



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”
Departamento de Ciências Biológicas



BIOQUÍMICA – LCB 208

ROTEIRO DE AULAS PRÁTICAS

DOCENTES:

Prof. Dr. Daniel Sherer de Moura

Profa. Dra. Helaine Carrer

Prof. Dr. Luiz Antônio Gallo

Prof. Dr. Luiz Carlos Basso

Técnica Responsável: Aline Borges

Piracicaba - SP

2014

SUMÁRIO

AULAS	pg
1. Colorimetria e Espectrofotometria	03
2. Determinação de Lactose no leite	07
3. Cromatografia em Papel de Filtro	11
4. Determinação do Teor de Caseína no leite (Reação do Biureto)	16
5. Determinação da Constante de Michaelis (K_m) e da Velocidade máxima (V_m) para a Invertase de Levedura	19
6. Reação de Hill (Fotólise da água)	23

COLORIMETRIA E ESPECTROFOTOMETRIA

1. OBJETIVOS

Dosagens de espécies químicas mediante a absorção de luz.

2. FUNDAMENTOS DO MÉTODO

A Colorimetria e a Espectrofotometria podem ser conceituadas como um procedimento analítico através do qual se determina a concentração de espécies químicas mediante a absorção de energia radiante (luz).

A luz pode ser entendida como uma forma de energia, de natureza ondulatória, caracterizada pelos diversos comprimentos de onda (λ , expressos em μm ou nm) (Figura 1) e que apresenta a propriedade de interagir com a matéria, sendo que parte de sua energia é absorvida por elétrons da eletrosfera dos átomos constituintes das moléculas.

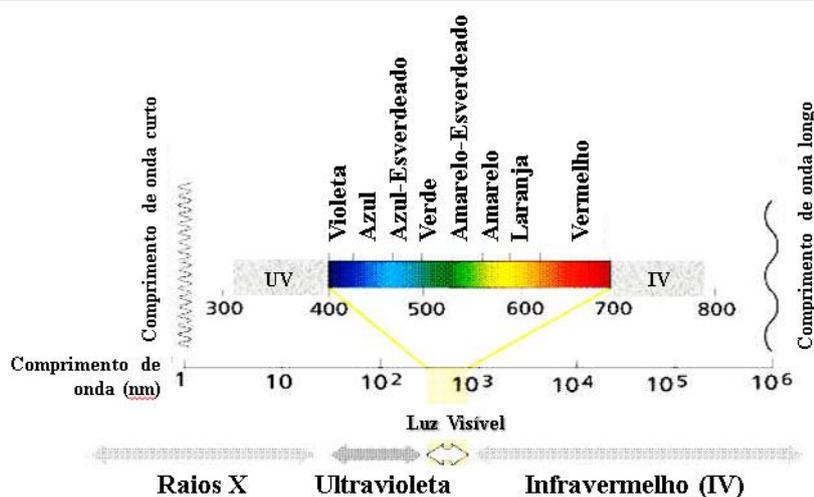


Figura 1. Espectro de absorção de luz em diversos comprimentos de onda (λ).

Uma solução quando iluminada por luz branca, apresenta uma cor que é resultante da absorção relativa dos vários comprimentos de onda que a compõem, que pode ser analisados por um espectrofotômetro (Figura 2). Esta absorção, em cada comprimento de onda, depende da natureza da substância, de sua concentração e da espessura da mesma que é atravessada pela luz.

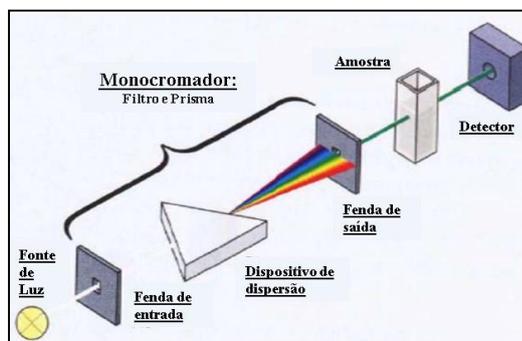
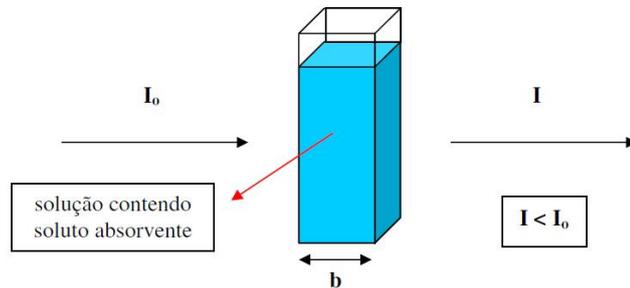


Figura 2. Componentes e funcionamento de um espectrofotômetro para análise da absorção de um determinado comprimento de onda específico de uma solução.

A Lei de Lambert-Beer: a absorvância é proporcional à concentração da espécie química absorvente, sendo constante o comprimento de onda, a espessura atravessada pelo feixe luminoso e demais fatores. Verifica-se uma relação linear entre absorvância ou densidade ótica e concentração, e de uma relação logarítmica entre transmitância e concentração.



c = concentração da espécie química absorvente
 b = espessura atravessada pelo feixe luminoso
 I_0 = intensidade de luz incidente
 I = intensidade de luz emergente (transmitida)

$$I < I_0$$

$$Ab = D.O. = K \cdot b \cdot c = \log \frac{I_0}{I} \quad (\text{absorvância ou densidade ótica})$$

A Transmitância ou Transmissão (T%) corresponde a:

$$T = 100 \times \frac{I}{I_0}$$

como, $\frac{I}{I_0} = \frac{T}{100}$, temos que: $\frac{I_0}{I} = \frac{100}{T}$

portanto, $\log \frac{I_0}{I} = \log \frac{100}{T}$

logo, $Ab = \log 100 - \log T$

$$Ab = 2 - \log T$$

3. MATERIAL

- Espectrofotômetro com cubetas
- Micropipetas de 1 mL
- Estante com tubos de ensaio
- Alaranjado de Metila (10 μ g/mL)
- Azul de Bromofenol (10 μ g/mL)

4. PRÁTICA

A. Coleta de dados para a construção do espectro de absorção:

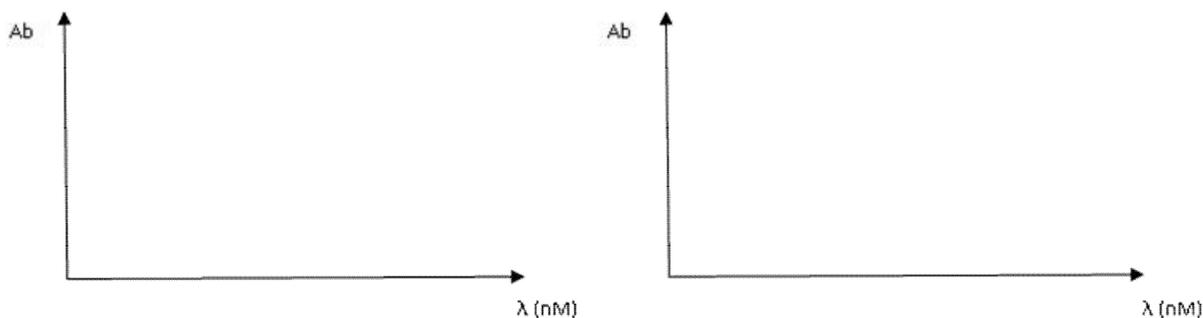
- Alaranjado de Metila ou do Azul de Bromofenol (um composto para cada grupo).

