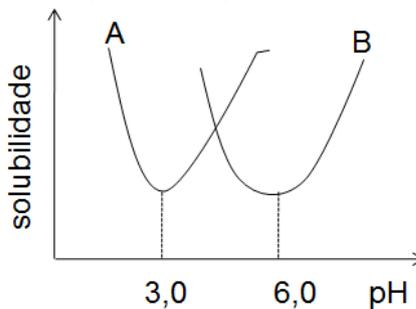


### Lista de exercícios de revisão

1.a) Os reagentes SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol são usualmente empregados em eletroforese de proteínas. Qual o papel de cada um desses reagentes?

b) Duas proteínas A e B apresentam solubilidade em função do pH dada pelo gráfico abaixo. Quando uma mistura dessas proteínas em tampão de pH 6,0 é aplicada em uma coluna de troca aniônica (troca ânions), uma delas é eluída normalmente, enquanto a outra só é eluída após adição de tampão com quantidades crescentes de NaCl.



Baseado nos dados acima, diga qual proteína é eluída após adição de NaCl, **justificando** sua resposta.

c) Você é o farmacêutico responsável por uma indústria alimentícia. Entre os componentes para a fabricação de diversos produtos da indústria está a enzima alfa-amilase. Ao entrar em contato com um fornecedor para a compra de um lote da enzima para hidrolisar amido, o vendedor lhe oferece 500 g da enzima com 99% de pureza. Essa é a única informação fornecida com relação à qualidade da enzima sendo negociada. Você compraria desse fornecedor?

2. Para obter um emprego de bioquímico, solicita-se que você assista a um vídeo que mostra uma colega purificando a citrato sintase a partir de coração de boi. Em determinados passos do protocolo (descrito abaixo) o entrevistador para o vídeo e lhe coloca questões. Responda as questões formuladas em *“itálico”*.

a) Vinte quilos de coração bovino são retirados de um matadouro e transportados ao laboratório em gelo. O bioquímico começa a processar os corações e realiza todas as etapas numa câmara fria ( $\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ou sob gelo. O tecido cardíaco é picado, suspenso em uma solução de sacarose 0,2 M tamponada a pH 7,2 e homogeneizado com um homogeneizador de alta velocidade. *Porque foi utilizado tecido cardíaco e em grande quantidade para purificar a citrato sintase? Qual o propósito de manter o tecido frio e suspendê-lo em sacarose 0,2 M a pH 7,2? O que ocorre com o tecido quando é homogenizado?*

b) O homogenato do tecido, que é denso e opaco, é submetido a uma série de etapas de centrifugação diferencial. *O que se consegue com esse procedimento?*

c) A purificação continua com a fração que contém principalmente mitocôndrias intactas. *Por que?*

d) Essas são então lisadas osmoticamente. O lisado que é menos denso que o homogenado, mais ainda opaco, consiste principalmente de membranas mitocondriais e conteúdo mitocondrial interno. *Qual a finalidade da lise?*

e) Ao lisado, adiciona-se sulfato de amônio até uma concentração específica. A solução é centrifugada, o precipitado descartado e o sobrenadante recolhido. A este, que é mais claro que o lisado, adiciona-se mais sulfato de amônio. Nova centrifugação é realizada, mas desta vez, o precipitado é recolhido porque contém a proteína de interesse. *Qual o objetivo de se adicionar sulfato de amônio? Por que a proteína precipita? Qual a razão para se adicionar o sal em duas etapas?*

f) O precipitado de sulfato de amônio é solubilizado e dialisado contra grandes volumes de uma solução tamponada a pH 7,2. *Qual é a finalidade da diálise? Por que o sulfato de amônio não é incluído no tampão de diálise? Por que se utiliza uma solução tamponada em vez de água?*

g) A solução dialisada é aplicada em uma coluna de cromatografia por exclusão. A eluição das proteínas da coluna é acompanhada por medidas de absorção de luz das frações a 280 nm. A primeira fração proteica que sai da coluna é recolhida e todas as outras frações são descartadas. *Como as proteínas são separadas na cromatografia de exclusão? Por que a absorção de luz a 280 nm é uma boa maneira de se monitorar a presença de proteínas nas frações eluídas?*

h) Para identificar as frações contendo citrato sintase foram realizadas medidas de atividade da enzima. As frações contendo atividade citrato sintase foram reunidas e aplicadas numa coluna cromatográfica de troca catiônica. Após desprezar a solução inicial que deixa a coluna, o bioquímico adiciona uma solução de pH mais alto à coluna e colhe a fração proteica que é imediatamente eluída. *Qual a razão para o bioquímico fazer isso? Qual é a carga de uma coluna de troca catiônica? Qual é a carga da proteína nas condições da cromatografia?*

**3.** Uma bioquímica conseguiu purificar uma celulase através da marcha de purificação a seguir.

1º passo: cromatografia de troca aniônica em pH 10.

