



**Universidade Federal Fluminense**

**Instituto de Biologia**

**Departamento de Biologia Celular e Molecular (GCM)**

***Roteiro de Aulas Práticas - Bioquímica***





Instituto de Biologia  
Departamento de Biologia Celular e Molecular  
Disciplina: Bioquímica

### **Sumário**

<b>1. Noções Básicas de Biossegurança.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Aula Prática 1- Pipetagem e diluição.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Aula Prática 2 - Titulação de aminoácidos e estudo do efeito-tampão.....</b>	<b>11</b>
<b>4. Aula Prática 3 - Espectrofotometria.....</b>	<b>14</b>
<b>5. Aula Prática 4 - Estudo Físico-Químico das Proteínas.....</b>	<b>19</b>
<b>6. Aula Prática 5 - Cinética Enzimática.....</b>	<b>23</b>
<b>7. Aula Prática 6 - Simulação da Separação de Isoenzimas Creatina Quinase por Eletroforese.....</b>	<b>28</b>
<b>8. Aula Prática 7 - Fermentação.....</b>	<b>31</b>
<b>9. Aula Prática 8 - Urinálise.....</b>	<b>34</b>
<b>10. Aula Prática 9 - Dosagem de glicose.....</b>	<b>37</b>
<b>11. Aula Prática 10 - Dosagem de ureia.....</b>	<b>39</b>



**Instituto de Biologia**  
**Departamento de Biologia Celular e Molecular**  
**Disciplina: Bioquímica**

***Noções Básicas de Biossegurança***

Os laboratórios de ensino e experimentação desempenham um papel fundamental na formação acadêmica e profissional de estudantes nas áreas das ciências da vida. No entanto, esses ambientes também apresentam potenciais riscos à saúde e segurança dos alunos, professores e demais colaboradores, devido à manipulação de substâncias químicas, agentes biológicos e equipamentos específicos. A biossegurança em laboratórios de ensino e experimentação é um conjunto de práticas e medidas destinadas a minimizar esses riscos, protegendo a saúde e o bem-estar de todos os envolvidos. Essas medidas visam prevenir acidentes e exposições a agentes nocivos, garantindo um ambiente de trabalho seguro e produtivo.

**Objetivo:** Garantir a segurança individual e coletiva, bem como a reprodutibilidade da metodologia e dos resultados obtidos durante as atividades práticas no laboratório de Bioquímica. É fundamental seguir rigorosamente todas as normas de biossegurança para prevenir acidentes e garantir a integridade física e a saúde de todos os envolvidos.

**Normas básicas de biossegurança**

- É obrigatório o uso de EPIs (Equipamentos de Proteção Individual), incluindo jaleco de mangas longas, calça comprida, calçados fechados e, quando necessário, óculos de proteção e luvas descartáveis;

Os EPIs devem ser utilizados desde o início até o término da prática, mesmo que não estejam em contato direto com substâncias químicas e agentes biológicos;

- É proibido comer, beber, mascar chiclete, colocar ou tirar lentes de contato dentro do laboratório;

- Cabelos compridos deverão estar presos; evite passar os dedos na boca, nariz, olhos e ouvidos durante a permanência no laboratório;

- Seja cuidadoso ao manusear substâncias corrosivas como ácidos e bases;

- Após a realização do experimento e finalização da aula, rinse a vidraria utilizada com água e coloque-a no local indicado para a lavagem.

- ***Higienização das mãos***

Antes e após as atividades no laboratório, é imprescindível lavar as mãos com água e sabão.

- ***Manipulação de substâncias químicas***

Sempre siga as instruções, fornecidas pelo professor, de uso e manipulação das substâncias químicas presentes no experimento.

Evite o contato direto com a pele e mucosas.

- ***Descarte de resíduos***

Separe adequadamente os resíduos sólidos e líquidos, seguindo as orientações de descarte estabelecidas pelo laboratório.

Utilize recipientes específicos para materiais cortantes e perfurantes.

- ***Procedimentos em caso de acidentes***

Em caso de acidente, como derramamento de substâncias químicas ou corte, informe imediatamente ao professor responsável.

Utilize os equipamentos de segurança adequados para a situação e siga as instruções para prestação de primeiros socorros.

- **Conduta ética e responsável**

Mantenha uma postura ética e responsável durante todas as atividades no laboratório, respeitando as normas de segurança e o ambiente de trabalho.

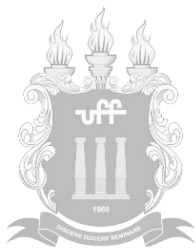
- **Treinamento e capacitação**

Todos os usuários do laboratório devem receber treinamento adequado sobre as normas de biossegurança e os procedimentos específicos de cada experimento antes de iniciar as atividades práticas.

A segurança no laboratório é responsabilidade de todos. Ao seguir rigorosamente as normas de biossegurança, garantimos um ambiente de trabalho seguro e produtivo para todos os envolvidos.

**Observação:** Este roteiro de normas básicas de biossegurança é uma diretriz inicial e deve ser complementado pelas políticas específicas do laboratório e pelas regulamentações da Comissão de Biossegurança do Instituto de Biologia - CBio-IB (<http://cibioib.sites.uff.br>).

As informações relacionadas à terminologia, encontrada nas Fichas de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQs), sistema de classificação de perigo – pictogramas de perigo – do Sistema Globalmente Harmonizado (GHS) - (elaborada pela CBio-IB/UFF), podem ser encontradas em: <http://cibioib.sites.uff.br>



**Instituto de Biologia**  
**Departamento de Biologia Celular e Molecular**  
**Disciplina: Bioquímica**

## ***Aula Prática 1 – Pipetagem e diluição***

Constantemente, os laboratórios de ensino e pesquisa precisam garantir a qualidade das suas análises e experimentos. Dentre os diversos fatores cruciais para tal garantia, os instrumentos de medição têm papel relevante, no que se refere a aferições precisas de volumes. Nesse contexto, as pipetas manuais e as automáticas (micropipetas) destacam-se, pois são instrumentos de alta precisão na medição e transferência de volumes. Vale ressaltar que alguns fatores podem interferir na exatidão da medição desses volumes: o conhecimento e habilidade do operador em manuseá-las é um deles. Portanto, conhecer e praticar corretamente a técnica de **pipetagem** é fundamental para obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis.

**Objetivo:** Apresentar ao estudante: a definição, aplicação e principais características que envolvem uma pipeta/micropipeta, ressaltando pontos-chave para a escolha do modelo correto.

### **Materiais:**

- Pipetas manuais de diferentes tipos e volumes;
- Vidrarias comumente utilizadas no laboratório para aferir volume (balão volumétrico e proveta);
- Tubos de ensaio;
- Micropipetas;
- Solução de azul de metileno (1%);
- Pipetadores.

### **Procedimentos:**

#### **1- Apresentação das diferentes pipetas (demonstração)**

As pipetas podem ser **de plástico ou de vidro, manuais ou automatizadas**. Vale destacar que existem pipetas para diferentes quantidades de líquido a ser transferido, que compreendem desde a escala de mililitros (mL) até uma escala de volume muito pequena, como microlitros ( $\mu$ l).

As pipetas são confeccionadas “**para conter**” (TC) ou “**para entregar**” (TD) um volume especificado de líquido. As TC conterão um determinado volume, mas não dispensarão no frasco o volume exato. Nessa pipeta, a inscrição TC (*to contain*) é indicada; as que possuem a inscrição TD (*to deliver*) dispensarão, no frasco desejado, exatamente o volume indicado. As inscrições TC ou TD encontram-se carimbadas no corpo da pipeta.

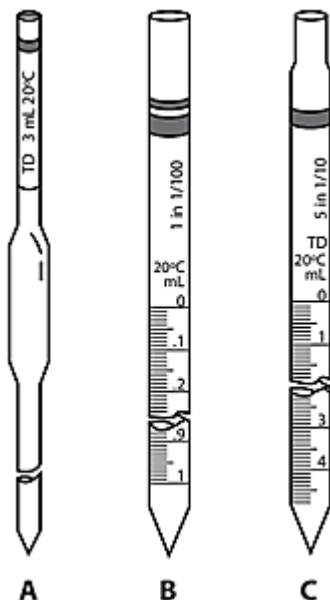
#### **- Manuais**

**Pipeta Graduada:** Tubo de vidro, também pode ser de plástico, que apresenta graduações, em mililitros, ao longo de sua estrutura, o que possibilita a sucção de quantidades variadas de líquido. Utilizada para a medição de pequenos volumes e não são consideradas exatas para medir amostras e padrões. Há dois tipos:

- Pipeta graduada de escoamento parcial: São identificadas por duas linhas coloridas no topo da pipeta e são usadas para medições precisas, onde a gota retida na ponta **não** faz parte do volume medido; é desconsiderada.

- Pipeta graduada de escoamento total (sorológica): A escala de medição se estende por todo o tubo, desde a ponta até a extremidade superior, permitindo a medição e transferência de diferentes volumes, dentro de sua capacidade total. São calibradas para que **todo** o líquido possa ser transferido. No topo, apresenta uma linha colorida.