Usando água destilada como referência, efetuar as leituras de Absorbância (ou D.O.) do **Alaranjado de Metila** (nos seguintes comprimentos de onda: 400, 420, 440, 460, 480, 500, 520, 550, 600, 650 e 700 nm) e o **Azul de Bromofenol** (nos seguintes comprimentos de onda: 400, 440, 490, 520, 540, 565, 580, 590, 620, 660 e 700 nm)

Preencher os dados da tabela abaixo, de acordo com o corante escolhido pelo grupo:

Alaranjado de Metila (10 μg/mL)			Azul de Bromofenol (10 μg/mL)		
λ (nm)	T (%)	Ab (2-logT)	λ (nm)	T (%)	Ab (2-logT)
400			400		
420			440		
440			490		
460			520		
480			540		
500			560		
520			580		
550			590		
600			620		
650			660		
700			700		

Utilizando os dados da tabela acima preparar um gráfico (x = comprimento de onda nm) e (y = leitura em absorbância), encontrando qual o comprimento de onde se refere ao pico de absorção do corante usado em aula.



B. Demonstração da Lei de Lambert-Beer:

Preparar 6 tubos de ensaio (enumerados de 0 a 5) conforme o quadro que se segue. o tubo nº 6 estará contendo solução do corante com concentração desconhecida, a qual deverá ser determinada através da Lei de Lambert-Beer.

Tubo (Nº)	Água (mL)	Corante* (mL)	Concentração Obtida (µg/mL)	Transmitância (T%)**	Absorbância (Abs Ou D.O.)
0	5	0			
1	4	1			
2	3	2			
3	2	3			
4	1	4			
5	0	5			
6	5	mL	Encontrar no gráfico (Equação da Reta)		

* Alaranjado de Metila ou Azul de Bromofenol na concentração de 10 µg/mL.

** Leituras efetuadas no comprimento de onda que corresponde ao pico de absorção do composto (λ máximo).

5. QUESTIONÁRIO:

- 1) Qual o comprimento de onda correspondente ao Pico de absorção da luz para cada corante? _____
- 2) Utilizando um programa de planilha eletrônica (p.ex.: excel), obter a equação da reta a partir da reta padrão.
 - A) Eq. Reta: _____
 - B) Concentração da solução do corante (solução problema): _____

DETERMINAÇÃO DE LACTOSE NO LEITE (MÉTODO DE SOMOGY & NELSON)

1. OBJETIVO

Determinar a concentração de lactose (açúcar redutor) no leite conservado em geladeira e mantido à temperatura ambiente empregando o método de Somogyi & Nelson.

2. FUNDAMENTOS DO MÉTODO

Carboidratos que apresentam em sua estrutura molecular os grupos aldeído ou cetona livres (no carbono 1), possuem poder redutor e são por isso denominados açúcares redutores. Geralmente, estes açúcares são monossacarídeos ou dissacarídeos que podem ser oxidados por agentes oxidantes relativamente suaves, tais como os íons férricos (Fe^{3+}) e cúprico (Cu^{2+}). Estes íons, por sua vez, são reduzidos pela ação dos açúcares redutores (agentes redutores). No açúcar, o carbono do grupo carbonila é oxidado a carboxila. É possível determinar a concentração de um açúcar redutor pela medida da quantidade de agente oxidante que é reduzido pela solução desse mesmo açúcar.

A lactose (Figura 1A) é o principal carboidrato do leite, produzida pela glândula mamária, sendo ainda a principal fonte de energia dos recém nascidos. Além disso, a lactose é um dissacarídeo redutor, que reduz o íon cúprico do **Reativo de Somogyi** a óxido cuproso, em meio alcalino e a quente. Em seguida, o óxido cuproso reage com o ânion arseno-molibdato do **Reativo de Nelson** produzindo um composto de coloração azul - óxido de molibdênio, Mo_2O_3 , com $\lambda_{\text{máx.}} = 540 \text{ nm}$ (Figura 1B).

Dentro de certos limites, a intensidade da coloração azul é diretamente proporcional à quantidade de lactose no leite. Essa intensidade de coloração pode ser medida utilizando-se um espectrofotômetro, que detecta a absorção de luz pelo óxido de molibdênio.

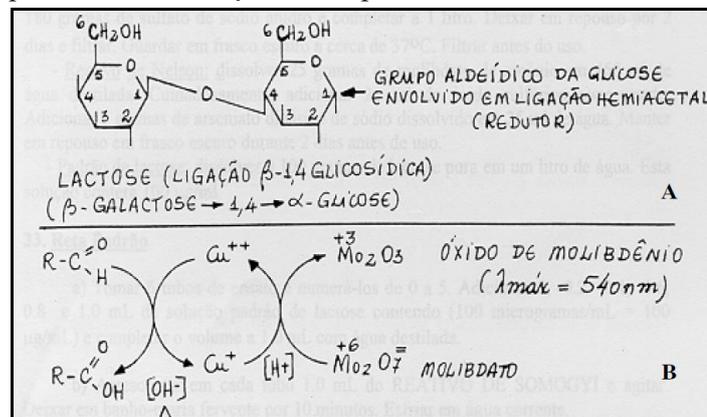


Figura 1. (A) Estrutura molecular do dissacarídeo lactose (β -galactose \rightarrow 1,4 \rightarrow α -glicose), evidenciando o carbono 1 contendo o grupo aldeído da glicose, envolvido em ligação hemiacetal (região redutora). (B) Reações envolvidas no método de Somogyi & Nelson, mostrando a formação do óxido de molibdênio, Mo_2O_3 , um composto de coloração azul, com $\lambda_{\text{máx.}} = 540 \text{ nm}$.

Antes da reação quantitativa, a amostra de leite deve ser desproteïnizada e clarificada, mediante precipitação de interferentes com **Ba(OH)₂** e **ZnSO₄**.

3. MATERIAL

- Espectrofotômetro
- Centrífuga de mesa
- Banho-maria (ebulição)
- Balão volumétrico de 100 mL
- Estante com 8 tubos de ensaio e 2 tubos de centrífuga
- Micropipetas de 1mL
- Hidróxido de bário 0,3N
- Sulfato de zinco 5%
- Reativo de Somogyi: dissolver 28 gramas de **fosfato de sódio dibásico** ou monoácido e 40 gramas de tartarato duplo de sódio e potássio em 700 ml de água. Adicionar 100 ml de NaOH 1N. Gotejar, sob agitação constante, 80 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 10%. Adicionar 180 gramas de sulfato de sódio anidro e completar a 1 litro. Deixar em repouso por 2 dias e filtrar. Guardar em frasco escuro a cerca de 37°C . Filtrar antes do uso.
- Reativo de Nelson: dissolver 50 gramas de molibdato de amônio em 900 ml de água destilada. Cuidadosamente, adicionar 52 ml de ácido sulfúrico concentrado. Adicionar 3 gramas de arseniato dibásico de sódio dissolvido em 50 ml de água. Completar para 1 litro e manter em repouso em frasco escuro durante 2 dias antes de uso e filtrar.
- Padrão de lactose: dissolver 0,1 gramas de lactose pura em um litro de água. Esta solução conterá 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4. PRÁTICA

- Tomar 6 tubos de ensaio e numerá-los de 0 a 5. Adicionar 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mL da solução padrão de lactose (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e completar o volume a 1 mL com água destilada.
- Acrescentar em cada tubo 1 mL do **Reativo de Somogyi** e agitar. Deixar em banho-maria fervente por 10 minutos. Esfriar em água corrente.
- Adicionar 1 ml do **Reativo de Nelson** e agitar. Completar o volume a 10 mL, adicionando 7 ml de água destilada.
- Fazer leitura em espectrofotômetro em 540 nm. Preencher a tabela abaixo:

TUBO (Nº)	ÁGUA (ml)	Lactose (mL)	Conc. Obtida ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Reat. Somogy (mL)	Banho Maria (min)	Reat. Nelson (mL)	Compl. Vol. (10 mL)	Transmit. (T%)	Absorb. λ	Δ Absorb. λ
0	1.0	0		1.0	10	1.0	7 mL			0
1	0.8	0.2		1.0	10	1.0	7 mL			
2	0.6	0.4		1.0	10	1.0	7 mL			
3	0.4	0.6		1.0	10	1.0	7 mL			
4	0.2	0.8		1.0	10	1.0	7 mL			
5	0	1.0		1.0	10	1.0	7 mL			

A. Preparo das Amostras de Leite

Cada grupo receberá 2 amostras de leite: uma armazenada em geladeira e outra mantida à temperatura ambiente.

a) Transferir 2 mL da amostra de leite para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada. Agitar bem.

b) Transferir 1 mL (com pipeta volumétrica) da solução diluída de leite para tubo de centrífuga. Efetuar a remoção dos interferentes pela adição de 1,0 mL de ZnSO₄ a 5% (agitar) e acrescentar 1,0 mL de hidróxido de bário 0,3N. Agitar. Completar a 10 mL adicionado 7 mL de água destilada. Agitar. Centrifugar a 300 x g durante 5 minutos (3.000 rpm).

B. Determinação do Teor de Lactose no Leite

Determinar os teores de lactose nas duas amostras de leite, preparando as amostras como segue na tabela abaixo:

Tubo	Volume (mL)	Reat. Somogy (mL)	Banho Maria (min.)	Reat. Nelson (mL)	Água destilada (mL)	Transmit. (T%)	Absorb. λ	Δ Absorb. λ	[lactose] ($\mu\text{g/mL}$)
Leite Ambiente	1,0	1,0	10	1,0	7 mL				
Leite Geladeira	1,0	1,0	10	1,0	7 mL				

Teor de lactose no leite ambiente:%

Teor de lactose no leite geladeira:%

5. QUESTIONÁRIO – CARBOIDRATOS E LIPÍDEOS

1) Em relação à Aula Prática, responder:

- Qual a Equação da Reta através da análise de correlação linear entre os resultados da primeira tabela (Δ Abs X [lactose])?
- Quais as concentrações das amostras desconhecidas (Geladeira e Ambiente) em cada tubo de ensaio?
- Qual a concentração das amostras desconhecidas (Geladeira e Ambiente) em g/100 mL de leite (%), observar que a amostra de leite analisada foi diluída 1:500?
- Explique os resultados obtidos nas concentrações de lactose no leite Ambiente e Geladeira.

- 2) Defina ligação hemiacetal demonstrando um exemplo através de uma cetose e uma aldose (ciclo hexose).
- 3) Escreva a fórmula cíclica (projeção) dos principais monossacarídeos (hexoses). Considere as posições D, L, α e β .
- 4) A molécula de D- β - glicose difere em que de uma molécula de D- α -glucose?
- 5) Explique resumidamente: (1) Como se faz a numeração da cadeia de um monossacarídeo; (2) Diferencie posição D, L, (+) e (-).
- 6) Escreva as fórmulas de: sacarose, maltose, lactose e celobiose.
- 7) O que são ligações glicosídicas dos tipos α (1,4) e β (1,4)?
- 8) Quais as diferenças entre os polissacarídeos amido, glicogênio e celulose quanto às ligações glicosídicas? Comente sobre suas funções destas três moléculas.
- 9) Como se dividem os polissacarídeos? Dê exemplos.
- 10) O que são dextranas, frutanas e hemicelulose?
- 11) O que são n-glicosídeos, o-metílicos, açúcares-alcoóis e amino-açúcares?
- 12) Citar as funções dos lipídeos nos seres vivos.
- 13) Qual a importância do índice de saponificação e índice de iodo (em relação ao peso molecular e grau de insaturação) nos ácidos graxos, gorduras e óleos.
- 14) Escreva a relação entre ponto de fusão e solubilidade quanto ao peso molecular, estrutura e grau de insaturação de lipídeos.
- 15) O que ocorre na rancificação oxidativa? Qual o papel dos antioxidantes? Cite exemplos.
- 16) Citar as características necessárias para que uma molécula funcione como sabão ou detergente.
- 17) Quais os componentes estruturais de uma cera e o tipo de ligação entre elas?
- 18) O que são ácidos graxos saturados, insaturados e poliinsaturados? Dê exemplos.
- 19) Quais as funções dos triglicerídeos? Que tipo de ligação existe?
- 20) Qual a função dos fosfolipídeos? Escreva um exemplo, dando sua importância.
- 21) A Testosterona e a Progesterona pertencem a qual classe de lipídeos? Por quê?

CROMATOGRAFIA EM PAPEL DE FILTRO

1. OBJETIVO

Identificação de aminoácidos numa solução desconhecida por cromatografia em papel filtro.

2. FUNDAMENTOS DO MÉTODO

Nesta aula prática a técnica de cromatografia em papel filtro será utilizada para análise de aminoácidos em solução. De um modo geral, o termo cromatografia pode ser definido como um procedimento bioquímico em que uma mistura de substâncias é separada pela carga, tamanho, solubilidade ou outra propriedade de seus componentes, através de sua partição entre uma fase móvel e uma fase estacionária.

O método de cromatografia em papel filtro será utilizado nesta aula para separação e identificação de aminoácidos. Para entendermos tais fundamentos devemos considerar a solubilidade dos aminoácidos num determinado solvente (variando em função da temperatura) e a propriedade dos aminoácidos de se tornarem coloridos após reagirem com substâncias específicas. Dependendo da estrutura molecular da cadeia lateral dos aminoácidos, estes apresentarão diferentes solubilidades no solvente empregado, mantida a temperatura constante. A capacidade de um determinado solvente (contido num recipiente) subir contra a força da gravidade através de um papel absorvente é muito importante nesta técnica de cromatografia em papel filtro, como mostrado na Figura 1. Conforme o solvente sobe pelo papel absorvente, ele pode levar consigo diferentes aminoácidos a diferentes distâncias separando-os a partir de uma mistura inicial de aminoácidos.

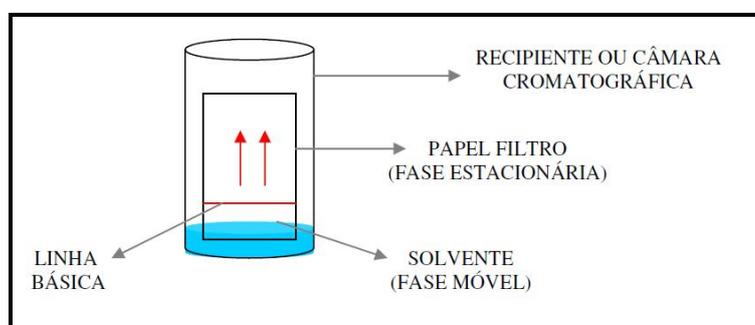


Figura 1. A migração da fase móvel (solvente) pelo papel filtro (fase estacionária) de modo ascendente (representado por setas vermelhas) é importante na técnica cromatográfica. Soluções de aminoácidos colocadas sobre a linha básica através de micropipetas serão transportadas pelo solvente a diferentes alturas. Após pulverização com ninhidrina, o papel filtro apresentará manchas coloridas em diferentes alturas, que representam os aminoácidos separados.

A partir da distância percorrida pelos aminoácidos desde a linha básica até o centro da mancha formada após a pulverização com ninhidrina, podemos calcular o chamado fator de retenção (R_f). Este pode ser definido como a relação existente entre a distância percorrida pelo soluto – aminoácido (até o centro da mancha), pela distância total percorrida pelo solvente (Figura 2). O valor de R_f revela a solubilidade de cada aminoácido no solvente empregado.

