



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

BIOQUÍMICA QBQ230N

Biologia Noturno

Professores

Alexander Henning Ulrich
Carlos Takeshi Hotta
Ricardo José Giordano

2018

ÍNDICE

BIOQUÍMICA QBQ230N	1
ÍNDICE	2
APRESENTAÇÃO	5
PROFESSORES:	5
INTRODUÇÃO E NORMAS GERAIS	5
NORMAS E RECOMENDAÇÕES NO LABORATÓRIO	5
GUIA PARA RELATÓRIO DE LABORATÓRIO	6
AVALIAÇÃO	7
BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA	7
CALENDÁRIO DE MÓDULOS E ATIVIDADES 2015 ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	
MÓDULO 1: ÀGUA, REAÇÃO ÁCIDO-BASE, PH E SISTEMA TAMPÃO	8
Exercícios do módulo 1	11
MÓDULO 2: AMINOÁCIDOS	12
Exercícios do módulo 2	12
MÓDULO 3: ESTRUTURA PRIMÁRIA DE PROTEÍNAS	15
Exercícios do módulo 3	16
MÓDULO 4: ESTRUTURA SECUNDÁRIA E Terciária DE PROTEÍNAS	17
Exercícios do módulo 4	20
MÓDULO 5: CINÉTICA E TERMODINÂMICA	21
Exercícios do módulo 5	25
MÓDULO 6: CINÉTICA ENZIMÁTICA	26
Exercícios do módulo 6	30
MÓDULO 7: MECANISMOS DE CATÁLISE ENZIMÁTICA	32

Exercícios do módulo 7	34
MÓDULO 8: CARBOIDRATOS: ESTRUTURA E FUNÇÃO	35
Exercícios do módulo 8	39
MÓDULO 9: LIPÍDIOS, MEMBRANA & TRANSPORTE ATRAVÉS DE MEMBRANAS	40
Exercícios do módulo 9	43
MÓDULO 10: INTRODUÇÃO AO METABOLISMO	45
Exercícios do módulo 10	47
MÓDULO 11: GLICÓLISE	49
Exercícios do módulo 11	52
MÓDULO 12: GLICONEOGÊNESE	53
Exercícios do módulo 13	54
MÓDULO 13: CICLO DE KREBS	55
Exercícios do módulo 13	56
MÓDULO 14: CADEIA RESPIRATÓRIA E FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA	57
Exercícios do módulo 14	59
MÓDULO 15. ÁCIDOS GRAXOS: ESTRUTURA, FUNÇÃO E METABOLISMO	60
Exercícios do módulo 15	63
MÓDULO 16: VIA DAS PENTOSSES E SÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS	64
Exercícios do módulo 16	66
MÓDULO 17: METABOLISMO DO GLICOGÊNIO	67
Exercícios do módulo 17	69
MÓDULO 18: CONTROLE HORMONAL DO METABOLISMO	70
Exercícios do módulo 18	73
MÓDULO 19: METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS E CICLO DA UREIA	74
Exercícios do módulo 19	75

MÓDULO 20 – INTEGRAÇÃO DO METABOLISMO	76
Exercícios do módulo 20	78
MÓDULO 21 – FOTOSSÍNTESE.....	79
Exercícios do módulo 21	80
MÓDULO 22: CICLO DO NITROGÊNIO	81
Exercícios do módulo 22	82
MICROPIPETADORES.....	84
LABORATÓRIO 1: COLORIMETRIA E ESPECTROFOTOMETRIA	86
LABORATÓRIO 2: TITULAÇÃO E CROMATOGRAFIA DE AMINOÁCIDOS.....	92
LABORATÓRIO 3: PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS – SDS-PAGE E PONTO ISOELÉTRICO (PI)	98
LABORATÓRIO 4: CINÉTICA ENZIMÁTICA - INVERTASE	106
LABORATÓRIO 5: REAÇÃO DE TRANSAMINAÇÃO	113

APRESENTAÇÃO

PROFESSORES:

Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich

sala 962, e-mail: henning@iq.usp.br

Prof. Dr. Carlos Takeshi Hotta

sala 951, e-mail: hotta@iq.usp.br

Prof. Dr. Ricardo José Giordano

sala1250, e-mail giordano@iq.usp.br

MONITORES:

Rafael Siqueira Chagas

e-mail: chagas.rs@usp.br

INTRODUÇÃO E NORMAS GERAIS

A disciplina de Bioquímica (QBQ230-noturno) compreende o programa de módulos mostrado no calendário das páginas 8 e 9. Cada módulo focaliza um tópico a ser desenvolvido em um dia de aula, envolvendo 3 atividades:

- a) Aula expositiva pelo professor;
- b) Grupos de discussão centrados em questões objetivas (exercícios da apostila);
- c) Fechamento do tema pelo professor que analisará as questões discutidas em grupo.

Além destes módulos, desenvolvidos em sala de aula, haverá também um conjunto de módulos de laboratório, consistindo em 5 aulas práticas.

Os grupos de discussão serão formados por 6 alunos, organizados no primeiro dia de aula permanecendo fixos por todo o curso.

Cada módulo de laboratório consistirá em 3 atividades:

- a) Explicação da aula prática (em sala de aula);
- b) Execução da aula prática no laboratório;
- c) Relatório que será preparado pelo grupo e entregue na aula seguinte.

Nos dias em que houver atividade na sala multimídia, a turma será dividida em dois grupos (A e B), os quais alternarão suas atividades na sala multimídia e na sala de aula. Isto é, enquanto o grupo A está na sala multimídia, o grupo B está na sala de aula (período de discussão e realização de exercícios).

NORMAS E RECOMENDAÇÕES NO LABORATÓRIO

É PROIBIDO COMER, BEBER E FUMAR NO LABORATÓRIO

- Leia com detalhe o procedimento experimental (protocolo) e preste atenção às instruções fornecidas antes de iniciar a experiência.
- Procure utilizar reagentes, vidraria e equipamentos disponíveis com cuidado, para evitar desperdício e quebra.
- Mantenha sua área de trabalho organizada. Ao terminar a experiência passe água na vidraria utilizada e a coloque no local indicado.
- Em caso de dúvida ou acidente, peça auxílio aos monitores ou aos professores.

USO DO AVENTAL NAS AULAS PRÁTICAS É OBRIGATÓRIO!

CADA ALUNO DEVERÁ TRAZER SEU PRÓPRIO AVENTAL

GUIA PARA RELATÓRIO DE LABORATÓRIO

OBJETIVOS: Colocar o(s) objetivo(s) da aula prática de forma clara e concisa.

INTRODUÇÃO: Deve conter os fundamentos bioquímicos da metodologia empregada (aspectos teóricos da aula prática encontrados na literatura).

MATERIAIS E MÉTODOS: Descrever os procedimentos executados em laboratório incluindo todos os reagentes, materiais e equipamentos utilizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Colocar todos os dados obtidos (utilizar tabelas, caso julgue necessário). Os gráficos serão aceitos em papel milimetrado ou no Excel. Comentar os resultados e discutir possíveis diferenças obtidas comparando com dados da literatura.

CONCLUSÃO: Comentar quais as conclusões da aula prática. Ser claro e objetivo nas conclusões. Esclarecer se os objetivos propostos foram atingidos ou não.

BIBLIOGRAFIA: Colocar todos os livros e artigos consultados.

NÃO ULTRAPASSAR 5 PÁGINAS DE RELATÓRIO!

AVALIAÇÃO

A avaliação de desempenho será composta dos seguintes itens:

- a) Provas em grupo (PG1 a PG8), que consistirão num trabalho em grupo para resolução de questões objetivas após a aula expositiva;
- b) Relatórios de laboratório (R1 a R4);
- c) Provas escritas individuais (P1, P2 e P3). A última prova escrita da matéria incluirá temas abordados nas aulas de laboratório.

O cálculo da media final será feito através da seguinte formula:

$$MédiaFinal = \frac{\left(\frac{\sum PGs + \sum Rs}{13} \right) \times 2 + P1 \times 2,5 + P2 \times 3,0 + P3 \times 2,5}{10}$$

Haverá uma única prova substitutiva para substituir uma das provas individuais de avaliação. Reposições de PG ou relatório de laboratório estão vetados.

A presença em todas as atividades é obrigatória. A lista de presença será passada em todas as aulas.

Alunos que alcançarem a média final $\geq 5,0$ e mostrarem freqüência $\geq 70\%$ estarão aprovados. Aqueles cuja média for no mínimo igual a 3,0 e apresentarem freqüência $\geq 70\%$ poderão fazer a prova de recuperação.

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

A bibliografia recomendada envolve 2 livros textos em português:

TORRES, B. B. & MARZZOCCO, A. **Bioquímica Básica.**

VOET, D; VOET, J. & PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica.**

Contudo, outros excelentes textos de Bioquímica, em inglês ou português, poderão ser usados com igual proveito:

VOET, D. & VOET, J. **Biochemistry.**

STRYER, L.; BERG, J. M. AND TYMOCZKO, J. L. **Biochemistry.**

LEHNINGER, A. L. **Principles of Biochemistry.**

CALENDÁRIO DE MÓDULOS E ATIVIDADES 2018; QBQ 230 N

DATA	PROF	Atividade	TÍTULO	Avaliação	
AGOSTO	2	R	T	Água; Reação ácido-base, pH e Sistema tampão. Equilíbrio	Exercício
	3	R	T	Aminoácidos: Estrutura, propriedades químicas	Provinha 1
	9	R	P	Prática 1: Colorimetria e espectrofotometria	RELATÓRIO 1
	10	R	MM	Proteínas: análise de sequências e métodos de separação	Exercício
	16	R	P	Prática 2: Titulação e cromatografia de aminoácidos	RELATÓRIO 2
	17	R	T+MM	Proteínas: Estrutura e função	Exercício
	23	R	P	Prática 3: Fracionamento de proteínas	RELATÓRIO 3
	24	R	T	Introdução à Cinética e Termodinâmica Química	Exercício
	30	H	T+MM	Cinética enzimática	Provinha 2
	31	H	T	cont. Cinética enzimática	Exercício
SETEMBRO	6	---	-	<i>Semana da Pátria – não haverá aula</i>	-
	7	---	-	<i>Semana da Pátria – não haverá aula</i>	-
	13	H	T	Carboidratos: estrutura e função	Exercício
	14	H	A	AVALIAÇÃO 1	P1
	20	C	P	Prática 4: Cinética da invertase	RELATÓRIO 4
	21	C	T	Lipídios, membranas e transporte através de membranas	Exercício
	27	C	T	Introdução ao metabolismo	Exercício
	28	C	T	Glicólise	Provinha 3
OUTUBRO	4	---	-	<i>Semana Temática da Biologia – não haverá aula</i>	-
	5	---	-	<i>Semana Temática da Biologia – não haverá aula</i>	-
	11	H	T	Gliconeogênese	Exercício
	12	--	T	<i>Dia da Padroeira do Brasil</i>	-
	18	H	T	Ciclo de Krebs	Exercício
	19	H	T	Cadeia respiratória e fosforilação oxidativa	Provinha 4
	25	H	T	Síntese e degradação de ácidos graxos	Exercício
26	H	T	Metabolismo do glicogênio e controle	Provinha 5	
NOVEMBRO	01	H	T	Metabolismo de aminoácidos e ciclo da ureia	Exercício
	02	---		Finados	
	08	C	P	Prática 5: Reação de transaminação	Relatório
	09	C		AVALIAÇÃO 2	P2
	15	----		Proclamação da República	Exercício
	16	H	T	Via das pentoses	Provinha 6
	22	C	T	Integração do Metabolismo	Exercício
	23	C	T	Fotossíntese e Ciclo de Calvin	Provinha 7
	29	H	T	Ciclo do Nitrogênio	Exercício
	30	H	A	AVALIAÇÃO 3	P3
06	H	PD	Plantão de Dúvidas	-	

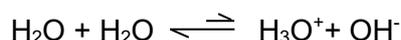
	07	H	A	Avaliação Substitutiva	AVALIAÇÃO
--	----	---	---	------------------------	-----------

T: aula teórica; MM: software na sala multimídia; P: aula prática no LBBM; Todas as aulas incluem exercícios em grupo. Provinhas e relatórios também são feitos em grupo. Todas as aulas incluem exercícios em grupo. Provinhas e relatórios também são feitos em grupo.

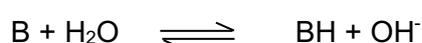
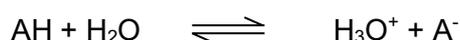
MÓDULO 1: ÁGUA, REAÇÃO ÁCIDO-BASE, pH E SISTEMA TAMPÃO

1. A molécula de água, H₂O, apresenta um ângulo de 104,5 graus entre as duas ligações O-H, dando-lhe um caráter altamente polar. Além disso, o átomo de O possui 2 pares de elétrons livres, permitindo a formação de ligações (ou pontes) de H entre moléculas vizinhas. Esta estrutura dá à água propriedades físicas e químicas de enorme importância biológica.

2. A água se ioniza através de uma reação ácido-base:



A reação ácido-base se caracteriza pela troca de prótons entre pares conjugados de ácidos e bases. A água pode se comportar como ácido e como base:



Estas são reações de equilíbrio, às quais correspondem constantes de equilíbrio definidas.

Por exemplo: $K = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{A}^-]}{[\text{AH}][\text{H}_2\text{O}]}$

K mede a afinidade relativa das bases, de cada par ácido-base conjugados (AH/ A⁻ e H₃O⁺/ H₂O), por prótons. Fala-se comumente em constante de dissociação de um ácido (K_a), significando: $K_a = K [\text{H}_2\text{O}] = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{AH}]}$, onde [H₂O] é essencialmente constante (55 M).

3. [H⁺] é a concentração hidrogeniônica e os valores de [H⁺] para a maioria das soluções são muito baixos e difíceis de serem comparados. Um valor mais prático é conhecido como pH:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+].$$

como	$1/[\text{H}^+] = 1/K \times [\text{A}^-]/[\text{AH}]$
pode-se obter	$\text{pH} = -\log K + \log [\text{A}^-]/[\text{AH}]$
por analogia	$-\log K = \text{pK}$
e	$\text{pH} = \text{pK} + \log [\text{A}^-]/[\text{AH}]$

Conclui-se que pK é numericamente igual a pH da solução na qual as concentrações molares do ácido e sua base conjugada são iguais (ie $\log [\text{A}^-]/[\text{AH}] = 0$).

A igualdade $\text{pH} = \text{pK} + \log [\text{A}^-]/[\text{AH}]$ é conhecida como **Equação de Henderson-Hasselbach**.

4. Ácidos são classificados de acordo com sua força relativa, ou seja, de acordo com sua capacidade de transferir um próton para a água. Ácidos com constantes de dissociação menores do que aquela de H₃O⁺ (que, por definição, é igual a 1 em soluções aquosas (vê se consegue confirmar porquê!)) são só parcialmente ionizados em soluções aquosas e são conhecidos como ácidos fracos (K < 1). Já os ácidos fortes têm constantes de dissociação maiores que a de H₃O⁺, sendo quase completamente ionizados em soluções aquosas (K > 1).
5. Tampões são sistemas aquosos que tendem a resistir a variações no seu pH quando pequenas quantidades de ácido (H⁺) ou base (OH⁻) são adicionadas. Um sistema tampão

consiste de um ácido fraco (o doador de prótons) e sua base conjugada (o receptor de prótons). É comum encontrar os seguintes símbolos para representar um ácido (AH ou BH⁺) e sua base conjugada (A⁻ ou B:)

6. A adição de ácido forte (H⁺) ou base forte (OH⁻) a uma solução aquosa de um ácido fraco, por exemplo, ácido acético (pK_a = 4,76), causa pequenas variações de pH, se a solução estiver a um pH próximo do pK do ácido. Este comportamento define um tampão ácido-base.

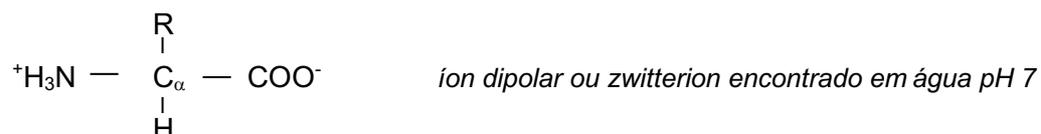
Exercícios do módulo 1

- 1) Defina ácidos e bases no conceito de Brønsted, mostrando exemplos.
- 2) a) Qual o pH das soluções 0,1 M dos ácidos fortes HCl e HNO₃? b) Usar a equação Henderson-Hasselbach para calcular o grau de dissociação dos ácidos fracos i) H₂S (K_a=1x10⁻⁷) e ii) ácido acético (K_a=2x10⁻⁵) em soluções 0,1 M. Qual o respectivo pH dessas soluções?
- 3) Esquematize a curva de titulação de 1 L de uma solução de 0,1 M H₃PO₄ com uma solução de 10 M NaOH, colocando pH (eixo y) em função de volume de base adicional (eixo x). Indicar os pontos na titulação (volumes de NaOH) em que o pH equivale cada um dos pK_{as} do ácido.
K_{a1}=7.5 x 10⁻³; K_{a2}=6.2 x 10⁻⁸; K_{a3}= 4.8 x 10⁻¹³
- 4) Indique como se pode preparar 1 L de um tampão a pH=7,0, capaz de manter o pH estável com adição de 10 mL de HCl 0,1M, dispondo-se das soluções:
- a) 1M H₃PO₄
b) 1M ácido acético
c) 1M NaOH
- 5) Desenhe a estrutura do gelo, mostrando ligações de hidrogênio entre moléculas de água. O que acontece quando o gelo derrete? Por que a água líquida a 4°C é mais densa do que o gelo a 0°C?
- 6) Desenhe a estrutura do NaCl no estado sólido e também no estado aquoso, neste último, destaque suas interações com água.

MÓDULO 2: AMINOÁCIDOS

1. Aminoácidos, bases purínicas e pirimidínicas, nucleosídeos e nucleotídeos, hexoses (como glicose), são componentes monoméricos dos principais polímeros biológicos, ou seja, proteínas, ácidos nucleicos (DNA e RNA) e polissacarídeos (glicogênio, amido e celulose). Aminoácidos, bases, nucleosídeos e nucleotídeos são muito solúveis em água e possuem grupos funcionais que participam em reações ácido-base. Glicose também é altamente solúvel em água, mas não participa em reações ácido-base.

i. Há 20 aminoácidos que compõem proteínas (Tabela 1), todos mostrando a fórmula geral:

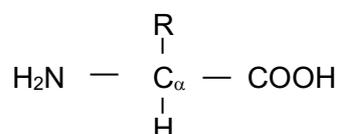


2. Aminoácidos podem ser agrupados em classes com base nas propriedades dos seus grupos radicais (R), em particular sua polaridade ou tendência de interagir com água em pH biológico ($\pm 7,0$).
3. Todos os aminoácidos livres comportam como ácidos polipróticos. Quando um aminoácido cristalino é dissolvido em água, ele pode agir como um ácido ou como uma base. O grupo carboxílico mostra um pK em torno de 2,0, enquanto o grupo amino tem um pK entre 9,0 e 10,0. Portanto, no pH fisiológico (pH 7,0), a maioria das moléculas de todos os aminoácidos está na forma de íons dipolares (zwitterions). **Chama-se pI de um aminoácido o pH da solução na qual suas moléculas possuem carga líquida nula.** Na cadeia lateral (-R) os aminoácidos apresentam grupos funcionais, entre os quais existem grupos ácido-base.
4. O carbono α dos aminoácidos, excetuando-se a glicina, é assimétrico, fazendo com que estas substâncias tenham atividade óptica e, portanto, apresentem pares de isômeros ópticos.

Exercícios do módulo 2

1) Quais dos aminoácidos têm dois carbonos quirais e qual deles não possui isomeria óptica?

2) Mostre porque a seguinte forma não-iônica de um aminoácido não pode ser encontrada em solução aquosa.



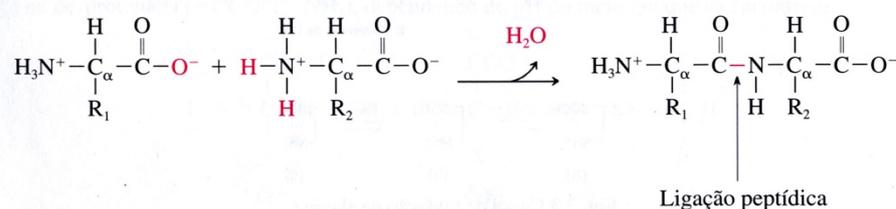
- 3)** O etanol não tem caráter ácido em água, enquanto fenol e ácido acético se dissociam em solução aquosa, sendo o ácido acético ($pK=4,8$) mais forte que o fenol ($pK=10$). Como se pode explicar o comportamento destes três compostos em água a partir de suas estruturas moleculares?
- 4)** Esquematize a curva de titulação da glicina com NaOH a partir de $pH=1$ e do ácido aspártico com HCl a partir de $pH=11$. Coloque o pH na ordenada e, na abscissa, a quantidade de equivalentes de ácido ou base forte.
- 5) a)** Quais os pontos isoelétricos de: glicina ($pKs=2,5$ e $9,5$), ácido aspártico ($pKs=2,5$; $4,0$ e $9,5$), lisina ($pKs=2,5$; $9,5$ e 10) e histidina ($pKs=2,5$; $6,0$ e $9,5$)? **b)** Calcular as cargas líquidas (aproximadas) do ácido aspártico, lisina ou histidina nos seguintes pHs : $pH 1$, $pH 8$, $pH 11$.
- 6)** Tentar classificar os aminoácidos em termos da natureza química dos seus grupos radicais: **a)** ionizáveis ou não ionizáveis, **b)** ácidos ou básicos, **c)** polares ou não polares, **d)** hidrofílicos ou hidrofóbicos, **e)** alifáticos ou aromáticos, **f)** lineares ou ramificados e **g)** pequenos e grandes.
- 7)** Na Tabela 1 indicar: a) O código de letra única para cada aminoácido e b) os pK_R dos aminoácidos com grupos radicais ionizáveis.

Tabela 1. Aminoácidos.

Apolares (Hidrófobos)					
Glicina (Gly)	Alanina (Ala)	Valina (Val)	Leucina (Leu)	Isoleucina (Ile)	Metionina (Met)
Prolina (Pro)	Fenilalanina (Phe)	Triptofano (Trp)			

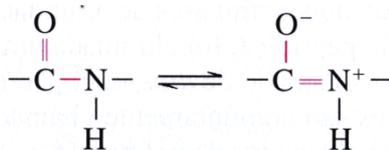
Polares (Hidrófilos)					
Polares sem carga					
Serina (Ser)	Treonina (Thr)	Cisteína (Cys)	Asparagina (Asn)	Glutamina (Gln)	Tirosina (Tyr)
Polares com carga positiva (Básicos)					
Lisina (Lys)	Arginina (Arg)	Histidina (His)			
Polares com carga negativa (Ácidos)					
Aspartato (Asp)	Glutamato (Glu)				

1. A descrição da estrutura das proteínas é dividida em quatro níveis de organização: estrutura primária, secundária, terciária e quaternária.
2. A estrutura primária se refere à seqüência de aminoácidos que compõem a proteína. Trata-se, portanto, da estrutura de ligações covalentes. **A principal ligação covalente entre aminoácidos é a ligação peptídica.** Os aminoácidos podem formar polímeros através da ligação do grupo carboxila de um aminoácido com o grupo amino de outro. Esta ligação carbono-nitrogênio chamada ligação peptídica, é obtida por exclusão de uma molécula de água. Quimicamente, a formação da ligação peptídica pode ser representada pela seguinte equação:

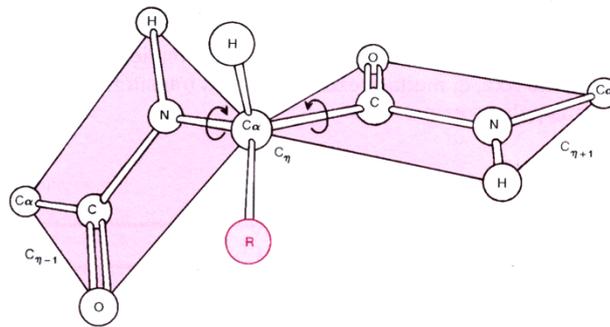
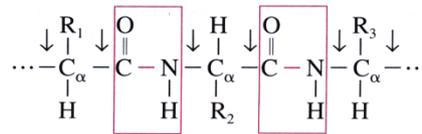


Esta reação, como esta escrita, jamais ocorre nos seres vivos. A união dos aminoácidos por ligação peptídica não é feita por reação direta entre eles, mas através de um complexo aparato de síntese protéica, que inclui ribossomos, ácidos ribonucléicos, várias proteínas e enzimas num processo chamado “tradução”. A equação mostra apenas o resultado líquido do processo.

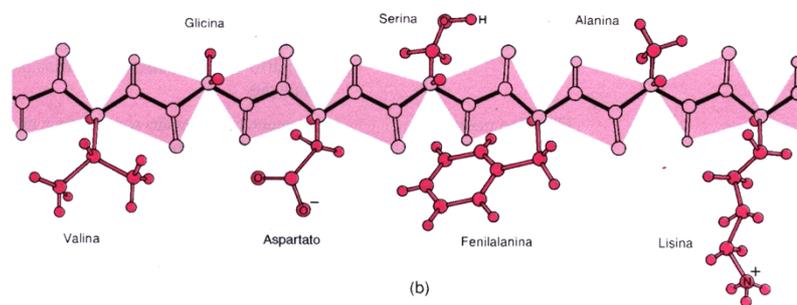
3. As propriedades da ligação peptídica impõem restrições ao dobramento do polímero formado. A ligação peptídica apesar de ser representada por um único traço de ligação, tem características intermediárias entre uma ligação simples e uma dupla ligação, devido as interações entre duas formas de ressonância.



A consequência desse caráter parcial de dupla ligação é que não há possibilidade de rotação em torno da ligação peptídica. Assim sendo, os quatro átomos dos grupamentos que participam da ligação peptídica ficam dispostos em um plano rígido, constituindo o que se costuma chamar de grupo peptídico ou unidade peptídica (vide retângulos) Notar também que os dois carbonos alpha (C_α) vizinhos de cada ligação peptídica também se encontram o plano.



(a)



(b)

Marzocco & Torres, Bioquímica Básica.

O polímero formado pode, portanto, ser visualizado como uma cadeia constituída por unidades planares (unidades peptídicas), unidas entre si com uma articulação flexível: o carbono α . Esta cadeia chama-se cadeia polipeptídica. As proteínas podem ser formadas por uma ou mais cadeias polipeptídicas.

4. Todavia, existem pontos de dobramento entre as unidades peptídicas rígidas, graças a possibilidade de rotação em torno das ligações com o carbono alfa (N-C α e C α -C), que são ligações efetivamente simples (vide figura acima). Estas ligações são chamadas phi (ϕ) e psi (ψ) respectivamente.
5. A cadeia polipeptídica pode ser dividida entre a **cadeia principal** e as **cadeias laterais** (grupos R) ligados aos carbonos alfa.

Exercícios do módulo 3

- 1) Defina estrutura primária, secundária, terciária e quaternária de uma proteína, dando exemplos.
- 2) Esquematize a estrutura de uma ligação peptídica.
- 3) **a)** Desenhar o tripeptídeo Ala-Asp-His. **b)** Calcular o seu pl. **c)** Calcular sua carga líquida em pH 1, pH 6 e pH 12.

4) Com os dados abaixo, defina a seqüência do peptídeo analisado: **a)** hidrólise ácida total resultou em: Arg, Tyr, Leu, Ala, Glu Lys, Ser e Pro; **b)** dansilação e hidrólise produziram: dansil-Leu; **c)** dois ciclos consecutivos de degradação de Edman liberaram, respectivamente Leu e Tyr; **d)** tripsina liberou 2 peptídeos cujas composições, após hidrólise ácida total, foram, respectivamente (Tyr, Leu, Arg) e (Ser, Glu, Pro, Ala Lys); **e)** carboxipeptidase A não liberou nada, mas carboxipeptidase C liberou Ser; **f)** endopeptidase V8 liberou o tripeptídeo Lys-Pro-Ser e um pentapeptídeo que, tratado com carboxipeptidase C, liberou Glu.

5) Mostre a reação de óxido-redução da cisteína que é importante na estrutura de peptídeos.

MÓDULO 4: ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERCIÁRIA DE PROTEÍNAS

1. A estrutura secundária é definida pela conformação local do esqueleto de ligações peptídicas que compõe o eixo da proteína. Esta conformação local pode ser explicitamente expressa através dos ângulos phi (ϕ) e psi (ψ) (vide Módulo 3). Em geral, certas combinações de ângulos phi (ϕ) e psi (ψ) são permitidas enquanto outras não são permitidas devido a impedimentos estéricos entre átomos de grupos vizinhos. Este princípio pode ser resumido numa diagrama de Ramachandran (Figura 1).

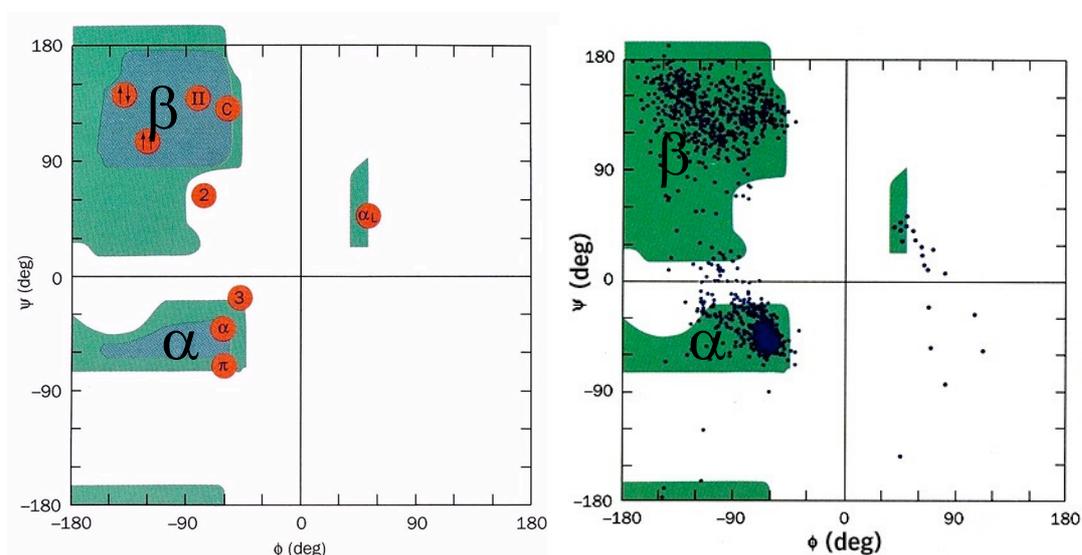


Figura 1: Diagramas de Ramachandran. Esquerda: Estruturas secundárias correspondentes às combinações estericamente permitidas para ângulos phi e psi. Direita: ângulos observados para todas as ligações em 12 proteínas com estruturas de alta resolução determinadas por cristalografia.

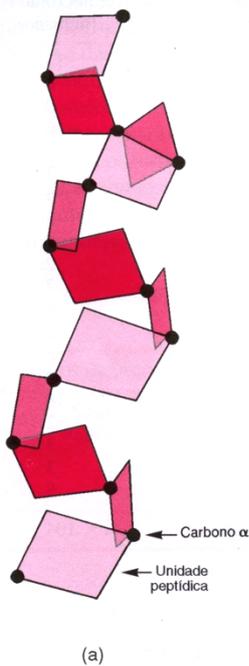


Figura 2: α -hélice.

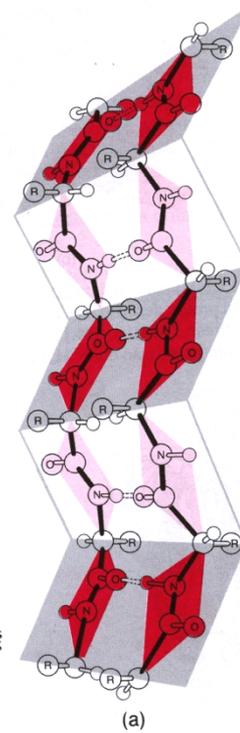
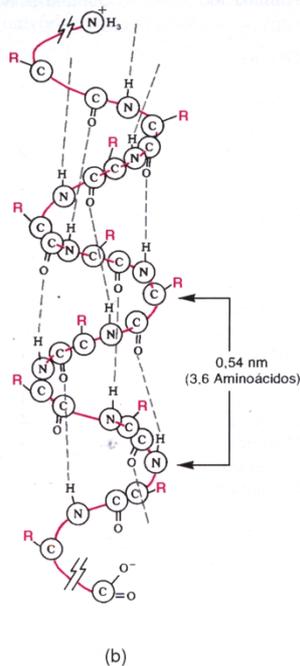
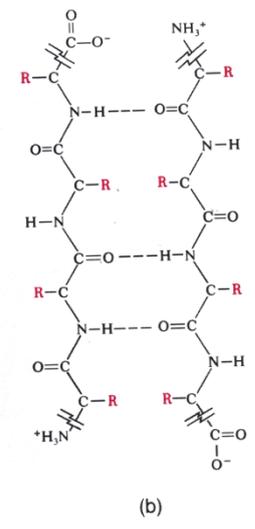


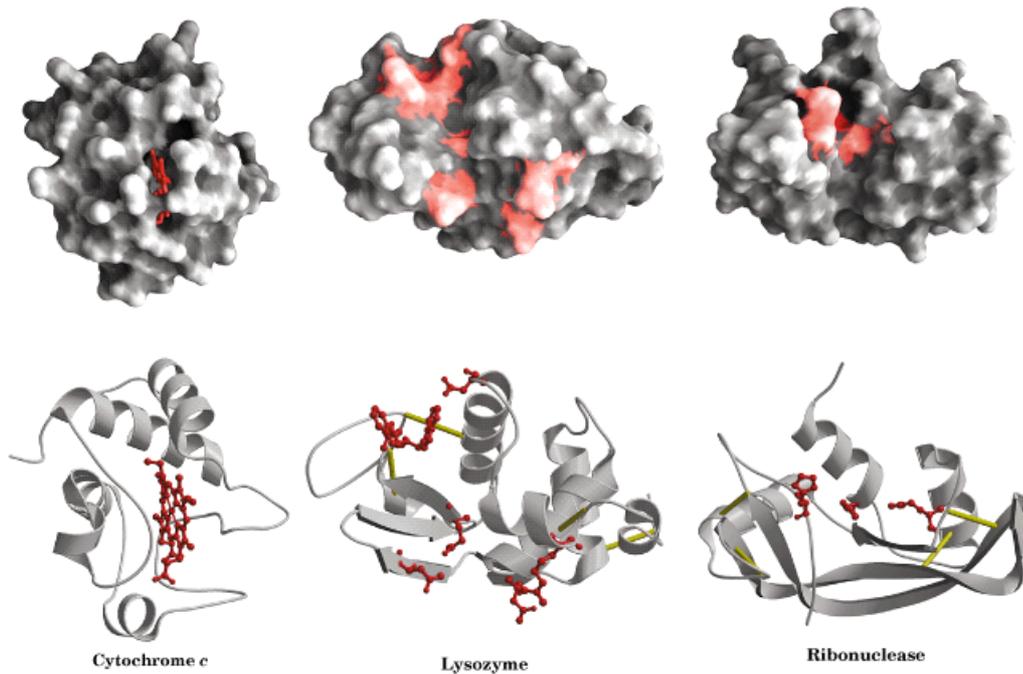
Figura 3: Folha β pregueada.



