



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



BIOQUÍMICA – LCB 208

ROTEIRO DE AULAS PRÁTICAS

DOCENTES:

Prof. Dr. Daniel Scherer

Prof. Dra. Helaine Carrer

Prof. Dr. Luiz Basso

Profa. Dra. Núbia Eloy

Prof. Dr. Paulo Teixeira

Prof. Dr. Victor Vitorello

Técnica Responsável: Aline Borges

Piracicaba - SP

2023

SUMÁRIO

AULAS	pg
1. Colorimetria e Espectrofotometria	03
2. Determinação de Lactose no leite	06
3. Cromatografia em Papel de Filtro	09
4. Determinação do Teor de Caseína no leite (Reação do Biureto)	12
5. Determinação da Constante de Michaelis (Km) e da Velocidade máxima (Vm) para a Invertase de Levedura	15
6. Reação de Hill (Fotólise da água)	16

COLORIMETRIA E ESPECTROFOTOMETRIA

1. OBJETIVOS

Dosagens de espécies químicas mediante a absorção de luz.

2. FUNDAMENTOS DO MÉTODO

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

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

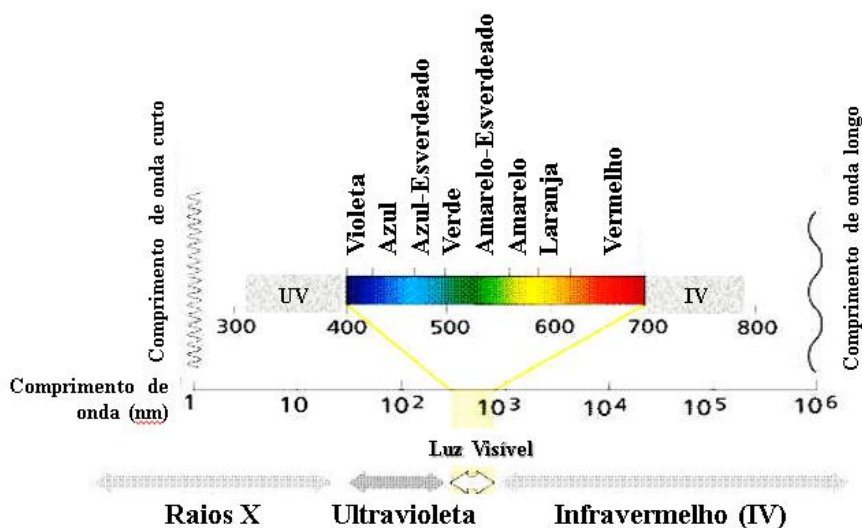


Figura 1. Espectro de absorção de luz em diversos comprimentos de onda (λ).

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

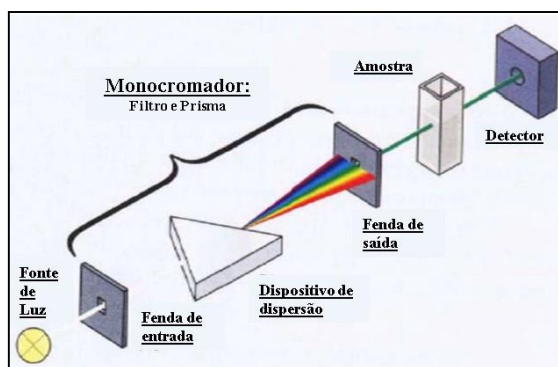
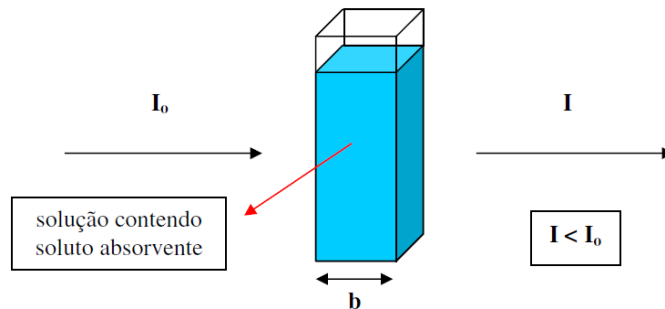


Figura 2. Componentes e funcionamento de um espectrofotômetro para análise da absorção de um determinado comprimento de onda específico de uma solução.

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



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

$$I < I_0$$

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

A Transmitância ou Transmissão (T%) corresponde a:

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

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

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

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

$$Ab = 2 - \log T$$

PRÁTICA

AULA 1. COLORIMETRIA E ESPECTROMETRIA

1ª ETAPA:

- Coletar dados para construir o espectro de absorção do **Alaranjado de Metila** ou **Azul de Bromofenol** (um composto por grupo).
- Preencher os dados da Tabela abaixo.

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		
440			490		
460			520		
480			540		
500			560		
520			580		
550			590		
600			620		
700			700		

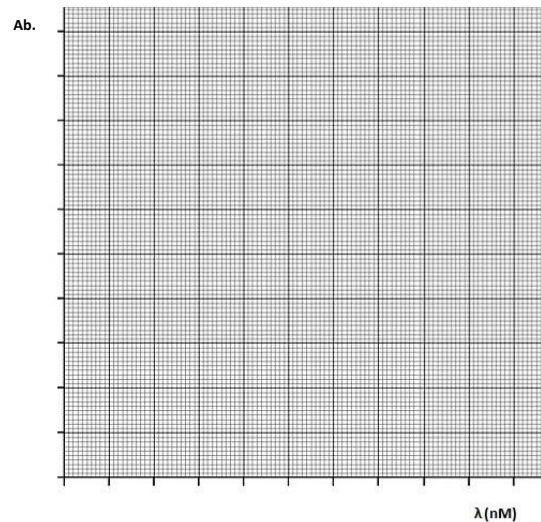


Gráfico 1. Espectro de Absorção do Corante λ (nm)

