



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"

Departamento de Ciências Biológicas

BIOQUÍMICA – LCB218

ROTEIRO DE AULAS PRÁTICAS

Docente:

Prof. Dra. Núbia Barbosa Eloy

Técnica Responsável: Aline Borges

Piracicaba – SP

SUMÁRIO

| Conteúdo | pg |
|---|-----------|
| 1. Colorimetria e Espectrofotometria | 03 |
| 2. Determinação de Lactose no leite | 07 |
| 3. Cromatografia em Papel de Filtro | 10 |
| 4. Determinação da Constante de Michaelis (Km) e da Velocidade máxima (Vm) para a Invertase de Levedura | 15 |
| Referências Bibliográficas | 19 |
| Tabela de Conversão T% em Absorbância | 20 |

COLORIMETRIA E ESPECTROFOTOMETRIA

1. OBJETIVOS

Dosagens de espécies químicas mediante a absorção de luz.

2. FUNDAMENTOS DO MÉTODO

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

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

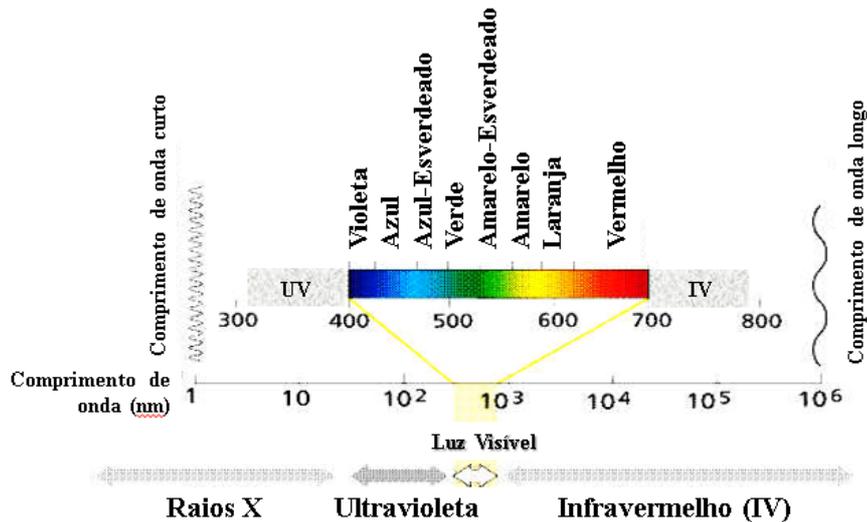
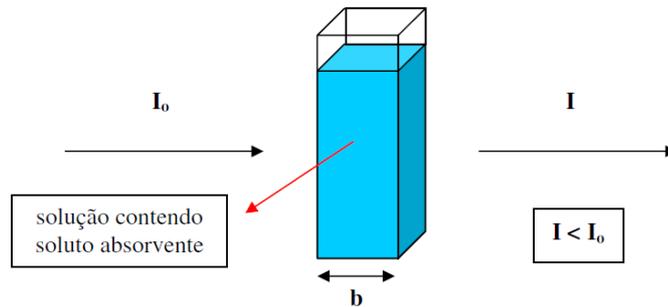


Figura 1. Espectro de absorção de luz em diversos comprimentos de onda (λ).

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

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

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



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

$$I < I_0$$

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

A Transmitância ou Transmissão ($T\%$) corresponde a:

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

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

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

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

$$Ab = 2 - \log T$$

3. MATERIAL

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

4. PRÁTICA

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

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

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

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

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

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

B. Demonstração da Lei de Lambert-Beer:

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

| Tubo (Nº) | Água (mL) | Corante* (mL) | Concentração Obtida ($\mu\text{g/mL}$) | Transmitância (T%)** | Absorbância (Abs) |
|-----------|-----------|---------------|---|----------------------|-------------------|
| 0 | 5 | 0 | | | |
| 1 | 4 | 1 | | | |
| 2 | 3 | 2 | | | |
| 3 | 2 | 3 | | | |
| 4 | 1 | 4 | | | |
| 5 | 0 | 5 | | | |
| 6 | 5 | mL | Encontrar no gráfico (Equação da Reta) | | |

* Alaranjado de Metila ou Azul de Bromofenol na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$.