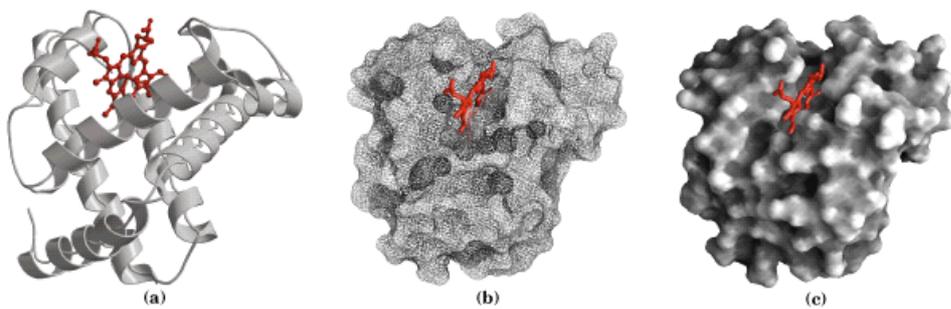
2. Há duas estruturas secundárias principais: α -hélice (Figura 2) e folha β pregueada (Figura 3), que são estruturas organizacionais regulares e repetitivas. Estas duas estruturas podem ser caracterizadas por combinações de ângulos phi e psi (Figura 1) adotadas pela cadeia principal. Além de α -hélice e folha β , as proteínas globulares mostram também alças de formas definidas, mas irregulares e não repetitivas.
3. A estrutura terciária descreve o arranjo tridimensional da cadeia principal da proteína, incluindo a disposição espacial das cadeias laterais dos aminoácidos. Há muitas possibilidades de arranjos tridimensionais para a estrutura terciária das proteínas.
- As propriedades bioquímicas e biológicas de uma proteína são determinadas pelo arranjo tridimensional de sua cadeia, isto é, pela sua estrutura terciária. Logo, nas condições fisiológicas a proteína adquire uma estrutura terciária bem definida e necessária à sua função, que é conhecida como **estrutura nativa**. O desarranjo da estrutura terciária leva à perda de função da proteína, processo que é genericamente chamado de desnaturação.
 - Em proteínas pequenas a estrutura primária define a estrutura terciária nativa da proteína. Nestes casos os processos de desnaturação e renaturação da estrutura da proteína são reversíveis. A estrutura nativa é a conformação da proteína de menor nível de energia livre (G) e é alcançada espontaneamente (processo exergônico). O exemplo clássico desse comportamento é dado pela proteína Rnase A, uma enzima que no seu estado nativo catalisa a hidrólise de RNA. Para proteínas grandes o processo de desnaturação é irreversível e o fenômeno de alcance da conformação nativa é complexo e ainda mal entendido.

- c. A estrutura tridimensional das proteínas é mantida por ligações fracas como pontes de H, ligações iônicas e interações hidrofóbicas. A exceção é a ponte de dissulfeto (-S-S-) que, apesar de covalente, é importante na manutenção da conformação nativa de proteínas.
- d. Proteínas possuem muitos grupos ionizáveis através de reação ácido-base, cujos pKs variam enormemente. O pI de uma proteína é definido como pH da solução na qual a carga líquida da molécula de proteína é nula.

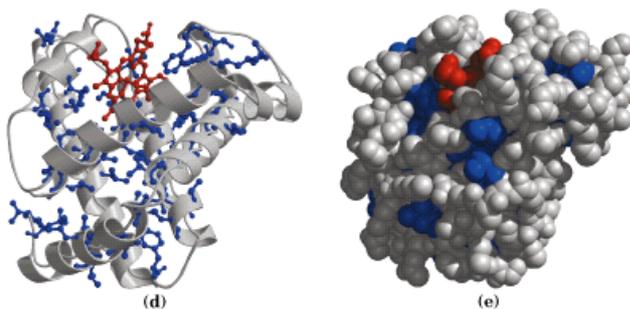
4. Existem muitas maneiras diferentes para apresentar estruturas tridimensionais de proteínas.



Estrutura de mioglobina de baleia, uma proteína globular típica



Topografia de superfície



Fita (azul = H ϕ)

modelo à space-filling

Exercícios do módulo 4

- 1) Distinga estrutura secundária e terciária de uma proteína. Dê exemplos.
- 2) Descreva α -hélice e folha β pregueada. Aponte as diferenças essenciais entre estas formas de estrutura secundária encontradas em peptídeos.
- 3) Discuta os dois diagramas de Ramachandran apresentados na Figura 1 e relacione-os com as estruturas apresentadas nas Figuras 2 e 3.
- 4) Descreva a experiência clássica de Anfinsen com a enzima ribonuclease A, indicando sua conclusão principal. Qual o papel das pontes de dissulfeto na manutenção da estrutura nativa (terciária) da ribonuclease? Conceitue estrutura nativa e desnaturação de proteínas, mostrando o que isso tem a ver com a atividade enzimática da ribonuclease A. Que função termodinâmica promove espontaneamente a transição da ribonuclease de desnaturada para nativa?
- 5.) Duas proteínas, apesar de terem diferenças quanto a alguns de seus aminoácidos, são capazes de desempenhar a mesma função. Explique como isto é possível.
- 6.) Pesquisar informações sobre a estrutura de hemoglobina. Descrever a sua estrutura terciária e quaternária. Descrever as mudanças na estrutura quaternária que acontecem devido à ligação de oxigênio.
- 7) O que é efeito hidrofóbico e qual o seu papel na manutenção da estrutura terciária das proteínas? Qual o fator preponderante no efeito hidrofóbico: o entálpico ou o entrópico? Explique qualitativamente sua resposta.
- 8) Mostre porque uréia desorganiza a α -hélice.

MÓDULO 5: CINÉTICA E TERMODINÂMICA

1. A variação de energia livre padrão é diretamente relacionada à constante de equilíbrio:

$$\Delta G^\circ = -2.3RT \log K_{eq}$$

2. A composição de um sistema de reação (uma mistura de reagentes e produtos) tende a uma variação contínua até que o equilíbrio é alcançado. No equilíbrio, as taxas de reação para um lado e para outro são exatamente iguais. As concentrações de reagentes e produtos no equilíbrio definem a constante de equilíbrio. Na reação:



$$K_{eq} = [C][D] / [A][B]$$

3. Quando um sistema não está em equilíbrio, ele tende ao equilíbrio, e a magnitude desta tendência pode ser medida como a variação de energia livre da reação, ΔG . A energia livre de Gibbs (G), uma propriedade termodinâmica, é definida pela equação: $G = H - TS$, onde H, T e S são respectivamente entalpia, temperatura absoluta e entropia, todas também propriedades termodinâmicas.
4. Numa transição de estado a temperatura (T) e pressão constantes (condições comuns às reações bioquímicas) a variação de G (ΔG) é: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

Se se trata de uma reação bioquímica, ΔH é o calor de reação. Quando ΔH é positivo a reação é endotérmica, se ΔH for negativo a reação é exotérmica. Nestas condições, a espontaneidade da reação é definida pelo valor de ΔG : se ΔG é negativo, a reação é espontânea, sendo denominada exergônica. Se, ao contrário, ΔG for positivo, a reação não ocorre espontaneamente e é denominada endergônica. Portanto, a reação ocorre no sentido em que a energia livre total diminui.

4. No equilíbrio, $\Delta G = 0$. Logo, é possível demonstrar a validade das seguintes igualdades:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + 2,3 RT \log B/A \longrightarrow B/A = K \longrightarrow \Delta G^\circ = - 2,3 RT \log K$$

5. Em condições padrão, à 25°C (298K), com concentrações de reagentes e produtos iguais a 1M, $pH = 0$, a variação de energia livre é considerada padrão, ou ΔG° . Entretanto, a maioria das reações bioquímicas ocorrem em $pH 7,0$, para as quais utiliza-se ΔG° .
6. A Figura 4 mostra esquematicamente como varia G com o desenvolvimento da reação, indicado no eixo das abcissas como coordenada de reação

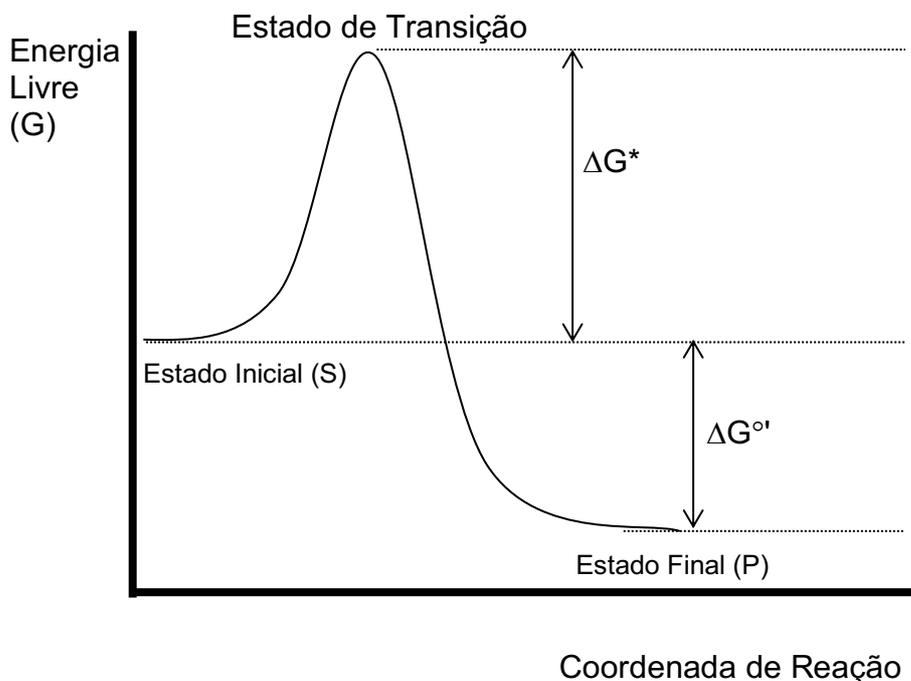


Figura 4. Variação de energia livre (G) no decorrer de uma reação genérica.

Para que a reação ocorra, necessariamente tem-se $G_{\text{final}} < G_{\text{inicial}}$, isto é, ΔG é negativo. Um ponto importante a ser destacado é que o valor de ΔG permite prever se a reação pode ocorrer, mas não a velocidade com que a reação atinge o equilíbrio. A velocidade de reação depende da energia livre do Estado de Transição que é maior que do que o dos reagentes no Estado Inicial, isto é, ΔG^* é positivo. Quanto maior o valor de ΔG^* , menor será a velocidade de reação.

7. Na reação genérica $A \rightarrow B$ a velocidade (v) é proporcional a $[A]$, isto é, $v_1 = k_1[A]$. A velocidade da reação inversa será, conseqüentemente, $v_{-1} = k_{-1}[B]$. k_1 e k_{-1} são constantes de velocidade e reações como $A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$ são ditas de primeira ordem, porque as suas respectivas velocidades dependem de concentração molar de um único reagente elevado à potência 1. As constantes de velocidade k_1 e k_{-1} são diferentes da constante de equilíbrio da reação, $K = [B]/[A]$. No estado de equilíbrio, por definição, $v_1 = v_{-1}$ e, portanto, formalmente, $K = k_1/k_{-1}$. As reações representadas pelas equações seguintes: $2A \rightarrow B$ e $A + B \rightarrow C$ são de segunda ordem, cujas velocidades são, respectivamente, $v = k_A[A]^2$ e $v = k_{AB}[A][B]$. Notar que a ordem da reação não coincide necessariamente com a estequiometria da equação química.
8. As quinases formam uma classe muito importante e abundante de enzimas, que se caracterizam por catalisar a transferência de um grupo fosfato de alta energia para uma outra substância receptora.
9. São chamados compostos de alta energia substâncias orgânicas com o grupo fosfato em ligações anidrido ou fosfoenol, cuja hidrólise libera fosfato inorgânico (Pi) com um ΔG° negativo e em valor absoluto superior a 8kcal/mol. Outros compostos fosforilados com o fosfato em ligações ester ou tioester também mostram um ΔG° de hidrólise negativo, mas de valor absoluto

11. Além das quinases que catalisam a transferência de grupo fosfato do ATP para metabólitos, existem as quinases que tem como substratos proteínas, genericamente referidas como quinases de proteína ou, simplesmente, proteína-quinases.

Há alguns milhares de proteína-quinases diferentes em um organismo, que catalisam a transferência de fosfato de ATP para o grupo OH da cadeia lateral de resíduos específicos de serina e treonina formando um éster de fosfato. As reações deste tipo são genericamente chamadas de fosforilações e são modificações covalentes que causam mudança de conformação das proteínas, alterando sua atividade biológica. Por exemplo, um grande número de enzimas são fosforiladas para sofrer uma transição do estado inativo ao ativo ou vice-versa. Mais raramente as proteínas são fosforiladas no grupo enólico de resíduos de tirosina.

Exercícios do módulo 5

- 1) Defina reações exotérmicas e endotérmicas. Qual a relação entre estes conceitos e a função termodinâmica entalpia?
- 2) Defina reações exergônicas e endergônicas. Qual a relação destes conceitos com ΔG^0 .
- 3) ΔG^0 é característico de cada reação (**desde que a temperatura seja constante**) e não varia com as concentrações de reagentes e produtos no equilíbrio. ΔG , por outro lado, não é característico da reação, podendo assumir qualquer valor em função das concentrações iniciais de reagentes e produtos (**quociente Q na expressão de ΔG**). Mostre por que estas afirmações são verdadeiras discutindo a expressão que relaciona ΔG^0 e ΔG .
- 4) Na reação genérica **A**→**B** $K_{eq}=10^3$. Qual o valor de ΔG^0 ? No ponto de equilíbrio as concentrações molares de A e B podem variar? Como varia ΔG com as concentrações molares iniciais de **A** e **B**?
- 5) Ainda para a reação **A**→**B** (questão 4) proponha uma condição na qual a reação inversa seja espontânea. Mostre que a sua proposta é possível calculando o respectivo ΔG . Esta questão possui múltiplas respostas ou apenas uma resposta única?
- 6) Para a reação **A**→**B** (questão 4), se a constante de velocidade de primeira ordem, k_1 for igual a 10, qual deve ser o valor da constante k_{-1} para a reação inversa? Para um mesmo K, constante de equilíbrio, pode haver múltiplos valores de k_1 e k_{-1} ? Qual a interpretação termodinâmica para a sua resposta?

- 7) Considerando a equação $\Delta G^0 = -2,3 RT \log K$, sendo: $R = 1,98 \times 10^{-3} \text{ kcal/mol K}$; $T = 298\text{K}$ e $2,3 RT = 1,36 \text{ kcal/mol}$. Calcule os valores de ΔG^0 quando K varia de 10^5 a 10^{-5} . Faça uma tabela.
- 8) Porque a hidrólise de ATP necessita catálise enzimática, sendo este um composto rico em energia? Utilize-se do gráfico esquemático de variação de G (energia livre) em função de coordenada de reação para responder a esta questão, definindo estado de transição e energia de ativação.

MÓDULO 6: CINÉTICA ENZIMÁTICA

1. Enzimas são catalisadores biológicos cuja natureza química é proteica. A natureza proteica das enzimas lhes proporciona alto grau de especificidade.
2. A grande maioria das reações biológicas não ocorre, ou ocorrem a velocidades baixíssimas nas condições fisiológicas de pH e temperatura. Logo, as reações biológicas, em geral, necessitam de catálise para ocorrer, isto é, necessitam de enzimas. Para cada reação há uma enzima específica.
3. Na reação genérica $A \rightarrow B$ a direção espontânea da reação é dada pela variação de energia livre, ΔG^0 , conforme esquematizado no gráfico da Figura 5.

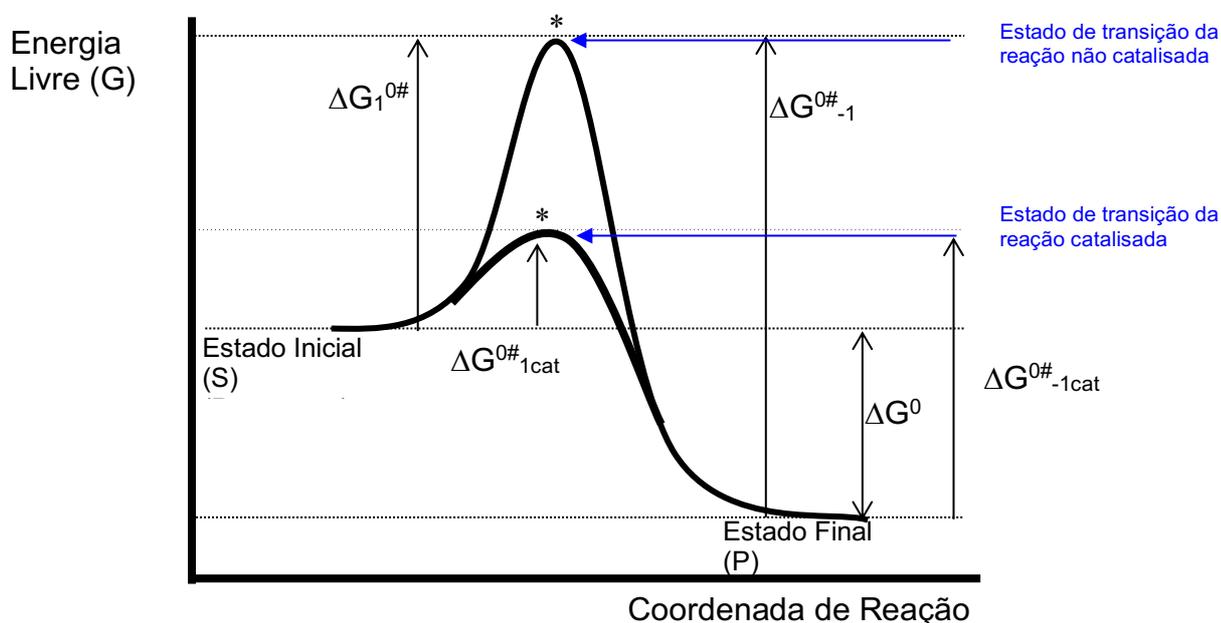
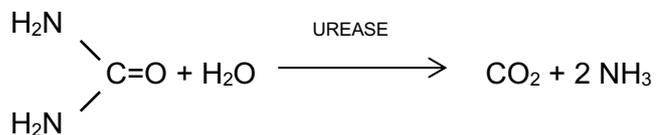


Figura 6. Variação de energia livre (G) na reação genérica $A \rightarrow B$.

ΔG^0 é uma constante que se relaciona com a constante de equilíbrio da reação pela expressão - $\Delta G^0 = 2.3 RT \log K$. Por outro lado, as velocidades das reações $A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$ ou, respectivamente, as constantes de velocidade k_1 e k_{-1} não dependem do ΔG^0 da reação, mas dos, respectivos,

$\Delta G_1^{0\neq}$ e $\Delta G_{-1}^{0\neq}$, que por sua vez só dependem da energia livre (G) do estado de transição (energias de ativação). **A enzima (catalisador) não muda o ΔG^0 da reação, pois catalisadores não interferem com os estados inicial e final das reações, mas mudam o “caminho” da reação e, por consequência diminuem a energia do Estado de Transição.**

4. Uréia é uma substância muito estável em água, mas que pode ser rapidamente decompostas por hidrólise se a reação for catalisada pela **enzima urease**:



Trata-se de reação de primeira ordem, onde $v = k_1[\text{uréia}]$, apesar da equação estequiométrica indicar a existência de 2 reagentes. Esta reação pode ser acompanhada em tubo de ensaio no laboratório. As Tabelas 3 e 4 mostram resultados obtidos na prática.

Tabela 3. Cinética da enzima urease.

Tubo nº	Tempo (minuto)	NH ₃ (μmoles)
1	0	0
2	2	0.084
3	4	0.168
4	6	0.252
5	8	0.336
6	10	0.420

Concentração da uréia: 5 mM; Concentração da urease: 0,1 μg/mL;

Volume de reação: 1 mL; Temperatura: 30°C.

Os dados da Tabela 3 mostram que a velocidade da reação é constante ao longo do tempo estudado. Já os dados da Tabela 4 mostram variações relativamente complexas da **velocidade de reação em função da concentração da uréia** para um período de 10 minutos de reação. Os dados da Tabela 4 permitem medir experimentalmente duas constantes importantes das reações enzimáticas V_{\max} (velocidade máxima) e K_m (constante de Michaelis) através da equação $v = V_{\max}[\text{S}] / (K_m + [\text{S}])$.

Tabela 4. Cinética da enzima urease.

Tubo n°	Uréia (mM)	Urease (µg)	NH ₃ (µmoles)
1	2,5	0,1	0,21
2	5,0	0,1	0,42
3	10	0,1	0,59
4	15	0,1	0,67
5	25	0,1	0,73
6	50	0,1	0,78
7	100	0,1	0,79
8	200	0,1	0,78
9	200	-	0,00

Os significados de V_{max} e K_m são definidos no modelo de cinética enzimática proposto por Michaelis e Menten no início do século passado onde ES é um **complexo enzima – substrato** formado antes de conversão do substrato em produtos.



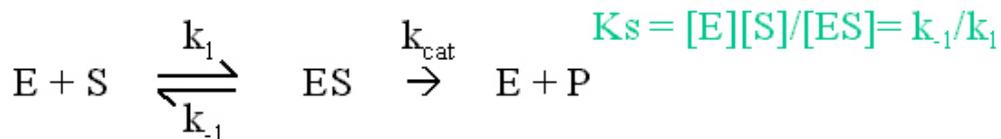
A derivação da **equação Michaelis – Menten**:

$$v = V_{max}[S] / (K_m + [S]) = k_{cat}[E_t][S] / (K_m + [S])$$

é apresentada na próxima página.

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Velocidade naquela [S] → V_0
 Velocidade máxima → V_{\max}
 Concentração do substrato → [S]
 K_m → K_{diss} aparente do Complexo enzima-substrato
 Fração de E_{tot} na forma de ES = $[S]/(K_{\text{diss}} + [S])$



Velocidade de reação = $d[P]/dt = k_{\text{cat}}[ES]$

Podemos assumir que $d[ES]/dt = 0$ (premissa de estado estacionário)

Logo: taxa de formação de ES = taxa de sua destruição

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_{\text{cat}})[ES]$$

$$k_1\{[E_{\text{TOT}}] - [ES]\}[S] = (k_{-1} + k_{\text{cat}})[ES]$$

$$k_1[E_{\text{TOT}}][S] - k_1[ES][S] = (k_{-1} + k_{\text{cat}})[ES]$$

$$k_1[E_{\text{TOT}}][S] = k_1[ES][S] + (k_{-1} + k_{\text{cat}})[ES]$$

$$k_1[E_{\text{TOT}}][S] = [ES]\{k_1[S] + (k_{-1} + k_{\text{cat}})\}$$

$$[ES] = k_1[E_{\text{TOT}}][S] / \{k_1[S] + (k_{-1} + k_{\text{cat}})\}$$

$$[ES] = [E_{\text{TOT}}][S] / \{[S] + (k_{-1} + k_{\text{cat}})/k_1\}$$

$$[ES] = [E_{\text{TOT}}][S] / \{[S] + K_M\} \text{ onde } K_M = (k_{-1} + k_{\text{cat}})/k_1$$

Logo: velocidade = $k_{\text{cat}}[E_{\text{TOT}}][S]/(K_M + [S])$

$$V_0 = V_{\max}[S]/(K_M + [S]) \text{ onde } V_{\max} = k_{\text{cat}}[E_{\text{TOT}}]$$

Notar que $K_M = (k_{-1} + k_{\text{cat}})/k_1$

Logo, se $k_{-1} \gg k_{\text{cat}} \rightarrow K_M = k_{-1}/k_1 = K_s = [E][S]/[ES] =$
 Constante de dissociação do complexo ES (enzima-substrato)

Condição de equilíbrio rápido
 Entre E, S e ES.

5. Substâncias que reduzem a atividade de uma enzima são chamadas **inibidores**. Em termos gerais, inibidores podem atuar em várias maneiras. Aqui vamos focalizar em **inibidores que ligam reversivelmente com a enzima com constantes de dissociação K_i** . Estes tipos de inibidores podem atuar em duas maneiras diferentes: a) Eles podem competir com o substrato para o mesmo sítio de ligação na superfície da enzima livre. Neste caso são chamados **inibidores competitivos** ou b) Eles podem ligar em outro sítio na enzima livre (E) e/ou no complexo enzima-substrato (ES). Estes inibidores são chamados **inibidores mistos/não-competitivos** se podem ligar a E e ES e são chamados **acompetitivos** se ligam somente ao complexo ES.

6. A presença de um inibidor competitivo se manifesta em uma mudança no valor do K_m :

$$K_{m \text{ obs}} = K_m(1+[I]/K_i) = \alpha K_m \quad \text{onde } \alpha = (1+[I]/K_i)$$

7. A presença de um inibidor misto/não-competitivo se manifesta em uma mudança nos valores do K_m e no valor do V_{\max} :

$$K_{m \text{ obs}} = K_m(1+[I]/K_i)/(1+[I]/K_i') = \alpha K_m / \alpha'$$

$$V_{\max \text{ obs}} = V_{\max} / \alpha'$$

8. A presença de um inibidor incompetitivo se manifesta em uma mudança nos valores do K_m e no valor do V_{\max} :

$$K_{m \text{ obs}} = K_m / (1+[I]/K_i) = K_m / \alpha'$$

$$V_{\max \text{ obs}} = V_{\max} / \alpha'$$

Exercícios do módulo 6

1) As velocidades de uma reação enzimática foram determinadas para diversas concentrações de substrato, conforme a tabela abaixo:

[S] (μM)	V ($\mu\text{mol/L.min}$)
5	22
10	39
20	65
50	102
100	120
200	135

Os gráficos de, respectivamente, V em função de [S] e 1/V em função de 1/[S] podem servir para determinar K_m e V_{\max} ? Como?

2) Numa reação enzimática, o valor de V_{\max} , mas não o de K_m é diretamente proporcional à concentração da enzima? Justifique.

3) A velocidade inicial de uma reação enzimática em função da concentração do substrato S, na ausência e na presença dos inibidores A e B segue os dados da tabela abaixo:

[S] (μM)	VELOCIDADE ($\mu\text{MOL/L X MIN}$)		
	SEM I	Com Inibidor A	Com Inibidor B
1,25	1,72	0,98	1,01
1,67	2,04	1,17	1,26
2,5	2,63	1,47	1,72
5,0	3,33	1,96	2,56
10,0	4,17	2,38	3,49

- a) Qual é a classe dos inibidores A e B?
- b) Determine V_{max} e K_m na ausência e presença dos inibidores.
- 4) Utilizando-se dos valores de K_m e V_{max} determinados nas questões 1 e 3, esquematize num mesmo gráfico, para as duas reações, V em função da concentração de substrato, expressa em múltiplos de K_m . No eixo dos Y ajuste arbitrariamente as escalas para cada reação fazendo coincidir os pontos de $V = V_{\text{max}}$. Como são as curvas para duas reações? Justifique o resultado.
- 5) O que são enzimas alostéricas? Defina utilizando-se de gráficos esquemáticos de V em função de [S], compare uma enzima michaeliana (da questão 4) com uma enzima alostérica positiva e com uma enzima alostérica negativa.

1. **Catálise ácido/base – catálise por transferência de prótons.** A catálise ácida é um processo no qual a transferência parcial de prótons de um ácido para o estado de transição diminui a energia livre do estado de transição de uma reação. A reação pode ser também estimulada por uma catálise básica se a taxa de reação aumentar com a abstração de um próton por uma base. Algumas reações podem ser sujeitas simultaneamente a ambos os processos, caracterizando uma catálise ácido-base. Em reações catalisadas por enzimas os ácidos e bases catalisadores são grupos específicos ionizáveis da enzima localizados no seu **sítio ativo/sítio catalítico**. A mutarrotação da glicose (Figura 6) e a catálise da ribonuclease pancreática bovina A (RNase A) (Figura 7) são exemplos de catálise ácido-base.

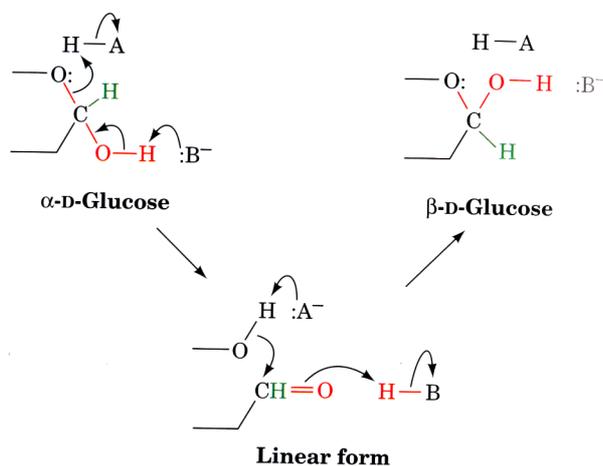


Figura 6. Mutarrotação da glicose.

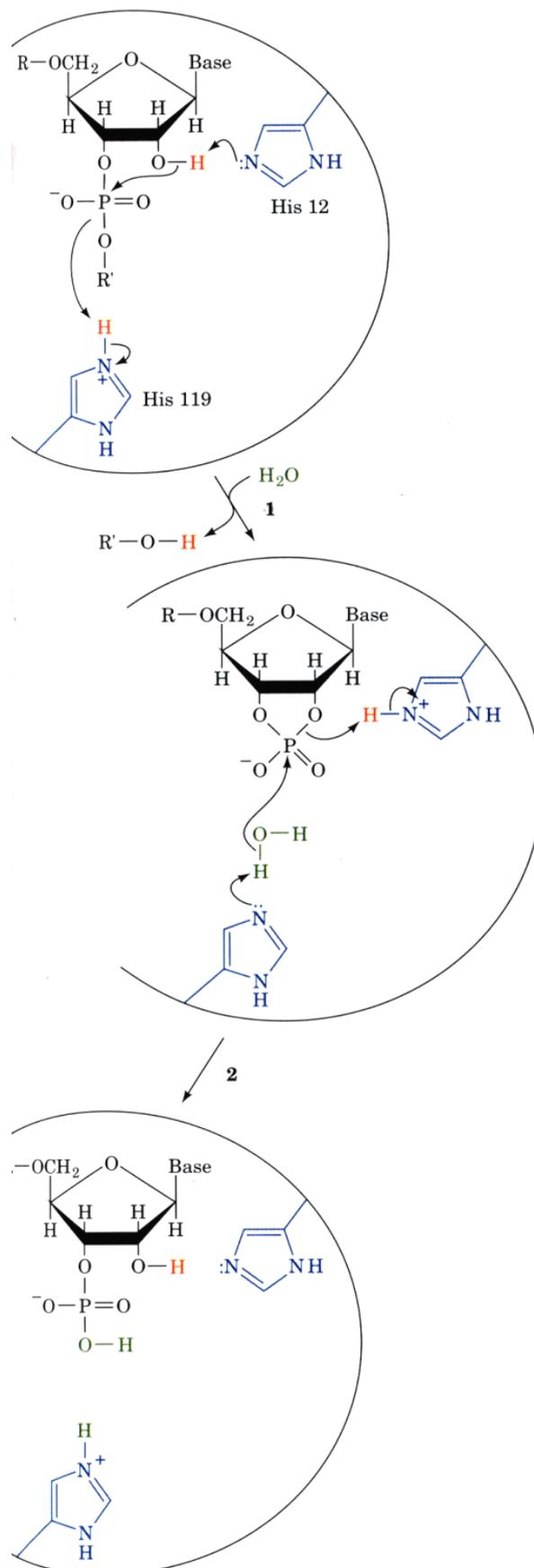
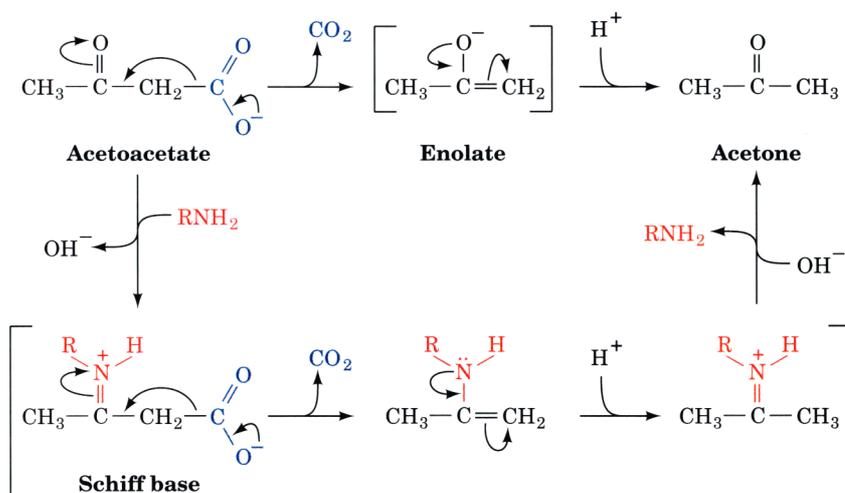
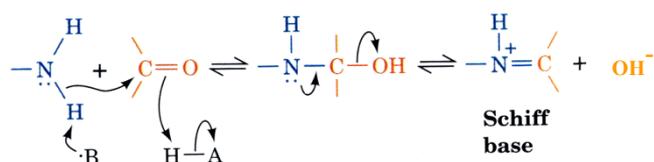


Figura 7. Catálise da ribonuclease pancreática bovina A (RNase A).

2. Catálise covalente envolve a aceleração da taxa de reação através da formação transiente de uma ligação covalente substrato-catalisador. A descarboxilação do acetoacetato é um exemplo deste processo:



No primeiro estágio desta reação, a amina faz um ataque nucleofílico ao grupo carbonila do acetoacetato formando uma base de Schiff (ligação imina).



O átomo de nitrogênio protonado do intermediário covalente atua como um receptor de elétrons reduzindo assim o caráter de alta energia do enolato. A catalise covalente possui estágios nucleofílicos e eletrofílicos. A catálise covalente pode ser dividida conceitualmente em três estágios:

- 1) A reação nucleofílica entre o catalisador e o substrato formando uma ligação covalente.
- 2) A perda de elétrons do centro da reação pelo catalisador agora eletrofílico.
- 3) A eliminação do catalisador que é uma reação essencial para retornar ao estágio 1.

Exercícios do módulo 7

- 1) Examine a reação de hidrólise de RNA catalisada pela RNase A para verificar que se trata de um mecanismo de catálise ácido-base.
- 2) Faça o gráfico da velocidade de uma reação enzimática em função do pH para uma enzima estável entre pHs 3 e 12, considerando que o substrato não possui grupos ionizáveis e a

atividade enzimática exige no centro ativo uma carboxila ($pK_a = 5$) desprotonada e um grupo amino ($pK_a = 9$) protonado.

3) Definir catálise eletrostática. Procure um exemplo de uma enzima que utiliza esta estratégia.

4) Descrever o mecanismo empregado pelas serina proteases (tripsina, quimiotripsina, elastase, etc) para hidrolisar ligações peptídicas. Descrever todas as etapas da reação. Quais tipos de catálise são empregados em cada uma das etapas?

