



BIOQUÍMICA EXPERIMENTAL

Licenciatura e Bacharelado em Química

5931022

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E
LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO - USP
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROF. DR. ARTHUR H.C. DE OLIVEIRA

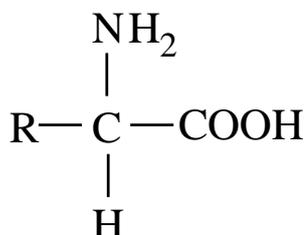
Auxílio técnico: Aline Chiba e Simone Perche

Monitor: Rafael B. P. Jeronymo e Carolina V. Garbelotti

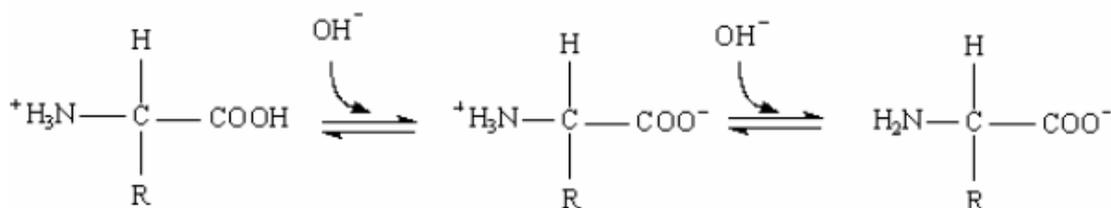
2023

PRÁTICA 1: PROPRIEDADES ÁCIDO-BASE DE AMINOÁCIDOS

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas. Os L α -aminoácidos são as unidades fundamentais que compõem todas as proteínas conhecidas. Sua estrutura geral é a seguinte:



O grupo **R**, denominado cadeia lateral, é diferente em cada um dos aminoácidos, contrariamente ao restante da estrutura, que é constante. A presença de pelo menos um grupo amina ($-\text{NH}_2$) e um grupo carboxila ($-\text{COOH}$) na molécula confere aos aminoácidos caráter anfotérico em solução aquosa. Estes grupos podem sofrer protonações e desprotonações reversíveis, comportando-se como eletrólitos fracos. Considerando-se suas formas ácidas ($-\text{COOH}$ e $-\text{NH}_3^+$), é fácil observar que cada grupo apresenta um valor de pKa. Além destes, outros grupos ionizáveis podem estar presentes na cadeia lateral dos diferentes aminoácidos, e nesse caso, o aminoácido apresentará um terceiro valor de pKa. Os grupos ionizáveis conferem aos aminoácidos a capacidade de atuarem como um sistema tampão. Conseqüentemente, as proteínas apresentarão também esta propriedade, uma vez que são polímeros de aminoácidos.



A classificação dos aminoácidos baseia-se particularmente na polaridade dos grupos **R** em pH biológico (≈ 7). Dessa forma, distinguem-se 5 classes principais de aminoácidos: alifáticos (não polares); aromáticos; polares não

carregados; carregados positivamente (básicos) e carregados negativamente (ácidos).

Os aminoácidos podem ser **titulados potenciométricamente**, apresentando curvas de titulação características, de acordo com os grupos ionizáveis presentes em sua estrutura. Os métodos de **análise potenciométrica** são baseados nas medidas das variações de potencial que ocorrem durante a titulação de uma solução de concentração desconhecida. Nas medidas potenciométricas, o potencial de uma solução é sempre dado em relação ao potencial de um eletrodo de referência, que pode ser o eletrodo de prata/cloreto de prata ou o eletrodo de calomelano saturado. Neste curso, será considerada apenas a parte da potenciometria referente a medidas de pH. A maneira mais efetiva de medir precisamente o valor do pH de um sistema bioquímico ou de uma solução qualquer é utilizando um **pHmetro** equipado com um **eletrodo de vidro**.

Por outro lado, os aminoácidos podem ser separados por **cromatografia em papel**, em função das diferentes polaridades de seus grupos **R**. A cromatografia em papel é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, por meio da distribuição destes componentes entre duas fases que estão em contato. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da **fase móvel** pela **fase estacionária**, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferentes destes componentes. Os componentes menos solúveis na fase estacionária têm uma movimentação mais rápida ao longo do papel, enquanto que os mais solúveis na fase estacionária são seletivamente retidos, tendo uma movimentação mais lenta. Sob um conjunto adequado de condições (pH, polaridade do solvente empregado, etc) cada aminoácido de uma mistura irá se deslocar a uma velocidade diferente sobre a fase estacionária e estará a uma distância específica do ponto de origem, quando cessar o fluxo da fase móvel.

A cromatografia em papel é uma microtécnica muito útil para a separação e análise qualitativa de componentes de uma mistura. A forma mais simples de cromatografia em papel é a **cromatografia ascendente**, apresentada nesta prática. Devido ao fato dos aminoácidos não absorverem luz na faixa de comprimentos de onda da luz visível, é necessário empregar um método de

revelação para localizá-los após a cromatografia. A **ninidrina** é muito utilizada como substância reveladora, pois reage com os grupos amina livres, tornando evidentes as manchas correspondentes a cada aminoácido após a migração.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A. Titulação potenciométrica de um aminoácido.

Titular 10,0 mL de uma solução de glicina, arginina ou ácido glutâmico, aproximadamente 0,1 M (fornecida pelo professor). Para isto, pipetar num bequer de 100 mL, 10,0 mL da solução a ser titulada e adicionar água destilada em quantidade suficiente para cobrir o bulbo do eletrodo de vidro, mergulhado na solução. Colocar numa bureta de 25 mL a solução de NaOH padronizada (fornecida pelo professor). Adicionar pequenos incrementos (0,5mL) da solução básica ao bequer, agitar (agitador magnético) e medir o pH após cada adição. **Desligar o agitador antes de realizar cada medida de pH.** Repetir o mesmo procedimento empregando como titulante solução padrão de HCl.

ATENÇÃO: antes de iniciar a titulação, determinar o pH da solução inicial.

IMPORTANTE:

- a. O pHmetro deve sempre ser calibrado com uma solução de pH conhecido, antes de se iniciarem as determinações.
- b. O eletrodo deve ser bem lavado (usar uma piceta contendo água destilada) antes e depois de cada titulação.

Questões:

1. Escrever a equação de dissociação do aminoácido titulado.

2. Traçar um gráfico de pH x mols de OH⁻ e H⁺ adicionados.
3. Comparar as curvas de titulação obtidas com as curvas esperadas, com base nos valores de pK_a dos grupos presentes na molécula de cada aminoácido.
4. Em que faixas de pH os aminoácidos titulados podem atuar como tampões? Justifique sua resposta a partir de seus resultados.

B. Cromatografia em papel de uma mistura de aminoácidos.

Usar um pedaço de papel de filtro, na direção e orientação das fibras de celulose, com dimensões 23 x 16 cm (já fornecido pelos técnicos). Traçar **com lápis** uma linha ao longo do comprimento maior, a 2 cm da borda. Deixar uma margem de 3 cm de cada lado, marcando estes pontos, **com lápis**. Marcar quatro pontos intermediários entre os dois anteriores, sobre a linha, com distâncias de 3,5 cm um do outro e numerar todos os pontos **a lápis**, de 1 a 6. As amostras a seguir devem ser aplicadas nos pontos numerados, utilizando um capilar, de tal modo que a mancha formada sobre o papel seja a menor possível:

ATENÇÃO: Evitar tocar sem uso de luvas a superfície do papel durante toda a operação.

- 1) Solução aquosa de ácido glutâmico 0,1 mol.L⁻¹
- 2) Solução aquosa de alanina 0,1 mol.L⁻¹
- 3) Solução aquosa de arginina 0,1 mol.L⁻¹
- 4) Solução aquosa de leucina 0,1 mol.L⁻¹
- 5) Solução aquosa de prolina 0,1 mol.L⁻¹
- 6) Solução aquosa de tirosina 0,1 mol.L⁻¹

Enrolar o papel de modo a transformá-lo em um cilindro e prender as extremidades superiores com um clipe. Colocar 25 ml de solvente de Partridge [n-

butanol/ácido acético glacial/água (4: 1: 1)] no fundo de um béquer de 2 L e mergulhar o cilindro de papel em seu interior de modo que este fique perfeitamente na vertical. **Evitar que o papel toque na parede do béquer.** Cobrir o béquer com um vidro de relógio grande e deixar o solvente migrar 10 cm. Retirar o papel e marcar imediatamente a linha de frente do solvente. Secar o papel na capela.

Após secar, pulverizar o cromatograma com (ou passar sobre ele, com algodão) solução de ninidrina 0,1% em etanol e secá-lo com o auxílio de um secador de cabelos (ar quente) ou na estufa entre 80-100°C por alguns minutos.

Encontrar o centro de cada mancha e calcular o R_f (fator de retenção) de cada aminoácido, através da seguinte equação:

$$R_f = \frac{d}{D}$$

onde d = distância percorrida pela mancha;

D = distância percorrida pelo eluente.

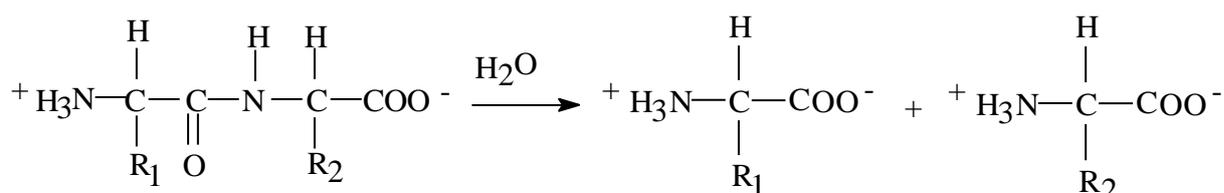
Questões:

1. Escreva a estrutura dos aminoácidos utilizados e classifique-os de acordo com a natureza da cadeia lateral.
2. Escreva a reação dos aminoácidos utilizados com a ninidrina.
3. Na cromatografia em papel, qual a fase móvel e qual a fase estacionária? Quais os princípios físico-químicos da separação dos aminoácidos por esta técnica?
4. Determine o R_f de todos os aminoácidos e faça uma discussão, em termos químicos, a respeito dos diferentes valores encontrados.

PRÁTICA 2: -REAÇÕES DE CARACTERIZAÇÃO DE AMINOÁCIDOS E PROTEÍNA; MÉTODOS DE DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A: Caracterização de aminoácidos:

Assim como outras moléculas orgânicas, as proteínas sofrem reações químicas características de seus grupos funcionais, ou seja, os grupos amino e carboxila livres e as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos que as compõem (grupos R). As ligações peptídicas podem ser hidrolisadas por aquecimento com ácido ou base forte, liberando os aminoácidos constituintes da proteína:



B: REAÇÕES DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS: MÉTODOS DE DOSAGEM DE PROTEÍNAS

B1. SOLUBILIDADE DE PROTEÍNAS

A **solubilidade** de uma proteína reflete um delicado equilíbrio entre diferentes interações energéticas, no interior da proteína, entre a proteína e o solvente em que ela se encontra e entre diferentes moléculas de proteína. Conseqüentemente, mudanças no meio ambiente em que está a proteína podem afetar tanto sua solubilidade quanto estrutura.

Extremos de pH, bem como a presença de certos solventes orgânicos miscíveis com a água, tais como álcool e acetona, ou ainda certos solutos, como a uréia, podem levar à desnaturação e posterior precipitação da proteína.

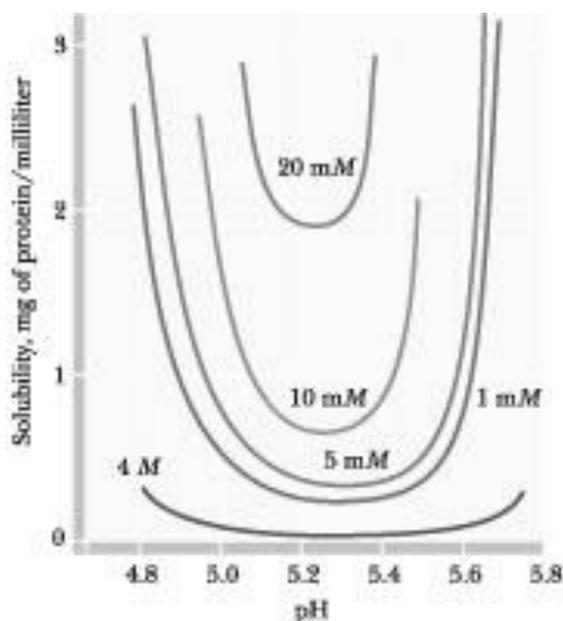
Nenhum desses tratamentos implica em quebra de ligações covalentes na cadeia polipeptídica. Os solventes orgânicos e a uréia agem primariamente quebrando as interações hidrofóbicas que mantêm estáveis as proteínas globulares. Já extremos de pH afetam de maneira abrupta a carga de grupos ionizáveis presentes nas proteínas, com isso causando repulsão ou diminuindo forças de atração eletrostática no interior da molécula; pode ocorrer ainda a quebra de pontes de hidrogênio.

