

TEXTO ACADÊMICO

54

BIOQUÍMICA EXPERIMENTAL

CUSTÓDIO DONIZETE DOS SANTOS
CELESTE MARIA PATTO DE ABREU
ANGELITA DUARTE CORRÊA
LUCIANO VILELA PAIVA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

BIOQUÍMICA EXPERIMENTAL

**Custódio Donizete dos Santos
Celeste Maria Patto de Abreu
Angelita Duarte Corrêa
Luciano Vilela Paiva**

EDITORA UFLA

LAVRAS - MG

Os textos Acadêmicos visam a publicar trabalhos elaborados pelos docentes para uso em sala de aula. Os textos, de responsabilidade dos autores e respectivos departamentos, poderão ser aperfeiçoados para, em futuras edições, serem publicados sob a forma de livro.

Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, por qualquer meio ou forma, sem a autorização escrita e prévia da Editora/UFLA.



Editora UFLA

Campus Histórico, Caixa Postal 3037

37200-000 – Lavras – MG

Fone: (35) 3829-1115 – Fax (35) 3829-1532

e-mail: editora@ufla.br

Homepage: www.editora.ufla.br

Diretoria Executiva: Marco Antônio Rezende Alvarenga (Diretor), Nilton Nagib Jorge Chalfun e Luiz Roberto Guimarães Guilherme.

Conselho Editorial: Marco Antônio Rezende Alvarenga (Presidente), Luiz Carlos de Oliveira Lima, Luiz Roberto Guimarães Guilherme, Renato Paiva, Cláudia Maria Ribeiro e Nilton Nagib Jorge Chalfun, Rilke Tadeu Fonseca de Freitas

Secretária: Cláudia Alves Pereira Estevam

Revisão de Texto: Amanda Jackeline Santos Silva

Editoração Eletrônica: Luciana Carvalho Costa, Alézia C. Modesto Ribeiro, Christyane A. Caetano

Marketing e Comercialização: Maria Aparecida Torres Florentino

Comissão Editorial Responsável Pela Análise e Avaliação dos Textos Acadêmicos Produzidos Pelo Departamento de Química: Ruy Carvalho (Presidente), Celeste Maria Patto de Abreu e Mário César Guerreiro (membros).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

REITOR: Antonio Nazareno Guimarães Mendes

VICE-REITOR: Ricardo Pereira Reis

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Santos, Custódio Donizete dos
Bioquímica experimental / Custódio Donizete dos Santos ... [et al.]. --
Lavras : Editora UFLA, 2005.
83 p. : il.

Bibliografia.

1. Bioquímica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-574.192

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO AO LABORATÓRIO	5
2. IDENTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS	8
3. PROPRIEDADES DOS ÁCIDOS GRAXOS E TRIGLICERÍDEOS	14
4. PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS.....	18
5.DETERMINAÇÃO DO pKa DOS AMINOÁCIDOS	29
6. CROMATOGRAFIA	35
7. EXTRAÇÃO DO DNA DA CEBOLA (Allium cepa)	43
8. ELETROFORESE	44
9. SOLUÇÕES-TAMPÕES	52
10. COLORIMETRIA	60
11. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA SACARASE DE FERMENTO	66
12. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE (VELOCIDADE) DA SACARASE DE FERMENTO	68
13. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA SACARASE	72
14. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE DA SACARASE DE FERMENTO	73
15. INIBIÇÃO DO CICLO DE KREBS	78
16. BIBLIOGRAFIAS CONSULTADAS	82

BIOQUÍMICA EXPERIMENTAL

Custódio Donizete dos Santos¹
Celeste Maria Patto de Abreu²
Angelita Duarte Corrêa²
Luciano Vilela Paiva²

1. INTRODUÇÃO AO LABORATÓRIO

1.1. Objetivos Gerais

As práticas de Bioquímica têm como objetivo criar condições para que o estudante ao final do curso seja capaz de:

- Reconhecer e manipular o equipamento freqüentemente utilizado no Laboratório de Bioquímica.
- Conhecer, por meio de reações, propriedades químicas das substâncias que compõem os organismos vivos.
- Interpretar os resultados experimentais.

1.2. Laboratório de Bioquímica

Os cuidados que os alunos deverão ter no laboratório são necessários para que tenham um bom desempenho durante o curso:

- Cada lugar no laboratório, quando possível, será equipado com o material necessário para a execução do trabalho programado.
- Após o uso de gás ou água, tomar o cuidado de fechar as torneiras completamente.
- Ao lançar nas pias os produtos das reações, fazer simultaneamente com descarga de água, para evitar a corrosão dos encanamentos.
- Não lançar nas pias papéis de filtro usados ou substâncias sólidas que possam obstruir os encanamentos.
- Não lançar fósforo aceso nos locais destinados a coleta de lixo.
- Os aparelhos somente deverão ser usados pelos alunos depois de instruídos nas respectivas manipulações, a fim de evitar danos irreparáveis.

¹Professor Titular do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras/MG

²Professores Adjunto do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras/UFLA.

1.3. Material do Estudante

Cada estudante deverá trazer para os trabalhos práticos o texto acadêmico “**Bioquímica Experimental**”. O texto acadêmico é individual e, sem ele, é impossível realizar os trabalhos práticos no laboratório.

Esse texto é constituído de roteiros para a execução das tarefas programadas. **Sugere-se que o roteiro de cada trabalho prático seja estudado previamente para facilitar a sua execução.**

1.4. Material Recebido e sua Limpeza

O material consiste nas vidrarias que serão utilizadas durante a aula prática. Os procedimentos de uso estão descritos a seguir:

- Para a execução de cada trabalho prático os grupos de estudantes receberão os materiais e os reagentes necessários.
- Um grupo não deverá utilizar o material de outro grupo, sobretudo quando eles estiverem ausentes.
- Cada grupo é responsável pelo seu lugar no laboratório (**manutenção da ordem e conservação de seu material de trabalho**).
- Se algum material for inutilizado, o estudante deverá avisar o professor responsável, para ser providenciado a sua substituição.
- O estudante não deverá jogar fora o material que julga inutilizado pois, as vezes, o mesmo poderá ser recuperado.
- Terminados os trabalhos, o estudante deverá proceder a limpeza de seu material, deixando-os em condições de ser utilizado novamente.
- A limpeza da vidraria deve ser realizada imediatamente após o seu uso. Lavar abundantemente com água corrente e água destilada. O material é posto para secar espontaneamente e, os tubos de ensaios, devem ficar emborcados (de boca para baixo) no respectivo suporte.

1.5. Reagentes

Os reagentes consistem nas soluções que serão utilizadas durante a aula prática. Os procedimentos e os cuidados durante o seu uso estão descritos a seguir:

- Para cada trabalho prático haverá a disposição dos estudantes os reagentes necessários.
-

- Após o uso, colocar os reagentes em seu lugar, para ser utilizado por outro grupo.
- Tomar os seguintes cuidados com as soluções dos reagentes a fim de evitar contaminação: a) Não trocar as rolhas. b) Não introduzir pipetas nas soluções padrões; deve-se transferir um pouco da solução (volume aproximado ao que vai ser gasto) para um béquer limpo, de onde se pipetará a quantidade indicada. c) Não restituir ao frasco original as soluções retiradas em excesso. d) Caso seja autorizado, pipetar diretamente do frasco do reagente; usar sempre uma pipeta limpa.

1.6. Execução dos Trabalhos Práticos

Neste item será descrito como os alunos deverão comportar-se para realizar os trabalhos práticos corretamente.

- Todos os trabalhos devem ser executados com atenção e disciplina.
- Trabalhos realizados sem atenção, podem introduzir erros que invalidam parcial ou totalmente a experiência. Isto significa desperdício de tempo e reagentes.
- Para que o estudante alcance a eficiência desejada é necessário que seja pontual, e tenha conhecimento prévio do trabalho prático a ser executado.

1.7. Prevenção de Acidentes

Aqui se descreve os cuidados principais que o estudante deverá ter durante a execução dos trabalhos práticos.

- Trabalhar sempre protegido por avental.
 - Ao acender o bico de Bunsen, ter sempre a chama que deve acendê-lo, antes de abrir a torneira.
 - Não fumar dentro do laboratório.
 - Não operar com substâncias inflamáveis nas proximidades de uma chama.
 - Os reagentes tóxicos e concentrados (como ácidos e bases fortes), não deverão ser pipetados e sim medidos em provetas, buretas etc.
-

2. IDENTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS

Existem muitas reações coloridas associadas com os carboidratos. Algumas reações são específicas e permitindo diferenciar um único carboidrato; outras reações são gerais e dão positivas para um grupo de carboidratos. A associação de testes específicos e gerais permite diferenciar um grande número de carboidratos tanto qualitativamente quanto quantitativamente.

2.1. Trabalhos Práticos

Cada grupo de estudante receberá cinco soluções dos seguintes carboidratos: **arabinose, glicose, frutose, sacarose e amido**. Essas soluções foram rotuladas ao acaso como sendo A, B, C, D e E. Através da aplicação dos testes relacionados abaixo, identificar cada solução de carboidrato.

2.1.1. Teste de Iodo

O teste de iodo serve para diferenciar os homopolissacarídeos do tipo amido dos outros carboidratos. Estes polissacarídeos formam com o iodo um complexo colorido característico. Exemplo: azul = amido; vermelho = glicogênio.

- Colocar em cada tubo de ensaio 0,5 mL da solução de carboidrato a ser identificado.
- Adicionar 2 gotas da solução de lugol. O aparecimento de **coloração azul** indica reação positiva.

2.1.2 Teste de Molisch

O teste do Molisch serve para diferenciar os carboidratos que apresentam estruturas com 5 ou mais átomos de carbono (pentoses e hexoses) dos carboidratos com estruturas com menor número de átomos de carbono (tetroses e trioses). O ácido sulfúrico desidrata pentoses em furfural e hexoses em hidroximetilfurfural. Os furfurais reagem com o alfa naftol (reagente de Molisch) dando origem a um composto de cor roxa.

- Colocar em cada tubo de ensaio **SECO**, 1 mL da solução de carboidrato a ser identificado.
-

- Adicionar aproximadamente 3 gotas da solução de Molisch e misturar.
- Escorrer aproximadamente 1 mL de ácido sulfúrico concentrado **pela parede do tubo inclinado**, de modo que os dois líquidos **não se misturem**. Voltar cuidadosamente o tubo para a posição vertical.
- Deixar em repouso.
- O aparecimento de estrias ou anel roxo na superfície de separação entre os dois líquidos indica reação positiva para carboidratos com 5 ou mais átomos de carbono na estrutura.

2.1.3. Teste de Selivanof

O teste de Selivanof é utilizado para diferenciar ceto-hexoses de aldohexoses. As ceto-hexoses são rapidamente desidratadas a hidroximetilfurfural pela ação do ácido clorídrico 6N (presente no reagente de Selivanof) durante a ebulição. O hidroximetilfurfural reage com o resorcinol (reagente de Selivanof) formando um **produto de condensação de cor vermelha** de estrutura desconhecida. As soluções concentradas de aldohexoses também dão reação positiva, porém, a sua desidratação é muito mais demorada.

- Adicionar em cada tubo de ensaio 0,5 mL da solução de carboidrato a ser identificado.
- Adicionar 1 mL do reagente de Selivanof e misturar.
- Colocar simultaneamente todos os tubos em banho de água em ebulição.
- O aparecimento da **cor vermelha** indica reação positiva para as ceto-hexoses.

2.1.4 Teste de Bial

O teste de Bial é uma reação colorida específica para pentoses. Em condições controladas (tempo, temperatura e concentração de ácido clorídrico) pentoses desidratam rapidamente transformando-se em furfural. Na presença do íon férrico, o orcinol e o furfural condensam-se rapidamente dando um produto azul. O hidroximetilfurfural formado a partir das ceto-hexoses não reage adequadamente como os furfurais. As aldohexoses desidratam muito mais vagarosamente que as pentoses.

- Adicionar em cada tubo de ensaio 0,5 mL da solução de carboidrato a ser identificado.
-

- Adicionar 1 mL da solução de Bial e misturar.
- Colocar simultaneamente todos os tubos em banho de água em ebulição.
- O aparecimento de coloração azul indica reação positiva para pentoses.

2.1.5. Teste de Benedict

O teste de Benedict é utilizado para diferenciar os carboidratos redutores dos não-redutores. Os íons cúpricos estabilizados em solução por agentes complexantes (azul), são reduzidos a quente pelos grupos carbonilas das aldoses e cetoses, formando um precipitado de óxido cuproso. A coloração da solução final e/ou do precipitado (**laranja a vermelho-tijolo**) dependerão apenas da concentração do açúcar redutor presente na solução.

- Adicionar em cada tubo de ensaio 0,5 mL da solução de carboidrato a ser identificado.
- Adicionar 1 mL do reagente de Benedict e misturar.
- Colocar simultaneamente todos os tubos em banho de água em ebulição.
- A formação de um precipitado de coloração **laranja a vermelho-tijolo** indica reação positiva para os açúcares redutores.

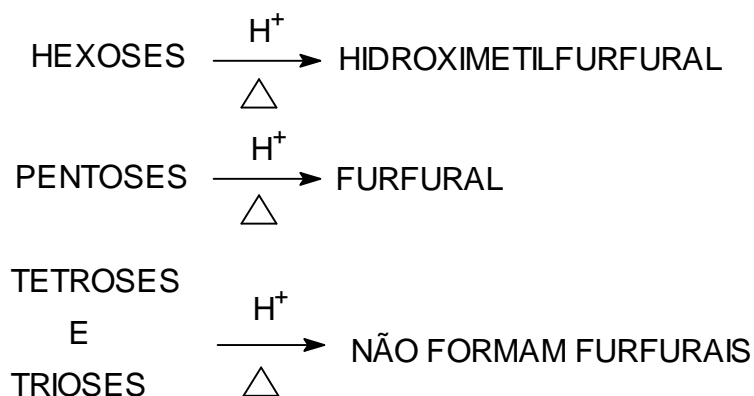
2.2. Propriedades dos Carboidratos Estudadas

2.2.1. Reação com Iodo (teste de iodo)

Os homopolissacarídeos do tipo amido apresentam uma estrutura tridimensional da cadeia glicosídica em forma de espiral (CONN & STUMPF, 1980). O átomo de iodo encaixa-se perfeitamente dentro dessa espiral provocando a formação da coloração azul característica.

2.2.2 Desidratação (Testes de Molisch, Selivanof e Bial)

Os carboidratos desidratam na presença de ácidos minerais fortes e calor, como pode ser visto a seguir:



Os furfurais reagem com os **FENÓIS** formando produtos coloridos.

Como diferenciar os testes de Molisch, Selivanof e Bial?

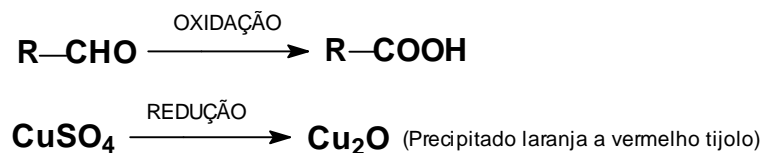
O teste de Molisch utiliza como agente desidratante o ácido sulfúrico, que desidrata indiscriminadamente todas as estruturas dos carboidratos formando os furfurais. Só não forma furfurais as tetroses e as trioses que não apresentam número de carbono suficiente. Os outros dois testes utilizam o ácido clorídrico, que desidrata somente os carboidratos que apresentam estrutura furanósica (pentoses e ceto-hexoses).

Como diferenciar o teste de Selivanof do teste de Bial ?

A diferenciação é obtida por meio da utilização de fenóis específicos. O teste de Selivanof utiliza o fenol **resorcinol** que só reage com o hidroximetilfurfural enquanto o teste de Bial utiliza o fenol **orcinol** que só reage com os furfurais.