MÓDULO 8: CARBOIDRATOS: ESTRUTURA E FUNÇÃO

1. Os carboidratos são compostos que apresentam a fórmula empírica $(CH_2O)_n$ ($n >$ ou $= 3$), sendo funcionalmente poliidroxi aldeídos ou poliidroxi cetonas. Os carboidratos mais simples são os monossacarídeos, que se apresentam na formas de aldoses ou cetoses, conforme o grupo funcional carbonílico que possuem, isto é, respectivamente, aldeído ou cetona. Há duas trioses: o gliceraldeído, uma aldotriose, e a diidroxiacetona, uma cetotriose (Figura 8). O gliceraldeído apresenta um carbono (C2) assimétrico, dando origem a dois isômeros ópticos, as formas D e L (Figura 9). Já a diidroxiacetona não possui C assimétrico e, por isso, não mostra esse tipo de isomeria. Os outros monossacarídeos podem ser derivados pelo crescimento da cadeia destas duas trioses. A Figura 10 mostra a família D derivada do D-gliceraldeído, cujas fórmulas estruturais planares obedecem as regras de Fisher.

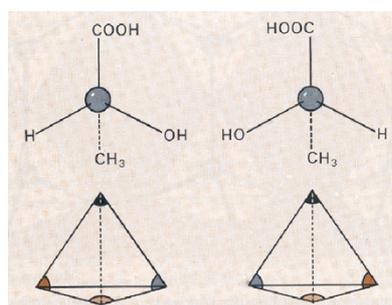
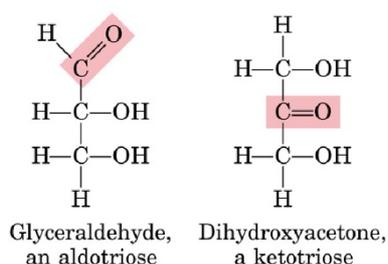


Figura 8. Gliceraldeído e diidroxiacetona.

Figura 9: Carbono quiral ou carbono assimétrico.

Relações esteroquímicas das aldoses

Aldose mais simples (aldotriose)

aldotetrose

aldopentose

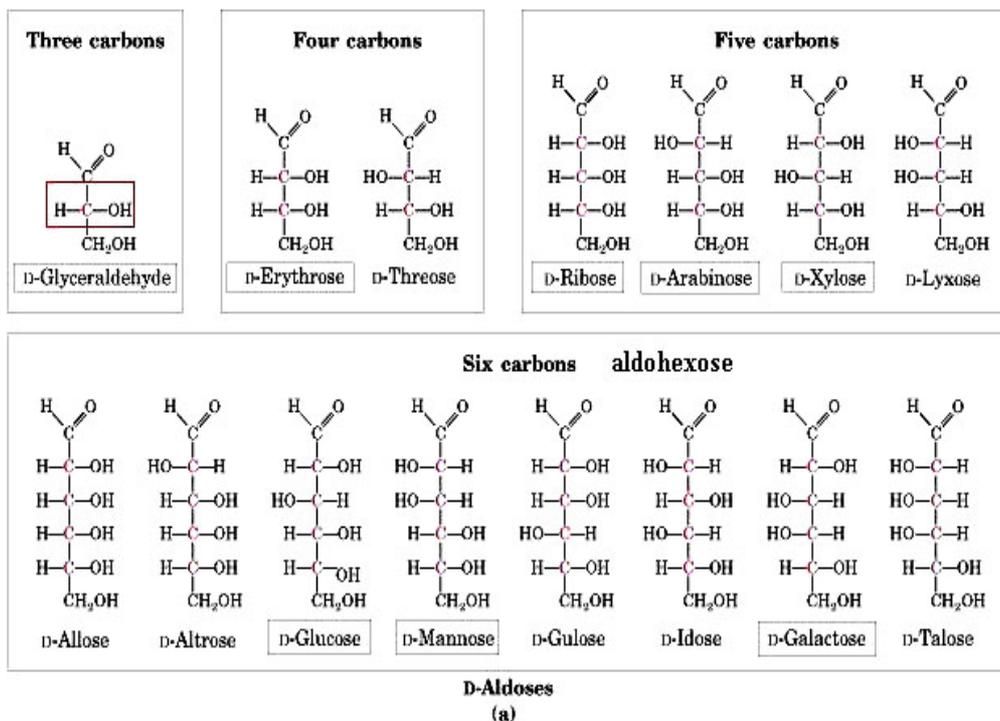


Figura 10. Família D derivada do D-gliceraldeído.

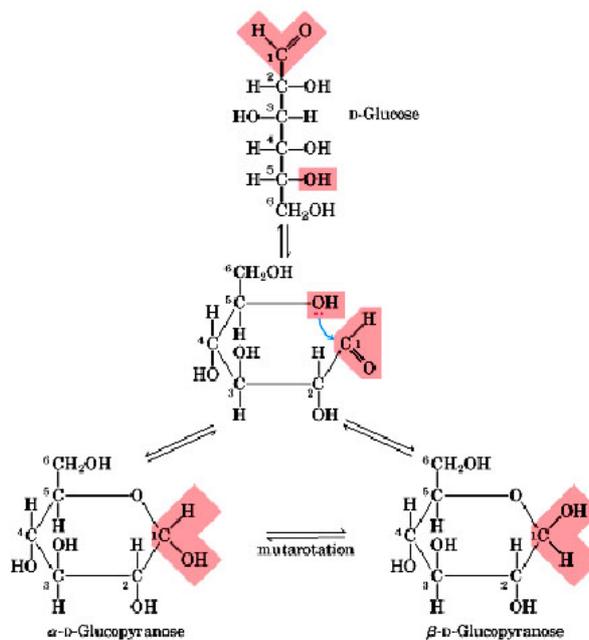
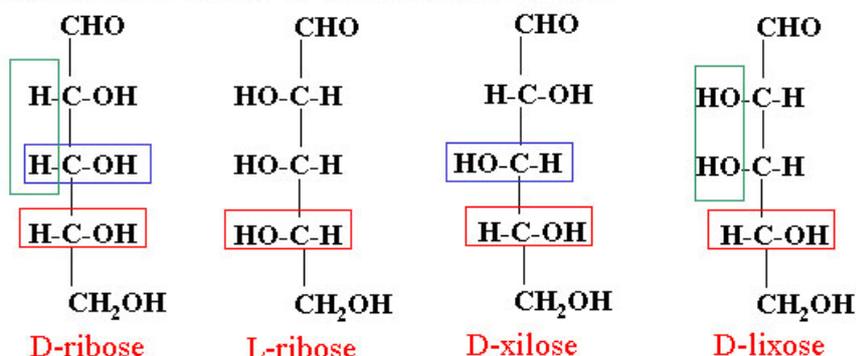


Figura 11. Ciclização da D-glicose.

O aumento da cadeia do monossacarídeo leva ao aparecimento de novos Cs assimétricos e, portanto mais isômeros estruturais, também chamados estereoisômeros. O número de isômeros é dado pela expressão 2^n onde n é o número de carbonos assimétricos. Por exemplo, em aldexoses há 4 Cs assimétricos, logo o número de isômeros é $2^4 = 16$, sendo 8 da forma D e 8 da forma L. Mas, as estruturas lineares como representadas na Figura 10 tanto para pentoses como para hexoses são poucos estáveis em solução, formando estruturas cíclicas segundo a reação mostrada na Figura 11. Esta é uma reação bem conhecida da química orgânica, pela qual um álcool (OH) faz uma adição nucleofílica a carbonila de um aldeído, formando um composto de condensação da conhecido como hemiacetal. No caso do exemplo da Figura 11 a hexose é a D-glicose e, como a figura mostra, a ciclização leva ao aparecimento de uma outra isomeria estrutural devido às duas posições possíveis do OH do C1 em relação ao plano do anel, gerando os isômeros α e β . É importante enfatizar que o OH do C1 não é quimicamente equivalente aos demais OHs que são alcoólicos, sendo por isso chamado de OH glicosídico. A existência do OH glicosídico permite que todos os monossarídeos sejam oxidados em condições brandas pelo reagente de Fehling, uma reação de oxido-reação na qual os OHs alcoólicos não participam.

Estereoisômêros / Enantiomeros / Diastereomeros / Epímeros / Anômeros

Possíveis estereoisomeros 2^n ; n= numero dos centros chirais



Enantiomeros: todos os centros chirais diferentes

Epímeros: apenas um centro chiral diferente

Diastereomer (qualquer par de estereoisomeros que não são enantiomeros)

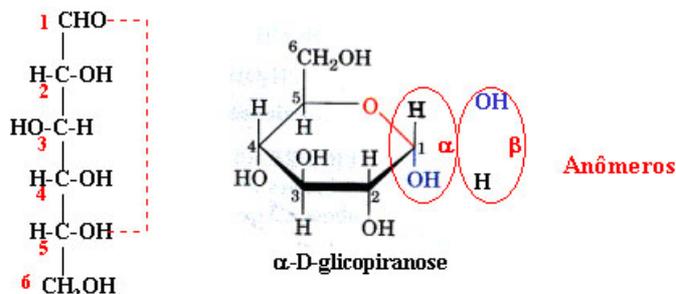
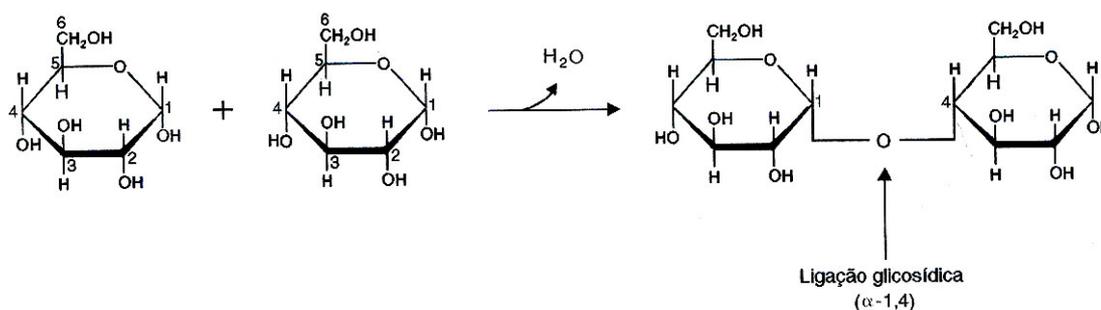


Figura 12. Nomenclatura para estereoisômeros.

2. Conforme exemplificado na Figura 12 há uma nomenclatura especificamente designada para distinguir pares de estereoisômeros. Enantiômeros possuem estruturas isoméricas que são uma imagem especular da outra, por exemplo, cada membro da família D de hexoses mostrada na Figura 10 tem um, e, somente um, enantiômero na família L. São epímeros pares de estereoisômeros que diferem apenas pela configuração de um C assimétrico. São anômeros os dois isômeros resultantes da posição do OH glicosídico do C1 na estrutura cíclica da hexose. E, finalmente, são denominados diastereoisômeros pares de isômeros que não caem em nenhuma das categorias anteriores.
3. Ligação glicosídica: os monossacarídeos podem se apresentar na forma de oligo ou polissacarídeos, onde os monômeros são ligados através de ligações glicosídicas. Oligossacarídeos são formados por um pequeno número de monossacarídeos, resultantes da condensação de um OH glicosídico com um OH alcoólico, como exemplificado abaixo pela dimerização de duas moléculas de α -glicose por ligação 1-4, originando o dissacarídeo maltose:



Caso a ligação glicosídica envolva a condensação dos dois OHs glicosídicos como é o caso da trealose, uma α 1-1-diglicose, o dissacarídeo não pode ser oxidado pelo reagente de Fehling (dissacarídeo não redutor). Já a maltose, que possui um OH glicosídico livre é um dissacarídeo redutor, sendo oxidado pelo reagente de Fehling.

4. Polissacarídeos são polímeros constituídos de centenas ou milhares de resíduos de monossacarídeos, geralmente glicose, formando cadeias lineares, como a celulose (β 1-4-poliglicose), ou cadeias ramificadas, como o glicogênio e o amido. O glicogênio é altamente ramificado, as suas cadeias lineares são formadas por ligações α 1-4-glicosídicas e suas ramificações decorrem de ligações α 1-6-glicosídicas (Figura 13). O glicogênio apresenta uma única extremidade redutora livre (C1 no resíduo final na última molécula de glicose da cadeia) e inúmeras extremidades não redutoras. A partir das extremidades não redutoras há acréscimo ou retirada de resíduos do polímero. Portanto, as moléculas de glicogênio não têm tamanhos definidos.

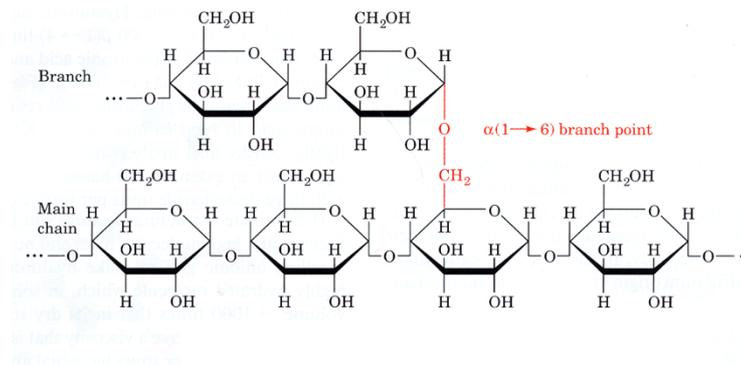


Figura 13. Glicogênio Poli (α 1-4) (α 1-6) glicose.

Exercícios do módulo 8

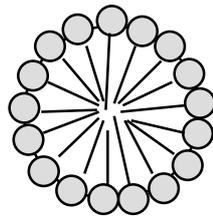
- 1) Desenhe o conjunto dos isômeros de D-aldoses de 6 C, através das fórmulas de projeção de Fisher. Quantos epímeros possui uma hexoaldose. Identifique todos os epímeros de D-glicose. Existem pares enantioméricos na família D de monossacarídeos. Explique.
- 2) Descreva o fenômeno da mutarrotação de D-glicose, incluindo as reações químicas pertinentes com as respectivas fórmulas estruturais dos reagentes. O que este fenômeno tem a ver com os conceitos de C anomérico e anômeros.
- 3) Compare os dissacarídeos maltose e sacarose, identificando a ligação glicosídica em cada caso. Por que maltose é redutora e sacarose não é.
- 4) Analise a estrutura do glicogênio. Procure destacar as vantagens e desvantagens da função deste polímero como composto de reserva energética.
- 5) Verifique as principais características dos polissacarídeos estruturais, comparando celulose, quitina e glicosaminoglicanos (estes também chamados mucopolissacarídeos).
- 6) A porção de natureza sacarídica de algumas glicoproteínas pode servir como sítio de reconhecimento celular. Para desempenhar esta função, os oligossacarídeos ou glicoproteínas devem ter a capacidade de formar um grande número de diferentes estruturas. Qual dos dois pode produzir uma maior variedade de estruturas: oligopeptídeos compostos de cinco resíduos

de diferentes aminoácidos ou oligossacarídeos compostos de cinco resíduos de diferentes monossacarídeos? Explique.

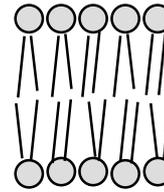
- 7) Frutose, o principal açúcar do mel, é comumente usada como adoçante de alimento. Este açúcar na forma β -D-piranosose é provavelmente a substância mais doce conhecida. A forma β -D-furanose é muito menos doce.
- a) Quais são as estruturas da β -D-frutopiranosose e β -D-frutofuranose?
- b) A doçura do mel diminui ao deixá-lo em repouso e ao mesmo tempo aumentando a temperatura. Explique.
- 8) *Interconversão das formas de D-galactose.* Uma solução recém-preparada da forma α de D-galactose (1g/ml em um tubo polarimétrico de 1 dm) mostra uma rotação óptica de $+150,7^\circ$. Quando deixada em repouso por um longo período de tempo a rotação decresce gradualmente até atingir um valor de equilíbrio igual a $+80,2^\circ$. Em contraste, uma solução recém-preparada (1g/ml) da forma β mostra rotação óptica de apenas $+52,8^\circ$. Quando esta solução é deixada em repouso por várias horas a rotação aumenta até o valor de equilíbrio igual a $+80,2^\circ$, valor idêntico àquele observado para a α -D-galactose.
- a) Escreva as fórmulas de projeção de Haworth das formas α e β da D-galactose. Qual característica distingue as duas formas?
- b) Por que a rotação de uma solução recém-preparada da forma α decresce gradualmente com o tempo? Explique por que soluções das formas α e β (de concentrações iguais) atingem o mesmo valor de rotação óptica no equilíbrio?
- c) Calcule a composição percentual das duas formas de galactose no equilíbrio.

MÓDULO 9: LIPÍDIOS, MEMBRANA & TRANSPORTE ATRAVÉS DE MEMBRANAS

1. Moléculas anfifílicas, como lipídeos com uma única cauda hidrofóbica, ácidos graxos livres e detergentes, quando em solução aquosa e acima de um limiar de concentração (**concentração micelar crítica ou cmc**) formam agregados globulares chamados micelas.
2. Por outro lado, lipídeos com duas caudas hidrofóbicas, como glicerofosfolipídeos e esfingolipídeos, tendem a formar bicamadas lipídicas, que são a base estrutural das membranas biológicas.

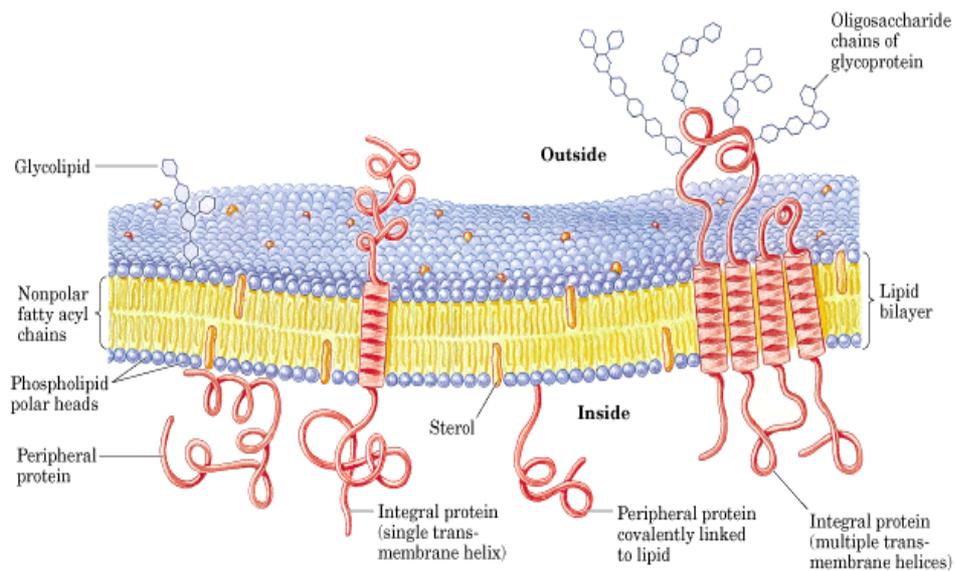


Micela

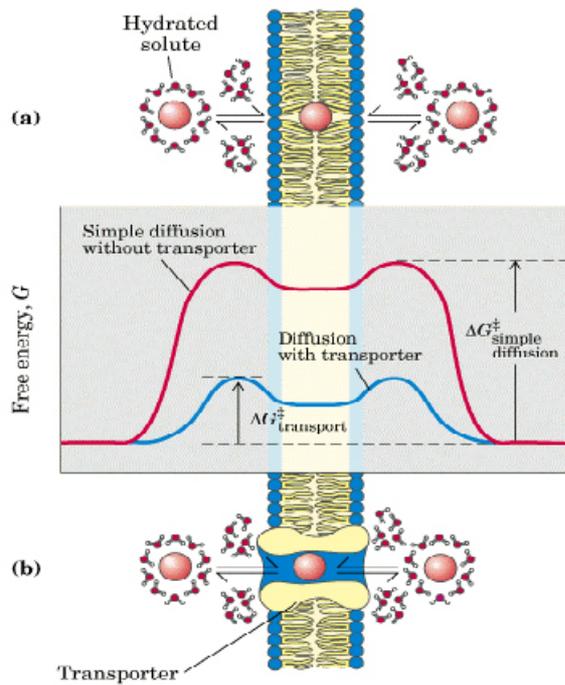


Bicamada

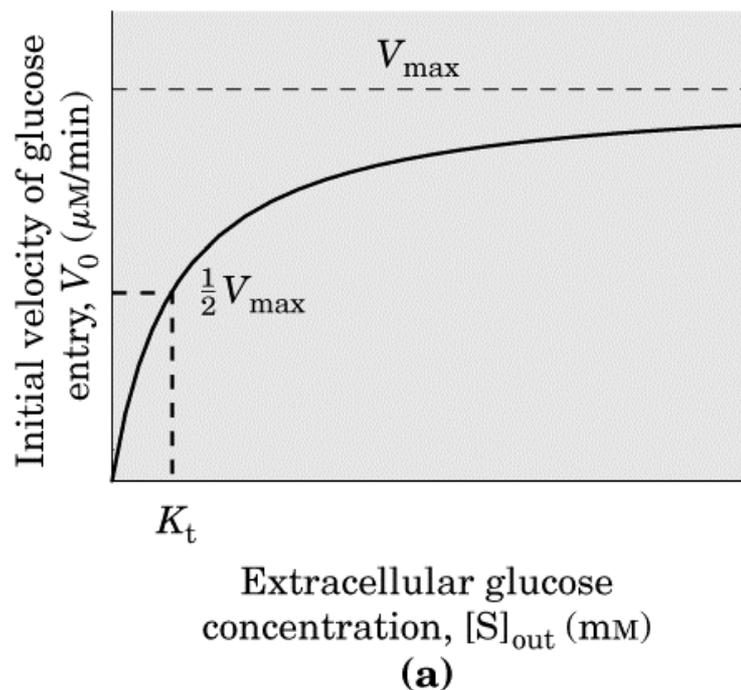
3. As membranas biológicas são compostas por proteínas associadas a uma matriz de bicamada lipídica. As proteínas que compõe as membranas pertencem a duas categorias: a) ntegrais ou intrínsecas e b) periféricas ou extrínsecas. Este arranjo estrutural foi originalmente proposto em 1972 por Singer e Nicholson como o modelo de mosaico fluído para as membranas biológicas, que foi plenamente confirmado por resultados experimentais estruturais e funcionais.i



Modelo de mosaico fluído para membranas biológicas



4. As membranas são barreiras hidrofóbicas que oferecem grande resistência à passagem de solutos hidrofílicos, cuja permeação exige proteínas transportadoras específicas, conforme esquematizado na figura abaixo. Desta maneira a membrana, através de transportadores específicos, regula o transporte de metabolitos entre compartimentos celulares.



5. Um exemplo clássico de transporte é a tomada de glicose pela hemácia mediada por um transportador específico, cuja velocidade depende da concentração externa de glicose e

obedece a uma curva hiperbólica de saturação já bem conhecida da cinética enzimática, sendo K_t análogo a K_m :

Esta forma de transporte é conhecida como transporte passivamente mediado ou difusão facilitada. Trata-se de um processo exergônico, pelo qual o soluto, no caso a glicose, atravessa espontaneamente a membrana indo do compartimento de maior para o de menor concentração.

6. Existem 5 transportadores conhecidos que mediam a difusão facilitada de glicose em humanos: GLUT1 a 5, cujos K_t s são diferentes para atender as necessidades funcionais dos tecidos nos quais são expressos. GLUT1 é o transportador em hemácias, já GLUT2 é expresso no fígado e células beta do pâncreas, enquanto GLUT4 aparece no músculo esquelético, tecido adiposo etc.
7. Mas, no epitélio do intestino a glicose obtida da dieta é transportada para dentro da célula contra o gradiente de concentração, portanto através de um processo endergônico que exige consumo de energia metabólica para ocorrer e é referido como transporte ativo. Neste caso o transportador é chamado simport, pelo qual a glicose é transportada junto com Na^+ e é termodinamicamente possível porque existe um gradiente eletroquímico de Na^+ de fora para dentro da célula. Há múltiplas formas de transporte ativo, das quais este exemplo da glicose é apenas uma delas. Grande parte da energia metabólica consumida pelas células se deve á manutenção da enorme diversidade de transportadores que promovem a transferência de metabolitos e íons contra gradientes de concentração.

Exercícios do módulo 9

- 1) O que é concentração micelar crítica. Como varia tamanho e forma de micelas formadas por anfifílicos de uma única cauda hidrocarbonada? Explique.
 - 2) Uma hipótese central na pesquisa de membranas é que os lipídeos da membrana devem ser fluídos (em oposição a "congelados") a fim de que a membrana possa desempenhar suas funções. O apoio para esta hipótese é fornecido pela observação de que a composição de ácido graxo das membranas pode ser alterada pelas condições nas quais a bactéria cresce. Por exemplo, se a bactéria está crescendo em temperatura menor que a normal, as quantidades observadas de ácidos graxos insaturados (relativas ao conteúdo de ácido graxo saturado) estão acima do normal.

Contrariamente, se a bactéria está crescendo em temperatura acima da normal, as quantidades observadas de ácidos graxos insaturados nos lipídeos da membrana (relativas aos ácidos graxos saturados) estão abaixo do normal.
- a) Sugira razões para o fato de que o conteúdo lipídico na membrana bacteriana deve ser fluido para que a membrana intacta opere apropriadamente.

- b) Explique como a alteração observada nos níveis dos ácidos graxos insaturados relativa aos níveis dos ácidos graxos saturados, em diferentes temperaturas de crescimento, apóia a hipótese da fluidez da membrana.
- 3) Forneça uma explicação termodinâmica para o fato de que moléculas de fosfolípídeo difundem rapidamente no plano da bicamada, mas muito lentamente mudam de uma face à oposta.
- 4) Descreva os mecanismos pelos quais detergentes extraem proteínas integrais de membrana, mantendo-as em solução.
- 5) Explique porque soda funciona bem para desentupir pias entupidas com gordura animal.
- 6) Para saber se uma bactéria tomava leucina e etileno glicol por transporte mediado ou não mediado, foram feitas medidas de velocidade inicial de tomada em função da concentração de ambas substâncias, resultando na tabela fornecida abaixo. O que você conclui do exame dessa tabela? Explique e calcule K_t e V_{max} se encontrar evidências de transporte mediado.

Componente	Concentração [M]	Velocidade Inicial (unidades arbitrárias)
Leucina	1×10^{-6}	110
	2×10^{-6}	220
	5×10^{-6}	480
	1×10^{-5}	830
	3×10^{-5}	1700
	1×10^{-4}	2600
	5×10^{-4}	3100
	1×10^{-3}	3200
Etileno glicol	1×10^{-3}	1
	5×10^{-3}	5
	0,01	10
	0,05	50
	0,1	100
	0,5	500
	1,0	1000

- 7) Células epiteliais de intestino de camundongo isoladas em cultura transportam L-leucina e D-leucina mostrando K_t (mM) e V_{max} , respectivamente iguais a: 0,24 e 420 para L-leucina e 4,7 e 310 para D-leucina, ambos em presença de Na^+ no meio de cultura. Mas na ausência de Na^+ , L-leucina mostra 0,24 e 23 enquanto D-leucina mostra 4,7 e 5 para K_t (mM) e V_{max} , respectivamente. Classifique esse transportador de leucina quanto ao tipo e mecanismos de

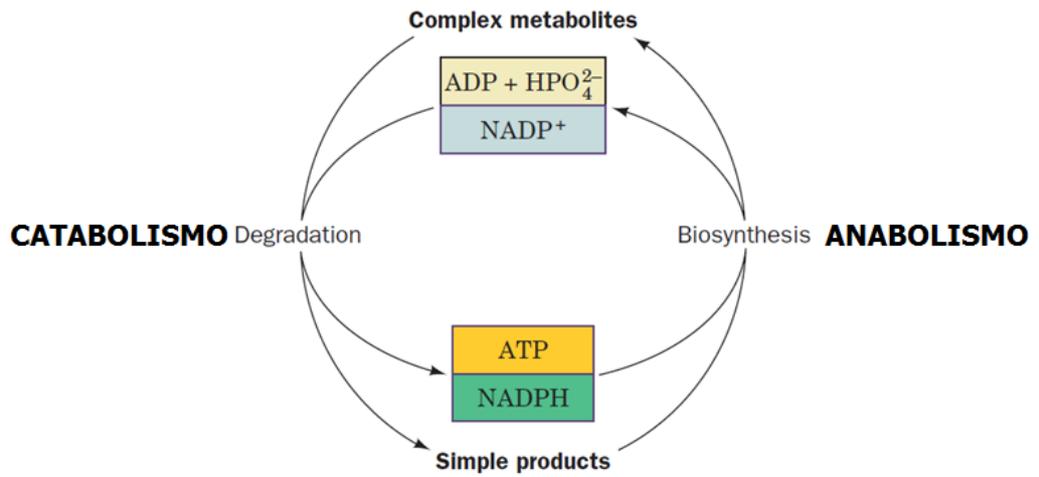
ação. Que efeitos você esperaria se nesse meio de cultura fosse colocada valinomicina (ionóforo de Na⁺)? E se fosse dissolvida ouabaína (inibidor da ATPase Na⁺/K⁺) no meio de cultura? Explique.

- 8) O pH e a absorção de drogas. A droga aspirina, intensamente prescrita, é um ácido fraco com um pK_a de 3,5. A aspirina é absorvida para o sangue através das células de revestimento do estômago e do intestino delgado. Para uma substância ser absorvida ela deve atravessar facilmente a membrana celular. A passagem através da membrana celular é determinada pela polaridade da molécula: moléculas iônicas (carregadas) e moléculas altamente polares passam lentamente, enquanto aquelas neutras e hidrofóbicas passam rapidamente. Como o pH do suco gástrico é cerca de 1 e o pH no intestino delgado, cerca de 6, pergunta-se:
- Escreva por fórmulas estruturais a ionização reversível da aspirina.
 - Onde a aspirina é mais absorvida para a corrente sanguínea, no estômago ou no intestino delgado? Justifique claramente a sua escolha.

MÓDULO 10: INTRODUÇÃO AO METABOLISMO

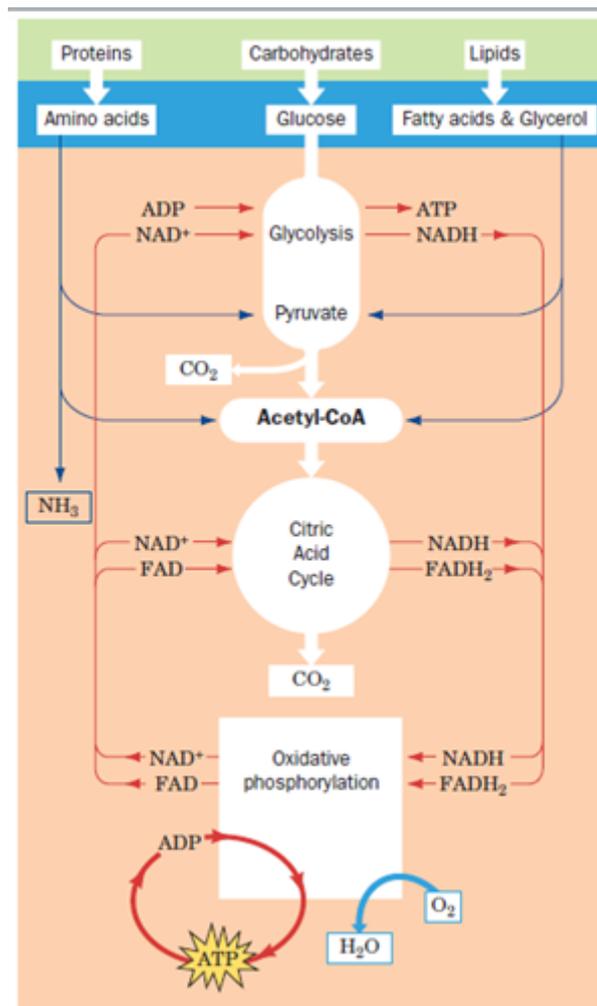
- Metabolismo é o conjunto das reações químicas que ocorrem num organismo vivo com o fim de promover a satisfação de necessidades estruturais e energéticas. O metabolismo tem quatro funções específicas: (1) obter energia química pela degradação de nutrientes ricos em energia oriundos do ambiente; (2) converter as moléculas dos nutrientes em unidades fundamentais precursoras das macromoléculas celulares; (3) reunir e organizar estas unidades fundamentais em proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes celulares; (4) sintetizar e degradar biomoléculas necessárias às funções especializadas das células.
- O metabolismo pode ser dividido em duas "fases": catabolismo e anabolismo. O catabolismo é a fase degradativa do metabolismo; nela, as moléculas orgânicas nutrientes, carboidratos, lipídios e proteínas provenientes do ambiente ou dos reservatórios de nutrientes da própria célula são degradados por reações consecutivas em produtos finais menores e mais simples. O anabolismo é uma fase sintetizante do metabolismo, na qual unidades fundamentais são reunidas para formar as macromoléculas componentes das células, como as proteínas, DNA etc.. Para ocorrer essas duas "fases" do metabolismo, é necessário um trânsito acentuado de energia. No catabolismo, por haver a "quebra" de moléculas, há a liberação de energia; por outro lado, o anabolismo é uma fase de síntese, necessitando de energia para sua ocorrência.

3)

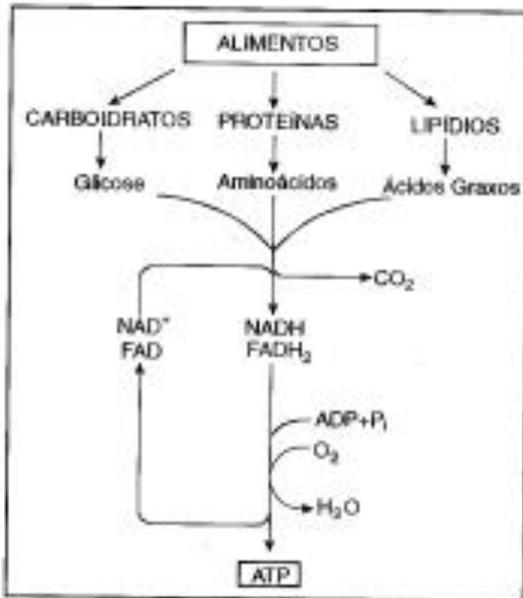


4) Catabolismo:

Vias metabólicas: Irreversíveis; Síntese e degradação diferentes; Pontos de regulação; Todas as vias são reguladas; Compartimentalização

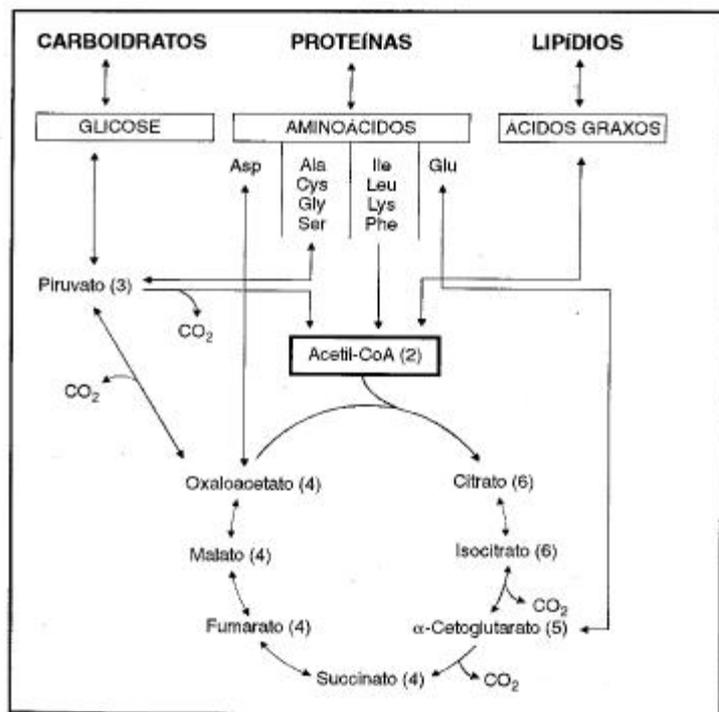


Exercícios do módulo 10



MAPA I: DEGRADAÇÃO (OXIDAÇÃO) DE ALIMENTOS

- 1) Qual a finalidade biológica dos processos representados no mapa?
- 2) Analisar a função das coenzimas e do oxigênio na oxidação dos alimentos.
- 3) Discutir as seguintes afirmações:
 - 3a. A energia dos alimentos é obtida por oxidação.
 - 3b. A oxidação biológica consiste na retirada de hidrogênio (2H) do substrato.
 - 3c. Uma parte da energia derivada da oxidação dos alimentos é usada para sintetizar um composto rico em energia (ATP).
 - 3d. A única função dos alimentos é fornecer energia.
- 4) Por que hidrocarbonetos, plásticos e metais não são alimentos para o homem?
- 5) Qual o destino dos átomos de carbono presentes nos macronutrientes quando eles sofrem metabolismo degradativo?
- 6) Resuma: por que é necessário alimentar-se e respirar?