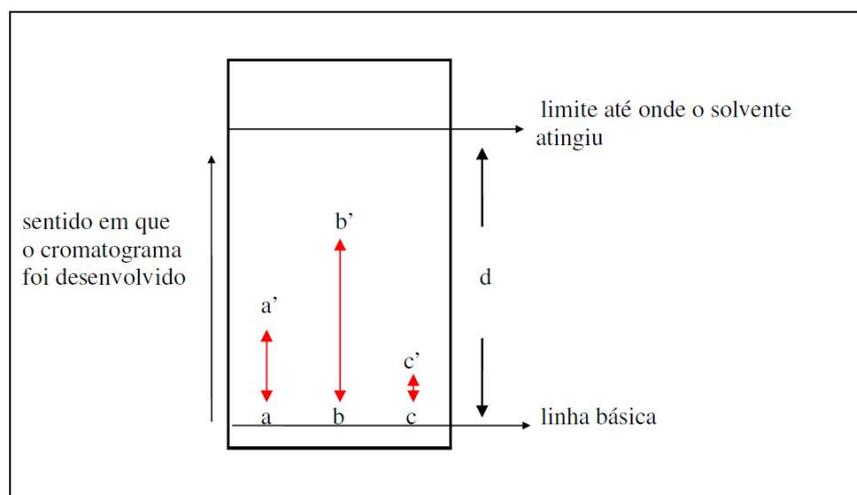


Figura 2. Soluções de aminoácidos a, b e c foram colocadas sobre a linha básica e percorreram as distâncias a', b' e c', respectivamente. A distância d refere-se à distância percorrida pelo solvente. Assim, os fatores de retenção para cada solução de aminoácido são: $R_{fa}=a'/d$; $R_{fb}=b'/d$; $R_{fc}=c'/d$.

A. Teoria sobre Rf (Equação de Martin e Synge)

Chama-se de Rf a relação:

$$\frac{Al}{Al + a As}$$

onde: a = coeficiente de partição

As = área ocupada pelo soluto na fase estacionária

Al = área ocupada pelo soluto na fase móvel

B. Solventes usados em cromatografia:

De acordo com as substâncias a serem cromatografadas, utilizamos os mais solventes diversos:

Fenol - Água (80: 20)

Usado para cromatografia de aminoácidos. Pode-se inclusive adicionar 40 mg de 8-hidroxiquinolina de 1 ml de NH_4OH concentrado por 100 ml de solvente.

Butanol: HaO (4: 1: 1)

Também empregado na cromatografia de aminoácidos, açúcares etc.

Benzol: butanol: Piridina: H₂O (5: 3: 3: 1)

Existem basicamente dois modos de revelação

- **Pelo uso da luz Ultravioleta:** empregado quando os compostos possuem núcleo que revelam o comprimento de onda ao nível do U.V.;

- **Uso de reagentes:** comumente utiliza-se para açúcares e imersão na seguinte solução: 1 mL de anilina + 1g de difenilamina + 100 mL de acetona + 10 mL de H₂PO₄ a 85%.

Para aminoácidos pulveriza-se o papel com solução de ninhidrina a 0,3% em álcool (usado na aula)

Para ácidos orgânicos pulveriza-se o papel com a seguinte solução: 1g de xilose + 3 mL de água + 1 mL de anilina + 100 mL de álcool metílico;

3. MATERIAL

- Papel Filtro (Whatmann);
- Câmara cromatográfica;
- Solvente (butanol, ácido acético e água na proporção de 4:1:1);
- Solução de aminoácidos padrão (arginina, leucina e prolina);
- Solução desconhecida (problema);
- Secador de cabelo;
- Lápis;
- Solução alcoólica de ninhidrina a 0,3%;
- Estufa.

4. PRÁTICA

- 1) Montar o cromatograma, ou seja, papel filtro (Whatmann) devidamente tratado (adaptado ao tamanho da câmara cromatográfica) constituindo a fase estacionária.
- 2) Traçar uma linha horizontal a dois centímetros do bordo inferior do papel (linha básica) sobre a qual, posteriormente, serão distribuídas “manchas” de solutos (aminoácidos).
- 3) Manter os cromatogramas dentro de recipientes hermeticamente fechados, denominados câmaras cromatográficas (Figura 3).
- 4) Adicionar o solvente específico para cromatografia de aminoácidos (butanol, ácido acético e água na proporção de 4:1:1), a uma altura menor do que dois centímetros.
- 5) Pipetar sobre a linha básica do cromatograma as soluções de aminoácidos padrão (arginina, leucina e prolina) e a solução problema (contendo uma mistura de aminoácidos desconhecidos) (Figura 3).

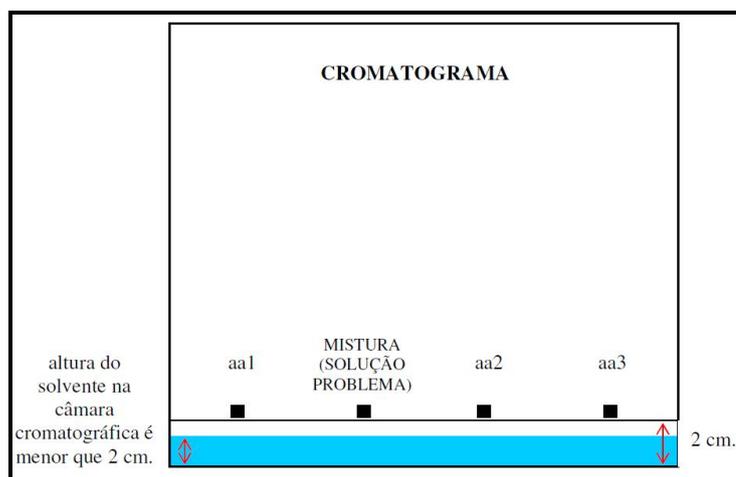


Figura 3. Distribuição das soluções de aminoácidos no cromatograma sobre a linha básica (dois centímetros acima do bordo inferior do papel). Notar que o solvente colocado na câmara cromatográfica atinge uma altura menor do que dois centímetros (considerando o cromatograma dentro da câmara). A solução problema contém uma mistura de aminoácidos desconhecida. Os aminoácidos 1, 2 e 3 são a arginina, leucina e prolina, respectivamente.

- 6) Secar o cromatograma através da utilização de um secador de cabelo antes de ser colocado na câmara cromatográfica. Este processo permite que o excesso das soluções de aminoácidos colocadas no papel seja removido.
- 7) Manter o cromatograma por 35 minutos dentro da câmara cromatográfica, para que o solvente suba contra a ação da gravidade.
- 8) Retirar o cromatograma da câmara e marcar com um lápis a altura que o solvente atingiu;
- 9) Secar o cromatograma com um secador de cabelo por 5 min para a remoção do solvente;
- 10) Pulverizar o papel com o reagente revelador ninhidrina a 0,3% em solução alcoólica;
- 11) Levar o cromatograma a uma estufa (temperatura de 60-65°C) por 5 minutos, até o aparecimento das manchas coloridas, que representam os aminoácidos separados.
- 12) Calcular os fatores de retenção (R_f) para cada aminoácido separado no papel filtro. Cada aminoácido apresenta um R_f específico para um determinado solvente numa dada temperatura. Como, cada aminoácido se desloca a uma determinada distância no cromatograma, baseado em sua solubilidade no solvente. A determinação da solubilidade de um determinado aminoácido depende diretamente da estrutura química de sua cadeia lateral (R).