2º passo: cromatografia de filtração em gel em pH 6,0.

Após cada passo os tubos que continham a atividade de celulase foram reunidos. Para esse material foi calculada a atividade enzimática total de celulase e também a quantidade de proteína. A tabela abaixo resume estes resultados.

Passo	Atividade de celulase aplicada (U)	Atividade de celulase recuperada (U)	Proteína total aplicada (mg)	Proteína total recuperada (mg)
Troca iônica	500	100	1.0	0.05
Filtração em gel	100	80	0.05	0.02

Após cada cromatografia os tubos que continham atividade de celulase também foram reunidos e analisados por SDS-PAGE. Os resultados são mostrados na Figura abaixo.

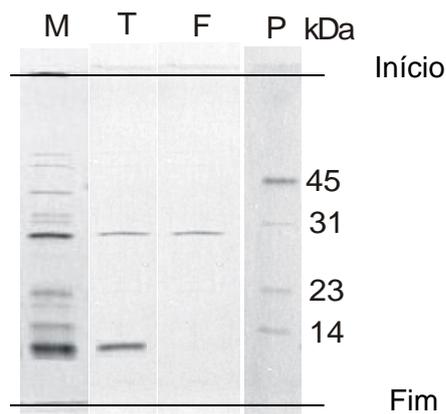


Figura. SDS-PAGE dos materiais recolhidos ao longo da marcha de purificação. M – meio de cultura; T – material recuperado após cromatografia de troca aniônica. F – material recuperado após cromatografia de filtração em gel; P – padrões de peso molecular.

Para o experimento de filtração em gel usado na marcha de purificação, primeiramente foi construída uma curva de calibração com proteínas de diferentes pesos moleculares. Os dados obtidos estão descritos na tabela abaixo juntamente com o resultado para cromatografia da celulase.

Tabela 2 – Volumes de eluição na cromatografia de filtração em gel em uma coluna cujo, volume total é 25ml.

Material	Volume de eluição (mL)
Proteína padrão de 2.000.000 daltons	7.53
Proteína padrão de 66.000 daltons	9.38
Proteína padrão de 45.000 daltons	10.46
Proteína padrão de 12.400 daltons	13.70
Proteína padrão de 6.500 daltons	16.22
ATIVIDADE CELULÁSICA	9.58

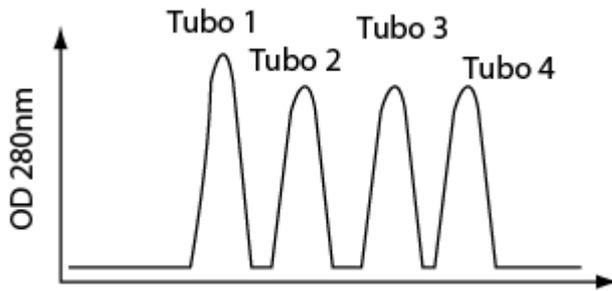
a) Calcule a recuperação da atividade enzimática após cada um dos passos da purificação da celulase.

b) Calcule a atividade específica da celulase após cada um dos passos da marcha de purificação.

c) Qual dos passos é melhor na purificação desta enzima? Por quê?

d) Calcule a massa molecular da enzima determinada por SDS-PAGE e por filtração em gel. Compare os valores e formule hipóteses para explicar os resultados.