MAPA II: INTERCONVERSÃO DE MACRONUTRIENTES

Um paciente com sobrepeso foi admitido a um hospital portando uma patologia que o impedia de alimentar-se por via oral. Durante os dias do seu tratamento, a equipe que o atendia prescreveu a aplicação intravenosa de soro glicolizado. O paciente, que pretendia perder algum peso, solicitou que o soro não fosse aplicado. Seu pedido não foi atendido. Para julgar a correção da conduta adotada pela equipe de atendimento, resolva as questões seguintes (1 a 4) consultando unicamente o Mapa II, que mostra, entre parênteses, o número de átomos de carbono de alguns compostos.

- 1) Quais são as reações irreversíveis que aparecem no mapa?
 - 2) Qual o primeiro composto comum à degradação de carboidratos, proteínas e lipídios?
 - 3) Animais de laboratório foram submetidos a dietas compostas exclusivamente de carboidratos, ou lipídios ou proteínas. Estes três tipos de compostos são essenciais para a sobrevivência. Não havendo outras restrições na dieta, prever que o grupo de animais sobreviveria, verificando se é possível sintetizar:
 - 3a. ácido graxo a partir de glicose
 - 3b. proteína a partir de glicose
 - 3c. proteína a partir de ácido graxo
 - 3d. glicose a partir de proteína
 - 3e. ácido graxo a partir de proteína
 - 3f. glicose a partir de ácido graxo
- Indicar no mapa a via utilizada para cada conversão.

4) Alguns tecidos (nervoso) e células (hemácias) obtêm ATP exclusivamente a partir de glicose. Como é possível garantir sua sobrevivência quando as reservas de glicogênio tornam-se insuficientes para manter a glicemia?

MÓDULO 11: GLICÓLISE

1. A glicólise é a principal via catabólica da glicose compreendendo as 10 reações enzimaticamente catalisadas que são mostradas na figura abaixo e cuja estequiometria total pode ser observada na equação química seguinte:



A glicólise, como todas as vias catabólicas, é exergônica e a equação acima corresponde a $\Delta G^\circ = -43,4 \text{ kJ/mol}$. Mas o dado da variação de energia livre mais interessante é em termos de ΔG , cujo valor exato depende de cada célula específica, por exemplo, em músculo cardíaco estima-se que seja igual a $-74,0 \text{ kJ/mol}$.

2. A finalidade da glicólise é obtenção de energia, como a equação estequiométrica indica, cada molécula de glicose é degradada a duas de piruvato e parte da energia livre liberada nesta degradação é retida nos produtos na forma de 2 NADH e 2 ATP.

3. A reação que permite a obtenção de NADH é a única de oxido-redução da glicólise, pela qual gliceraldeído-3-P é oxidado a glicerato-1,3-bisP, através da ação oxidante de NAD^+ catalisada pela enzima gliceraldeído desidrogenase. A manutenção da capacidade oxidante da glicólise exige que NADH seja re-oxidada a NAD^+ , uma alternativa para isso é apresentada na figura, através da reação pela qual NADH reduz piruvato a lactato, recuperando NAD^+ . Esta alternativa ocorre no músculo esquelético com baixos níveis de O_2 .

4. Já ATP é produzido em duas reações distintas pelas quais um radical fosforil é transferido de, respectivamente, glicerato-1,3-P e P-enolpiruvato para ADP, em transferências catalisadas por glicerato-1,3-P-quinase e P-enolpiruvato-quinase. Esta maneira de fosforilação de ADP é conhecida como fosforilação a nível do substrato, para distingui-la da fosforilação oxidativa da mitocôndria que será vista mais adiante.

5. Na glicólise, há 3 reações de fosforilação irreversíveis catalisadas, respectivamente, pela hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvato-quinase, que funcionam como marca-passos da via, cuja regulação se dá por um elaborado sistema de controle alostérico das enzimas.

6. Diversas outras hexoses, como frutose, galactose e manose, também são metabolizadas pela via glicolítica.

7. A glicólise em condições anaeróbicas tem energética e funções variadas, conforme o organismo. Cabe fazer dois destaques importantes.

8. Em vertebrados, encontram-se músculos esqueléticos muito pobres em mitocôndria, que são especializados para produzir ATP a partir de glicólise anaeróbica, cuja energética obedece a seguinte reação geral: $\text{Glicose} \rightarrow 2\text{Lactato} + 2\text{H}^+$; $\Delta G^{\circ} = -196\text{kJ/mol}$. Mas, parte dessa energia livre liberada que seria dissipada (61kJ/mol) é retida na forma de 2ATP produzidos por mol de glicose degradada. Deve-se ainda enfatizar que o lactato não é descartado, pois vai ser aproveitado no fígado, aonde é reoxidado a piruvato, alternativa metabólica importante a ser examinada mais à frente.
9. Leveduras mostram um exemplo de glicólise anaeróbica na forma da fermentação alcoólica, segundo a reação geral: $\text{Glicose} \rightarrow 2\text{Etanol} + \text{CO}_2$; $\Delta G^{\circ} = -235\text{kJ/mol}$. Aqui também parte da energia livre, +61kJ/mol, é mantida com a produção de 2ATP. A parte final da fermentação alcoólica compreende duas reações: a primeira envolve a descarboxilação de piruvato e liberação de acetaldeído, catalisada pela enzima piruvato-carboxilase, que não existe em animais. Na segunda reação a desidrogenase alcoólica catalisa a redução do acetaldeído por NADH.

Exercícios do módulo 11

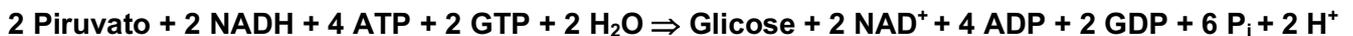
- 1) Classifique as reações da glicólise, destacando as que são de óxido-redução.
- 2) Equacione a reação de oxidação de gliceraldeído-3-fosfato, destacando o oxidante e o redutor.
- 3) Na reação do item 2) parte da energia é utilizada para produzir ATP. Mostre como isso é possível, equacionando as etapas relevantes da reação. Defina fosforilação ao nível do substrato.
- 4) Equacione a reação líquida da transformação de glicose em piruvato. Como é regenerada a capacidade oxidante do sistema NAD^+/NADH necessária à atividade glicolítica nos glóbulos vermelhos humanos (que não têm mitocôndria) e na cultura de levedo sem O_2 (fermentação).
- 5) Examine uma tabela com as 10 reações da via glicolítica que contenha, respectivamente, o $\Delta G^{0'}$ e o ΔG das reações. Quais são as reações irreversíveis da glicólise?
- 6) Porque os valores de $\Delta G^{0'}$ e de ΔG da mesma reação podem ser diferentes? Para decidir se a via glicolítica numa determinada célula é reversível ou irreversível, que valor é mais relevante, $\Delta G^{0'}$ ou ΔG ?
- 7) Uma pessoa incapaz de executar exercícios físicos intensos e prolongados teve suas enzimas analisadas. Todas as enzimas da via glicolítica estavam em concentração normal, com exceção da fosfoglicerato mutase muscular.
 - a) Como será afetada a produção de energia metabólica em uma célula que apresenta baixos níveis desta enzima?
 - b) Como será afetada a produção de Lactato na ausência desta enzima? [Referência: Di Mauro, S.; Miranda, A.F.; Kahn, S.e Gitlin, K. - Human muscle phosphoglycerate mutase deficiency *Science* 1981, vol. 212, 1277-1279.
- 8) Calcular a porcentagem de energia armazenada pela célula ao degradar glicose pela via glicolítica. Sabe-se que:



1. O fígado humano precisa manter níveis mínimos da glicose circulante, porque cérebro e hemácias dependem quase exclusivamente de glicose para produção de energia. No entanto, a reserva de glicogênio hepático não é suficiente para essa finalidade. Por isso, o fígado sintetiza glicose de novo a partir de lactato, piruvato, glicerol, intermediários do ciclo de Krebs e aminoácidos, através de uma via anabólica chamada de gliconeogênese. No jejum, mesmo o jejum de poucas horas, a gliconeogênese é a principal fonte da glicose liberada pelo fígado na circulação.
2. A glicólise, como já foi visto, é uma via catabólica com a finalidade de produzir energia na forma de **2 NADH + 2 ATP** a partir da degradação de glicose a piruvato de acordo com a equação química seguinte:



A gliconeogênese tem a finalidade de sintetizar glicose a partir de piruvato, isto é, faz o caminho metabólico inverso ao da glicólise. Mas, a gliconeogênese, contrariamente à glicólise, é muito endergônica. Para produzir glicose a partir de piruvato necessitam-se **2 NADH + 4 ATP + 2 GTP**, conforme a estequiometria indicada na equação abaixo:

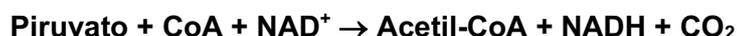


3. A gliconeogênese utiliza enzimas glicolíticas reversivelmente, mas três dessas enzimas, a hexoquinase, a fosfofrutoquinase e a piruvato quinase, catalisam reações com ΔG^- muito negativo, sendo essencialmente irreversíveis. Estas reações são substituídas na gliconeogênese por reações exergônicas, tornando termodinamicamente favorável a síntese de glicose a partir de piruvato. Destas reações, as duas primeiras correspondentes às enzimas hexoquinase e fosfofrutoquinase, são substituídas por reações simples de hidrólise de ligação fosfo-éster, catalisadas, respectivamente, pelas enzimas glicose-6-P-fosfatase e frutose-1,6-bis-fosfatase. Já a terceira reação, que permite a volta de piruvato para P-enolpiruvato é mais complexa e se dá em duas etapas catalisadas, respectivamente, por piruvato-carboxilase e P-enolpiruvato-carboxiquinase.
4. O balanceamento entre glicólise e gliconeogênese é coordenadamente controlado por um complexo sistema de regulação enzimática, envolvendo interações alostéricas e modificações covalentes. Todo esse controle está concentrado nas 3 reações nas quais glicólise e gliconeogênese seguem reações independentes, irreversíveis e opostas, que são: 1) glicose / glicose-6-P; 2) frutose-6-P / frutose-1,6-bisP; 3) P-enolpiruvato / piruvato.

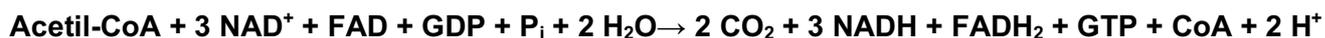
Exercícios do módulo 13

- 1) Explique como a hemácia mantém glicose a 5 mM e G6P a 0,0083 mM, se a conversão de glicose em G6P é muito exergônica. Como seriam afetadas as concentrações relativas dos intermediários da glicólise se a glucoquinase ($K_m = 5\text{mM}$) fosse colocada artificialmente na hemácia em lugar da hexoquinase ($K_m = 0,1\text{mM}$)?
- 2) Na gliconeogênese, como são revertidas as reações de glicose \rightarrow G6P e F6P \rightarrow F-1,6-BP, que são altamente exergônicas. Conceitue ciclo fútil.
- 3) A reversão da reação de PEP + ADP \rightarrow piruvato + ATP não pode ocorrer por um processo relativamente fácil como a reversão de glicose + ATP \rightarrow G6P + ADP. Qual é a solução bioquímica que os sistemas biológicos utilizam para ir de piruvato a PEP?
- 4) Qual é o consumo de energia na síntese de glicose a partir de piruvato, medido em equivalentes de ATP. Indique as reações onde há consumo. Compare o rendimento da via glicolítica com o consumo da gliconeogênese, são iguais ou diferentes?
- 5) Um procedimento comum para determinação da efetividade de compostos como precursores da glicose é colocar um animal em jejum até que os estoques de glicogênio do fígado sejam depletados e então administrar o substrato em questão. Um substrato que leva a um aumento líquido no glicogênio hepático é chamado de glicogênico pois ele deve primeiro ser convertido em glicose-6-fosfato. Mostre por meio de reações enzimáticas conhecidas quais das seguintes substâncias são glicogênicas:
 - a) succinato,
 - b) glicerol,
 - c) acetil CoA,
 - d) piruvato e
 - e) butirato.Escreva as fórmulas estruturais das substâncias relacionadas de (a) a (e).
- 6) Citar os efetadores alostéricos positivos e negativos de fosfofrutoquinase e frutose 1,6 bisfosfatase no fígado. Quais são as consequências destes efetadores no fluxo relativo dos metabolitos através da neoglicogênese e da glicólise?
- 7) O nível de frutose 2,6 bisfosfato nos hepatócitos varia com a disponibilidade da glicose: é baixo no jejum e alto após as refeições. Como isso se explica em termos das reações catalisadas por fosfofrutoquinase-2 e frutose 2,6 bisfosfatase.

1. Em condições aeróbicas, o destino do piruvato produzido na glicólise é sofrer uma descarboxilação oxidativa catalisada pela piruvato desidrogenase, que é um complexo multienzimático existente no interior da mitocôndria de eucariotos. Portanto, o piruvato precisa entrar na mitocôndria para ser degradado por essa via. A reação geral é a seguinte:

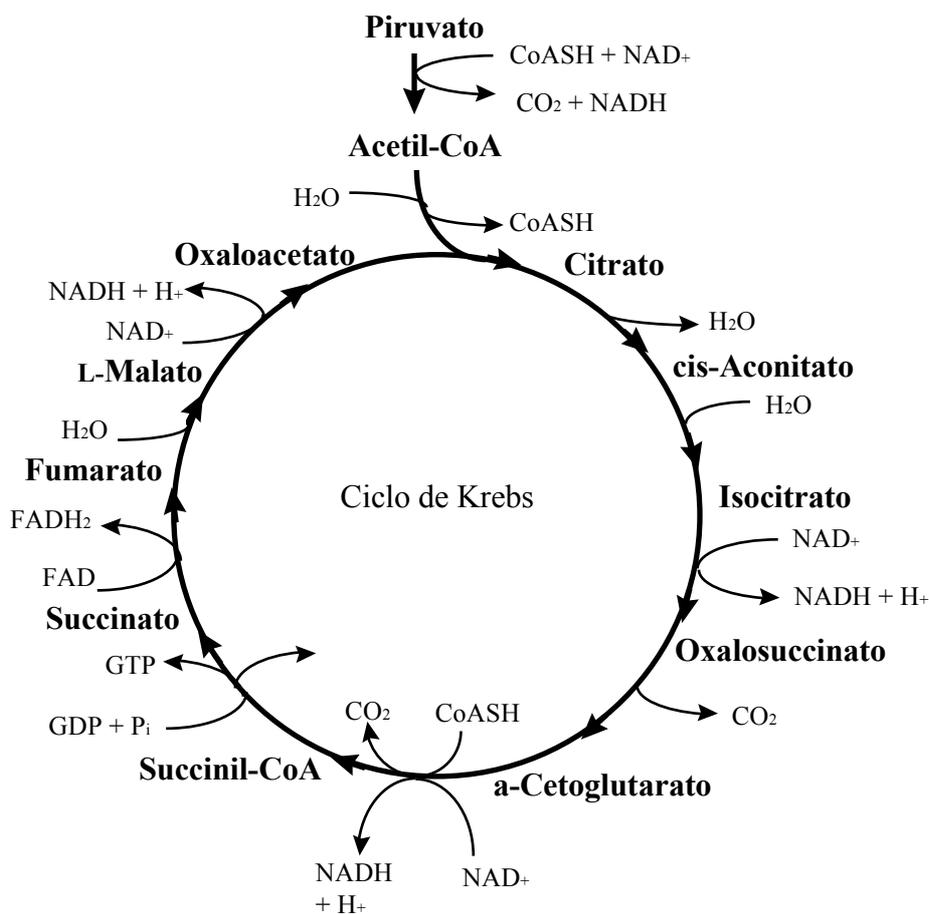


2. O acetilCoA resultante da metabolização do piruvato é totalmente oxidado no ciclo do ácido cítrico, também chamado ciclo de Krebs, conforme a seguinte reação geral:



O ciclo de Krebs, esquematizado na figura, compreende 8 reações, envolvendo 8 enzimas e 8 ácidos carboxílicos, di e tri-ácidos, todos dispersos na matriz da mitocôndria. Portanto, começando no piruvato e passando pelo acetilCoA, ocorre oxidação completa desses metabolitos liberando 3CO_2 sem participação de O_2 molecular. Os agentes oxidantes em todas as reações são NAD^+ ou FAD e as formas reduzidas destas co-enzimas ($\text{NADH} + \text{FADH}_2$), resultantes do processo, só são reoxidadas na cadeia respiratória, uma via especializada que se localiza na membrana mitocondrial interna e será considerada mais adiante.

3. O ciclo de Krebs, conforme sua reação geral indica, é essencialmente catabólico, pois promove a oxidação do radical acetil a 2CO_2 e retém parte da energia livre desta reação na forma de coenzimas reduzidos que, posteriormente, servirão à produção de ATP através da fosforilação oxidativa. Para cumprir esta função basta que os 8 intermediários do ciclo ocorram em concentrações catalíticas. Mas, o ciclo possui outra função, além da catabólica, diversos de seus intermediários alimentam as vias de síntese de aminoácidos, lipídeos e glicose, isto é, o ciclo tem também função anabólica e, portanto, deve ser classificado como anfibólico. Para que o ciclo desempenhe concomitantemente ambas as funções, catabólica e anabólica, as concentrações dos intermediários são mantidas e controladas através de um complexo sistema de reações auxiliares, conhecidas como reações anapleróticas. Um exemplo de reação anaplerótica é a carboxilação de piruvato para obter oxalacetato, catalisada pela enzima piruvato carboxilase.
4. A transformação de piruvato em acetil-CoA, é uma reação para a qual convergem diversas vias catabólicas e anabólicas, além da glicólise. Por esse motivo a piruvato desidrogenase está sujeita a um controle altamente elaborado, compreendendo dois níveis de regulação: a) controle alostérico através da inibição pelo produto, exercido por NADH e acetil-CoA; b) modificação covalente reversível da subunidade E_1 da enzima, por fosforilação/desfosforilação.
5. As enzimas citrato sintase, isocitrato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase são as reguladoras do fluxo metabólico através do ciclo de Krebs e estão sujeitas a controle alostérico, envolvendo NADH como inibidor e Ca^+ e ADP como ativadores.



Exercícios do módulo 13

- 1) Escrever a reação de formação de acetil-CoA a partir de piruvato e indicar:
 - a) as 5 coenzimas necessárias
 - b) as vitaminas envolvidas
 - c) a sua localização celular

- 2) Como é a equação química, estequiometricamente equilibrada, que representa a oxidação de acetil-CoA no ciclo de Krebs? Como se pode medir o rendimento do ciclo de Krebs em termos de coenzimas reduzidos (poder redutor) e ATP (“ligações de fosfato de alta energia”).

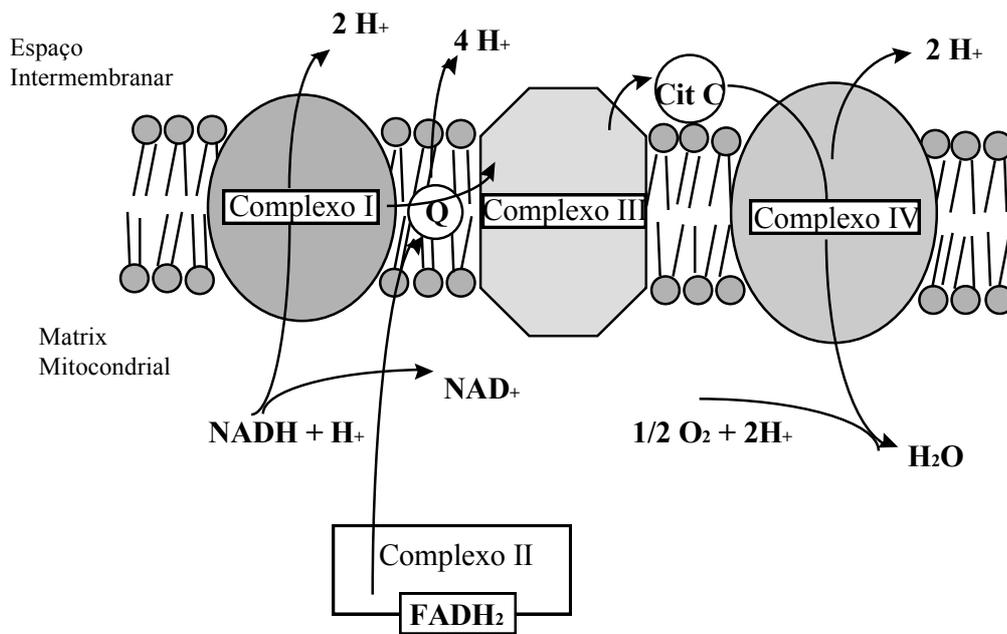
- 3) Identifique os tipos de reações que ocorrem no ciclo de Krebs, mostrando as respectivas equações químicas.

- 4) Equacione a descarboxilação oxidativa de α -cetoglutarato a succinato, respeitando a estequiometria da reação. Mostre as etapas que compõem esta reação com as respectivas enzimas e coenzimas.

- 5) Quais são as enzimas do ciclo de Krebs sujeitas a regulação? Explique como cada uma delas é regulada.
- 6) Explique porque piruvato é estequiometricamente convertido a CO_2 na respiração de fatias de músculo mantidas em solução fisiológica, enquanto oxalacetato e citrato tem efeito catalítico neste mesmo processo. Mostre porque a respiração pode ser sustentada pelo consumo estequiométrico de citrato, mas não de acetato, quando o ciclo de Krebs é inibido por malonato.
- 7) Dispondo das enzimas necessárias, a adição de que compostos fará aumentar a concentração de oxaloacetato em um sistema "in vitro" que contém mitocôndrias: acetil-CoA, piruvato, glutamato, citrato ou ácidos graxos?
- 8) Uma suspensão de mitocôndrias, suplementada com acetil-CoA marcada com C^{14} , produz CO_2 marcado apenas quando suprida de oxigênio. Em condições anaeróbias, a adição de azul de metileno restaura a produção de CO_2 marcado, observando-se também a descoloração do corante (azul de metileno reduzido é incolor). Explique estes dados.

MÓDULO 14: CADEIA RESPIRATÓRIA E FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

1. Fosforilação oxidativa é o processo bioquímico pelo qual a oxidação de NADH e FADH_2 , produzidos na glicólise e ciclo de Krebs, ocorre acoplada à produção de ATP , a partir de $\text{ADP} + \text{Pi}$. Este processo se dá na cadeia respiratória ou cadeia de transporte de elétrons, que compreende um conjunto ordenado de enzimas e transportadores de elétrons inseridos na membrana interna da mitocôndria.
2. A cadeia respiratória contém 4 complexos, **I, II, III e IV**, ordenados por ordem crescente de potencial redox, indo do potencial padrão de NAD^+/NADH ($E^{0'} = -0,315\text{V}$) ao do $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ ($E^{0'} = +0,815\text{V}$). Os elétrons são transferidos do **complexo I** ou **II** para o **complexo III** pela **coenzima Q** (ou ubiquinona), e do **complexo III** para o **complexo IV** pelo **citocromo C** para chegar ao O_2 . NADH e FADH_2 , cedem elétrons, respectivamente, aos complexos I e II. A transferência exergônica de elétrons do nível redox de NADH para o de O_2 ($\Delta E^{0'} = 1,130\text{V}$) envolve uma diferença de energia livre liberada ($\Delta G^{0'} = -218\text{kJ/mol}$) que é em parte retida pelo transporte de H^+ do lado interno para o externo da membrana, criando o gradiente eletroquímico de prótons que permitirá "empurrar" o processo endergônico de fosforilação de ADP por Pi para gerar ATP , através da bomba de prótons que constitui a ATP sintase (também conhecida com $\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$).



3. A ATP sintase é distinta e fisicamente separada da cadeia de transporte de elétrons. A transferência de 2e de NADH até O₂ envolve um $\Delta G^{0'} = -218 \text{ kJ/mol}$, que gera um incremento no gradiente de prótons suficiente para mover a ATP sintase, permitindo a produção de 3 moles de ATP ($\Delta G^{0'} = +30,5 \text{ kJ/mol}$). Nestas condições, a ATP sintase trabalha com uma eficiência termodinâmica igual a 42%. É, no entanto, necessário destacar que quando os 2e saem do nível redox de FADH₂, formam-se apenas 2ATP. Naturalmente, para uma melhor medida da real eficiência termodinâmica da fosforilação oxidativa seria preciso estimar o ΔG da transferência de elétrons em vez do $\Delta G^{0'}$.
4. A grande quantidade de energia livre que seria dissipada na oxidação completa da glicose a CO₂ e H₂O [$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2 \rightarrow 6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}$; $\Delta G^{0'} = -2823 \text{ kJ/mol}$] é aproveitada para produção de ATP, graças quase exclusivamente ao processo de fosforilação oxidativa, rendendo 38ATP por mol de glicose (incluindo neste total 2ATP da glicólise e 2 do ciclo de Krebs).
5. Vários mecanismos da cadeia de transporte de elétrons e de seu acoplamento à síntese de ATP foram elucidados através da utilização de inibidores e desacopladores, entre os quais estão: rotenona, amital, antimicina A, cianeto e DNP.
 - Rotenona e amital inibem a redução dos complexo I e III por NADH.
 - Antimicina A inibe o transporte de elétrons no complexo II.
 - Cianeto inibe o transporte no complexo IV.
 - DNP é desacoplador, pois promove o “vazamento” de H⁺, levando à dissipação do gradiente de prótons e contínuo transporte de elétrons, desacoplado da síntese de ATP.
6. A síntese de ATP a partir de ADP e P_i na mitocôndria, que é catalisada pela ATP sintase, é dirigida pelo processo de transporte de elétrons. Mas como a ATP sintase é fisicamente separada das proteínas do transporte de elétrons, a energia livre liberada no transporte de elétrons deve ser conservada em uma forma que possa ser utilizada pela ATP sintase. A energia livre do

transporte de elétrons é conservada pelo bombeamento de H^+ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, criando um gradiente de H^+ . A volta dos prótons ao interior da mitocôndria é termodinamicamente favorável. A membrana interna da mitocôndria é impermeável a prótons em toda sua extensão, exceto na ATP sintase; e é então por este canal que os prótons atravessam a membrana, de volta à matriz mitocondrial. A variação de energia livre associada ao transporte de um próton através da membrana interna da mitocôndria pode ser determinada através de medidas da diferença de pH e do potencial de membrana estabelecidos em mitocôndrias consumindo oxigênio.

7.

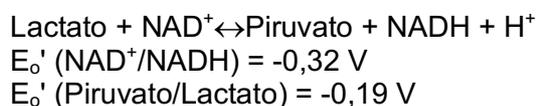
Exercícios do módulo 14

- 1) Definir potencial de óxido-redução (E), potencial de óxido-redução padrão (E°) e potencial de óxido-redução padrão bioquímico ($E^{\circ'}$).
- 2) Entre os transportadores universais de elétrons da cadeia respiratória estão NAD^+ e os nucleotídeos de flavina (FAD e FMN), quais são as diferenças entre estes transportadores de elétrons quanto a potencial redox e forma de interação com as enzimas com as quais atuam?
- 3) Classifique os seguintes inibidores quanto a seus mecanismos de ação na cadeia respiratória: **a)** rotenona; **b)** antimicina A; **c)** oligomicina e **d)** DNP (2,4-dinitrofenol).
- 4) Descreva o mecanismo de ação do DNP (2,4-dinitrofenol), mostrando porque o mecanismo de ação deste inibidor é uma demonstração experimental importante da hipótese quimiosmótica da fosforilação oxidativa.
- 5) Porque F_1 e F_0 são ambos necessários para a síntese de ATP?
- 6) Em mitocôndrias isoladas, o transporte de elétrons não ocorre na ausência de ADP e P_i , mesmo que haja abundância de succinato para fornecer elétrons. Como se explica que mitocôndrias nessas condições passam a transportar elétrons e consumir oxigênio se forem tratadas com DNP?

7) A relação entre energia livre padrão de uma reação e o potencial redox é:

$$\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E_{o}' \text{ onde } n \text{ é o número de elétrons transferidos}$$
$$F \text{ é a constante de Faraday (} F = 23.60 \text{ cal V}^{-1}\text{)}$$
$$\Delta E_{o}' \text{ é o, diferença de potencial padrão da dupla redox.}$$

A uma solução 1 M de NAD^+ , NADH , Piruvato e Lactato, adicionou-se lactato desidrogenase:



a) Em que sentido a reação ocorrerá?

b) À medida que a reação ocorre, como variam esses potenciais redox?

8) Na hipótese do acoplamento quimiosmótico, a energia que começa na forma de potencial químico de redução/oxidação, é convertida na forma de potencial próton-motriz e finalmente é convertida na forma de potencial químico de ATP. Qual é a diferença entre o potencial químico (G) e o potencial elétrico (\square) de um soluto distribuído dos dois lados de uma membrana? Defina “força próton-motriz”.

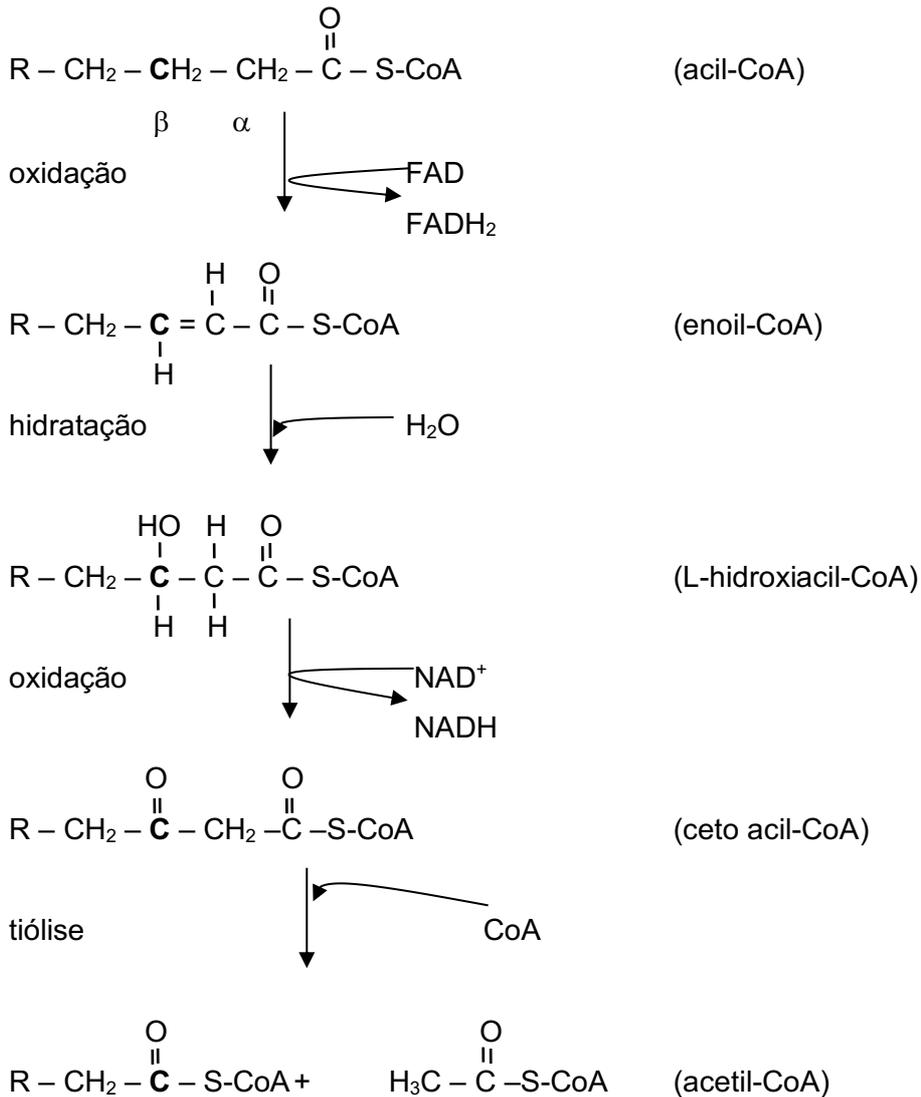
MÓDULO 15. ÁCIDOS GRAXOS: ESTRUTURA, FUNÇÃO E METABOLISMO

1. Lípidos ou lipídeos são substâncias biológicas solúveis em solventes orgânicos, como clorofórmio e metanol e, praticamente, insolúveis em água. Os lípidos compreendem: a) ácidos graxos, em geral na forma de triacilgliceróis; b) glicerofosfolípidos; c) esfingolípidos; d) colesterol e derivados. Este módulo se restringe a ácidos graxos e triacilgliceróis.
2. Ácidos graxos são ácidos carboxílicos com longas cadeias hidrocarbonadas, encontrados na forma de tri-ésteres de glicerol. A maioria possui um número par de C, predominando os de 16 C (ácido palmítico) e os de 18 C (ácido oléico). Grande parte apresenta dupla ligação (insaturado) e muitos são poli-insaturados.
3. As propriedades físicas dos ácidos graxos dependem do grau de insaturação da cadeia hidrocarbonada. As moléculas dos ácidos graxos saturados são muito flexíveis, facilitando a atração e coesão entre si. Duplas ligações entre C impõe rigidez à cadeia, tornando-a menos flexível e limitando a coesividade entre as moléculas do ácido graxo. Em consequência disso, a temperatura de fusão (transição de fase sólido/líquido) diminui com o grau de insaturação dos ácidos graxos.
4. Os triacilglicerídeos desempenham um papel de reserva de energia metabólica. Algumas de suas propriedades físico-químicas são ideais para essa função: a) elevado grau de redução de

seus C, maximizando a quantidade de energia livre liberada na oxidação e b) alta hidrofobicidade, permitindo estocagem livre de água (estoques anidros). Não é por acaso que os triglicerídeos compõem cerca de 90% da reserva de energia metabólica e também da dieta lipídica dos humanos.