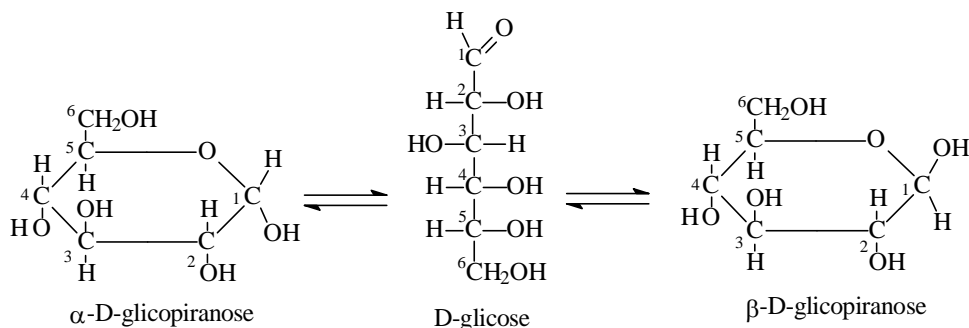
2.2.3. Açúcares Redutores (teste de Benedict)

Os carboidratos que apresentam a carbonila livre ou potencialmente livre oxidam-se para ácidos carboxílicos (ácidos aldônicos), provocando a redução do reagente de Benedict.



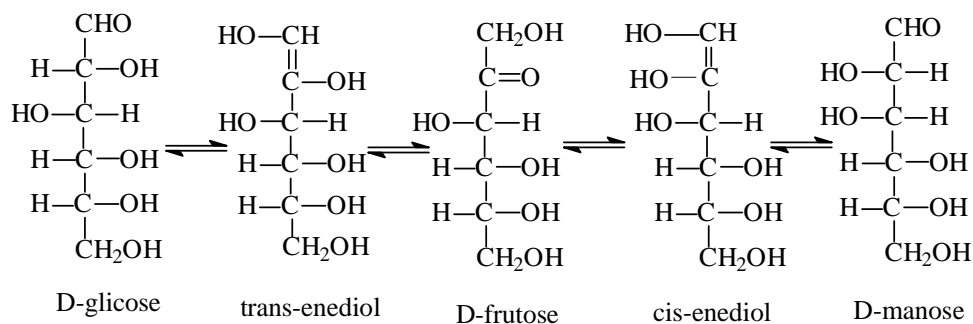
Quais os carboidratos apresentam a carbonila livre?

Somente aqueles que apresentam o carbono anomérico livre. Estes carboidratos apresentam a propriedade **mutarrotação** que provoca a abertura do anel liberando a carbonila.

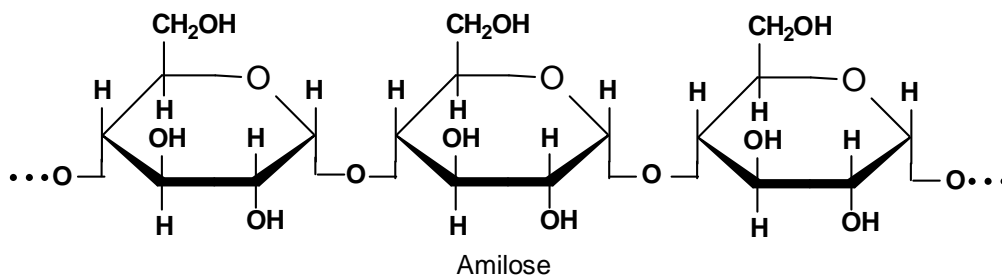


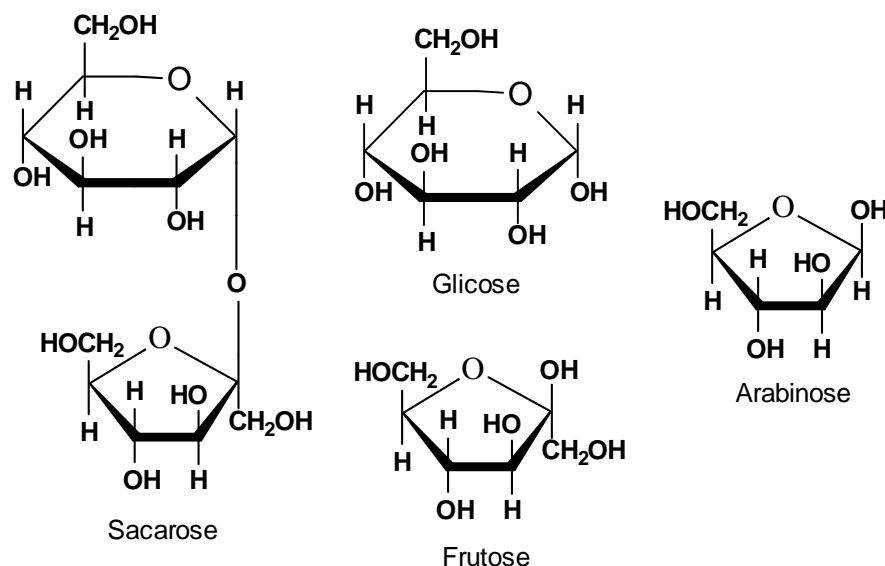
Por que a frutose, uma cetose, apresenta reação positiva com o teste de Benedict?

A reação é positiva porque ocorre a transformação da frutose (cetose) em glicose e manose (aldoses) através de uma propriedade dos carboidratos denominada **tautomeria**.



2.3. Estrutura dos Carboidratos





2.4. Soluções

Solução de Molisch

Alfa-naftol 2% em etanol 95GL.

Solução de Lugol

0,5 g de iodo metálico, 1 g de iodeto de potássio em 100 mL de água. Diluir a solução 4 vezes para utilização em aula prática.

Solução de Selivanof

0,05 g de resorcinol em 100 mL de HCl 6N.

Solução de Bial

0,3 g de orcinol em 100 mL de HCl concentrado. Adicionar 5 gotas de cloreto férrico 10%. Preparar o reagente com HCl diluído 2 vezes para utilização em aula prática.

Solução de Benedict

86,5 g de citrato de sódio, 50 g de carbonato de sódio anidro. Dissolver em cerca de 400 mL de água quente, filtrar se necessário. Adicionar a solução de sulfato de cobre (8,65 g dissolvido em 50 mL de água) agitando continuamente e elevar o volume para 500 mL. Diluir a solução 4 vezes para a utilização em aula prática.

Obs.: Guardar esses tubos para a pesquisa de ácidos graxos voláteis.

3.2.2. Óleo em Água e Solventes Apolares:

Colocar em 3 tubos de ensaio numerados (4, 5 e 6), 2 mL dos seguintes solventes:

- Tubo 4: água
- Tubo 5: etanol
- Tubo 6: éter

Adicionar 5 gotas de óleo em cada tubo, agitar e verificar a solubilidade.

Interpretação da solubilidade em água e solventes apolares:

A solubilidade dos ácidos graxos em água diminui com o aumento do número de átomos de carbono. Os ácidos de peso molecular elevado (acima de 8 carbonos) são praticamente insolúveis em água. O ácido butírico (C_4) é solúvel em água, enquanto que o ácido esteárico (C_{18}) é praticamente insolúvel neste solvente.

Pode-se concluir que a baixa solubilidade dos ácidos graxos em água deve-se ao seu grupo hidrofóbico, que confere a esses ácidos maiores solubilidades nos solventes apolares.

Os óleos (triacilgliceróis) apresentam um comportamento semelhante aos ácidos graxos com cadeia longa, ou seja, baixa solubilidade em solventes polares como a água e alta solubilidade em solventes apolares como o éter. A solubilidade em etanol é maior que em água e menor que em éter, porque o etanol apresenta uma polaridade intermediária entre a água e o éter.

3.3. Pesquisa de Ácidos Graxos Fixos e Voláteis:

- Nos tubos 1, 2 e 3 utilizados na análise dos caracteres físicos (item 3.1.), colocar um pedaço de papel indicador preso na boca do tubo.
- Colocar em banho-maria a 100°C e observar a mudança de cor do papel indicador devido os vapores dos ácidos graxos voláteis.

Interpretação da pesquisa de ácidos graxos fixos e voláteis

Determinados ácidos graxos podem ser arrastados pelo vapor de água, sendo denominados ácidos graxos voláteis. Os ácidos graxos com até 8 átomos de

carbono, aproximadamente, são voláteis enquanto, os ácidos graxos com mais de 8 carbonos são fixos. O ácido butírico é volátil, os demais são fixos.

3.4. Pesquisa de Insaturação:

- Colocar em 2 tubos de ensaio: algumas gotas de ácido oléico no primeiro e alguns fragmentos de ácido esteárico no segundo.
- Colocar em cada tubo 2 mL de éter e agitar.
- Gotejar solução de bromo em cada tubo e verificar o descoloramento da solução de bromo.

Interpretação da pesquisa de insaturação

Os ácidos graxos insaturados, sofrem reação de adição de bromo ao nível das duplas ligações formando derivados saturados bromados. Sendo corada a solução de bromo (pardo-amarelada) e incolor o produto de adição, podemos acompanhar a reação através da descoloração da solução de bromo, revelando assim a presença da dupla ligação. O ácido esteárico sendo saturado não adiciona bromo, bastando portanto, colocar uma só gota de solução de bromo para persistir a cor amarelada do bromo diluído.

Os ácidos graxos, bem como seus ésteres (triglicerídeos, cêras, etc) são solúveis em solventes orgânicos como o éter (item 3.2.2) assim, a reação acima se desenvolve melhor com estes solventes.

3.5. Saponificação de Triglicerídeos

- Em um tubo de ensaio, colocar 10 gotas de um triglicerídeo (óleo de soja, amendoim, mamona, etc.)
- Juntar 2 mL de solução alcoólica 10% de hidróxido de sódio (pipetar com cuidado).
- Ferver em banho-maria até a obtenção de uma solução transparente e clara.
- Adicionar 3 mL de H₂O destilada e agitar.
- Observar a formação de espumas (sabão).

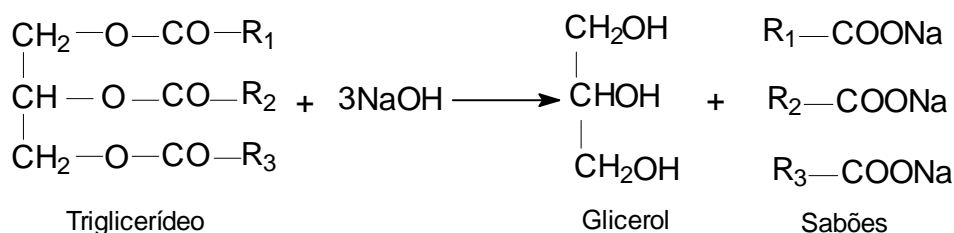
Obs.: Conservar o conteúdo do tubo.

3.5.1. Propriedades dos Sabões

- Dividir em três tubos de ensaio o conteúdo do tubo da experiência anterior.
- Ao primeiro tubo, adicionar 5 gotas de solução de cloreto de cálcio e agitar. Observar a formação de um precipitado branco e a incapacidade de formar espumas (sabão de cálcio).
- Ao segundo tubo, adicionar 1 mL de solução de ácido clorídrico e agitar. Observar a formação de um precipitado branco e a incapacidade de formar espumas (ácidos graxos).
- Ao terceiro tubo, adicionar ± 10 gotas de solução saturada de cloreto de sódio, gota a gota até o aparecimento de um precipitado branco. Agitar e observar o precipitado branco que se forma, mas com capacidade de espumar (sabão precipitado).

Interpretação da saponificação dos triglicerídeos

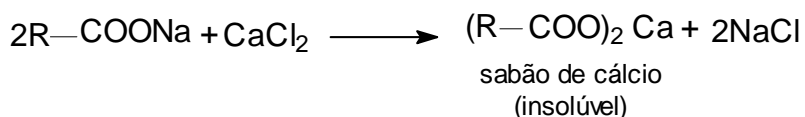
Os triglicerídeos (ésteres) sofrem hidrólise na presença de solução alcoólica de NaOH quente produzindo o Glicerol e sais de sódio correspondentes aos ácidos graxos (sabões). Esta reação é a base do índice de saponificação.



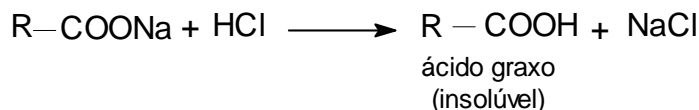
No organismo, a hidrólise dos triglicerídeos se faz pela lipase (enzima) auxiliada pela bile, que tem a propriedade de emulsificar os óleos favorecendo a ação da lipase.

Os sabões são substâncias que, em solução, têm a propriedade de baixar a tensão superficial da água favorecendo a obtenção de emulsões e a formação de espumas.

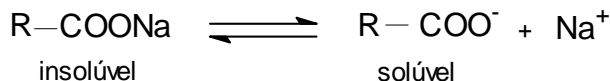
Os sais de cálcio, magnésio, metais pesados, etc., formam com os sabões, uma reação de dupla-troca com produção de um sabão insolúvel, perdendo suas propriedades.



Os sabões, quando tratados por ácidos minerais (HCl) regeneram os correspondentes ácidos graxos que sendo insolúveis não apresentam propriedades de detergentes.



Os sabões de sódio podem ser precipitados pela adição de solução concentrada de NaCl. Nestas condições, aumenta-se a concentração sódio $[\text{Na}^+]$ da solução e a reação tende para a esquerda, segundo a Lei das Massas (efeito do íon comum).



A equação matemática que expressa essa Lei é:

$$K_{eq} = \frac{[\text{R-COO}^-] \cdot [\text{Na}^+]}{[\text{R-COONa}]}$$

4. PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS

4.1. Introdução

Proteínas: são polímeros de **aminoácidos** unidos entre si por ligações peptídicas.

Aminoácidos: são compostos orgânicos que apresentam em sua estrutura a função orgânica amina e a função ácido carboxílico.



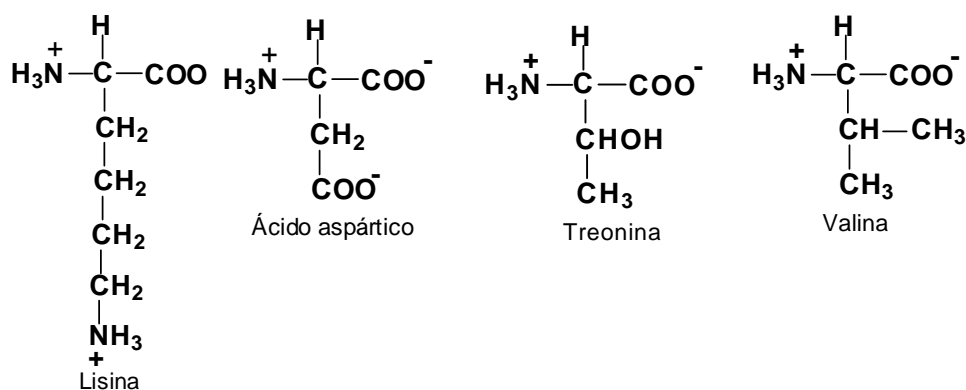
Fórmula geral de um aminoácido

As proteínas encontradas nos organismos vivos são formadas por 20 diferentes tipos de alfa-aminoácidos (caracterizados pelos seus diferentes radicais), dos quais 19 apresentam a configuração absoluta L (semelhante ao L-gliceraldeído).

4.2. Classificação dos Aminoácidos

Os aminoácidos são normalmente classificados de acordo com a polaridade de seus radicais, que sugerem as possíveis interações que esses aminoácidos podem realizar entre si, quando estão presentes nas proteínas

- Aminoácidos com radicais apolares ou hidrofóbicos
- Aminoácidos com radicais polares sem carga
- Aminoácidos com radicais polares com carga positiva
- Aminoácidos com radicais polares com carga negativa



4.3. Interações entre os Radicais dos Aminoácidos

As interações entre os radicais dos aminoácidos podem ser: interações hidrofóbicas, interações iônicas, interações de hidrogênio, interações de Van-der-Walls, interações dipolo-dipolo etc.

Além das interações, muitas ligações covalentes podem ocorrer entre os radicais dos aminoácidos. A **ligação dissulfeto** é a mais comum entre as proteínas globulares.