As proteínas também mostram uma variação na solubilidade que depende da concentração de sais em solução, sendo a maioria das proteínas muito pouco solúvel em água pura. O efeito de sais, tais como cloreto de sódio, de aumentar a solubilidade de proteínas é freqüentemente denominado **salting-in** e está relacionado a uma diminuição das interações entre grupos carregados de moléculas da mesma ou de diferentes proteínas. Por outro lado, certos sais, como o sulfato de amônio, em altas concentrações, são capazes de induzir um grande decréscimo da solubilidade das proteínas (**salting-out**), pois competem efetivamente com estas pelas moléculas de água disponíveis. Nessa situação, as moléculas protéicas tendem a se associar, pois as interações proteína-proteína tornam-se energeticamente mais favorecidas que as interações proteína-água. Cada proteína tem um ponto de **salting-out** característico, o que pode ser explorado em separações de misturas protéicas em seus componentes.

As 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.

Os valores do pI das proteínas são característicos e refletem a proporção de aminoácidos ácidos e básicos na sua molécula. A pepsina, por exemplo, uma das enzimas da digestão, apresenta um valor de pI igual a 1 e a relação entre aminoácidos ácidos e básicos é de 15:1. Entretanto, o pI das proteínas não pode ser calculado a partir dos valores de pKa dos aminoácidos componentes isolados, uma vez que esses valores variam de acordo com as vizinhanças do aminoácido na molécula proteica. Como pode ser visto na figura abaixo, a solubilidade de uma proteína pode variar com a concentração salina ([NaCl], indicada próximo a cada curva). 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 uma precipitação no pI para purificar uma proteína específica.



B2. Espectrofotometria e dosagem de proteína

A espectrofotometria é um método instrumental de análise de soluções que permite determinar sua concentração em função de uma de suas propriedades, a **absorção de luz**. É um dos métodos mais versáteis e mais largamente utilizados em bioquímica e possui vantagens definitivas: é um método **não destrutivo** e que oferece **seletividade**, uma vez que cada composto tem um espectro característico; pode-se, assim, ter meios de determinar a concentração de um único composto numa solução, sem interferência dos demais, o que é de grande valia, por exemplo, para monitorar a concentração de uma determinada espécie numa mistura de reação; é, ainda, um método que permite determinações de alta precisão num curto espaço de tempo.

Conceitos Básicos

As moléculas existem em diferentes estados estáveis que correspondem a quantidades definidas de energia. A energia de uma molécula é devida a diversos tipos de movimentos: deslocamentos eletrônicos, vibração de átomos, rotação e translação da molécula. Nas transições de um estado a outro, as energias absorvidas ou liberadas variam de uma maneira **quantizada** (não existem estados com teor de energia intermediário).

As diferenças entre os níveis energéticos não são constantes:

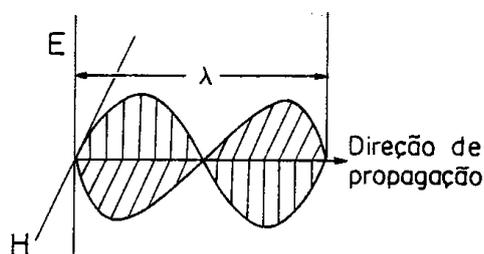
ΔE eletrônicos > ΔE vibracionais > ΔE rotacionais

Quando uma molécula passa de um nível energético E_1 a um outro E_2 , ela absorve ou libera radiação eletromagnética, de acordo com a equação:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu = hc/\lambda \quad (1)$$

onde: h = constante de Planck
 ν = frequência da radiação emitida ou absorvida
 c = velocidade da luz no vácuo
 λ = comprimento de onda da radiação

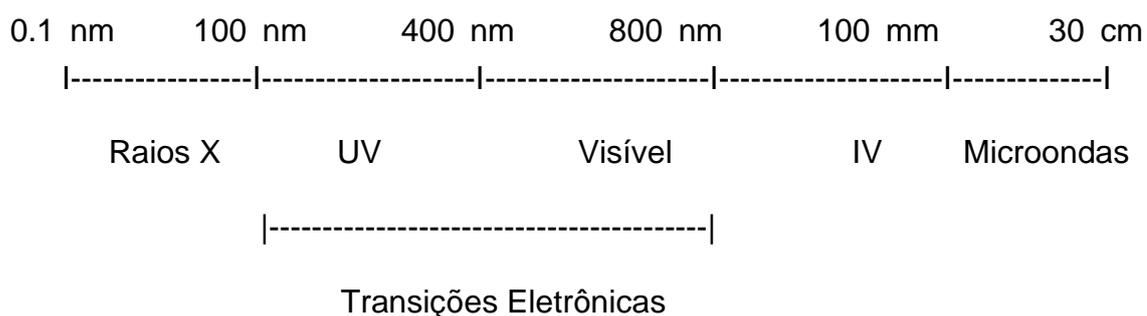
Uma onda luminosa é constituída por um campo magnético e um elétrico oscilantes, perpendiculares entre si e à direção de propagação da onda, conforme ilustra a figura abaixo:



A luz interage com a matéria primariamente através do campo elétrico; porém, nessas interações ela atua como se fosse composta de pequenos corpúsculos energéticos denominados fótons ou quanta de luz. Absorção de luz

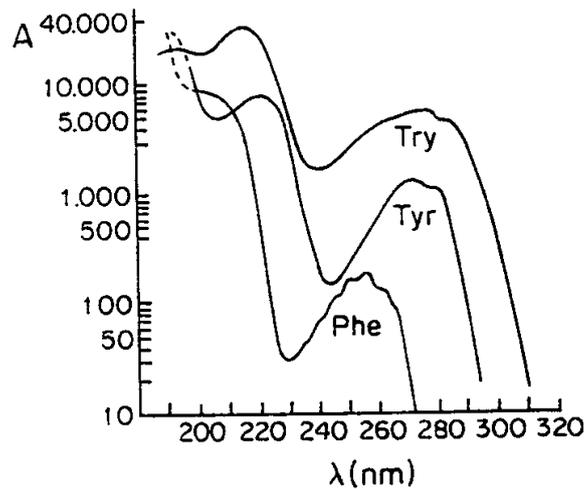
ocorre quando a energia do fóton ($h\nu$) corresponde à diferença entre dois níveis energéticos numa molécula.

A separação de um fluxo de radiações eletromagnéticas nos diferentes comprimentos de onda (ou frequências) que o compõem dá origem a um **espectro**, semelhante ao que ocorre com a luz solar branca quando da formação de um arco-íris. O espectro eletromagnético, do qual a luz visível é apenas uma pequena parte, pode ser dividido em 5 grandes regiões, conforme mostra a figura:



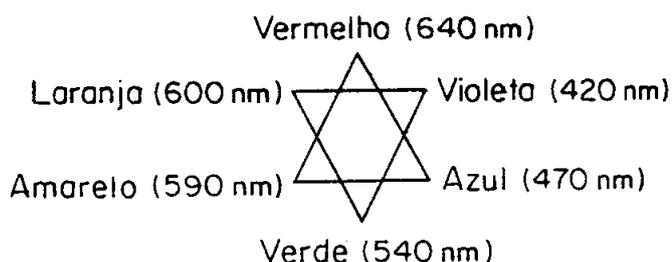
As radiações de uso mais frequente em bioquímica estão nas regiões do ultravioleta e visível.

O espectro de um determinado composto pode ser de **emissão** ou de **absorção**. Os espectros de emissão podem ser obtidos submetendo-se a amostra a uma chama ou arco voltáico. Estes espectros aparecem como um conjunto de bandas ou linhas brilhantes em um fundo escuro. Já os espectros de absorção são obtidos interpondo-se a amostra em questão no trajeto da luz proveniente de uma fonte luminosa. Desse modo, obtém-se um espectro colorido, contínuo, interrompido por bandas escuras que representam as radiações absorvidas pela amostra. Um espectro de absorção pode ser representado graficamente colocando-se a quantidade de luz absorvida em função do comprimento de onda da radiação. A figura abaixo corresponde aos espectros de absorção dos aminoácidos Tirosina, Triptofano e Fenilalanina, os quais, devido à presença de grupamentos aromáticos em sua estrutura, são responsáveis pelas propriedades de absorção das proteínas na região do ultravioleta.



Devido à natureza das moléculas que constituem os organismos vivos, os processos fotobiológicos mais importantes ocorrem na região da luz visível. Na fotossíntese, por exemplo, a energia necessária para reduzir um mol de gás carbônico à glicose, da ordem de 120 Kcal, é proporcionada por uma radiação cujo comprimento de onda é 680 nm; a visão é o resultado da isomerização do retineno pela ação da luz visível (380-800 nm), que desencadeia a excitação nervosa.

A cor dos corpos ou substâncias é devida à recepção, na retina do globo ocular, das radiações da luz solar branca que estes não absorveram. Desse modo, a cor vermelha de uma solução é devida ao fato de que a substância presente absorve todas as radiações do espectro visível exceto aquelas correspondentes à cor vermelha. Geralmente, o comprimento de onda ou cor que uma substância mais absorve corresponde à cor complementar à que ela apresenta, de acordo com o seguinte diagrama:



Desse modo, se uma solução é vermelha, a cor que absorve com mais intensidade é o verde; se é amarela, absorve o violeta, e assim por diante.

Como regra geral, quando se deseja medir a concentração de uma solução usando-se métodos espectrofotométricos deve-se escolher a cor, correspondente a um comprimento de onda, que a substância em questão absorve com maior intensidade.

A Lei de Lambert-Beer

Quando a luz atravessa uma solução, parte dela pode ser absorvida e, neste caso, a luz transmitida terá menor intensidade.

Lambert e Beer demonstraram que a relação entre a intensidade da luz incidente, I_0 , e a intensidade da luz transmitida, I , por um meio transparente de espessura b e concentração c é dada por:

$$A = \log I_0/I = a \cdot b \cdot c$$

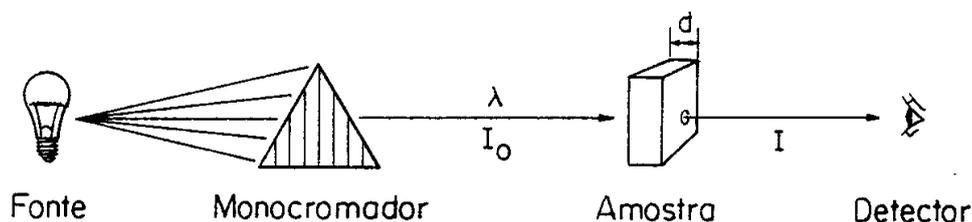
onde a é um coeficiente de proporcionalidade denominado **coeficiente de extinção**, o qual é característico da espécie absorvente e varia com o comprimento de onda e o solvente empregado; A é a **absorbância** da solução e I/I_0 é a **transmitância** da solução. Quando a concentração é dada em moles/litro, o coeficiente de extinção é denominado **coeficiente de extinção molar** (a_m ou ϵ) e quando a concentração é dada em gramas/litro, é denominado **coeficiente de extinção específico** (a_s).