2ª ETAPA

- Demonstrar a Lei de Lambert-Beer: Estabelece que a absorbância é proporcional à concentração da espécie química absorvente.
- Efetuar as transferências dos volumes (mL) dos corantes (Alaranjado de Metila ou Azul de Bromofenol nas concentrações de 10 µg/mL) e volumes de água destilada (**serão obtidas diferentes concentrações dos corantes**) para os tubos de ensaio conforme Tabela abaixo. **Calcular concentração final em cada tubo.**

Tubos	Água destilada (mL)	Corante [10 µg/mL] (mL)	[Corante] (µg/mL)	T% λ max.	Ab. λ max.
0	5	0			
1	4	1			
2	3	2			
3	2	3			
4	1	4			
5	0	5			
6	5 mL da solução de [] desconhecida		X=		

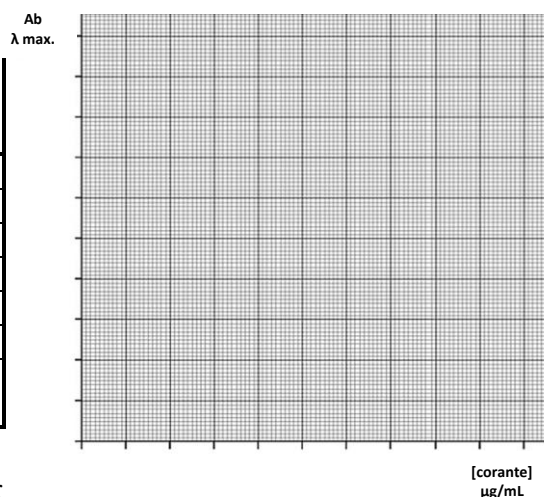


Gráfico 2. Correlação dos valores de absorbância (Y) e concentração de corante (X).

- Com os valores obter a Reta Padrão utilizando o **Gráfico 2** a partir dos dados de Absorbância e valores de concentrações conhecidas da amostra.
- Encontrar a concentração da amostra com [] desconhecida.

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.

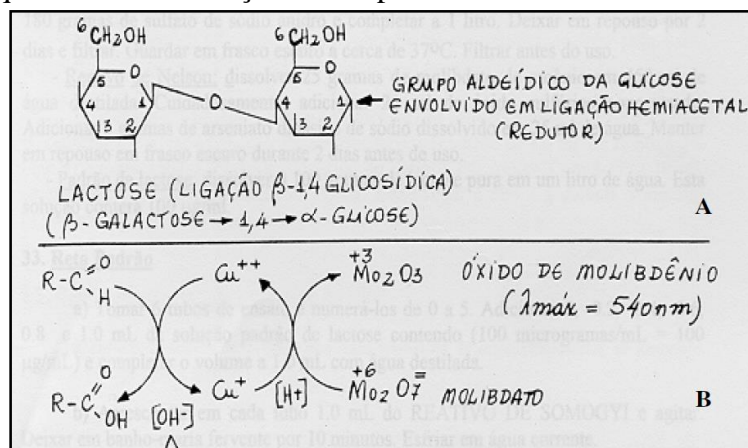


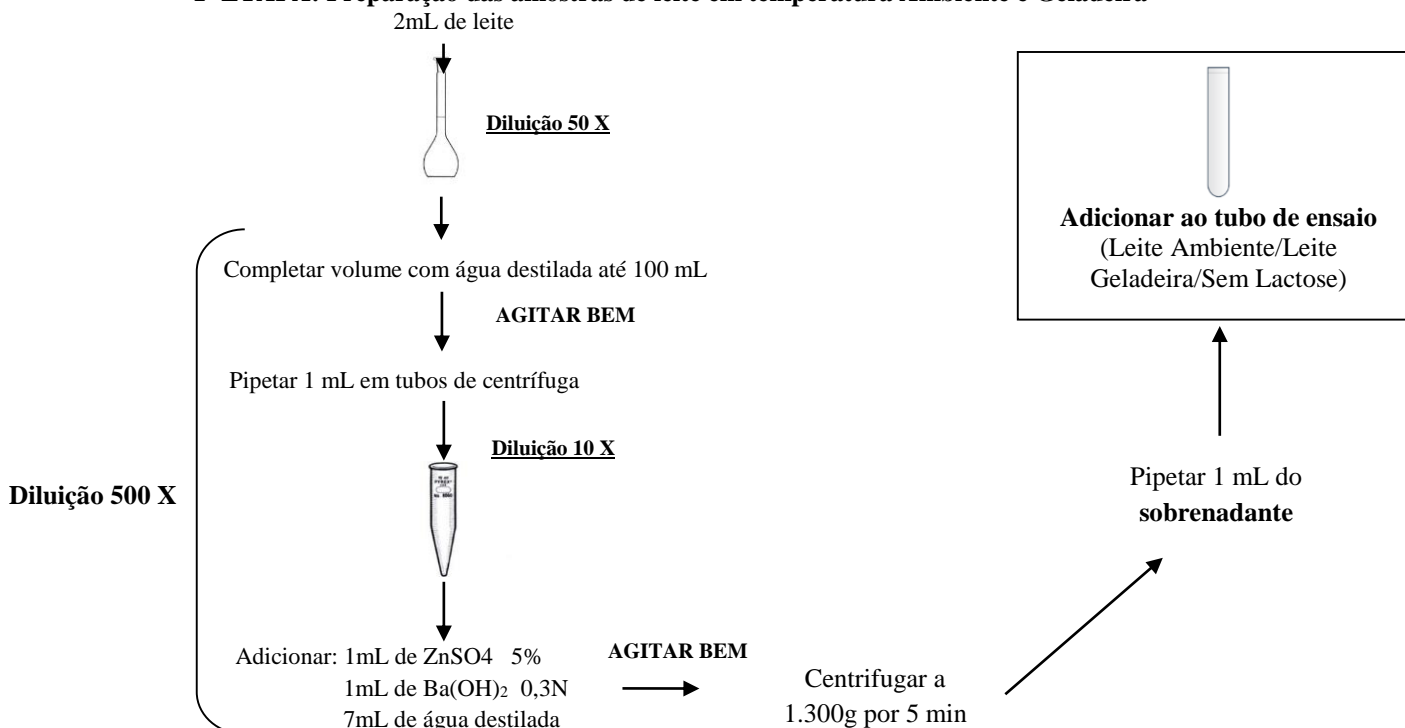
Figura 1. (A) Estrutura molecular do dissacarídeo lactose (β -galactose $\rightarrow 1,4 \rightarrow \alpha$ -glicose), evidenciando o carbono 1 contendo o grupo aldeído da glicose, envolvido em ligação hemiacetal (região redutora). (B) Reações envolvidas no método de Somogyi & Nelson, mostrando a formação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