4.4. Peptídeos

A união dos aminoácidos por meio da ligação peptídica dá origem aos peptídeos (união de 2 ou mais aminoácidos). Os polipeptídeos naturais são denominados de proteínas.

4.5.3. Estrutura Terciária

A estrutura terciária define as interações entre os **radicais dos aminoácidos** distantes na seqüência linear. Essas interações normalmente provocam dobras **orientadas** na cadeia polipeptídica. Acredita-se que a orientação das dobras sejam realizadas pelas **interações hidrofóbicas** entre os radicais dos aminoácidos hidrofóbicos.

INTERAÇÃO HIDROFÓBICA: os compostos apolares ou hidrofóbicos, bem como os radicais dos aminoácidos hidrofóbicos, desorganizam a estrutura da água, propriedade esta denominada de **coesividade**. Para recuperar a sua estrutura, a água “**obriga**” os compostos hidrofóbicos, bem como os radicais hidrofóbicos dos aminoácidos a interagirem entre si diminuindo assim, a superfície de contato com a água. Os radicais dos aminoácidos hidrofóbicos dentro da cadeia polipeptídica, quando afastam do meio aquoso, arrastam a cadeia polipeptídica, ocupando o interior da molécula de proteína. Esse comportamento, leva a cadeia polipeptídica a dobrar sobre si mesma de uma maneira organizada. A informação de como a cadeia deve dobrar, portanto, está embutida na seqüência linear dos aminoácidos (posição dos aminoácidos hidrofóbicos).

4.5.4. Estrutura Quaternária

A estrutura quaternária define as interações entre as cadeias de polipeptídeos, formando as proteínas oligoméricas (com mais de uma cadeia), sendo cada cadeia polipeptídica denominada de subunidade.

4.6. Propriedades das Proteínas

As propriedades das proteínas estão relacionadas com as propriedades dos aminoácidos que as compõem:

4.6.1. Solubilidade das Proteínas

A solubilidade das proteínas é determinada, pela variedade dos grupos residuais (radicais) dos aminoácidos, pela maneira do dobramento da cadeia polipeptídica e também pelas propriedades do sistema de solvente, no qual a proteína está contida. Os fatores que influenciam na solubilidade afetam a estrutura secundária e terciária das proteínas.

Efeito da Força Iônica: cada íon em solução aquosa é rodeado por uma “atmosfera iônica” de carga oposta que pode causar grande mudança na solubilidade de uma proteína.

Em geral, a solubilidade das proteínas, aumenta na presença de baixa força iônica (baixa porcentagem de saturação) de certos sais (por exemplo sais de Na, K e Mg). Esse fenômeno é denominado “**salting in**”. O aumento da solubilidade das proteínas ocorre em função da estabilização dos grupos carregados dos radicais dos aminoácidos.

A presença de sais (como o sulfato de amônio) em alta força iônica diminui a solubilidade das proteínas. Esse fenômeno é denominado “**salting out**”. A diminuição de solubilidade é devido a competição entre a proteína e o sal pela água livre, bem como pela água de hidratação ao redor da proteína. A diminuição da água de hidratação ao redor da molécula de proteína provoca a agregação e a precipitação dessas moléculas. O efeito de sais (como o sulfato de amônio), na solubilidade das proteínas, pode ser medido em termos de **porcentagem de saturação** da solução (solução saturada de sulfato de amônio é considerada 100% saturada). Cada proteína apresenta um comportamento diferente de outra proteína em solução salina e, por isso, permite a sua separação através de uma precipitação diferencial, em diferentes porcentagens de saturação.

Efeito do pH: em geral, as proteínas são menos solúveis em um pH igual ao seu ponto isoelétrico. O ponto isoelétrico de uma proteína é o pH, em que a carga líquida de todos os grupos dissociáveis é igual a zero, ou seja, a proteína não apresenta migração em um campo elétrico (equilíbrio de cargas positivas e negativas).

Efeito da Temperatura: o efeito da temperatura na solubilidade das proteínas é muito variável. De maneira geral, podemos afirmar que as proteínas diminuem a sua solubilidade com o aumento da temperatura, em função do aumento da desnaturação da molécula. A temperatura na qual inicia-se a desnaturação é variável de proteína para proteína, sendo influenciada por outros fatores, como por exemplo, o pH e a presença de substrato (se for uma enzima). Normalmente, as proteínas iniciam um processo de desnaturação em torno de 35°C.

Efeito de Solventes Orgânicos: solventes orgânicos, tais como álcoois, éteres, cetonas, etc, que diminuem a constante dielétrica da solução aquosa

(capacidade das moléculas do solvente orientarem-se em um campo elétrico), tornam as soluções mais apolares e diminuem a solubilidade das proteínas (ou qualquer substância iônica). Os solventes que aumentam a constante dielétrica, tais como o dimetilsulfóxido, aumentam a solubilidade das proteínas.

4.6.2. Desnaturação das Proteínas

As proteínas apresentam estruturas tridimensionais (conformação) que são definidas por vários níveis estruturais: estrutura primária, estrutura secundária, estrutura terciária e estrutura quaternária. A partir da estrutura secundária, a conformação é mantida por interações frágeis (baixa energia de ligação) entre os átomos e/ou grupos de átomos dos aminoácidos, tais como: interações de hidrogênio, interações iônicas, interações hidrofóbicas, forças de Van-der-Walls etc, que em conjunto, determinam a estrutura tridimensional estável das proteínas.

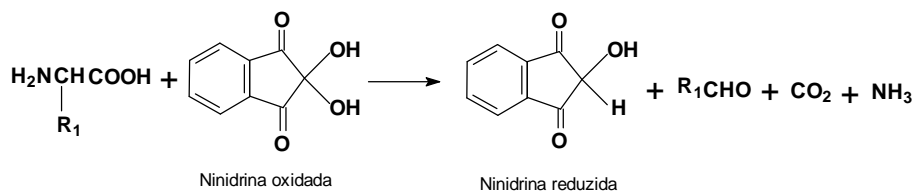
Qualquer processo que provoca o rompimento dessas interações, provoca uma variedade de modificações estruturais (desordem nas cadeias polipeptídicas) que são denominadas de **desnaturação**.

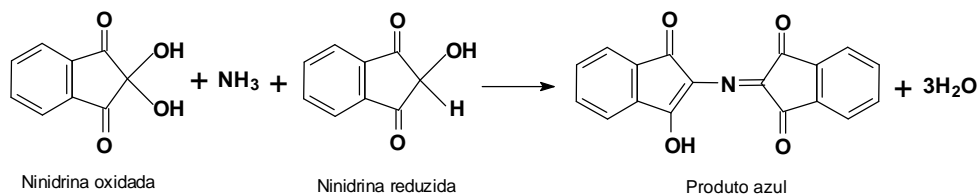
A desnaturação pode ser provocada por vários fatores, como, por exemplo: calor, extremos de pH, detergentes, sais neutros, solventes orgânicos, íons de metais pesados etc. Alguns dos critérios experimentais utilizados para medir a extensão da desnaturação são: a diminuição da solubilidade e a perda da atividade biológica.

4.7. Reações Coloridas das Proteínas

Existem muitas reações coloridas específicas para os aminoácidos e proteínas. Apenas duas reações serão descritas.

Reação de Ninidrina: a ninidrina é um oxidante fraco, que reage com o grupo amino dos aminoácidos formando amônia (obtida pela liberação do grupo amino), aldeído e gás carbônico (obtido pela liberação de um átomo de carbono da carboxila), como mostrado na reação a seguir:



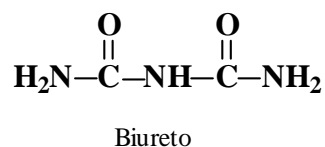


A coloração azul é característica dos aminoácidos que tem alfa aminogrupos. Essa reação é largamente empregada na determinação quantitativa dos aminoácidos.

Reação de Biureto: a reação de biureto consiste na formação de complexos coloridos entre o átomo de cobre e a amônia ou amônias substituídas. Os peptídeos e as proteínas formam complexos mais intrincados, nos quais o cobre está ligado a mais de um nitrogênio da cadeia polipeptídica.

Esses complexos são formados especialmente em soluções alcalinas, e apresentam coloração **azul** quando formado com amônia ou amônias substituídas, e coloração **violeta** quando formados com peptídeos e proteínas. Os peptídeos com duas ou mais ligações peptídicas e/ou proteínas podem ser medidos quantitativamente por meio da determinação da absorção de luz pela cor violeta, que é característica de um teste de biureto positivo.

O teste é denominado de **reação de biureto** porque uma substância denominada **biureto** apresenta coloração violeta característica do teste de biureto positivo.



4.8. Trabalho Prático

4.8.1. Precipitação das Proteínas

4.8.1.1 Precipitação por sulfato de amônio

- Pipetar 1 mL de uma solução de clara de ovo 10% (10 mL de clara de ovo dissolvida em 100 mL de solução).
- Adicionar 3 mL de sulfato de amônio saturado.
- Observar o turvamento da solução.

O turvamento ocorre devido a diminuição da solubilidade das proteínas da clara, em função da competição com o sulfato de amônio pelas moléculas de água (**salting-out**). A água funciona como um isolante de cada molécula de proteína, por meio de sua camada de hidratação, impedindo que as moléculas interajam entre si. Com a adição de sulfato de amônio a água vai sendo retirada das moléculas de proteína, provocando a interação, agregação e precipitação das moléculas (salting-out). Cada proteína precipita em uma determinada concentração (% de saturação) de sulfato de amônio.

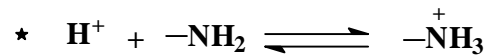
4.8.1.2. Precipitação isoelétrica da caseína

- Pipetar em um tubo de ensaio 1 mL de solução de caseína 0,5% preparada em solução de **hidróxido de sódio 0,05N**.
- Adicionar ácido clorídrico 0,05N, **gota a gota**, agitando o tubo após cada adição, até que a precipitação ocorra (formação de uma suspensão de coloração branca). **A caseína precipita-se no ponto isoelétrico.**

Para determinar, grosseiramente, o valor do ponto isoelétrico da caseína, adicionar gotas do indicador verde de bromocresol e comparar a cor do precipitado, com a tabela de viragem do indicador abaixo.

Verde de bromocresol pKa = 4,7		
pH	Faixa de pH	Cor do indicador
pH ácido	Menor que 3,7	Amarelo
pH transição	3,7 a 5,7	Verde
pH alcalino	Maior que 5,7	Azul

Em geral as proteínas são **menos** solúveis no ponto isoelétrico. A caseína é praticamente insolúvel precipitando-se nesse pH. Quando dissolvida em pH alcalino (NaOH 0,05N), a molécula apresenta um predomínio de cargas negativas em função da ionização dos radicais dos aminoácidos. À medida que a solução de HCl 0,05N vai sendo adicionada, as cargas negativas tendem a desaparecer (protonação do grupo carboxila**) enquanto ocorre o aparecimento das cargas positivas (protonação do grupo amino*), até o pH em que ocorre o **equilíbrio de cargas (ponto isoelétrico - pI)**, causando a precipitação da caseína. O valor do ponto isoelétrico é variável de proteína para proteína e, nesse exemplo, o valor do pH foi estimado por meio da adição do indicador de pH verde de bromocresol. O ponto isoelétrico é obtido quando a caseína está precipitada, correspondendo ao pH de transição que está no intervalo entre pH = 3,7 a pH = 5,7).



4.8.1.3. Precipitação pelo calor

- Pipetar 1mL de solução de clara de ovo 10% para um tubo de ensaio.
- Aquecer em banho de água em ebulição por 5 minutos.
- Observar o turvamento da solução devido a diminuição de solubilidade das proteínas da clara de ovo.

De maneira geral, as proteínas diminuem sua solubilidade com a temperatura, em função do aumento da desnaturação. Com a desnaturação ocorre a exposição dos radicais hidrofóbicos, normalmente presentes no interior da molécula, provocando a diminuição da solubilidade.

4.8.1.4. Precipitação por solvente orgânico

- Pipetar 1mL de solução de clara de ovo 10% para um tubo de ensaio.
- Adicionar 1mL de etanol 95GL.
- Observar o turvamento da solução devido a diminuição de solubilidade das proteínas da clara do ovo.

As proteínas estão evolutivamente adaptadas ao meio aquoso e, por isso, mantêm os seus radicais polares predominantemente no exterior da molécula, em contato com a água. Qualquer solvente que adicionado a água, diminui a polaridade do meio (diminui a constante dielétrica) vai provoca a diminuição de solubilidade das proteínas.

4.8.1.5. Precipitação por metais

Experimento 1

- Pipetar em um tubo de ensaio 1 mL de solução de clara de ovo 10% ligeiramente alcalina.
 - Pipetar 1 mL de solução de cloreto de mercúrio 0,01M.
 - Observar a formação de um precipitado branco.
 - Adicionar nesse precipitado, gotas de ácido clorídrico 0,05N e observar que o precipitado dissolve.
-

Experimento 2

- Pipetar em um tubo de ensaio 1 mL de solução de clara de ovo 10% ligeiramente alcalina.
- Pipetar 1 mL de solução de cloreto de mercúrio 0,01M.
- Observar a formação de um precipitado branco.
- Adicionar 1 mL de solução neutra de EDTA (ácido etileno diamino tetra acético - agente complexante de metais) 0.05M e observar que o precipitado dissolve.

As proteínas formam sais insolúveis com certos íons metálicos. Quando uma solução de proteína está em meio alcalino, ela apresenta uma carga líquida negativa. Na presença de certos cátions de metais formam-se sais que podem ser solúveis ou insolúveis, dependendo da natureza do metal; por exemplo, sais de Na, K e Mg são solúveis enquanto de Hg, Pb, Cu e Zn são insolúveis.

A precipitação ocorre, então, em função da formação de sais com metais específicos. Em meio alcalino, as proteínas têm um predomínio de cargas negativas (ânions) que reagem com os metais (cátions) formando sais. O sal formado entre as proteínas da clara com o mercúrio utilizado nos experimentos (cloreto de mercúrio) é insolúvel.

Alterando o pH do meio, mediante adição de ácidos, as proteínas adquirem um predomínio de cargas positivas provocando a dissolução do precipitado. As proteínas com cargas positivas não reagem com os metais.

A adição de EDTA, um composto que formam complexos com os metais, vai retirar (complexar) o mercúrio da solução e o precipitado também dissolve.

4.8.1.6. Precipitação por Ácidos

- Pipetar 1mL da solução de clara de ovo 10% para um tubo de ensaio.
- Adicionar 1mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%.
- Observar a formação de um precipitado branco.

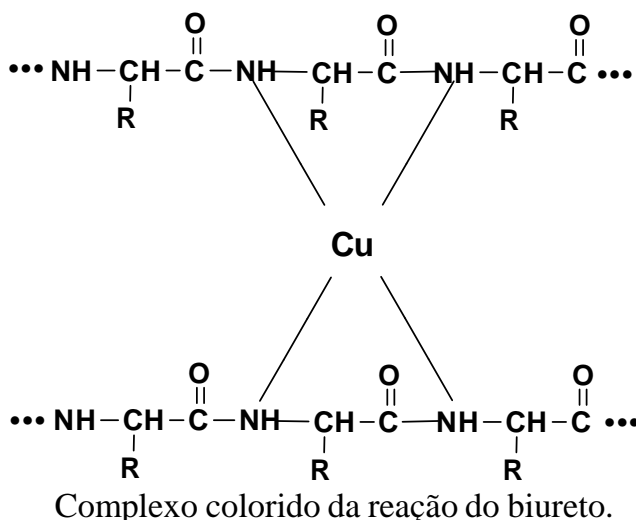
Da mesma maneira que os metais, certos ácidos (ácido perclórico e ácido tricloroacético, por exemplo) quando adicionados em soluções protéicas provocam o abaixamento do pH atribuindo carga positiva às proteínas (cátions). Esses cátions reagem com o ácido adicionado (ânions) formando sais insolúveis. Esses ácidos são normalmente utilizados para a desproteíntização de soluções.