**Pipeta Volumétrica:** Pipeta que possibilita o transporte de um determinado volume; possui um bulbo cilíndrico contendo um tubo estreito em cada extremidade; a marca do volume fica gravada na parte superior da pipeta.



**A:** Pipeta volumétrica; **B:** Pipeta graduada de escoamento parcial; **C:** Pipeta graduada de escoamento total (sorológica).

**Pipeta de Pasteur:** Criada pelo médico francês Louis Pasteur, é simples, descartável e, geralmente, produzida em plástico. Apresenta abertura somente em sua base para entrada do líquido. Na outra extremidade, apresenta um “balão” que, ao ser pressionado, expelle o ar para o exterior da pipeta e, posteriormente, o líquido é sugado para o interior. Utilizada para transferência de pequenos volumes, sem a necessidade de grande precisão na medida.



#### - Automáticas

São extremamente exatas e precisas na transferência de volumes de líquido na escala de microlitros. Podem ser de volume fixo ou variável, dependendo do modelo. A sucção de líquido ocorre por deslocamento de ar, pois ao pressionar o êmbolo, o pistão, no interior da pipeta, se desloca para baixo e expulsa o ar (de acordo com o volume ajustado pelo operador, previamente). Assim, o volume do líquido aspirado é igual ao volume de ar deslocado pelo pistão.

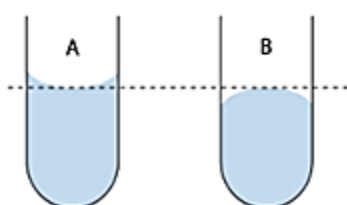


**Pipeta automática - volume variável**

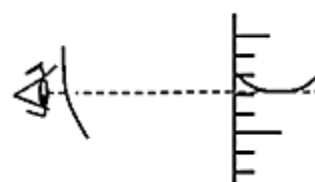
A utilização da pipeta automática requer o uso de ponteiros descartáveis que devem ser ajustadas corretamente e de forma precisa à micropipeta.

**Para uma pipetagem precisa, atente-se para:**

- Padronização da pipetagem: Aperte o botão até o primeiro estágio, mergulhe a ponteira no líquido (sem encostar o corpo da pipeta no líquido) e aspire-o, soltando o botão. Remova a pipeta do líquido e aperte o botão até o segundo estágio, garantindo a dispensação total do conteúdo;
- Imersão da ponteira: Para pipetas de volume micro, a imersão da ponteira deve ser entre 1-2mm; já para pipetas de volumes maiores, esse valor seria de 3 a 6mm. Quando imergir a ponteira, o ângulo deve ser o mais vertical possível, não desviando mais do que 20° da vertical. Um ângulo superior faz com que uma quantidade maior de líquido seja aspirado. Dispensar até a última gota. Em grande parte das aplicações, dispensar com a extremidade da ponteira contra a parede do recipiente, pois isso reduz ou elimina a quantidade remanescente de amostra na ponteira— técnica na qual pode aumentar a precisão em 1% ou mais;
- Utilizar a pipeta sempre na vertical. Quando for observar o menisco\* - curva formada na superfície de um líquido, em um recipiente, contendo um determinado volume - os olhos devem estar posicionados na altura do mesmo, conforme imagens abaixo:



**Formas do Menisco:** (A) côncavo; (B) convexo



**Forma correta:** leitura do menisco

Fonte: <https://nutrifaciplac.wordpress.com/wp-content/uploads/2018/08/protocolo-de-aula-prc3a1tica-i-de-ioquc3admica-docx.pdf>

\* O menisco é a curva na superfície superior de um líquido próximo à superfície do recipiente ou de outro objeto. Ele é causado pela tensão superficial. Pode ser convexo ou côncavo, dependendo do líquido e da superfície. Observado nas análises volumétricas em que se utiliza, por exemplo, pipeta, proveta\*\*, balão volumétrico\*\*\*.

- Nunca pipetar com a boca - utilize sempre um dispositivo (pipetador\*\*\*\*) para auxiliá-lo;
- Utilizar pipetas limpas e secas;
- Utilizar pipetas com volume total o mais próximo possível do volume a ser medido;
- O fluxo do líquido deve ser contínuo, tanto na aspiração, quanto na dispensação.

**\*\*Proveta:** Tubo, de vidro ou plástico, graduado usado para medir volumes aproximados de líquidos. Apresenta precisão menor que pipetas ou balões volumétricos.



**\*\*\*Balão Volumétrico:** Utilizado para aferir, com alta precisão, uma quantidade específica de volume.



**\*\*\*\*Pipetadores:** (A) Pera-confeccionado de borracha - atua como uma fonte de vácuo para o seu preenchimento, auxiliando no controle do fluxo e do volume aspirado; (B) *Pi-pump* - não possuem botão para sucção, mas sim um disco que promove o controle do volume de entrada do líquido.



A



B

**Béquer (Becker):** Material cilíndrico de plástico ou vidro de fundo plano, amplamente usado em laboratórios de pesquisa e ensino para reações em geral, incluindo misturar, dissolver sólidos, transferir e aquecer líquidos e preparar soluções. Apesar de conter escalas para leitura de volume, **não é um instrumento de precisão.**

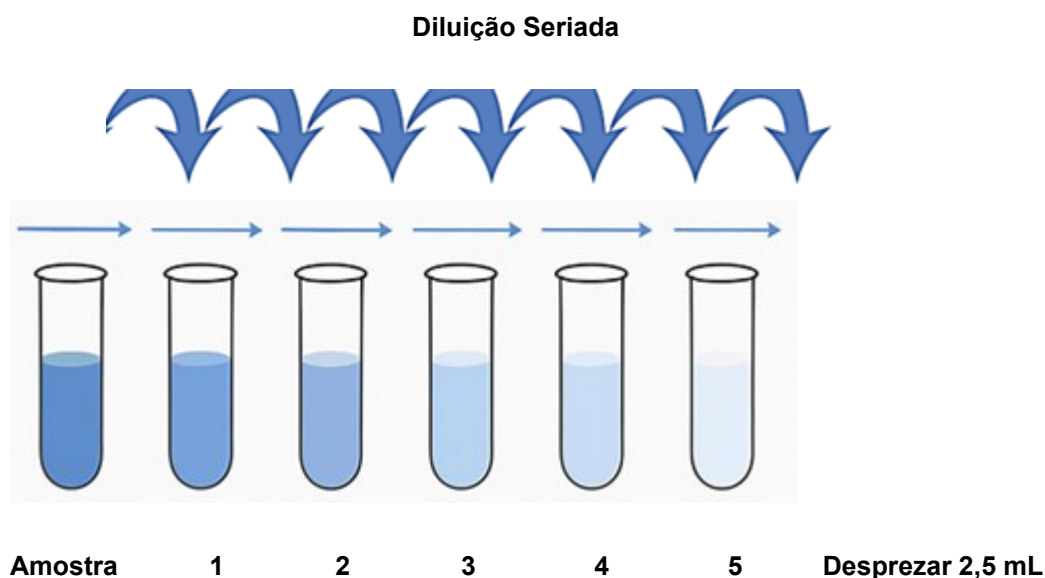


## 2- Prática Experimental - Realização de diluição seriada

Diluir progressivamente uma solução de azul de metileno (1%) de forma proporcional utilizando pipeta de vidro ou micropipeta.

### Procedimento:

- I- Distribua em 5 tubos de ensaio 2,5 mL de água destilada;
- II- Ao tubo 1, adicionar 2,5 mL da solução de azul de metileno 1% (amostra), conforme figura abaixo;
- III- Homogenize a solução;
- IV- Transfira 2,5 mL do tubo 1 para o tubo 2 e homogenize;
- V- Transfira 2,5 mL do tubo 2 para o tubo 3 e homogenize;
- VI- Realize o mesmo procedimento sucessivamente até o último tubo, conforme figura abaixo;
- VII- Ao final, aponte as concentrações finais das soluções.



**Questões para discussão:**

1- Qual o fundamento da diluição seriada?

2- Um técnico de laboratório precisa preparar uma diluição de 1:20 de soro para a realização de um teste imunológico. Ele necessita preparar um volume final de 100 microlitros da referida diluição. Qual volume de soro ele deverá pipetar para preparar corretamente a diluição?

3- Quais as aplicações da diluição seriada?



**Instituto de Biologia**  
**Departamento de Biologia Celular e Molecular**  
**Disciplina: Bioquímica**

## ***Aula Prática 2 – Titulação de aminoácidos e estudo do efeito-tampão***

Os aminoácidos possuem no mínimo dois grupos (pois o R também pode ser ionizável) que podem sofrer protonação e desprotonação e essas reações dependerão do pH da solução em que os aminoácidos se encontram. Sendo assim, os aminoácidos podem participar do tamponamento de soluções, sendo este fenômeno um dos fatores que possibilitou o surgimento da vida.

**Objetivo:** Construir curvas de titulação de aminoácidos, determinando os valores de pK de cada um deles e estudar o efeito tamponante de diferentes soluções utilizando-se o pHmetro, também chamado de medidor de pH.