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

QUESTIONÁRIO:

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

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

1. OBJETIVO

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

2. FUNDAMENTOS DO MÉTODO

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

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

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

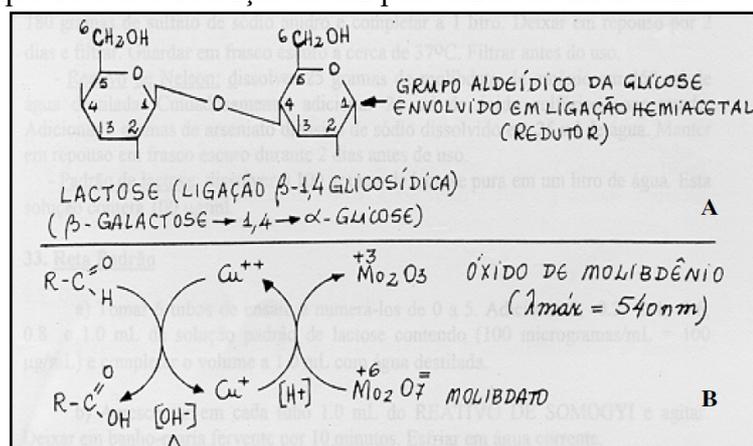


Figura 1. (A) Estrutura molecular do dissacarídeo lactose (β -galactose \rightarrow 1,4 \rightarrow α -glicose), evidenciando o carbono 1 contendo o grupo aldeído da glicose, envolvido em ligação hemiacetal (região redutora). (B) Reações envolvidas no método de Somogyi & Nelson, mostrando a formação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

Antes da reação quantitativa, a amostra de leite deve ser desproteinizada e clarificada, mediante precipitação de interferentes com $\text{Ba}(\text{OH})_2$ e ZnSO_4 .

3. MATERIAL

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

4. PRÁTICA

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

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

A. Preparo das Amostras de Leite

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

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

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

B. Determinação do Teor de Lactose no Leite

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

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

Em relação à Aula Prática, responder:

1. Qual a Equação da Reta através da análise de correlação linear entre os resultados da primeira tabela (Δ Abs X [lactose])?

2. Quais as concentrações das amostras desconhecidas?

Concentração de Lactose no Leite Ambiente ($\mu\text{g/mL}$)

Leite Geladeira ($\mu\text{g/mL}$)

Leite Sem Lactose ($\mu\text{g/mL}$)

3. Qual a concentração das amostras desconhecidas (Geladeira e Ambiente) em g/100 mL de leite (%), observar que a amostra de leite analisada foi diluída 1:500?

Teor de lactose no Leite Ambiente:% (m/v)

Leite Geladeira:% (m/v)

Leite Sem Lactose% (m/v)

4. Explique os resultados obtidos nas concentrações de lactose no leite Ambiente e Geladeira.

5. A amostra de leite sem lactose apresentou resultado esperado? Justifique.

CROMATOGRAFIA EM PAPEL DE FILTRO

1. OBJETIVO

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

2. FUNDAMENTOS DO MÉTODO

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

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

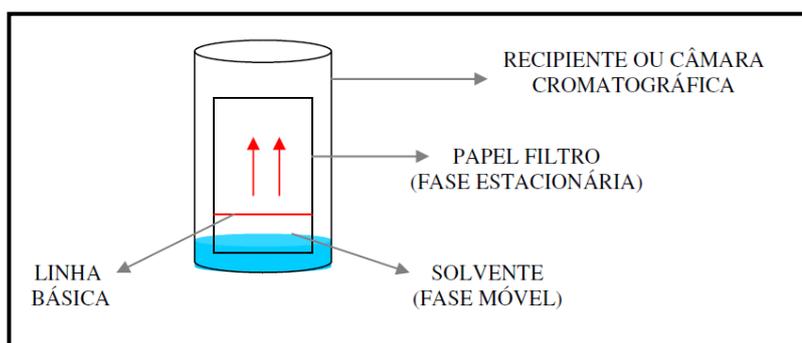


Figura 1. A migração da fase móvel (solvente) pelo papel filtro (fase estacionária) de modo ascendente (representado por setas vermelhas) é importante na técnica cromatográfica. Soluções de aminoácidos colocadas sobre a linha básica através de micropipetas serão transportadas pelo solvente a diferentes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

