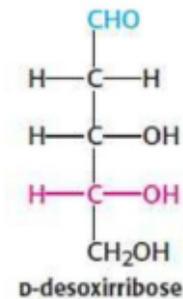
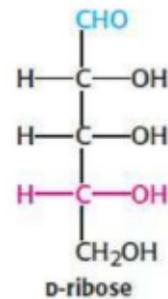


QBQ1453 – Bioquímica Experimental

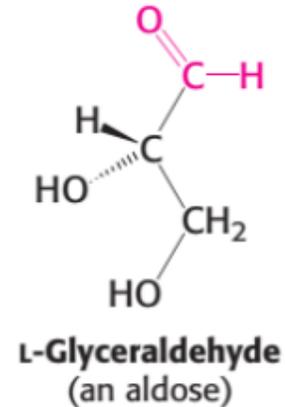
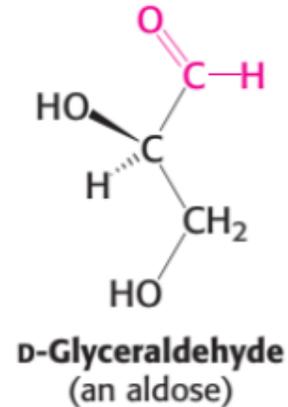
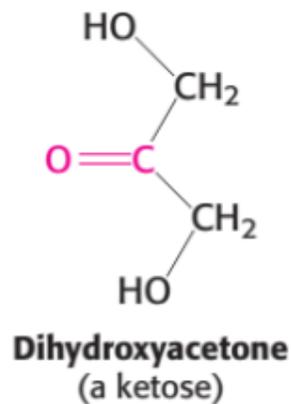
Dosagem de Açúcares Redutores

Nícolas Hoch

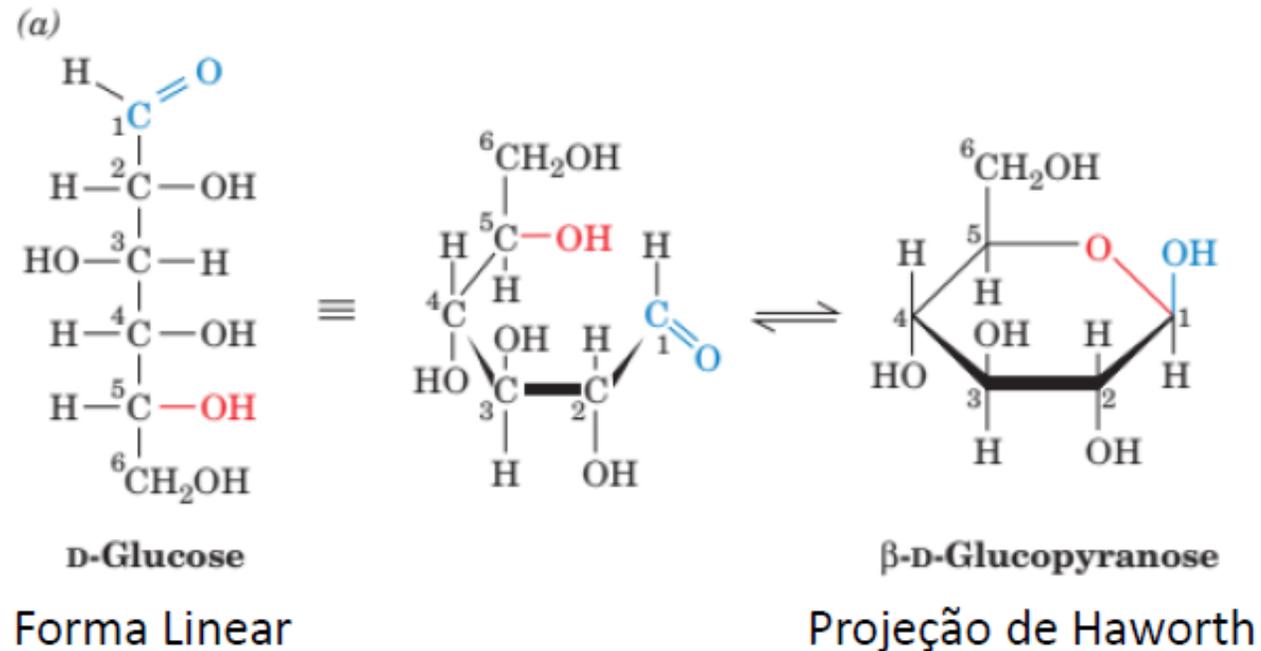
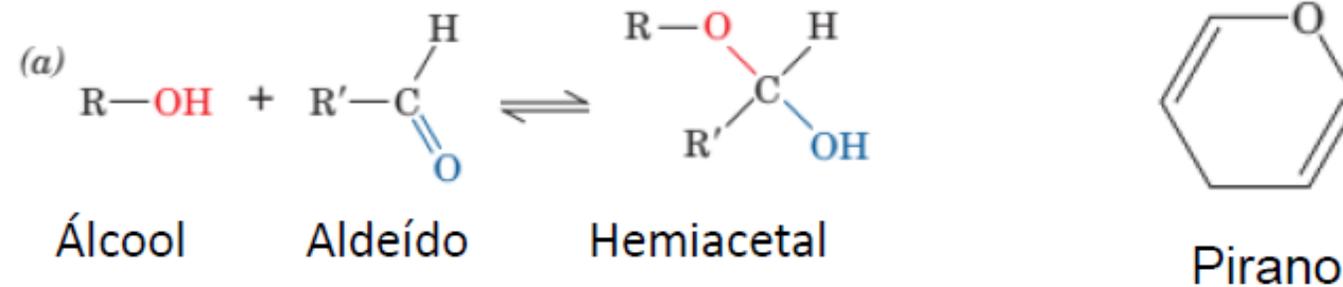
- Carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na Terra (fotossíntese-celulose, amido; chitina em artrópodes).
- Fonte de energia para diversos seres vivos.
- Todas as células são recobertas por uma complexa mistura de açúcares.
- Presentes na estrutura dos ác. nucleicos (pentose), glicolipídeos , glicoproteínas, proteoglicanas ou livres.