### **Materiais:**

- H<sub>2</sub>O destilada;
- 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;
- Béqueres de vidro;
- pHmetro (medidor de pH);
- Pipetas automáticas;
- Placa agitadora;
- Barras magnéticas.

### **Procedimentos:**

- **Ajuste do medidor de pH**

- Ligar o aparelho;
- Retirar o eletrodo do recipiente (com cuidado) contendo solução de KCl 3M e lavá-lo com água destilada.
- Imergir o eletrodo na solução-padrão de pH 7 (com cuidado) e calibrar o aparelho no botão adequado.
- Retirar o eletrodo da solução (com cuidado) 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 o eletrodo não estiver imerso em uma solução.

- **Titulação de 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 valor de pH, após cada adição (adicionar o NaOH diretamente à solução, sem esbarrar no eletrodo ou na parede interna do béquer).
- Construir o gráfico de pH da solução versus volume de NaOH adicionado.

- **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 <sub>2</sub> O
1	10 mL	10 mL	--
2	5 mL	5 mL	10 mL
3	12,5 mL	7,5 mL	--
4	7,5 mL	12,5 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.

### 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<sub>a</sub> 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<sup>+</sup>] é igual à concentração de íons acetato, podemos reescrever a reação de dissociação da seguinte forma:  $0,2 - y = y \times y$ ).

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

Sendo assim a expressão de equilíbrio pode ser: 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?



**Você Sabia?**

*O ácido glutâmico é o principal responsável pelo sabor umami, reconhecido como o quinto gosto básico, ao lado de doce, salgado, azedo e amargo. O ácido glutâmico produz o sabor umami porque ativa receptores específicos nas papilas gustativas. Essa interação gera a sensação de sabor encorpado e persistente, base do uso do glutamato monossódico (MSG) como realçador do sabor.*



**Instituto de Biologia**  
**Departamento de Biologia Celular e Molecular**  
**Disciplina: Bioquímica**

### ***Aula Prática 3 – Espectrofotometria***

O termo espectro foi utilizado inicialmente por Isaac Newton, quando este descobriu que a luz branca ao atravessar um prisma, se dividia em várias cores. Atualmente, sabe-se que o espectro visível (luz branca) 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 ( $\lambda$ ) é medido em nanômetros (nm) onde 1,0 nm equivale a  $10^{-9}$  metros. A tabela abaixo mostra as regiões do espectro em relação ao comprimento de onda.

<b>Região</b>	<b>Comprimento de onda (<math>\lambda</math>) em nm</b>
raios X	0,1-100
ultravioleta	100-400
visível	400-800
infravermelho	800-5000
microondas	5000-30000

A cor dos objetos é devida a duas causas: reflexão e absorção. Assim, um papel transparente vermelho recebe todos os  $\lambda$  da luz branca, mas reflete e transmite somente o vermelho, sendo o restante absorvido. Quando um objeto é da cor branca, todos os  $\lambda$  são absorvidos. No entanto, existe uma cor ou  $\lambda$  que é mais absorvido, que corresponde à chamada cor complementar. Se uma solução absorve na faixa 435 - 480 nm, que corresponde a radiação azul, a sua cor (cor complementar) será o amarela, ou seja, 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.

<b>Intervalo <math>\lambda</math> (nm)</b>	<b>Cor</b>	<b>Cor complementar</b>
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

A capacidade que as diversas substâncias químicas têm de absorverem luz em determinados comprimentos de onda pode ser utilizada para a sua determinação quantitativa e qualitativa, uma vez que o espectro de absorção (intensidade) é dependente da concentração do composto (analito).

A intensidade da radiação transmitida por uma solução pode ser determinada em aparelho (fotômetro) que é constituído de: uma fonte luminosa, um seletor de  $\lambda$  (filtro ou prisma); compartimento para a amostra (porta-cubeta); célula fotoelétrica e sistema para amplificação e medida do sinal (corrente elétrica) proveniente da célula fotoelétrica. Pode-se selecionar o  $\lambda$  que incidirá sobre a solução usando-se um prisma ou um filtro óptico. Se o aparelho dispõe de

filtro óptico é denominado fotômetro ou fotocolorímetro e se dispôr de prisma; espectrofotômetro. Este último é muito útil, pois pode selecionar faixas de comprimento de onda extremamente estreitas nas regiões de UV, visível e infravermelho. 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 infravermelho. Esta metodologia, por conseguinte, tem largo emprego na química analítica quantitativa. Alguns exemplos da utilização desta técnica: na determinação de atividade enzimática ou nas dosagens de compostos orgânicos em fluidos biológicos, como glicose, uréia, proteínas, etc., onde se dosa um produto colorido, um produto tornado colorido através de uma reação química ou um produto que absorva na região do UV ou infravermelho. Técnicas imunológicas quantitativas (como o ELISA) também usam a fotometria.

- **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 dessa solução. Esta interferência depende:

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

Desta forma, as partículas podem absorver e transmitir parte do espectro dependendo da sua concentração, natureza química e/ou cor. Se pudermos medir o total de luz que incide (luz incidente -  $I_0$ ) em uma solução de determinada substância e o total desta mesma luz que foi transmitida ( $I_t$ ) podemos avaliar o quanto a substância absorveu. Desta forma funciona um fotômetro ou espectrofotômetro. Observe que o termo transmissão tem aplicação limitada, já que,  $I_t$  é  $I_0$  menos a luz que é absorvida não só pela substância que se deseja medir, mas também pela água ou solvente utilizado, 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, utiliza-se considerar  $I_t$  (**100 % de Transmitância**) a luz transmitida após  $I_0$  atravessar a cubeta contendo uma solução denominada de “branco”. Este “branco” contém todos os componentes do meio, exceto a substância a ser analisada. No escuro, bloqueada a passagem de luz para o fototubo (fotocélula), a **Transmitância é igual a zero (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 de luz), é pouco utilizada, pois é substituída pelo valor de densidade ótica (**D.O.**) ou absorvância (**A**), termo mais aceito atualmente que corresponde ao logaritmo do inverso da transmitância: A palavra “absorvância” também pode ser chamada de “absorbância”.

$$A = \log 1/T$$

A absorvância é desta forma, medida em uma escala de 0 (log 1/1) a infinito (log 1/10). A relação da **A** com a concentração da substância pode ser compreendida pela Lei de Lambert-Beer, onde a absorvância de uma solução é proporcional à concentração da substância na solução e à distância percorrida pelo feixe luminoso através da solução (caminho ótico):

$$A = \epsilon \cdot 1 \cdot c$$

onde  $\epsilon$  = coeficiente de extinção molar (constante para cada substância, é definida como a **A** de uma solução 1 M da substância num dado comprimento de onda e em uma cubeta de 1 cm de caminho ótico); 1 = largura da cubeta (caminho ótico); c = concentração da substância. 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, a lei de Lambert-Beer tem algumas exceções. Tais anomalias têm sido atribuídas a uma mudança na natureza do soluto, com uma concomitante mudança na concentração. Alguns ácidos, bases e sais em solução, não obedecem a esta lei por estarem mais completamente ionizados à medida que aumenta a diluição (devido a absorção de luz dos íons diferir das moléculas não ionizadas). Para evitar discrepâncias da Lei de Lambert-Beer, deve-se trabalhar com soluções mais diluídas e construir previamente, uma curva padrão ou de referência, onde se executa um experimento com soluções de concentrações conhecidas e crescentes da substância a se determinar e verifica-se a absorvância no comprimento de onda indicado e na cubeta de caminho óptico adequados. Desta forma, teremos os limites de concentração onde a substância obedece a Lei de Lambert-Beer, ou seja, onde há linearidade. Através da curva padrão, podemos também determinar a concentração de valor desconhecido em uma solução problema. O comprimento de onda é escolhido através da execução do espectro de absorção da substância, determinando-se, normalmente, o  $\lambda$  em que a absorvância, para a substância em questão, é máxima.

**Objetivos: 1ª parte da prática** - Determinar o espectro de absorção das soluções corantes (azul e amarelo) nos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 380, 410, 430, 450, 470, 490, 510, 540, 590, 620, 650, 680 e 710 e identificar o  $\lambda$  onde ocorre absorção máxima; **2ª parte da prática** - Obtenção da curva padrão através da diluição seriada de cada solução corante.

#### **Materiais:**

- Solução do corante azul 1 mg/100 mL;
- Solução do corante amarelo 1 mg/100 mL;
- H<sub>2</sub>O destilada;
- Espectrofotômetro faixa visível;
- Tubos de ensaio;
- Cubetas de plástico de 1,0 ou 3,0 mL;
- Balões de borracha;
- Pipetas Pasteur de plástico;
- Pipetas automáticas de 1 mL ou de 5 mL;
- Agitador de tubos;
- Caneta marca-tubo.