A partir da distância percorrida pelos aminoácidos desde a linha básica até o centro da mancha formada após a pulverização com ninhidrina, podemos calcular o chamado fator de retenção (Rf). Este pode ser definido como a relação existente entre a distância percorrida pelo

soluto – aminoácido (até o centro da mancha), pela distância total percorrida pelo solvente (Figura 2). O valor de Rf revela a solubilidade de cada aminoácido no solvente empregado.

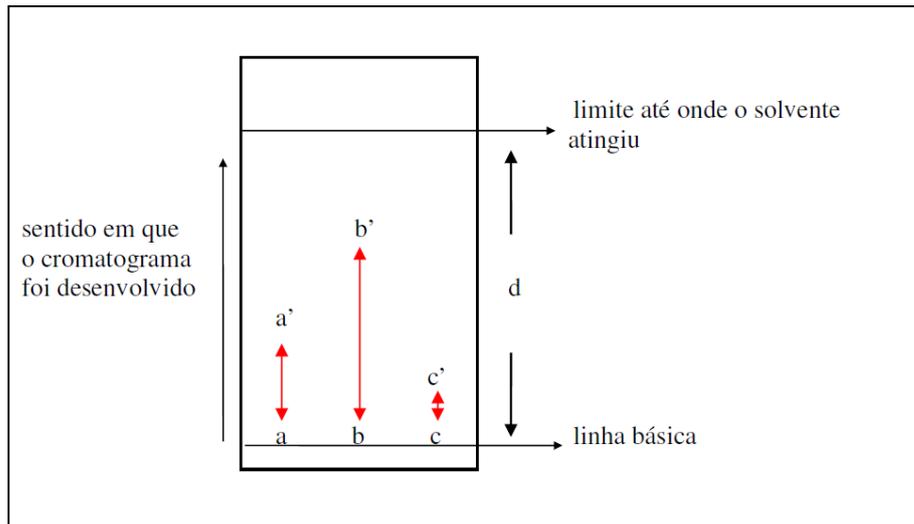


Figura 2. Soluções de aminoácidos a, b e c foram colocadas sobre a linha básica e percorreram as distâncias a', b' e c', respectivamente. A distância d refere-se à distância percorrida pelo solvente. Assim, os fatores de retenção para cada solução de aminoácido são: $R_{fa}=a'/d$; $R_{fb}=b'/d$; $R_{fc}=c'/d$.

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

Chama-se de Rf a relação:

$$\frac{A_l}{A_l + a A_s}$$

onde: a = coeficiente de partição

A_s = área ocupada pelo soluto na fase estacionária

A_l = área ocupada pelo soluto na fase móvel

B. Solventes usados em cromatografia:

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

Fenol - Água (80: 20)

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

Butanol: HaO (4: 1: 1)

Também empregado na cromatografia de aminoácidos, açúcares etc.

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

Existem basicamente dois modos de revelação

- **Pelo uso da luz Ultravioleta:** empregado quando os compostos possuem núcleo que revelam o comprimento de onda ao nível do U.V.;
- **Uso de reagentes:** comumente utiliza-se para açúcares e imersão na seguinte solução: 1 mL de anilina + 1g de difenilamina + 100 mL de acetona + 10 mL de H_2PO_4 a 85%.