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

PRÁTICA:

AULA 2. DETERMINAÇÃO DE LACTOSE NO LEITE (MÉTODO DE SOMOGY & NELSON)

1ª ETAPA: Preparação das amostras de leite em temperatura Ambiente e Geladeira



2ª ETAPA: Preparação da RETA PADRÃO e Determinação da Concentração de Lactose (Leite Ambiente/Geladeira)

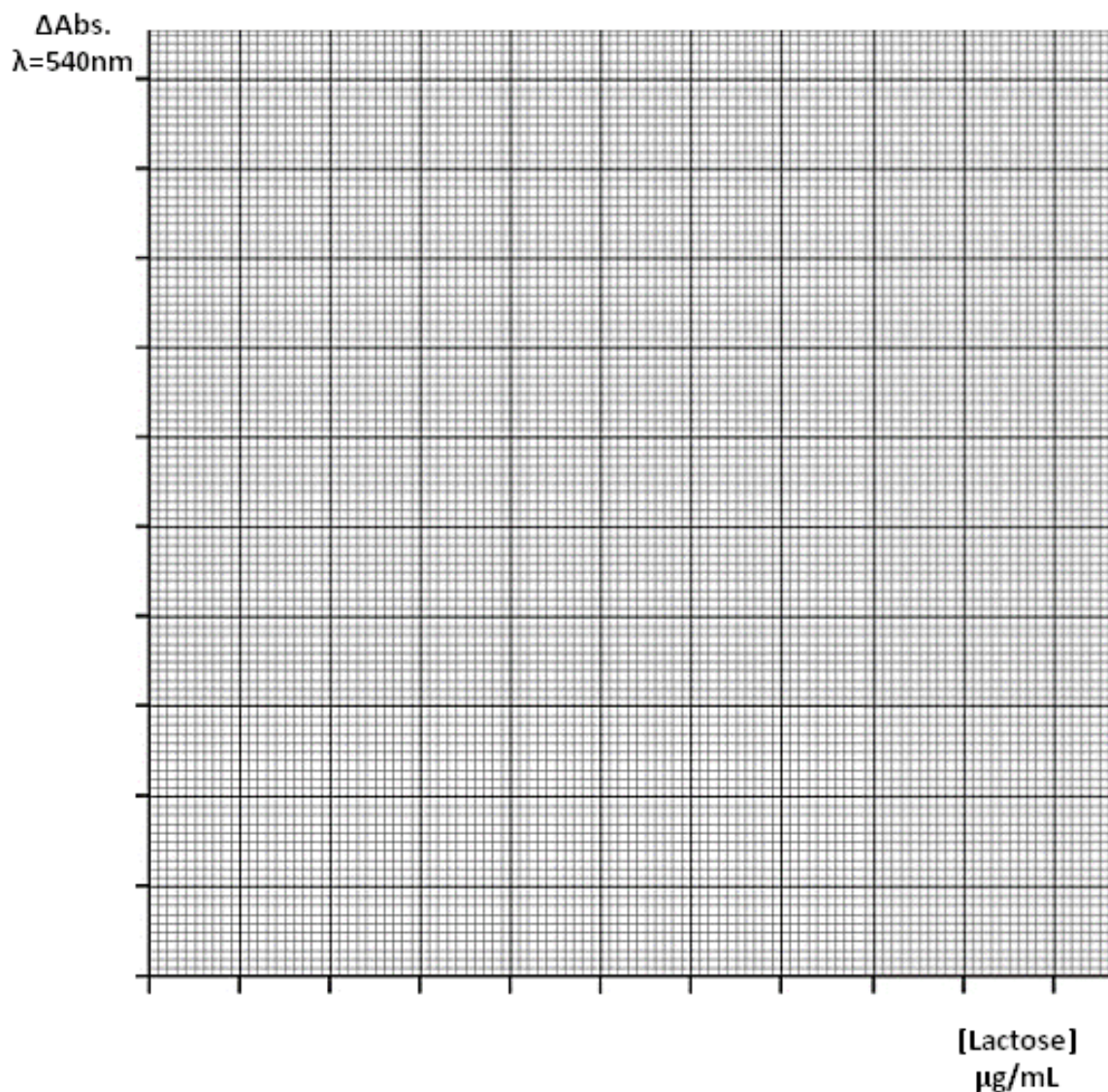
Tabela 1. Retá Padrão

TUBO (Nº)	ÁGUA (ml)	Lactose (100 µg/mL) (mL)	Conc. Obtida (µg/mL)	Reat. Somogy (mL)	Banho Maria	Reat. Nelson (mL)	Compl. Vol. (10 mL)	Transmit. (T%)	Absorb. λ=540nm	Δ Absorb. λ=540nm
0	1,0	0		1,0	Incubar a 100°C por 10 min	1,0	7 mL			0
1	0,8	0,2		1,0		1,0	7 mL			
2	0,6	0,4		1,0		1,0	7 mL			
3	0,4	0,6		1,0		1,0	7 mL			
4	0,2	0,8		1,0		1,0	7 mL			
5	0,0	1,0		1,0		1,0	7 mL			