Algumas considerações sobre a Lei de Beer-Lambert:

1. A lei é válida para as soluções diluídas, uma vez que em soluções concentradas podem ocorrer interações entre as moléculas do soluto, acarretando desvios na relação linear entre a absorvância e a concentração. Além disso, concentrações elevadas podem provocar variações no índice de refração, o que também provocará desvios da lei.
2. A associação, a dissociação ou a reação entre as espécies absorventes e o solvente podem provocar desvios na lei.
3. A instrumentação utilizada pode ser um fator de desvio da lei, uma vez que certos aparelhos não fornecem um feixe de luz monocromática.
4. Vários parâmetros podem influir no espectro de absorção de uma substância. Entre eles tem-se: natureza do solvente, pH da solução, temperatura, força iônica da solução e/ou presença de contaminantes.
5. Se em uma solução existem vários compostos que absorvem luz e não interagem entre si, a absorvância total da solução é dada pela somatória das absorvâncias de cada um deles:

$$A = a_1 \cdot b \cdot c_1 + a_2 \cdot b \cdot c_2 + \dots + a_n \cdot b \cdot c_n$$

Espectrofotômetro é o equipamento empregado para medir a absorção de luz em função do comprimento de onda. É constituído por 4 partes básicas: uma fonte de luz (lâmpada de Tungstênio ou Deutério), um monocromador (prisma ou rede de difração), uma célula para conter a amostra (cubeta) e um detector. A figura a seguir é a representação esquemática de um espectrofotômetro:



Os espectrofotômetros, por possuírem duas fontes de luz, podem ser utilizados para medidas de absorção de luz tanto na região do ultravioleta (lâmpada de Deutério) quanto do visível (Tungstênio).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A. REAÇÕES DE CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS

A1) Reação do Biureto

Coloque numa estante 4 tubos de ensaio numerados. Ao primeiro, adicione 2 mL de água, ao segundo, 2 mL (ou 40 gotas) de solução de ovoalbumina a 2%; ao terceiro, 2 mL (ou 40 gotas) de solução de gelatina a 2% e ao quarto 2 mL (ou 40 gotas) de solução de glicina a 1%. Acrescente, a cada tubo, igual quantidade de NaOH 2M. Agite o tubo e adicione, gota a gota, uma solução de CuSO_4 0,5%, agitando após cada adição, até o aparecimento de coloração violeta, característica de ligação peptídica. Qual é a reação que ocorre no tubo de ensaio? Qual a aplicação importante desta reação?

Coloque num tubo, limpo e seco, uma pitada de uréia e aqueça o tubo em uma chama, diretamente. A uréia se funde, ferve e ocorre o aparecimento de um sólido no fundo do tubo. Após o resfriamento do tubo, dissolva o sólido com 2 mL (ou 40 gotas) de NaOH 2M. Adicione a solução de CuSO_4 0,5%, conforme descrito acima. Observe e explique os resultados, relacionando-os com os da etapa anterior.

A2) Reação com Acetato de Chumbo

Prepare 3 tubos de ensaio, contendo, o primeiro uma pequena quantidade (ponta de espátula) de gelatina, o segundo uma pequena mecha de cabelos e o terceiro 40 gotas (ou 2 mL) de ovoalbumina 2%. Junte a cada tubo 2 mL (ou 40 gotas) de NaOH 6M e 3 gotas de solução de acetato de chumbo 1%. Ferva cuidadosamente por 2 a 3 minutos e observe. Qual a composição do sólido formado? Quais os aminoácidos, existentes nas proteínas, responsáveis por esta reação?

B. REAÇÕES DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS

B1) Efeito de ácidos fortes

Prepare 2 tubos de ensaio, contendo, o primeiro 40 gotas de HNO_3 concentrado e o segundo 40 gotas de HCl concentrado. Adicione cuidadosamente, escorrendo pelas paredes do tubo, 2 mL de solução de

ovoalbumina. Observe e explique o aparecimento de um precipitado branco no limite de separação entre os líquidos, em cada um dos tubos. (A reação do tubo 1 é usada, frequentemente, para pesquisar albumina na urina.)

B2) Precipitação fracionada por soluções salinas concentradas

A 2 mL de solução de ovoalbumina, colocados num tubo Falcon de 15 mL, adicione igual volume de solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Forma-se um precipitado branco. Centrifugue, por 5 minutos, a suspensão, guardando o sobrenadante para o ensaio seguinte. Ao precipitado, adicione 2 mL de água destilada. O precipitado dissolve? Por quê?

Ao sobrenadante, adicione $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido até a saturação completa. Observe, procurando explicar o ocorrido.

ATENÇÃO: Para a centrifugação utilize 2 tubinhos equilibrados (de mesma massa), colocados de maneira diametralmente oposta no interior da centrífuga!!!

B3) Precipitação por acetona

Prepare 4 tubos de ensaio, de acordo com o protocolo abaixo:

Tubo	1	2	3	4
Acetona	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL
H ₂ O	3 mL	2 mL	1 mL	-----
Solução de ovoalbumina 2%	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

Agite e observe a precipitação em cada tubo. Explique.

C. Determinação do ponto isoelétrico de uma proteína.

Pese, aproximadamente, 0,5 g de caseína seca, extraída do leite, e coloque em um béquer de 250 mL. Adicione 25 mL de água e 5 mL de NaOH 1 mol.L⁻¹ e aqueça em 40°C para dissolver a caseína. Neutralize a solução (pH ~ 7,0) com solução de ácido clorídrico 1 mol.L⁻¹. Se houver precipitação, filtre a solução.

Prepare sete tubos de ensaio e os enumere de 1 a 7. A cada tubo, começando com o número 1, adicione, respectivamente 8 mL de solução tampão pH 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5 e 3,0. A cada um dos tubos adicione 1,0 mL de solução de caseína, agite e observe o resultado imediatamente e após 30 minutos. Complete o quadro abaixo.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
pH							
Precipitado							
Observações após 30 min.							

Questões:

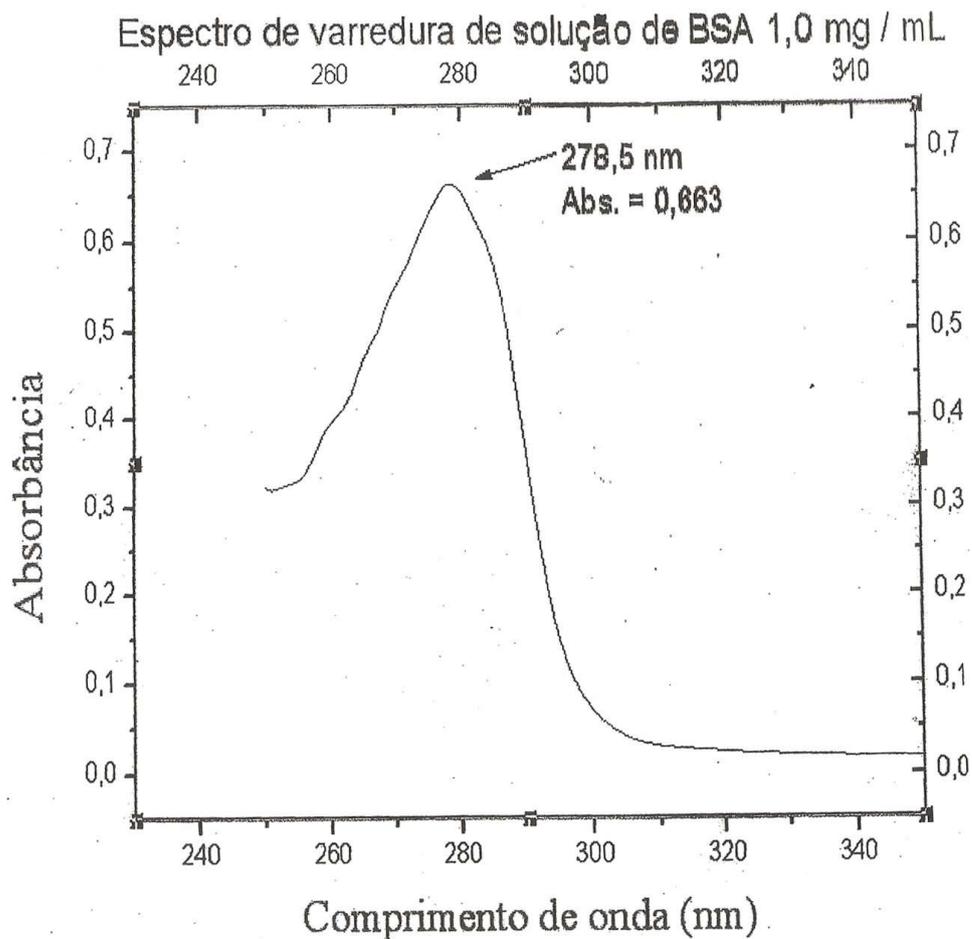
- 1) Qual o ponto isoelétrico da caseína?
- 2) De que maneira o ponto isoelétrico de uma proteína determina o seu comportamento eletroforético?

D. Métodos de dosagem de proteínas

D1) Espectro de absorção da albumina do soro bovino

O espectro de absorção de uma solução 1 mg.mL⁻¹ de albumina bovina (BSA) será traçado automaticamente, na faixa de 220-320 nm, utilizando um espectrofotômetro.

A partir do espectro, determine o coeficiente de extinção molar dessa proteína, sabendo que o peso molecular do BSA é 66.000 Da. Faça essa determinação durante a confecção do relatório.



D2) Determinação da concentração de proteína em uma amostra.

Será empregado o método de dosagem de proteína descrito por Read & Northcote (Analytical Biochemistry, 1981, 116:53 e Methods in Enzymology, 1983, 91: 119).

Cada grupo deverá traçar uma curva padrão, contendo **pelo menos 5** pontos experimentais, empregando uma solução padrão de BSA 0,1 mg/mL. As concentrações de proteína, utilizadas para a curva padrão, deverão estar na faixa de 1 a 20 $\mu\text{g/mL}$. Simultaneamente, cada grupo determinará a concentração de proteína numa amostra de BSA de concentração desconhecida, fornecida pela equipe técnica. Anote o número da amostra desconhecida do seu grupo e apresente esse número no relatório.

Para realizar a dosagem, prepare pelo menos 5 soluções de BSA (soluções da curva padrão) com concentrações entre 2 e 20 $\mu\text{g/mL}$ e volume total de 1,0 mL, em 5 tubos de ensaio (**Peça a ajuda do monitor quando for utilizar**

as pipetas automáticas). Prepare também um tubo “branco” para calibrar (zerar) o espectrofotômetro, utilizando 1,0 mL de água destilada em lugar da solução de proteína. Inclua ainda, na sua fileira de tubos de ensaio, um tubo contendo 1 mL de uma solução de BSA de concentração desconhecida (fornecida pela equipe técnica). A tabela abaixo apresenta um protocolo típico para esta dosagem de proteína.

Tubo	Proteína no tubo (µg)	Solução estoque BSA (µL)	Água (µL)	Reagente (mL)	A595
1	2			1,5	
2					
3					
4					
5	20				
6	0	-----	1000	1,5	Branco
7	Desconhecida			1,5	

Após a preparação das soluções, o procedimento a seguir será feito com todos os tubos preparados (soluções da curva padrão, “branco” e amostra desconhecida). Adicione (e agite em seguida por 3 segundos) a cada tubo de ensaio 1,5 mL do Reagente de Coomassie Blue pronto para uso (ver composição abaixo) e deixe a mistura em repouso à temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, faça a leitura da absorbância em 595 nm, usando como “branco”, o tubo 6 (ver tabela abaixo). As leituras deverão ser efetuadas em até cerca de 30 minutos após a preparação das misturas; caso contrário ocorrerá precipitação do reagente nos tubos, invalidando as dosagens.

ATENÇÃO: Você receberá o Reagente de Coomassie Blue pronto para o uso. A solução estoque do corante (descrita na preparação) permanecerá em poder do técnico responsável. Caso necessite um volume maior do reagente pronto, solicite ao técnico ou ao monitor.

Questões:

1. Qual a concentração da amostra desconhecida que foi fornecida para seu grupo? Não se esqueça de informar o número dessa amostra no relatório.
2. Quais os princípios do método de dosagem de proteínas proposto por Read & Northcote?

Preparação do Reagente de Coomassie Blue G-250:

Reagente de Coomassie Blue pronto para uso: Pipetar 1,5 mL da solução estoque do corante numa proveta, adicionar 2,0 mL de etanol 95% e 4,0 mL de H₃PO₄ 85-88%. Adicionar água destilada até um volume final de 30 mL numa proveta e misturar bem. Usar em seguida e descartar o excesso.

Solução estoque do corante: Dissolver 1 g do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em 100 mL de etanol 95% (d= 0,81 g/mL). Agitar bem (agitador magnético) até dissolver completamente. Adicionar 200 mL de H₃PO₄ 85-88% (d= 1,71 g/mL). Nessas condições, o corante é bastante solúvel e estável em temperatura ambiente, durante meses.

ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

O movimento de partículas carregadas eletricamente sob a ação de um campo elétrico é denominado **eletroforese**. Uma vez que as proteínas apresentam carga líquida em qualquer pH diferente de seu ponto isoelétrico, também migram quando sujeitas a um campo elétrico e sua velocidade de migração é proporcional à densidade de carga (relação carga/massa). Assim, a aplicação de um campo elétrico a uma mistura de proteínas em solução resulta na migração de cada uma delas em direção a um dos eletrodos, com diferentes velocidades. Entretanto, devido à dispersão das moléculas por toda a solução, nenhuma separação é observada nesse processo.

A eletroforese de zona é uma modificação desse procedimento em que a mistura de proteínas é colocada numa zona (ou banda) estreita, a uma certa distância dos eletrodos. Desse modo, durante o processo, proteínas de diferentes mobilidades migram como bandas discretas que gradualmente se separam umas das outras, desde que as relações carga/massa sejam suficientemente diferentes. Entretanto, numa eletroforese de zona realizada em solução (eletroforese livre) nenhuma separação é observada, devido à ocorrência de correntes de convecção e à difusão das moléculas protéicas durante e após o processo.

Com a finalidade de minimizar esses efeitos foram desenvolvidas várias metodologias em que a eletroforese de proteínas é realizada num meio estabilizado, denominado suporte, que além de evitar efeitos de convecção e difusão, permite que as proteínas sejam fixadas, impedindo sua difusão após o término do experimento. Esse suporte pode ser papel, acetato de celulose, agarose, amido, poliacrilamida, etc. Tanto o papel quanto o acetato de celulose são relativamente inertes e servem simplesmente como suporte para as proteínas e meio de anticonvecção, exercendo, conseqüentemente, pequena influência no processo de separação propriamente dito. Nesses suportes, as partículas carregadas são separadas essencialmente em função de sua densidade de carga no pH escolhido. Os géis (agarose, amido, poliacrilamida), além de evitar a convecção e minimizar a difusão, participam ativamente do processo de separação, interagindo com as partículas que estão migrando. Esses géis

constituem meios porosos em que o tamanho dos poros é da mesma ordem de grandeza das moléculas proteicas, de modo que ocorre um efeito de peneira molecular. Assim sendo, a separação ocorre em função da carga da partícula e também do tamanho (PM) da mesma, embora a migração também possa ser afetada pela forma das proteínas.

O efeito de peneira molecular depende do quanto são próximos o tamanho do poro do gel e o tamanho das moléculas proteicas em migração. Assim, ele predomina nos géis de amido e poliacrilamida, sendo insignificante no gel de agarose.

Atualmente, excelentes fracionamentos de proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos têm sido obtidos utilizando-se a técnica de eletroforese em **gel de poliacrilamida**. Quimicamente, o gel de poliacrilamida é resultante da polimerização da acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) em longas cadeias, formando uma rede tridimensional através de ligações cruzadas, devido à presença de um composto bifuncional, a N,N'- metileno bisacrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}=\text{CH}-\text{CH}_2$).

As vantagens do gel de poliacrilamida em relação aos demais são numerosas. Algumas delas são:

1. em condições de polimerização constantes e utilizando produtos quimicamente puros, o gel pode ser preparado de uma maneira reprodutível;
2. pode-se variar convenientemente o tamanho dos poros do gel, de acordo com as proporções de acrilamida e bisacrilamida empregadas e, assim, obter o fracionamento desejado (a concentração do gel pode variar de 2 a 30%);
3. o gel é quimicamente inerte e estável numa ampla faixa de pH, força iônica e temperatura, além de ser transparente, o que facilita a visualização das bandas proteicas.

A eletroforese não é empregada usualmente para a purificação de proteínas em grande escala, pois os métodos eletroforéticos freqüentemente alteram sua estrutura e função, além de existirem alternativas mais simples disponíveis. Entretanto, a eletroforese é extremamente útil como método analítico, pois as proteínas podem ser simultaneamente separadas e visualizadas, permitindo estimar rapidamente o número de proteínas numa mistura ou o grau de purificação de uma amostra de uma determinada proteína. Além disso, a

eletroforese permite a determinação de propriedades fundamentais de uma proteína, como seu ponto isoelétrico (**focalização isoelétrica**) e seu peso molecular.

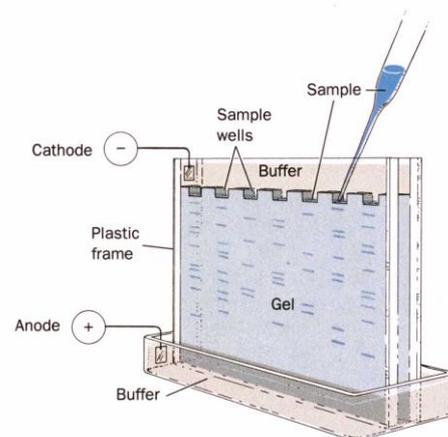
Um método eletroforético bastante comum para estimar a pureza e o peso molecular de proteínas utiliza o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) com a finalidade de dissociar todas as proteínas em suas subunidades polipeptídicas constituintes. Para isso, a mistura proteica é aquecida a 100°C na presença de excesso de SDS e β -mercaptoetanol, um agente capaz de reduzir pontes S-S. Nessas condições, a maioria dos polipeptídeos liga o SDS numa relação constante, cerca de uma molécula de detergente para cada dois resíduos de aminoácido. As moléculas de SDS ligadas contribuem com uma elevada carga negativa, tornando a carga intrínseca da proteína insignificante e a densidade de carga aproximadamente constante para qualquer polipeptídeo. Além disso, a conformação nativa das proteínas é alterada pelo SDS e a maioria das cadeias polipeptídicas assume formas similares. Portanto, numa eletroforese em gel de poliacrilamida, de tamanho de poro adequado e em presença de SDS, as cadeias polipeptídicas são separadas exclusivamente em função de seu peso molecular. Este pode, então, ser determinado por comparação com a migração de polipeptídeos de peso molecular conhecido, nas mesmas condições.

A eletroforese em gel de poliacrilamida pode ser realizada numa ampla faixa de pH (3 a 10). Em condições desnaturantes (presença de SDS e β -mercaptoetanol), o pH exerce pouca influência, uma vez que todos os complexos SDS-polipeptídeo são negativos nessa faixa. Entretanto, o pH é crítico para uma eletroforese em condições não desnaturantes (proteínas nativas), pois afeta a carga líquida das proteínas e conseqüentemente sua migração no gel.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Esta etapa será parcialmente demonstrativa e as atividades de cada grupo serão discutidas durante o experimento.

Primeiramente a cuba de eletroforese será devidamente limpa e montada. Para a realização da eletroforese em condições desnaturante (SDS-PAGE, Laemmli, *Nature* (1970) 227:680), um gel de acrilamida (7%) foi montado segundo a tabela abaixo.



Reagentes	Volume Aplicado (mL)	
	Gel de Separação (7%)	Gel de empilhamento
Acrilamida	2,50	1,8
Água	4,75	5,9
Tampão do Gel	1,25*	0,8**
SDS (1%)	1,00	1,0
TEMED	0,020	0,020
Persulfato de Amônio	0,50	0,50

*Tampão do Gel: Tris-HCl 3,0M pH 8,9

** Tampão do Gel: Tris-HCl 1,5M pH 6,8

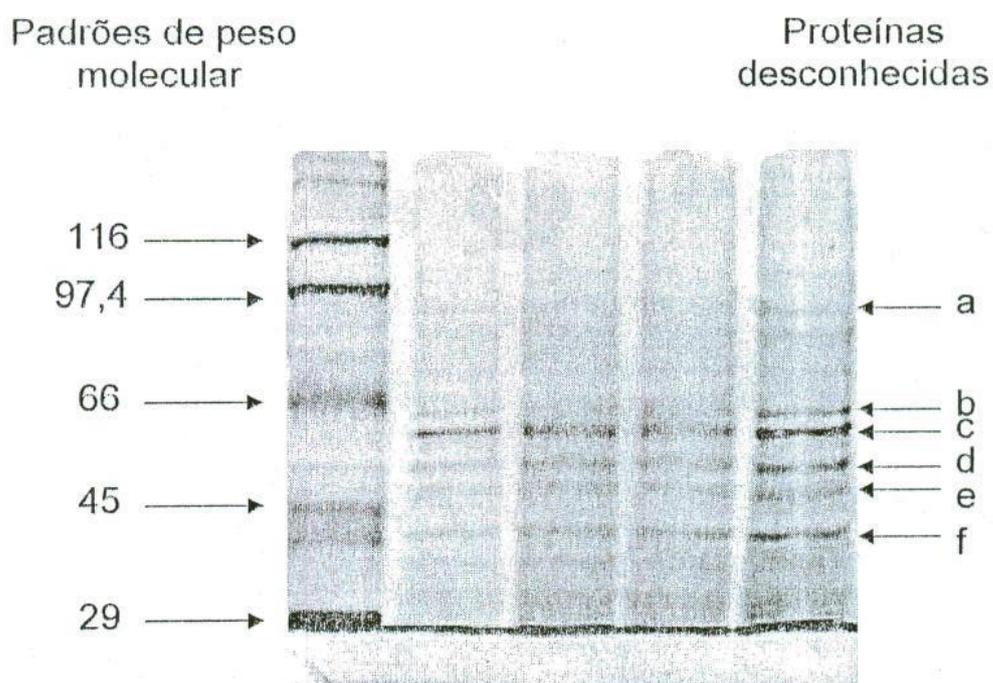
A solução do gel foi aplicada entre as placas de vidro, na cuba de eletroforese, e após alguns minutos já estará polimerizado. Em seguida, a solução do gel de empilhamento foi aplicada sobre o gel de separação polimerizado e foi colocado o pente para a formação dos canaletas onde serão aplicadas as amostras. O preparo das amostras foi realizado previamente segundo métodos de desnaturação (aquecimento na presença de SDS e β -mercaptoetanol). A cuba será então preenchida com Tampão Tris-HCl 0,05M contendo glicina 0,384M e

SDS 0,2%, pH 8,3, diluído 2 vezes. As amostras serão aplicadas nas canaletas do gel e em seguida será aplicado uma diferença de potencial, a qual será responsável pela migração das proteínas.

Após a realização da eletroforese, o gel é retirado da cuba, corado com Comassie Blue R-250, e as bandas proteicas serão reveladas. A imagem abaixo é de um gel digitalizado após a coloração.

Análise da Eletroforese em Gel Desnaturante (estimativa de massa molecular da proteína desnaturada)

Cada grupo deverá calcular a migração relativa para todas as bandas (imagem do gel abaixo) e, utilizando as bandas do padrão de massa molecular, traçar uma curva padrão de log MM x migração relativa das bandas. Utilizando a curva padrão obtida, será possível determinar a massa molecular das amostras aplicadas.



No relatório, descreva o experimento realizado e os resultados obtidos, procurando explicá-los com base nos princípios da metodologia empregada.

CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Um dos problemas que continuamente desafiam os bioquímicos é a separação e purificação de um ou mais compostos a partir de uma mistura complexa. Uma grande variedade de técnicas cromatográficas, tanto analíticas quanto quantitativas, foi desenvolvida para esse propósito. Estas técnicas possuem em comum a propriedade de fracionar misturas de várias substâncias explorando diferenças nas suas propriedades químicas e físicas, que fazem com que cada composto interaja diferencialmente com uma **fase móvel** e uma **fase estacionária**. Existem quatro tipos principais de cromatografia: líquida, gasosa, de camada fina e em papel (já estudada na primeira aula prática). A seleção do tipo de cromatografia a ser empregado para realizar uma determinada etapa de separação é dependente do material a ser isolado. Frequentemente, diversos métodos cromatográficos são utilizados seqüencialmente para se obter um composto na forma pura. Atualmente, as técnicas cromatográficas são de larga aplicação em química e bioquímica, tanto em pesquisa quanto na indústria.

Um leito cromatográfico pode ser construído de várias formas, consistindo sempre de duas fases, uma estacionária e uma móvel. A fase estacionária pode ser sólida, líquida ou uma mistura sólido-líquido. Já a fase móvel, líquida ou gasosa, preenche os interstícios da fase estacionária e deve fluir através dela. As fases móvel e estacionária devem ser escolhidas de tal forma que os compostos a serem separados possuam um coeficiente de partição bem definido entre elas. Vários mecanismos de distribuição podem ser empregados: partição entre líquidos imiscíveis, equilíbrio de adsorção entre uma fase estacionária adsorvente e uma fase líquida móvel, etc.