4.8.2. Reações Coloridas das Proteínas

4.8.2.1 Reação de biureto

- Pipetar para um tubo de ensaio 1mL de solução de clara de ovo 10%.
- Pipetar 1mL de solução de NaOH 2N.
- Adicionar gotas de sulfato de cobre 0,01M.
- Observar a formação de uma coloração **roxa**.
- Fazer um tubo substituindo a clara de ovo por água para comparar com a cor formada.

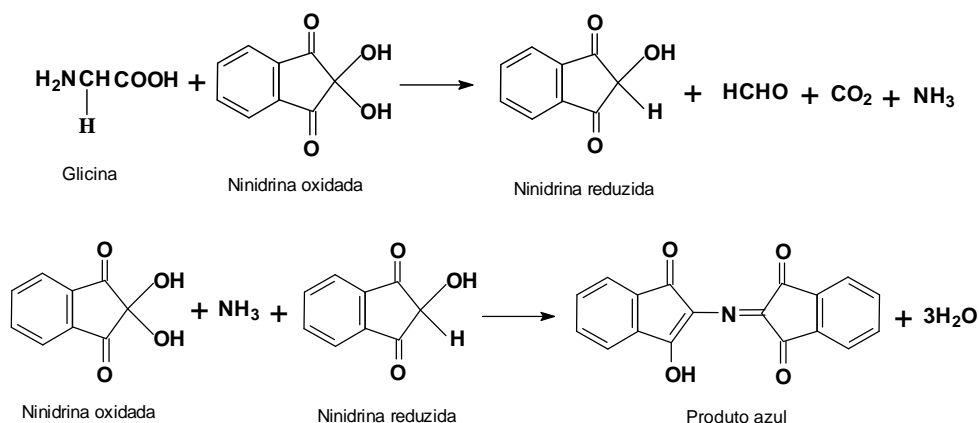
A reação de biureto é uma reação específica que ocorre entre o átomo de cobre e os peptídeos (**tripeptídeos em diante**), formando um complexo de cor roxa característico.



4.8.2.2. Reação de Ninidrina

- Pipetar para um tubo de ensaio 1mL da solução de glicina 0,1%.
- Pipetar 1mL da solução de ninidrina 0,1% (preparar em etanol).
- Colocar em banho de água em ebulição por 2 minutos.
- Observar a formação de uma coloração **azul**.
- Fazer um tubo substituindo a glicina por água para comparar com a cor formada.

A reação de ninidrina é uma reação colorida específica, utilizada para caracterizar e quantificar os alfa-aminoácidos.



5. DETERMINAÇÃO DO pKa DOS AMINOÁCIDOS

5.1. Introdução

A capacidade de ionização é uma propriedade importante de muitos compostos biológicos. Ácidos orgânicos, aminoácidos, purinas, pirimidinas e ésteres fosfatos são exemplos de compostos que ionizam-se em graus variáveis em sistemas biológicos. Uma vez que o pH de muitos fluídos biológicos é próximo de 7,0, o grau de ionização de alguns desses compostos pode ser total.

Uma das propriedades qualitativas características de uma molécula, é o pKa de qualquer grupo dissociável que ela possui. Por essa razão, a determinação experimental do pKa de grupos ionizáveis é um procedimento importante na descrição das propriedades de uma substância desconhecida. O pKa pode ser determinado experimentalmente em laboratório, construindo-se a **curva de titulação** com um potenciômetro. A medida que quantidades conhecidas de álcali ou de ácido são adicionados a uma solução problema, o pH é determinado, e o gráfico da curva de titulação pode ser construído. A partir dessa curva o ponto de inflexão (que corresponde ao valor do pKa) pode ser determinados por métodos adequados.

O conhecimento do conceito de ácidos e bases será importante na discussão da estrutura dos aminoácidos.

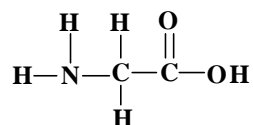
- **Ácidos:** são todas as substâncias capazes de doar prótons (Brönsted).
- **Bases:** são todas as substâncias capazes de receber prótons (Brönsted).

5.2 Curva de Titulação da Glicina

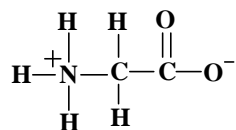
Uma das maneiras de mostrar que os aminoácidos existem como íons dipolares (zwitterions) em vez de moléculas neutras, consiste em fazer a determinação do pKa do grupo que está envolvido em reação, com hidróxido de sódio e com ácido clorídrico, por meio da titulação potenciométrica.

Para os aminoácidos (glicina, por exemplo), além da determinação dos valores dos valores de pKa, pode-se também analisar a sua estrutura predominante. Serão consideradas duas hipóteses:

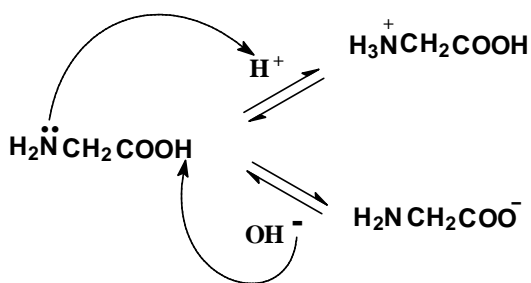
Hipótese 1 – A glicina como uma molécula neutra



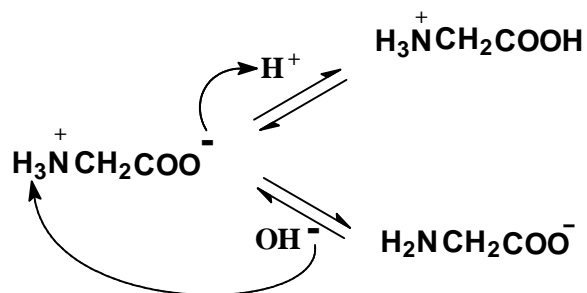
Hipótese 2 – A glicina como uma molécula carregada



Titulação da glicina considerando a hipótese 1:



Titulação da glicina considerando a hipótese 2:



Para descobrir qual é a hipótese verdadeira, analisar os valores dos pKa, que serão determinados pela titulação potenciométrica a seguir.

5.3. Trabalho Prático

- Pesar 0,30 g de glicina e dissolver em 30 mL de água destilada em um béquer de 50 mL.
- A calibração do potenciômetro com solução padrão de pH e a montagem do sistema para as medidas de pH da solução de glicina será feita pelo professor.
- Após a montagem do sistema, fazer a leitura do pH da solução e iniciar a titulação adicionando volumes de 0,50 mL de hidróxido de sódio 0,5 N até um volume de aproximadamente 8,0 mL como mostrado na tabela abaixo.

Proceder da mesma maneira para a titulação da glicina com ácido clorídrico 0,5 N.

Volume HCl	pH	Volume NaOH	pH
0,0 mL		0,0 mL	
0,5 mL		0,5 mL	
1,0 mL		1,0 mL	
1,5 mL		1,5 mL	
2,0 mL		2,0 mL	
3,0 mL		3,0 mL	
4,0 mL		4,0 mL	
5,0 mL		5,0 mL	
6,0 mL		6,0 mL	
7,0 mL		7,0 mL	
8,0 mL		8,0 mL	

- Construir a curva de titulação a partir dos dados da tabela acima, colocando o pH na ordenada e os volumes de HCl e NaOH na abcissa.
- pKa pode ser obtido graficamente pelo ponto de inflexão da curva de titulação, ou por de cálculos estequiométricos.
- Para determinar o pKa utilizando cálculos estequiométricos, determinar:
 - A normalidade da solução de glicina (0,3 g/30 mL).
 - O volume de HCl e NaOH gastos para reagirem com a glicina.

Como a glicina é um ácido fraco ou uma base fraca (substância anfótera), ocorre a formação de uma solução tampão durante a titulação (região plana da curva de titulação). Por isso, o valor do pKa poderá ser determinado utilizando a **equação de Henderson-Hasselbalch**.

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{base conjugada}]}{[\text{ácidoconjugado}]}$$

O valor do pKa será igual ao valor do pH ($\text{pKa} = \text{pH}$), quando as concentrações de base conjugada e ácido conjugado forem iguais ($[\text{BC}] = [\text{AC}]$). Sabendo o volume de HCl ou NaOH necessário para estabelecer essa igualdade, o valor do pKa de cada grupo do aminoácido será determinado encontrando os valores de pH correspondentes aos volumes de HCl ou NaOH na tabela de titulação acima.

As estruturas da glicina (neutra ou carregada) podem agora ser analisadas utilizando os valores dos pKa encontrados. A estrutura correta da glicina será aquela que apresentar **valores de pKa coerentes** com os grupos titulados da glicina. Utilizar os conhecimentos sobre ácidos e bases previamente adquiridos para concluir corretamente.

5.4. Análise da Estrutura

A análise da estrutura da glicina será realizada considerando as duas hipóteses:

Hipótese 1 - se a glicina existir como uma molécula neutra, quando titulada com hidróxido de sódio, é o grupo carboxila que vai reagir com o álcali. O pKa determinado experimentalmente deve estar na região de 3,0 a 5,0 (o valor de pKa da carboxila de ácidos carboxílicos situa-se nesse intervalo). Quando titulada com ácido clorídrico, é o grupo amino que vai reagir com o ácido e o pKa determinado experimentalmente deve estar na região de 9,0 a 11,0 (o valor do pKa do grupo amino das aminas situam-se nesse intervalo).

Hipótese 2 - se a glicina existir como uma molécula carregada (íon dipolar), quando titulada com hidróxido de sódio, o pKa determinado experimentalmente deve estar na região de 9,0 a 11,0 (porque é o grupo amino que vai reagir) e, quando titulada com ácido clorídrico o pKa deve estar na região de 3,0 a 5,0 (porque é o grupo carboxila que vai reagir).

Ao comparar os valores de pKa encontrados com os valores de pKa de aminas e ácidos carboxílicos (9 a 11 e 3 a 5, respectivamente), pode-se concluir que os aminoácidos são moléculas carregadas, sendo a hipótese 2 a verdadeira.

5.5. Determinação do Ponto Isoelétrico

O ponto isoelétrico é o pH onde há um equilíbrio de cargas na estrutura do aminoácido ou peptídeo. Quando o aminoácido apresenta um grupo ácido e um alcalino o ponto isoelétrico é obtido pela média dos pKa de cada grupo.

$$pI = \frac{\text{pKa do grupo ácido} + \text{pKa do grupo alcalino}}{2}$$

O valor do pKa será igual ao valor do pH ($pKa = pH$), quando as concentrações de base conjugada e ácido conjugado forem iguais ($[BC] = [AC]$). Sabendo o volume de HCl ou NaOH necessário para estabelecer essa igualdade, o valor do pKa de cada grupo do aminoácido será determinado encontrando os valores de pH correspondentes aos volumes de HCl ou NaOH na tabela de titulação acima.

As estruturas da glicina (neutra ou carregada) podem agora ser analisadas utilizando os valores dos pKa encontrados. A estrutura correta da glicina será aquela que apresentar **valores de pKa coerentes** com os grupos titulados da glicina. Utilizar os conhecimentos sobre ácidos e bases previamente adquiridos para concluir corretamente.

5.4. Análise da Estrutura

A análise da estrutura da glicina será realizada considerando as duas hipóteses:

Hipótese 1 - se a glicina existir como uma molécula neutra, quando titulada com hidróxido de sódio, é o grupo carboxila que vai reagir com o álcali. O pKa determinado experimentalmente deve estar na região de 3,0 a 5,0 (o valor de pKa da carboxila de ácidos carboxílicos situa-se nesse intervalo). Quando titulada com ácido clorídrico, é o grupo amino que vai reagir com o ácido e o pKa determinado experimentalmente deve estar na região de 9,0 a 11,0 (o valor do pKa do grupo amino das aminas situam-se nesse intervalo).

Hipótese 2 - se a glicina existir como uma molécula carregada (íon dipolar), quando titulada com hidróxido de sódio, o pKa determinado experimentalmente deve estar na região de 9,0 a 11,0 (porque é o grupo amino que vai reagir) e, quando titulada com ácido clorídrico o pKa deve estar na região de 3,0 a 5,0 (porque é o grupo carboxila que vai reagir).

Ao comparar os valores de pKa encontrados com os valores de pKa de amins e ácidos carboxílicos (9 a 11 e 3 a 5, respectivamente), pode-se concluir que os aminoácidos são moléculas carregadas, sendo a hipótese 2 a verdadeira.

5.5. Determinação do Ponto Isoelétrico

O ponto isoelétrico é o pH onde há um equilíbrio de cargas na estrutura do aminoácido ou peptídeo. Quando o aminoácido apresenta um grupo ácido e um alcalino o ponto isoelétrico é obtido pela média dos pKa de cada grupo.

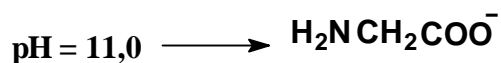
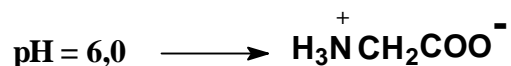
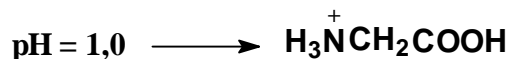
$$pI = \frac{\text{pKa do grupo ácido} + \text{pKa do grupo alcalino}}{2}$$

OBS: Essa equação só é válida para os aminoácidos que não apresentam radicais ionizáveis.

5.6. Exercícios

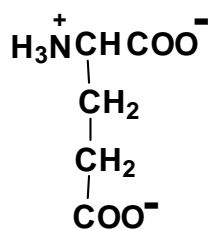
1. Quais os grupos da glicina estarão predominantemente ionizados nos pH 1,0; 6,0 e 11,0?

A ionização do grupo amino e do grupo carboxílico da glicina depende do pKa do grupo e do pH do meio. Nos pH 1,0; 6,0 e 11,0 a glicina apresenta respectivamente as seguintes formas ionizadas:



2. Conhecendo o valor do pI, qual a carga vai predominar no aminoácido em pH inferior e superior ao pI?

3. O ácido glutâmico é um aminoácido com radical ácido. Qual será o valor aproximado do pKr (radical), considerando o pK₁ (carboxila) e o pK₂ (grupo amino) iguais aos pKas da glicina?



Ácido glutâmico

Para estimar o valor do pK_r (pK_a do radical) do ácido glutâmico deve-se considerar o **efeito indutivo** que o grupo amino exerce sobre as duas carboxilas, bem como os valores gerais do pK_a dos ácidos carboxílicos, que estão aproximadamente no intervalo de 3,0 a 5,0. Quanto mais próximo da carboxila estiver o grupo amino, maior será o efeito indutivo e conseqüentemente menor será o valor do pK_a. Pode-se concluir, portanto, que o valor do pK_r do ácido glutâmico deverá ser maior que o pK₁.

Portanto, o ponto isoelétrico de um aminoácido, peptídeo ou proteína, poderá ser calculado pela fórmula empírica: $pI = \frac{pK_n + pK_{n+1}}{2}$, onde n = número de grupos básicos (aqueles que podem carregar-se positivamente). Ou seja, será a média aritmética entre 2 valores de pK_a.

4. Fazer um esquema da curva de titulação do ácido glutâmico. Lembrar que o efeito tampão ocorre em torno do pK_a.

6. CROMATOGRAFIA

6.1. Introdução

A cromatografia é uma técnica utilizada para a separação e identificação de substâncias. A separação é obtida mediante o movimento das substâncias produzidas pelo movimento de um ou mais solventes, por meio de um suporte, que normalmente é sólido, previamente preparado.

O tipo de força envolvida na separação das substâncias por cromatografia é que vai caracterizar o tipo de cromatografia: **cromatografia de partição** - a separação é obtida pela diferença de solubilidade das substâncias em diferentes solventes; **cromatografia de troca iônica** - a separação é obtida pela diferença de

cargas entre as substâncias; **cromatografia de filtração molecular** - a separação é obtida de acordo com a diferença de tamanho entre as moléculas das substâncias; **cromatografia de afinidade** - a separação é obtida mediante uma afinidade específica de ligação (ligação antígeno-anticorpo, ligação enzima-inibidor, etc).

6.2. Cromatografia em Papel

A cromatografia em papel é um tipo da cromatografia de partição na qual, a separação das substâncias é obtida pelo movimento de um solvente com a utilização de uma folha de papel específico.