5. A reserva de triacilglicerídeos do tecido adiposo é mobilizada através da hidrólise a glicerol e ácidos graxos livres, catalisada por lípase específica. Os ácidos graxos livres são carregados pela corrente sanguínea na forma de complexos com albumina, que representa 50% da proteína do plasma. Ácidos graxos livres são muito insolúveis, a $\sim 1 \mu\text{M}$ formam micelas, que são altamente tóxicas.
6. A via catabólica de degradação de ácidos graxos para produção de ATP ocorre na matriz mitocondrial e se chama beta-oxidação. Esta via leva à clivagem sequencial da cadeia do ácido graxo em pares de C, liberando a cada ciclo: 1 acetilCoA, 1 NADH e 1 FADH_2 (ver reações abaixo), que alimentarão, respectivamente, o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória. Mas, a beta-oxidação exige previamente uma ativação inicial que consome 1 ATP e libera o ácido graxo na forma de acilCoA. Esta etapa preliminar de ativação se dá associada à membrana externa da mitocôndria e, a transferência da acilCoa para dentro da mitocôndria, é mediada pela carnitina.

Reações de um ciclo de beta-oxidação:



7. A oxidação completa de uma molécula de palmitato (16 C) a CO_2 e H_2O , através da beta-oxidação, ciclo de Krebs e cadeia respiratória, rende 129 ATP. É importante destacar que este rendimento, medido em ATP/mol-oxidado, é muito superior ao da oxidação completa de açúcares e proteínas, pois a oxidação de um ácido graxo leva à liberação de 37,6 kJ/g de energia livre, enquanto oxidação de açúcares ou proteínas libera apenas 16,7 kJ/g.

8.

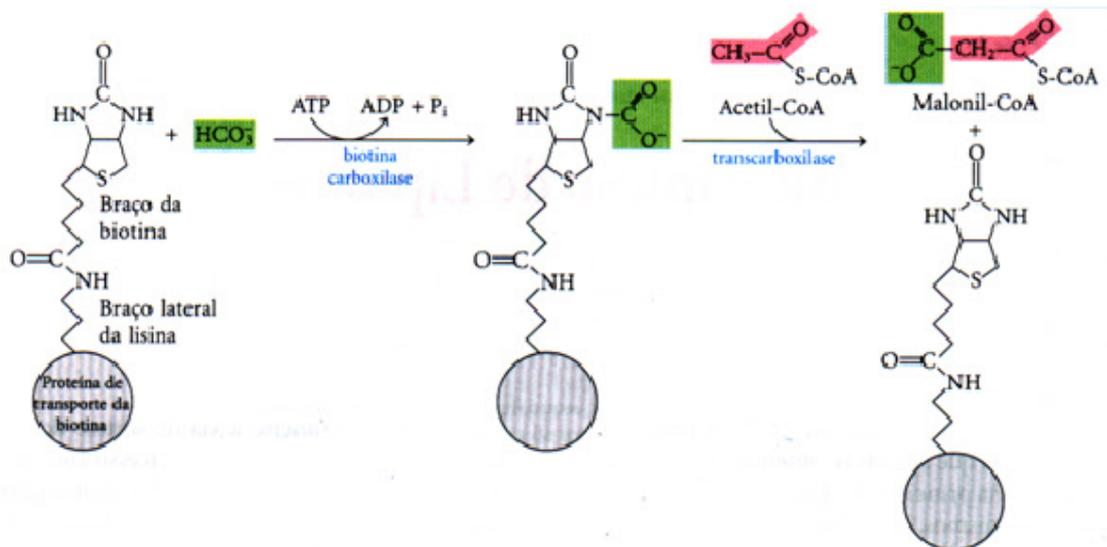
10. É importante destacar que animais degradam eficientemente glicose até acetilCoA pela glicólise e assim podem converter C de açúcar em cadeias de lipídeo de reserva. Mas, estes organismos não podem fazer o caminho de volta de cadeias de ácido graxo para glicose, pois não possuem reações que convertam acetilCoA em piruvato ou oxalacetato.

Exercícios do módulo 15

- 1) Ponto de fusão dos ácidos graxos. Os pontos de fusão de uma série de ácidos graxos de 18 átomos de carbono são: ácido esteárico (69,9°C), ácido oléico (13,4°C), ácido linoléico(-5°C) e ácido linolénico (-11°C). Que aspecto estrutural destes ácidos graxos de 18 carbonos pode ser correlacionado com o ponto de fusão? Forneça uma explicação molecular para esta tendência do ponto de fusão.
- 2) Mostre como os ácidos graxos são ativados antes de serem degradados. Em que compartimento celular isso ocorre?
- 3) Aonde e sob que forma são estocados os ácidos graxos? Como os ácidos graxos da reserva metabólica são mobilizados para serem oxidados na matriz mitocondrial?
- 4) Explique os passos da β -oxidação dos ácidos graxos, partindo de uma molécula de palmitato. Calcule o rendimento energético da oxidação completa de palmitato a CO_2 e H_2O .
- 5) Na β -oxidação, a cadeia de ácidos graxos é degradada aos pares de carbono. Na síntese de ácidos graxos, a cadeia cresce também aos pares de carbono. No entanto, o precursor na alongação da cadeia, durante a síntese, é malonil-CoA e não acetil-CoA. Explique porquê.
- 6) Equacione as etapas que compõem o conjunto de reações que permitem adicionar acetil-CoA à cadeia de ácido graxo crescente durante a síntese de palmitato. Mostre que etapa torna o processo favorecido termodinamicamente.
- 7) Compare a β -oxidação e a biossíntese de palmitato, mostrando diferenças e semelhanças em:
 - a) carregadores de grupos acila;
 - b) reações de óxido-redução;
 - c) coenzimas de óxido-redução;
 - d) gasto ou produção de energia em termos de equivalentes de ATP e de coenzimas redutoras.
- 8) Mostre como se dá a oxidação do ácido oléico.

MÓDULO 16: VIA DAS PENTOSSES E SINTESE DE ACIDOS GRAXOS

1. Muitas funções celulares que envolvem reações endergônicas são efetuadas graças à hidrólise exergônica de ATP. Outras reações endergônicas, como a síntese de ácidos graxos e colesterol e a fotossíntese, requerem NADPH, que tem um grande poder redutor.
2. Os ácidos graxos são sintetizados no citosol por via anabólica própria que adiciona seqüencialmente unidades de 2 C á cadeia em crescimento. Esta via é alimentada por acetilCoA, mas só a primeira unidade de 2 C entra como acetilCoA, as subseqüentes são na forma de malonilCoA. Portanto, o acetilCoA precisa ser previamente ativado a malonilCoA, por carboxilação e consumo de 1 ATP, para permitir a reação de condensação, levando ao crescimento da cadeia do ácido graxo de uma unidade de 2 C, por ciclo de síntese. A ativação de acetilCoA é catalisada pela acetilCoA-carboxilase, uma enzima sujeita a controle complexo, envolvendo regulação alostérica e ativação / desativação por modificação covalente (fosforilação / desfosforilação).
3. O primeiro passo no processo de síntese de ácido graxo ocorre com a síntese de malonil-CoA a partir de acetil-CoA (2C). Isso corre através da carboxilação da biotina (vitamina B7) pelo bicarbonato e conseguinte descarboxilação da biotina que doa um carbono ao acetil CoA que formará o malonil-CoA (3C).



4. O malonil-CoA se ligará a um sítio da ácido graxo sintase e o grupo acetil se ligará ao outro sítio, neste momento ocorrerá a condensação destes dois compostos com a liberação de uma molécula de CO_2 . Ocorrerá a redução do composto condensado realizada pelo NADPH com adição de 2H^+ . Seguida a essa redução ocorrerá uma desidratação com saída de uma molécula de H_2O . Ocorrerá uma nova redução realizada pelo NADPH com nova adição de 2H^+ .
5. Novos grupamentos malonil-CoA serão adicionados realizando as 4 etapas : condensação, redução, desidratação e redução, criando um ácido graxo, adicionando cada vez 2 carbonos. Toda vez que ocorrer uma condensação haverá liberação de um CO_2 . O ácido graxo com 16

carbonos (palmitato) pode dar origem a outros ácidos graxos através de processos que envolvem desaturação e alongamento.

6. A síntese de palmitato (16 C) é altamente endergônica, obedecendo a seguinte estequiometria:
AcetilCoA + 7 malonilCoA + 14 NADPH + 7H⁺ → palmitato + 7 CO₂ + 14 NADP⁺ + 8 CoA + 6H₂O
7. A elongação da cadeia além de 16 C e a inserção de duplas ligações é feita por outros sistemas enzimáticos especializados, que se localizam na membrana do retículo endoplasmático. Mas, mamíferos não possuem enzimas para introduzir duplas ligações em cadeias de ácidos graxos acima do C9. Por isso, linoleato (18:2) e linolenato (18:3), são ácidos graxos essenciais que precisam ser adquiridos pela dieta.
8. O grupo fosforila no carbono 2 de uma das unidades de ribose do NADPH o diferencia de NADH. NADH é oxidado pela cadeia respiratória para gerar ATP, enquanto que NADPH serve como um doador de elétrons em reações biossintéticas redutoras.
9. Na via das pentoses, NADPH é gerado quando a glicose-6-fosfato é oxidada a ribose-5-fosfato, que é um açúcar de 5 carbonos, componente de vários compostos importantes, como ATP, CoA, NAD⁺, FAD, RNA e DNA.
10. A via das pentoses também catalisa a interconversão de açúcares de 3, 4, 5, 6 e 7 carbonos, em uma série de reações não oxidativas que ocorrem no citosol.
11. As reações da via das pentoses são as seguintes:
- glicose-6-fosfato é desidrogenado e convertido a ribulose-5-fosfato, em três reações, produzindo 2 NADPH + H⁺.
 - ribulose-5-fosfato é isomerizada a ribose-5-fosfato.
- Nestas reações, 2 NADPH + H⁺ e uma ribose-5-fosfato são gerados para cada glicose-6-fosfato oxidada.
- ribose-5-fosfato é convertida a gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato pela transcetolase e transaldolase. A transcetolase catalisa a transferência de unidades de C2 de uma cetose para uma aldose. A transaldolase transfere unidades de C3 de uma aldose para uma cetose.
- As reações de transcetolase e transaldolase criam uma ligação reversível entre a via das pentoses e a via glicolítica. O resultado dessas reações é a formação de 2 hexoses e 1 triose a partir de 3 pentoses:
- $$\begin{array}{ll} \text{C}_5 + \text{C}_5 \rightleftharpoons \text{C}_3 + \text{C}_7 & \text{Transcetolase} \\ \text{C}_7 + \text{C}_3 \rightleftharpoons \text{C}_4 + \text{C}_6 & \text{Transaldolase} \\ \text{C}_5 + \text{C}_4 \rightleftharpoons \text{C}_3 + \text{C}_6 & \text{Transcetolase} \end{array}$$
12. O excesso de ribose-5-fosfato formado pela via das pentoses pode ser completamente convertido em intermediários da via glicolítica.

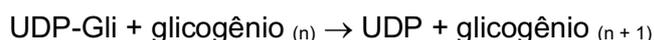
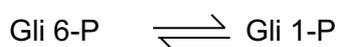
13. A primeira reação da via das pentoses, a desidrogenação da glicose-6-fosfato, é praticamente irreversível. E é essa a reação em que a via das pentoses é controlada. O fator regulatório mais importante é o nível de NADP^+ , o receptor de elétrons na oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona. Além disso, NADPH compete com NADP^+ pela ligação à enzima. A parte não oxidativa da via das pentoses é controlada principalmente pela disponibilidade de substratos.
14. A via percorrida pela glicose-6-fosfato depende da necessidade celular de $\text{NADPH} + \text{H}^+$, ribose-5-fosfato e ATP:
- Quando muito mais ribose-5-fosfato é requerida que $\text{NADPH} + \text{H}^+$, a maior parte de glicose-6-fosfato é convertida a frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato pela via glicolítica, a transaldolase e a transcetolase convertem esses em ribose-3-fosfato.
 - Quando a necessidade de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ e ribose-5-fosfato estão balanceadas, a reação predominante é a formação de 2 NADPH e uma ribose-5-fosfato de glicose-6-fosfato pela fase oxidativa da via das pentoses.
 - Quando muito mais $\text{NADPH} + \text{H}^+$ é requerido que ribose-5-fosfato, a glicose-6-fosfato é completamente oxidada a CO_2 , ou convertida a piruvato.

Exercícios do módulo 16

- 1) Mostre a parte oxidativa do ciclo das pentoses com as equações das reações envolvidas, indicando os agentes oxidantes e a origem do carbono presente no CO_2 liberado.
- 2) Compare NADH e NADPH , indicando suas funções no metabolismo de carboidratos. Explique porque a via da pentose-fosfato é muito mais ativa no tecido adiposo que no músculo.
- 3) Quando há necessidade de NADPH , o ciclo das pentoses pode funcionar dando um resultado líquido que equivale à oxidação total de glicose a CO_2 . Explique este processo através das respectivas reações estequiometricamente equilibradas.
- 4) Ribose 5-fosfato pode ser obtida para a síntese de nucleotídeos através da via das pentoses, com ou sem oxidação da glicose. Mostre como isso é possível com as respectivas equações químicas.
- 4.) Explique como a via da pentose-fosfato é controlada, tendo em vista que grande parte das reações dessa via é reversível.
- 6) Compare as reações catalisadas por transaldolases e transcetolases, indicando reagentes, produtos e a natureza das reações.

MÓDULO 17: METABOLISMO DO GLICOGÊNIO

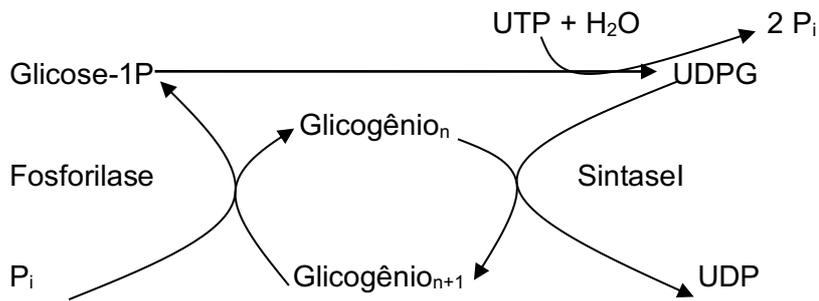
1. O glicogênio é um polissacarídeo que funciona como forma de reserva de energia em animais e microrganismos. Em animais, o glicogênio está depositado no fígado, um órgão central de reserva de energia, e, também, nos músculos, onde é degradado localmente. O glicogênio hepático é exportado para manter a glicemia.
2. A natureza polimérica e semi-solúvel do glicogênio constitui-se numa maneira perfeita de armazenar energia na forma de glicose. O estoque de glicogênio do fígado na forma de glicose causaria tamanha pressão osmótica, que a viabilidade do hepatócito seria impossível.
3. O glicogênio é um polímero de α -D-glico-piranosose altamente ramificado. Na cadeia os monômeros são interligados por ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4); nos pontos de ramificação a ligação também é glicosídica, mas α (1 \rightarrow 6).
4. A glicose, na forma de glicose-1-P, é liberada da reserva de glicogênio pela fosforólise da ligação α (1 \rightarrow 4) da extremidade não redutora do polímero. Esta reação é catalisada pela glicogênio fosforilase.
5. A glicogênio fosforilase degrada até restarem 4 resíduos antes de uma ramificação até que a enzima desramificadora transfere 3 dos 4 resíduos para outra extremidade da cadeia de glicogênio formando uma nova ligação α (1 \rightarrow 4). O resíduo restante está ligado a cadeia pela ligação α (1 \rightarrow 6) que é hidrolisada pela enzima desramificadora através de sua atividade α (1 \rightarrow 6) glicosidase.
6. Glicose-1-fosfato é convertida a glicose-6-fosfato pela fosfoglicomutase, esta pode ser liberada pela circulação no fígado pela ação da glicose-6-fosfatase ou degradada pelo músculo.
7. A síntese do glicogênio se dá através de via uma diferente da de degradação. A glicose-1-P é primeiro ativada à uridinadifosfato-glicose, ou simplesmente UDP-G. UDP-G é o substrato da glicogênio sintase que catalisa a adição de um resíduo de glicose ao carbono 4 da glicose de uma extremidade não redutora do glicogênio, liberando ainda como produto UDP. Esta reação necessita de cadeias glicogênicas pré-existentes que funcionam como PRIMER da reação, oferecendo extremidades não redutoras para reagir com UDP-G.



O UDP é convertido a a UTP as custas da utilização de ATP:



8. A glicogênio fosforilase e glicogênio sintase formam um ciclo que, respectivamente, libera e deposita glicose-1-P no estoque da glicogênio:



É fácil notar que se estas enzimas funcionarem concomitantemente o ciclo será FÚTIL, cujo único resultado líquido será dissipação de energia através da reação:



Conclui-se que, necessariamente, no hepatócito estas enzimas são coordenadamente reguladas, isto é, quando a fosforilase é ativada para mobilizar glicose-1-P, a sintase é desativada, e vice-versa, conforme a necessidade celular.

9. Ambas fosforilase e sintase são reguladas por fosforilação (modificação covalente) em resíduos específicos de serina, reações catalisadas pela mesma proteína-quinase que possui dupla especificidade, sendo por isso chamada de sintase-fosforilase quinase. A fosforilase e a sintase são espécies fosforiladas, portanto a fosforilação, catalisada pela sintase-fosforilase quinase, causa ativação da fosforilase e inativação da sintase.
10. A fosforilase a e a sintase I (formas ativas), por um lado, e a fosforilase b e a sintase D (formas não ativas), por outro, são, respectivamente interconversíveis. Para tanto é necessário que fosforilase a e a sintase I sejam desfosforiladas, através de uma reação que requer catálise. A principal enzima, catalisadora comum destas desfosforilações, é a fosfoproteína fosfatase 1.
11. A integração metabólica requerida pelo bom funcionamento do organismo faz com que as interconversões coordenadas da fosforilase e sintase do glicogênio no fígado, por fosforilação, sejam controladas extracelularmente por hormônios específicos, principalmente: adrenalina, glucagon e insulina.
12. As formas inativas fosforilase b e sintase D são intracelularmente estimuladas por fatores alostéricos positivos, por razões de economia interna do metabolismo celular, independentemente de controle hormonal. São estimuladores alostéricos da fosforilase b e sintase D, respectivamente, 5'-AMP e glicose-6P.

Exercícios do módulo 17

- 1) A ativação de glicose-1-fosfato (G1-P), requer a clivagem de uma ligação de alta energia, liberando PP_i . Considere os passos de ativação de G1-P e a reação de regeneração de UTP e analise o gasto de energia necessário para a síntese de glicogênio. Compare o gasto de energia para a adição de um resíduo de glicose ao glicogênio, com a obtenção de energia a partir da liberação de glicose na degradação do glicogênio.

- 2) Qual a finalidade das reservas de glicogênio do fígado e músculo? Qual a principal diferença bioquímica entre esses tecidos?

- 3) Equacione as etapas de mobilização da glicose a partir do glicogênio no fígado e no músculo. Mostre:
 - a) no fígado (desde a fosforólise até a liberação de glicose no plasma);
 - b) no músculo (desde a fosforólise até o aproveitamento na glicólise).

- 4) Qual a função da hidrólise de PP_i no controle da síntese de glicogênio?

- 5) Esquematize as etapas de degradação total do glicogênio, indicando as enzimas envolvidas, reagentes e produtos da reação.

- 6) Mostre como são coordenadas síntese e degradação do glicogênio. Restrinja-se à ativação e inativação da fosforilase e da sintase, explicando a natureza do processo e as enzimas envolvidas (não considere o controle hormonal).

MÓDULO 18: CONTROLE HORMONAL DO METABOLISMO

1. A regulação metabólica é feita de interferência direta de determinadas reações químicas que compõem o metabolismo, aumentando ou reduzindo sua velocidade. O resultado direto deste processo é a maior oferta de substratos ou acúmulo de metabólitos que acabará por influenciar outras vias dependentes destes compostos e a forma mais eficiente de regulação desta rede é aumentar a concentração ou alterar a eficiência da enzima.
2. Pode se controlar a síntese ou degradação enzimática; também se pode modular a atividade enzimática através de mudanças conformacionais da própria enzima provocada através da ligação de compostos ou grupos na cadeia peptídica: regulação alostérica e regulação por modificação covalente. A concentração enzimática também pode variar conforme a oferta do substrato; alteração mediada através de hormônios.
3. Hormônios são sinais químicos que permitem a comunicação entre células. São sintetizados em células glandulares para atingir células alvo através da circulação sanguínea. As células alvo respondem a hormônios específicos por possuírem os respectivos receptores hormonais. A ligação do hormônio ao receptor segue uma reação de equilíbrio semelhante à interação enzima-substrato: $H + R \rightarrow [RH]$; a constante de dissociação de RH (K_D), correspondente à reação inversa é muito baixa - (10^{-12} a 10^{-9} M) - devido à alta afinidade entre hormônio e receptor.
4. Uma parte importante dos receptores hormonais são proteínas integrais de membrana, muitas das quais tem, atualmente, sua estrutura primária conhecida e sua estrutura tridimensional modelada, em consequência da clonagem e seqüenciamento dos seus respectivos genes. Por exemplo, o receptor β -adrenérgico do hormônio adrenalina, encontrado em hepatócito e outros tipos celulares, possui um peso molecular de 64 kD, compreendendo uma única cadeia peptídica que, de maneira serpentiforme, atravessa a membrana 7 vezes, deixando do lado extracelular, a extremidade N-terminal e 3 alças, e do lado intracelular, outras 3 alças mais a extremidade C-terminal. A porção extracelular do receptor contém o sítio de ligação da adrenalina, enquanto a porção intracelular se associa a um trímero de proteínas conhecidas como proteína-G, por ter um sítio específico para ligação do nucleotídeo GTP. São hoje conhecidos mais de 1000 receptores, de múltiplos hormônios, com esta estrutura básica formando a superfamília chamada dos receptores associados a proteína-G. A função deste receptor é transduzir o sinal "adrenalina" de fora para dentro da célula, processo que é mediado pelas proteínas-G. Há também receptores presentes no citoplasma nuclear e citoplasmático e neste caso, o hormônio precisa ter alta solubilidade a lipídeos, atravessando a membrana plasmática como os hormônios esteróides para encontrar o seu receptor dentro da célula.
5. Os hormônios estão envolvidos no metabolismo em dois níveis: indução ou repressão gênica de determinadas enzimas ou através da modificação covalente: A fosforilação é mediada pelas

proteínas quinases que transferem o grupo fosfato do ATP para resíduos específicos de serina, treonina e tirosina, formando uma ligação éster fosfórico ou a retirada do grupo fosfato é catalisada pela ação de fosfoproteínas fosfatases através da hidrólise.

6. A ligação de adrenalina ao receptor β -adrenérgico acoplado a proteína G ativa a enzima adenilato ciclase através da ativação da subunidade α (por ligação de GTP), presente na face interna da membrana citoplasmática, qual ativa a adenilato ciclase, catalisando a formação de cAMP a partir de ATP e desencadeando a transdução de sinal. A descoberta de cAMP, por Sutherland e colaboradores há cerca de 40 anos, levou à criação do conceito do segundo mensageiro da ação hormonal, sendo cAMP o primeiro a ser descrito, e permitiu dar início à progressiva compreensão dos mecanismos de ação do receptor de adrenalina. Devemos lembrar que os primeiros mensageiros químicos extracelulares são os hormônios. cAMP tem efeito transiente e é hidrolisada pela ação da fosfodiesterase. Na célula, o balanço entre as reações de síntese (a) e degradação (b) regula a concentração intracelular do cAMP.
 - a) $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{cAMP} + 2 \text{P}_i$; catalisada pela adenilato ciclase
 - b) $\text{cAMP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{AMP}$; catalisada pela fosfodiesterase.
7. A base da ação metabólica do cAMP é a ativação alostérica de uma quinase cujos substratos são proteínas, sendo conhecida como proteína quinase dependente de cAMP, ou simplesmente PKA (*Protein Kinase dependent on cAMP*). A PKA, uma vez ativada, catalisa a fosforilação ativadora (modificação covalente) de uma cascata de proteínas quinases que terminam na fosforilação da fosforilase a e da sintase do glicogênio, causando, respectivamente, a ativação e a inativação dessas enzimas. O resultado final dessa seqüência de ativações enzimáticas, com alternância de regulação alostérica e modificação covalente, é a fosforólise do glicogênio liberando glicose-1P, comandada por sinais hormonais extracelulares.
8. Os efeitos de ativação ou não da via dependem do receptor ativado, no caso dos receptores α adrenérgicos, os efeitos de α_1 são mediados através dos íons cálcio e a ativação de α_2 leva a inibição da via de adenilato ciclase. Há casos aonde a proteína G é do tipo G_s sendo ativadora de adenilato ciclase e do tipo G_R inibindo a adenilato ciclase. Algumas toxinas podem ativar ou bloquear a via de transdução de sinal: toxina da cólera e a toxina da coqueluche.
9. Dois hormônios são os principais responsáveis pelo equilíbrio da concentração da glicose circulante: glucagon e insulina.
10. O glucagon é um hormônio que tem efeitos equivalentes aos da adrenalina no controle do metabolismo do glicogênio: possui um receptor da família dos receptores acoplados a proteína-G e ativa a cascata que se inicia com cAMP/PKA. Este é liberado em condições de hipoglicemia ativando processos degradativos para manutenção da glicemia sanguínea. A PKA (proteína quinase ativada por cAMP) fosforila a fosforilase quinase tornando-a ativa. A fosforilase quinase fosforila agora glicogênio fosforilase. A glicogênio fosforilase ativada (quando fosforilada, glicogênio fosforilase b \rightarrow a) catalisa a hidrólise de resíduos de glicose do glicogênio liberando grupos de glicose-1-fosfato. No mesmo tempo, a fosforilase quinase, ativada pela cascata do

receptor de glucagon-proteína-G, cAMP/PKA, fosforila a glicogênio sintase, a qual se torna inativa quando fosforilada (sintase I → sintase D).

11. A insulina tem efeito oposto, promove a absorção de glicose pelo fígado e músculos e usa deposição nas reservas de glicogênio. Mas é importante notar que a insulina tem mecanismos de ação totalmente diferentes da adrenalina e do glucagon. Os receptores de insulina não pertencem à família dos receptores acoplados a proteína-G e não têm ação sobre a adenilato ciclase. Seus receptores são do grupo de receptores cujo domínio intracelular apresenta atividade intrínseca de proteína-quinase de tirosina. A insulina estimula fosfoproteínas fosfatases. Para reverter a ação do glucagon, a insulina promove a ativação da fosfoproteína fosfatase que catalisa a desfosforilação da glicogênio fosforilase e da glicogênio sintase, levando a inativação da primeira (fosforilase a → b) e ativação da segunda (sintase D → sintase I). Desta forma o fluxo glicose→glicogênio é favorecido. O transporte da glicose no interior das células com a atuação da insulina é um processo passivo mediado por uma família de permeases denominadas GLUT (**glucose transporter**).
12. Respostas celulares rápidas desencadeadas por hormônios só podem ser obtidas através da ativação, ou da inibição, de enzimas pré-existentes. Hormônios esteróides (por exemplo cortisol) quando secretados difundem-se pela membrana citoplasmática e ligam-se ao seus receptores intracelulares os quais, quando ativados, promovem no núcleo a regulação do metabolismo pela indução da transcrição de genes que codificam enzimas específicas, levando à síntese de novo das proteínas correspondentes, fenômeno conhecido como indução enzimática. Mas o mecanismo de indução enzimática desencadeado por hormônios resulta necessariamente numa resposta celular lenta, uma vez que os RNAs mensageiros (mRNAs) precisam ser transcritos, processados, transportados para o citoplasma e finalmente traduzidos para produzir as proteínas enzimáticas exigidas.
13. A adrenalina estimula uma resposta local no músculo. A liberação de adrenalina é induzida por estímulo nervoso autônomo em situações de perigo, exercício físico, e hipoglicemia e induz a degradação do glicogênio com os fins de fornecer glicose-1-fosfato como fonte de energia para atividades musculares que permitem ao animal reagir a estas situações.
14. Regulação da glicólise e gliconeogênese. A glicólise é uma das vias metabólicas principais para o fornecimento de energia. No fígado, encontra-se também a gliconeogênese, a qual é, de forma geral, uma via antagônica da glicólise. A regulação das duas vias é feita de forma recíproca, isto é, quando uma delas está ativa, a outra está inibida. Há três vias sob controle metabólico: as conversões reversíveis de: (i) glicose para glicose-6-fosfato (hexoquinase e glicose-6-fosfatase); (ii) frutose-6-fosfato e frutose-1,6-bisfosfato (fosfofrutoquinase e frutose-1,6-bisfosfatase; e (iii) fosfoenolpiruvato e piruvato (piruvato quinase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase, piruvato carboxilase). A fosfofrutoquinase é o principal ponto de regulação da glicólise. AMP e frutose-

2,6-bisfosfato agem como efetadores alostéricos positivos. A formação de frutose-2,6-bisfosfato está sob controle hormonal. Em condições de hipoglicemia, o glucagon estimula a produção de cAMP no fígado. Isso ativa a PKA a fosforilar e inativar a fosfofrutoquinase e ativar a frutose-bisfosfatase-2, diminuindo a concentração de frutose-2,6-bisfosfatase. Como resultado, o equilíbrio entre as reações de fosfofrutoquinase é alterado, em favor da síntese de frutose-6-fosfato, aumentando o fluxo gliconeogênico e a síntese de glicose-6-fosfato. Ao contrário, em condições de hiperglicemia, as concentrações de cAMP diminuíram, e o conseqüente aumento de frutose-2,6-bisfosfato ativa a fosfofrutoquinase e promove a glicólise.

Exercícios do módulo 18

- 1) Os hormônios podem ser de natureza química muito diferente, por exemplo, adrenalina, uma catecolamina, e glucagon, um peptídeo. Apesar disso, desencadeiam o mesmo processo metabólico no fígado, isto é, mobilização de glicose da reserva de glicogênio. Se um hormônio é um sinal químico, como é possível que substâncias quimicamente tão diferentes transmitam a mesma sinalização metabólica para o hepatócito?
- 2) O sinal hormonal, por exemplo, da adrenalina no hepatócito, é rapidamente decodificado e amplificado numa cascata que alterna ativações alostéricas e reações enzimáticas. Mostre quais são os fundamentos desse processo que garantem essa rapidez e amplificação.
- 3) As vias metabólicas clássicas como, por exemplo, a glicólise e a via de biossíntese de ácidos graxos, cuidam da grande massa do trabalho metabólico, como, respectivamente, produção e armazenamento de energia. Há, no entanto, vias ou circuitos, quantitativamente insignificantes, mas fundamentais, para o controle das vias metabólicas massivas. Os circuitos, ou vias regulatórias, acionados pelos hormônios pertencem a este grupo. Que circuito regulatório permite à adrenalina promover a glicólise no músculo e a gliconeogênese no fígado?
- 4) O nível de glicose no sangue após um período de jejum é de aproximadamente 0,8 mg/ml (4 mM). Depois da ingestão de alimentos, o nível de glicose passa a ser de aproximadamente 1,2 mg/ml (6 mM). Explique porque os níveis de glicose variam tão pouco em situações alimentares tão diferentes. Como esses níveis são controlados?
- 5) A indução enzimática é uma importante forma de adaptação do hepatócito às necessidades metabólicas do organismo, mas não serve para respostas ultra-rápidas como a mobilização de glicose da reserva de glicogênio. Explique porquê.
- 6) A concentração de ATP na célula está em torno de 5 mM. A quantidade total de ATP é pequena e é fonte primária de energia para o funcionamento celular. Por outro lado, o ATP é também o

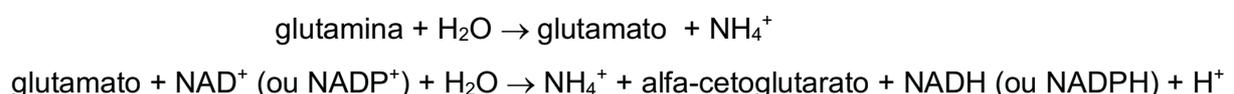
reagente que permite gerar cAMP, um dos mais importantes sinais químicos intracelulares de regulação metabólica. Além disso, cabe lembrar que todos os efeitos regulatórios do cAMP decorrem da ativação da enzima quinase de proteína dependente de cAMP, conhecida como PKA. Tendo em conta todos estes fatos conhecidos, qual deve ser a ordem de grandeza da constante de ativação (K_a , semelhante a K_m) de PKA por cAMP? Justifique sua resposta.