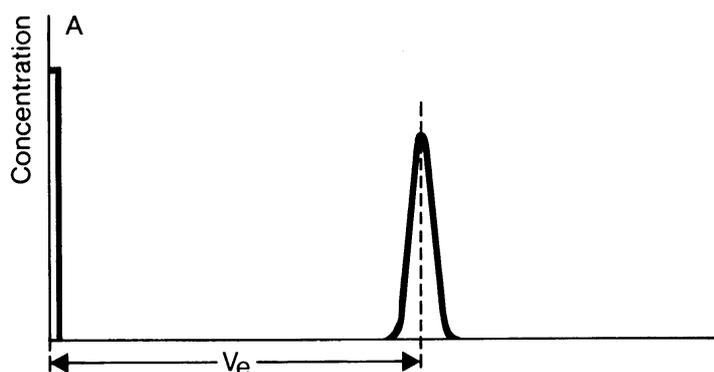
Um dos métodos mais empregados para a purificação de proteínas é a **cromatografia em coluna**, em que se tira proveito das diferenças de carga, tamanho, especificidade de ligação e outras propriedades entre as várias proteínas presentes numa mistura. Um material sólido e poroso é colocado numa coluna cilíndrica de vidro ou metal, constituindo a fase estacionária, através da qual flui a fase móvel (eluente), uma solução de pH e composição iônica conhecidos, contendo a mistura proteica a ser fracionada. À medida que a mistura flui através da coluna, que é constantemente suprida do eluente, cada proteína é

retardada diferentemente, dependendo de sua interação com o material da matriz sólida. Três métodos cromatográficos são particularmente importantes na purificação de proteínas: **filtração em gel** e cromatografias de **troca iônica** e **afinidade**.

A filtração em gel, ou cromatografia por **exclusão molecular**, baseia-se num processo puramente mecânico. O gel é uma matriz de composição inerte, com partículas de forma, tamanho e porosidade uniformes. As moléculas da amostra são separadas, à medida que o processo se desenvolve, porque as menores são capazes de penetrar facilmente em todos os poros do gel, equilibrando-se com o eluente que se encontra dentro e fora deles, enquanto as maiores são excluídas de todos os poros, passando entre os grânulos do gel. Desse modo, as moléculas menores são retardadas em relação às maiores. As moléculas com tamanho intermediário migram com velocidades variáveis entre esses dois extremos, pois são capazes de penetrar em alguns poros, mas não em todos. Assim, o gel atua como uma peneira molecular, separando as moléculas de acordo com o seu peso molecular. Os tipos mais comuns de gel são o Sephadex e o Biogel.

Os resultados obtidos em uma filtração em gel são expressos na forma de um diagrama de eluição ou cromatograma, onde é mostrada a variação da concentração do soluto no eluente em função do volume total do eluente que passou através da coluna.

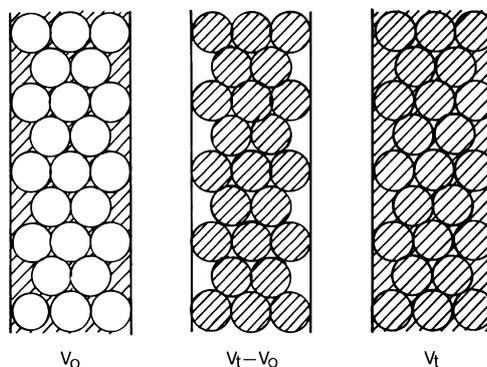
Os volumes de eluição (V_e) dos diferentes componentes de uma mistura são facilmente determinados; porém, para uma medida criteriosa, o volume da amostra aplicada não deve ser superior a 10% do volume total do gel na coluna (volume *bed*), uma vez que este fator influencia o perfil cromatográfico, constituindo uma fonte de erros consideráveis na determinação de V_e .



A massa molecular (MM) de uma proteína pode ser facilmente determinada a partir de medidas de V_e e V_0 , usando um gráfico do Log MM vs V_e/V_0 (eluição relativa) das proteínas de massa molecular conhecidas (padrões de MM). Abaixo estão algumas imagens mostrando os volumes usados nas análises de experimentos de cromatografia por exclusão de massa molecular

V_0 = volume de eluição das moléculas que não penetram nos poros do gel
(volume *void*)

V_t = volume total de gel na coluna (volume *bed*)



PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1) Separação de amostras por exclusão molecular

Esta etapa será parcialmente demonstrativa. Quatro colunas de diferentes diâmetros e comprimentos serão preparadas pelos técnicos. Amostras, contendo azul de metileno e hemoglobina, serão aplicadas nas diferentes colunas e em seguida se iniciará a coleta de frações de aproximadamente 3 mL (determine o tempo para completar 3mL na proveta e colete as amostras usando esse tempo). Após a eluição total dos componentes da amostra, a qual será acompanhada visualmente, cada grupo deverá fazer as medidas de absorbâncias das frações obtidas, nos comprimentos de onda de 664 nm e 410 nm.

Os resultados de cada coluna deverão ser apresentados por meio de gráficos de Absorbância x Volume de eluição (cromatogramas). Cada grupo deverá anotar o diâmetro da coluna utilizada e a altura do gel no seu interior. Após o experimento, os diferentes grupos deverão trocar os dados (ou

cromatogramas) das colunas entre si e a partir dos resultados obtidos, comparar a eficiência de cada coluna em função de seu diâmetro e altura.

No relatório, deverão ser descritos o experimento realizado e os resultados obtidos (das 4 colunas), procurando explicá-los com base nos princípios da metodologia empregada.

2. Análise do Cromatograma da Filtração em Gel (estimativa de massa molecular da proteína em solução)

Segue abaixo uma tabela contendo valores de volume de eluição referentes a um conjunto de proteínas de massas moleculares conhecidas e duas proteínas de massas moleculares desconhecidas eluídas de uma coluna. Utilizando tais dados, monte uma curva padrão de $\log MM \times V_e/V_0$. A partir da curva padrão, calcule as massas moleculares das amostras (proteínas desconhecidas) em questão. Cada grupo receberá, no laboratório, os volumes das proteínas desconhecidas 3 e 4.

Padrão de Massa Molecular		$V_0 = 7,84 \text{ mL}$
Nome	Massa Molecular (kDa)	Volume de Eluição (V_e) (mL)
Albumina	67	16,14
Ribonuclease A	13,5	19,25
Tiroglobulina	669	12,29
Quimotripsinogênio	25	19,00
Ferritina	440	13,97
Ovoalbumina	43	16,82
Catalase	232	15,45
Proteína desconhecida 1	???	18,50
Proteína desconhecida 2	???	14,10
Proteína desconhecida 3	???	
Proteína desconhecida 4	???	

Introdução

Embora várias abordagens sejam utilizadas comumente para estudar o mecanismo de ação de uma enzima, a mais antiga e até hoje mais importante consiste em determinar a velocidade da reação enzimática e como ela varia em resposta a mudanças nas condições experimentais. Este é o campo de estudo da Cinética Enzimática.

As enzimas são proteínas que se encontram na natureza misturadas entre si e com outras substâncias. Entretanto, é possível detectar e determinar sua atividade por meio das reações que catalisam, bastando para isso conhecerem-se as características da reação catalisada bem como dispor-se de métodos analíticos apropriados de dosagem.

De acordo com a União Internacional de Bioquímica, uma Unidade Internacional (U.I.) de enzima é definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um micromol de substrato em produto por minuto, em condições experimentais definidas.

A proporcionalidade existente entre a velocidade de uma reação enzimática e a quantidade de enzima ativa presente, em condições de concentração saturante de substrato, permite conhecer a atividade enzimática (unidades de enzima) de um extrato proteico qualquer. Para que a dosagem seja válida, é necessário que a concentração de substrato permaneça praticamente constante durante o tempo de medida da atividade e que durante esse intervalo a enzima seja estável.

De maneira geral, as velocidades usadas nos cálculos cinéticos são velocidades iniciais. Para uma reação qualquer, a velocidade da reação será considerada inicial se, durante o tempo de medida da atividade, a variação da concentração do substrato for igual ou inferior a 5% da concentração inicial.

A velocidade de uma reação, enzimática ou não, pode ser determinada de modo **contínuo** ou **descontínuo**. No primeiro caso, é necessário dispor-se de

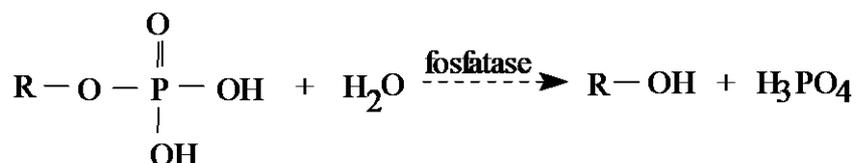
aparelhos que possam registrar continuamente o aparecimento de um produto da reação ou desaparecimento de um reagente. O mesmo não ocorre no segundo caso, em que a reação é bloqueada quando houver decorrido um determinado intervalo de tempo específico. A utilização de um ou outro método dependerá exclusivamente da reação em questão e da disponibilidade do equipamento a ser usado.

Em uma cinética enzimática, dois importantes aspectos devem ser considerados: a cinética propriamente dita e a determinação quantitativa dos produtos formados ou reagentes consumidos. Em relação à cinética propriamente dita, vários são os fatores a serem considerados: concentração da enzima, concentração do substrato, tempo de incubação, pH, temperatura, bloqueio da reação, presença de inibidores ou ativadores, etc. Em relação à dosagem, é fundamental que o método escolhido seja simples, sensível, reprodutível e não sofra interferências de outros componentes da mistura reacional. É importante, também, realizar controles que permitam descartar quaisquer artefatos que possam simular uma atividade enzimática. Dentre eles, os fundamentais são o "branco" da enzima e o "branco" do substrato. O primeiro possibilita corrigir a qualquer momento a hidrólise espontânea do substrato, enquanto o segundo é um controle que evita erros devidos às interferências dos componentes do sistema reacional no método de dosagem empregado.

Nos estudos cinéticos nos quais se utiliza o método descontínuo, o bloqueio da reação deve ser rigorosamente controlado. Geralmente esse bloqueio é efetuado com a inativação irreversível da enzima, que pode ser provocada por NaOH 1,0 mol/L, ácido tricloroacético 20-30%, calor, reagentes específicos, etc.

Nos experimentos cinéticos a serem realizados nesta disciplina será estudada uma fosfatase ácida, extraída dos tubérculos da batata, que apresenta uma massa molecular aparente de 66.000 Da.

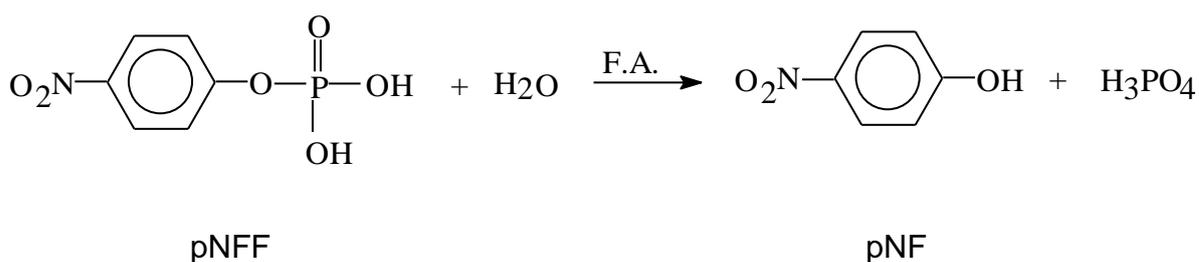
As fosfatases (E.C. 3.1.3.1.) são enzimas que podem ser encontradas em animais, plantas, fungos, bactérias e leveduras. Geralmente são fosfomonoesterases não específicas e hidrolisam ésteres de fosfato (ver equação química abaixo), podendo ser classificadas em ácidas, neutras ou alcalinas, dependendo do pH necessário para o desenvolvimento de sua atividade ótima.



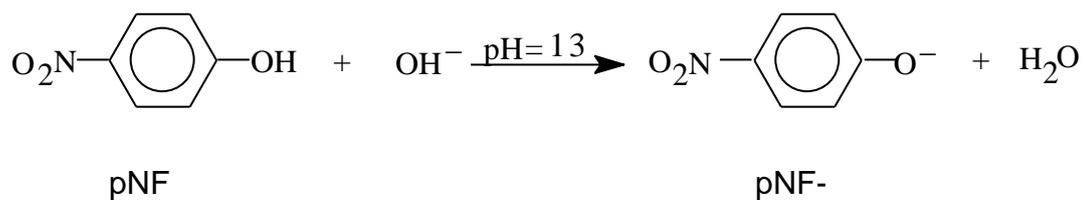
As fosfatases ácidas (E.C. 3.1.3.2) são insensíveis à presença de cátions mono e divalentes no meio de reação, enquanto as fosfatases alcalinas requerem a presença de metais, principalmente Mg^{2+} , para sua atividade.