Tabela 2. Coleta dos valores de Δ absorbância das amostras

Tubo	Leite Diluído (mL)	Reat. Somogy (mL)	Banho Maria (min.)	Reat. Nelson (mL)	Água Destilada (mL)	Transmit. (T%)	Absorb. λ=540nm	Δ Absorb. λ=540nm	[Lactose] (µg/mL)
Leite Ambiente	1,0	1,0	100°C por 10 min	1,0	7 mL				
Leite Geladeira	1,0	1,0		1,0	7 mL				
Leite S/Lactose	1,0	1,0		1,0	7mL				

- **RETA PADRÃO: Colocar valor no Gráfico**



- **Concentração de Lactose no Leite Ambiente..... (μg/mL)**
 Leite Geladeira..... (μg/mL)
 Leite Sem Lactose..... (μg/mL)
- **Teor de lactose no Leite Ambiente:% (m/v)**
 Leite Geladeira:% (m/v)
 Leite Sem Lactose.....% (m/v)

Cálculo:

CROMATOGRAFIA EM PAPEL DE FILTRO

1. OBJETIVO

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

2. FUNDAMENTOS DO MÉTODO

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

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

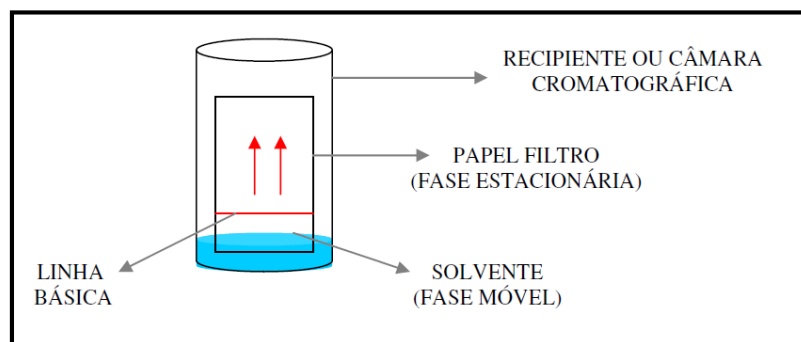


Figura 1. A migração da fase móvel (solvente) pelo papel filtro (fase estacionária) de modo ascendente (representado por setas vermelhas) é importante na técnica cromatográfica. Soluções de aminoácidos colocadas sobre a linha básica através de micropipetas serão transportadas pelo solvente a diferentes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

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

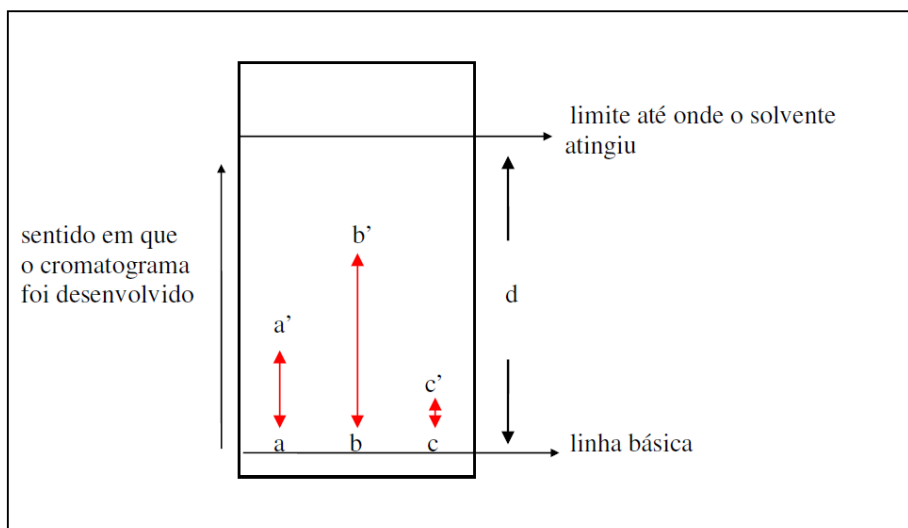


Figura 2. Soluções de aminoácidos a, b e c foram colocadas sobre a linha básica e percorreram as distâncias a', b' e c', respectivamente. A distância d refere-se à distância percorrida pelo solvente. Assim, os fatores de retenção para cada solução de aminoácido são: $R_{fa}=a'/d$; $R_{fb}=b'/d$; $R_{fc}=c'/d$.

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

Chama-se de Rf a relação:

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

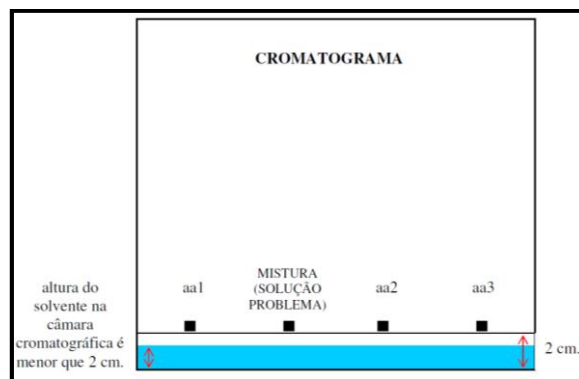
onde: a = coeficiente de partição
 A_s = área ocupada pelo soluto na fase estacionária
 A_l = área ocupada pelo soluto na fase móvel

PRÁTICA.