MÓDULO 19: METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS E CICLO DA UREIA

1. Em animais, o N do grupo amino dos aminoácidos são eficientemente obtidos a partir de NH_4^+ pelas reações catalisadas pelas enzimas desidrogenase glutâmica e glutamina sintetase, fornecendo, respectivamente, glutamato e glutamina.
2. Ainda em animais de forma geral, os aminoácidos alanina e aspartato podem ser obtidos a partir de, respectivamente, piruvato e oxalacetato, através da reação de transaminação tendo glutamato como doador de grupo amino. Outros aminoácidos exigem reações adicionais, além da transaminação para sua síntese final. Mas, como regra, os esqueletos de C dos aminoácidos são obtidos a partir dos intermediários da glicólise, do ciclo de Krebs e do ciclo das pentoses.
3. Há, no entanto, aminoácidos que não podem ser sintetizados por animais devido a falta do precursor que fornece o esqueleto de C. Estes são ditos aminoácidos essenciais e tem que ser obtidos na dieta. Por exemplo, humanos tem que conseguir da dieta 9 aminoácidos essenciais.
4. Triglicerídeos e glicogênio são compostos de reserva, mobilizados quando há necessidade de energia. Em animais, não existem espécies de proteína com funções de reserva energética, mas no jejum prolongado proteínas são hidrolisadas para liberar aminoácidos que serão catabolisados para produção de energia. O fígado é o centro de catabolização de aminoácidos.
5. O catabolismo de aminoácidos envolve a eliminação de N na forma de NH_4^+ e a transformação dos esqueletos de C em intermediários da glicólise e do ciclo de Krebs.
6. Duas reações principais permitem a eliminação do amino grupo. Diversos aminoácidos podem transferir o grupo amino para o alfa-cetoglutarato numa reação catalisada por transaminases:



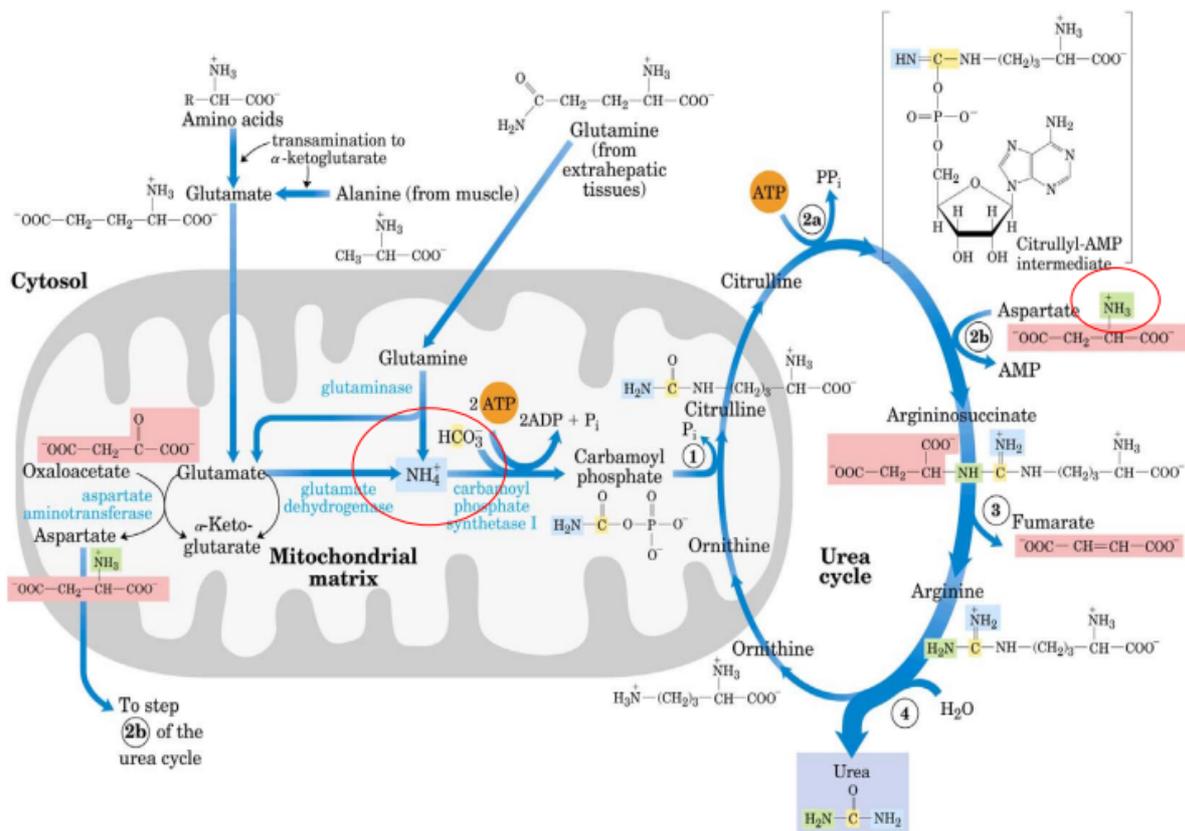
Por outro lado, glutamina e glutamato podem ser desaminados em reações catalisadas pela glutaminase e desidrogenase glutâmica, respectivamente:



O cátion amônio é tóxico, sendo utilizado para a síntese de glutamina ou convertido em uréia no ciclo correspondente, para fins de excreção.

8. Aminoácidos como alanina, aspartato e glutamato são ditos glicogênicos porque podem ser convertidos em, respectivamente, piruvato, oxalacetato e alfa-cetoglutarato, que, por sua vez, podem ser transformados em fosfoenolpiruvato para síntese de glicose. Já os aminoácidos leucina e lisina são chamados cetogênicos por produzirem exclusivamente acetilCoA como produto de degradação, portanto servindo à síntese de corpos cetônicos, mas não de glicose.

9.



Exercícios do módulo 19

- 1) Como é a reação de transaminação e qual a sua importância para o metabolismo de aminoácidos?
- 2) A amônia pode ser tóxica para a mitocôndria hepática? Como se explica bioquimicamente esta toxidez? Que reações e respectivas enzimas protegem a mitocôndria da toxidez de amônia?
- 3) Uma das duas principais reações de entrada de NH_3 no metabolismo é a reação catalisada pela glutamina sintetase. Mostre a equação dessa reação. Qual a importância da glutamina para o metabolismo? Dê exemplos.

- 4) O que são aminoácidos glicogênicos e cetogênicos? Dê exemplos e explique mostrando as reações relevantes do metabolismo.
- 5) Humanos sintetizam parte dos aminoácidos que precisam, o restante é obtido da dieta e por isso, chamados essenciais. Mostre, com as reações pertinentes, porque e como alguns aminoácidos são sintetizados por humanos e qual a limitação que impede a síntese dos essenciais.
- 6) Animais em geral não possuem reservas na forma de proteínas ou qualquer outra macromolécula nitrogenada. Quais as consequências desse fato para o balanço de nitrogênio nesses organismos em condições de alimentação abundante e de jejum acentuado?

MÓDULO 20 – INTEGRAÇÃO DO METABOLISMO

1. Toda e qualquer comunicação dentro do nosso organismo deve ocorrer através do sistema nervoso ou sistema endócrino. Ao sistema endócrino pertencem todas as glândulas que secretam hormônio.

2. Hormônios

Definição: Toda substância química (mensageiro) produzida em um tecido específico (glândula) onde ele é secretado para agir em uma célula alvo.

•Características:

–Coordenação do metabolismo nos órgãos separados dos mamíferos é alcançada por uma sinalização hormonal e neuronal (células endócrinas secretam hormônios e neurônios secretam neurotransmissores);

–Meia vida curta;

–Baixas concentrações no sangue;

–Produzem respostas fisiológicas e bioquímicas

–Possuem ação lenta (expressão gênica) e ação rápida (ação na atividade de uma ou mais enzima –mecanismo alostérico (retroalimentação) ou modificação covalente.

Exemplos de hormônios peptídicos ou protéicos = glucagon e insulina

Esses hormônios agem especialmente no fígado, músculo e tecido adiposo para manter o nível da glicose sanguínea ajustado.

3. INSULINA

A insulina avisa os tecidos: fígado, músculo e adiposo que a concentração de glicose sanguínea é maior que a necessária, isto resulta na captação do excesso de glicose presente no sangue pelas células e sua conversão em composto de armazenamento: GLICOGÊNIO E Triacilgliceróis (TAGs).

Quando o nível de glicose no sangue está alta, o metabolismo ativo da glicose nas células β aumenta a concentração intracelular de ATP, provocando o fechamento dos canais de K^+ presentes na membrana plasmática e a consequente despolarização da membrana. Em resposta a essa mudança no potencial de membrana, os canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem na membrana plasmática abrem-se, permitindo que o Ca^{2+} entre dentro da célula, isto eleva a concentração citosólica de Ca^{2+} o suficiente para acionar a liberação da insulina por exocitose.

Imediatamente após uma refeição rica em calorias, glicose, ácidos graxos e aminoácidos chegam ao fígado. A insulina liberada em resposta à alta concentração da glicose no sangue estimula a captação dela pelos tecidos. Alguma glicose é exportada para o cérebro para suprir suas necessidades de energia, e uma parte da glicose vai para os tecidos muscular e adiposo. No fígado, a glicose em excesso é oxidada até acetil-CoA, que é empregado na síntese ácidos graxo para a exportação para o tecido muscular e adiposo, na forma de TAGs integrando VLDL. O NADPH necessário para a biossíntese desses lipídios é, obtida pela oxidação de parte da glicose disponível na via das pentoses fosfato. Os aminoácidos em excesso são convertidos em piruvato e acetil-CoA, que também será empregado na síntese de lipídios. As gorduras da dieta são transportadas pelo sistema linfático, na forma de quilomícrons, do intestino até os tecidos muscular e adiposo.

A insulina estimula a captação da glicose pelos tecidos aumentando o transportador GLUT4, nos quais a glicose é convertida em glicose 6-fosfato pela hexoquinase no músculo e glicocinase no fígado, primeira enzima da via glicolítica (reação irreversível).

No fígado, a insulina também ativa a glicogênio sintase e inativa a glicogênio fosforilase, de forma que a maior parte da glicose 6-fosfato seja canalizada para glicogênio.

4. GLUCAGON

O glucagon inibe a degradação da glicose pela glicólise no fígado e estimula a síntese de glicose pelo gliconeogênese. Ambos os efeitos resultam da diminuição do nível de frutose 2,6 bisfosfato, um inibidor alostérico da enzima gliconeogênica: a frutose 1,6 bisfosfato e um ativador da fosfofrutoquinase-1. Lembre-se que a concentração da frutose 2,6 bisfosfato é, em última instância controlada pela reação da fosforilação de proteínas dependentes do AMPc

Ao contrário do que acontece quando os níveis de insulina estão altos, o glucagon favorece a formação de glicose no fígado aumentando a atividade da glicogênio fosforilase e inativando a glicogênio sintase.

O glucagon induz um aumento na concentração de glicose sanguínea de várias maneiras. Da mesma forma que a epinefrina age no músculo, o glucagon estimula a degradação de glicogênio

hepático ativando a glicogênio fosforilase e inativando a glicogênio sintase, ambos os efeitos são resultado da fosforilação de enzimas reguladas, desencadeada pelo AMPc. * A glicogênio sintase está inativa quando fosforilada.

5. No metabolismo absorptivo prevalece a ação da insulina. Síntese de compostos de reserva: GLICOGÊNIO e TAGs.

Nas primeiras poucas horas de uma refeição, a concentração de glicose no sangue diminui levemente e os tecidos recebem glicose liberada pela degradação do glicogênio hepático. A síntese de lipídios é pequena ou não ocorre. Ocorre a degradação dos TAGs nos adipócitos e degradação de glicogênio no fígado para suprir necessidade energética cerebral e no músculo para sua própria utilização. No fígado também ocorre a gliconeogênese a partir da degradação de proteínas não-essenciais e do glicerol dos TAGs.

Eventualmente, o uso de intermediários do ciclo de Krebs na gliconeogênese esgota o oxaloacetato, impedindo a entrada da acetil-CoA no ciclo. O acetil-CoA produzido pela oxidação do ácido graxo acumula-se favorecendo a formação de acetoacetil-CoA e corpos cetônicos no fígado. Depois de alguns dias de jejum, os níveis de corpos cetônicos no sangue se elevam à medida que estes combustíveis são exportados do fígado para o coração, músculo esquelético e cérebro, que os usam no lugar da glicose.

Diabetes melito: Os indivíduos com qualquer um dos tipos de diabetes são incapazes de captar eficientemente a glicose do sangue, por isso o metabolismo se assemelha ao de um jejum prolongado.

Exercícios do módulo 20

1) Verificar quais das afirmações abaixo são verdadeiras e quais são falsas quando referentes a um portador de diabetes tipo I, não tratado. Critique a justificativa, verificando se a explicação é correta.

1a. O tecido muscular realiza beta-oxidação porque o nível de triacilglicerol plasmático está elevado.

1b. O nível de triacilglicerol plasmático está elevado porque a lipase dos adipócitos está na forma ativa.

1c. O paciente vai ganhar peso porque sua glicemia permanece alta.

1d. Haverá intensificação do ciclo de Krebs, no tecido muscular, porque a glicemia está elevada.

1e. A produção dos corpos cetônicos intensifica-se nos períodos de jejum prolongado porque há necessidade de fornecer estes compostos para o cérebro.

2) Descrever as alterações metabólicas decorrentes da falta de insulina (diabetes).

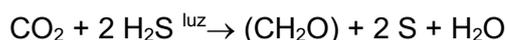
3) Descreva ação dos hormônios peptídicos no período pós-absortivo.

1. A fotossíntese é o processo pelo qual a energia luminosa é transformada em energia química e poder redutor, armazenada nas moléculas de ATP e NADH + H⁺. Num segundo passo fase escura (na verdade, fase independente de luz) a energia armazenada é utilizada para síntese de glicose a partir de CO₂ + H₂O. A fotossíntese ocorre nos cloroplastos, uma organela que, como a mitocôndria, possui uma membrana externa altamente permeável e uma membrana interna praticamente impermeável, separadas por um espaço intermembranar.

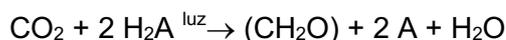
A equação geral da fotossíntese é:



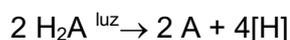
3. As reações dependentes de luz ocorrem na membrana tilacóide e envolvem processos semelhantes ao transporte de elétrons e fosforilação oxidativa da mitocôndria. As reações independentes de luz ocorrem no estroma.
4. Os primeiros estudos de fotossíntese realizados levaram à conclusão de que CO₂ era a fonte do O₂ gerado na fotossíntese. Em 1931, entretanto, demonstrou-se que bactérias fotossintetizantes anaeróbicas, sintetizam glicose a partir de CO₂, sem gerar O₂:



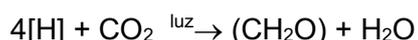
5. A reação geral da fotossíntese pode ser demonstrada como segue:



Em cianobactérias, H₂A é H₂S, e em plantas, H₂O. Isso sugere que a fotossíntese seja um processo de duas fases, nos quais a energia solar é utilizada para oxidar H₂A (fase clara):



e o agente redutor resultante [H] subsequentemente reduz CO₂ (fase escura):



6. O principal fotorreceptor na fotossíntese é a clorofila. A luz absorvida pelas clorofilas antena e pigmentos acessórios é transferida para centros de reação fotossintéticos, onde ocorrem as principais reações da fotossíntese.
7. Plantas e cianobactérias utilizam o poder redutor gerado pela oxidação de H₂O dirigida pela luz para produzir NADPH.
8. A produção de O₂ na fotossíntese requer 2 fotossistemas: **Fotossistema I** (P700) gera um forte agente redutor, capaz de reduzir NADP⁺, e concomitantemente, um oxidante fraco; **Fotossistema II** (P680) gera um forte agente oxidante, capaz de oxidar H₂O, e concomitantemente, um redutor fraco. O redutor fraco reduz o oxidante fraco. Assim, fotossistemas I e II precisam funcionar em série para acoplar a oxidação da H₂O com a redução de NADP⁺ (transferência de elétrons de H₂O para NADP⁺, formando O₂ e NADPH + H⁺).
9. Quando iluminado, o FS II passa para uma forma excitada e perde elétrons, os quais são transportados por reações de óxido-redução para o fotossistema I. O PS I iluminado fornece elétrons para a redução de NADP⁺. Como resultado temos a oxidação do FS II e a redução do

FS I. A reposição de elétrons em PS II é feita por elétrons provenientes da oxidação de água e, em PSI, por elétrons emitidos por PSII.

10. Os componentes envolvidos no transporte de elétrons de H_2O para $NADP^+$ com produção de $NADPH + H^+$ estão organizados em três partículas, que estão ligadas a membrana tilacóide: (1) fotossistema II; (2) complexo do citocromo b_6f ; (3) fotossistema I (fotofosforilação não-cíclica).
11. Os cloroplastos geram ATP de maneira muito semelhante à da mitocôndria, ou seja, através do acoplamento da dissipação de um gradiente de prótons à síntese de ATP.
12. Na fotofosforilação cíclica, os elétrons emitidos por P700 (PSI) são transferidos ao complexo citocromo b_6f , retornando finalmente a P700. Não há síntese de $NADPH + H^+$, nem liberação de oxigênio.
13. Na fase clara da fotossíntese, ATP e $NADPH + H^+$ são sintetizados, e esses são utilizados na fase escura para a síntese de carboidratos. A via pela qual as plantas incorporam CO_2 em carboidratos é denominada de Ciclo de Calvin.
14. O ciclo de Calvin engloba duas fases: (1) a fase de produção, na qual 3 moléculas de ribulose-5-fosfato reagem com 3 moléculas de CO_2 , gerando 6 moléculas de gliceraldeído-3-fosfato, com o gasto de 9 ATPs e 6 $NADPH + H^+$; (2) a fase de recuperação, na qual os átomos de carbono de 5 gliceraldeído-3-fosfato entram em uma série de reações para dar origem a 3 ribulose-5-fosfato, com as quais o ciclo recomeça.

Exercícios do módulo 21

- 1) Porque as folhas das plantas são verdes? Explique em termos de composição e espectro de absorção dos pigmentos foliares.
- 2) Há muito tempo, foi observado que a eficiência da fotossíntese, medida em termos de O_2 produzido por energia luminosa absorvida, cai drasticamente quando uma fonte de luz monocromática alcança o comprimento de onda de 700 nm (queda no vermelho). Além disso, observou-se também que a aplicação concomitante de um feixe de luz de baixa intensidade e comprimento de onda de 650 nm complementava a luz vermelha de 700 nm, recuperando a eficiência fotossintética de liberar O_2 . Que importância teve no passado a descoberta deste fenômeno e qual a explicação atual para sua existência?
- 3) O que é fotofosforilação cíclica e no que difere da fotofosforilação não cíclica? Quando o $[NADPH + H^+ / NADP^+]$ é alto, a produção de O_2 durante fotofosforilação é suprimida. Explique o fenômeno considerando os papéis dos dois fotossistemas.
- 4) Porque a descoberta da reação de Hill, em 1939, deu apoio à hipótese anterior de Van Niel, propondo que o O_2 da fotossíntese vem da água?

- 5) Compare a fase clara da fotossíntese com o processo de respiração na mitocôndria, indicando diferenças e semelhanças.
- 6) Sabe-se que a produção de O_2 na fotossíntese requer o funcionamento de dois fotossistemas. Explique resumidamente como ocorre a interação entre os dois fotossistemas, incluindo doador e receptor de elétrons no processo.
- 7) Compare a fase clara da fotossíntese com o processo de respiração na mitocôndria, indicando diferenças e semelhanças.
- 8) Sabe-se que a produção de O_2 na fotossíntese requer o funcionamento de dois fotossistemas. Explique resumidamente como ocorre a interação entre os dois fotossistemas, incluindo doador e receptor de elétrons no processo.
- 9) Explique como algumas bactérias anaeróbicas podem realizar a fotossíntese.
- 10) Explique como organismos fotossintetizantes sintetizam carboidratos a partir de CO_2 e H_2O .
- 11) Explique a regulação do ciclo de Calvin, mencionando as enzimas-chave sujeitas a regulação e como as reações da fase controlam o processo da fixação de CO_2 .
- 12) Quando uma suspensão de algas verdes é iluminada na ausência de CO_2 e depois incubada no escuro com CO_2 radiomarcado [$^{14}CO_2$], o $^{14}CO_2$ é convertido em [^{14}C]-glicose por um curto tempo. Qual é o significado dessa observação e como ele está relacionado com as reações luminosas da fotossíntese? Por que cessa a conversão de $^{14}CO_2$ depois um curto intervalo de tempo?

MÓDULO 22: CICLO DO NITROGÊNIO

1. Os gases mais abundantes no ar atmosférico, O_2 e N_2 , são essenciais para a existência da vida biológica no planeta Terra, mas divergem quanto à reatividade química. O O_2 tem propriedades de radical livre reagindo com relativa facilidade, daí servir muito bem como oxidante final na respiração de todos os organismos. Já o N_2 possui uma tripla ligação altamente estável que lhe confere baixíssima reatividade química. Apesar disso, o N_2 gasoso da atmosfera é a fonte do elemento N que garante a vida na Terra. Por essas razões físico-químicas a redução do N_2 atmosférico pelos sistemas biológicos tem características muito peculiares.

2. A redução química do N_2 a NH_3 exige condições drásticas, 500 graus Celsius de temperatura e 300 atm de pressão, certamente incompatíveis com a vida biológica. Mas bactérias especializadas do gênero *Rhizobium*, que são simbiotes de plantas leguminosas, reduzem eficientemente N_2 a NH_4^+ , uma espécie química totalmente compatível com o metabolismo de todos os organismos. Portanto, o N_2 fixado por essa simbiose entre planta e bactéria garante a disponibilidade do elemento N para todas as formas de vida terrestre. As bactérias fixadoras de N_2 possuem um complexo enzimático singular, a nitrogenase. A reação de redução do N_2 a NH_4^+ (fixação de nitrogênio), qual envolve um redutor poderoso a grande investimento de energia na forma de ATP, é catalisado pela nitrogenase, qual usa $NADPH + H^+$ como doador de elétrons:



3. A volatilidade do NH_4^+ ($NH_3 + H^+$) não favorece sua permanência no solo, mas existem bactérias autotróficas de vida livre, muito abundantes e largamente disseminadas, que são especializadas na oxidação do cátion amônio a nitrito e nitrato para fins de obtenção de energia metabólica. Desta maneira o elemento N é estavelmente depositado no solo na forma de espécies químicas, sais de nitrito e nitrato, que são eficientemente absorvidas pelas raízes das plantas e prontamente reduzidas a NH_4^+ no interior da célula vegetal.

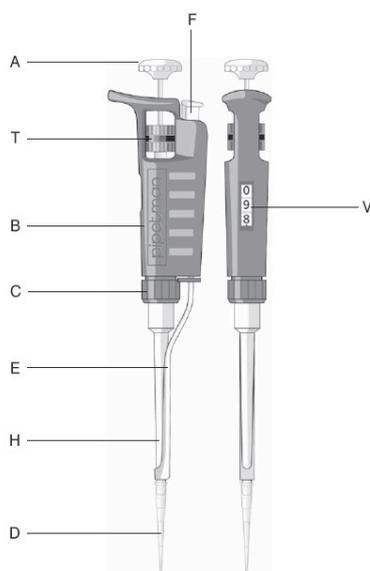
As etapas sumariamente mencionadas compreendem o ciclo do nitrogênio na natureza: a) redução do N_2 a NH_4^+ ; b) oxidação de NH_4^+ a nitrito e nitrato; c) redução de nitrito e nitrato a NH_4^+ e d) transformação do elemento N de inorgânico para orgânico com a síntese de aminoácidos a partir de NH_4^+ , reação possível em todas as formas de organismos biológicos.

Exercícios do módulo 22

- 1) CO_2 e N_2 existem na atmosfera e são fontes dos elementos C e N para os seres vivos. CO_2 é eficientemente fixado pelas plantas em geral através da fotossíntese. N_2 por outro lado, apesar de extremamente abundante, 70 a 80% do ar, não é fixado pela grande maioria das plantas, que necessitam espécies reduzidas ou oxidadas de N_2 para a síntese de compostos nitrogenados. Somente algumas poucas formas de bactérias têm a capacidade de fixação de N_2 . Compare o processo de fixação de CO_2 com o de fixação de N_2 , e procure mostrar porque as plantas fixam muito bem CO_2 , mas não N_2 .
- 2) Equacione a reação da nitrogenase e mostre aonde ocorre.
- 3) Qual é a função de compostos nitrogenados na respiração anaeróbica? Descreva a respiração anaeróbica identificando doadores e aceptores de elétrons?

- 4) Certas bactérias oxidam NH_3 a nitritos e nitratos, enquanto plantas e bactérias em geral reduzem nitritos e nitratos a NH_3 . Qual a função da redução de nitritos e nitratos na vida desses organismos?
- 5) Cianobactérias conseguem fazer fotossíntese e fixação de nitrogênio no mesmo tempo. Explique como isso ocorre.
- 6) Compare as vias de assimilação de amônia em organismos ricos e deficientes em nitrogênio.

DESCRIÇÃO



- A) Botão com código de cores
- B) Corpo da pipeta ou handle
- C) Porca de conexão
- D) Ponteira Diamond
- E) Ejetor de ponteiros
- F) Botão de ejeção
- H) Porta-cone
- T) Tambor de ajuste do volume
- V) Volúmetro

AJUSTE DO VOLUME

O volúmetro é formado por três dígitos indicadores que são usados para ajustar o volume de líquido a ser transferido. São lidos desde o alto (dígito mais significativo) até a base (dígito menos significativo). Um marcador (ponta de seta) é usado para ajustar o volume exato ou intermediário contra a escala dos indicadores da base. Os dígitos possuem as cores preta ou vermelha para indicar a posição do ponto decimal, de acordo com o modelo.

O volume é ajustado girando-se o tambor de ajuste do volume (T) ou o botão da pipeta (A). O botão da pipeta é a maneira mais fácil e rápida de acertar o volume, especialmente quando o operador estiver usando luvas. O tambor de ajuste deve ser utilizado para se alcançar lentamente o volume desejado. Para obter máxima exatidão no ajuste do volume, siga as recomendações abaixo:

- Quando diminuir o volume, cuidadosamente chegue ao valor desejado e não ultrapasse a marca.
- Quando aumentar o volume, ultrapasse o valor desejado 1/3 de volta e depois, cuidadosamente, diminua o volume até chegar ao desejado, não ultrapassando a marca.



Modelo	Cor dos números do volúmetro	
	Preto	Vermelho
P2 a P200	μl	0.1 μl e 0.01 μl
P1000, P5000	0.1 ml e 0.01 ml	ml
P10ml	ml	0.1 ml

Exemplo para cada modelo:

P2	P10	P20	P100
1	0	1	0
2	7	2	7
5	5	5	5
1,25 μl	7,5 μl	12,5 μl	75 μl

P200	P1000	P5000	P10 ml
1	0	1	0
2	7	2	7
5	5	5	5
125 μl	0,75 ml	1,25 ml	7,5 ml

TÉCNICAS DE PIPETAGEM

Pré rinse a ponteira

Quando uma nova ponteira é colocada (ou aumenta-se o volume a ser aspirado), é necessário pré-rinsar a ponteira. Para isso, basta aspirar e dispensar o líquido algumas vezes.

A ação de pré-rinsar a nova ponteira garante a exatidão e precisão do volume a ser posteriormente transferido. Isto porque quando se aspira um líquido, forma-se um filme na parede interna da ponteira. A natureza desse filme, que é o causador de erro na primeira medida, depende do líquido a ser transferido. Entretanto, este filme se mantém relativamente constante após algumas pipetagens com a mesma ponteira. É preciso pré-rinsar a ponteira para maximizar o desempenho da pipeta.

Encaixe da ponteira Diamond Gilson

Ponteiras plásticas devem ser utilizadas uma única vez - não devem ser lavadas ou reutilizadas. Empurre o porta-cone contra a ponteira fazendo um movimento de rotação, a fim de garantir o encaixe perfeito e o bloqueio contra entrada de ar.

Aspire

Pressione o botão até o primeiro estágio (que corresponde ao volume de líquido selecionado). Segure a pipeta verticalmente e mergulhe a ponteira no líquido. A profundidade de imersão da ponteira varia de acordo com o modelo da pipeta

Solte o botão de modo lento e constante para aspirar o volume selecionado;

Espere alguns segundos e retire a ponteira do líquido;

Se houver gotículas do líquido do lado de fora da ponteira, limpe-as usando papel macio e limpo, porém não toque no orifício da ponteira.

Dispense

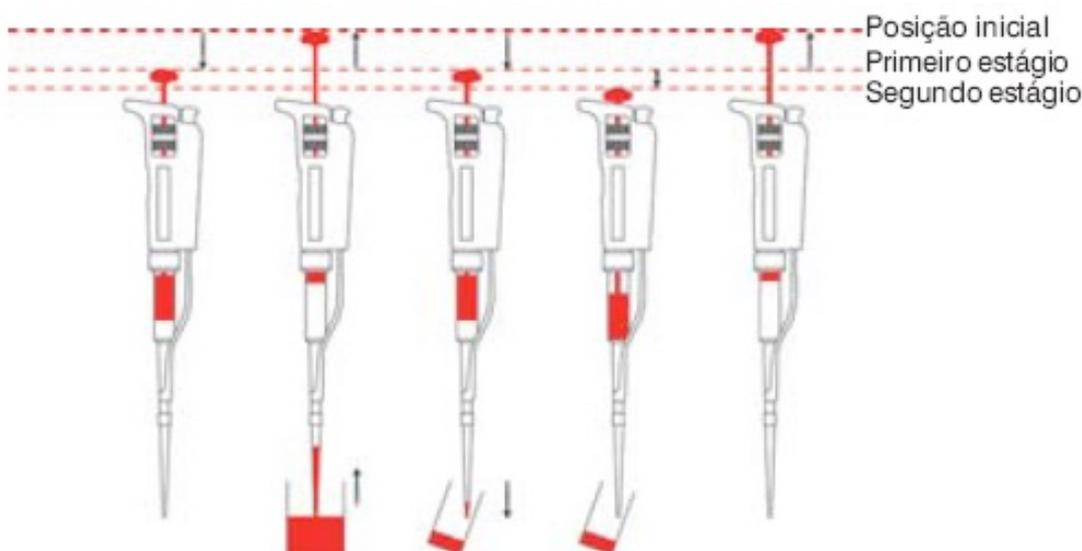
Encoste a ponta da ponteira na parede interna do recipiente e incline a pipeta aproximadamente de 10 a 40°C;

Pressione o botão até o primeiro estágio de forma lenta e constante;

Ao final, aguarde pelo menos um segundo; então pressione o botão até o segundo estágio (purga) para eliminar possíveis gotículas que permaneceram na ponteira;

Mantenha o botão pressionado até o final e retire a ponteira de dentro do recipiente mantendo-a em contato com a parede do mesmo ("arranhar" a ponta da ponteira na parede do recipiente);

Solte o botão suavemente.



Fonte: <http://www.analiticaweb.com.br/>

I. FUNDAMENTOS

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).

Fotometria é uma técnica de análise quantitativa que envolve a medida de intensidade de absorção de luz monocromática de um composto químico em solução.

Serve para identificar o comprimento de onda característico para cada composto e para quantificação do composto através de 1) absorção direta e 2) através de método colorimétrico. Essa intensidade de absorção depende:

- 1) do comprimento de onda escolhido (normalmente usa o $\lambda_{\text{máx}}$ - onde o composto absorve mais luz),
- 2) do percurso que o feixe de luz percorrerá na solução e
- 3) da concentração do composto nessa solução.

A lei de Lambert-Beer estabelece que a absorbância é diretamente proporcional à concentração da espécie absorvente. A fração de luz que passa por uma amostra (a transmitância = I_t/I_0) está relacionada logaritmicamente, e não linearmente, com a concentração da amostra (figura 1).

A lei de Lambert-Beer relaciona esses três fatores e estabelece que:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

onde:

A = absorbância é definida pela reação seguinte: **A = - log I_t/I_0** , que por ser uma razão, não possui unidade (I_0 é intensidade de luz incidente; I_t é intensidade de luz transmitida);

ϵ = absortividade molar (característico de cada substância), em $L \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$;

l = caminho óptico (percurso da luz monocromática na solução), em cm;

c = concentração da substância em mol/L.

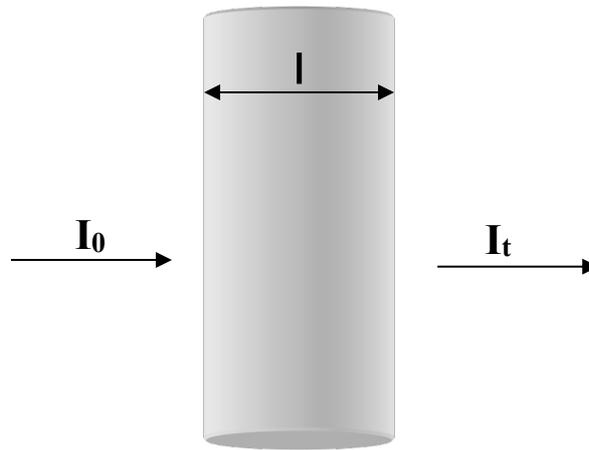
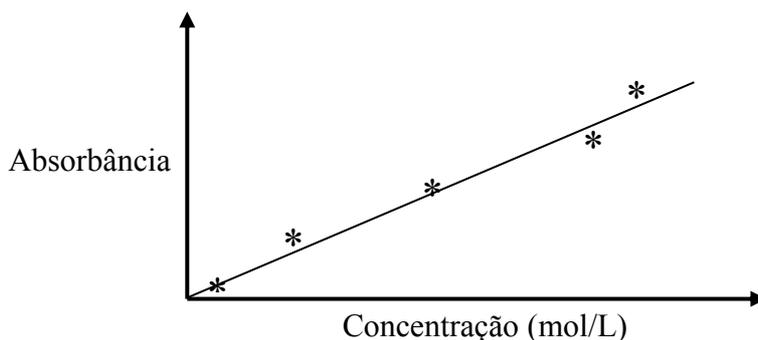


Figura 1 – I_0 é intensidade de luz incidente; I_t é intensidade de luz transmitida após percorrer o caminho óptico (l) pela solução da amostra.

Desta forma, mantendo-se o caminho óptico constante, a absorvância torna-se diretamente proporcional à concentração da substância no respectivo $\lambda_{\text{máx}}$.

Nestas condições, podemos utilizar uma solução de concentração conhecida do composto a ser analisado (ou outra substância de características químicas semelhantes) para construir um diagrama de absorvância em função da concentração da substância em questão. Com este diagrama, denominada curva padrão, podemos medir a quantidade do composto em amostras de concentração desconhecida, pela simples medida de suas absorvâncias desde que, estas estejam nas mesmas condições utilizadas para a construção da curva padrão (mesmos reagentes, mesma temperatura, etc).

Um exemplo de uma curva padrão:



Um dos métodos utilizados para dosagem de proteína é chamado de método do Biureto. Esse método faz uso da propriedade de íons Cu^{2+} em meio alcalino de formar ligações com o nitrogênio das ligações peptídicas. Desta reação (reação de biureto) resulta uma coloração púrpura intensa. Este fato pode ser explorado para se determinar por colorimetria a quantidade de proteína de uma solução. A cor desenvolvida numa reação de íons de Cu^{2+} em meio alcalino com estas

proteínas deve-se exclusivamente às ligações peptídicas e a sua intensidade é proporcional a quantidade de tais ligações. A absorbância é detectada no espectrofotômetro (figura 2).

Um outro método para determinar a quantidade de proteína é baseado no fato que certos aminoácidos possuem anéis aromáticos o que os leva a absorver em comprimentos de onda específicos na região de UV. Bases purínicas e pirimidínicas também possuem estas propriedades.

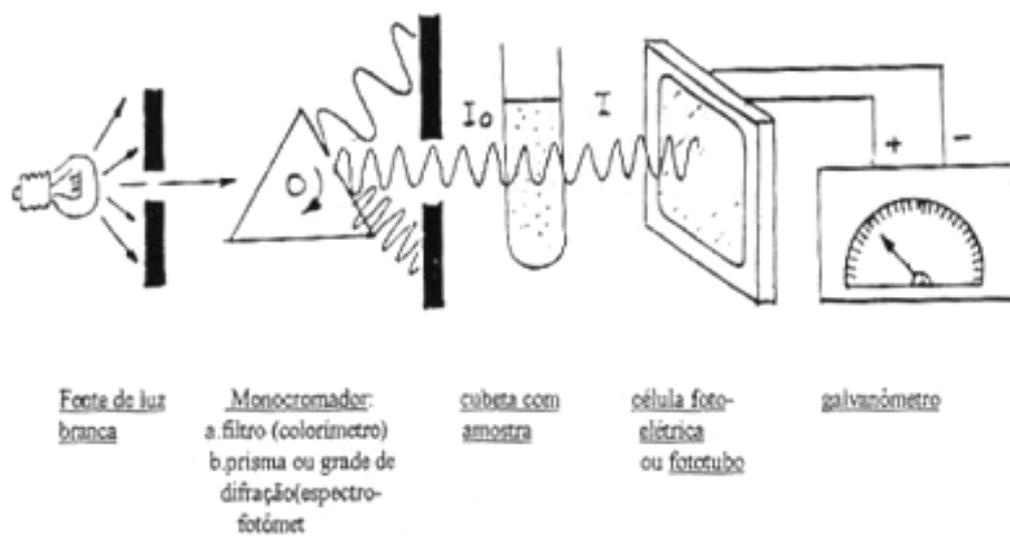


Figura 2 – Modelo de um espectrofotômetro.