5. QUESTIONÁRIO - AMINOÁCIDO

- 1) Em relação à **Aula Prática**, responder:
 - A) Quais os aminoácidos estudados em classe e a coloração deles na reação com ninhidrina?
 - B) Qual Rf dos aminoácidos utilizados no experimento?
 - C) Qual aminoácido apresentou maior Rf e por quê?
 - D) Qual aminoácido apresentou menor Rf e por quê?
 - E) Os aminoácidos apresentaram coloração diferente? Por quê?
 - F) Quais aminoácidos estão presentes na mistura?
- 2) Escreva as classificações dos aminoácidos de acordo com a cadeia lateral. Cite dois exemplos de cada classe.
- 3) Escrever a reação entre dois aminoácidos, identificando a ligação peptídica.
- 4) Explicar o que significa ponto isoelétrico de um aminoácido.
- 5) Citar a carga de um aminoácido abaixo e acima de seu ponto isoelétrico.

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CASEÍNA NO LEITE (PELA REAÇÃO DO BIURETO)

1. OBJETIVO

Quantificar a concentração da proteína do leite utilizando Reativo de Biureto.

2. FUNDAMENTOS DO MÉTODO

A importância em se estudar a proteína caseína presente no leite, se relaciona com o fato desta ser uma proteína bastante completa (alto valor biológico), pois ela possui todos os aminoácidos essenciais (aqueles que sua síntese no organismo é inadequada para satisfazer as necessidades metabólicas e que devem ser fornecidos como parte da dieta). Os aminoácidos essenciais para os seres humanos são: treonina, triptofano, histidina, lisina, leucina, isoleucina, metionina, valina e fenilalanina. Ausência ou inadequada ingestão de alguns desses aminoácidos resulta em balanço nitrogenado negativo, perda de peso, crescimento menor em crianças e pré-escolares e sintomatologia clínica.

A metodologia da Reação do Biureto, que é utilizada para a caracterização de proteínas, pode ser empregada para a quantificação das mesmas mediante a colorimetria. O método se baseia no fato de que as proteínas (nesse caso, a caseína) formam um complexo violeta com o íon cúprico (Cu^{2+}) em meio alcalino, e tal complexo apresenta um pico de absorção a 540 nm. A coloração violeta apresentada pelo complexo é proporcional à concentração das proteínas na amostra (leite). Essa reação é positiva para peptídeos constituídos de no mínimo três aminoácidos; assim, a Reação do Biureto será negativa para dipeptídeos e aminoácidos livres. Tal complexação também ocorre com o Biureto ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), daí o nome da reação. A Figura 1 apresenta a formação do complexo violeta, pela interação do íon cúprico com duas cadeias polipeptídicas.

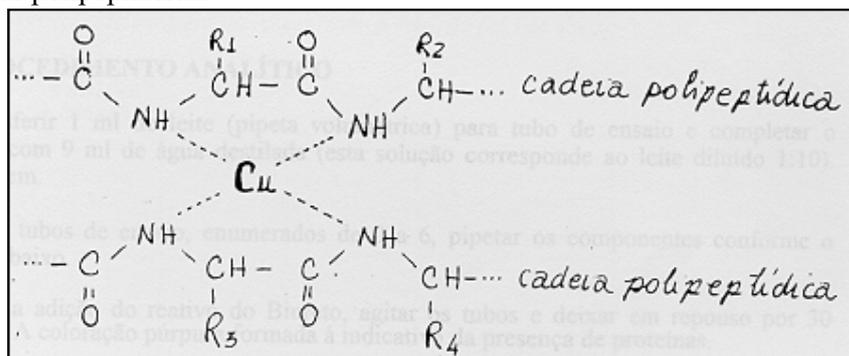


Figura 1. Formação do complexo violeta, pela interação do íon cúprico com duas cadeias polipeptídicas.

3. MATERIAL

- Espectrofotômetro (540 nm)
- Balão volumétrico com leite diluído (1 mL de leite desnatado e 9 mL de água destilada → 1:10)
- Estante com 6 tubos de ensaio (Reta Padrão) e 1 tubo de ensaio para amostra de leite diluído (1:10)
- 1 erlenmeyer com água destilada
- 1 micropipeta de 1 mL
- 1 Tubo de centrífuga de 15 mL (Tipo Falcon)
- **Reagente do Biureto:** Pesar 1.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 6g de tartarato duplo de sódio e potássio, dissolvê-los em água destilada completando o volume a aproximadamente 500 mL. Juntar, sob agitação, 300 mL de NaOH 10% e completar a 1 litro.
- **Padrão de Caseína (5 mg/mL)** - dissolver 2,5g de caseína em 500 mL de NaOH 0,1 N.

4. PRÁTICA

1. Com a micropipeta transferir 1 ml do leite (1:10) para um tubo de centrífuga (Tipo Falcon)
2. Em 7 tubos de ensaio, enumerados de 0 a 6, pipetar os componentes conforme o quadro abaixo.
3. Após a adição do **Reativo do Biureto**, agitar os tubos e deixar em repouso por 30 minutos. A coloração púrpura formada é indicativo da presença de proteínas.
4. Fazer leitura de Transmitância a 540 nm em espectrofotômetro e converter em Absorbância com auxílio de tabela ($A_b = 2 - \log T$).
5. Com os dados obtidos dos tubos 0 a 5, obter função da Reta na análise de correlação em planilha eletrônica (Excel), utilizando os valores de Δ Absorbância (**Y**) e concentrações de caseína expressas em mg/tubo (**X**).
6. Calcular a concentração de caseína no leite diluído (1:10) e concentração de caseína no leite desnatado longa vida em g/100 mL de leite (%).

Tubo (Nº)	Água Destilada	Caseína (10 mg/mL)	Caseína (mg/tubo)	Reativo Biureto	Transmitância (%)	Absorb. 540 nm	Δ Absorb. 540 nm
0	1,0	0		5			0
1	0,8	0,2		5			
2	0,6	0,4		5			
3	0,4	0,6		5			
4	0,2	0,8		5			
5	0	1,0		5			
6	1 mL leite diluído (1:10)		x	5			

5. QUESTIONÁRIO - PROTEÍNA

- 1) Em relação à **Aula Prática**, responder:
 - a) Determinar o valor da concentração de caseína no leite através da equação da função Reta Padrão em planilha eletrônica, dando o resultado em g/100 mL (m/v) (%) de leite.
 - b) Discutir o valor encontrado em relação ao valor nutricional do leite.
 - c) O que ocorre com a caseína do leite quando o valor de pH fica abaixo de 6,5?
- 2) Representar a ligação peptídica.
- 3) O que vem a ser a estrutura primária, secundária, terciária e quaternária de uma proteína?
- 4) Citar os tipos de ligação responsáveis pelas estruturas secundária e terciária de uma proteína?
- 5) O que vem a ser desnaturação de uma proteína, e que agentes causam esta desnaturação?
- 6) Definir proteína simples e conjugada. Dê exemplos.

DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS (Km) E DA VELOCIDADE MÁXIMA (Vm) PARA A INVERTASE DE LEVEDURA

1. OBJETIVO

Determinar os parâmetros Km e Vm da enzima invertase utilizando a sacarose como substrato, mediante o estudo cinético da reação.

2. FUNDAMENTOS DO MÉTODO

As reações químicas conduzidas pelos organismos vivos são, na sua grande maioria, catalisadas enzimaticamente, tornando a velocidade das mesmas compatíveis com as exigências metabólicas.

Assim a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), por intermédio da "invertase" hidrolisa a sacarose resultando numa mistura equimolecular de glicose e frutose (Figura 1), açúcares esses que são absorvidos pela célula. A membrana plasmática é impermeável à sacarose, e a levedura acaba excretando a invertase (sendo, pois, uma exoenzima) para a hidrólise ocorrer fora da célula de levedura.