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

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

3. MATERIAL

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

4. PRÁTICA

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

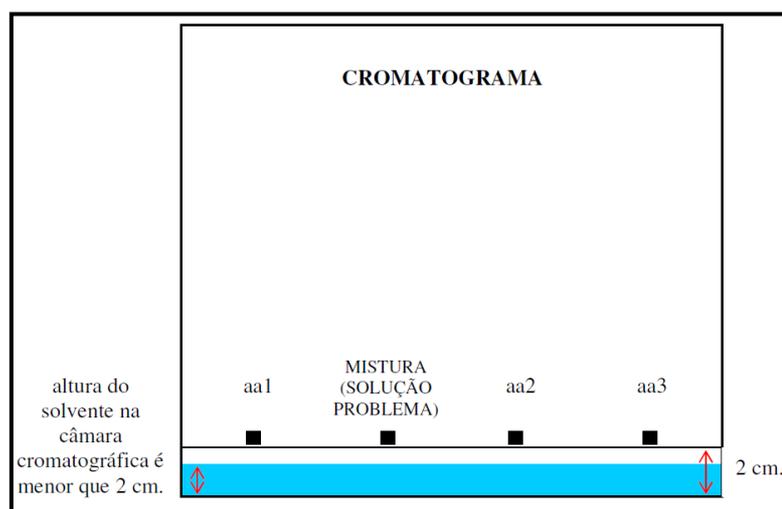


Figura 3. Distribuição das soluções de aminoácidos no cromatograma sobre a linha básica (dois centímetros acima do bordo inferior do papel). Notar que o solvente colocado na câmara cromatográfica atinge uma altura menor do que dois centímetros (considerando o cromatograma dentro da câmara). A solução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

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

5. QUESTIONÁRIO

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

1. Quais os aminoácidos estudados nesta aula e a classificação de cada um?
2. Qual Rf dos aminoácidos utilizados no experimento?
3. Qual aminoácido apresentou maior Rf e por quê?
4. Qual aminoácido apresentou menor Rf e por quê?
5. No que se baseia a coloração dos aminoácidos com a ninhidrina?
6. Por que a Prolina apresentou coloração amarela?
6. Quais aminoácidos estão presentes nas misturas 1, 2, 3 e 4?

DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE MÁXIMA (V_m) E DA CONSTANTE DE MICHAELIS (K_m) PARA A INVERTASE DE LEVEDURA

1. OBJETIVO

Determinar os parâmetros de V_m e K_m da enzima invertase utilizando a sacarose como substrato, mediante o estudo cinético da reação.

2. FUNDAMENTOS DO MÉTODO

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

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

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

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

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

3. MATERIAL

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

4. PRÁTICA

A. Extração da enzima

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

B. Ensaio enzimático

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

| Tubo (Nº) | Sacarose (75 mM) | Água Destilada (mL) | Invertase 1:50 (mL) |
|-----------|--|---------------------|---------------------|
| 0 | 0,0 | 1,0 | 0,5 |
| 1 | 0,1 | 0,9 | 0,5 |
| 2 | 0,2 | 0,8 | 0,5 |
| 3 | 0,4 | 0,6 | 0,5 |
| 4 | 0,8 | 0,2 | 0,5 |
| 5 | 1,0 | 0,0 | 0,5 |
| 6 | 1,0 | 0,0 | 0,0 |
| 7 | 1,5 mL de padrão contendo 40 ug de glicose | | |

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

Reação para dosagem de açúcares redutores.

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

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

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

| Tubo | Água dest. (mL) | Sacarose (mL) (75 mM) | [S] mM | Invertase Diluída | | Reat. Somogy (mL) | | Reat. Nelson (mL) | Água dest. (mL) | T% $\lambda=530\text{nm}$ | Abs. $\lambda=530\text{nm}$ |
|------|---|-----------------------|--------|-------------------|---------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|-----------------|---------------------------|-----------------------------|
| 0 | 1,00 | 0,00 | 0 | 0,5 | INCUBAR A 37°C POR 10 MIN | 1 | INCUBAR A 100°C POR 5 MIN | 1 | 4,5 | | |
| 1 | 0,90 | 0,10 | 5 | 0,5 | | 1 | | 1 | 4,5 | | |
| 2 | 0,80 | 0,20 | 10 | 0,5 | | 1 | | 1 | 4,5 | | |
| 3 | 0,60 | 0,40 | 20 | 0,5 | | 1 | | 1 | 4,5 | | |
| 4 | 0,20 | 0,80 | 40 | 0,5 | | 1 | | 1 | 4,5 | | |
| 5 | 0,00 | 1,00 | 50 | 0,5 | | 1 | | 1 | 4,5 | | |
| 6 | 0,5 | 1,00 | 50 | 0,0 | | 1 | | 1 | 4,5 | | |
| 7 | 1,5 mL de padrão contendo 40 μg de glicose | | | | | 1 | | 1 | 4,5 | | |