#### **Procedimentos:**

- **1ª parte da prática (obtenção do espectro de absorção)**

1. Ligar o espectrofotômetro (observe atentamente a voltagem do equipamento e da tomada);
2. Ajustar inicialmente o comprimento de onda ( $\lambda$ ) para 380 nm usando o seletor do aparelho;
3. Ajustar o 100 % de transmitância (T) e o zero % de absorvância (A), sem as cubetas, no botão correspondente do espectrofotômetro. Esperar o equipamento fazer a calibração. Leia em seguida, os tubos sempre em absorvância (A);
4. Colocar a cubeta contendo água destilada (branco) no porta-cubetas do aparelho e ajustar novamente o zero % de absorvância. Esse procedimento é chamado de “zerar” o aparelho;

5. Colocar uma outra cubeta no porta-cubetas contendo a solução colorida (azul ou amarelo), e anote a absorvância registrada neste comprimento de onda, 380 nm;
6. Em seguida, com auxílio do seletor ajuste o comprimento de onda para 410 nm;
7. Ler a cubeta contendo água destilada e “zerar” o aparelho neste comprimento de onda;
8. Ler a cubeta com a solução colorida (azul ou amarelo) e registrar a leitura em absorvância;
9. Repetir novamente o mesmo procedimento nos comprimentos de onda mostrados na tabela 1;
10. Anotar os valores obtidos de absorvância na tabela 1 e construir um gráfico. No eixo Y, coloque os valores de absorvância (A), e no eixo X, os comprimentos de onda ( $\lambda$ ) em nanômetro.

**Atenção:** a cada seleção do comprimento de onda, o *espectrofotômetro deve ser “zerado”* com água antes de realizar a leitura da solução colorida.

**Tabela 1: Obtenção do espectro máximo de absorção da solução colorida**

Comprimento de onda ( $\lambda = \text{nm}$ )	Absorvância (A) Azul	Absorvância (A) Amarelo
380		
410		
430		
450		
470		
490		
510		
540		
590		
620		
650		
680		
710		

• **2ª parte da prática (obtenção da curva padrão)**

1. Numerar os tubos de ensaio de 1 a 6;
2. Pipetar 2,0 mL de água destilada em todos os tubos;
3. Pipetar 2,0 mL da solução estoque colorida (azul ou amarela) apenas no tubo 1 e agitar no vortex;
4. Retirar 2,0 mL deste tubo 1 e colocar no tubo 2, e agitar no vortex;
5. Retirar 2,0 mL deste tubo 2 e colocar no tubo 3, e agitar no vortex;
6. Repetir esse procedimento até o tubo 6;
7. Retirar 2,0 mL do tubo 6 e descartar;
8. Pegar duas cubetas de plástico e, em uma delas, colocar somente 2,0 mL de água destilada. E, a outra cubeta será utilizada para ler todos os tubos (1 a 6) no comprimento de onda onde a absorção foi máxima, que foi obtido na 1ª parte da prática. Sugere-se que os tubos experimentais devam ser lidos nesta ordem: do tubo 6 para o tubo 1. Anotar os valores de absorvância na tabela 2;
9. Monte o gráfico da seguinte maneira: no eixo Y, coloque os valores de absorvância (A). E, no eixo, X, os respectivos tubos.

**Atenção:** cada tubo deve ter 2 ml de volume final.

**Tabela 2: Valores de Absorvância da diluição seriada da solução colorida**

Tubos	Absorvância (A) (corante azul)	Absorvância (A) (corante amarelo)
1		
2		
3		
4		
5		
6		

### Questões para discussão:

- 1- O que é um espectro de absorção? Como ele é obtido?
- 2- Por que geralmente é mais correto e exato medir absorvância na faixa de 0,2 a 0,9?
- 3- A lei de Lambert-Beer pode ser aplicada em toda faixa de concentração de uma amostra? Justifique.
- 4- Discurse sobre a lei de Lambert-Beer.
- 5- Qual a importância da espectrofotometria na pesquisa científica e na área laboratorial?
- 6- Caso você queira realizar a leitura em absorvância de uma solução de cor vermelha, como seria o procedimento?
- 7- Qual o objetivo da 2ª parte do experimento?
- 8- Seria possível realizar a leitura no espectrofotômetro de uma solução de cor vermelha em comprimento de onda de 420 nm? Justifique.

### Você Sabia?

O oxímetro é usado em diversas situações de suporte médico e tem por função analisar a saturação de oxigênio no sangue (razão entre a concentração de hemoglobina oxigenada e a concentração total de hemoglobina no sangue). O equipamento utiliza luz e os princípios da espectrofotometria, uma vez que a oxihemoglobina absorve mais luz no comprimento de onda de 950nm, enquanto a desoxihemoglobina absorve mais no comprimento de onda de 650nm. Dependendo da quantidade de oxi e desoxihemoglobina no sangue, o aparato calcula a proporção entre a quantidade de luz vermelha absorvida em comparação com a infravermelha, resultando em leitura de saturação de oxigênio (Cheung A., Macnab A., Kwon B. K., Shadgan B. *Detection of hypoxia by near-infrared spectroscopy and pulse oximetry: a comparative study. Journal of Biomedical Optics, Vol. 27, Issue 7, 077001; July 2022*).



complexos (como tricloroacético, tânico e fosfotúngstico) formam sais insolúveis nos quais a proteína funciona como cátion. Metais pesados (como cobre, zinco, prata e mercúrio) em meio alcalino formam precipitados nos quais a proteína atua como ânion. Assim, esses métodos são empregados quando se deseja desproteínizar uma solução, visando analisar outro soluto, e não as proteínas.

O etanol, por possuir uma constante dielétrica menor do que a da água, pode ser utilizado para precipitar proteínas, pois ao ser adicionado a uma solução proteica, as proteínas tendem a se associar e precipitar.

Os aminoácidos componentes de uma proteína podem ser genericamente detectados 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.

**Objetivos:** **i-** Realizar reação específica para detecção de proteínas utilizando-se o reativo de Biureto; **ii-** Realizar reação específica de detecção de aminoácidos, através da reação com a ninhidrina; **iii-** Verificar a alteração de solubilidade de proteínas em presença de soluções salinas e solventes orgânicos; **iv-** Verificar a ação de agentes desnaturantes e precipitantes na solubilidade de proteínas; **v-** Observar a separação cromatográfica (cromatografia de exclusão molecular) de substâncias de pesos moleculares diferentes.

#### **Materiais:**

- Reagente de Biureto:  $\text{CuSO}_4$  em solução alcalina;
- Solução diluída de proteína;
- Solução concentrada de proteína;
- Solução de ninhidrina 0,1 g % (P/V);
- Solução de aminoácidos;
- Solução de prolina;
- 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;
- Coluna de vidro contendo a resina cromatográfica Sephadex G-25 (faixa de separação PM 1000-5000 Da);
- Solução contendo compostos de diferentes pesos moleculares (azul de dextran: 2.000.000 Da; vitamina B<sub>12</sub>: 1355 Da em tampão pH 7,0, contendo sacarose).

#### **Procedimentos:**

- **Reação de Biureto**

Preparar as amostras, conforme tabela a seguir:

Tubos	H <sub>2</sub> O destilada (mL)	Solução diluída de proteínas (mL)	Solução de aminoácidos (mL)	Reativo de Biureto (mL)
1	0,5	-	-	1
2		0,5	-	1
3		-	0,5	1

- Agitar e comparar o desenvolvimento de cor nos tubos.

- **Reação da Ninhidrina**

Preparar as amostras conforme tabela abaixo:

Tubos	H <sub>2</sub> O destilada (mL)	Solução Diluída de proteínas (mL)	Solução de Aminoácidos (mL)	Solução de Prolina (mL)	Solução de Ninhidrina (mL)
4	0,5	-	-	-	2
5	-	0,5	-	-	2
6	-	-	0,5-	-	2
7	-	-	1	0,5	2

- Após a adição das amostras, agitar e colocar os tubos de ensaio em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Comparar o desenvolvimento de cor nos tubos.

- **Precipitação Ácida**

- Em um tubo de centrifuga (**tubo 8**): colocar 1 mL de TCA 10% (P/V) + 1 mL da solução diluída de proteínas;

- Agitar e observar. Centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm na centrifuga clínica, separando as frações - sobrenadante (SOB) e precipitado (PPT);

- Remover completamente o SOB e transferir um volume de 0,5 mL para o tubo **9**;

- Adicionar tampão ao tubo **8** que está com o PPT. Agitar e verificar se o PPT foi ou não solubilizado.

- Adicionar 1 mL de reativo de Biureto aos **tubos 8 e 9**. Agitar e observar se houve ou não aparecimento de cor.

- **Efeito da Adição de Sais**

- Em um tubo de centrifuga (**tubo 10**), adicionar 2 mL da solução diluída de proteínas + 2 mL da solução saturada de sulfato de amônio. Agitar. Centrifugar a 3000rpm por 10 minutos, separar as frações - sobrenadante e precipitado. Adicionar 1 mL de tampão ao precipitado e agitar. Verificar o que acontece.

- Colocar o sobrenadante no tubo de centrifuga (**tubo 11**). Adicionar igual volume de TCA 10% (P/V), agitar e centrifugar novamente. Se aparecer algum precipitado, tentar dissolvê-lo com 1 mL de tampão.

- **Efeito da adição de solventes orgânicos**

- Em um tubo (**tubo 12**) colocar 1mL da solução de proteínas concentrada + 2mL de etanol gelado (lentamente pela parede do tubo). Observar o aparecimento de uma ligeira interface e turvação.