6.2.1. Princípio da Cromatografia

Uma gotícula da solução contendo a mistura de substâncias a ser separada é colocada próximo a margem do papel (aproximadamente 2 centímetros) formando uma mancha úmida. Deixa-se secar o solvente da mancha, onde foi colocada a solução, ficando a mistura das substâncias impregnadas no papel. A margem do papel próximo a mancha é imersa em um solvente adequado, (solvente de partição) sem, contudo, submergir a referida mancha. O solvente sobe no papel por capilaridade (cromatografia ascendente; quando o fluxo do solvente desce pelo papel, a cromatografia é denominada cromatografia descendente) e, ao passar pela mancha, arrasta as substâncias impregnadas no papel de acordo com a solubilidade dessas substâncias nos diferentes solventes: o solvente da fase estacionária (água impregnada no papel) e o solvente da fase móvel (solvente de partição, que normalmente é composto de uma mistura de solventes de diferentes polaridades). Cada substância geralmente move-se a uma determinada velocidade, em função da sua solubilidade em cada solvente (fase móvel e fase estacionária).

Deixa-se o solvente migrar por um período de tempo (o espaço percorrido pelo solvente vai variar de acordo com cada cromatografia). O papel é então seco e, se as substâncias a serem separadas são incolores, faz-se a revelação da cromatografia por meio de uma reação química colorida específica.

6.2.2. Forças Envolvidas na Separação das Substâncias

A distância (da origem) migrada por uma determinada substância é resultante de duas forças: a **força de propulsão** e a **força de retardamento**.

Força de Propulsão: a força de propulsão atua no sentido de deslocar as substâncias de sua origem e movê-la no sentido do fluxo do solvente. As duas principais forças de propulsão são: o **fluxo do solvente** e a **solubilidade**.

Fluxo do solvente: quando um solvente flui através da mancha, a tendência é carregar todas as substâncias com ele, de acordo com a solubilidade dessas substâncias no solvente. Pode-se generalizar dizendo que, se uma substância a ser cromatografada for completamente e instantaneamente solúvel no solvente, e não havendo a atuação de nenhuma força de retardamento, a substância migrará juntamente com a frente do solvente. Alternativamente, se a substância a ser cromatografada for completamente insolúvel no solvente, ela permanecerá na origem.

Solubilidade: o solvente de partição é normalmente composto de uma mistura de substâncias de diferentes polaridades (a própria água embebida no papel pode ser considerada como um dos solventes da cromatografia ou, o suporte é previamente preparado através da impregnação de um solvente específico). Em função dessa diferença de polaridade, é que vai haver a separação das substâncias devido as diferenças de solubilidade nesses solventes.

Na cromatografia em papel a água é o solvente impregnado no papel constituindo a **fase estacionária**. O solvente ou a mistura de solventes que migrar através da água (fase estacionária) é considerada a **fase móvel**. Poucas substâncias tem solubilidades idênticas em um determinado solvente. As substâncias mais solúveis na fase móvel movem mais rapidamente que as substâncias mais solúveis na fase estacionária. A tendência é as substâncias separarem cada vez mais durante a cromatografia.

Os solventes são escolhidos de modo a oferecerem maiores solubilidades diferenciais entre as substâncias a serem separadas.

Força de Retardamento: a força de retardamento atua no sentido de impedir que as substâncias sejam arrastadas da origem. As principais forças de retardamento são: a **adsorção** e a **partição**.

Adsorção: é a força que tende a manter as moléculas das substâncias ligadas a superfície do papel. Algumas substâncias são mais fortemente adsorvidas do que outras alterando o deslocamento delas no suporte.

Partição: a partição pode ser definida como sendo a distribuição de uma determinada substância entre dois solventes imiscíveis. De fato, a cromatografia depende da presença de duas fases de líquidos. Uma é denominada **fase móvel**,

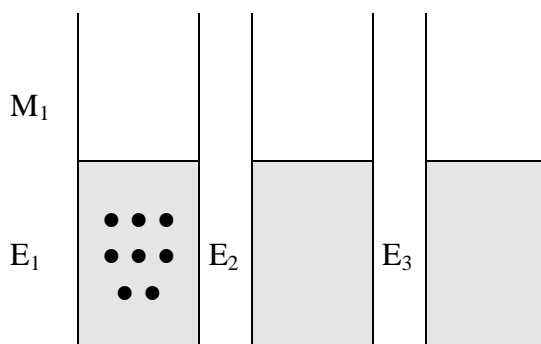
formada normalmente de solventes ou mistura de solventes mais apolares e a outra é denominada de **fase estacionária**, formada normalmente por solventes mais polares, impregnados no suporte. Na cromatografia em papel a fase estacionária é considerada a própria água presente no papel de filtro.

Se a água presente no papel de filtro é a fase estacionária, durante a cromatografia, a fase móvel vai mover-se através da água (fase estacionária), provocando a partição do soluto (**obs** - o papel de filtro apresenta de 6 a 12% de água ligada à celulose). A quantidade de soluto encontrada em cada fase vai depender da solubilidade do soluto em cada um solvente. O grau de partição no equilíbrio é denominado de **coeficiente de partição** e, o fenômeno da distribuição da substância nos dois solventes é denominado de **distribuição em contracorrente**.

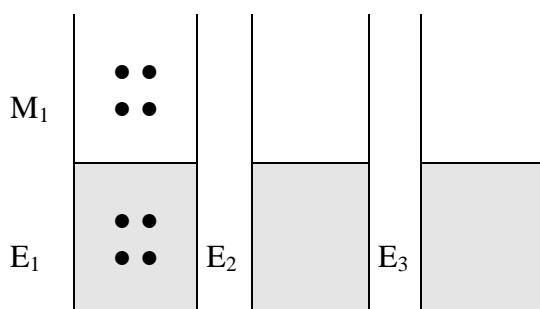
6.2.3. Distribuição em Contracorrente

A distribuição em contracorrente requer que os dois solventes sejam imiscíveis entre si (ou constituem fases distintas na cromatografia) e que a substância a ser separada apresente algum grau de solubilidade em cada um deles. Um dos solventes é imóvel e corresponde à fase estacionária da cromatografia (E) e o outro solvente, que se move através da fase estacionária carregando consigo parte da substância a ser separada (de acordo com o coeficiente de partição), corresponde à fase móvel (M).

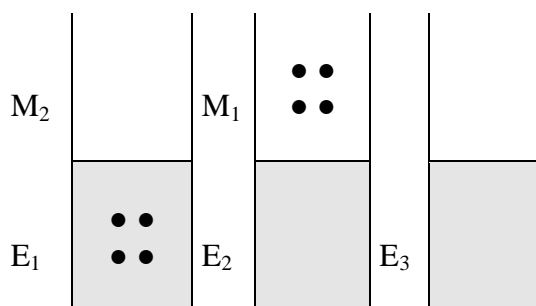
O esquema a seguir tenta explicar como ocorre a partição. Deve ser considerado um coeficiente de partição igual a 1,0 (um). O soluto (ou mistura de solutos) é dissolvido na fase estacionária e é representado hipoteticamente por 8 (oito) bolas.



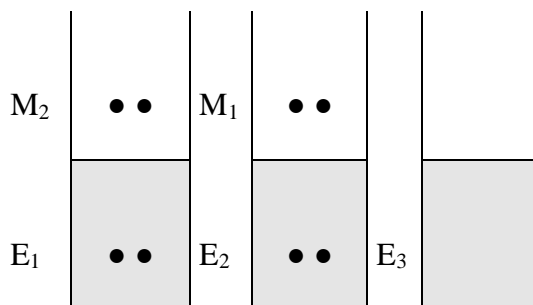
Estágio 1 - todos os tubos contém um volume da fase estacionária (E₁, E₂, E₃). O tubo 1 contém o soluto dissolvido na fase estacionária (8 moléculas) e um volume igual fase móvel (M₁).



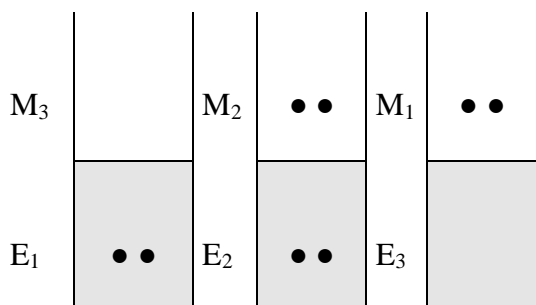
Estágio 2 - O tubo 1 (um) é agitado e deixa-se as duas fases separarem-se. A substância será distribuída entre as duas fases E_1 e M_1 , de acordo com o coeficiente de partição.



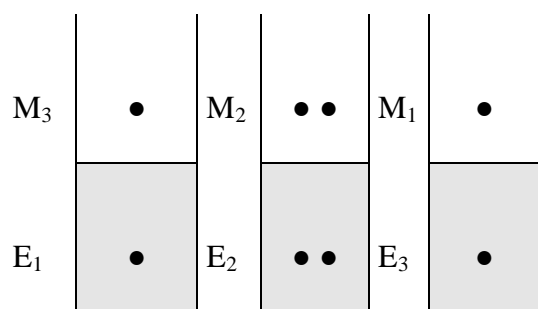
Estágio 3 - A fase móvel foi transferida do tubo 1 (um) para o tubo 2 (dois) e um novo volume M_2 , vindo da cuba, foi adicionado no tubo 1 (um), mostrando a migração do solvente.



Estágio 4 - Os tubos 1 (um) e 2 (dois) são agitados e deixam-se as fases separarem-se. A substância se distribui igualmente entre a fase estacionária (E) e a fase móvel (M).



Estágio 5 - A fase móvel M_1 é transferida do tubo 2 para o tubo 3, M_2 é transferida do tubo 1 para o tubo 2 e um novo volume de fase móvel M_3 vindo da cuba é adicionado no tubo 1 (um).



Estágio 6 - Todos os tubos são agitados e deixam-se as fases separarem-se. A substância distribui-se igualmente entre a fase móvel (M) e a fase estacionária (E) em todos os tubos.

- Após as três distribuições, a substância é encontrada principalmente no tubo do meio porque o coeficiente de partição é 1 (um).
- Notar que a numeração E1, E2 e E3 está em direção oposta a M1, M2 e M3, indicando que a fase móvel move-se através da fase estacionária. Devido a esse movimento contrário das fases é que denomina-se distribuição em contracorrente.
- A partição é uma força de retardamento na cromatografia em papel porque, o soluto que foi deslocado da folha de papel pelo solvente em movimento, está continuamente retornando a folha de papel e retardando o progresso da cromatografia. Como a partição de uma determinada substância é diferente da partição de outra substância, ela é considerada também, uma força diferencial.

A partição pode também ser explicada de acordo com a tabela abaixo:

TABELA – Distribuição de uma substância A (20% solúvel na fase móvel) após 10 passos de extração com a fase móvel M.

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Extração											
0	200										
1	160	40									
2	128	64	8								
3	102	77	19								
4	82	82	30	6							
5	66	82	40	11	1						
6	53	79	48	17	3						
7	42	74	54	24	5	1					
8	34	67	58	30	9	2					
9	27	61	59	36	13	4					
10	22	54	59	41	17	6	1				

- Elaborar uma tabela igual a anterior considerando uma substância **B** que seja 80% solúvel na fase móvel.
- Fazer um gráfico mostrando a distribuição de A e B. Colocar os tubos na abscissa e as partes das substâncias A e B, após os 10 passos de extração, na ordenada.
- As duas substâncias vão se separar ou não?

6.3. Trabalho Prático

O trabalho prático consiste em identificar as soluções dos aminoácidos glicina 1%, fenilalanina 1% e sua mistura, rotulados ao acaso como sendo substâncias A, B e C, utilizando-se uma cromatografia em papel.

6.3.1. Procedimento

- Utilizar uma folha de papel Whatman número 1 com aproximadamente 16 centímetros de lado e fazer um traço a lápis a 2 centímetros de uma das bordas do papel. Tocar no papel o mínimo possível durante a operação.
 - Marcar sobre o traço pontos de 4 em 4 centímetros e numerá-los a lápis segundo o rótulo das substâncias A, B, C.
 - Aplicar as amostras nos pontos numerados com auxílio de uma pipeta, de maneira que a mancha formada sobre o papel seja a menor possível (aproximadamente 0,5 cm de diâmetro).
 - Secar completamente as manchas com auxílio de um jato de ar quente (ou colocar em estufa).
 - Enrolar o papel de modo a transformá-lo em um cilindro e prender a parte superior do papel (oposta as manchas) com um grampeador.
 - Mergulhar o cilindro de papel em uma cuba contendo o solvente de partição de modo que ele fique perfeitamente na vertical, sem tocar nas paredes da cuba.
 - Deixar o solvente migrar aproximadamente 10 centímetros. Retirar o papel e marcar imediatamente a linha de frente do solvente.
 - Secar o papel em estufa.
 - Borrifar solução de ninidrina 0,1% (preparada em etanol 95%) e colocar em estufa por alguns minutos para ocorrer a revelação.
 - Delimitar com lápis as manchas que aparecerem no papel e calcular a razão de fluxo (Rf).
-

$$\text{Razão de fluxo} = \frac{\text{distância migrada pelo soluto}}{\text{distância migrada pelo solvente}}$$

- Comparar os valores de Rf encontrados com os valores apresentados na tabela abaixo.
- Os aminoácidos aplicados no mesmo local do papel vão separar?

A separação dos aminoácidos glicina e fenilalanina vai ocorrer predominantemente em função da solubilidade dos aminoácidos na água (fase estacionária) ou no etanol/água (fase móvel) de acordo com o coeficiente de partição.

A fenilalanina será mais solúvel no etanol (fase móvel) do que na água (fase estacionária), porque apresenta um **radical hidrofóbico** muito grande (a presença de radical hidrofóbico aumenta a solubilidade em solventes orgânicos e diminui a solubilidade em água). Ao contrário, a glicina (que não possui radical hidrofóbico) será mais solúvel em água (fase estacionária).

Conclui-se, portanto, que a mancha mais distante da origem é de fenilalanina e a mancha mais próxima é de glicina.

Como a solubilidade é uma constante de cada substância, a mistura deverá conter duas manchas (uma de glicina e outra de fenilalanina), com migração igual a dos aminoácidos sozinhos.

6.4. Solvente de Partição para Cromatografia de Aminoácidos

- Etanol - água - amônia (d = 0,88) 8:1:1
- N - butanol - ácido acético - água 4:1:1
- Fenol - água 4:1 (adicionar 0.25 mL de amônia para cada 50 mL de solução).

Fazer imediatamente antes de usar.

TABELA – Valores de Rf de alguns aminoácidos (solvente de partição: butanol - ácido acético - água 4:1:1)

Aminoácidos	Rf	Aminoácidos	Rf	Aminoácidos	Rf
CIS	0,08	SER	0,27	TRP	0,50
LIS	0,14	GLU	0,30	MET	0,55
HIS	0,20	TRE	0,35	VAL	0,60
ARG	0,20	ALA	0,38	FEN	0,68
ASP	0,24	PRO	0,43	ILE	0,72
GLI	0,26	TIR	0,45	LEU	0,73

7. EXTRAÇÃO DO DNA DA CEBOLA (*Allium cepa*)

7.1. Introdução

Os ácidos nucleicos podem ser divididos em ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). O DNA atua como fonte de informação para síntese de proteínas dos organismos e fornece a informação hereditária para as células-filhas. As moléculas de RNA podem ser divididas em três classes principais: RNA mensageiro, RNA de transferência e RNA ribossômico. Cada um difere do outro em relação a tamanho, função e estabilidade.

Para a análise do DNA de células eucarióticas, a primeira etapa importante é o seu isolamento. O procedimento a seguir é utilizado para extrair grandes quantidades de DNA a partir de cebola. Protocolos similares são usados nas extrações de DNA de outras fontes, como amostras de sangue, tecidos, etc.