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

| Tubo (N°) | [S]* mM | Δ Abs. 530 nm | V (ug AR/10min) | V** (ug AR/h) | $\frac{1}{[S]}$ mM | $\frac{1}{V}$ (ug AR/h) |
|-----------|------------------|----------------------|-----------------|---------------|--------------------|-------------------------|
| 0 | | 0 | 0 | - | - | - |
| 1 | | | | | | |
| 2 | | | | | | |
| 3 | | | | | | |
| 4 | | | | | | |
| 5 | | | | | | |
| 6 | 40 ug de glicose | | - | - | - | - |

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

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

QUESTIONÁRIO - ENZIMAS

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

1. Completar a Tabela acima e utilizar os valores de Δ Abs. para calcular a velocidade da reação enzimática em ug de açúcar redutor (AR) por hora.
2. Demonstre os cálculos de obtenção das concentrações de Substrato
3. Obter os Gráficos 1e 2 abaixo, indicando os Valores de V_m e K_m da Invertase

4. Discuta por que ocorre diferença nos valores de absorbância nos tubos 0 e 6.

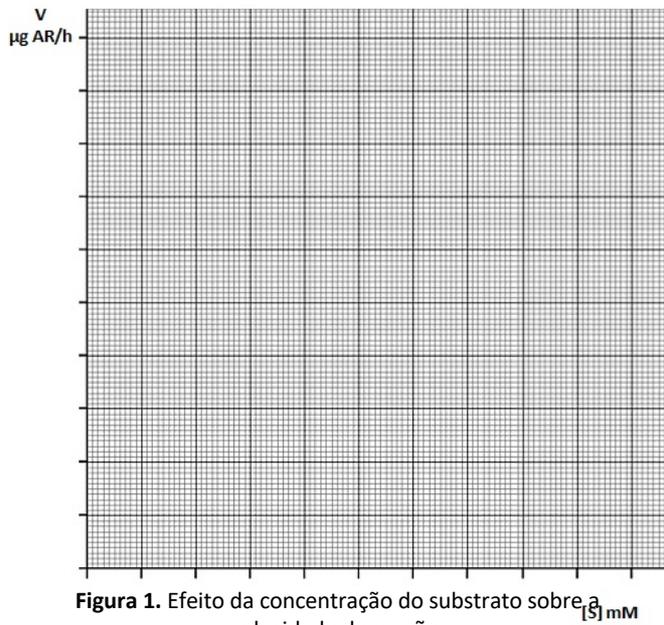


Figura 1. Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação.