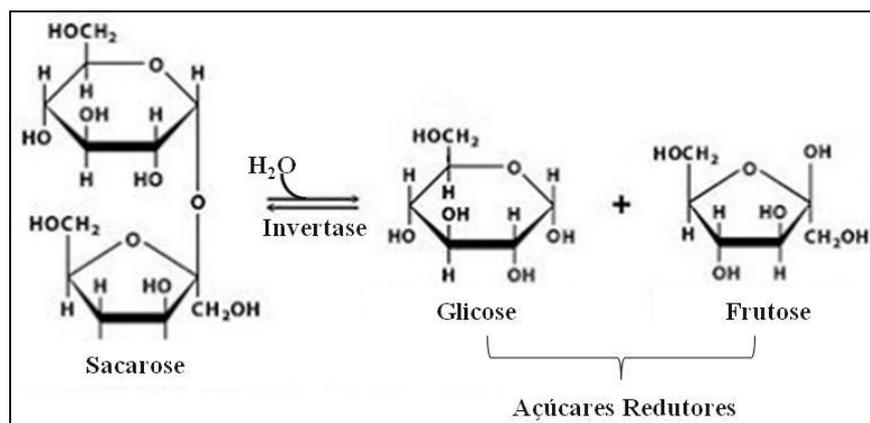


Figura 1. A molécula de sacarose hidrolisada pela enzima invertase da levedura produzindo açúcares redutores (Glicose e Frutose).

No presente experimento a invertase será obtida de levedura de panificação (fermento Fleischmann) e adicionada à sacarose (açúcar não redutor), cuja hidrólise resulta na formação de açúcares redutores (glicose e frutose) que serão estimados pela **Reação de Somogyi-Nelson**.

Para tal se colocará a enzima frente à diferentes concentrações de substrato (sacarose), resultando em diferentes velocidades de reação enzimática, permitindo, mediante um tratamento matemático adequado, determinar graficamente os valores de Km e Vm.

3. MATERIAL

- Espectrofotômetro
- Estante com 8 tubos de ensaio (por grupo)
- 2 pipetas graduadas de 2 mL (por grupo)
- 1 pipeta graduada de 1 mL (por grupo)
- 1 pipeta volumétrica de 1 mL (por grupo)
- Centrífuga e banho-maria para dosagem de açúcares redutores
- 4 g de fermento prensado tipo Fleischmann
- Reagente de Somogyi
- Reagente de Nelson
- Padrão de açúcar redutor (100 ug de glicose por 2,5 mL)
- Substrato (sacarose 12,5 mM = 4,27 g/L)

4. PRÁTICA

A. Extração da enzima

Transferir 4 g de fermento de panificação para tubo de centrífuga, adicionar 20 mL de água destilada e deixar em estufa a 37°C por 30 minutos agitando casualmente. Centrifugar a 1.000 x g por 15 minutos recolhendo o sobrenadante que contém a enzima invertase. Fazer uma diluição de 1:50.

B. Ensaio enzimático

Em 7 tubos de ensaio, enumerados de 0 a 6, pipetar os volumes (em mL) das soluções conforme indica o quadro que se segue:

Tubo (Nº)	Sacarose (12,5 mM)	Água Destilada (mL)	Invertase 1:50 (mL)
0	0,0	2,0	0,5
1	0,4	1,6	0,5
2	0,8	1,2	0,5
3	1,2	0,8	0,5
4	1,6	0,4	0,5
5	2,0	0,0	0,5
6	2,5 mL de padrão contendo 100 ug de glicose		

Incubar os tubos (exceto o tubo nº7) a 37°C, por 15 minutos, para que a invertase catalise a hidrólise da sacarose, resultando na formação de glicose e frutose (açúcares redutores), os quais podem ser determinados pela **Reação de Somogyi-Nelson**.

C. Reação para dosagem de açúcares redutores.

Tão logo termine o período de incubação acrescentar 1 mL do **Reativo de Somogy** (a reação enzimática é paralisada pela desnaturação da invertase, quer pela ação do Cu⁺⁺ ou pela alcalinidade do reagente).

Ferver os tubos em banho-maria por 10 minutos, resfriá-los e juntar 1 mL do **Reativo de Nelson**. AGITAR BEM OS TUBOS.

Em seguida, completar o volume a 10 mL (adicionando 5,5 mL de água destilada), agitar novamente a fazer leitura a 530 nm.

D. Coletar os dados, organizando-os conforme o quadro que se segue.

TUBO (Nº)	T% 530 nm	Abs. (2-logT) 530 nm	Δ Abs. 530 nm	[S]*	V**	$\frac{1}{[S]}$	$\frac{1}{V}$
0				0 mM			
1				2 mM			
2				4 mM			
3				6 mM			
4				8 mM			
5				10 mM			
6				-	-	-	-

* [S] = **concentração de substrato** (sacarose) no meio de reação enzimática expressa em milimolaridade mM.

** V = **velocidade de reação enzimática** expressa em µg (micrograma) de glicose (açúcar redutor) formado por hora.

5. QUESTIONÁRIO - ENZIMAS

1) Em relação à **Aula Prática**, responder:

a) Completar a Tabela acima e utilizar os valores de Δ Abs. para calcular a velocidade da reação enzimática em µg de açúcar redutor (AR) por hora, completando a Tabela abaixo:

Tubo (Nº)	[S] mM	Δ Abs. 530 nm	V (µg AR/15min)	V (µg AR/h)	$\frac{1}{[S]}$ mM	$\frac{1}{V}$ (µg AR/h)
0	0					
1	2					
2	4					
3	6					
4	8					
5	10					
7	100 µg de glicose		-		-	-

b) Calcular as velocidades de reação (V) para cada tubo, utilizando os dados de 1/V (eixo Y) em função de 1/[S] (eixo X), obtendo a equação da **Reta Padrão** em planilha eletrônica.

c) Com base na equação inversa da equação de Michaelis-Mentes, determinar analiticamente os valores de Km e Vmax e discutir os seus significados bioquímicos.

2) Qual o conceito de “sitio ativo”?

3) O que vem a ser velocidade de uma reação enzimática?

- 4) Qual a explicação de Michaelis Mentem para o modo de ação de uma enzima?
- 5) Escreva graficamente a comparação entre as energias de ativação de uma reação catalisada e de uma reação não catalisada.
- 6) A aldolase apresenta K-equilíbrio 9×10^4 . Porém na célula a reação se desloca no sentido da degradação da frutose. Por quê?
- 7) Que vem a ser inibidor competitivo e não competitivo?
- 8) O que é uma enzima alostérica?
- 9) Qual o efeito da temperatura e do pH em uma reação enzimática?
- 10) O que é cofator enzimático?
- 11) O que são coenzimas? Dê exemplos.

REAÇÃO DE HILL (FOTÓLISE DA ÁGUA)

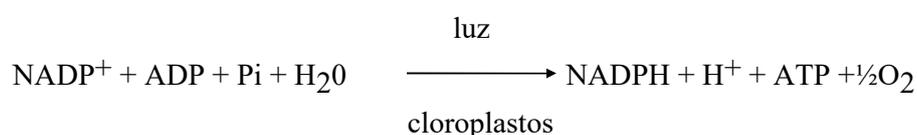
1. OBJETIVO

Avaliar a habilidade metabólica do cloroplasto de promover a fotólise da água, o primeiro passo na sequência de reações da fotossíntese.