Embora a atividade das fosfatases possa ser acompanhada pelo desaparecimento do éster de fosfato, e também pela dosagem do fosfato livre, o método mais empregado baseia-se na dosagem do composto R-OH, empregando substratos sintéticos, denominados "**Substratos Cromogênicos**". Neste caso, o composto R-OH é colorido ou então pode ser transformado em um produto colorido, cuja concentração pode ser determinada diretamente por espectrofotometria.

A atividade da fosfatase ácida da batata será determinada espectrofotometricamente, utilizando-se como substrato o p-nitrofenilfosfato (pNFF), que é hidrolisado pela enzima da seguinte maneira:



Apesar do substrato (pNFF) e do produto formado, p-nitrofenol (pNF), serem ambos incolores, em pH alcalino o pNF se dissocia em p-nitrofenolato (pNF^-), que apresenta coloração amarela. Desse modo, pode ser quantificado em 410 nm ($\epsilon=17600 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ em pH 13,0).



Assim, de acordo com esta última equação, para determinar a atividade da fosfatase ácida basta permitir que a reação se desenvolva no pH ótimo para a atividade da enzima (5,5) durante um intervalo de tempo conhecido, e em seguida bloqueá-la por adição de NaOH 1,0 mol/L. A adição dessa base forte, além de assegurar o término da reação (desnaturação da enzima), transformará o PNF em PNF⁻, o qual poderá ser dosado diretamente em 410 nm.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

PRÁTICA 4. CINÉTICA ENZIMÁTICA: Efeito do tempo e da concentração de enzima.

A. Efeito da concentração da enzima sobre a velocidade da reação.

Cada grupo deverá preparar uma fileira de tubos, em um rack, em que serão mantidas constantes as concentrações do tampão empregado e do substrato, variando apenas a massa de enzima presente em cada tubo.

O tampão utilizado neste experimento será o tampão citrato de sódio em concentração final 100 mmol/L, pH 5,5. Já o substrato, pNFF (p-nitrofenilfosfato) será usado numa concentração final 2 mmol/L, o que garantirá a saturação da enzima durante o experimento.

As soluções de partida (estoque) fornecidas serão:

* tampão Citrato de sódio 1 mol/L, pH 5.5;

* pNFF 20 mmol/L

*Fosfatase ácida (40 ng/mL).

Cada grupo deverá preparar um protocolo experimental especificando os volumes de tampão, substrato, água e enzima a serem pipetados em cada tubo, num total de sete tubos, para que, num volume final de 1,0 mL, sejam obtidas as concentrações desejadas de cada componente (citrato 100 mmol/L e PNFF 2 mmol/L). A massa de enzima em cada tubo deverá variar de 0 (branco) a 10 ng. Um bom protocolo experimental poderá ser montado conforme a tabela na próxima página.

Nº Tubo	Tampão (mL)	pNFF (mL)	Água (mL)	Enzima (mL)	A _{410nm}	ng de E/tubo
1				0	branco	0
2						
3						
4						
5						
6						
7						

Ao montar a fileira de tubos, pipetar em cada tubo, os volumes adequados de tampão, pNFF e água. Manter os tubos na bancada, à temperatura ambiente, e adicionar a cada um deles, em intervalos regulares de 1,0 minuto, a quantidade de enzima especificada no protocolo experimental. Homogeneizar suavemente o conteúdo dos tubos e deixar a reação se processar durante exatamente 30 minutos. A seguir, interromper a reação pela adição de 1,0 mL de NaOH 1,0 mol/L a cada tubo, com o mesmo intervalo de 1,0 minuto entre os tubos, agitando vigorosamente. Efetuar, em seguida, a leitura de absorvância em 410 nm, usando o tubo 1 como “branco”.

Calcular a quantidade de p-nitrofenolato formado (em $\mu\text{moles/min}$) em cada tubo e fazer um gráfico destes valores em função da massa de enzima (ng) no tubo. Com base nos seus resultados responder:

1. A velocidade da reação é proporcional à massa de enzima colocada no tubo?
2. As velocidades de reação determinadas são realmente velocidades iniciais?
3. Sabendo que a massa molecular aparente da enzima é 66.000, determinar o “número de renovação” da enzima em relação ao pNFF.

B. Efeito do tempo de incubação da enzima com o substrato.

Cada grupo deverá preparar uma nova fileira de tubos, mantendo constantes as concentrações do tampão, do substrato e da enzima. As condições experimentais utilizadas serão: tampão citrato de sódio 100 mmol/L, pH 5,5, contendo pNFF 2 mmol/L e fosfatase ácida 10 ng/tubo.

As soluções de partida (estoque) fornecidas serão:

* MR = Tampão citrato de sódio 200 mmol/L, pH 5.5, contendo PNFF 4 mmol/L.

*Fosfatase ácida (40 ng/mL).

O tempo de reação deverá variar de 0 até 30 minutos. Deste modo, um protocolo experimental poderá ser elaborado como o da tabela abaixo, especificando os volumes de MR e enzima a serem pipetados e o tempo total de reação:

Nº do tubo	MR (mL)	Enzima (mL)	H ₂ O (mL)	Tempo de Reação (min)	A _{410 nm}
1					
2					
3					
4					
5					
6					

Obs.: Não se esqueça do branco!!!

Adicionar a enzima a cada tubo contendo o meio reacional (tampão e substrato), **observando rigorosamente** os tempos de reação programados no protocolo experimental. Para facilitar o controle do tempo, pipetar a enzima nos tubos com 1 minuto de intervalo. Homogenizar suavemente o conteúdo do tubo e deixar a reação se processar exatamente durante o tempo planejado, à temperatura ambiente. A seguir, interromper a reação adicionando a cada tubo 1,0 mL de NaOH 1,0 mol/L, **observando rigorosamente** os tempos programados, e agitar vigorosamente. Efetuar, em seguida, a leitura de absorbância em 410 nm, utilizando como “branco” um tubo de ensaio contendo água em substituição à enzima e 1,0 mL de NaOH 1,0 mol/L.

Calcular a quantidade de p-nitrofenolato formado (em $\mu\text{moles/tubo}$) e fazer um gráfico destes valores em função do tempo de reação. Fazer um segundo gráfico de $\mu\text{moles de p-nitrofenolato formado/min}$ em função do tempo de reação.

Com base nos seus resultados responder:

1. A quantidade de produto formado é diretamente proporcional ao tempo de incubação da enzima com o substrato? Por quê?
2. O que você pode concluir sobre a velocidade da reação no intervalo de tempo testado, analisando o segundo gráfico? Explique.
3. As velocidades de reação determinadas são realmente velocidades iniciais?

PRÁTICA 5 - CINÉTICA ENZIMÁTICA: pH-ótimo e Determinação do K_M : Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação.

A. Efeito do pH sobre a velocidade da reação.

Com a finalidade de estudar a influência do pH sobre a velocidade de hidrólise do substrato pela fosfatase ácida, cada grupo deverá preparar uma fileira de tubos mantendo constantes as concentrações de tampão (100 mmol/L), substrato (2 mmol/L) e enzima (10 ng/tubo), variando apenas o pH do tampão utilizado. O volume total de cada tubo será 1 mL.

As soluções de partida serão:

- soluções tampão citrato de diferentes valores de pH em concentração 200 mmol/L.
- substrato pNFF 20 mmol/L
- Fosfatase ácida 100 ng/mL diluída em água

Utilize a tabela abaixo para montar o seu protocolo, antes de iniciar o experimento. Não se esqueça que para este experimento você precisará de **um branco para cada teste de pH**. Portanto, será necessário preparar duas fileiras de 10 tubos conforme o protocolo. Numa série será adicionada a enzima, enquanto na outra a enzima será substituída por igual volume de água (brancos).

Adicione a cada tubo, em intervalos regulares de 1 minuto, a quantidade de enzima especificada no protocolo experimental. Homogeneizar suavemente o conteúdo dos tubos e deixe a reação se processar durante exatamente 30 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, interrompa a reação pela adição de 1,0 mL de NaOH 1,0 mol/L a cada tubo, com o mesmo intervalo de 1,0 minuto entre os tubos, e agite vigorosamente. Lembre-se de adicionar 1,0 mL de NaOH também aos tubos de ensaio que serão utilizados como branco. Efetue, em seguida, a leitura de absorbância em 410 nm, usando para cada tubo o seu branco correspondente.

Nº do tubo	pH	Volume do tampão (mL)	pNFF (mL)	H ₂ O (mL)	Enzima (mL)	A _{410 nm}
1	2,5					
2	3,0					
3	3,5					
4	4,0					
5	4,5					
6	5,0					
7	5,5					
8	6,0					
9	6,5					
10	7,0					

Calcule a quantidade de p-nitrofenolato formado, em $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mL}$ de enzima (U/mL) e $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de enzima (U/mg) em cada pH estudado. Faça um gráfico da atividade da enzima, expressa em U/mg de enzima, em função do pH e determine o seu pH-ótimo.

Com base em seus resultados, responda:

1. Por que o pH do meio reacional afeta a velocidade das reações enzimáticas?
2. Por que é importante utilizar uma solução tampão nas determinações de atividade enzimática?

B. Determinação do Km: efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação

Com a finalidade de estudar a influência da concentração de pNFF sobre a velocidade da reação catalisada pela fosfatase ácida, cada grupo deverá preparar uma fileira de tubos mantendo constantes as concentrações de tampão citrato de sódio, pH 5,5 (100 mmol/L) e enzima (10 ng/tubo), variando apenas a concentração de substrato. O volume total de cada tubo será 1 mL. É importante ressaltar que para cada concentração de substrato deverá ser preparado um branco, necessário para corrigir a hidrólise espontânea do substrato. Nos tubos dos brancos, a enzima deverá ser substituída por igual volume de água.

As soluções de partida (estoque) fornecidas serão:

- Tampão citrato 200 mmol/L, pH 5,5.
- PNFF 20 mmol/L, 2 mmol/L e 1 mmol/L.
- fosfatase ácida 100 ng/mL

A maior dificuldade neste tipo de experimento é estabelecer a faixa de concentrações de substrato a ser usada. Entretanto, neste caso, as concentrações adequadas foram determinadas previamente e estão indicadas na tabela a seguir.

Complete o protocolo experimental, determinando corretamente os volumes das soluções estoque de pNFF que você precisa utilizar para obter as concentrações desejadas (observe que você tem à sua disposição o substrato em três concentrações diferentes). Calcule também os volumes adequados de tampão, da solução de enzima e de água para cada tubo.

Tubo	Tampão (mL)	Água (mL)	[pNFF] estoque (mmol/L)	pNFF (mL)	[pNFF] (mM)	Enzima (mL)	A _{410 nm}
1					0,05		
2					0,07		
3					0,10		
4					0,15		
5					0,20		
6					0,40		
7					0,50		
8					1,00		
9					2,00		
10					5,00		

Adicione a cada tubo a enzima, em intervalos regulares de 1 minuto. Homogenize, suavemente, o conteúdo dos tubos e deixe a reação se processar durante exatamente 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, interrompa a reação pela adição de 1,0 mL de NaOH 1,0 mol/L a cada tubo, com o mesmo intervalo de 1 minuto entre os tubos e agite vigorosamente. Efetue, em seguida, a leitura de absorvância de cada tubo em 410 nm, usando o branco correspondente (em que a enzima foi substituída por igual volume de água).

1. Com base nos seus resultados determine os valores de K_M e V_m traçando os seguintes gráficos:

a) $v \times [S]$

b) $1/v \times 1/[S]$ (Representação de Lineweaver-Burk)

c) $[S]/v \times [S]$ (Representação de Hanes)

d) $v \times v/[S]$ (Representação de Hofstee)

(Observe que para todas estas representações a faixa de concentrações de substrato escolhida deve ser próxima do K_M e as velocidades devem estar entre 10 e 90% de V_m)

2. Verifique se as velocidades determinadas são realmente velocidades iniciais.

PRÁTICA 6 - CINÉTICA ENZIMÁTICA: EFEITO DE INIBIDORES SOBRE A VELOCIDADE DE REAÇÃO.