II. OBJETIVOS

- 1) Determinação da concentração de uma proteína em solução aquosa por fotometria.
- 2) Determinação do espectro de absorção de luz de aminoácidos e bases purínicas e pirimidínicas.

III. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

- 1) **Determinação da concentração de uma proteína em solução aquosa por fotometria**
 - 1a) **Determinação do $\lambda_{\text{máx}}$ do produto da reação de biureto**

Adicionar no tubo 1:

- 1,0 mL de padrão de albumina (8 mg/mL),
- 0,5 mL de água,
- 2,5 mL de reagente de biureto.

Adicionar no tubo 2:

- 1,5 mL de água,
- 2,5 mL de reagente de biureto.

Após adição dos reagentes, agitar e incubar os tubos por 15 min a 37°C.

Transferir conteúdo dos tubos para cubetas do espectrofotômetro e ler as absorvâncias nos comprimentos de onda 400, 420, 450, 470, 500, 520, 550, 580, 600, 630, 650, 680 e 700 nm. Usar a solução de biureto como branco (tubo 2).

Com isso, você estará construindo a curva de absorvância em função do comprimento de onda. Estabelecer qual é o $\lambda_{\text{máx}}$ do produto da reação de biureto.

1b) Determinação da concentração de proteína

Preparar os tubos como descrito na tabela 1 utilizando uma solução de 8 mg/mL de albumina (proteína padrão) e a solução de proteína desconhecida. No tubo **branco** não deverá ser adicionada solução de proteína. A ordem de adição dos componentes da reação deve ser:

- primeiro solução de proteína,
- água,
- por último o reagente biureto.

Após adição do reagente, agitar e incubar os tubos por 15 min a 37°C.

Transferir o conteúdo dos tubos para cubetas do espectrofotômetro e ler as absorvâncias a 540 nm.

Utilizando a curva padrão (tubos de 1 a 5) e o valor medido de absorção a 540nm da amostra desconhecida, calcular a concentração de proteína nesta amostra.

Tabela 1 – Dados para a construção da curva padrão para determinação de concentração de proteínas.

tubos	Padrão de albumina (8mg/mL)	proteína desconhecida	água destilada	reagente biureto	concentração (mg/mL)	absorvância (540 nm)
branco	-	-	1,5 mL	2,5 mL		
1	0,1mL	-	1,4 mL	2,5 mL		
2	0,2mL	-	1,3 mL	2,5 mL		
3	0,4mL	-	1,1 mL	2,5 mL		
4	0,7mL	-	0,8 mL	2,5 mL		
5	1,0mL	-	0,5 mL	2,5 mL		
amostra desconhecida	-	1,0 mL	0,5 mL	2,5 mL		

2) Determinação do espectro de absorção de luz de aminoácidos e bases purínicas e pirimidínicas

2a) Determinação do $\lambda_{\text{máx}}$

Pipetar 1 mL de cada solução em uma cubeta de quartzo de espectrofotômetro:

- Leucina (0,2 mg/mL)
- Triptofano (0,004 mg/mL)
- Tirosina (0,1 mg/mL)
- Adenina (0,004 mg/mL)
- Timina (0,01 mg/mL)

Determinar nas diferentes soluções fornecidas:

- a) $\lambda_{\text{máx}}$,
- b) absorvância obtida em $\lambda_{\text{máx}}$,
- c) calcular ϵ de cada substância.

2b) Determinação da curva de absorvância x concentração

Para construção da curva de absorvância em diferentes concentrações de triptofano, pipetar os seguintes volumes e medir a absorvância em $\lambda_{\text{máx}}$. (tabela 2).

Tabela 2 – Absorvância em $\lambda_{\text{máx}}$ em diferentes concentrações de triptofano.

tubos	Triptofano (0,01 mg/mL)	água destilada	concentração (mg/mL)	absorvância obtida
branco	-	2,0 mL		
1	0,1 mL	1,9 mL		
2	0,2 mL	1,8 mL		
3	0,4 mL	1,6 mL		
4	0,7 mL	1,3 mL		

Fazer curva de absorvância x concentração e verificar se a mesma obedece a lei de Lambert-Beer.

IV. RELATÓRIO DE LABORATÓRIO 1

Além da apresentação e discussão dos dados obtidos no laboratório, o relatório deve incluir as seguintes questões respondidas:

1. De acordo com a lei de Lambert-Beer, qual a unidade de absorvância?
2. Na construção de uma curva padrão (absorvância por concentração), percebeu-se que essa não passava pela origem das coordenadas. Aponte pelo menos uma causa para explicar esse fato.
3. Por que se deve esperar 15 minutos para ler a absorvância após a adição do biureto?
4. Qual a função do branco?
5. Na determinação da creatinina do sangue, 4,0 mL da solução 1:10 de filtrado de sangue desproteínizado foram tratados com 2,0 mL de uma solução recém preparada de ácido pícrico meio saturada em NaOH 5%. Após 5 min a leitura da cor formada em 530 nm foi de 0,085 de absorção. 4

mL de um padrão contendo 0,03 mg de creatinina tratados semelhantemente mostraram uma leitura de 0,425. Qual a concentração de creatinina em mg por 100 mL?

6. A transferrina é uma proteína transportadora de ferro encontrada no sangue. Possui um peso molecular de 81000 Da e tem dois íons Fe^{3+} . A desferrioxamina B é um potente quelante de ferro usado no tratamento de pacientes com excesso de ferro no organismo. A desferrioxamina B possui um peso molecular de cerca de 650 Da e pode se ligar com um Fe^{+3} . A desferrioxamina pode tirar o ferro de vários locais de dentro do sangue e é excretada (com o ferro ligado) pelos rins. As absorvidades molares desses compostos (saturados com ferro) em dois comprimentos de onda estão apresentadas a seguir. Ambos os compostos são incolores (nenhuma absorção visível) na ausência de ferro.

λ (nm)	Transferrina ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Desferrioxamina ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
428	3540	2730
470	4170	2290

a) Uma solução de transferrina exibe uma absorvância de 0,463 em 470 nm em uma célula de 1 cm. Calcule a concentração de transferrina em miligramas e a concentração de ferro em microgramas por mililitro.

b) Pouco tempo depois da adição de desferrioxamina (que dilui a amostra), absorvância em 470 nm foi de 0,424 e a absorvância em 428 nm foi de 0,401. Calcule a fração de ferro na desferrioxamina. Lembre-se de que a transferrina se liga a dois átomos de ferro, e a desferrioxamina se liga apenas a um.

7. Encontre a absorvância e a transmitância de uma solução 0,00240 M de uma substância com coeficiente de absorvidade molar de $313 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ numa célula com 2 cm de caminho óptico.

I. FUNDAMENTOS

Aminoácidos

As unidades constituintes das proteínas são os L- α -aminoácidos. Como o próprio nome indica, estes compostos apresentam pelo menos um grupo amina ($-\text{NH}_2$) e um grupo carboxílico ($-\text{COOH}$). Em consequência deste fato, ao serem dissolvidos em água, os aminoácidos apresentam caráter anfotérico, ou seja, comportam-se como ácido e como base. Os grupos amina e carboxila podem sofrer protonações e desprotonações reversíveis, comportando-se como eletrólitos fracos. Se os considerarmos em suas formas de ácidos conjugados: $-\text{NH}_3^+$ e $-\text{COOH}$, veremos que cada um deles apresentará um valor de pKa. Assim, um aminoácido apresenta pelo menos dois valores de pKa e dependendo da natureza ionizável ou não do grupo R (radical) ligado ao carbono α , pode ocorrer ou não um terceiro valor de pKa. Em pH 7,0 o amino grupo apresenta-se protonado (forma ácida) e o grupo carboxila desprotonado (forma básica) (figura 1).

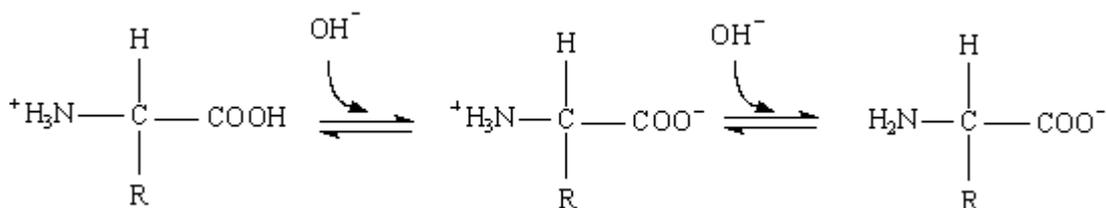


Figura 1 – Titulação com álcali de um aminoácido.

Cromatografia - Separação de aminoácidos

Um dos problemas que continuamente desafiam os bioquímicos é a separação e a purificação de um ou mais compostos de uma mistura complexa. Uma grande variedade de técnicas modernas, tanto analíticas quanto preparativas, é denominada de cromatografia. O que elas possuem em comum é a propriedade de fracionar uma mistura complexa de substâncias usando diferentes características químicas entre os componentes da mistura, o que faz com que eles interajam diferencialmente com a fase estacionária e com uma fase móvel.

Existem quatro tipos principais de cromatografia: cromatografia líquida, cromatografia gasosa, cromatografia de camada fina e cromatografia em papel. A seleção do tipo de cromatografia para realizar uma determinada etapa de separação é dependente do material a ser isolado. Frequentemente, diversos métodos cromatográficos podem ser usados seqüencialmente para que seja obtido um composto na forma pura.

Um leito cromatográfico pode ser construído de várias formas, mas ele sempre consistirá, basicamente, de duas fases: a fase estacionária e a fase móvel. A fase estacionária pode ser sólida, líquida ou pode consistir de uma mistura de um sólido com um líquido. A fase móvel, que pode ser

líquida ou gasosa, preenche os interstícios da fase estacionária e deve ser capaz de fluir através desta. As fases móvel e estacionária devem ser escolhidas de forma que os compostos que serão separados durante o processo cromatográfico possuam um coeficiente de partição definido entre as duas fases. Neste processo, vários mecanismos de distribuição podem ser empregados: a distribuição pode ser uma simples partição entre dois líquidos imiscíveis; um equilíbrio de adsorção entre uma fase estacionária adsorvente e uma fase líquida móvel; ou um equilíbrio de troca iônica entre uma fase estacionária trocadora de íon e uma fase móvel constituída por uma solução de um eletrólito.

Cromatografia de aminoácidos em papel

Neste protocolo emprega-se uma mistura de solventes que interagem com as fibras de celulose no papel de formas diferentes. O deslocamento do soluto pode ser explicado da seguinte forma: as fibras de celulose do papel possuem uma forte afinidade pela água presente na mistura de solvente, mas muito pouca afinidade pela fase orgânica. O papel, assim, pode ser visto como um suporte inerte contendo uma fase estacionária aquosa (polar). Na medida em que o solvente flui através de uma seção do papel contendo o soluto, uma partição deste composto ocorre entre a fase móvel orgânica (pouco polar) e a fase estacionária aquosa (polar). Desta forma, parte do soluto deixa o papel e entra na fase móvel. Com o fluxo contínuo de solvente, o efeito desta partição entre a fase móvel e a fase estacionária é a transferência do soluto do seu ponto de aplicação ao papel para um outro ponto localizado a alguma distância do local de aplicação, no sentido do fluxo de solvente. Após o equilíbrio do papel com o vapor de um solvente saturado com água, o desenvolvimento do solvente produz a separação (figura 2).

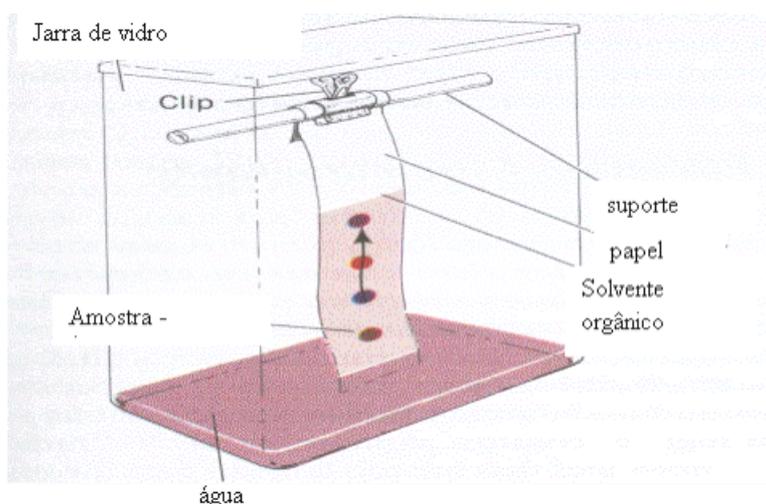


Figura 2 – Cromatografia em papel ascendente.

Quanto mais apolar for o grupo R, maior a mobilidade do aminoácido com a fase móvel. Conseqüentemente a relação (R_F) entre a distância percorrida pelo aminoácido no papel e a

distância percorrida pela fase móvel será também maior. A Tabela I apresenta valores de R_F de alguns aminoácidos nas condições descritas.

$$R_F = \frac{\text{distância percorrida pelo aminoácido no papel}}{\text{distância percorrida pela fase móvel}}$$

Através da cromatografia em papel identificaremos um aminoácido desconhecido em comparação com quatro outros conhecidos (denominados de aminoácidos-padrão). Com ajuda da Tabela II e dos valores de pKa obtidos na titulação, confirmaremos a identidade do aminoácido.

A solubilidade relativa dos aminoácidos nestas duas fases pode ser mudada por alterações na polaridade do solvente, ou no pH da solução, o qual irá alterar o estado iônico dos aminoácidos. Sob um conjunto adequado de condições, então, cada molécula de uma mistura irá se deslocar a uma diferente velocidade sobre a fase estacionária e estará a uma distância específica de um do ponto de origem, quando cessar o fluxo de solvente.

Devido ao fato dos aminoácidos não absorverem luz no comprimento de onda visível, eles não podem ser vistos. Assim, algum método deve ser usado após a cromatografia para localizá-los. A reação de ninhidrina é usada para este propósito por que reage com grupamentos amino livres produzindo um composto colorido (usualmente púrpura) (figura 3). Diversos aminoácidos, contudo, produzem diversas tonalidades de cores com a ninhidrina, o que pode ajudar em sua identificação. A reação da ninhidrina com prolina, por exemplo, gera um composto amarelo e a reação da ninhidrina com a tirosina produz uma coloração azul metálica.

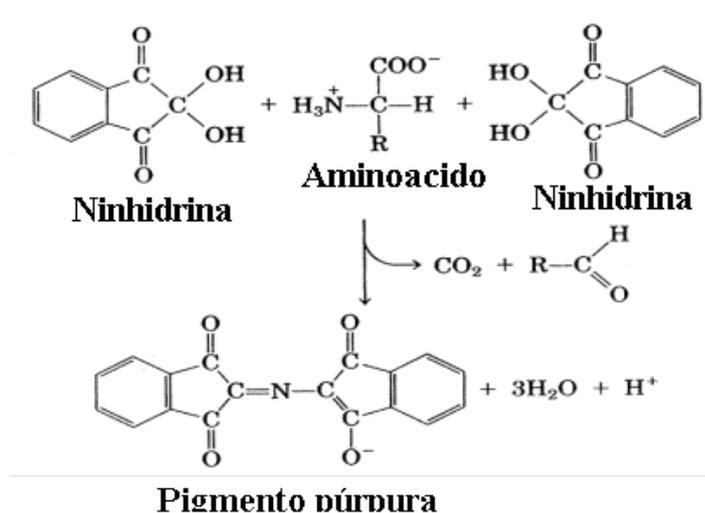


Figura 3 – Reação da ninhidrina com aminoácidos.

Titulação de aminoácidos

Nesta titulação adicionaremos lentamente uma base ou um ácido a soluções de aminoácidos permitindo a obtenção dos respectivos pKas.

A curva de titulação mostra como varia o pH em função de equivalentes do titulante (ácido ou base forte) adicionados. Para um aminoácido, deve-se observar no mínimo dois patamares nessa

curva correspondendo à titulação dos grupos carboxilato e α -amino, respectivamente. No meio de cada um desses patamares há um ponto de inflexão, cujo valor de pH é numericamente igual ao pKa do grupo correspondente. Essa relação numérica entre pH e pKa é facilmente compreensível da análise da equação de Henderson-Hasselbalch.

II. OBJETIVOS

- 1) Identificação de um aminoácido através de seu R_F , determinado pela técnica de cromatografia em papel.
- 2) a) Identificação de um aminoácido através de seus pKas, determinados pela técnica de titulação.
b) Comparação da curva de titulação de um aminoácido com a de um ácido fraco monoprotico.

III. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1) Cromatografia em papel

Tomar uma folha (23 x 16 cm) de papel Whatman nº 1 e fazer um traço a lápis ao longo do comprimento maior a 2 cm da borda. Evitar tocar no papel durante toda a operação. Deixar uma margem de 1,5cm de cada lado. Marcar seis pontos sobre essa linha que distem 4 cm um do outro e numerá-los a lápis de 1 a 6. As amostras devem ser aplicadas nos pontos numerados (3 uL) de tal modo que a mancha formada sobre o papel seja a menor possível.

Nos números de 1 a 4 aplicar os padrões e no número 6, a mistura de padrões. A amostra desconhecida é aplicada no número 5.

Enrolar o papel de modo a transformá-lo em um cilindro e prender as extremidades superiores com clips.

Colocar 25 mL de solvente de Partridge (n-butanol/ácido acético glacial/água 4:1:1), em uma placa de Petri e mergulhar o cilindro de papel em seu interior de modo que este fique perfeitamente na vertical. Evitar que o papel toque na parede da placa.

Cobrir o sistema com um bquer de 2 L e deixar o solvente migrar 10 cm.

Retirar o papel e marcar imediatamente a linha de frente do solvente.

Secar o papel na estufa.

Mergulhar em solução 0,1% de ninhidrina em acetona e levar à estufa (80°C-100°C) por alguns minutos.

Delimitar com lápis as manchas que aparecem no papel.

Determinar o R_F dos padrões e do aminoácido desconhecido e comparar com os dados fornecidos na tabela 1, para sua identificação.

Tabela 1 - R_F de aminoácidos determinados nas seguintes condições: solvente de Partridge, n-butanol/ácido acético glacial/água (4:1:1), papel Whatman nº1 e à 20°C.

Aminoácido	R_F	Aminoácido	R_F
Cys	0,08	Ala	0,38
Lys	0,14	Pro	0,43
His	0,20	Tyr	0,45
Arg	0,20	Trp	0,50
Asp	0,24	Met	0,55
Gly	0,26	Val	0,60
Ser	0,27	Phe	0,68
Glu	0,30	Ile	0,72
Thr	0,35	Leu	0,80

2) Titulação

Colocar 50 mL da solução do aminoácido (0,10 M) em pH 1,0 em um béquer e titular com solução 0,5 M de KOH medindo o pH após cada adição de 1 mL até atingir pH 11,0.

Colocar 50 mL de ácido acético 0,15 M em outro béquer e titular com solução 0,5 M de KOH medindo o pH após cada adição de 0,5 mL até pH 12,0.

Determinar os pKs do aminoácido desconhecido e do ácido acético e comparar os pKs com os dados fornecidos na tabela 2, para sua identificação.

Tabela 2 - pK de aminoácidos

Aminoácido	pKa	Aminoácido	pKa
Glu	2,19	Thr	2,62
	4,25		10,43
	9,67	Asn	2,20
Lys	2,18		8,80
	8,95	Ala	2,30
	10,53		9,70
His	1,82	Leu	2,36
	6,00		9,60
	9,17	Pro	1,99
Cys	1,71		10,60
	8,33	Gly	2,34
	10,78		9,60

IV. RELATÓRIO DE LABORATÓRIO 2

Além da apresentação e discussão dos dados obtidos no laboratório, o relatório deve incluir a cromatografia em papel anexada e a identificação do aminoácido desconhecido. Além disso, deve conter as seguintes questões respondidas.

1. Esquematize o gráfico de titulação de 100 mL de 0,1 M de glicina, pH 1,72 com NaOH 2 M. Faça pH em função de equivalentes de OH^- e de volume de solução de NaOH 2 M.
2. Quais são as concentrações das várias espécies iônicas de lisina a pHs 4, 8 e 10 (0,1 M)?
3. Deduza a equação que relaciona pI e pKs para um aminoácido monoamino e monocarboxílico. Utilize a equação de Henderson-Hasselbalch.
4. Analise a tabela de R_F dos aminoácidos mostrado na apostila. Procure explicar as razões da ordenação dos aminoácidos seguindo os valores crescentes de R_F . De que depende R_F ?
4. Dê exemplos de outros tipos de cromatografia e suas aplicações.

I. FUNDAMENTOS

Métodos de Purificação de Proteínas

É possível purificar e isolar proteínas utilizando-se princípios físico-químicos, que levam em conta as propriedades características dessas biomoléculas. Uma dessas características está baseada na **solubilidade** das diferentes cadeias laterais dos aminoácidos, que dependem da concentração de sais dissolvidos no solvente (força iônica da solução), da polaridade do solvente (constante dielétrica desse solvente), do pH do meio (ponto isoelétrico da proteína) e da temperatura.

Em uma solução aquosa de **baixa força iônica**, a solubilidade de uma proteína, em geral, aumenta com a concentração salina. Esse fenômeno é conhecido como “**salting in**”. Em soluções com **alta força iônica**, entretanto, a solubilidade de uma proteína em geral decresce, fenômeno que resulta da competição entre os íons salinos adicionados e o soluto (proteína), diminuindo a capacidade de solvatação do solvente aquoso. Esse fenômeno é conhecido como “**salting out**”, constituindo uma das técnicas mais utilizadas para a purificação de proteínas. Sulfato de Amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ é o sal mais utilizado para “salting out”, uma vez que sua solubilidade é alta (3,9 M a 0°C), permitindo gerar soluções aquosas de alta força iônica.

Proteínas em geral possuem uma grande variedade de aminoácidos com grupamentos ionizáveis com diferentes pKs. A um pH característico para cada proteína, as cargas positivas da molécula são balanceadas pelas cargas negativas, conferindo à proteína carga total zero. Neste pH, denominado **ponto isoelétrico (pI)**, a molécula torna-se imóvel em presença de um campo elétrico. Como pode ser visto na figura 1, a solubilidade da lactoglobulina pode variar com a concentração salina (NaCl). No entanto, em qualquer caso, ao se ajustar o pH para valores próximos ao pI da proteína, ocorre uma solubilização mínima e a maior fração de proteínas ficará insolúvel. Em muitas situações, pode-se utilizar os conceitos de “**salting out**” e de **precipitação no pI** para purificar uma proteína específica.

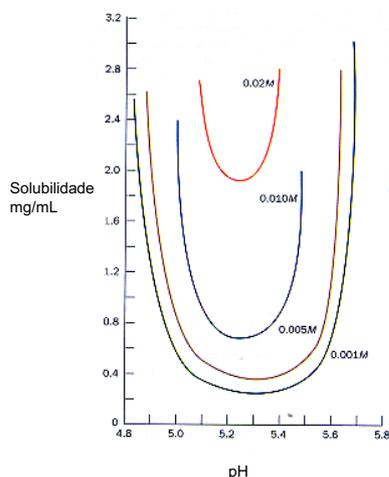


Figura 1 – Solubilidade da lactoglobulina em função do pH em diferentes concentrações de NaCl.

Eletroforese e Separação de Proteínas Totais (SDS-PAGE)

A separação de macromoléculas (proteínas, DNA e RNA) pode ser feita aplicando-se um campo elétrico numa matriz sólida, como um gel ou papel, que contem a mistura de interesse. Esse método, amplamente utilizado, denomina-se **eletroforese** e baseia-se na migração das moléculas em relação a um campo elétrico, devido à sua carga.

Normalmente se utiliza um gel, devido a supressão das correntes de convecção produzidas por pequenos gradientes de temperatura e também porque o gel funciona como uma peneira molecular, permitindo a separação das macromoléculas por peso molecular.

O gel de eletroforese é constituído de um polímero de acrilamida cuja estrutura está demonstrada na Figura 2. Esta polimerização ocorre na presença de radicais livres, os quais são gerados por persulfato de amônio e estabilizados por TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamino). A polimerização também depende da presença de um agente, o N,N'-metileno-bis-acrilamida, que facilita a ligação das cadeias entre si, formando um gel cuja porosidade é determinada pelo comprimento das cadeias e pelo grau de interligação entre estas.

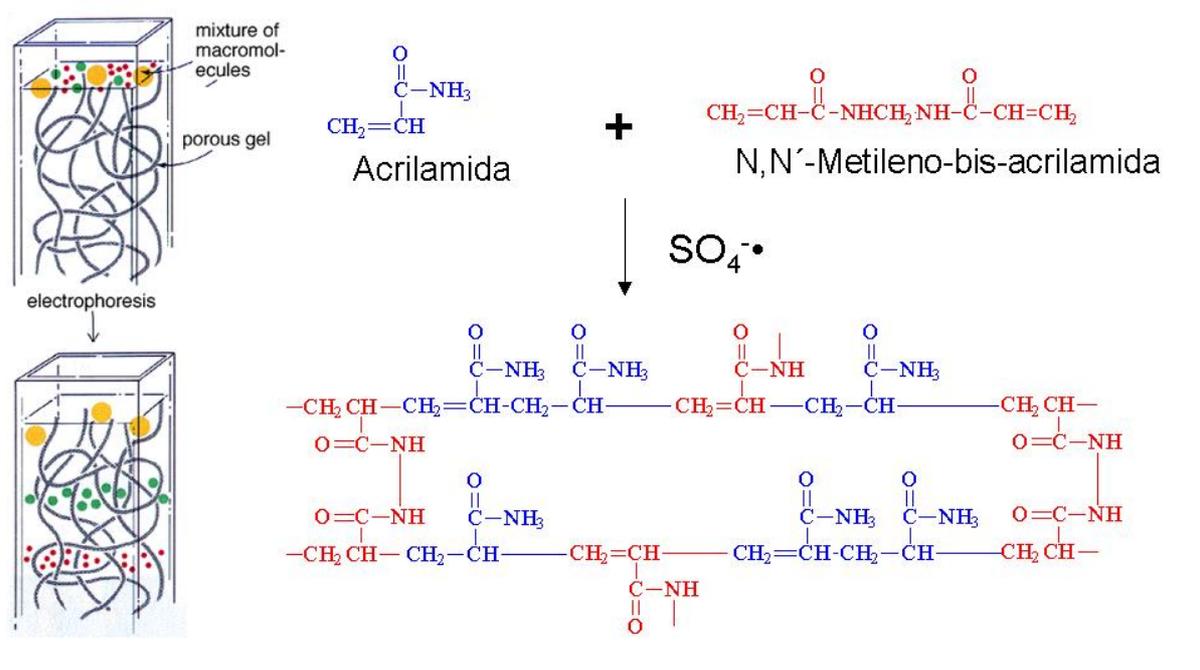


Figura 2 – Esquerda: ação de peneiramento de um gel poroso de acrilamida. Direita: formação de um gel de poliacrilamida. O tamanho do poro pode ser controlado pelo ajuste da concentração do monômero ativado (acrilamida, em azul) e do interligante (bis-acrilamida, em vermelho).

A separação de proteínas ocorre em condições desnaturantes. A mistura de proteínas é dissolvida em tampão de amostra. Este tampão de amostra contém SDS (dodecil sulfato de sódio), que é um detergente aniônico que acaba rompendo as ligações não covalentes existentes na proteína nativa resultando na sua desnaturação. Neste tampão também temos β -mercaptoetanol que reduz as pontes de dissulfeto existentes na proteína.

II. OBJETIVOS

- 1) Precipitar as proteínas totais de uma solução de leite em pó, utilizando os conceitos de precipitação no pl.
- 2) Utilizar eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE) para separar as proteínas de diferentes amostras e estimar sua concentração.

III. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1) Precipitação no pl

Preparar uma série de tubos de ensaio de acordo com a tabela 1

Tabela 1 – Preparação dos tubos em diferentes pHs.

Tubo	1	2	3	4	5
Ácido Acético 0,1 mM	1,0 mL				
Ácido Acético 1,0 mM		1,0 mL			
Ácido Acético 50 mM			1,0 mL		
Ácido Acético 1,0 M				1,0 mL	
Ácido Acético 2,0 M					1,0 mL
PH	6,7	5,7	4,7	3,7	2,7
Turvação (sim / não)					

Adicionar, a cada um dos tubos, uma alíquota (5,0 mL) de solução de leite em pó desnatado (5%, previamente centrifugado).

Agitar os tubos e aguardar 5 minutos

Separar alíquotas de 1,0 mL, distribuir em tubos plásticos pequenos e centrifugar (5000 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente). Descartar a fase sobrenadante e ressuspender o precipitado em NaOH 0,1M (1,0 mL) (Observação: utilizar o mesmo procedimento mesmo para os tubos que aparentemente não apresentam precipitado)

Após a dissolução total do precipitado, **separar** uma alíquota da solução obtida (10,0 µL) para SDS-PAGE.

2. Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE)

Para este experimento, serão utilizadas como amostras:

- alíquotas de proteínas purificadas anteriormente, a partir de uma solução de leite em pó (5%) (amostras 1 a 5)

- a solução contendo o extrato bruto de proteínas totais de leite em pó (5,0 μL) para comparação (amostra 6)
- Soro bovino diluído a 10% (10,0 μL) para comparação (amostra 7)
- Albumina bovina a 4,0 mg/mL (5,0 μL) (padrão de peso molecular: 66,0 KDa)

Montar o aparato para eletroforese conforme figura 3 (o gel de eletroforese será preparado previamente de acordo com o apêndice 1), adicionar na cuba o tampão de corrida até cobrir os poços do gel para eletroforese.

Adicionar tampão de amostra (10 μL) a cada uma das amostras, e aquecer (2 minutos, 100°C) para desnaturar as proteínas. Resfriar (gelo) e aplicar 15 μL nos poços do gel para eletroforese seguindo a ordem da tabela 2.

Tabela 2 – Adição das amostras ao SDS-PAGE

poço nº	1	2	3	4	5	6	7	8
Amostra	padrão	amostra 1	amostra 2	amostra 3	amostra 4	amostra 5	amostra 6	amostra 7

Aplicar a tensão nos eletrodos do aparato de eletroforese (150 V) e aguardar (30 minutos) até que o corante marcador (Azul de Bromofenol) se aproxime da base do gel

Interromper a eletroforese e mergulhar o gel em uma solução de coloração: Coomassie Blue R (0,25g) em metanol : ácido acético : água (45% : 10% : 45%). Aguardar (5-10 minutos)

Substituir a solução de coloração pela solução de descoloração: metanol : ácido acético : água (45% : 10% : 45%) (15 minutos)

Verificar as proteínas coradas, e estimar por comparação, a purificação da amostra.

IV. RELATÓRIO DE LABORATÓRIO 3

Além da apresentação e discussão dos dados obtidos no laboratório, as seguintes questões devem estar respondidas no relatório:

1. No primeiro experimento, em que condições a maior precipitação de proteínas ocorreu? A que pH corresponde?
2. É possível estimar o peso molecular da proteína majoritária precipitada a partir da solução de leite em pó? Compare com a fração total de leite em pó utilizada para fazer a eletroforese. Houve eficiência na separação dessa proteína?
3. A tabela abaixo mostra valores de pI para diferentes proteínas, com seus respectivos valores de peso molecular (em kDa). Observe a banda de proteína purificada corada no gel de poliacrilamida e a posição relativa ao padrão de albumina bovina adicionado.

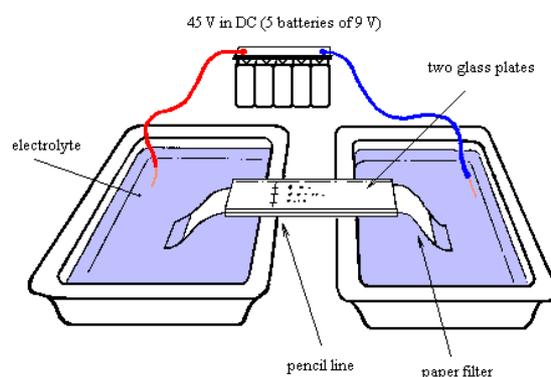
Proteína	pI	Peso Molecular (kDa)
Caseína	4,7	20,0-23,0
Insulina	5,4	6,0
Colágeno	6,6	130,0
Hemoglobina	7,1	64,5
Citocromo c	10,6	13,0
Histona	10,8	12,0 a 20,0

De acordo com os valores de pI e de peso molecular, qual seria a proteína purificada da solução de leite em pó?

4. Se houvesse contaminação da solução de leite em pó com albumina bovina, esse método de purificação seria eficiente? Como a albumina bovina poderia ser detectada? E se houvesse contaminação do leite em pó com hemoglobina, esse método de purificação seria eficiente? Consulte os dados de pI e justifique sua resposta.

5. O que é eletroforese? Qual a função do gel de empilhamento? E do gel de separação (ou de resolução)? Observe os diferentes pHs das soluções B e C (vide Apêndice) utilizadas para fazer os géis de resolução e de empilhamento, respectivamente. Por que o gel de empilhamento e o gel de resolução possuem pHs diferentes? Porque há SDS no gel?

6. Conforme a figura abaixo, uma mistura de três proteínas cujos valores de pI são 4,0; 7,0 e 11,0 foi submetida a eletroforese. Usando-se tampões de valores de pH = 4,0; 7,0 e 11,0 esquematizar as posições relativas das três proteínas em cada tampão. Proteínas de mesma carga correriam a mesma distância numa eletroforese? Existe alguma possibilidade de se separar proteínas diferentes só que de cargas iguais?



Equipamento para eletroforese em papel.

7. A mobilidade eletroforética em pH = 8,6 de uma proteína normal e de análogas anormais (que tem um aminoácido mutado) está representada abaixo. Identifique a que posição corresponde cada uma das proteínas e diga o porquê.

ProS – substituição de glutamato por valina

ProJ – substituição de glicina por aspartato

ProN – substituição de lisina por glutamato

ProC – substituição de glutamato por lisina

A B Normal C D

(-) ————— (+)

8. Uma proteína com 40 kDa e outra com 90 kDa foram utilizadas como padrão num gel de poliacrilamida com SDS. A motilidade relativa foi de 0,92 e 0,54 respectivamente. Qual seria a massa aparente de uma proteína neste gel, com motilidade de 0,72.

9. Apesar de uma cromatografia em coluna de gel filtração e uma eletroforese gel de poliacrilamida usarem princípios físicos semelhantes, porque ao separamos uma proteína de 40 kDa e outra de 15 kDa a de maior peso é a primeira a ser eluída da cromatografia e a de menor peso é a que mais se move na eletroforese do gel. Em que situações você usaria a cromatografia? E a eletroforese?

V. APÊNDICE

Preparação do gel de acrilamida / SDS

Inicialmente montam-se as placas de vidro com os espaçadores posicionados. Vedar o espaço entre as placas com agarose (1% aquecida em ebulição). Aguardar resfriamento.

PRECAUÇÕES: Acrilamida é neurotóxica quando não polimerizada. Utilize sempre luvas descartáveis para manipular soluções contendo acrilamida. Evite inalar TEMED (mesmo diluído, pode ser tóxico) e butanol.

Preparar a solução para o gel de resolução (de “corrida”):

- água destilada (3,7 mL)
- solução A (1,8 mL)
- solução B (1,9 mL)

- APS (Persulfato de Amônio) (0,12 mL) (solução a 10%)
- TEMED (0,45 mL) (diluído 40 vezes)

OBS: Adicionar o TEMED por último, pois ele é o agente polimerizante deste gel.