AULA 3. CROMATOGRAFIA EM PAPEL DE FILTRO

- 1) Pipetar 3 μL da solução de aminoácido **ARGININA** no **PAPEL DE FILTRO** no ponto marcado para o aminoácido
- 2) Repetir o procedimento para a **LEUCINA, PROLINA e MISTURA** (solução problema)

Cromatograma. Distribuição das soluções de aminoácidos no cromatograma sobre a linha básica (dois centímetros acima do bordo inferior do papel). Os aminoácidos 1, 2 e 3 são a arginina, leucina e prolina, respectivamente.



- 3) Secar o papel de filtro com secador de cabelo
- 4) Juntar as extremidades do papel. **NÃO AS SOBREPONHA**. Grampeie as pontas
- 5) Colocar o “**CANUDO**” dentro da cuba contendo a mistura de solventes
- 6) Tampar a cuba
- 7) Deixar correr o cromatograma durante 20-30 minutos
- 8) Tirar da cuba e imediatamente marcar com lápis a **FRENTE DO SOLVENTE**
- 9) Secar o papel com secador de cabelo
- 10) **IDENTIFICAR** o cromatograma do seu **Grupo**
- 11) Pulverizar o papel com o revelador e colocar em estufa à 60°C - 65°C por 5 minutos
- 12) Remover os grampos
- 13) Delimitar as **MANCHAS** com lápis e marcar o centro das mesmas
- 14) Medir **A DISTÂNCIA** entre o ponto de aplicação e o centro das manchas (d)
- 15) Medir a distância entre o ponto de aplicação e a **FRENTE DO SOLVENTE (D)**
- 16) Calcular o **Rf: d/D** característico de cada aminoácido:

Rf da ARGININA:

Rf da LEUCINA:

Rf da PROLINA:

- 17) Identificar os aminoácidos na **MISTURA:**

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

1. OBJETIVO

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

2. FUNDAMENTOS DO MÉTODO

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

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

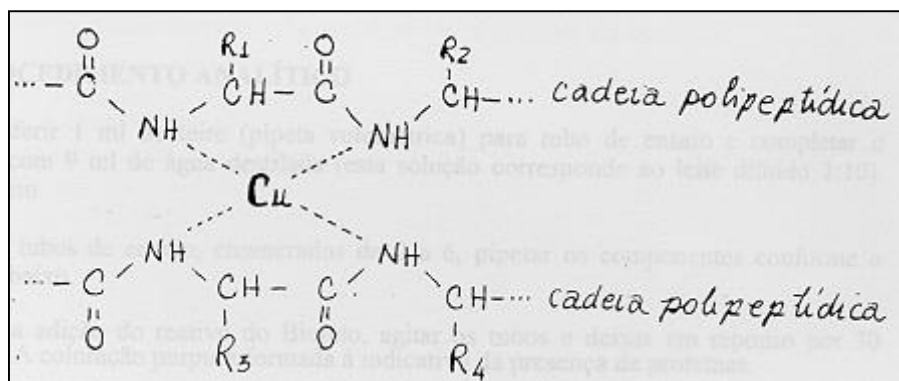
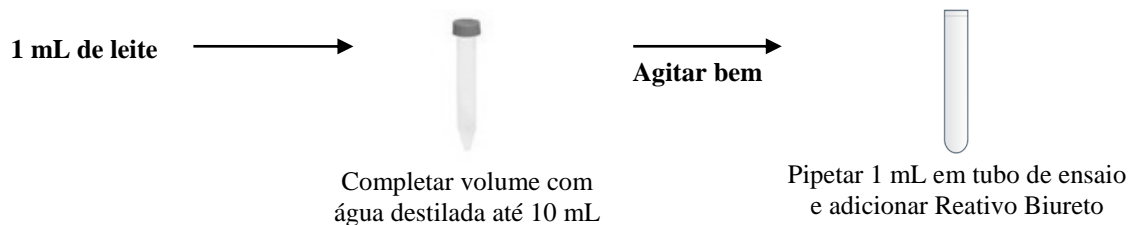


Figura 1. Formação do complexo violeta, pela interação do íon cúprico com duas cadeias polipeptídicas.