Para estudar a inibição da atividade da enzima pelo fosfato de sódio, cada grupo deverá preparar 5 fileiras de 10 tubos de ensaio (uma fileira sendo com os brancos, outra sem inibidor e 3 com inibidor em 3 diferentes concentrações). Em todas as baterias, as concentrações de tampão citrato, pH 5,5 (100 mmol/L) e enzima (10 ng/tubo, exceto nos brancos) serão mantidas constantes, enquanto a concentração de substrato deverá variar conforme o protocolo apresentado na prática 6. O volume total de cada tubo será de 1 mL. Nas três baterias contendo o inibidor, o fosfato de sódio estará presente numa concentração de 0,5; 1,5 ou 3,0 mmol/L, sendo mantida a mesma concentração nos 10 tubos da bateria. Nos tubos da fileira de brancos (sem enzima e sem inibidor) adicione um volume de água igual à soma dos volumes de enzima e fosfato adicionados aos demais. Todas as reações serão finalizadas com 1,0 mL de NaOH 1,0 mol/L.

Para este experimento serão fornecidas as seguintes soluções estoque:

- * Tampão citrato 200 mmol/L, pH 5,5
- * fosfato de sódio 5 mmol/L, 15 mmol/L e 30 mmol/L
- * PNFF 20 mmol/L, 2 mmol/L e 1 mmol/L.
- * fosfatase ácida 100 ng/mL

Para cada fileira de tubos onde houver o inibidor deverá ser utilizada a solução estoque adequada, de modo a obter a concentração final desejada de fosfato (0; 0,5; 1,5 ou 3,0 mmol/L). A tabela a seguir é um modelo para a construção do protocolo experimental para cada bateria.

Adicione o volume de enzima calculado, aos tubos das 4 fileiras, em intervalos regulares de 1 minuto. Homogenize, suavemente, o conteúdo dos tubos e deixe a reação se processar durante exatamente 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, interrompa a reação pela adição de 1,0 mL de NaOH 1,0 mol/L a cada tubo, com o mesmo intervalo de 1 minuto entre os tubos e agite

vigorosamente. Efetue, em seguida, a leitura de absorvância de cada tubo em 410 nm, usando o branco correspondente.

Tubo	Tampão (mL)	Água (mL)	[pNFF] estoque (mmol/L)	pNFF (mL)	[pNFF] (mM)	Fosfato (mL)	Enzima (mL)	A _{410 nm}
1					0,05			
2					0,07			
3					0,1			
4					0,15			
5					0,2			
6					0,4			
7					0,5			
8					1,0			
9					2,0			
10					5,0			

Utilizando os resultados obtidos:

1. Calcule a atividade da enzima em U/mg para cada um dos tubos.
2. Faça a representação dos duplos inversos e determine o tipo de inibição que está ocorrendo.
3. Utilizando a representação de $K_{mapp} \times [Inibidor]$ (mmol/L) determine graficamente no eixo X (mmol/L) o valor da constante de dissociação do complexo enzima-inibidor (K_i) em mM.

PRÁTICA 7. REAÇÕES DE CARACTERIZAÇÃO DE CARBOIDRATOS; MÉTODOS DE DOSAGEM DE MONOSSACARÍDEOS

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes do planeta. Quimicamente, são **polihidroxi aldeídos** ou **polihidroxi cetonas** cíclicas que ocorrem na natureza como unidades monossacarídicas (aldoses ou cetoses), oligossacarídeos (algumas unidades monossacarídicas unidas por **ligações glicosídicas**) e polissacarídeos (grandes cadeias lineares ou ramificadas compostas por muitas unidades monossacarídicas). Os **monossacarídeos** mais comuns na natureza são a glicose, a frutose, a ribose (constituente dos ácidos nucleicos) e a manose. Entre os oligossacarídeos, os mais abundantes são os **dissacarídeos**, como a sacarose e a lactose. Os polissacarídeos podem ter centenas ou milhares de unidades monossacarídicas; alguns, como a **celulose** e a **quitina** (principal componente do exoesqueleto de insetos e outros invertebrados) têm função estrutural, enquanto outros, como o **amido**, e o **glicogênio** atuam como reserva de energia em vegetais e animais.

Monossacarídeos de 4 ou mais átomos de carbono podem existir como hemiacetais ou hemicetais, apresentando uma estrutura em forma de anel. Estes anéis podem ser de 5 átomos (**furanoses**) ou 6 átomos (**piranoses**). As furanoses e piranoses ocorrem em formas isoméricas denominadas **anômeros** α e β , que são interconvertidos num processo chamado **mutarrotação**. Monossacarídeos e outros açúcares que apresentam carbono anomérico (carbono carbonílico ou hemiacetal) livre são chamados **açúcares redutores**. Quando aquecidos em presença de certos íons metálicos em meio fracamente alcalino, os açúcares redutores sofrem oxidação do grupamento carbonila, com a formação do respectivo ácido carboxílico e a redução do metal.

Devido à presença de vários grupos reacionais na molécula, os monossacarídeos podem sofrer também uma série de outras reações químicas. Por exemplo, quando aquecidos na presença de fenóis, certas aminas, antrona e/ou resorcinol, os monossacarídeos formam produtos coloridos. Muitas destas

reações são utilizadas na quantificação de açúcares, através de dosagem espectrofotométrica na região do visível.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1. Reações características dos carboidratos

Colocar em diferentes tubos de ensaio um pequeno volume (40 gotas ou 2 mL) de cada solução de açúcar disponível e adicionar uma quantidade equivalente do reagente de Benedict. Faça um tubo com reagente e substitua o açúcar por água (branco). Homogeneizar e colocar os tubos num banho-maria a aproximadamente 100°C durante 2 min. Deixar esfriar e anotar os resultados. Repetir o mesmo procedimento, empregando agora o reagente de Tollens.

Explicar através de equação química o que ocorre em cada teste qualitativo realizado com os açúcares disponíveis.

ATENÇÃO: devido à formação do espelho de prata, terminado este experimento deixe os tubos na capela, próximo aos descartes.

2. Determinação quantitativa de glicose

Cada grupo deverá determinar a concentração de uma solução de glicose de concentração desconhecida. Para isto deverá traçar uma curva padrão empregando o método do Ácido 3,5-dinitrosalicílico (Anal. Biochem. **31**: 426, 1959). Partindo de uma solução padrão de glicose de concentração 0,01 M, preparar soluções contendo entre 0,35 e 1,5 mg de glicose (ver tabela abaixo), em um volume final de 1,5 mL. Preparar essas soluções em uma fileira de tubos em um rack e adicionar a essa fileira, o tubo da amostra de concentração desconhecida, fornecida pela equipe técnica).

A tabela, na próxima página, apresenta um protocolo típico para esta dosagem de glicose:

ATENÇÃO: Não se esqueça de acrescentar também um tubo contendo 1,5 mL da amostra desconhecida! E informar o número dessa amostra no relatório!!

Tubo	Glicose (mL)	Água (mL)	Glicose (mg)	Reagente (mL)	A ₅₄₀
0	0	1,5	0	1,0	branco
1			0,36		
2			0,72		
3			1,08		
4			1,44		

Após a preparação das soluções, o procedimento a seguir será feito com todos os tubos preparados (“branco”, soluções da curva padrão e amostra desconhecida). Adicionar a cada tubo 1,0 mL do reagente ANS, colocá-los em banho-maria a aproximadamente 100°C por 5 minutos, deixar esfriar e completar o volume para 10 mL. Ler a absorbância de cada tubo em 540 nm.

3. Determinação de lactose no leite (método de Somogyi e Nelson)

Cada grupo deverá determinar a concentração de lactose em 2 amostras de leite: uma armazenada em geladeira e outra previamente mantida à temperatura ambiente por 48 horas. Será empregado o método de Somogy e Nelson (Journal of Biological Chemistry, **195**:19-23).

3.a. Preparo das amostras de leite

Transferir 2 mL (utilizando uma pipeta) de uma das amostras de leite para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada. Transferir esta solução para um béquer e repetir o mesmo procedimento com a

outra amostra. Transferir 1 mL (pipeta) de cada solução diluída de leite para tubos cônicos de 15 mL. Adicionar 1,0 mL de ZnSO₄ a 5% e agitar. Acrescentar 1,0 mL de hidróxido de bário 0,3N (agitar a solução de bário antes de usar) e agitar novamente. Adicionar 7 mL de água destilada e agitar. Centrifugar durante 5 minutos (3.000 rpm).

ATENÇÃO: Para a centrifugação utilize 2 tubinhos equilibrados (de mesma massa), colocados de maneira diametralmente oposta no interior da centrífuga!!!

3.b. Determinação da curva padrão de lactose e do teor de lactose no leite

Para a curva padrão, partindo de uma solução padrão de lactose (360,30 g/mol) de concentração 100 µg/mL, preparar 5 soluções contendo entre 20 e 100 µg de lactose, em um volume final de 1,0 mL (ver tabela abaixo). Prepare um tubo “branco” usando 1mL de água no lugar da lactose padrão. Em seguida, para as dosagens de lactose no leite, preparar 2 outros tubos contendo 1 mL do sobrenadante obtido após a centrifugação de cada uma das amostras de leite (Leite X e Leite Y). A tabela, na próxima página, apresenta um protocolo típico para esta dosagem de lactose.

Após a preparação das soluções, o procedimento a seguir será feito com todos os tubos preparados (“branco”, soluções da curva padrão e amostras de leite). Adicionar a cada tubo 1,0 mL do reagente de Somogyi e agitar. Deixar em banho-maria, na temperatura de ebulição, por 10 minutos. Retirar os tubos do banho e esfriar em água corrente. Adicionar 1,0 mL do reagente de Nelson a cada tubo e agitar. Completar o volume para 10.0 mL, com água destilada. Determinar a absorbância em 540 nm.

Tubo	Água (mL)	Lactose (mL)	Amostra de leite	[Lactose] ($\mu\text{g/mL}$)	Reag. Somogy (mL)	Reag. Nelson (mL)	Água (mL)	A _{540 nm}
0	1	-----	-----		1.0	1.0	7	branco
1	0.8	0.2	-----		1.0	1.0	7	
2	0.6	0.4	-----		1.0	1.0	7	
3	0.4	0.6	-----		1.0	1.0	7	
4	0.2	0.8	-----		1.0	1.0	7	
5	-----	1.0	-----		1.0	1.0	7	
6	-----	-----	1 mL de X		1.0	1.0	7	
7	-----	-----	1 mL de Y		1.0	1.0	7	

ATENÇÃO: não esqueça de preparar o “branco”, empregando 1 ml de água em lugar da solução de lactose.

A partir dos resultados obtidos, determinar as concentrações de lactose nas duas amostras de leite. Expressar os resultados em g de lactose/100 mL de leite. (Não esquecer de considerar a diluição do leite!).

Questões

1. Quais os princípios do método de dosagem de lactose desenvolvido por Somogyi e Nelson? Apresente as reações químicas pertinentes.
2. Discuta os resultados obtidos em função da diferença de temperatura de armazenagem do leite. Os resultados obtidos foram os esperados? Por quê?

Reagentes:

Reagente de Tollens: Nitrato de Prata 1% em NH_4OH .

Reagente de Benedict: Dissolver 173 g de citrato de sódio e 100 g de carbonato de sódio em 800 mL de água destilada quente. Adicionar 100 mL de uma solução contendo 17,3 g de sulfato de cobre e completar o volume para 1 litro.

Ácido 3,5-dinitrosalicílico (reagente ANS): Formar uma pasta com 5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico e alguns mL de água; aquecer em banho-maria a 50°C , acrescentando água até aproximadamente 100 mL; adicionar, agitando, 8 g de NaOH . Preparar separadamente uma solução com 150 g de tartarato de sódio e potássio em 250 mL de água, aquecendo em banho a 50°C . Misturar as duas soluções e completar o volume para 500 mL. Alternativamente, pode-se dissolver 8 g de NaOH em 80 mL de água e acrescentar esta solução à pasta de ácido 3,5 dinitrosalicílico, acrescentando água a esta mistura até aproximadamente 100 mL. Prossegue-se, então, conforme o roteiro acima.