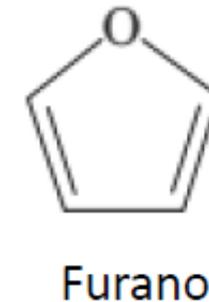
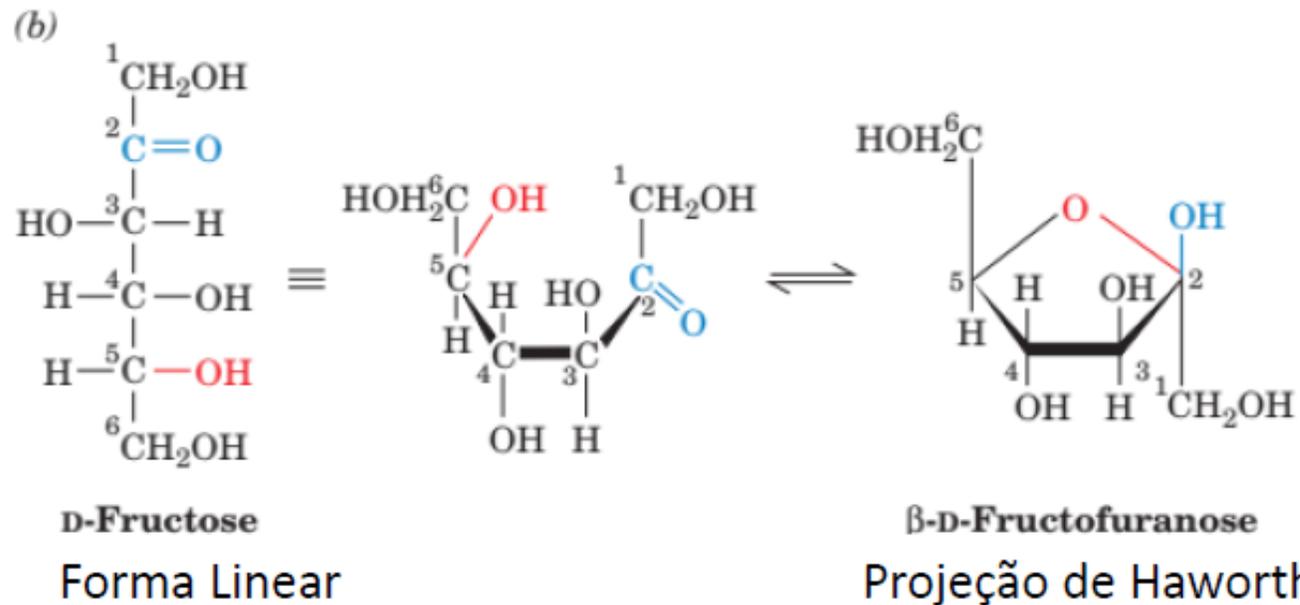
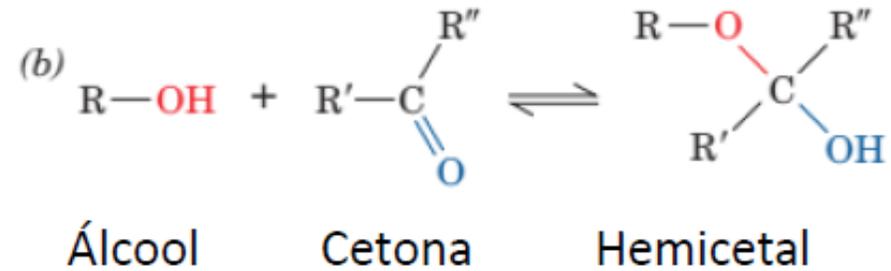
- Carboidratos = hidratos de carbono $(C.H_2O)_n$, $n \geq 3$.
- As unidades básicas são os monossacarídeos (não podem ser hidrolisadas em unidades menores).
- Grupos funcionais: poli-hidroxi aldeídos (aldose) ou poli-hidroxi cetonas (cetose), genericamente –oses.