A extração de DNA de células eucariontes consta fundamentalmente de três etapas:

- Ruptura (física e química) das membranas celulares para a liberação do material genético;
- Desmembramento dos cromossomos em seus componentes básicos: DNA e proteínas;
- Separação do DNA dos demais componentes celulares.

Objetivos

- Conhecer os princípios básicos da extração do material genético da cebola, a partir dos tecidos do bulbo;
- Estudar a estrutura e composição celular;
- Identificação do material genético na célula.

Procedimentos

- Pique a cebola em pedaços pequenos;
 - Coloque no béquer pequeno de plástico (50 mL), 4 colheres de chá de pedaços de cebola;
-

- Adicione 2 colheres de sopa de solução de lise;
- Macere intensamente com o auxílio do bastão de madeira;
- Complete com a solução de lise até 25 mL no béquer, misturando a solução;
- Coe a solução com o auxílio do funil e do papel de filtro; coloque o filtrado em um tubo Falcon ou tubo de ensaio com tampa (dica: suspenda o papel de filtro para facilitar o escoamento de solução);
- Depois de filtrar a solução, tampe o tubo e o coloque no banho-maria por 15 minutos;
- Em seguida, coloque o tubo no béquer com gelo e água, durante 5 minutos;
- Decorrido este tempo, adicione um volume igual de isopropanol (gelado) ao do tubo e misture vagarosamente (por inversão). Neste momento será verificada a formação de um precipitado.

8. ELETROFORESE

8.1. Introdução

Eletroforese pode ser definida como o movimento de uma molécula carregada (íon) em um campo elétrico. Três componentes básicos são necessários para se realizar uma eletroforese: um **campo elétrico** que é obtido por meio de uma fonte de corrente contínua, um **suporte** onde a molécula pode migrar e a própria **molécula carregada**.

De acordo com o meio, onde a molécula se move, a eletroforese pode ser classificada em: **eletroforese livre** - quando a migração da molécula carregada realiza-se em um meio líquido, como por exemplo, através de uma solução tampão. Este tipo de eletroforese não é mais utilizado; **eletroforese de zona ou banda** - a molécula carregada migra em um suporte sólido que pode ser de vários tipos: papel, acetato de celulose, gel de amido, gel de poliacrilamida etc. Na eletroforese de zona, as moléculas carregadas são separadas em discretas zonas e, por isso, dá-se o nome de eletroforese de zona ou de banda.

8.2. Ionização das Moléculas

A carga de uma molécula é o resultado da ionização de seus grupos dissociáveis. Essa ionização depende do pH do meio e do pK do grupo dissociável. O grau de

dissociação é, portanto, a porcentagem de todas espécies carregadas em um determinado pH. O grau de dissociação pode ser estimado pela **equação de Henderson-Hasselbalch**.

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{base conjugada}]}{[\text{ácido conjugado}]}$$

A migração diferencial das moléculas, ou seja, a sua separação em um campo elétrico, resulta das diferentes quantidades de íons carregados em um determinado pH.

8.3. Movimento de um Íon em um Campo Elétrico

Quando uma molécula com carga líquida “**Q**”, for colocada em um campo elétrico **S**, sofre o efeito de uma força de campo “**F**” que depende do campo elétrico e da carga da molécula.

$$\mathbf{F} = \mathbf{S} \cdot \mathbf{Q}$$

O campo elétrico “**S**” é a relação entre a voltagem (V) e a distância entre os eletrodos (d).

$$\mathbf{F} = \frac{\mathbf{V}}{\mathbf{d}} \cdot \mathbf{Q}$$

A velocidade de migração de uma molécula carregada pode ser alterada, portanto, mudando a distância entre os eletrodos, bem como alterando a voltagem do sistema.

Na ausência de uma força de resistência, a molécula acelera até encontrar o eletrodo. Entretanto, isso não ocorre devido à resistência resultante da fricção com o suporte. A força de fricção “**F**” é uma função do tamanho e da forma da molécula, viscosidade da solução e velocidade de migração, como mostra a equação de STOKES.

$$\mathbf{F} = 6 \cdot \pi \cdot \mathbf{R} \cdot \mathbf{N} \cdot \mathbf{v}$$

F - Força de fricção
 R - Raio da molécula
 N - Viscosidade do meio
 v - velocidade de migração

Quando a força de resistência excede a força de propulsão da molécula, não ocorre a migração. Quando a força de propulsão excede a força de resistência, ocorre a migração da molécula carregada. Os fatores que afetam a velocidade de migração de uma molécula carregada podem ser obtidos quando a força de propulsão e a força de resistência são iguais:

$$\text{Força de propulsão} \longrightarrow F = \frac{V}{d} \cdot Q$$

$$\text{Força de resistência} \longrightarrow F = 6 \cdot \pi \cdot R \cdot N \cdot v$$

Igualando as forças

$$\frac{V}{d} \cdot Q = 6 \cdot \pi \cdot R \cdot N \cdot v$$

Isolando a velocidade

$$v = \frac{V \cdot Q}{6 \cdot \pi \cdot R \cdot N \cdot d}$$

A velocidade de migração ou mobilidade de uma molécula carregada em um campo elétrico é diretamente proporcional à carga da molécula e ao próprio campo elétrico e inversamente proporcional ao tamanho da molécula e a viscosidade da solução. Quando o suporte utilizado for um gel de poliacrilamida, o efeito do tamanho dos poros devem ser considerados, ou seja, a migração é inversamente proporcional ao logaritmo do tamanho dos poros.

Como cada molécula carregada (proteína, por exemplo) deve possuir carga e tamanhos específicos, elas migram para uma única posição no gel de poliacrilamida, em um determinado de tempo de corrida. Em uma mistura de íons (proteínas, por

exemplo), cada uma deve posicionar em um lugar único no gel de poliacrilamida formando as bandas ou zonas quando reveladas.

Na eletroforese de zona, onde a molécula carregada pode migrar em uma grande variedade de suportes, vários outros fatores além daqueles comentados acima, podem influenciar a migração. Alguns fatores são mais proeminentes em um tipo de suporte enquanto outros fatores são mais proeminentes em outros tipos de suportes. Dentre esses fatores, pode-se exemplificar a evaporação (resultando em movimento capilar) e a força iônica.

8.4. Trabalho Prático

Realizar uma eletroforese de uma solução de clara de ovo 10%, utilizando como suporte um cilindro de gel de poliacrilamida.

8.4.1. Reagentes

- A - Tampão TRIS 1,5 M pH 8,9 + TEMED 0,05%
- B - Acrilamida 60% - bis-acrilamida 1,6%
- C - Perssulfato de amônio 7,2mM (0,165 g/100 mL)

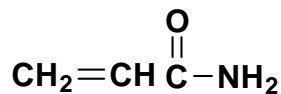
8.4.2. Polimerização do Gel

- Em um béquer de 50 mL adicionar:

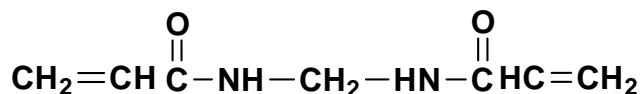
0,50 mL do reagente A
0,25 mL do reagente B
0,85 mL do reagente C
0,40 mL de água

- Misturar os reagentes, colocar em vácuo para desaerar a solução (evitar a formação de bolhas de ar no gel).
 - Colocar em um cilindro de vidro (aproximadamente 0,5 cm de diâmetro e 7,0 cm de comprimento), deixando um espaço de 1 cm para a aplicação da amostra.
 - Adicionar 0,1 ml de água sobre a solução do gel para eliminar o menisco formado na parte superior da solução.
 - Colocar no escuro para promover a polimerização com perssulfato de amônio.
-

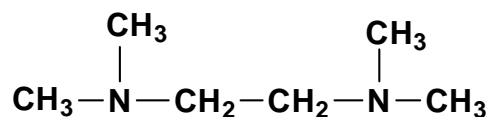
8.5. Estruturas



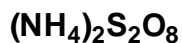
Acrilamida



Bis-acrilamida



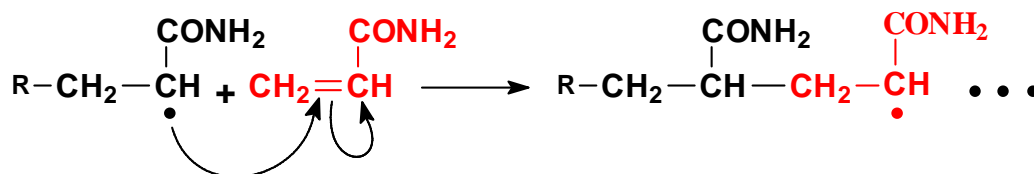
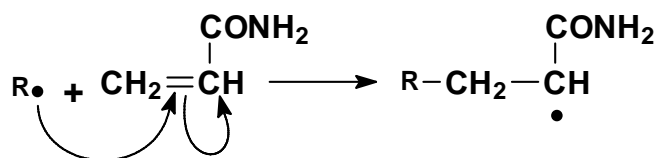
TEMED



Persulfato de amônio

8.6. Polimerização

A polimerização do gel de poliacrilamida é catalisada pela presença de radicais livres em solução. A formação de radicais ($\text{R}\cdot$) pode ser obtida de uma solução aquosa de persulfato de amônio recém preparada.



Após a polimerização, o gel de poliacrilamida apresenta uma estrutura em forma de rede, que vai interferir na migração das moléculas. Quanto maior for o poro do gel, menor será o atrito das moléculas com o gel e maior será a migração. Caso contrário, a migração será menor.

O tamanho do poro do gel pode ser alterado, variando a concentração de acrilamida / bis-acrilamida.

A concentração do gel é expressa em função da concentração de acrilamida ou expressa em função da soma das concentrações de acrilamida e bis-acrilamida. No exemplo do trabalho prático adicionou 0,25 mL de solução de acrilamida 60% em um volume final de 2 mL. A concentração de acrilamida na solução (concentração do gel) é de 7,5%.

8.7. Preparação da Amostra

A amostra deve conter aproximadamente 100 microgramas de proteínas para uma boa resolução do método.

Adicionar em um tubo de ensaio:

- 0,1 mL de clara de ovo 10%
- 0,2 mL de glicerol (tornar a solução mais densa)
- 0,5 mL do tampão de corrida
- 0,1 mL de azul de bromofenol 0,05% (marcador de frente)
- Aplicar 0,1 mL da mistura acima **SOBRE** o gel de poliacrilamida, **SOB** o tampão de corrida, após a montagem do sistema (ver abaixo).

8.8. Preparação do Tampão de Corrida

Adicionar em um béquer de 1 litro 12,0 g de tris (0,1 M), 57,5 g de glicina (0,8 M), dissolver, acertar o pH para 8,3 e completar com água para 1000 mL de solução. Diluir o tampão de corrida 4 vezes para realizar a eletroforese.

8.9. Montagem do Sistema

Para realizar uma eletroforese é necessário uma fonte de corrente contínua e uma cuba (normalmente de acrílico), onde é colocado o cilindro de gel de poliacrilamida. A cuba é composta de uma parte superior que apresenta orifícios para colocar o cilindro de gel (banho superior) e uma parte inferior (banho inferior).

O tampão de corrida é colocado no banho superior sobre o gel de poliacrilamida e no banho inferior até que a extremidade do gel fique submersa.

Os banhos são conectados com os pólos positivo e negativo da fonte e o gel de poliacrilamida funcionará, portanto, como uma resistência elétrica.

8.10. Início da Eletroforese

A eletroforese inicia-se quando se conecta a fonte com a cuba e liga-se o sistema à rede elétrica. A amperagem necessária para promover a migração das moléculas carregadas sem haver aquecimento do gel de poliacrilamida é de 2,5 miliampères por cilindro. Mesmo assim, todo sistema deve ser colocado em câmara fria para evitar a desnaturação das proteínas da amostra.

Obs: em aula prática será utilizado 7,5 miliampères por cilindro para diminuir o tempo de migração da amostra.

8.11. Término da Eletroforese

A eletroforese termina quando o marcador de frente (azul de bromofenol) alcançar o final do gel. O sistema é desmontado e o gel de poliacrilamida é retirado de dentro do cilindro de vidro, injetando água entre o gel e o cilindro de vidro. A água dissolve a película do fotofloco grudada no cilindro, liberando o gel de poliacrilamida.

Nota: antes de realizar a polimerização, o cilindro de vidro é mergulhado em uma solução de fotofloco 10% e seco em estufa, para a formação de uma película no interior do cilindro de vidro.

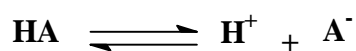
Ao gel de poliacrilamida dá-se o tratamento necessário ao objetivo da eletroforese. Na aula prática, o gel será corado para proteínas com solução de amido black 0,1% (0,1 g de amido black, 8 mL de etanol, 7 mL de ácido acético e completar o volume para 100 mL com água destilada). Deixar o gel corando por uma hora e colocar em solução de descoloração (250 mL de etanol, 80 mL de ácido acético e completar com água para 1000 mL) por 24 horas.

9. SOLUÇÕES-TAMPÕES

9.1. Introdução

Equação de Henderson Hasselbalch: Henderson e Hasselbalch aplicaram a Lei de ação das massas à ionização dos eletrólitos fracos, e obtiveram uma expressão muito útil, para cálculos de soluções-tampões, que se conhece como **equação de Henderson-Hasselbalch**.

Considerando a ionização de um eletrólito fraco qualquer HA,



rearranjando tem-se:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \longrightarrow [\text{H}^+] = \frac{K_a \cdot [\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

tomando os logaritmos:

$$\log [\text{H}^+] = \log K_a + \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

multiplicando por -1

$$-\log [\text{H}^+] = -\log K_a - \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

considerando:

$$-\log [\text{H}^+] = \text{pH} \quad \text{e} \quad -\log K_a = \text{p}K_a$$

substituindo e invertendo:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Essa forma da equação de Henderson-Hasselbalch pode ser escrita como uma expressão muito mais geral, substituindo o termo “A” pelo termo “base conjugada → BC” e o termo “HA” pelo termo “ácido conjugado → AC”.

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{Base Conjugada}]}{[\text{Ácido Conjugado}]}$$

9.2. Tampões

Com o conhecimento da ionização dos eletrólitos fracos pode-se discutir soluções-tampões. Uma solução-tampão (ou mistura tampão ou sistema tampão) é aquela que resiste a variação do pH quando se adiciona ácido ou álcali. Geralmente, uma solução-tampão consiste de uma mistura de ácido fraco de Brønsted e sua base conjugada; por exemplo, misturas de ácido acético e acetato de sódio ou de hidróxido de amônio e cloreto de amônio são soluções-tampões.

- **Ácido de Brønsted:** são substâncias que doam prótons.
- **Base de Brønsted:** são substâncias que recebem prótons.
- **Ácido fraco:** são ácidos que apresentam ionização parcial.
- **Base fraca:** são bases que apresentam ionização parcial.

Existem muitos exemplos de soluções-tampões em bioquímica. A capacidade de impedir mudanças bruscas de pH é uma propriedade importante dos organismos vivos. Os líquidos citoplasmáticos contêm proteínas dissolvidas, substratos orgânicos e sais inorgânicos e resistem a mudanças excessivas do pH. O plasma sanguíneo é uma solução-tampão muito efetiva, feita quase idealmente para conservar o valor do pH do sangue em 7,2, com variação de 0,2 unidades de pH. Os valores situados fora desses limites são incompatíveis com a vida.

Pode-se ter uma apreciação mais completa do poder tamponante das células vivas, ao recordar que muitos metabólitos que constantemente estão sendo produzidos pelas células são ácidos fracos de Brønsted. Além disso, todas as enzimas que catalisam as reações das quais participam esses eletrólitos, apresentam máxima ação catalítica dentro de limites definidos de pH.

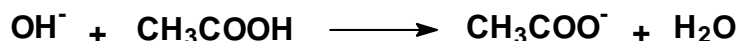
No laboratório, o bioquímico deseja examinar reações “in vivo” sob condições em que a variação de pH seja mínima. Ele obtém essas condições pelo uso de tampões eficientes, preferencialmente aqueles inertes às reações que se investigam.