Reagente de Somogyi: Solução A: Dissolver 25 g de carbonato de sódio (Na_2CO_3) , 20g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 200g de sulfato de sódio (Na_2SO_4) e 25 g de tartarato duplo de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) em 1000 mL de água (destilada e deionizada). Solução B: dissolver 15g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre). em 100 mL de água (destilada e deionizada). Para uso, misturar as soluções A e B imediatamente antes do uso na proporção de 24mL de A para 1 mL de B.

Reagente de Nelson: Solução I: Dissolver 25 g de molibdato de amônio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) em 450 ml de água destilada e, cuidadosamente, adicionar 21mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4).. Solução II: Dissolver 3 g de arseniato dibásico de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) em 25 ml de água. Para uso: Misturar as soluções I e II, manter à 37°C por 24 a 48 horas ou aquecer a 55°C por 15 a 25 minutos sob agitação.

Solução Padrão de Lactose: Dissolver 0,100 g de lactose pura em 1 L de água.

PRÁTICA 8. REAÇÕES DE CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDEOS

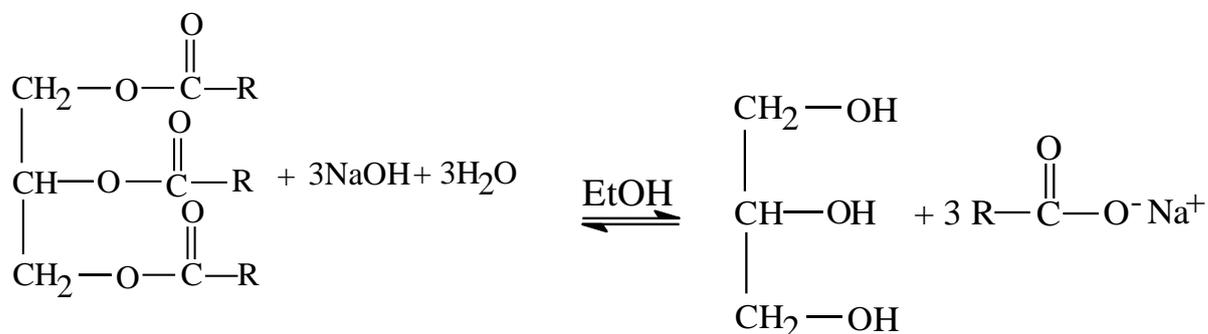
Os **lipídeos** são um grupo de compostos quimicamente diversos que apresentam em comum a característica de serem praticamente insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos apolares e nos de baixa polaridade. Estes compostos desempenham inúmeras funções biológicas: gorduras e óleos representam a principal forma de estocagem de energia em muitos organismos; fosfolipídeos e esteróis são os principais componentes estruturais das membranas biológicas. Alguns lipídeos atuam ainda como cofatores enzimáticos, carreadores de elétrons, hormônios e mensageiros intracelulares, entre outras funções.

As **gorduras e óleos** são derivados de **ácidos graxos** (ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbônicas variando entre 4 e 36 átomos de carbono). Os ácidos graxos mais comuns na natureza apresentam número par de átomos de carbono (12 a 24) numa cadeia não ramificada. Alguns são completamente saturados, enquanto outros apresentam uma ou mais duplas ligações, em configuração *cis*-.

As propriedades físicas dos ácidos graxos e compostos em que eles estão presentes são determinadas em grande parte pelo comprimento da cadeia carbônica e seu grau de insaturação. Quanto mais longa a cadeia e menor o número de duplas ligações, menor a solubilidade do composto em água e maior o seu ponto de fusão.

Os **triacilgliceróis** (ou triglicérides) são constituídos por três moléculas de ácido graxo esterificadas a uma única molécula de glicerol. Nos triacilgliceróis simples, as três moléculas de ácido graxo são iguais, enquanto nos mistos, mais comuns na natureza, duas ou mais moléculas de ácido graxo são diferentes. Os triacilgliceróis são os principais componentes de óleos vegetais, gordura animal e certos derivados de leite, que geralmente apresentam 5 a 12 tipos diferentes de ácidos graxos esterificados ao glicerol de modo aleatório, formando misturas complexas e bastante heterogêneas. Por exemplo, no óleo de soja (*Glycine hispida*) são encontrados, principalmente, os seguintes ácidos graxos: ácido palmítico (9%), ácido esteárico (4%), ácido oléico (23%), ácido linolêico (55%) e ácido linolênico (8%).

Para separar os componentes de um acilglicerol emprega-se a reação de saponificação:



Os ácidos graxos podem ser identificados através das propriedades de seus sais (sabões), obtidos na reação de saponificação. Os sabões são compostos que abaixam a tensão superficial da água, são solúveis em água (os de metais alcalinos), insolúveis em éter e em soluções salinas concentradas.

O **índice de saponificação** corresponde à massa de hidróxido de potássio (em mg) necessária para saponificar 1 g de triacilgliceróis (gordura ou óleo). A determinação deste índice tem importância prática graças à sua relação com o comprimento da cadeia carbônica dos resíduos de ácidos graxos presentes no material testado. Três moléculas de KOH são necessárias para neutralizar 3 ácidos graxos liberados pela hidrólise dos triacilgliceróis, não importando o tamanho da cadeia dos ácidos graxos. Desta forma, o índice de saponificação correspondente a uma dada massa de lipídeos varia inversamente com a massa molar dos resíduos de ácidos graxos.

A tabela, na próxima página, mostra os valores de índice de saponificação encontrados para alguns óleos e gorduras comuns.

Produto	Índice de Saponificação
Óleo de soja	189-195
Óleo de milho	187-193
Óleo de girassol	188 -194
Óleo de amendoim	188-195
Óleo de arroz	181-189
Óleo de algodão	189-198
Azeite de oliva	186-196
Azeite de dendê	195-205
Gordura de coco	250-264
Gordura do leite	219-234

A formação de odores e sabores estranhos em lipídeos e alimentos que os contêm, geralmente descrita como **rancidez**, é seguramente uma das reações mais importantes de deterioração de qualidade destes alimentos. Existem basicamente dois tipos de rancidez: a hidrolítica e a oxidativa. A rancidez hidrolítica deve-se à ação de lipases, amplamente distribuídas nos alimentos e que catalisam a hidrólise dos triglicerídeos, liberando ácidos graxos. A rancidez oxidativa pode ocorrer por via enzimática, pela ação das enzimas lipoxigenases, ou por via não enzimática, através da autooxidação ou da fotooxidação. Na rancidez oxidativa têm-se a reação do oxigênio atmosférico com as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados produzindo peróxidos e hidroperóxidos que por uma série de reações paralelas geram compostos como aldeídos, cetonas, álcoois e outros, responsáveis pelas características de produtos rancificados. A oxidação pode levar à destruição de vitaminas, ácidos graxos, pigmentos e proteínas, mas a perda das qualidades sensoriais é o efeito mais visível decorrente deste processo. Os compostos voláteis formados podem fazer com que o alimento seja rejeitado mesmo estando em concentrações muito baixas. Desta forma, alimentos

com alto teor de ácidos graxos insaturados, devem ser acondicionados em embalagens com baixa permeabilidade ao oxigênio, com boa barreira à luz, recomendando-se ainda a utilização de vácuo, minimizando os efeitos da oxidação.

A determinação de acidez pode nos fornecer dados valiosos sobre o estado de conservação de um óleo ou gordura, uma vez que processos de decomposição, por hidrólise, oxidação ou fermentação, alteram a concentração de íons hidrogênio no produto. O método mais utilizado para a determinação da acidez de óleos e gorduras é a titulação.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1. Propriedades gerais dos óleos

a) Saponificação

Colocar em um tubo de ensaio 20 gotas de um óleo vegetal. Adicionar 2 mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio a 10%. Aquecer **cuidadosamente** em chama baixa, durante aproximadamente 8 minutos. Adicionar 10 mL de água quente e agitar com bastão de vidro, continuando o aquecimento em banho fervente por 15 minutos. Justificar o resultado com auxílio de equação química. Guardar o tubo para o procedimento da etapa abaixo.

b) Formação de emulsão

Numerar 2 tubos (não lavados) de ensaio colocando em cada um 5 gotas de um óleo vegetal. Adicionar 5 mL de água ao tubo nº 1 e 5 mL de solução de Na_2CO_3 a 2% ao tubo nº 2. Agitar fortemente e verificar a formação de emulsão. Verificar o tempo de duração da mesma em cada um dos tubos.

c) Separação dos ácidos graxos

Transferir metade do conteúdo do tubo contendo sabões (obtido no ensaio a) para outro tubo de ensaio. Introduzir neste um pedaço de papel tornassol azul.

Adicionar gotas HCl concentrado até a viragem do papel indicador. Verificar a separação da mistura em duas camadas. Deixar em banho fervente até a fusão da camada superior. Justificar a separação em duas fases, com o auxílio de uma equação química. Qual é o componente orgânico presente na camada aquosa?

Conservar o tubo em banho-fervente para ensaios posteriores.

d) Solubilidade dos sabões

Ao tubo contendo a solução restante do sabão obtido no ensaio (a), adicionar 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Observar e explicar o que acontece.

e) Formação de sabões por redissolução dos ácidos graxos

Transferir 3 gotas dos ácidos graxos obtidos no ensaio (c) para um tubo contendo cerca de 5 mL de água quente. Adicionar às gotas solução de NaOH 1 N, até a solubilidade da fase oleosa. Agitar o tubo, verificar a formação de espuma e explicar os resultados com o auxílio de uma equação química. Conservar o tubo para ensaios posteriores.

f) Formação de sabões insolúveis

Dividir o conteúdo do tubo preparado no ensaio acima (item e) em duas alíquotas. Dobrar o volume de cada uma por adição de água. Ao primeiro tubo, adicionar 4 gotas de cloreto de cálcio a 5% e, ao segundo, 4 gotas de acetato de chumbo a 1%. Agitar os tubos e explicar os resultados.

g) Determinação do índice de saponificação de um óleo

Em um erlenmeyer de 250 mL rigorosamente limpo e seco, pesar cerca de 1 g (anote a massa exata) de óleo vegetal e anotar a massa exata. Em seguida, adicionar 25,0 mL de solução alcoólica de KOH 0,50 mol.L⁻¹. Levar o sistema ao banho-maria fervente por 30 minutos. Colocar também no banho um béquer com 50 mL de água para que aqueça simultaneamente. Retirar a amostra do banho-

maria e adicionar a água fervente. Titular ainda quente com HCl 0,50 mol.L⁻¹, usando 2 gotas de fenolftaleína como indicador.

Realizar uma prova em branco usando 25,0 mL de solução alcoólica de KOH 0,50 mol.L⁻¹ aquecida (cerca de 5 minutos no banho-maria fervente) e titular com HCl 0,50 mol.L⁻¹, usando a fenolftaleína como indicador.

Cálculo:

$$I.S. = \frac{(VB - VA) \cdot M_{HCl} \cdot 56,1}{m}$$

onde:

VB = volume (em mL) do HCl gasto na titulação do branco

VA = volume (em mL) do HCl gasto na titulação da amostra

m = massa da amostra (em gramas)

M_{HCl} = concentração molar da solução de HCl

O valor calculado de I.S. (índice de saponificação) já tem implícito o fato de que a massa de KOH deve ser expressa em mg. O valor 56,1 que aparece na expressão acima corresponde à massa molar do KOH.

Determinar o índice de saponificação do óleo escolhido e compará-lo com o valor esperado.

h) Determinação do índice de acidez de um óleo

Pese de 5,0 a 10,0 gramas de óleo vegetal diretamente em um erlenmeyer de 125,0 mL, anotando o valor da massa pesada. Adicione 25,0 mL de uma mistura de éter e etanol (na proporção de 1:1) e 3 gotas de fenolftaleína. Faça um experimento controle sem a amostra de óleo (branco).

Titule com NaOH 0,01 mol.L⁻¹. A cor rósea deve persistir por 30 segundos. Anote o volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra (Va) e do branco (Vb).

Calcula-se o índice de acidez livre através da seguinte fórmula:

$$IA\% = \frac{(V_a - V_b) \text{ (mL) de NaOH} \times [\text{NaOH}] \text{ (mol.L}^{-1}) \times 282 \text{ g.mol}^{-1}}{\text{massa da amostra (g)} \times 10}$$

onde: **Vb**: volume obtido na titulação do branco.

Va: volume de NaOH 0,01 mol.L⁻¹ obtido na titulação da amostra.

O valor 282 g.mol⁻¹ corresponde à massa molar do ácido oléico, presente em abundância nos óleos vegetais.

Fundamente o princípio do método e discuta os resultados obtidos.