- **Cromatografia em Peneira Molecular:**

- Numa coluna de vidro (aprox. 30 x 1,5 cm), foi colocado previamente o gel Sephadex G25 suspenso em tampão pH 7,0;

- Aplicar cerca de 1mL da amostra (solução contendo azul de dextran, vitamina B12 e sacarose) diretamente sobre a superfície do gel, que deverá estar com cerca de 2 cm de tampão. Como a amostra está mais densa, devido à presença da sacarose, esta amostra se depositará sobre o gel.

- Observar a ordem de eluição dos componentes da amostra.

### Questões para discussão:

1- Explique o que ocorreu em cada etapa executada (etapas 1 a 6).

- 2- Pelos resultados obtidos no experimento realizado, podemos afirmar que a solução de sulfato de amônio saturado precipitou todas as proteínas? Por quê? Como podemos saber se está precipitação é reversível ou não?
- 3- Pelos resultados obtidos, podemos afirmar que o etanol gelado precipitou todas as proteínas? Por quê? Como poderíamos comprovar isto? O precipitado obtido (após centrifugação) seria dissolvido em tampão? Por quê?
- 4- Qual foi a ordem de eluição das amostras (azul de dextran + vitamina B12) na coluna cromatográfica (item 4.7)? Por quê?



**Você Sabia?**

*A produção de hemoderivados teve início durante a Segunda Guerra Mundial. Nesse período, houve o desenvolvimento da hemoterapia e surgiram técnicas para a coleta e congelamento de plasma. Em meados da década de 1940, foi criado o método de Cohn, desenvolvido para a produção de albumina por meio da precipitação em etanol. Esse método é utilizado em escala industrial até hoje, com algumas modificações (Featherstone PJ, Ball CM. The development of albumin solutions in the Second World War. Anaesth Intensive Care. 2023 Jul;51-4:236-238).*



**Instituto de Biologia**

**Departamento de Biologia Celular e Molecular**

**Disciplina: Bioquímica**

### ***Aula Prática 5 – Cinética Enzimática***

As enzimas são catalisadores biológicos que aceleram a velocidade de reações químicas espontâneas, ou seja, aquelas que ocorrem associadas à liberação de energia, denominadas exergônicas. Sua natureza química é proteica, embora atividades catalíticas sejam encontradas, também, em alguns tipos de moléculas de RNA. As enzimas não alteram a constante de equilíbrio nem a variação de energia livre das reações que catalisam, sendo regeneradas, sob a forma original, ao final do processo. Durante a reação, as moléculas de substratos (S) são convertidas em produtos (P), de acordo com a reversibilidade da reação definida por sua constante de equilíbrio. De modo geral, as enzimas são específicas em relação aos substratos que utilizam, formando um complexo com estes durante o processo de catálise:



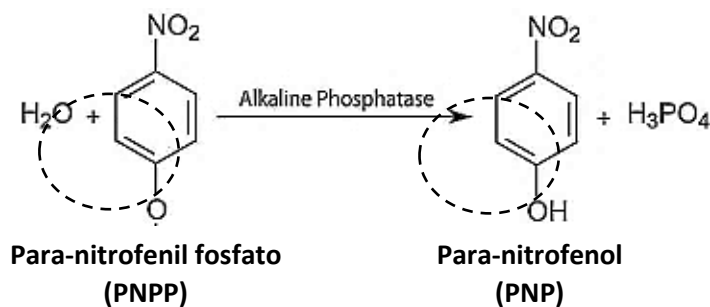
Algumas teorias foram elaboradas para explicar a interação entre a enzima e seus substratos. Na primeira delas, o modelo “**chave-fechadura**”, baseado na proposta original de Emil Fischer, previa que o sítio ativo da enzima seria complementar ao substrato, ou pelo menos a uma parte de sua estrutura. O segundo modelo, proposto por Haldane e Pauling, previa que o “**sítio ativo seria complementar ao estado de transição da reação**”. O terceiro modelo, proposto por Koshland em 1958, denominado “**ajuste (ou encaixe) induzido**”, previa que o substrato seria capaz de induzir alterações espontâneas no sítio ativo da enzima para que este se tornasse complementar ao estado de transição da reação, reduzindo a energia de ativação necessária para atingir o estado de transição da reação, uma espécie de barreira energética para a conversão espontânea dos reagentes em produtos.

Diferentes fatores podem influenciar na atividade de uma enzima e, conseqüentemente, na velocidade de uma reação por ela catalisada. Por terem estrutura proteica, alterações no pH, na temperatura, ou na força iônica do meio reacional podem afetar sua atividade. Por vezes, esses fatores podem afetar até mesmo a estrutura dos substratos. Como esperado, a concentração do complexo ES, definida a qualquer momento da reação pelas concentrações de substrato e de enzima no meio reacional, são determinantes para a velocidade da reação, pois a concentração de substrato tende a cair, em função de sua conversão em produto; enquanto a concentração de enzima tende a ser constante durante todo o ensaio enzimático. Sendo assim, podemos presumir que a velocidade da reação cai durante o ensaio, e que tende a zero quando a reação atinge seu equilíbrio.

A velocidade de uma reação catalisada por enzima pode ser determinada em função da quantidade de produto formado por unidade de tempo (caso mais comum), ou através da mensuração da quantidade de substrato consumido por unidade de tempo. O produto formado pode ser medido diretamente, através de alguma de suas propriedades físico-químicas, ou então através de uma reação química que resulte em um segundo produto que possua uma propriedade que permita sua quantificação. Uma propriedade frequentemente utilizada para mensurar a quantidade de produto formado durante o ensaio enzimático é a sua capacidade de absorver energia de radiações eletromagnéticas em comprimentos de onda específicos na faixa do visível, ou UV, de acordo com os princípios da espectrofotometria.

Os ensaios de atividade enzimática desenvolvidos nesta 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 substrato (para-nitrofenil fosfato - incolor), resultando na formação de um produto de cor amarelada, o para-nitrofenol, o qual possui a coloração potencializada em meio alcalino. Portanto, a determinação da concentração de produto formado será estimada pela intensidade da coloração amarela no meio reacional.



**Objetivo:** Avaliar alguns fatores que podem interferir na geração de produto, e que podem ser observados através de alterações na intensidade da coloração amarela no meio reacional, que será, sob certas condições, proporcional à concentração do produto formado. Os fatores a serem considerados no ensaio são o **tempo de reação**, a **concentração de substrato** e a **concentração de enzima**.

#### Materiais:

- Uma batata inglesa média (cerca de 110g);
- Substrato: para-nitrofenilfosfato (PNPP) de sódio 1mM (solução fresca) – **reagente termo e fotossensível**;
- NaOH 0,02N;
- Liquidificador;
- Funil;
- Peneira;
- Filtro de papel.

#### Procedimentos:

- **Preparo do extrato de batata inglesa contendo a enzima fosfatase**

- ✓ **Importante:** *O homogeneizado deve ser preparado apenas quando todos os outros componentes do ensaio (água e substrato) estiverem presentes nos tubos de ensaio.*

- Descascar a batata;
- Homogeneizar a batata descascada em 200mL de água, usando um liquidificador;
- Filtrar o homogeneizado, utilizando um funil, uma peneira e um filtro de papel.

- **Orientações gerais para os ensaios de atividade da enzima fosfatase**

- ✓ **Considerando-se apenas uma única exceção, o homogeneizado deverá ser sempre adicionado por último aos ensaios.**

- Numerar os tubos de ensaio que seu grupo vai utilizar;
- Colocar sempre os reagentes na mesma ordem, iniciando pela água e seguido pelo substrato em todos os tubos;
- Após adicionar o homogeneizado, agite a mistura suavemente e inicie a contagem do tempo para a adição de NaOH 0,02N;

- A incubação será realizada à temperatura ambiente;
- Após adicionar o NaOH, agite a mistura suavemente.

### Grupo 1 - Avaliação da influência do tempo de reação na geração de produto

- Preparar as amostras conforme informações contidas na tabela abaixo:

Tubo	Substrato (mL)	Água (mL)	Homogeneizado (mL)	Adicionar 2mL de NaOH 0,02N, após (min) de início da reação
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.
- Discuta os resultados com os colegas de seu grupo.

### Grupo 2 - Avaliação da concentração de enzima na geração de produto

- Preparar as amostras conforme informações contidas na tabela abaixo:

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 e agite-o;
- Observe a cor desenvolvida nos tubos (7-10).
- Discuta os resultados com os colegas de seu grupo.

### Grupo 3 - Avaliação da concentração de substrato na geração de produto

- Preparar as amostras conforme informações contidas na tabela abaixo:

Tubo	Substrato $\mu\text{m}$	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 a adição do homogeneizado, agite os tubos.

- **Ao final dos 10 minutos de reação**, adicione 2mL de NaOH 0,02N em cada tubo e agite-o;
- Observe a cor desenvolvida nos tubos (11-16).

- Discuta os resultados com os colegas de seu grupo.