Ciclização de monossacarídeos - Piranoses

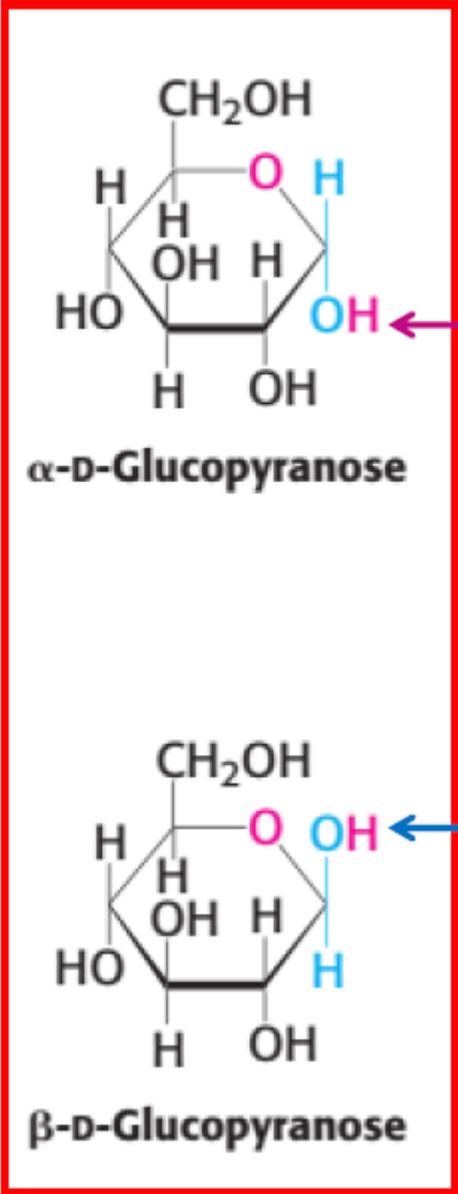
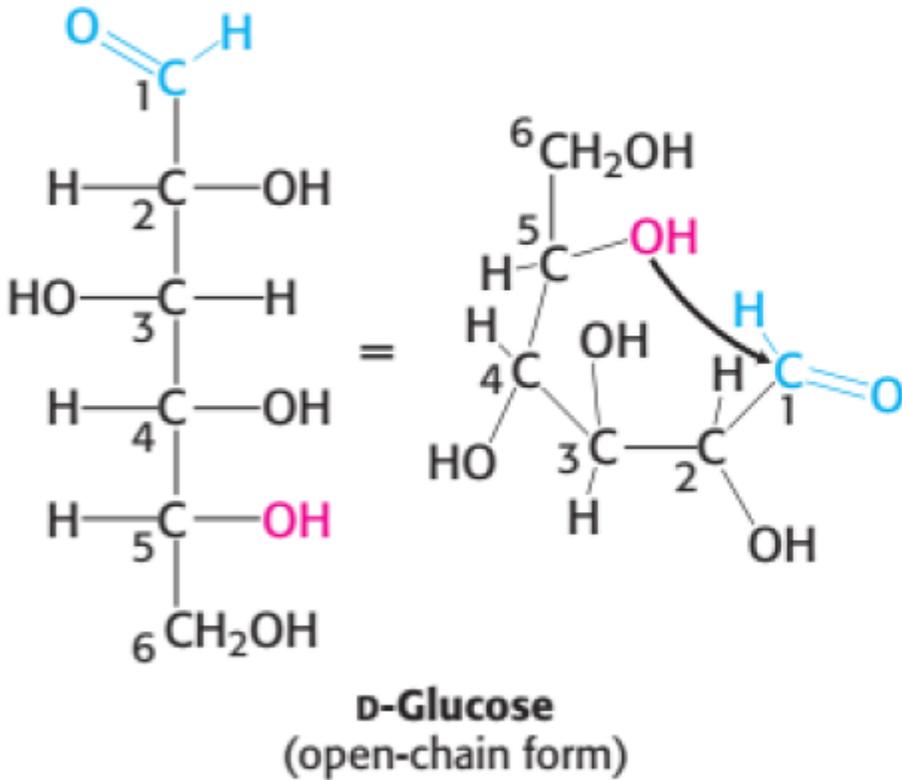