PRÁTICA

AULA 4. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA NO LEITE

1ª ETAPA: Preparo amostra: leite diluído 1:10

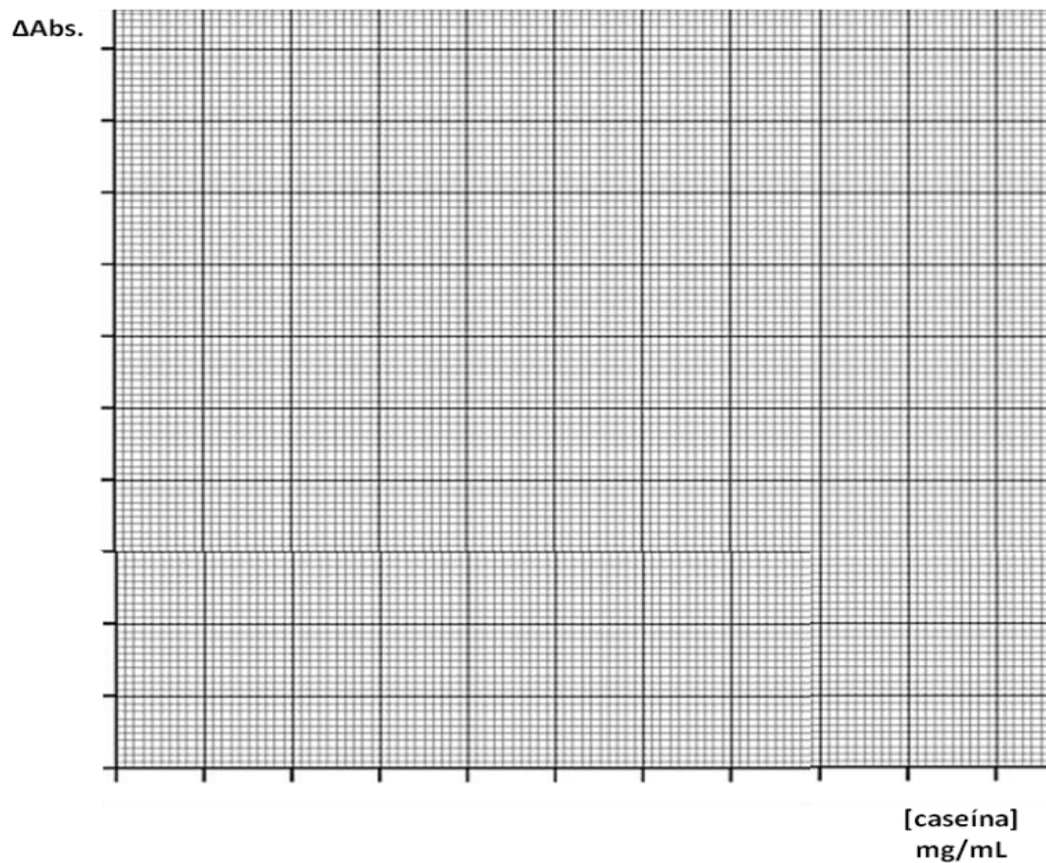


2ª ETAPA: Preparação da Reta Padrão e Quantificação do Teor de Caseína

1) Adicionar **água destilada** em **todos** os tubos de 0 a 5 e em seguida adicionar o **padrão de caseína** conforme tabela abaixo:

Tubo	Água destilada (mL)	Caseína [10 mg/mL] (mL)	Reativo Biureto (mL)	Repouso (min)	Concentração Final (mg/mL)	T (%) $\lambda=540$ nm	Absorb. $\lambda=540$ nm	Δ Abs $\lambda=540$ nm
0	1,0	0	4	30				
1	0,8	0,2	4	30				
2	0,6	0,4	4	30				
3	0,4	0,6	4	30				
4	0,2	0,8	4	30				
5	0	1,0	4	30				
6	1 mL Leite de Diluído (1:10)		4	30	X			

Cálculo:



- Concentração de proteína na amostra de leite diluído:mg/mL
- Teor de proteína totais no leite amostrado: (g/100mL) (%)

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

1. OBJETIVO

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

2. FUNDAMENTOS DO MÉTODO

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

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

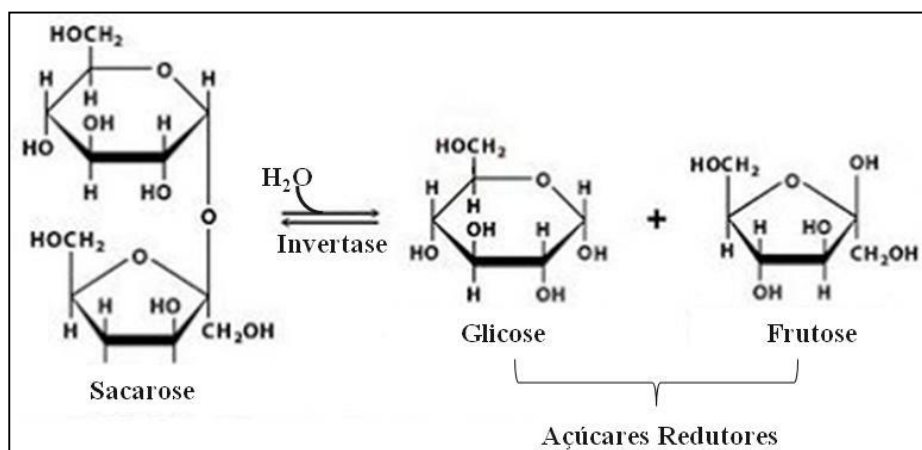


Figura 1. A molécula de sacarose hidrolisada pela enzima invertase da levedura produzindo açúcares redutores (Glicose e Frutose).

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

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

PRÁTICA

AULA 5. DETERMINAÇÕES DA CONSTANTE DE MICHAELIS (KM) E DA VELOCIDADE MÁXIMA (VM) PARA A INVERTASE DE LEVEDURA

1ª ETAPA: A) Ensaio Enzimático e Reação de Dosagem de Açúcares Redutores

Tubo	Água dest. (mL)	Sacarose (mL) (75 mM)	Invertase Diluída		Reat. Somogy (mL)		Reat. Nelson (mL)	Água dest. (mL)	Abs $\lambda=530\text{nm}$	Δ Abs. $\lambda=530\text{nm}$
0	1,00	0,00	0,5	INCUBAR A 37°C POR 10 MIN	1	INCUBAR A 100°C POR 5 MIN	1	4,5		0
1	0,90	0,10	0,5		1		1	4,5		Δ Abs1
2	0,80	0,20	0,5		1		1	4,5		Δ Abs2
3	0,60	0,40	0,5		1		1	4,5		Δ Abs3
4	0,20	0,80	0,5		1		1	4,5		Δ Abs4
5	0,00	1,00	0,5		1		1	4,5		Δ Abs5
6	0,5	1,00	0,0		1		1	4,5		X
7	1,5 mL de padrão contendo 60 μg de glicose				1		1	4,5		

2ª ETAPA: Cálculo do 1/v e 1/[S]