Os tampões podem incluir ácidos fracos, tais como o ácido fosfórico, acético, glutárico, tartárico, etc ou bases fracas, tais como a amônia, piridina, tris (tri hidroximetil amino metano), etc.

9.2.1. Mecanismo de Tamponamento

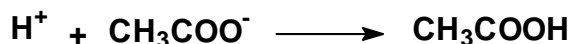
O mecanismo em que uma solução-tampão exerce controle sobre as mudanças bruscas de pH será considerado imaginando a adição de ácido e base em uma solução-tampão:

1. Quando se adiciona base a um tampão acetato [mistura de ácido acético (ácido conjugado) e acetato de sódio (base conjugada)] ocorre a seguinte reação:



Ao acrescentar base, há uma dissociação adicional do ácido acético para **fornecer mais prótons** (para reagir com a base adicionada) e dessa forma manter o pH sem variar.

2. Quando se adiciona ácido a um tampão acetato, ocorre a seguinte reação:



Os prótons adicionados combinam-se instantaneamente com o ânion acetato presente na solução-tampão (como acetato de sódio) para formar o ácido fraco não dissociado (ácido acético). Com a **retirada de prótons** da solução, o pH se mantém sem variar, ou seja, a mudança de pH é muito menor do que ocorreria se a base conjugada estivesse ausente.

9.2.2. Eficiência de Tamponamento

Na discussão dos aspectos quantitativos da ação tamponante, dois fatores determinam a eficiência ou capacidade tamponante da solução- tampão.

1. A capacidade tamponante é diretamente proporcional à **concentração dos componentes do sistema**. A concentração de um tampão refere-se à **soma** das concentrações do ácido fraco e sua base conjugada. Dessa forma, um tampão de

acetato 0,1 M, pode conter 0,05 mols de ácido acético e 0,05 mols de acetato de sódio em um litro de solução. Também pode conter 0,065 mols de ácido acético e 0,035 mols de acetato de sódio em um litro de solução.

2. O segundo fator que influi na eficiência de uma solução-tampão é a **relação** entre a **concentração da base conjugada e do ácido conjugado**. Pode se observar que, quantitativamente, a solução-tampão mais eficiente será aquela que tiver a mesma concentração de ácido e de base conjugada.

Observando a curva de titulação da glicina (trabalho prático 5), pode-se observar que a mudança mínima no pH, resultante da adição de uma unidade de base (ou ácido) ocorre próximo do pKa da glicina. Nesse pH, a relação entre a concentração da base conjugada e do ácido conjugado é 1 (um). Por outro lado, em valores de pH distantes do pKa (e portanto, com relações entre base conjugada e ácido bem diferentes da unidade), a mudança no pH por unidade de ácido ou álcali adicionado é muito maior.

Conhecendo-se os dois fatores que influenciam a capacidade tamponante, pode-se decidir qual é o tampão mais eficiente para qualquer valor de pH desejado.

- **Por exemplo: pH = 5,0** - deve-se selecionar um ácido fraco que tenha pKa igual a 5,0. Se isso não for possível, um ácido fraco que tenha pKa mais próximo de 5,0 será o mais adequado. Além disso, deve-se utilizar a concentração mais alta possível, que seja compatível com as características do sistema, já que as altas concentrações de sais freqüentemente inibem a atividade de enzimas e outros sistemas fisiológicos. A solubilidade dos componentes do sistema-tampão, também pode ser um fator limitante da concentração do tampão.

9.2.3. Escolha de uma Substância

O tamponamento sempre ocorre em torno do pKa. Por esse motivo, a escolha da substância para fazer o tampão é feita utilizando essa constante.

Para uma solução ser considerada tampão, a relação $[BC]/[AC]$ tem que estar no intervalo de 1/10 a 10/1. Em termos de pH, isso significa que uma substância apresenta capacidade de tamponar no intervalo correspondente a **uma unidade de pH abaixo do pKa até uma unidade de pH acima do pKa**.

Exemplo: Escolher uma substância para preparar um tampão pH = 8,0. Utilizar a equação de Henderson-Hasselbalch para encontrar o intervalo de valores de pKa de substâncias que podem ser utilizados para preparar o tampão.

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{BC}]}{[\text{AC}]} \longrightarrow 8,0 = \text{pKa} + \log \frac{1}{10}$$

$$\text{pKa} = 8,0 + 1,0 \longrightarrow \text{pKa} = 9,0$$

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{BC}]}{[\text{AC}]} \longrightarrow 8,0 = \text{pKa} + \log \frac{10}{1}$$

$$\text{pKa} = 8,0 - 1,0 \longrightarrow \text{pKa} = 7,0$$

Para preparar o tampão pH = 8,0, pode-se utilizar substâncias que apresentam valores de pKa no intervalo de 7,0 a 9,0. Entretanto, deve-se sempre preparar um tampão que seja mais eficiente (maior capacidade de tamponamento).

A eficiência de um tampão, como descrito acima, é avaliada por dois fatores principais: **a concentração** e **a relação [BC]/[AC]**.

1. Concentração: Quanto mais concentrado for o tampão maior será a capacidade de resistir a variação do pH. Entretanto, esse fator é limitante em função da solubilidade das substâncias e da inativação de proteínas com atividade biológica (enzimas) por um excesso de sais.

2. Relação [BC]/[AC]: a relação [BC]/[AC] deve ser sempre o mais próximo possível da unidade, ou seja, escolher sempre que possível, uma substância que tenha um valor de pKa igual ao pH desejado.

Na Tabela a seguir, relaciona-se o valor do pKa de algumas substâncias comumente utilizadas para preparar tampões em bioquímica.

Tabela de pKa

Substância	pK ₁	pK ₂	pK ₃	pK ₄
Ácido acético	4,7			
Cloreto de amônio	9,3			
Ácido carbônico	6,4	10,3		
Ácido cítrico	3,1	4,7	5,4	
Dietanolamina	8,9			
Etanolamina	9,5			
Ácido fumárico	3,0	4,5		
Glicina	2,3	9,6		
Glicilglicina	3,1	8,1		
Histidina	1,8	6,0	9,2	
Ácido maleico	2,0	6,3		
Ácido fosfórico	2,1	7,2	12,3	
Ácido pirofosfórico	0,9	2,0	6,7	9,4
Trietanolamina	7,8			
Tris (tri hidroximetil amino metano)	8,0			
Dietil barbiturato de sódio)	8,0			
Ácido etileno diamino tetracético	2,0	2,7	6,2	10,3

Exemplo 1: preparar um litro de tampão de acetato 0,1 M pH = 5,30.

O primeiro passo é determinar a relação entre a concentração de base conjugada (íon acetato) e do ácido conjugado (ácido acético) nessa solução-tampão. Ela é calculada pela equação de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{BC}]}{[\text{AC}]}$$

$$5,3 = 4,7 + \log \frac{[\text{BC}]}{[\text{AC}]}$$

$$\log \frac{[\text{BC}]}{[\text{AC}]} = 5,3 - 4,7$$

$$\log \frac{[\text{BC}]}{[\text{AC}]} = 0,60$$

$$\frac{[\text{BC}]}{[\text{AC}]} = \text{antilog } 0,60$$

$$\frac{[\text{BC}]}{[\text{AC}]} = \frac{4,0}{1}$$

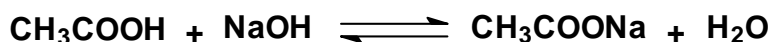
Nessa solução, haverá 4 partes de **base conjugada** para cada parte de **ácido conjugado** ou seja, 80% dos componentes da solução-tampão será de **base conjugada**.

Como um litro de tampão acetato 0,1 M conterà 0,1 mol de acetato e ácido acético combinados, haverá $0,80 \times 0,1$ ou 0,080 mols do íon acetato presente. Essa quantidade de íon de acetato encontra-se em 6,56 g de acetato de sódio.

Para o componente ácido conjugado haverá $0,20 \times 0,1$ ou 0,020 mols de ácido acético, ou seja, 1,20 g de ácido acético. Quando se mistura essa quantidade de ácido acético com o acetato de sódio e completa-se o volume para 1 litro, obtém-se uma solução-tampão com a concentração e o pH desejado.

É uma prática comum preparar-se uma mistura tampão partindo-se de um dos componentes do tampão desejado, obtendo-se outro componente pela adição de ácido ou base forte.

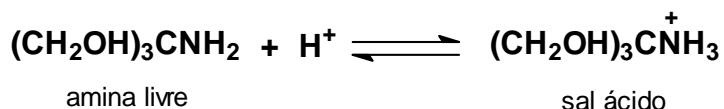
Exemplo 2: o mesmo tampão acima pode ser preparado somente a partir do ácido acético. A base conjugada é obtida reagindo o ácido com NaOH.



Calcular a quantidade de ácido acético para preparar 1000 mL da solução 0,1 M. Essa quantidade é 6,0 g ou 5,71 mL.

A relação [BC]/[AC] calculada no exemplo 1 acima é 4/1, portanto, 80% ou 0,08 M do ácido acético deverá ser convertido em acetato de sódio mediante adição de NaOH. Considerando uma solução de NaOH igual a 1M, serão gastos 80 mL dessa solução ($N.V = N'.V'$). O tampão estará pronto após conferir o pH em um phmetro.

Exemplo 3: preparar 500 mL de tampão Tris 0,5 M pH 7,4. A amina primária trihidroximetilaminometano, ou “Tris”, tem sido largamente usada como tampão em bioquímica. Essa amina reage com ácido para formar o sal da amina correspondente, que apresenta um pKa para a dissociação do sal ácido formado igual a 8,0.



A relação entre a concentração da base conjugada e do ácido conjugado nesse tampão será calculada pela equação de Henderson-Hasselbalch como no exemplo 1.

$$7,4 = 8,0 + \log \frac{[\text{amina livre}]}{[\text{sal ácido}]}$$

$$- 0,60 = \log \frac{[\text{amina livre}]}{[\text{sal ácido}]}$$

$$0,60 = \log \frac{[\text{sal ácido}]}{[\text{amina livre}]}$$

$$\text{antilog } 0,60 = \frac{[\text{sal ácido}]}{[\text{amina livre}]}$$

$$\frac{4,0}{1} = \frac{[\text{sal ácido}]}{[\text{amina livre}]}$$

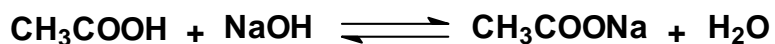
A partir desse cálculo, conclui-se que a composição desse tampão “Tris” será: 4/5 ou 80% da concentração do tampão de sal ácido e 1/5 ou 20% da concentração do tampão de amina livre. Como 500 mL de tampão 0,5 M contém 0,25 mols de “Tris” (sal ácido + amina livre), o tampão conterá 0,8 x 0,25 ou 0,2 moles de sal ácido e 0,2 x 0,25 ou 0,05 mols de amina livre.

Para preparar o tampão, pesa-se 0,25 mols (30,2 g) da amina sólida (PM = 121 g), adiciona-se 0,20 mols de HCl (200 mL de HCl 1 N) e completa-se o volume para 500 mL.

9.3. Trabalho Prático

Preparar 70 mL de tampão acetato 0,25 M pH = 4,7.

- Utilizar o ácido acético (ácido conjugado) (pka = 4,7).
- O outro componente do tampão (base conjugada) será obtida pela adição de NaOH 2N, de acordo com a reação:



O procedimento para preparar o tampão consistirá dos seguintes passos:

1. Calcular a massa do ácido acético necessária para preparar 70 mL de solução 0,25 M.
2. Calcular a relação [BC]/[AC] utilizando a equação de Henderson-Hasselbalch.
3. De acordo com a relação calculada, determinar a fração da concentração do ácido que deverá ser convertida em base conjugada com a adição do NaOH.
4. Calcular o volume de NaOH 2N necessária para neutralizar a fração da concentração calculada acima ($N \cdot V = N' \cdot V'$).
5. Misturar as soluções em béquer, conferir o pH em um pHmetro e completar o volume com água destilada.

Os tampões preparados serão guardados em geladeira para serem utilizados posteriormente.

10. COLORIMETRIA

10.1. Introdução

Colorimetria é um método instrumental utilizado para a determinação quantitativa de substâncias, por meio da absorção ou transmissão de luz por soluções coloridas.

Princípio da colorimetria: Uma solução quando iluminada por luz branca, apresenta uma cor que é resultante da absorção relativa de vários comprimentos de onda que compõem essa luz.

A absorção, em cada comprimento de onda por uma solução colorida depende: a) da natureza da substância, b) da sua concentração e c) do caminho ótico (espessura da solução que é atravessada pela luz).

A dependência da absorção de luz, em função da variação de concentração da substância colorida, constitui a base para os métodos de dosagem colorimétricos. Esta dependência é expressa quantitativamente pela equação de Lambert-Beer:

$$\log \frac{I}{I_0} = K C L \quad (1)$$

I_0 = intensidade da luz incidente

I = intensidade da luz emergente

C = concentração

L = caminho ótico

K = constante de proporcionalidade

A relação entre a luz emergente (**I**) e a luz incidente (**I₀**) é denominada de **transmitância (T)**.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

O logaritmo negativo da transmitância (T) é denominado de **absorbância (A)** ou **densidade ótica (D)**.

$$A = -(\log T) \quad (3)$$

Substituindo a equação 3 na equação 1 tem-se:

$$A = K C L \quad (4)$$

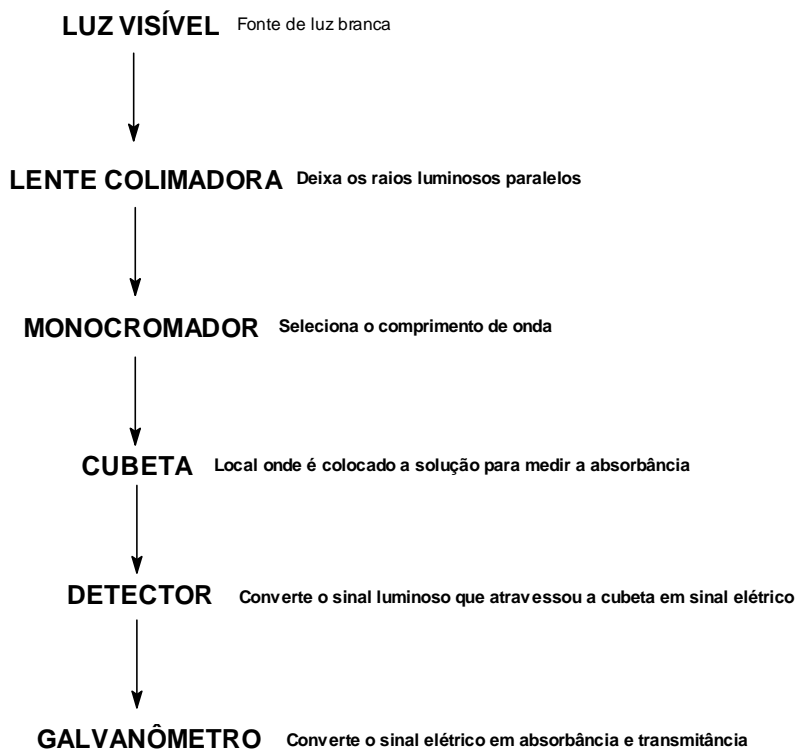
Considerando o caminho ótico igual a 1centímetro (caminho ótico da maioria das cubetas), a equação de Lambert-Beer fica:

$$A = K C \quad (5)$$

10.2. Espectrofotômetro

O espectrofotômetro é o equipamento que é utilizado para medir a absorbância e a transmitância de uma solução, em vários comprimentos de onda, permitindo a obtenção de um espectro que caracteriza a substância.

10.2.1. Esquema Geral de um Espectrofotômetro



10.2.2. Determinação da Absorbância

Pela própria definição de absorbância, sua determinação implica no conhecimento da intensidade da luz incidente e emergente. A medida absoluta da luz incidente apresenta dificuldades de ordem técnica. Para contornar essas dificuldades, considera-se **a luz incidente igual em intensidade a luz emergente de uma cubeta contendo apenas o solvente**. Utilizando este artifício, além de contornarem-se as dificuldades da medida da luz incidente, ficam também eliminadas as absorções de luz introduzidas pelas paredes da cubeta, bem como pelo solvente e suas impurezas.