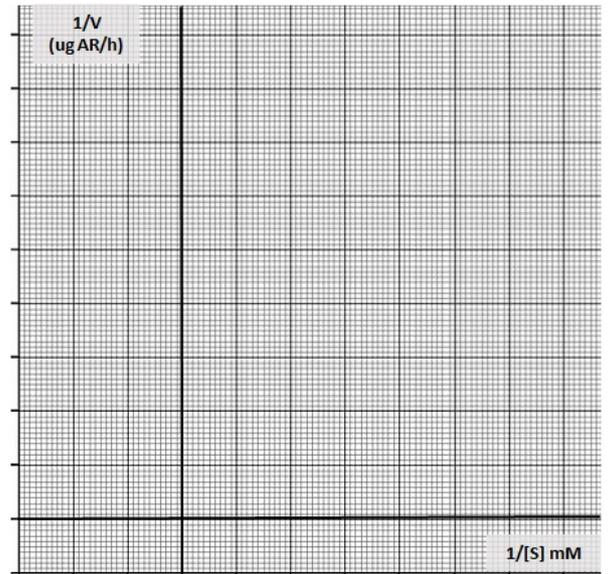


Figura 2. Gráfico representando a recíproca da hipérbole de Leneweaver-Burk.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVRON, M. "Mechanism of photoinduced electron transport in isolated chloroplasts", in D.R. Sanadi (ed.), **Current Topics of Bioenergetics**, 12, Academic Press, New York, 1967, p.1.
- JACOBS, M.B. **The Chemical Analysis of Foods and Food Products**. Van Nostrand, New York, 1958, 970p.
- LITWACK, G. **Experimental Biochemistry - A Laboratory Manual**. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1960, 313p.
- MARTELLI, H.L.; PANEK, A.D. **Bioquímica Experimental**. Ao Livro Técnico, Rio de Janeiro, 1968, 112p.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3a. Ed., Sarvier, São Paulo, 2002, 975p.
- VILLELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e Experimentos de Bioquímica**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1972, 522p.
- VILLELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e Experimentos de Bioquímica**. Koogan, Rio de Janeiro, 1973, 552p.
- WHARTON, D.C.; MC CARTY, R.E. **Experiments and Methods in Biochemistry**. McMillan Publishing Co, Inc., New York, 1972, 350p.