Ciclização de monossacarídeos- Furanoses



Anomeria

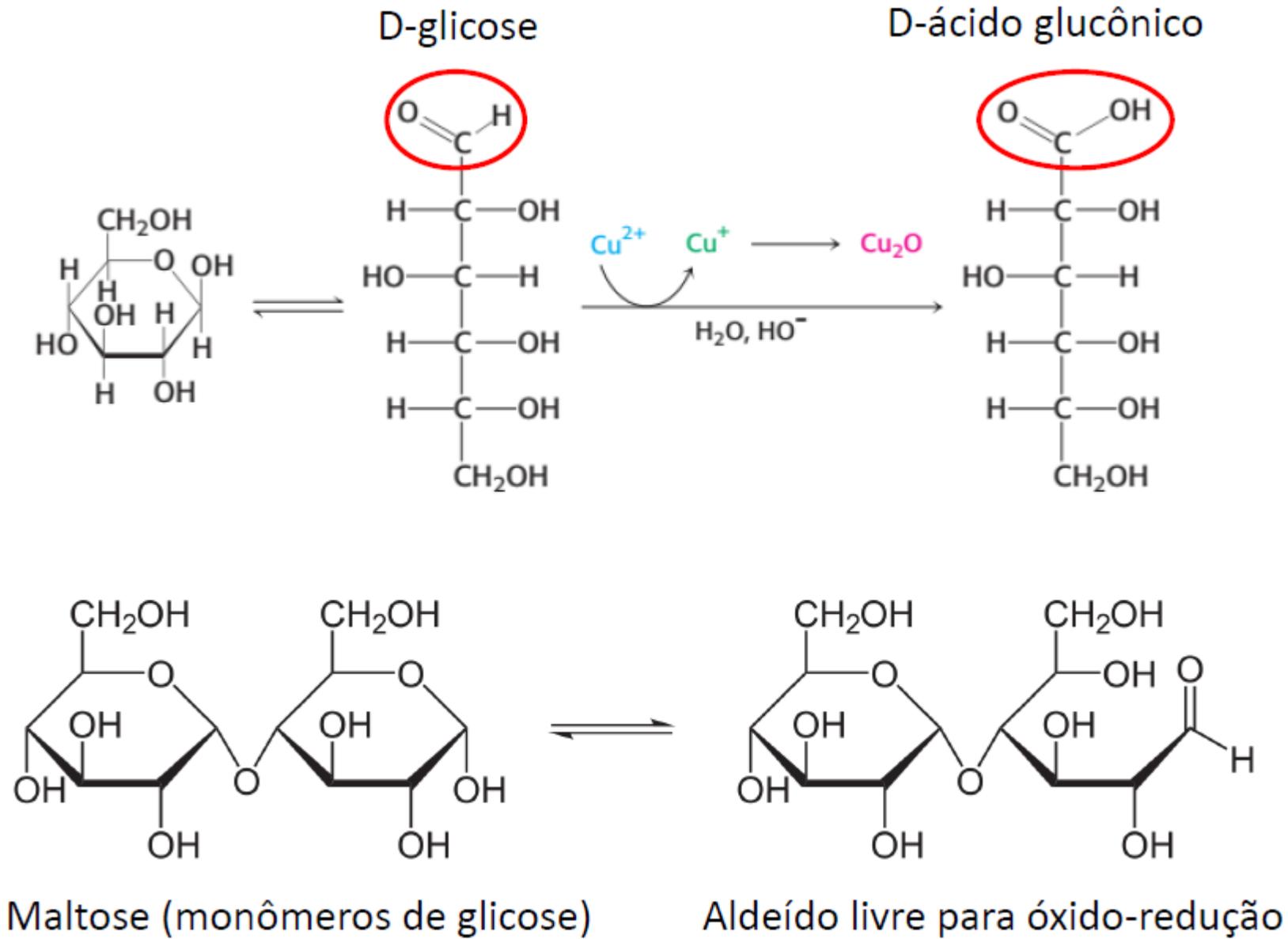
<1% na forma linear



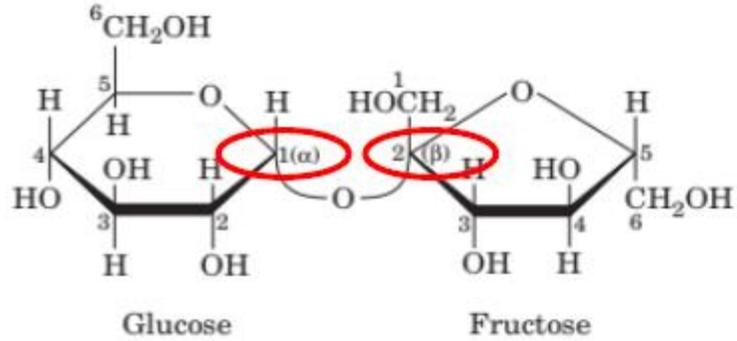
Alfa

Beta

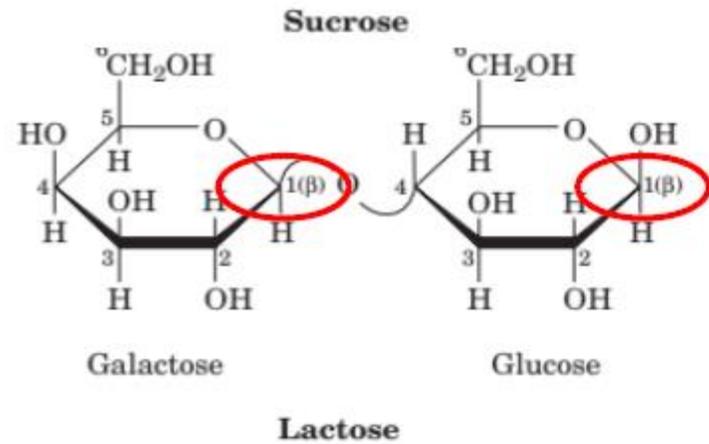
Açúcares redutores



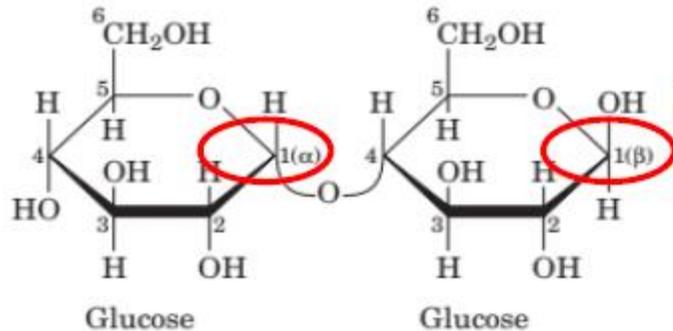
Açúcares redutores



Sacarose não tem extremidades redutoras livres

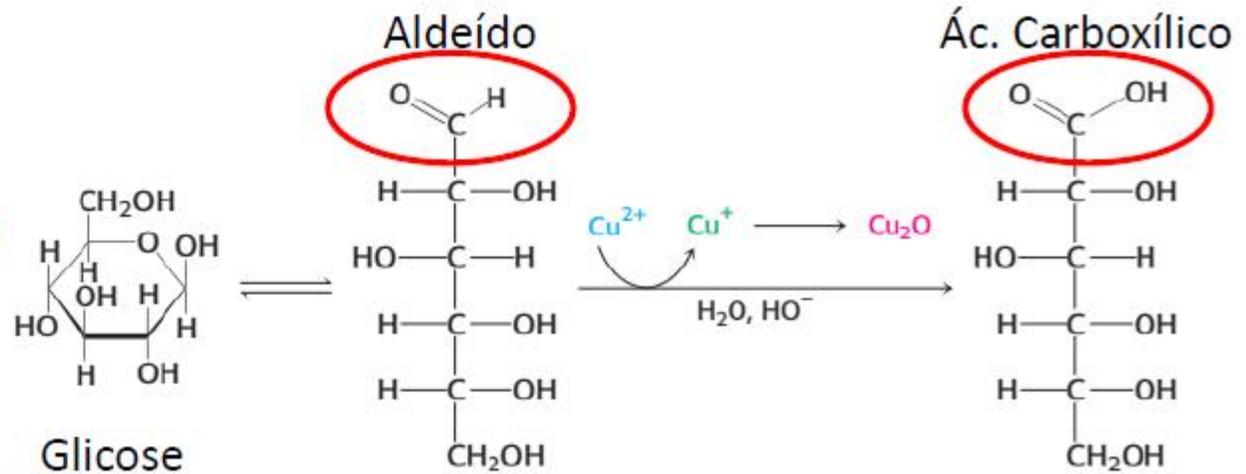


Lactose

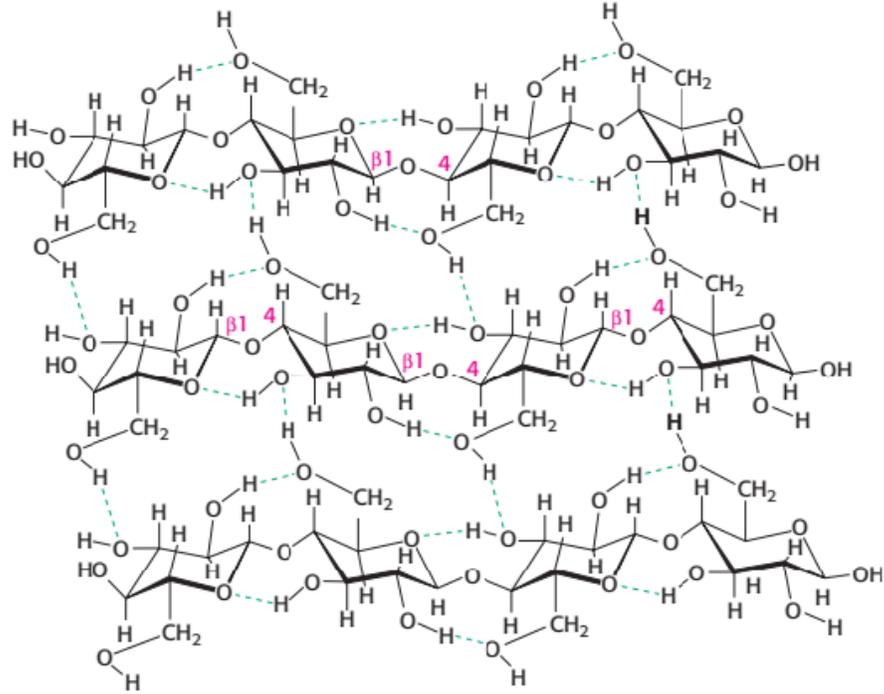


Maltose