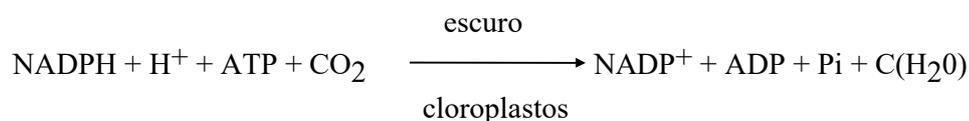
2. FUNDAMENTOS DO MÉTODO

O processo fotossintético, que ocorre no interior do cloroplasto, compreende 2 etapas:

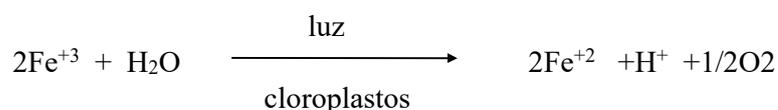
a) **Fase luminosa:** dependente de luz, ocorrendo a fotólise da água acoplada com as produções de NADPH + H⁺ (fotorredução) e de ATP (fotofosforilação), conforme a equação abaixo.



b) **Fase escura:** não depende de luz e corresponde à redução do CO₂ ao nível de carboidrato utilizando NADPH + H⁺ e ATP.



Hill, em 1937, tentando desvendar o processo fotossintético empregando cloroplastos isolados de espinafre pretendia a redução do CO₂ ao nível de carboidrato. Por dificuldades técnicas, limitadas pela época, não conseguiu o seu intento, mas chegou a demonstrar a habilidade de cloroplastos isolados de reduzir outros compostos em um processo acoplado à fotólise da água com evolução de O₂:



Assim a produção fotoquímica de oxigênio exige a presença de um aceptor de H⁺ e/ou elétrons, que necessariamente não precisa ser o CO₂.

No presente experimento será utilizado como aceptor de elétrons (reagente de Hill) um indicador de óxido-redução, o 2,6-diclorofenolindofenol, que na forma oxidada é azul (com λ max. ao redor de 540 nm) e na forma reduzida é incolor (Figura 1), o que permite o acompanhamento da reação fotoquímica mediada por cloroplastos isolados de espinafre.

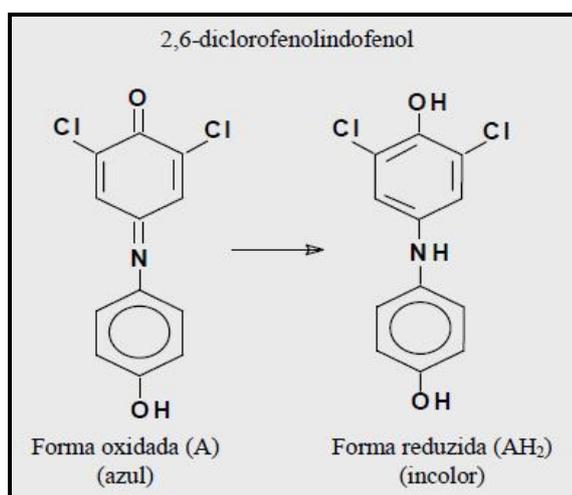


Figura 1. Redução do 2,6 diclorofenolindofenol na Reação de Hill.

3. MATERIAL

- Espectrofotômetro
- Tubos de ensaio (4 por grupo)
- Centrífuga de mesa para tubos de centrífuga (15 ml)
- Almofariz com pistilo (1 para cada grupo)
- Lâmpada de 100 W (2 por aula)
- Micropipeta de 1mL
- Tubos de centrífuga tipo Falcon
- Algodão
- Funil pequeno de plástico
- Pipeta volumétrica (Pasteur)
- Folha de alumínio
- Banho maria (100°C)
- Folhas de espinafre
- Sacarose 0,35M
- Tampão fosfato 0,05 M (pH = 6,5) contendo sacarose 0,35 M
- 2,6-diclorofenolindofenol (16 mg/100 ml)
- Ácido ascórbico (cristais)

4. PRÁTICA

A. Extração dos Cloroplastos

- a) Picar 5 g de folhas de espinafre e homogeneizar em almofariz usando areia lavada como abrasivo e 10 ml de sacarose 0,35 M (adicionados aos poucos) como extrator.
- b) Filtrar o homogeneizado em algodão.
- c) Centrifugar por 2 minutos a 200 x g, (1300 rpm) desprezar o precipitado e centrifugar novamente o sobrenadante por 7 minutos a 1000 x g. (3000 rpm)
- d) Ressuspender os cloroplastos lavados em 10 ml de tampão fosfato 0,05 M (pH= 6,5) contendo sacarose 0,35 M.

B. Ensaio

Preparar 4 tubos de colorímetro conforme o quadro que se segue:

TUBOS	SUSPENSÃO CLOROPLASTO (mL)	TAMPÃO FOSFATO (mL)	2,6-DCF (mL)	OBSERVAÇÕES
1	1,5 (+ ác.ascórbico)	3	0,5	ajustar o "zero" do aparelho
2	1,5	3	0,5	ler imediatamente
3	1,5	3	0,5	ler imediatamente e cobrir com folha de Alumínio
4	1,5 (ferver 3')	3	0,5	

Os tubos 2, 3 e 4 são expostos à luz de lâmpada (100 W) durante 1 minuto (o tubo nº 3 protegido da luz) e faz-se a leitura de absorbância (Abs.) repetindo a operação 3 vezes.

5. QUESTIONÁRIO – FOTOSSÍNTESE

1) Em relação à **Aula Prática**, anotar as leituras obtidas e fazer um gráfico:

TUBOS	SUSPENSÃO CLOROPLASTO (mL)	ABS. ($\lambda=540$ nm) 1ª LEITURA	ABS. ($\lambda=540$ nm) 2ª LEITURA	ABS. ($\lambda=540$ nm) 3ª LEITURA
1	1,5 (+ ácido ascórbico)			
2	1,5			
3	1,5			
4	1,5 (ferver 3')			

Discutir os resultados:

- Qual a função do ácido ascórbico?
- Qual a função do 2,6 DCF?
- Descreva o observado nos tubos 2, 3 e 4 durante as leituras.
- Em quais tubos ocorrem fotossíntese? Por quê?
- Em quais tubos não ocorre a fotossíntese? Por quê?



- 2) Quais os eventos que dependem e quais os que não dependem da luz quanto à formação de glicose por uma planta fotossintetizadora?
- 3) Por que os comprimentos de onda na faixa de 450 e 650 nm são mais eficientes para a realização de fotossíntese pelas plantas superiores?
- 4) Quais as funções dos carotenóides no processo fotossintético conduzido pelas plantas?
- 5) Como se explicam a essencialidade do Cl, Mn e Mg para o processo fotossintético?
- 6) Como são estruturados os sistemas de pigmentos para a captação da energia radiante para a condução da fotossíntese?
- 7) Qual a função da água no processo fotossintético?
- 8) O que fica demonstrado quando se observa a redução do 2,6-diclorofenolindofenol por cloroplastos iluminados (reação de Hill)?
- 9) Como os herbicidas que bloqueiam o transporte de elétrons no processo fotossintético matam a planta?
- 10) Como que os herbicidas que bloqueiam o transporte de elétrons na fase luminosa da fotossíntese (2,4-DNP e DCMU) matam a planta?
- 11) O que vem a ser “foto-redução do NADP+” e “fotofosforilação do ADP”?
- 12) Qual o primeiro composto formado pela assimilação do CO₂ mediante a via C₃ de fixação? Idem para a via C₄. Quais as enzimas envolvidas nesta etapa e suas afinidades para com o CO₂?
- 13) Que adaptações ocorreram nas crassuláceas que lhes permitem a melhor sobrevivência em ambientes quentes e áridos?
- 14) O que vem a ser “fotorrespiração”? Qual o seu substrato e porque é pouco intensa nas plantas C₄? Qual a importância da luz e do O₂ neste processo?
- 15) Cite quatro diferenças entre plantas C₃ e C₄ (exceto foto-respiração).
- 16) Porque as plantas C₄ fazem fotossíntese com boa eficiência mesmo em temperaturas mais elevadas?
- 17) Porque a fotossíntese nas plantas C₄ não atinge a saturação mesmo com grande intensidade luminosa?
- 18) O que vem a ser “ponto de compensação” e por que é menor para as plantas C₄?