Tabela de Conversão

T em A x 1.000

| | <u>00</u> | <u>01</u> | <u>02</u> | ~ | <u>04</u> | <u>05</u> | <u>06</u> | <u>07</u> | <u>08</u> | <u>09</u> |
|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 0 | | 3.000 | 2699 | 2.523 | 2.398 | 2.301 | 2.222 | 2.155 | 2.097 | 2.046 |
| 1 | 2.000 | 1.959 | 1.921 | 1.886 | 1.854 | 1.824 | 1.796 | 1.770 | 1.745 | 1.721 |
| 2 | 1.699 | 1.678 | 1.658 | 1.638 | 1.620 | 1.602 | 1.585 | 1.569 | 1.553 | 1.538 |
| 3 | 1.523 | 1.509 | 1.495 | 1.481 | 1.469 | 1.458 | 1.444 | 1.432 | 1.420 | 1.409 |
| 4 | 1.398 | 1.387 | 1.377 | 1.387 | 1.357 | 1.347 | 1.337 | 1.328 | 1.319 | 1.310 |
| 5 | 1.301 | 1.292 | 1.284 | 1.276 | 1.268 | 1.260 | 1.252 | 1.244 | 1.237 | 1.229 |
| 6 | 1.222 | 1.215 | 1.208 | 1.201 | 1.194 | 1.187 | 1.180 | 1.174 | 1.167 | 1.161 |
| 7 | 1.155 | 1.149 | 1.143 | 1.137 | 1.131 | 1.125 | 1.119 | 1.114 | 1.108 | 1.102 |
| 8 | 1.097 | 1.092 | 1.086 | 1.081 | 1.076 | 1.071 | 1.066 | 1.060 | 1.056 | 1.051 |
| 9 | 1.048 | 1.041 | 1.036 | 1.032 | 1.027 | 1.022 | 1.018 | 1.013 | 1.009 | 1.004 |
| 10 | 1.000 | 0.996 | 0.991 | 0.987 | 0.983 | 0.979 | 0.975 | 0.971 | 0.967 | 0.963 |
| 11 | 959 | 955 | 951 | 947 | 943 | 939 | 938 | 932 | 928 | 924 |
| 12 | 921 | 917 | 914 | 910 | 907 | 903 | 900 | 896 | 893 | 889 |
| 13 | 886 | 883 | 879 | 876 | 873 | 870 | 866 | 863 | 860 | 857 |
| 14 | 854 | 851 | 848 | 845 | 842 | 839 | 836 | 833 | 830 | 827 |
| 15 | 824 | 821 | 818 | 815 | 812 | 810 | 807 | 804 | 801 | 799 |
| 16 | 796 | 793 | 790 | 788 | 785 | 783 | 780 | 777 | 775 | 772 |
| 17 | 770 | 767 | 764 | 762 | 759 | 757 | 764 | 752 | 750 | 747 |
| 18 | 745 | 745 | 742 | 738 | 735 | 733 | 730 | 728 | 726 | 724 |
| 19 | 721 | 719 | 717 | 714 | 712 | 710 | 708 | 706 | 703 | 701 |
| 20 | 699 | 697 | 695 | 693 | 690 | 688 | 686 | 684 | 682 | 680 |
| 21 | 678 | 676 | 674 | 672 | 670 | 668 | 666 | 664 | 662 | 660 |
| 22 | 658 | 656 | 654 | 652 | 650 | 648 | 646 | 644 | 642 | 640 |
| 23 | 638 | 636 | 635 | 633 | 631 | 629 | 627 | 625 | 623 | 622 |
| 24 | 620 | 618 | 616 | 614 | 613 | 611 | 609 | 607 | 606 | 604 |
| 25 | 602 | 600 | 599 | 597 | 595 | 593 | 592 | 590 | 588 | 587 |
| 26 | 585 | 583 | 582 | 580 | 578 | 577 | 575 | 573 | 572 | 570 |
| 27 | 569 | 567 | 565 | 564 | 562 | 561 | 559 | 558 | 556 | 554 |
| 28 | 553 | 551 | 550 | 548 | 547 | 545 | 544 | 542 | 541 | 539 |
| 29 | 538 | 536 | 535 | 533 | 532 | 530 | 529 | 527 | 528 | 524 |
| 30 | 523 | 521 | 520 | 519 | 517 | 516 | 514 | 513 | 511 | 510 |
| 31 | 509 | 507 | 506 | 504 | 503 | 502 | 500 | 499 | 498 | 495 |
| 32 | 495 | 493 | 492 | 491 | 489 | 488 | 487 | 485 | 484 | 483 |
| 33 | 481 | 480 | 479 | 478 | 476 | 475 | 474 | 472 | 471 | 470 |
| 34 | 469 | 467 | 468 | 465 | 463 | 462 | 461 | 460 | 458 | 457 |
| 35 | 456 | 455 | 453 | 452 | 451 | 450 | 449 | 447 | 446 | 445 |
| 36 | 444 | 442 | 441 | 440 | 439 | 438 | 437 | 435 | 334 | 433 |
| 37 | 432 | 431 | 429 | 428 | 427 | 426 | 425 | 424 | 423 | 421 |
| 38 | 420 | 419 | 418 | 417 | 416 | 415 | 413 | 412 | 411 | 410 |