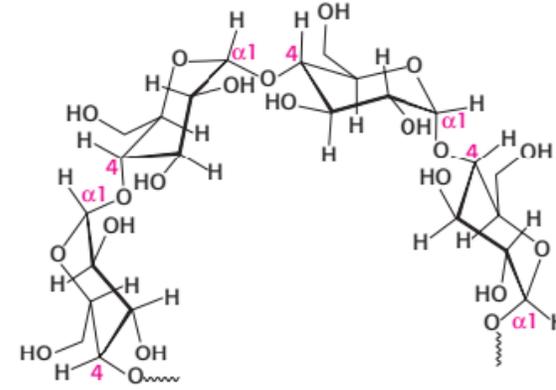
Lactose e maltose possuem extremidades redutoras livres



Políssacarídeos

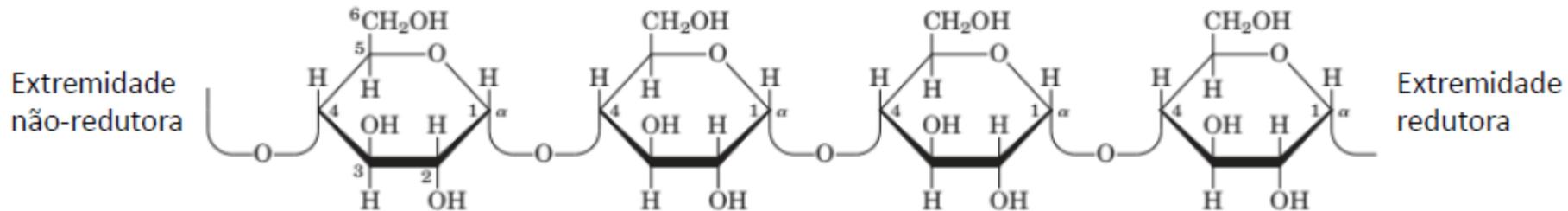


Celulose
Ligação β -1,4



Amido e glicogênio
Ligação α -1,4

Figura 11.14 – As ligações glicosídicas determinam a estrutura do políssacarídeo.



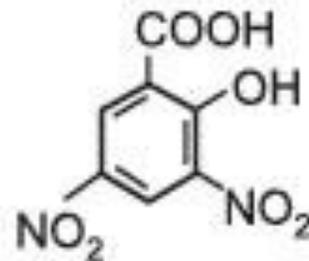
Amilose

Detecção por ensaios colorimétricos

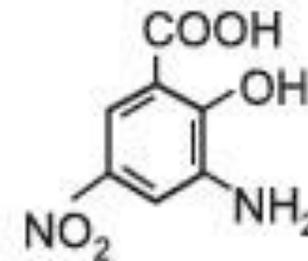
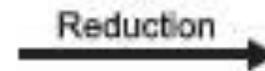
- Ensaios baseados na redução de Cu^{2+} para Cu^{1+}
Ex. Reagente de Fehling, Reagente de Benedict

- Ensaios baseados na redução de Ag^+ para Ag^0
Ex. Reagente de Tollens

- Redução de DNS



3,5-dinitrosalicylic acid
(yellow)



3 amino, 5-nitro salicylic acid
(orange-red)

* reação acelerada pelo calor

B) Dosagem de açúcares redutores

Objetivos

Dosar colorimetricamente açúcares redutores solúveis no lisado de *Saccharomyces cerevisiae*.