Tubo (Nº)	[S]* mM	*** Δ Abs. corrigida	V (ug AR/10min)	V** (ug AR/h)	$\frac{1}{[S]}$ mM	$\frac{1}{V}$ (ug AR/h)
0	0	-	0	-	-	-
1		Δ Abs1 – 0,1X				
2		Δ Abs2 – 0,2X				
3		Δ Abs3 – 0,4X				
4		Δ Abs4 – 0,8X				
5		Δ Abs5 – 1,0X				

*[S] = Concentração de Substrato (sacarose) no meio de reação enzimática expressa em milimolaridade (mM);

**V = Velocidade de Reação Enzimática expressa em μg (micrograma) de glicose (açúcar redutor) formado por hora.

3ª ETAPA: Obter os Gráficos abaixo, indicando os Valores de V_m e K_m da Invertase

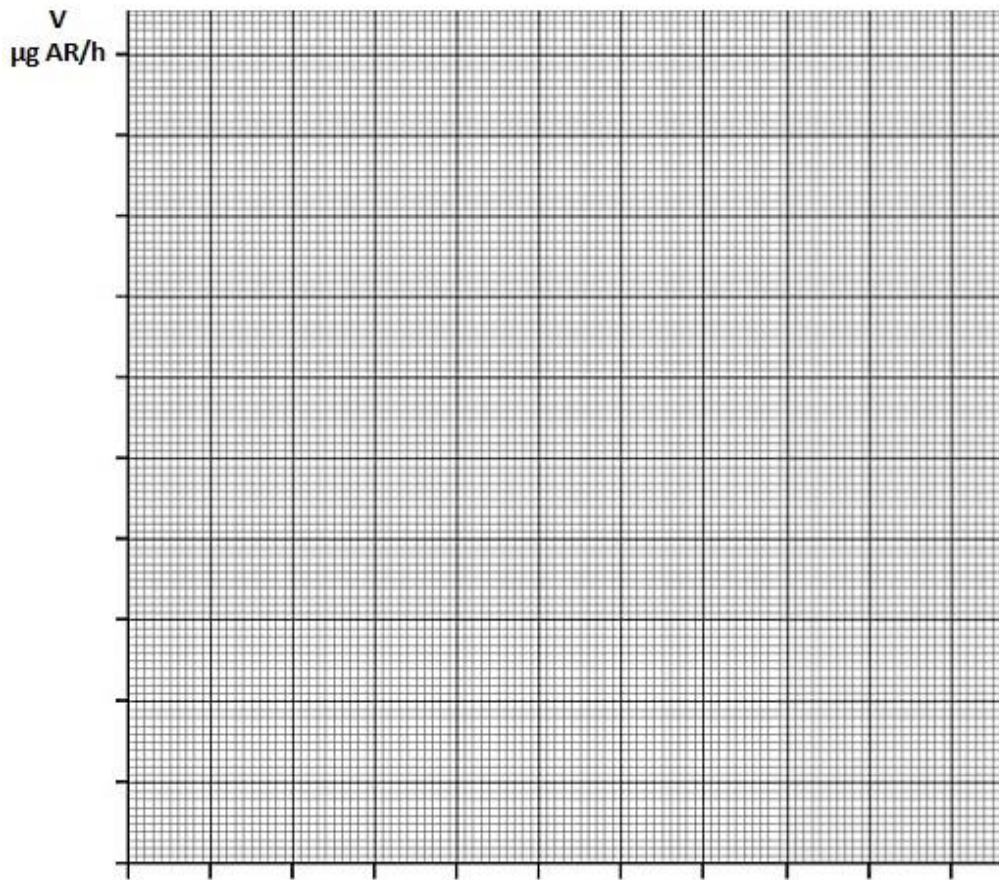


Figura 1. Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação $[S]$ mM

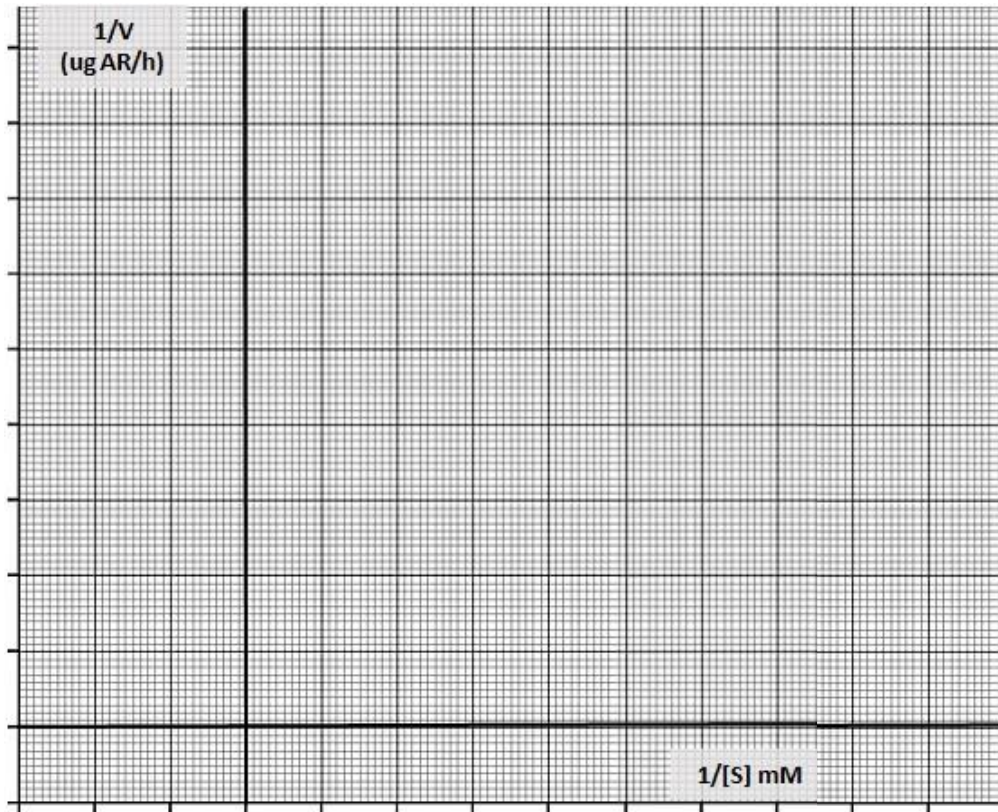


Figura 2. Gráfico representando a recíproca da hipérbole.