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVRON, M. "Mechanism of photoinduced electron transport in isolated chloroplasts", in D.R. Sanadi (ed.), **Current Topics of Bioenergetics**, 12, Academic Press, New York, 1967, p.1.

JACOBS, M.B. **The Chemical Analysis of Foods and Food Products**. Van Nostrand, New York, 1958, 970p.

LITWACK, G. **Experimental Biochemistry - A Laboratory Manual**. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1960, 313p.

MARTELLI, H.L.; PANEK, A.D. **Bioquímica Experimental**. Ao Livro Técnico, Rio de Janeiro, 1968, 112p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3a. Ed., Sarvier, São Paulo, 2002, 975p.

VILLELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e Experimentos de Bioquímica**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1972, 522p.

VILLELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e Experimentos de Bioquímica**. Koogan, Rio de Janeiro, 1973, 552p.

WHARTON, D.C.; MC CARTY, R.E. **Experiments and Methods in Biochemistry**. McMillan Publishing Co, Inc., New York, 1972, 350p.

Tabela de Conversão

	T em A x 1.000									
	<u>00</u>	<u>01</u>	<u>02</u>	<u>~</u>	<u>04</u>	<u>05</u>	<u>06</u>	<u>07</u>	<u>08</u>	<u>09</u>
0		3.000	2699	2.523	2.398	2.301	2.222	2.155	2.097	2.046
1	2.000	1.959	1.921	1.886	1.854	1.824	1.796	1.770	1.745	1.721
2	1.699	1.678	1.658	1.638	1.620	1.602	1.585	1.569	1.553	1.538
3	1.523	1.509	1.495	1.481	1.469	1.458	1.444	1.432	1.420	1.409
4	1.398	1.387	1.377	1.387	1.357	1.347	1.337	1.328	1.319	1.310
5	1.301	1.292	1.284	1.276	1.268	1.260	1.252	1.244	1.237	1.229
6	1.222	1.215	1.208	1.201	1.194	1.187	1.180	1.174	1.167	1.161
7	1.155	1.149	1.143	1.137	1.131	1.125	1.119	1.114	1.108	1.102
8	1.097	1.092	1.086	1.081	1.076	1.071	1.066	1.060	1.056	1.051
9	1.048	1.041	1.036	1.032	1.027	1.022	1.018	1.013	1.009	1.004
10	1.000	0.996	0.991	0.987	0.983	0.979	0.975	0.971	0.967	0.963
11	959	955	951	947	943	939	938	932	928	924
12	921	917	914	910	907	903	900	896	893	889
13	886	883	879	876	873	870	866	863	860	857
14	854	851	848	845	842	839	836	833	830	827
15	824	821	818	815	812	810	807	804	801	799
16	796	793	790	788	785	783	780	777	775	772
17	770	767	764	762	759	757	764	752	750	747
18	745	745	742	738	735	733	730	728	726	724
19	721	719	717	714	712	710	708	706	703	701
20	699	697	695	693	690	688	686	684	682	680
21	678	676	674	672	670	688	666	664	662	660
22	658	656	654	652	650	648	646	644	642	640
23	638	636	635	633	631	629	627	625	623	622
24	620	618	616	614	613	611	609	607	606	604
25	602	600	599	597	595	503	592	590	588	587
26	585	583	582	580	578	577	575	573	572	570
27	569	567	565	564	562	561	559	558	556	554
28	553	551	550	548	547	545	544	542	541	539
29	538	536	535	533	532	530	529	527	528	524
30	523	521	520	519	517	516	514	513	511	510
31	509	507	506	504	503	502	500	499	498	495
32	495	493	492	491	489	488	487	485	484	483
33	481	480	479	478	476	475	474	472	471	470
34	469	467	468	465	463	462	461	460	458	457
35	456	455	453	452	451	450	449	447	446	445
36	444	442	441	440	439	438	437	435	334	433
37	432	431	429	428	427	426	425	424	423	421
38	420	419	418	417	416	415	413	412	411	410
39	409	408	407	406	405	403	402	401	400	399
40	398	397	396	395	394	393	391	390	389	388
41	387	386	385	384	383	382	381	380	379	378
42	377	376	375	374	373	372	371	370	369	368
43	367	366	365	364	363	362	361	360	359	358
44	357	356	355	354	353	352	351	350	349	348
45	347	346	345	344	343	342	341	340	339	338
46	337	336	335	334	333	333	332	331	330	329
47	328	327	328	326	325	324	323	322	321	320
48	319	318	317	316	315	314	313	312	312	311
49	310	309	308	307	306	305	305	304	303	302
	<u>00</u>	<u>01</u>	<u>02</u>	<u>03</u>	<u>04</u>	<u>05</u>	<u>06</u>	<u>07</u>	<u>08</u>	<u>09</u>
50	301	300	299	298	298	297	296	295	294	293
51	292	292	291	290	289	288	287	287	286	285
52	284	283	282	281	281	280	279	278	277	277
53	278	275	274	273	272	272	271	270	289	268
54	268	267	266	265	264	264	263	262	261	260
55	250	259	258	257	256	255	255	254	253	253
56	252	251	250	249	249	248	247	246	246	245
57	244	243	243	242	241	240	240	239	238	237
58	237	236	235	234	234	233	232	231	231	230
59	229	228	228	227	226	225	225	224	223	223
60	222	221	220	220	219	218	218	217	216	215
61	215	214	213	213	212	211	210	210	209	208
62	208	207	206	206	205	204	203	203	202	202
63	201	200	199	199	198	197	197	196	195	194
64	194	193	192	192	191	190	190	189	188	188
65	187	186	186	185	184	184	183	182	182	181
66	180	180	179	178	178	177	177	176	175	175
67	174	173	173	172	171	171	170	169	169	168
68	167	167	166	166	165	164	164	163	162	162
69	161	161	160	159	159	158	157	157	156	156
70	155	154	154	153	152	152	151	151	150	149
71	149	148	148	147	146	146	145	144	144	143
72	143	142	141	141	140	140	139	138	138	137
73	137	136	135	135	134	134	133	133	132	132
74	131	130	130	129	128	128	127	127	126	126
75	125	124	124	123	123	122	121	121	120	120
76	119	119	118	117	117	116	116	115	115	114
77	114	113	112	112	111	111	110	110	109	109
78	108	107	107	106	106	105	105	104	103	103
79	102	102	101	101	100	100	099	099	098	097
80	097	096	096	095	095	094	094	093	093	092
81	092	091	090	090	089	089	088	088	087	087

82	086	086	085	085	084	084	083	083	082	081
83	081	080	080	079	079	078	078	077	077	076
84	076	075	075	074	074	073	073	072	072	071
85	071	070	070	069	069	068	068	067	067	066
86	066	065	064	064	063	063	062	062	061	061
87	060	060	059	059	058	058	057	057	057	056
88	056	055	055	054	054	053	053	052	052	051
89	051	050	050	049	049	048	048	047	047	046
90	046	045	045	044	044	043	043	042	042	041
91	041	040	040	040	039	039	038	038	037	037
92	036	036	035	035	034	034	033	033	032	032
93	032	031	031	030	030	029	029	028	028	027
94	027	026	026	025	025	025	024	024	023	023
95	022	022	021	021	020	020	020	019	019	018
96	018	017	017	016	016	015	015	015	014	014
97	013	013	012	012	011	011	011	010	010	009
98	009	008	007	007	007	007	006	006	005	005
99	004	004	003	003	003	002	002	001	001	000