| 39 | 409 | 408 | 407 | 406 | 405 | 403 | 402 | 401 | 400 | 399 |
| 40 | 398 | 397 | 396 | 395 | 394 | 393 | 391 | 390 | 389 | 388 |
| 41 | 387 | 386 | 385 | 384 | 383 | 382 | 381 | 380 | 379 | 378 |
| 42 | 377 | 376 | 375 | 374 | 373 | 372 | 371 | 370 | 369 | 368 |
| 43 | 367 | 366 | 365 | 364 | 363 | 362 | 361 | 360 | 359 | 358 |
| 44 | 357 | 356 | 355 | 354 | 353 | 352 | 351 | 350 | 349 | 348 |
| 45 | 347 | 346 | 345 | 344 | 343 | 342 | 341 | 340 | 339 | 338 |
| 46 | 337 | 336 | 335 | 334 | 333 | 333 | 332 | 331 | 330 | 329 |
| 47 | 328 | 327 | 328 | 326 | 325 | 324 | 323 | 322 | 321 | 320 |
| 48 | 319 | 318 | 317 | 316 | 315 | 314 | 313 | 312 | 312 | 311 |
| 49 | 310 | 309 | 308 | 307 | 306 | 305 | 305 | 304 | 303 | 302 |
| | <u>00</u> | <u>01</u> | <u>02</u> | <u>03</u> | <u>04</u> | <u>05</u> | <u>06</u> | <u>07</u> | <u>08</u> | <u>09</u> |
| 50 | 301 | 300 | 299 | 298 | 298 | 297 | 296 | 295 | 294 | 293 |
| 51 | 292 | 292 | 291 | 290 | 289 | 288 | 287 | 287 | 286 | 285 |
| 52 | 284 | 283 | 282 | 281 | 281 | 280 | 279 | 278 | 277 | 277 |
| 53 | 278 | 275 | 274 | 273 | 272 | 272 | 271 | 270 | 269 | 268 |
| 54 | 268 | 267 | 266 | 265 | 264 | 264 | 263 | 262 | 261 | 260 |
| 55 | 250 | 259 | 258 | 257 | 257 | 256 | 255 | 254 | 253 | 253 |
| 56 | 252 | 251 | 250 | 249 | 249 | 248 | 247 | 246 | 246 | 245 |
| 57 | 244 | 243 | 243 | 242 | 241 | 240 | 240 | 239 | 238 | 237 |
| 58 | 237 | 236 | 235 | 234 | 234 | 233 | 232 | 231 | 231 | 230 |
| 59 | 229 | 228 | 228 | 227 | 226 | 225 | 225 | 224 | 223 | 223 |
| 60 | 222 | 221 | 220 | 220 | 219 | 218 | 218 | 217 | 216 | 215 |
| 61 | 215 | 214 | 213 | 213 | 212 | 211 | 210 | 210 | 209 | 208 |
| 62 | 208 | 207 | 206 | 206 | 205 | 204 | 203 | 203 | 202 | 202 |
| 63 | 201 | 200 | 199 | 199 | 198 | 197 | 197 | 196 | 195 | 194 |
| 64 | 194 | 193 | 192 | 192 | 191 | 190 | 190 | 189 | 188 | 188 |
| 65 | 187 | 186 | 186 | 185 | 184 | 184 | 183 | 182 | 182 | 181 |
| 66 | 180 | 180 | 179 | 178 | 178 | 177 | 177 | 176 | 175 | 175 |
| 67 | 174 | 173 | 173 | 172 | 171 | 171 | 170 | 169 | 169 | 168 |
| 68 | 167 | 167 | 166 | 166 | 165 | 164 | 164 | 163 | 162 | 162 |
| 69 | 161 | 161 | 160 | 159 | 159 | 158 | 157 | 157 | 156 | 156 |
| 70 | 155 | 154 | 154 | 153 | 152 | 152 | 151 | 151 | 150 | 149 |
| 71 | 149 | 148 | 148 | 147 | 146 | 146 | 145 | 144 | 144 | 143 |
| 72 | 143 | 142 | 141 | 141 | 140 | 140 | 139 | 138 | 138 | 137 |
| 73 | 137 | 136 | 135 | 135 | 134 | 134 | 133 | 133 | 132 | 132 |
| 74 | 131 | 130 | 130 | 129 | 128 | 128 | 127 | 127 | 126 | 126 |
| 75 | 125 | 124 | 124 | 123 | 123 | 122 | 121 | 121 | 120 | 120 |
| 76 | 119 | 119 | 118 | 117 | 117 | 116 | 116 | 115 | 115 | 114 |
| 77 | 114 | 113 | 112 | 112 | 111 | 111 | 110 | 110 | 109 | 109 |
| 78 | 108 | 107 | 107 | 106 | 106 | 105 | 105 | 104 | 103 | 103 |
| 79 | 102 | 102 | 101 | 101 | 100 | 100 | 099 | 099 | 098 | 097 |
| 80 | 097 | 096 | 096 | 095 | 095 | 094 | 094 | 093 | 093 | 092 |
| 81 | 092 | 091 | 090 | 090 | 089 | 089 | 088 | 088 | 087 | 087 |

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