### Questões para discussão:

- 1- Explique os resultados obtidos pelo seu grupo aos colegas da turma.
- 2- Por que a enzima (homogeneizado) deve ser adicionada por último ao ensaio?
- 3- Por que motivo o NaOH foi adicionado à reação?
- 4- Como são definidas as condições ótimas de ensaio de uma determinada reação enzimática?

### Exercícios complementares:

1. A variação da velocidade de uma reação catalisada por enzima em função de sua concentração foi analisada em 6 tubos.

Tubo	Enzima (mL)
1	-
2	0,2
3	0,4
4	0,6
5	0,8
6	0,8

Cada tubo dos seis tubos recebeu 0,6 mL de uma solução contendo 0,1 mM de substrato. A enzima estava contida num homogeneizado hepático (10g%), e foi adicionada aos tubos conforme os volumes indicados na tabela ao lado. O volume final em todos os tubos foi o mesmo (3 mL), sendo ajustado com tampão apropriado. **Ao final de 60 minutos de reação, a concentração de produto formado foi igual em quase todos os tubos, exceto os de número 1 e 6, sendo esse último incubado a temperatura de 0°C durante todo o ensaio.** Considere as informações fornecidas e discuta:

- a) Por que motivo a enzima não foi adicionada ao tubo 1?
  - b) Por que motivo foi observada a mesma concentração de produto nos tubos 2 a 5?
  - c) Qual seria o resultado esperado se o tempo de reação fosse de 5 minutos, mantendo-se todas as outras condições do ensaio enzimático?
  - d) Por que motivo, não foi observada a formação de produto no tubo 6?
  - e) Qual é a concentração de substrato no ensaio?
  - f)
2. **O ensaio de uma reação enzimática “in vitro”, onde a formação do produto P (fumarato), a partir do substrato S (succinato), é catalisada pela enzima E (succinato desidrogenase), foi realizado nas seguintes condições:**
- I) não sendo possível obter-se a enzima pura, usou-se o mesmo volume de extrato celular contendo a enzima em todos os tubos;
  - II) a concentração de substrato inicial estava em grande excesso, em relação a concentração de enzima;
  - III) o ensaio enzimático foi realizado em condições de pH e temperatura ótimas para a reação.

### O resultado obtido foi o seguinte:

a) A formação de produto cresceu significativamente, a taxa constante, entre o instante zero (início da reação) e os 10 minutos de reação;

b) a partir do 10º minuto de incubação, a velocidade de reação medida pela concentração de produto formado por minuto, começou a diminuir. Considere as informações fornecidas e discuta:

- a) Por qual motivo a taxa de formação de produto se manteve constante até o 10º minuto de ensaio?
- b) Por que motivo a velocidade da reação começou a diminuir a partir do 10º minuto de ensaio?
- c) O que seria esperado, se a concentração de enzima no ensaio fosse maior?



**Você Sabia?**

*Que as enzimas, presentes em células, purificadas ou imobilizadas em suportes, além das enzimas artificiais (nanoenzimas), podem ser utilizadas como ferramentas na detecção da presença de poluentes ambientais? Diversas enzimas podem ser inibidas por contaminantes ambientais, como metais pesados ou pesticidas, o que as torna uma ferramenta confiável e sensível na detecção da presença de poluentes antes, durante e após o processo de restauração de um determinado meio ambiente poluído (Rao MA, Scelza R, Acevedo F, Diez MC, Gianfreda L. Enzymes as useful tools for environmental purposes. Chemosphere. 2014 Jul;107:145-162).*



**Instituto de Biologia**  
**Departamento de Biologia Celular e Molecular**  
**Disciplina: Bioquímica**

## ***Aula Prática 6 – Simulação da Separação de Isoenzimas Creatina Quinase por Eletroforese***

As isoenzimas são enzimas que catalisam a mesma reação química, porém diferem em sua estrutura e em suas características cinéticas. Um exemplo são as isoenzimas da creatina quinase (CK; EC 2.7.3.2), que catalisam a reação reversível de fosforilação da creatina (Cr) em fosfocreatina (PCr), além da conversão de ATP em ADP, conforme descrito na equação abaixo:



A creatina quinase (CK) mitocondrial, juntamente com as isoenzimas citosólicas da CK e o produto de sua reação, a fosfocreatina, desempenham papel crucial no fornecimento de energia para a manutenção da homeostase celular. As isoenzimas citosólicas da CK são diméricas, compostas por subunidades B (tipo cerebral) e M (tipo muscular), que se combinam para formar três isoenzimas: CK-BB (CK1), CK-MB (CK2) e CK-MM (CK3). Devido a diferente expressão tecidual dos monômeros, ocorre distribuição tecidual específica das isoenzimas. A CK-BB é predominante no cérebro (100%) e na musculatura lisa gastrointestinal (96%); a CK-MB está presente principalmente no miocárdio (20% a 30%); e a CK-MM é a principal isoenzima do músculo esquelético (98%). O aumento dessas isoenzimas na circulação sanguínea indica dano estrutural tecidual, tornando-as biomarcadores úteis de lesões.

Em condições fisiológicas, o soro de indivíduos saudáveis contém predominantemente CK-MM. No entanto, em casos de infarto agudo do miocárdio, a CK-MB é liberada na circulação. Alterações nos níveis de CK-MM ocorrem em lesões e regeneração do músculo esquelético, como após exercícios extenuantes ou em distrofias musculares, enquanto o aumento de CK-BB está associado a lesões cerebrais. A quantificação dos níveis séricos totais de CK é realizada por meio da avaliação da taxa de reação catalisada. Entretanto, esse método não diferencia as isoenzimas. Para identificá-las e quantificá-las, são necessários métodos adicionais, como eletroforese em agarose ou acetato de celulose combinados com densitometria das bandas obtidas.

**Objetivo:** Interpretar os resultados da eletroforese de isoenzimas creatina quinase e sua correlação com condições clínicas.

### **Materiais:**

- 5 soluções contendo misturas de corantes (azul de bromofenol, xileno cianol e anilina vermelha);
- Cuba e fonte de eletroforese
- Gel de Agarose 1%;
- Micropipetas;
- Ponteiras;
- Tampão de corrida TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM de ácido acético, 1 mM de EDTA, pH = 8,6).

**Procedimento:**

- **1ª parte do experimento – Eletroforese das amostras**

- Aplicar as amostras (10 µL no gel de agarose grande e 5 µL no gel pequeno) de cada mistura de corante (M1 a M4 e M\*). As amostras devem ser aplicadas no polo negativo (eletrodo preto, cátodo) do gel de agarose (1 %), pulando um poço entre as amostras. A eletroforese ocorrerá durante 40 minutos a 45 mA.

\*Os corantes, xileno cianol, azul de bromofenol e anilina vermelha foram combinados para obter cinco misturas. Quatro delas (M1 a M4) simularão a composição das isoenzimas séricas de CK de quatro indivíduos em condições clínicas específicas, a saber: distrofia muscular de Duchenne, lesão cerebral, infarto agudo do miocárdio e indivíduo saudável. E a quinta mistura, contendo os três corantes acima mencionados, foi estabelecida como padrão simulando a migração das 3 isoenzimas de CK na eletroforese e atuando como marcador (M).

- **2ª parte do experimento - Interpretação dos resultados da eletroforese**

Para a interpretação dos resultados devem ser consideradas as seguintes informações:

- As três bandas do marcador (M) simulam a migração das três isoenzimas CK.
- As misturas M1 a M4 simulam os padrões de eletroforese sérica de CK de quatro indivíduos em condições clínicas distintas, a saber: distrofia muscular de Duchenne, lesão cerebral, infarto agudo do miocárdio e indivíduo saudável.
- Os pontos isoelétricos das isoenzimas CK-MM, CK-MB e CK-BB são respectivamente 7,2, 5,2 e 4,8.
- As isoenzimas CK são proteínas compactas com pesos moleculares semelhantes (CK-MM - 81, CK-MB - 82,5 e CK-BB - 82 kDa).
- O tampão de corrida eletroforético tem pH = 8,6.

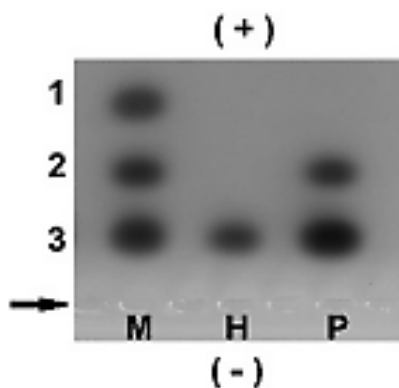
Analise o gel da eletroforese, após a corrida, respondendo as questões abaixo:

- Considerando os pontos isoelétricos das isoenzimas CK e o pH do tampão de eletroforese, indique a carga que as isoenzimas CK apresentam em pH 8,6 e a direção esperada das isoenzimas CK na migração da eletroforese.
- Indique as isoenzimas CK que estão sendo representadas por cada banda do marcador M.
- Interprete os resultados da separação das misturas de corantes (M1 a M4), discutindo o padrão de bandas de eletroforese obtido e sua correlação com uma possível condição clínica.
- Desenhe um eletroferograma que ilustre o resultado do marcador.