Utilizar a solução imediatamente após o preparo (aplicando-a no espaço entre as placas de vidro com uma pipeta. Serão necessários aproximadamente 4,0 mL de solução. Aguardar a polimerização do gel (5 minutos). Será necessário deixar aproximadamente 1,0 cm de espaço para aplicar o gel de empilhamento

OBS: A solução começa a polimerizar muito rapidamente, é necessária atenção e rapidez para aplicar a solução no aparato de eletroforese.

Preparar a solução para o gel de empilhamento:

- Água destilada (1,66 mL)
- Solução A (0,3 mL)
- Solução C (0,75 mL)
- APS (Persulfato de Amônio) (0,05 mL) (solução a 10%)
- TEMED (0,24 mL) (diluído 40 vezes)

OBS: Adicionar o TEMED por último, pois ele é o agente polimerizante deste gel.

Utilizar a solução imediatamente após o preparo, aplicando-a sobre o gel de resolução (deve preencher um espaço de cerca de 1 cm de altura). Colocar um pente plástico para formar os poços onde as amostras serão aplicadas (de acordo com a demonstração). Serão necessários aproximadamente 1,60 mL de solução. Aguardar a polimerização do gel (15 minutos)

OBS: A solução começa a polimerizar muito rapidamente, é necessária atenção e rapidez para aplicar a solução no aparato de eletroforese.

Soluções utilizadas

Solução A: Acrilamida e bis-acrilamida

45 g acrilamida
1,2 g bis-acrilamida
água destilada (até 100 mL)

Solução B: Tris-HCl pH 8,8

18,17 g Tris (em 50 mL de água destilada)
Ajustar o pH para 8,8 (com HCl)
Adicionar SDS (4,0 mL, solução a 10%)
Completar o volume com água destilada (até 100 mL)

Solução C: Tris-HCl pH 6,8

6,06 g Tris (em 50 mL de água destilada)
Ajustar o pH para 6,8 (com HCl)

Completar o volume com água destilada (até 100 mL)

Tampão de corrida:

3,0 g de Tris, 14,4 g de Glicina e 10,0 mL de SDS (10%)

Ajustar o volume de água destilada para 1000 mL

Tampão de amostra:

SDS 10% (5,0 mL), 2-mercaptoetanol (0,5 mL), Glicerol (2,0 mL), EDTA 0,1M (0,1 mL), Azul de Bromofenol 1% (1,0 mL), Solução C (2,5 mL) e água destilada (até 20,0 mL).

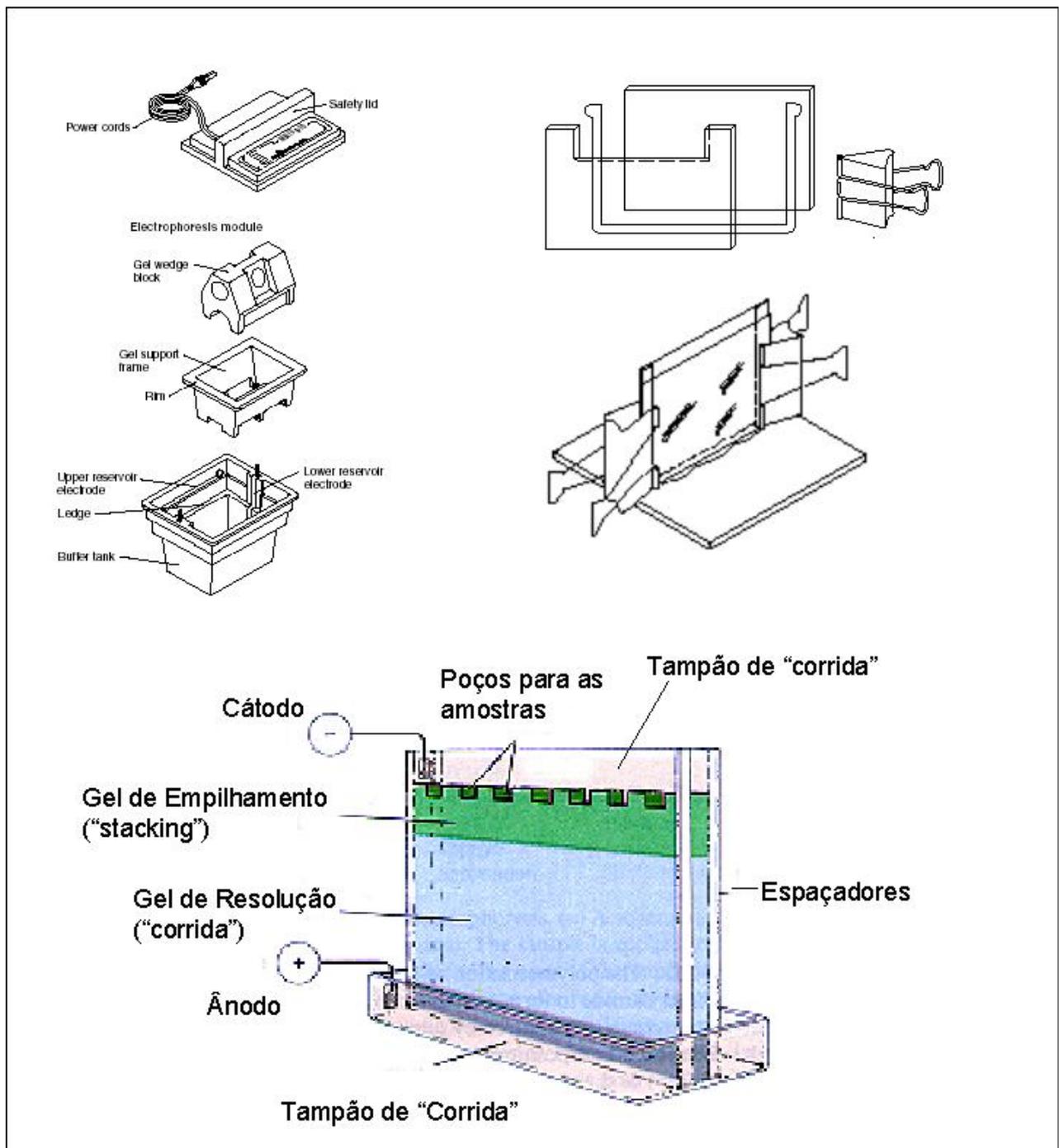
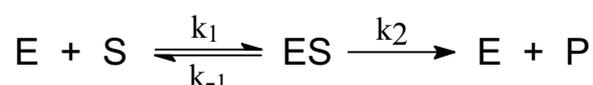


Figura 3 – Esquema do aparato para eletroforese.

I. FUNDAMENTOS

A Cinética Enzimática estuda os mecanismos de reações químicas catalisadas por enzimas. Há na estrutura da enzima, uma determinada região diretamente responsável pela ação catalítica. Essa região é denominada sítio ativo e a sua conformação correta é fundamental para a atividade enzimática. Ali se localizam diversos resíduos de aminoácidos que podem desempenhar funções de orientação do substrato e de direta interação com este, permitindo que a reação ocorra.

Em 1913, L. Michaelis e M. L. Menten, desenvolveram estudos considerando as principais propriedades das enzimas e aplicando as teorias conhecidas de Cinética Química para um modelo simplificado, o qual envolvia a enzima livre (E), o substrato (S), o complexo enzima-substrato (ES) e o produto (P). Esse modelo pode ser expresso pela equação química:



Michaelis e Menten, com essas considerações, desenvolveram a expressão de velocidade para uma reação catalisada enzimaticamente, onde V é função de $[S]$ e V_{\max} e K_m são constantes (figura 1):

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Na figura 2 está apresentada a curva de velocidade inicial de reação em função da concentração de substrato para uma enzima que siga o modelo proposto por Michaelis e Menten. Essa enzima é dita de características michaelianas e obedece à expressão de velocidade apresentada acima.

• Dedução da Equação de Michaelis-Menten

$$k_1[E][S] = k_2[ES] + k_3[ES] \quad \text{Veloc. de formação} = \text{Veloc. de degradação}$$

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES] \Rightarrow [ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_2 + k_3} \Rightarrow [ES] = \frac{[E][S]}{(k_2 + k_3)/k_1}$$

$$(k_2 + k_3)/k_1 = K_M$$

Constante de Michaelis

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \Rightarrow [ES] = \frac{([E_t] - [ES])[S]}{K_M} \Rightarrow K_M[ES] = ([E_t] - [ES])[S] \Rightarrow$$

$$K_M[ES] = [E_t][S] - [ES][S] \Rightarrow K_M[ES] + [ES][S] = [E_t][S] \Rightarrow$$

$$[ES](K_M + [S]) = [E_t][S] \Rightarrow [ES] = \frac{[E_t][S]}{K_M + [S]} \Rightarrow [ES] = [E_t] \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$V_0 = k_3[ES] \Rightarrow V_0 = k_3[E_t] \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$V_{\text{Max}} \Rightarrow \text{sítios catalíticos saturados} \Rightarrow [S] \gg K_M \Rightarrow \frac{[S]}{K_M + [S]} \approx 1 \Rightarrow V_{\text{max}} = k_3[E_t]$$

$$V_0 = V_{\text{Max}} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Equação de Michaelis-Menten

Na situação em que $V_0 = \frac{1}{2} V_{\text{Max}}$ $\Rightarrow \frac{V_{\text{Max}}}{2} = \frac{V_{\text{Max}}[S]}{K_M + [S]} \Rightarrow \frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + [S]}$ \Rightarrow

$$K_M + [S] = 2[S]$$

$$K_M = [S]$$

Na situação em que $[S]$ é muito alta $\Rightarrow [S] \gg K_M \Rightarrow V_0 = \frac{V_{\text{Max}}[S]}{[S]}$ \Rightarrow

$$V_0 = V_{\text{Max}}$$

Figura 1 - Dedução da equação de Michaelis-Menten.

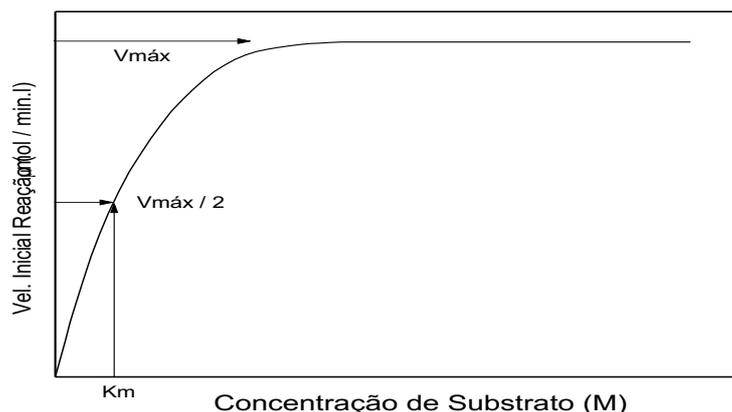
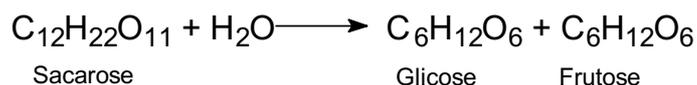


Figura 2 – Velocidade de reação em função da concentração de substrato para uma enzima michaeliana.

Nesta curva pode-se facilmente identificar o efeito de saturação do substrato. Nestas circunstâncias, o sistema tende a adquirir velocidade de reação máxima ($V_{máx}$), grandeza que é função da concentração inicial da enzima livre (E). Podemos também definir uma concentração de substrato na qual se obtém metade de $V_{máx}$. Esse valor de [S] é numericamente igual ao K_m , parâmetro que dentro de certos limites mede a afinidade da enzima pelo substrato.

O método mais preciso para determinação gráfica dessas grandezas num experimento de Cinética Enzimática é através do gráfico de duplo-recíproco ou de Lineweaver-Burk. Para tanto se deve plotar $1/V$ em função de $1/[S]$.

A enzima escolhida para este estudo é a invertase de levedura que catalisa a hidrólise da sacarose para produzir glicose e frutose:



A determinação da velocidade da reação (ou da atividade enzimática) pode ser feita através da dosagem dos açúcares redutores formados (frutose e glicose). A dosagem baseia-se na reação entre o ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) e os açúcares redutores. Estes monossacarídeos reduzem o DNS fornecendo um produto de cor característica, cuja formação pode ser acompanhada a 540 nm.

Conhecendo-se por colorimetria a quantidade (μmols) de açúcares redutores formada, por um cálculo estequiométrico simples, pode-se determinar a quantidade correspondente (μmols) de sacarose hidrolisada. Nestas experiências as velocidades da reação serão expressas em μmols de sacarose hidrolisada por minuto.

Para estudos de velocidade, o tempo de reação deve ser medido com a maior exatidão possível. Para isso, o grupo deverá organizar-se de maneira a não permitir que a reação se inicie em tempos diferentes nos vários tubos. Para tal, é importante manter os tubos em gelo durante a adição dos reagentes. Esses devem ser adicionados na ordem em que aparecem nos protocolos,

com a enzima sendo adicionada por último. Leva-se então os tubos, todos juntos, ao banho a 37°C para reagir. Transcorrido o tempo determinado, os tubos devem voltar, todos juntos e simultaneamente, para o gelo. Neste ponto a reação pára.

A atividade enzimática é medida em unidade (U), sendo que 1 U é a quantidade de enzima necessária para a formação de 1 μmol de produto por minuto.

II. OBJETIVOS

Estudar as influências das concentrações de enzima e substrato nas velocidades de uma reação enzimática, examinar as curvas obtidas experimentalmente, calcular os parâmetros cinéticos e discutir seus valores e importância.

III. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1) Construção da curva padrão

Adicionar a seis tubos (180 X 20 mm) com volumes crescentes de solução padrão redutora (glicose 6 mM + frutose 6 mM), conforme indicado na tabela 1. Complete o volume em cada tubo para 2,0 mL com tampão. Adicionar em seguida 2 mL do reagente DNS. As quantidades estão indicadas na tabela 1.

Tabela 1 – Curva padrão da solução redutora.

tubos	solução padrão redutora (mL)	solução tampão (mL)	reagente DNS (mL)	absorbância (540 nm)	sacarose hidrolisada(μmols)
branco	-	2,0	2,0	0,000	0,00
1	0,2	1,8	2,0		
2	0,4	1,6	2,0		
3	0,6	1,4	2,0		
4	0,8	1,2	2,0		
5	1,0	1,0	2,0		

Anotar aqui a concentração da solução padrão: _____

Após a adição do DNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico), colocar os tubos em banho-maria fervente por 10 min. Após este tempo, esfriar em água corrente e adicionar 16 mL de água destilada. Agitar com inversão da posição na vertical (3x). Ler as absorbâncias a 540 nm contra o branco.

Construir o gráfico absorbância *versus* concentração de sacarose hidrolisada. Este gráfico será a **curva padrão**.

2. Efeito da concentração da enzima

Numerar sete tubos de ensaio (180 X 20 mm) e adicionar os reagentes conforme tabela 2.

Manter todos os tubos no gelo.

Tabela 2 – Estudo da concentração de enzima x velocidade de reação.

tubos	sacarose 5% em tampão (mL)	tampão pH 4,77 (mL)	solução enzima (mL)	Concentração enzima (μM)	Abs. 540 nm	sacarose hidrolisada por min. ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
branco	1,0	1,0	-	0,00	0,000	0,00
1	1,0	0,9	0,1			
2	1,0	0,7	0,3			
3	1,0	0,5	0,5			
4	1,0	0,3	0,7			
5	1,0	0,1	0,9			
6	1,0	-	1,0			

Após a adição da enzima, agitar suavemente. Retirar os tubos do gelo e colocá-los imediatamente (e simultaneamente) em banho-maria a 37°C por 5 min. Transcorrido este tempo, os tubos devem retornar imediatamente para o gelo. Assume-se que nesse instante a reação para. Ainda no gelo, adicionar a cada tubo 2 mL de DNS. Na presença de DNS, devido à alcalinidade do reagente, a enzima para de funcionar.

Transferir os tubos para banho-maria fervente e esperar 10 min. Findo este tempo, esfriar em água corrente e adicionar 16 mL de água destilada em cada tubo. Agitar com inversão da posição na vertical (3x). Ler as absorbâncias a 540 nm.

Fazer o gráfico colocando a concentração da enzima (μM) nas abscissas e a velocidade de hidrólise expressa em μmols de sacarose hidrolisada por minuto nas ordenadas. Durante a aula de laboratório será fornecido o valor da concentração da enzima na solução estoque.

3. Efeito da concentração de substrato

Numerar sete tubos de ensaio (180 X 20 mm) e adicionar os reagentes segundo a tabela 3.

Manter todos os tubos no gelo.

Tabela 3 – Estudo da concentração de substrato x velocidade de reação.

tubos	sacarose 5% em tampão (mL)	tampão pH 4,77 (mL)	solução enzima (mL)	concentração sacarose (μM)	Abs. 540 nm	sacarose hidrolisada por min. ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
branco	1,0	1,0	-		0,000	0,00
1	0,05	1,45	0,5			
2	0,1	1,4	0,5			
3	0,3	1,2	0,5			
4	0,5	1,0	0,5			
5	0,7	0,8	0,5			
6	1,0	0,5	0,5			

Proceder exatamente como no caso do estudo da concentração da enzima (item anterior).

Após a adição da enzima, agitar suavemente. Retirar os tubos do gelo e colocá-los imediatamente (e simultaneamente) em banho-maria a 37°C por 5 min. Transcorrido este tempo, os tubos devem retornar imediatamente para o gelo. Assume-se que nesse instante a reação para. Ainda no gelo, adicionar a cada tubo 2 mL de DNS. Na presença de DNS, devido à alcalinidade do reagente, a enzima (valor elevado de pH) pára de funcionar.

Transferir os tubos para banho-maria fervente e esperar 10 min. Findo este tempo, esfriar em água corrente e adicionar 16 mL de água destilada em cada tubo. Agitar com inversão da posição na vertical (3x). Ler as absorbâncias a 540nm.

Fazer um gráfico da velocidade “versus” concentração inicial do substrato. Estimar os valores de $V_{\text{máx}}$ e K_m .

Fazer o gráfico de Lineweaver-Burk e calcular os valores de $V_{\text{máx}}$ e K_m .

Comparar o valor de K_m com o encontrado na literatura científica.

IV. RELATÓRIO DE LABORATÓRIO 3

Além da apresentação e discussão dos dados obtidos no laboratório, as seguintes questões devem estar respondidas no relatório.

1. Qual o substrato utilizado nesta prática? Qual a reação catalisada pela enzima a partir deste substrato? Qual(is) o(s) produto(s) da reação catalisada pela enzima a partir deste substrato?
2. Foi utilizado algum tubo controle? Qual a função de um tubo controle? Dê exemplos.
3. Por que os tubos devem ser mantidos em banho de gelo? E porque os tubos devem ser transferidos ao mesmo tempo para o banho a 30°C?

4. Por que a leitura da absorbância é feita a 540 nm?
5. Discutir as curvas obtidas para o efeito da concentração da enzima e do substrato e elaborar um protocolo para estudar o efeito do pH sobre a atividade.
6. No item 2 do protocolo é dito que, devido à alcalinidade do reagente DNS, sua adição faz a reação parar (enzima perde atividade). Justifique essa afirmação.
7. Como se pode dosar uma enzima? Em que a dosagem de uma enzima difere da dosagem de uma substância qualquer? Como determinar a atividade enzimática (U) de uma enzima?
8. Sabe-se que para $[E] = x$, tem-se $V_{\text{máx}} = 1 \text{ U}$, o que ocorrerá com $V_{\text{máx}}$ se $[E] = 2x$? Qual será o valor de K_m ?
9. Definir K_i . O que o valor de K_i indica? Como se determina o K_i graficamente? Descreva um experimento simples que ajude a definir se uma substância é um inibidor competitivo ou não-competitivo.
10. O que é atividade específica de uma enzima? Como se calcula a atividade específica?
11. Uma solução da enzima hexoquinase (atuante na via glicolítica), de características michaelianas, possui um valor de K_m igual a 0,15 mM para a glicose e 1,5 mM para a frutose. A velocidade máxima da reação ($V_{\text{máx}}$) neste sistema é a mesma para os dois substratos e igual a 50 mmols substrato.(min.L)⁻¹. Plote os dois casos num mesmo gráfico de velocidade reação em função da concentração de substrato. Faça também o gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk contendo os dois substratos. Comente as diferenças observadas entre os dois substratos nas duas curvas.
12. Uma solução comercial de xantina oxidase (enzima que participa do metabolismo de purinas) possui, em seu rótulo, as seguintes informações:

Dosagem de proteína: 2,4 mg/mL

Atividade enzimática : 150 U/mg proteína

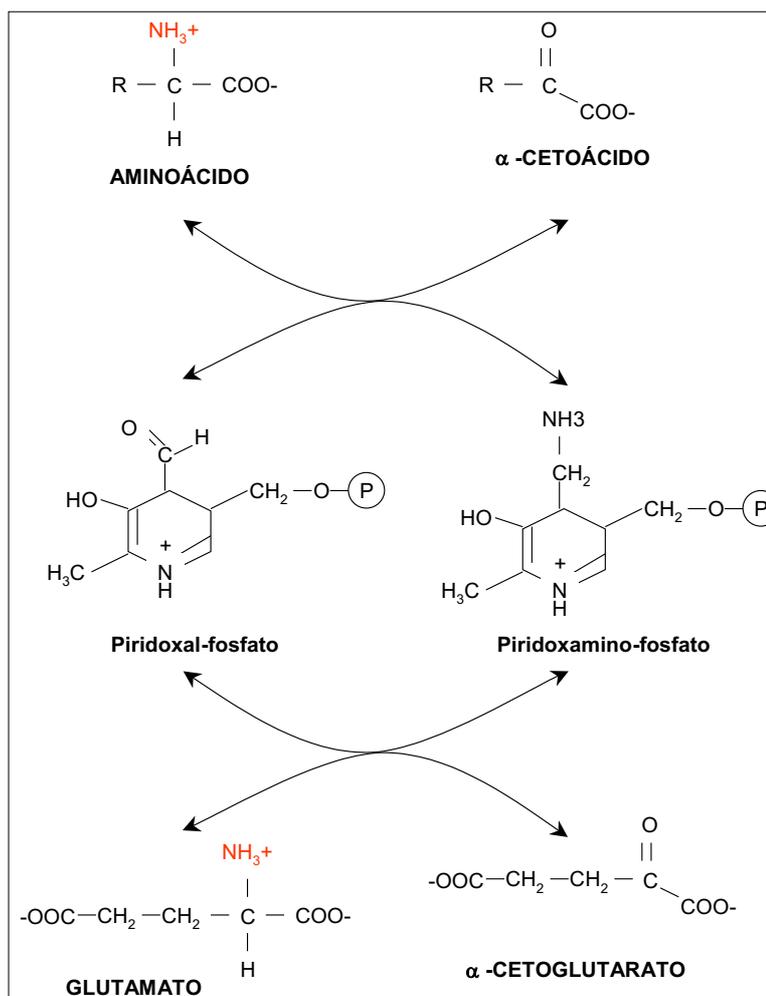
De acordo com o protocolo do ensaio enzimático, são necessários 10 mL de uma solução de xantina oxidase com atividade de 0,2 U/mL. Assim sendo, pergunta-se:

- a.) Como preparar esta solução?
- b.) Se a minha concentração de substrato (xantina) for 0,6 mM, quantos mols de xantina devem restar em solução após 10 min?

LABORATÓRIO 5: REAÇÃO DE TRANSAMINAÇÃO

I. FUNDAMENTOS

Enzimas transaminases ou aminotransferases são importantes no metabolismo de aminoácidos, pois transferem o grupo α -NH₃⁺ de um aminoácido para um α -cetoácido. Foram identificadas mais de 50 tipos de transaminases, presentes em todos os tipos de células e sendo encontradas tanto no citossol como em mitocôndrias de células eucarióticas. O grupo α -NH₃⁺ de todos os aminoácidos (com exceção de Lys, Arg e Thr) podem ser removidos por transaminases em diferentes organismos. As transaminases possuem especificidade diferenciada: relativamente específica para o α -cetoácido receptor do grupo -NH₃⁺ e, numa menor intensidade, para o aminoácido doador. A coenzima PLP (piridoxal-fosfato) é essencial para as transaminações e várias outras enzimas envolvidas no catabolismo de aminoácidos (figura 1). PLP é derivada da vitamina B6, hidrossolúvel, o piridoxal. A figura 2 mostra como os processos catabólicos dos diversos aminoácidos colaboram com o eficiente funcionamento do ciclo de Krebs pelo fornecimento de intermediários desse ciclo.



O ácido glutâmico (Glu), produzido em diversas transaminações, pode tanto sofrer desaminação oxidativa, produzindo o α -cetoglutarato e o íon NH₄⁺, que será utilizado no ciclo da

uréia, como doar o grupo $-NH_3^+$ para a biossíntese de outros aminoácidos. O Glu é o principal doador de grupos $-NH_3^+$ nesta função. A figura 3 ilustra esses processos metabólicos. **Figura 1** - Reação de transaminação, mostrando a dependência pela coenzima PLP no processo de transferência dos grupos amino entre aminoácidos e cetoácidos.

Figura 2 - Os processos catabólicos dos diversos aminoácidos colaboram com o eficiente funcionamento do ciclo de Krebs pelo fornecimento de intermediários desse ciclo.

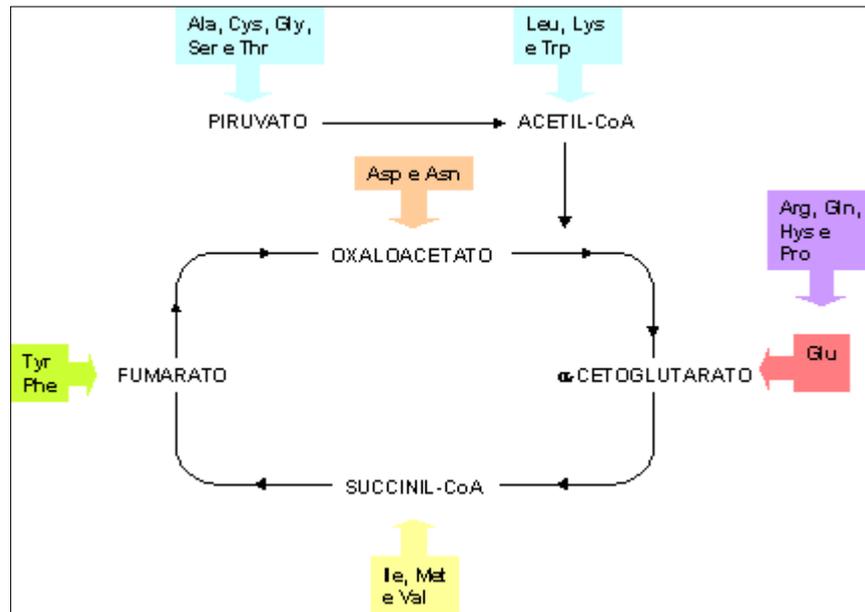
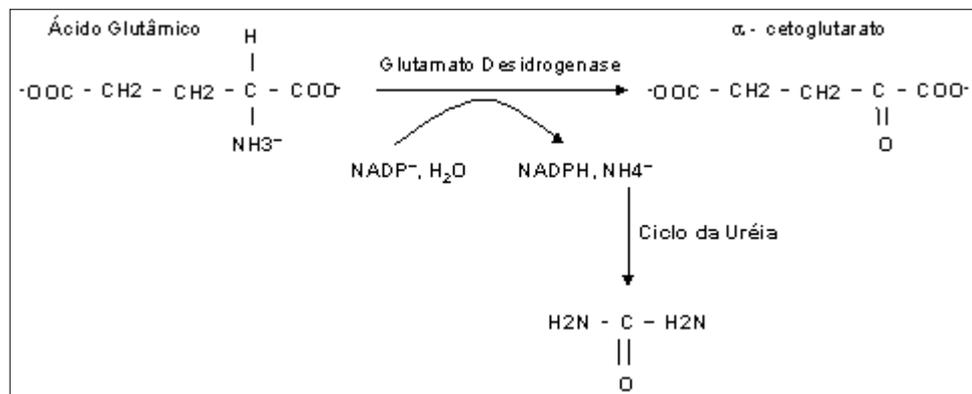


Figura 3 – Formação de α -cetoglutarato e uréia a partir de glutamato.



II. OBJETIVOS

Estudar as reações de transaminases e identificar os produtos e reagentes através da cromatografia em papel.

III. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1) Preparação do homogeneizado de fígado

Essa etapa será realizada previamente. Fígados de camundongos (5 a 7 animais) ou de galinha foram extraídos e lavados com PBS (tampão fosfato: 0,05M, pH 7,4), picados e macerados para homogeneização com PBS (até 10,0 mL de volume final). O homogeneizado foi centrifugado (800 g, 15 minutos) para eliminar células remanescentes, núcleos e debris celulares. O sobrenadante foi aliquoteado para utilização em sala de aula, mantido em gelo e em seguida mantido congelado (-20°C) até sua utilização.

2) Preparação da mistura reacional

O sistema completo da reação é composto por um aminoácido, um cetoácido, o preparado enzimático, arsenito de sódio e o tampão. O arsenito de sódio é empregado com a finalidade de evitar a oxidação dos cetoácidos pelo sistema enzimático.

Montar a seguinte reação:

- 0,3 mL de solução de α -cetogluturato 0,2M pH 7,4
- 0,3 mL de solução de Alanina a 0,2M pH 7,4
- 0,3 mL de preparação enzimática
- 0,5 mL de tampão fosfato 0,05M pH7,4
- 0,4 mL de solução de arsenito de sódio 0,2M

E também um controle negativo (branco) contendo todos os componentes exceto a preparação enzimática, que é substituída por tampão:

- 0,3 mL de solução de α -cetogluturato 0,2M pH 7,4
- 0,3 mL de solução de Alanina a 0,2M pH 7,4
- 0,8 mL de tampão fosfato 0,05M pH7,4
- 0,4 mL de solução de arsenito de sódio 0,2M

Incubar os dois tubos (reação e controle negativo) a 37°C por 30 minutos. Em seguida, inativar a reação em banho-maria fervente por 3 minutos. Centrifugar a 5000 rpm, 10 minutos (centrífuga Eppendorf). Decantar o sobrenadante transferindo para um segundo tubo Eppendorf e fazer a cromatografia com os padrões adequados.

3. Cromatografia

Em um papel de filtro Whatman número 1 (10 cm X 20 cm) traçar com um lápis uma linha horizontal de 2,5 cm de altura a partir da origem (ponto de contato do papel com a solução na cuba de cromatografia). Marcar 7 pontos com 2,5 cm de distância entre si.

Aplicar, com um capilar de vidro fino, sobre os pontos marcados, uma pequena alíquota dos padrões de alanina, glutamato, piruvato, e α -cetogluturato, a mistura de reação, o branco (controle negativo) e 2,4-dinitrofenil-hidrazina. Sobre os pontos onde foram aplicados os padrões e as amostras, adicionar 3 μ L de 2,4-dinitrofenil-hidrazina.

O solvente utilizado para a cromatografia será uma mistura de butanol/etanol/ NH_4OH 0,5 M na proporção 70:20:30 (v/v).

Após o solvente alcançar 1 cm do final do papel, secar o papel a 80°C em estufa e marcar os produtos coloridos formados. Revelar os aminoácidos do cromatograma com a solução de ninhidrina, secando em seguida o papel. Marcar a posição das manchas que aparecerem.

IV. RELATÓRIO DE LABORATÓRIO 5

O relatório deve conter os resultados do procedimento experimental, com possíveis explicações de erro experimental como também as seguintes questões resolvidas:

1. Explique, resumidamente, como a escolha do tipo de eluente (solvente de corrida) e do papel pode afetar a eficiência da separação de componentes pela técnica de cromatografia em papel.
2. Procure nos livros a reação que ocorre entre a ninhidrina e os aminoácidos e também qual é a reação de transaminação que ocorreu em seu experimento.
3. Dopamina é uma amina biogênica usada como neurotransmissor no cérebro.
 - a) Explique a reação geral que leva a formação de aminas biogênicas a partir de aminoácidos.
 - b) De qual aminoácido a dopamina pode ser sintetizada? Explique.
 - c) Explique a síntese do aminoácido que origina a dopamina.
 - d) Crie uma hipótese de um defeito genético que torne este aminoácido em aminoácido essencial.
 - e) Imagine um possível tratamento para a deficiência de dopamina na doença de Parkinson (note que a dopamina por si só não pode ser usada, pois não passa pela barreira hematoencefálica e deste modo não pode chegar ao cérebro).
4. Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no cérebro.
 - a) Explique como glutamato age como neurotransmissor (transmitindo um sinal químico que se torna elétrico).
 - b) Explique como glutamato pode ser removido da fenda sináptica, mencionando o tipo de transporte (ativo ou passivo).

- c) A phoneutriatoxina 3-4 do veneno da aranha *Phoneutria niger* inibe o transporte de glutamato da fenda sináptica para o citoplasma do neurônio pre-sináptico. Explique quais são os efeitos da inibição do transporte de glutamato sobre a neurotransmissão. Sugira um tratamento.
- d) Mencione as reações que inativam o glutamato.
- e) Qual neurotransmissor inibitório que é sintetizado a partir do glutamato? Explique a reação.

5. Fenilcetonúria (PKU) é uma doença genética do metabolismo de aminoácidos. Uma criança de dois anos de idade foi levada ao hospital. Sua mãe indicou que ela vomitava freqüentemente, especialmente após as refeições. O peso da criança e o seu desenvolvimento físico eram abaixo do normal. Seus cabelos, embora escuros, continham porções de cabelos brancos. Uma amostra de urina tratada com cloreto férrico (FeCl_3) apresentou uma cor verde característica da presença do ácido fenilpirúvico. A análise quantitativa de amostras de urina apresentou os resultados mostrados na tabela abaixo.

Substância	Paciente (mmol/L)	Normal (mmol/L)
Fenilalanina	7,0	0,01
Fenilpiruvato	4,8	0
Fenilactato	10,3	0

- a) Sugira que enzima possa estar deficiente. Proponha um tratamento para esta condição.
- b) Por que a fenilalanina aparece na urina em grandes quantidades?
- c) Qual é a fonte do fenilpiruvato e do fenilactato?
- d) Por que o cabelo da paciente apresentou porções brancas?

6. Intoxicação de amônia resultante da deficiência de arginina da dieta (Morris e Roger, Science 199, 431, 1978).

Gatos, depois de jejum por uma noite, receberam uma única refeição de uma dieta de aminoácidos completa sem arginina. Dentro de duas horas, os níveis de amônia sanguíneos aumentaram de nível normal de 18 mg/l para 140 mg/l e os gatos apresentaram sintomas clínicos de intoxicação pela amônia. Um gato morreu 4,5 horas depois de ingerir apenas 8 g da dieta. Um grupo controle alimentado com a dieta completa de aminoácidos ou com uma dieta de aminoácidos ou com uma dieta de aminoácidos onde arginina foi substituída pela ornitina não apresentou nenhum sintoma clínico anormal.

- a) Qual era o papel do jejum neste experimento?
- b) O que induziu o aumento dos níveis de amônia? Por que a ausência de arginina levou à intoxicação por amônia? A arginina é um aminoácido essencial para gatos?
- c) Por que a ornitina pode substituir a arginina?