4. Um bioquímico recebeu uma amostra para análise. Nela, havia diversas proteínas que precisavam ser separadas umas das outras. Numa primeira etapa, o bioquímico utilizou uma coluna de gel filtração recomendada para proteínas de alto peso molecular (>60 kDa) e obteve o seguinte perfil de eluição:



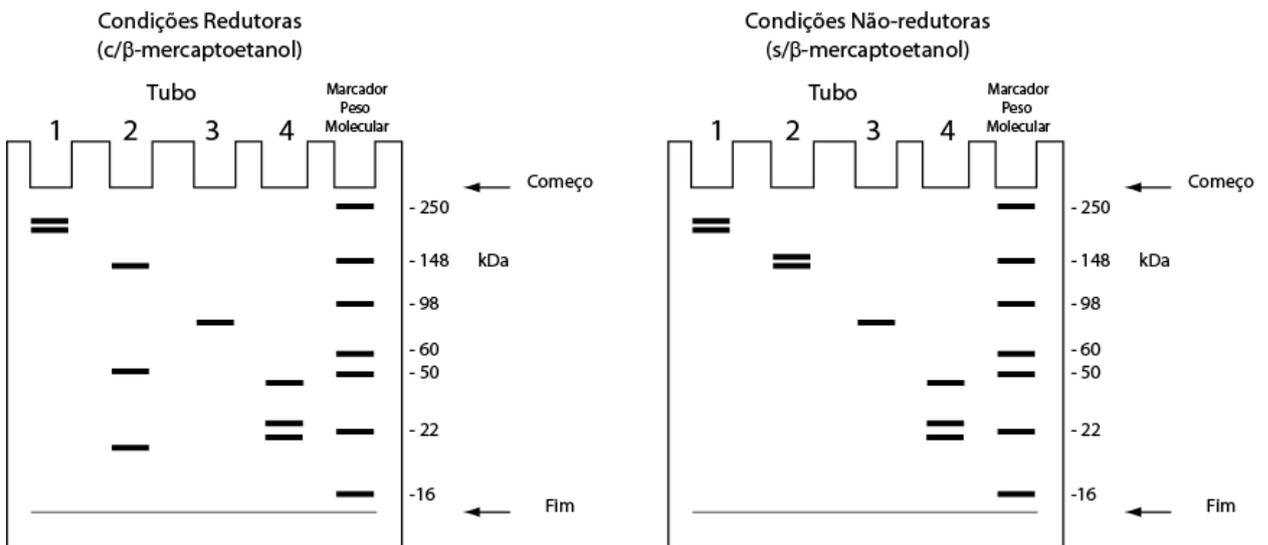
**Figura** - Perfil da cromatografia de gel filtração em Superdex-200. As proteínas separadas foram coletadas nos tubos 1, 2, 3 e 4, conforme indicado na figura. Os volumes aproximados de eluição para cada tubo foram:

Tubo 1 = 10 ml; Tubo 2 = 11 ml; Tubo 3 = 13 ml; Tubo 4 = entre 14,5 e 15 ml  
 Volumes aproximados (+/- 0,5 ml)

Usando essa mesma coluna de gel filtração, nas mesmas condições da corrida anterior, o bioquímico analisou os padrões de peso molecular, obtendo os seguintes resultados:

Padrão	Vol. Eluição (ml)
Proteína padrão de 2.000 kDa	7.53
Proteína padrão de 250 kDa	9.38
Proteína padrão de 170 kDa	10.46
Proteína padrão de 65 kDa	13.70
Proteína padrão de 24 kDa	16.22
Volume total da coluna = 25 ml	

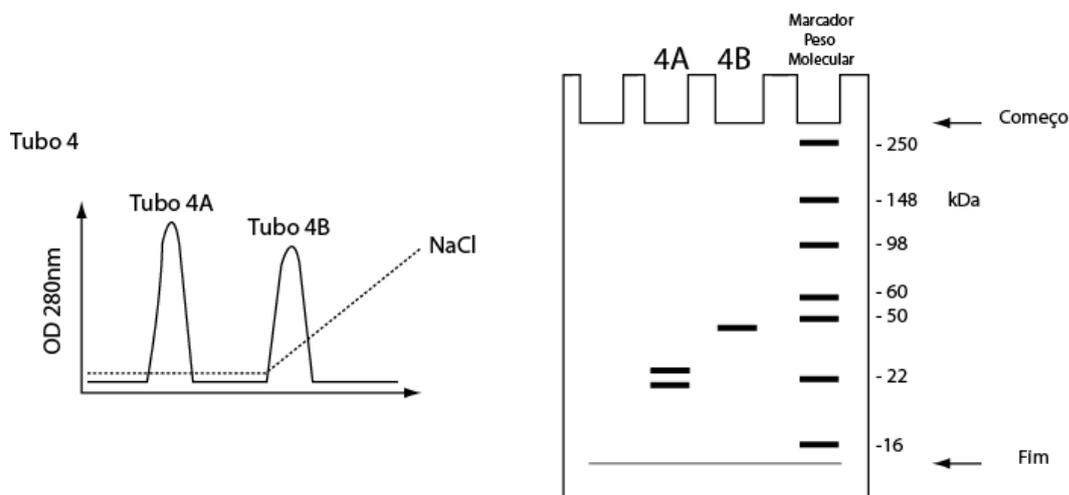
Os tubos marcados de 1 a 4 foram então analisados por SDS-PAGE em condições redutoras e não redutoras, sendo obtido o seguinte perfil:



**Figura** - Eletroforese de SDS-PAGE em condições redutoras (c/β-mercaptoetanol) e não redutoras das proteínas contidas nos tubos 1, 2, 3 e 4. No último poço, encontram-se os padrões de pesos moleculares.

Após analisar os dados, o bioquímico então decidiu submeter a amostra do tubo 4 a uma cromatografia de troca de ânions (-) em pH 7, seguida de eletroforese SDS-PAGE

das frações obtidas. Os resultados da cromatografia e da eletroforese estão na figura abaixo:



**Figura** - Cromatografia de troca de ânions das proteínas no tubo 4 e eletroforese das proteínas presentes nos tubos 4A e 4B.

O bioquímico deu-se então por satisfeito e escreveu o seu relatório final.

- Quantas proteínas estavam presentes na amostra?
- Qual o peso molecular de cada uma delas? Quais continham mais de uma sub-unidade e qual o peso molecular de cada cadeia proteica?
- Qual o  $pI$  aproximado de cada proteína do tubo 4 (maior, menor ou próximo de 7)?

5. O tecido embrionário de fígado contém uma enzima que catalisa a reação  $S \longrightarrow P$ . O tecido de fígado de adultos também apresenta a mesma atividade enzimática ( $S \longrightarrow P$ ). Alguns dados cinéticos obtidos com extratos dos dois tecidos são apresentados abaixo.

[S] (M)	Velocidade Inicial Observada ( $\mu\text{-moles} \times \text{mg de proteína}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ )	
	Extrato de Fígado Adulto ( $E_1$ )	Extrato de Fígado Embrionário ( $E_2$ )
	$1,67 \times 10^{-5}$	1,05
$2,5 \times 10^{-5}$	1,54	6,66
$3,33 \times 10^{-5}$	1,98	8,00
$5,0 \times 10^{-5}$	2,86	10,00
$7,0 \times 10^{-5}$	3,78	11,67
$1,0 \times 10^{-4}$	5,00	13,33
$1,5 \times 10^{-4}$	6,67	15,0
$1,67 \times 10^{-4}$	7,15	15,4
$2,0 \times 10^{-4}$	8,00	16,0
$3,0 \times 10^{-4}$	10,00	17,1

A partir dos dados acima você conclui que essas enzimas são a mesma ou são enzimas diferentes? Justifique.

6. As prostaglandinas são responsáveis pela febre e dor associadas a processos inflamatórios. Esses mediadores são produzidos a partir do ácido araquidônico, um ácido graxo de 20 C, por meio de reações catalisadas pela prostaglandina endoperóxido sintase. Experimentos realizados com essa enzima em ausência e em presença do ibuprofeno, um medicamento largamente utilizado, forneceram os dados cinéticos apresentados na tabela abaixo.

Ácido araquidônico mM	Velocidade (mM/min)	
	sem ibuprofeno	com ibuprofeno (0,1 mM)
0,5	23,5	16,67
1,0	32,2	25,25
1,5	36,9	30,49
2,5	41,8	37,04
3,5	44,0	38,91

a) Calcule o  $K_M$  e o  $V_{m\acute{a}x}$  da prostaglandina endoperóxido sintase em ausência e em presença do ibuprofeno. **Mostre os seus cálculos.**

b) Que tipo de ação tem o ibuprofeno sobre a enzima? **Justifique detalhadamente sua resposta.**

c) Considere que a reação catalisada pela prostaglandina endoperóxido sintase possa ser simplificada pelo esquema abaixo e redesenhe o esquema em presença de ibuprofeno.



d) Defina a  $K_I$  para o ibuprofeno e calcule o seu valor.