**Questões para discussão:**

- Qual a composição das isoenzimas citosólicas da CK?
- A CK-MM pode ser denominada de CK1?
- O aumento da atividade total da CK é indicador de infarto agudo do miocárdio?
- A imagem abaixo representa a eletroforese da CK para três amostras: **M** – marcador composto pelas três isoenzimas da CK, **H** – amostra de um indivíduo saudável e **P** – amostra de um paciente. A seta indica o ponto de aplicação das amostras, os símbolos (-) e (+) representam os polos negativo e positivo, e os números (1–3) indicam a posição

horizontal de cada banda das isoenzimas da CK. Analise o resultado obtido e responda às perguntas abaixo, considerando as informações fornecidas:

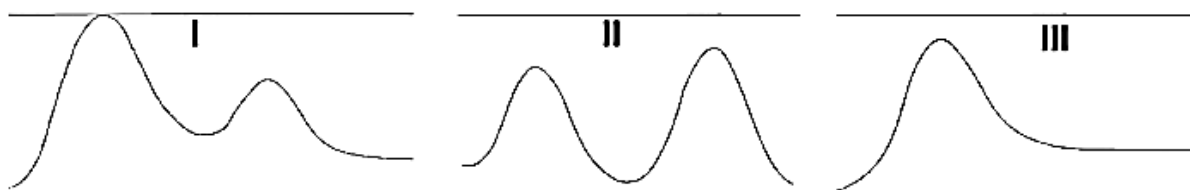


- i) A eletroforese foi realizada em pH 8,6;
- ii) O ponto isoelétrico dos dímeros de CK MM, MB e BB são, respectivamente, 7,2, 5,2 e 4,8;
- iii) As três isoenzimas da CK possuem peso molecular semelhante.

a) Qual é a composição do dímero de CK indicado pelo número 1?

b) Indique o possível diagnóstico para o paciente.

c) Identifique o eletroferograma que ilustra corretamente as bandas 3 e 2 da amostra P.



**Você Sabia?**

A técnica de eletroforese permitiu identificar o primeiro caso de anemia falciforme antes mesmo de saberem exatamente qual alteração ocorria na hemoglobina. Em 1949, Linus Pauling e colaboradores mostraram que a hemoglobina S (HbS) migrava de forma diferente da hemoglobina normal (HbA) em um campo elétrico. Essa foi a primeira demonstração de que uma doença humana podia ser causada por uma alteração em uma única proteína (Pauling, L., Itano, H. A., Singer, S. J., & Wells, I. C. (1949). Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. *Science*, 110(2865): 543–548).



**Instituto de Biologia**  
**Departamento de Biologia Celular e Molecular**  
**Disciplina: Bioquímica**

## ***Aula Prática 7 – Fermentação***

Desde os primórdios da evolução, quando as primeiras espécies sobreviveram em uma atmosfera sem oxigênio, a quebra da molécula de glicose, nestas condições, é utilizada por alguns seres vivos como um dos mecanismos bioquímicos mais primitivos para a extração de energia. Mesmo com a evolução, diversos microrganismos e certos tipos celulares de organismos superiores conservaram completamente, até hoje, a química das reações do processo de fermentação.

Dentro deste contexto, *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo modelo amplamente estudado devido às suas características metabólicas únicas e sua relevância para a biotecnologia e a pesquisa científica. Esta levedura possui um metabolismo altamente versátil, permitindo-lhe prosperar em diversas condições ambientais e nutricionais. Uma das características mais notáveis de *S. cerevisiae* é sua capacidade de realizar a fermentação alcoólica. Na ausência de oxigênio, esta levedura converte açúcares, como a glicose, em etanol e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Além da fermentação, *S. cerevisiae* também pode realizar respiração aeróbica quando o oxigênio está disponível. Neste modo, a levedura oxida completamente os açúcares até CO<sub>2</sub> e água, gerando uma quantidade significativamente maior de ATP, a molécula energética da célula. Esta flexibilidade metabólica entre fermentação e respiração aeróbica é uma vantagem evolutiva que permite a *S. cerevisiae* sobreviver e prosperar em ambientes variáveis. *S. cerevisiae* possui um metabolismo altamente eficiente na utilização de diferentes fontes de carbono, além de tolerar condições extremas de osmolaridade e pH; pode ser geneticamente manipulada, o que permite aos pesquisadores modificar e otimizar suas vias metabólicas para aplicações específicas, como a produção de biocombustíveis, produtos farmacêuticos e outros compostos de valor agregado. As características metabólicas de *S. cerevisiae*, combinadas com sua robustez e versatilidade, tornam-na um organismo modelo essencial para a biotecnologia moderna e a pesquisa em biologia celular e molecular.

**Objetivo:** Observar a ocorrência ou não do processo de fermentação pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* incubada em diferentes condições experimentais.

### **Materiais:**

- Células de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura - fermento biológico);
- H<sub>2</sub>O destilada;
- Glicose;
- Amido;
- NaCl;
- Balões de borracha de látex;
- Tubos de ensaio;
- Frascos de vidro pequenos com tampas de plástico;
- Mangueras de plástico maleável com calibre pequeno;
- Filme plástico de parafina (*parafilm*) ou qualquer material para vedar;
- Solução de fenoltaleína 1% pH 8,0.

**Procedimentos:**

- **1ª parte do experimento**

**Grupo 1-** Preparar as amostras, conforme tabela abaixo:

Tubos	H <sub>2</sub> O destilada (mL)	Glicose (g)	Amido (g)	Levedura (g)	NaCl (g)
1	5	-	-	0,5	-
2	5	0,5	-	-	-
3	5	0,5	-	0,5	-
4	5	-	0,5	0,5	-
5	5	-	0,5	0,5	0,5

- Vedar o tubo com *parafilm* (filme plástico flexível) e homogeneizar a solução, após cada adição; retirar o *parafilm* e fechar a boca dos tubos com os balões de borracha. **Incubar os tubos à 36°C** e marcar o tempo. Observar os tubos a cada 10 min. (durante 30 a 40 minutos) e descrever o resultado.

**Grupo 2-** Preparar as amostras, conforme tabela abaixo:

Tubos	H <sub>2</sub> O destilada (mL)	Glicose (g)	Amido (g)	Levedura (g)	NaCl (g)
1	5	-	-	0,5	-
2	5	0,5	-	-	-
3	5	0,5	-	0,5	-
4	5	-	0,5	0,5	-
5	5	-	0,5	0,5	0,5

- Vedar o tubo com *parafilm* e homogeneizar a solução, após cada adição; retirar o *parafilm* e fechar a boca dos tubos com os balões de borracha, **deixar a temperatura ambiente** e marcar o tempo. Observar os tubos a cada 10 min. (durante 30 a 40 minutos) e descrever o resultado.

- **2ª parte do experimento**

- Colocar 5 mL de H<sub>2</sub>O\*\*, 0,5g de levedura e 0,5g de glicose em um frasco de vidro; homogeneizar;
- Colocar 10 mL de solução de fenoltaleína pH 8,0 em um frasco de vidro;
- Fechar, cada frasco, com a tampa. Ambas as tampas estarão conectadas por uma mangueira. Os tubos devem estar bem vedados (usar *parafilm* para auxiliar na vedação);
- Observar o resultado e correlacione-o com os obtidos na primeira parte do experimento.

\*\* **Grupo 1-** usar H<sub>2</sub>O morna; **Grupo 2 –** usar H<sub>2</sub>O à temperatura ambiente.

**Questões para discussão:**

- 1- O que você observou nos tubos de ensaio e frascos de vidro (parte 2)?
- 2- Como você acha que está a concentração de glicose no início e final dos experimentos?
- 3- Quais são os produtos formados pelas leveduras durante o processo de fermentação? Como pode saber disso?
- 4- Qual o objetivo da segunda parte do experimento?
- 5- Explique a possível ação do NaCl no sistema (tubo 5).

**Você Sabia?**

*Que saborear um queijo com consistência e sabor característicos, sem que ele seja derivado do leite de vaca ou comer um hambúrguer vegetal sem notar que não está comendo carne animal já é uma realidade? Com a fermentação de precisão é possível entregar essas soluções ao produzir as mesmas proteínas presentes em produtos de origem animal, além de ingredientes que adicionam sabor, cor e suculência característicos para os produtos vegetais análogos, ou de carne cultivada (Heidemann, M. S. et al., São Paulo: Tiibooks; The Good Food Institute Brasil, 2024Liu; Aimutis; Drake, 2024).*



**Instituto de Biologia**  
**Departamento de Biologia Celular e Molecular**  
**Disciplina: Bioquímica**

### ***Aula Prática 8 – Urinálise***

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 por água; a coloração pode variar entre o incolor e o amarelo (dieta, atividade física e principalmente a frequência /quantidade da ingestão de água podem interferir na colocação); apresenta substâncias oriundas do processo de excreção, resultantes do metabolismo. O 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 concentrações de corpos cetônicos, sais e pigmentos biliares (urobilinogênio e urobilina). A análise da urina fornece valiosas informações que auxiliam no diagnóstico de doenças renais, das vias urinárias, do trato genital e até de doenças sistêmicas.