Reagentes

- água destilada
- glicose 5 mM
- lisado de leveduras
- ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) 10 g/L

Materiais

- tubos de ensaio grandes
- pipetadores
- pipetas
- ponteiras
- suportes para tubos de ensaio
- placa de 96 poços

Aparelhagem

- espectrofotômetro
- vórtice
- banho-maria

Procedimento A - Curva padrão de glicose

1. em cada tubo, adicionar as quantidades estipuladas de água e de glicose, conforme a tabela 1
2. adicionar a quantidade necessária de reagente de DNS
3. Tampar o tubo de ensaio com o dedo (luva!) e homogeneizar cuidadosamente por inversão ou com vórtice
4. colocar os tubos em banho-maria fervente por 10 min
5. esfriá-los em uma bandeja com água
6. adicionar 8 mL de água destilada, completando o volume para 10 mL totais
7. Homogeneizar o tubo novamente
8. transferir 200µL de cada solução para pocinhos da placa de 96 poços
9. ler as absorvâncias a 540 nm, descontando o valor do branco

Solução padrão de glicose = 5 mM = 5 mmol/L = 5 µmol/mL;

Massa molar glicose = 180 g/mol

Tabela 1

tubos	Solução glicose (mL)	água (mL)	DNS (mL)	massa glicose (mg)	A ₅₄₀	A ₅₄₀ - branco
branco	0,0	1,0	1,0			
1	0,1	0,9	1,0			
2	0,2	0,8	1,0			
3	0,3	0,7	1,0			
4	0,4	0,6	1,0			
5	0,5	0,5	1,0			
6	0,6	0,4	1,0			
7	0,7	0,3	1,0			
8	0,8	0,2	1,0			
9	0,9	0,1	1,0			
10	1,0	0,0	1,0			

Procedimento B – Dosagem de açúcares redutores no lisado obtido

1. Agitar o lisado suavemente por inversão
2. Dilui-lo conforme indicado abaixo

OBSERVAÇÃO: para esse procedimento é necessário que o lisado seja diluído

1. Transferir 0,2 mL do lisado para um tubo de ensaio grande identificado como **L10X**.
2. Adicionar 1,8 mL de água destilada.
3. Homogeneizar em vórtice.
4. Transferir 0,4 mL do tubo **L10X** para um tubo de ensaio grande identificado como **L25X**.
5. Adicionar 0,6 mL de água destilada
6. Homogeneizar em vórtice.

3. Preparar os tubos segundo a **Tabela 2**
4. Proceder com o mesmo protocolo da curva padrão (passos 3 a 8)

Tabela 2

tubos	amostras (mL)	água (mL)	DNS (mL)	A ₅₄₀	A ₅₄₀ - branco
L1	0,25 (L)	0,75	1,0		
L2	0,25 (L)	0,75	1,0		
L3	0,25 (L)	0,75	1,0		
L10x 1	0,25 (L10X)	0,75	1,0		
L10x 2	0,25 (L10X)	0,75	1,0		
L10X 3	0,25 (L10X)	0,75	1,0		
L25X 1	0,25 (L25X)	0,75	1,0		
L25X 2	0,25 (L25x)	0,75	1,0		
L25X 3	0,25 (L25x)	0,75	1,0		

Caso a absorbância esteja fora dos limites da curva padrão, repita a dosagem com as modificações necessárias para que o valor obtido fique dentro dos limites da curva padrão.

Tratamento de Dados e Análise dos Resultados

PRÁTICA 1B - DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES

INSTRUÇÕES:

1. Completar as tabelas com os resultados experimentais.
2. Construir a curva padrão para quantificação de glicose com o reagente DNS.
3. Calcular a concentração de açúcares redutores (mg/mL) no lisado de *Saccharomyces cerevisiae*.

TABELA PARA CURVA PADRÃO DE GLICOSE

tubos	massa de glicose (mg)	Abs ₅₄₀
1		---
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

Equação de reta: $y = ax + b$	
coeficiente angular = a	
Intercepto no eixo y = b	

TABELA PARA O CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES NO LISADO DE *S. CEREVISIAE*

tubos	A ₅₄₀	Massa de açúcar calculada usando a curva padrão (mg)	Volume da amostra (mL)	Concentração (mg/mL)	Diluição prévia (X)	Concentração de açúcar redutor no lisado original (sem diluição)
L1			0,25			
L2			0,25			
L3			0,25			
L10X 1			0,25			
L10X 2			0,25			
L10X 3			0,25			
L25X 1			0,25			
L25X 2			0,25			
L25X 3			0,25			

Apenas valores de absorvância contidos na curva padrão podem ser utilizados. Caso seu grupo tenha usado uma diluição diferente do protocolo, ajustar de acordo.