REAÇÃO DE HILL (FOTÓLISE DA ÁGUA)

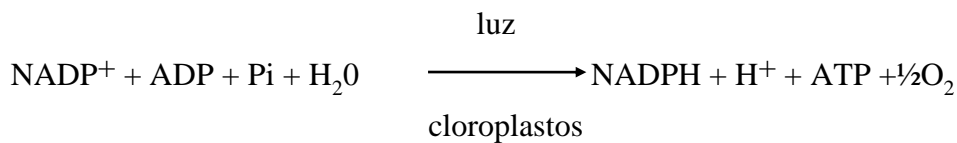
1. OBJETIVO

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

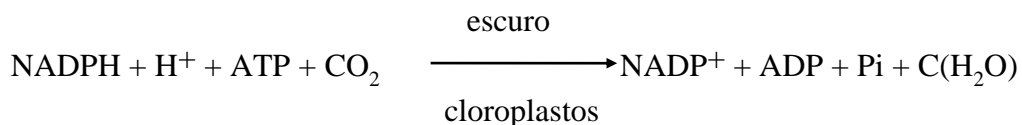
2. FUNDAMENTOS DO MÉTODO

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

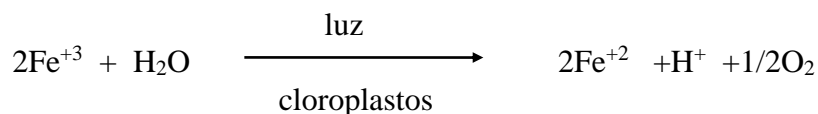
a) **Fase luminosa:** dependente de luz, ocorrendo a fotólise da água acoplada com as produções de NADPH + H⁺ (fotorredução) e de ATP (fotofosforilação), conforme a equação abaixo.



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



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



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

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

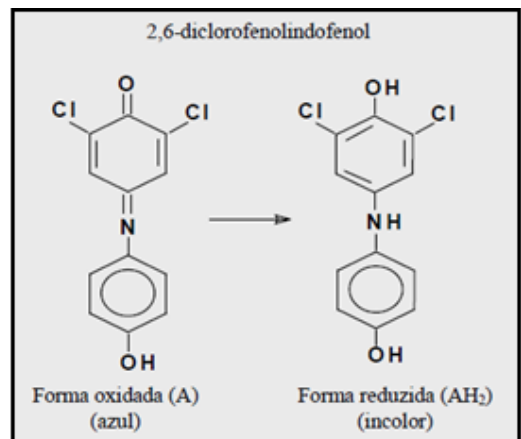


Figura 1. Redução do 2,6 diclorofenolindofenol na Reação de Hill.

PRÁTICA

AULA 6. REACÃO DE HILL (FOTÓLISE DA ÁGUA)

1. Pesar 5 gramas de espinafre (já pesados em papel alumínio)
2. Cortar em pedaços e colocar no almofariz
3. Macerar o espinafre adicionando Sacarose 0,35M aos poucos num total de 10 mL
4. Filtrar o homogeneizado (funil com algodão) coletando em tubo de centrifuga (tubo Falcon)
5. Centrifugar a 1300 rpm durante 2 minutos
6. Passar o sobrenadante para novo tubo de centrifuga (cerca de 9 mL)
7. Centrifugar 1300 rpm durante 7 minutos
8. Desprezar o sobrenadante
9. Ressuspender o precipitado (cloroplasto) em 10 mL de Sacarose em Tampão Fosfato
10. Colocar 1,5 mL da suspensão de cloroplasto no tubo de ensaio numero 4. Ferver por 3 minutos em banho-Maria
11. Durante a fervura do tubo 4, distribuir 1,5 mL da suspensão de cloroplasto nos demais tubos (1,2, 3).
12. Adicionar uma pitada de ácido ascórbico no tubo 1 (já se encontra no tubo)
13. Adicionar 3 mL de Tampão Fosfato nos tubos 1,2,3 e 4.
14. Manter o tubo 3 no escuro (com a tampa)
15. Levar até o monitor para adição de 0,5mL de 2,6 DCF nos tubos 1,2,3 e 4
16. Fazer a leitura imediatamente (540 nm). Ler a Transmitância e obter a Absorbância (2-logT).
17. Deixar os tubos por 1min à luz da lâmpada 100 W (tubo 3 com papel alumínio)
18. Repetir a leitura por mais 2 vezes.
19. Preencher a tabela abaixo.

TUBOS	SUSPENSÃO CLOROPLASTO (ML)	TAMPÃO FOSFATO (ML)	2,6-DCF (ML)	1ª LEITURA		1min à lâmpada (100W)	2ª LEITURA		1min à lâmpada (100W)	3ª LEITURA	
				T (%)	Abs.		T (%)	Abs.		T (%)	Abs.
1*	1,5 (ác. ascórbico)	3	0,5								
2	1,5	3	0,5								
3	1,5 (coberto com alumínio)	3	0,5								
4	1,5 (ferver 3')	3	0,5								

* Ajustar o "zero" do aparelho.

- Discutir os resultados:
 - a) Represente no Gráfico abaixo as três leituras dos tubos 1, 2, 3 e 4.
 - b) Em quais tubos está ocorrendo fotólise?.....
 - c) Em quais tubos está ocorrendo fotólise?.....



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.

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