Esta prática refere-se a dois exames de rotina da urina, através dos quais é possível pressupor se há alguma alteração no metabolismo, principalmente energético, através da presença de moléculas como a glicose e corpos cetônicos. Vale ressaltar que, em condições normais, não aparece glicose na urina em quantidade detectável pelos reagentes convencionais, visto que, praticamente, toda glicose filtrada é reabsorvida pelos rins. Entretanto, quando a carga filtrada excede a capacidade de reabsorção da glicose, 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 raramente 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: 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. Já os chamados corpos cetônicos (acetoacetato, ácido  $\beta$ -hidroxibutírico e acetona), quando presentes em níveis elevados na urina podem indicar um quadro de jejum prolongado ou *diabetes mellitus* não tratado. Em condições normais, o ácido acetoacético e o ácido  $\beta$ -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.

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

#### **Materiais:**

- 8,5 mL de urina “didática”;
- 2,5 mL de Reativo de Benedict ( $\text{CuSO}_4$ ; citrato de sódio e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ );
- 1 mL de Reativo de Imbert (nitroprussiato de sódio e ácido acético glacial);
- 3 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  10% (p/v).

**Procedimentos:**

- **Pesquisa de Glicose**

- Colocar 2,5 mL do Reativo de Benedict em um tubo de ensaio;
- Adicionar 4 gotas de urina “didática”;
- 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 +++

- **Pesquisa de Corpos Cetônicos**

- Colocar 8 mL de urina “didática” 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<sub>4</sub>OH 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

**Questões para discussão:**

- 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.
- 2- Por que condições como jejum severo e prolongado ou *diabetes mellitus* não compensado pode acarretar cetonemia e consequente cetonúria?
- 3- Conceitue e diferencie (metabolicamente): *diabetes insipidus*, *diabetes mellitus* e *diabetes renalis*.

**Você Sabia?**

Que além de servir como combustível, o  $\beta$ -hidroxibutirato também pode atuar como uma molécula de sinalização, modulando expressão gênica, inflamação e até estresse oxidativo? Hoje ele é estudado como um possível modulador epigenético em doenças neurológicas e envelhecimento ( NEWMAN, J. C.; VERDIN, E.  $\beta$ -Hydroxybutyrate: A Signaling Metabolite. *Annual Review of Nutrition*, v. 37, p. 51-76, 2017).



**Instituto de Biologia**  
**Departamento de Biologia Celular e Molecular**  
**Disciplina: Bioquímica**

### ***Aula Prática 9 – Detecção/dosagem de glicose***

A determinação da concentração de glicose no sangue é um dos exames bioquímicos mais comuns na prática clínica e laboratorial. Isso porque a glicose é a principal fonte de energia das células, e seus níveis no sangue precisam ser mantidos dentro de limites estreitos para garantir o bom funcionamento do organismo.

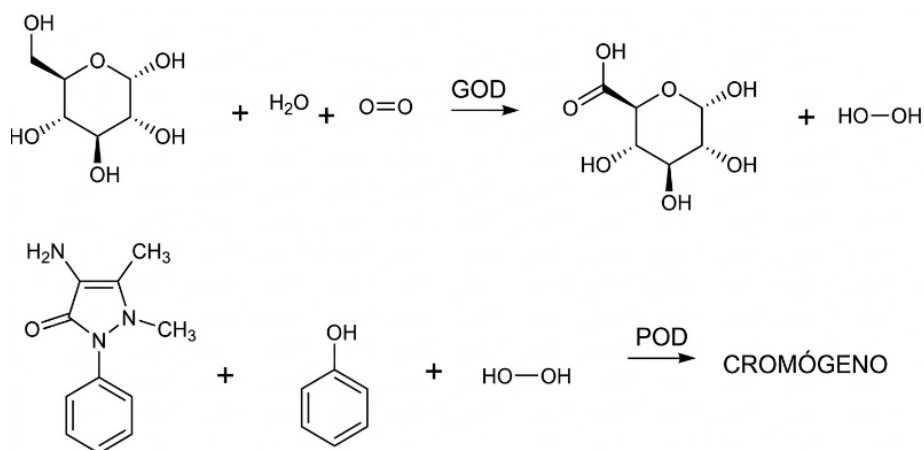
Alterações na glicemia estão associadas a condições metabólicas relevantes, como diabetes mellitus, episódios de hipoglicemia e distúrbios hormonais. Por isso, medir a glicose de forma precisa é fundamental para o diagnóstico, o acompanhamento e a prevenção de complicações agudas e crônicas.

No ambiente hospitalar, a dosagem de glicose também tem papel decisivo em emergências, auxiliando na tomada rápida de decisões clínicas.

**Objetivo:** Detectar a presença de glicose em amostras biológicas (soro ou plasma).

#### **Princípio da técnica**

A glicose presente na amostra é oxidada pela enzima **glicose oxidase (GOD)**, formando **ácido glicônico** e **peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**.



Peróxido de Hidrogênio, em presença da Peroxidase (POD) reage com a 4 -Aminoantipirina e Fenol, formando um cromógeno vermelho cereja cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose.

A intensidade da cor pode ser medida por espectrofotometria, em comprimento de onda entre 500 - 550 nm.

Ao comparar a amostra desconhecida com uma curva padrão de glicose (concentração conhecida), pode-se calcular a concentração de glicose da amostra.

#### **Materiais:**

- Microtubos de plástico;
- Estante para microtubos;
- Amostras de soro e/ou urina;

- Micropipetas;
- Ponteiras para micropipetas
- Descarte para ponteira;
- Banho-maria
- Agitador para tubos (Vórtex);
- **Reagente 1** (tampão 100 mmol/L, pH  $\leq$  7,5; glicose oxidase 11000 U/L; peroxidase 700 U/L; 4-aminoantipirina 290 mmol/L);
- **Reagente 2** (padrão: glicose 100 mg/dL);

#### Procedimento:

- Numerar os tubos e organizá-los na estante, conforme tabela abaixo:

Tubos	Branco	Padrão	Teste 1	Teste 2	Teste 3
Reagente 1	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L-	500 $\mu$ L
Reagente 2		10 $\mu$ L			
Amostra 1	-	-	10 $\mu$ L	-	-
Amostra 2	-	-	-	10 $\mu$ L	-
Amostra 3	-	-	-	-	10 $\mu$ L

- Homogeneizar bem em vórtex e colocar em banho-maria à 37°C por 10 minutos. Observar progressão da reação colorimétrica e anotar os resultados. A cor é estável por 30 minutos.

#### Questões para discussão:

- 1- O que você observou nos tubos?
- 2- Existe relação entre a intensidade de cor e a concentração de glicose? O que isso pode indicar sobre o estado do paciente?
- 3- Qual o fundamento do método de dosagem/detecção empregado?

#### Você Sabia?

*A glicose pode diminuir 5 a 10 mg/dL por hora em amostras de sangue total mantidas à temperatura ambiente, devido à glicólise em eritrócitos e leucócitos. Por isso, tubos de coleta que contém fluoreto de sódio (NaF) (que inibe a enzima enolase) são usados para preservar a glicemia até a análise (Burtis, C. A. e colaboradores: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 8th ed. Elsevier, 2019).*



- Ponteiras para micropipetas;
- Descarte para ponteira;
- Banho-maria;
- Agitador para tubos (Vórtex);
- Reagente 1 (padrão: ureia 70 mg/dL);
- Reagente 2 (enzima: contém tampão fosfato 10 mmol/L, pH 6,9 e urease  $\leq$  500 KU/L )
- Reagente 3 (oxidante: hidróxido de sódio 2,8 mol/L e hipoclorito de sódio  $\leq$ 140 mmol/L.)

#### Procedimento:

- Numerar os tubos e organizá-los na estante, conforme tabela abaixo:

Tubos	Branco	Padrão	Teste 1	Teste 2	Teste 3
Reagente 1	-	10 $\mu$ L	-	-	-
Reagente 2	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
Amostra 1	-	-	10 $\mu$ L	-	-
Amostra 2	-	-	-	10 $\mu$ L	-
Amostra 3	-	-	-	-	10 $\mu$ L
<b>Homogeneizar em vórtex e colocar em banho-maria 37°C, por 5 minutos</b>					
Reagente 3	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
<b>Homogeneizar em vórtex e colocar em banho-maria 37°C, por 5 minutos</b>					

- Observar a progressão da reação colorimétrica e anotar os resultados.

#### Questões para discussão:

- 1- O que você observou nos tubos?
- 2- Existe relação entre a intensidade de cor e a concentração de ureia? O que isso pode indicar sobre o estado do paciente?
- 3- Explique uma situação em que pode haver aumento do nível de ureia no sangue, mas não na urina.

#### Você Sabia?

*A ureia foi a primeira substância orgânica sintetizada em laboratório a partir de compostos inorgânicos, em 1828, pelo químico F. Wöhler. Essa descoberta derrubou a antiga "Teoria da Força Vital" e marcou o nascimento da química orgânica moderna — tudo graças a um composto que hoje podemos dosar rotineiramente em exames de sangue!*