A leitura da absorbância de uma solução colorida é feita como segue:

- Acerta-se a corrente de escuro (detector no escuro) de acordo com cada instrumento. (transmitância igual a 0 (zero) e absorbância igual a infinito (sem luz)).

- Escolher o comprimento de onda a ser utilizado, característico para cada cor da solução (seguir as instruções da metodologia ou fazer o espectro de absorção).
- Colocar no espectrofotômetro a cubeta contendo o solvente (que de agora em diante chamaremos de **BRANCO**); abrir a passagem de luz e ajustar o galvanômetro para que a leitura seja absorvância 0 (zero) ou transmitância 100 %.
- Retirar o branco e substituir pela cubeta contendo a solução colorida e fazer a leitura da absorvância e/ou da transmitância.

10.3. Validade da Lei de Lambert-Beer

Verifica-se na prática, que a Lei de Lambert-Beer não é rigorosamente aplicável em todos os casos. Interferem fatores dependentes da própria substância, bem como do equipamento de medida. Em vista desses fatores de interferência, torna-se conveniente que, para a determinação da concentração, obtenha-se experimentalmente uma curva de absorvância em função de várias concentrações de uma solução padrão, no lugar da determinação da constante de proporcionalidade da Lei de Lambert-Beer.

10.4. Escolha do Comprimento de Onda

Para uma melhor determinação colorimétrica da concentração de uma substância, deve-se na maioria dos casos, procurar **um comprimento de onda que proporcione uma maior variação de absorvância para uma determinada concentração**. Quando tem-se uma substância incolor, é possível realizar a sua dosagem colorimétrica, pela transformação estequiométrica dessa substância em outra substância colorida ou ainda, faz-se reagir com uma substância colorida que será consumida. A diminuição de absorvância do reagente colorido é um índice da concentração da substância a ser dosada.

10.5. Preparação da Curva Padrão

A curva padrão é preparada como descrito a seguir:

- Escolher um método de dosagem.
 - Prepara-se uma solução padrão com concentração rigorosamente conhecida.
 - Mede-se com pipetas de precisão, diferentes volumes dessa solução, completando-se com solvente para um volume final determinado.
-

- Calcule e anote a concentração de cada uma das amostras.
- Faça duplicatas dessas amostras e processe-as pelo método de dosagem.
- Um volume igual de solvente é processado pelo mesmo método, para servir de **branco** nesta dosagem (eliminando da leitura o erro causado pela absorção de luz pela cubeta, solvente, reagente e impurezas).
- Orientado pela indicação do método empregado escolher o comprimento de onda.
- Se as informações do método não permitirem a escolha, fazer o **espectro de absorção**, tomando a precaução de, ao mudar o comprimento de onda, ajustar a absorbância do branco em zero ou a transmitância em 100%.

10.5.1. Leitura no Espectrofotômetro

- Ligue o espectrofotômetro e acerte o zero de transmitância (corrente de escuro) de acordo com as indicações específicas do fabricante.
- Escolha o comprimento de onda.
- Coloque o branco na cubeta e introduza-a no espectrofotômetro e ajuste para que indique absorbância zero ou transmitância 100%.
- Retire o branco substituindo-o por outra cuba contendo sucessivamente os vários padrões de concentração.
- As absorbâncias correspondentes a cada concentração permitirão construir a curva padrão para este método.

Toda vez que os reagentes forem preparados deve ser verificada a validade da curva padrão, porque os reagentes podem alterar com o tempo.

10.6. Trabalho Prático

Construir uma **curva padrão de glicose** para ser utilizada posteriormente nos cálculos de atividade enzimática.

10.6.1. Curva Padrão de Glicose

Um dos procedimentos utilizados para a determinação de grupos redutores livres (de carboidratos), consiste em determinar a capacidade da amostra que contém o carboidrato de reduzir o **ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS)** em meio alcalino. A quantidade do açúcar redutor presente na solução é diretamente proporcional à quantidade de ácido 3-5 dinitrosalicílico reduzido que é então medido colorimetricamente.

10.6.1.1. Procedimento

- Preparar uma solução padrão de glicose com concentração igual a 0,5 mg/mL.
- Preparar a curva padrão colocando em uma série de tubos quantidades crescentes da solução padrão de glicose.
- Preparar o tubo branco que contém todos os reagentes exceto a glicose.
- Adicionar 0,4 mL da solução alcalina de ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) em cada tubo e agitar para misturar as soluções.
- Colocar os tubos simultaneamente em água em ebulição durante exatamente 5 minutos.
- Retirar simultaneamente todos os tubos e esfriar sob jato de água.
- Adicionar 1,0 ml de água destilada e agitar.
- Fazer a leitura da absorvância e da transmitância contra o branco utilizando o comprimento de onda 550 nanômetros.

TABELA

Tubos	Padrão de Glicose	Água	DNS	E	Água	550nm x B	
						T	A
1	0,05 mL	0,35mL	0,40mL	E	1,0mL		
2	0,10 “	0,30 “	“	B	“		
3	0,15 “	0,25 “	“	U	“		
4	0,20 “	0,20 “	“	L	“		
5	0,25 “	0,15 “	“	I	“		
6	0,30 “	0,10 “	“	Ç	“		
7	0,35 “	0,05 “	“	Ã	“		
8	0,40 “	0,00 “	“	O	“		
B	0,00 “	0,40 “	“	5'	“	100	0

- Construir a curva padrão em papel milimetrado colocando a concentração de glicose em **MICROMOL DE GLICOSE** na abscissa e a **ABSORVÂNCIA** na ordenada.
- Calcular a inclinação da curva padrão (K) para cada ponto, utilizando a equação de Lambert-Beer ($A=KC$), onde A é a absorvância e C a concentração de glicose em micromol.
- Calcular a **inclinação média** da curva padrão (somatória de cada inclinação dividido pelo número de pontos).

- Escrever a equação de Lambert-Beer utilizando o valor da inclinação média da curva padrão (K = constante de proporcionalidade) calculado.

9.7. Reagente de DNS

- Dissolver completamente 1g de ácido 3-5 dinitrosalicílico em 20 mL de NaOH 2N e 50 mL de água.
- Adicionar 30 g de tartarato de sódio e potássio e dissolver
- Completar o volume para 100 mL com água destilada. Filtrar em lã de vidro se necessário.
- Guardar em frasco escuro, protegendo a solução da luz e do CO_2 .

11. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA SACARASE DE FERMENTO

Considerando que as enzimas são proteínas, mudanças de pH afetarão profundamente o caráter iônico de seus grupos ionizáveis alterando, portanto, a sua conformação e seu o sítio catalítico. Além dos efeitos puramente iônicos, valores de pH muito baixo ou muito alto pode causar desnaturação e conseqüentemente inativação de uma enzima. Por esse motivo, no estudo das enzimas, é necessário determinar, no início da investigação, o pH ótimo de atividade enzimática.

O pH ótimo é o pH em que a enzima apresenta a sua maior atividade catalítica. A sua determinação é feita por meio da incubação da enzima com seu substrato em vários pHs.

11.1. Procedimento

O volume da reação tem que ser o mesmo da curva padrão de glicose, ou seja, 0,40 mL. Esse volume deverá ser distribuído entre a enzima, o substrato e o tampão (por exemplo: 0,2 mL de enzima, 0,1 mL de tampão e 0,1 mL de sacarose 0,1M preparada em água (substrato da sacarase).

- Pipetar em cada tubo de ensaio 0,2 mL do sobrenadante de fermento convenientemente diluído (diluição de aproximadamente 500 vezes).
 - Adicionar separadamente em cada tubo de ensaio 0,1 mL de tampão com os seguintes pH: 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0.
-

- Adicionar em cada tubo de ensaio 0,1 mL de sacarose 0,1M preparada em água o mais rápido possível.
- Agitar os tubos e colocar em banho-maria à temperatura de 30 °C durante 20 minutos.
- Após a incubação parar a reação adicionando 0,4 mL da solução de ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS). Essa solução é alcalina e desnatura a sacarase.
- Fazer um tubo controle (tempo zero) utilizando qualquer tampão a fim de determinar uma possível contaminação dos reagentes. Para não haver reação enzimática, inverter a ordem das soluções: colocar primeiro a enzima, o DNS (para desnaturar a enzima) e depois o substrato e o tampão.
- Agitar todos os tubos (branco, ensaio e controle) e colocá-los simultaneamente em água em ebulição durante 5 minutos para ocorrer a reação entre os açúcares redutores e o DNS.
- Retirar simultaneamente todos os tubos da ebulição, esfriar e adicionar 1,0 mL de água e agitar.
- Fazer a leitura da transmitância a 550 nanômetros (nm) calibrando o espectrofotômetro com o tubo branco.
- Subtrair a leitura do tubo controle de todas as absorbâncias.
- Calcular a porcentagem de atividade para cada pH. Considerar a maior absorbância igual a 100%.
- Fazer o gráfico em papel milimetrado, colocando o pH na abcissa e a porcentagem de atividade na ordenada.

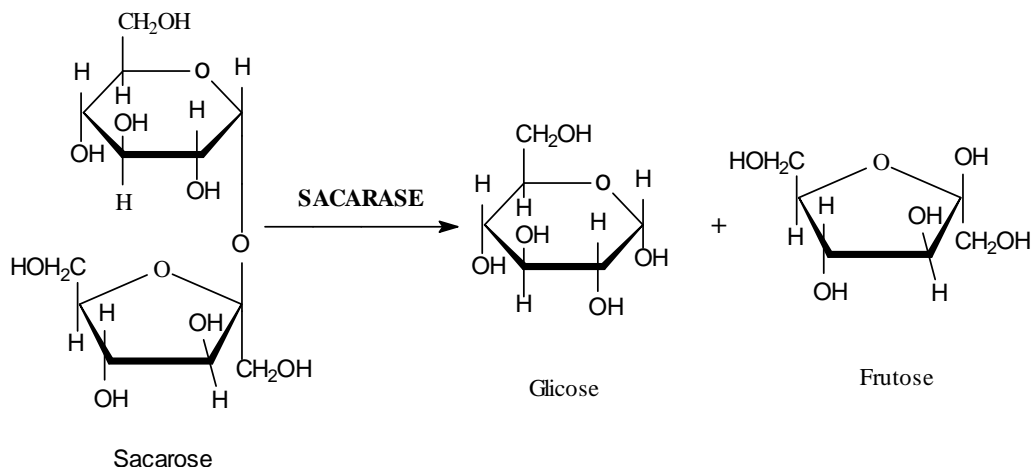
TABELA

Tubos	Enzima mL	Tampão		Substrato mL	Tempo Min.	DNS mL		Água mL	550 nm x B		
		Vol	pH						Trans	Abs	
1	0,2	0,1	3	0,1	20	0,4	E	1,0			
2	“	“	3,5	“	“	“	B	“			
3	“	“	4	“	“	“	U	“			
4	“	“	4,5	“	“	“	L	“			
5	“	“	5	“	“	“	I	“			
6	“	“	5,5	“	“	“	Ç	“			
7	“	“	6	“	“	“	Ã	“			
8	“	“	6,5	“	“	“	O	“			
9	“	“	7	“	“	“		“			
10	“	“	QQ	“		“	5'	“			
B		0,4 mL de água						“		100	0

12. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE (VELOCIDADE) DA SACARASE DE FERMENTO

12.1. Introdução

A sacarase é uma enzima que atua sobre o dissacarídeo sacarose hidrolisando-o em 2 monossacarídeos: glicose e frutose.



A sacarase apresenta vários sinônimos. Ela pode ser denominada invertase, em função da inversão da rotação ótica ocorrida durante a hidrólise da sacarose (a sacarose é destrógera e a mistura equimolecular de glicose e frutose é levógera). A sacarase pode ser denominada de beta - frutosidase ou ainda alfa - glicosidase; esses dois últimos nomes descrevem melhor a atividade de hidrólise da sacarase sobre a sacarose.

A atividade enzimática ou velocidade de reação enzimática é definida como sendo a quantidade de produto formado (em micromol), durante um tempo de 1 (um) minuto de reação. Como esse tempo é muito pequeno para qualquer manuseio dos tubos de ensaios no laboratório, normalmente trabalha-se com tempos maiores (arbitrários) e, por meio de cálculos, expressa-se a velocidade de reação por minuto.

A determinação da velocidade de reação enzimática “in vitro” é realizada fazendo a incubação da enzima juntamente com seu substrato, após a padronização de alguns pré-requisitos.

12.2. Trabalho Prático

Determinar a atividade enzimática (velocidade) da sacarase em duas temperaturas (temperatura ambiente da água e banho-maria a 37 °C), utilizando como fonte de enzima o sobrenadante de fermento.

12.2.1. Pré-Requisitos

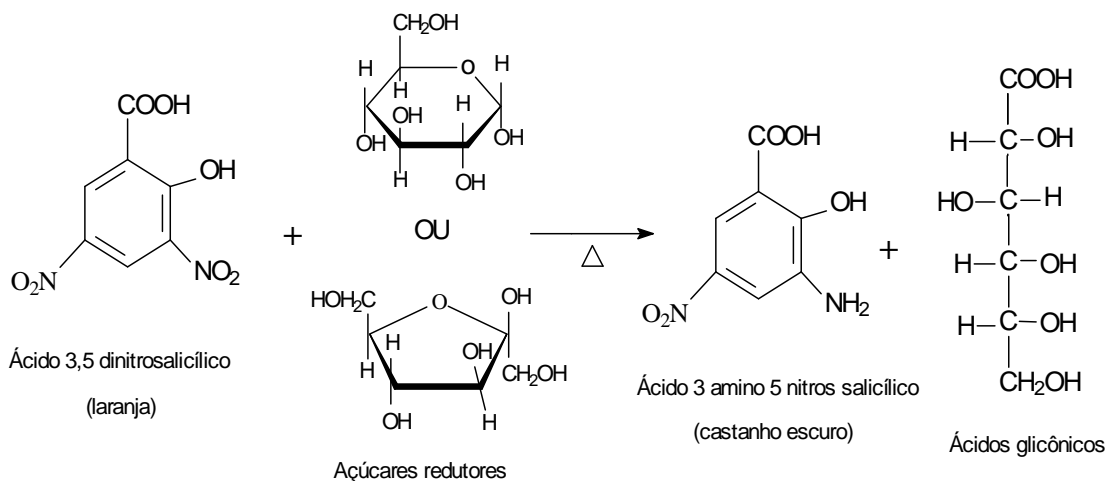
- 1. Volume de Reação:** o volume da reação deve ser igual ao volume da curva padrão (trabalho prático 9) para permitir os cálculos da velocidade.
- 2. Diluição da Enzima e Tempo de Reação:** o tempo de reação é determinado por tentativas (tempos arbitrários) em função da diluição da enzima, a fim de se obter uma leitura compatível com a metodologia e com o instrumento de dosagem utilizado (espectrofotômetro).
- 3. pH da Reação:** a determinação da velocidade deve ser realizada em um meio tamponado, no pH ótimo de atividade da enzima. Normalmente, o substrato é dissolvido no sistema tampão.
- 4. Temperatura de Reação:** a temperatura de reação padronizada internacionalmente é de 30 °C. Entretanto, a velocidade pode ser determinada a qualquer temperatura, desde que a enzima seja estável (não ocorra a desnaturação).
- 5. Interrupção da Reação:** terminado o tempo, a reação é interrompida provocando a desnaturação da enzima. A desnaturação pode ser realizada por calor, extremos de pH ou inibição. Na aula prática, a reação será interrompida por pH adicionando o reagente de DNS que é uma solução alcalina (pH aproximadamente 12).
- 6. Quantificação do Produto Formado:** o produto da reação (glicose e frutose) será quantificado pela metodologia do **DNS**. Utilizar a curva padrão preparada no trabalho prático 9.

Observação: quando se trabalha com extratos brutos de organismos vivos, que muitas vezes podem apresentar cor (exemplo: extrato da parte aérea de plantas), o ensaio enzimático deve ser realizado em vários tempos (curva de tempo) e a velocidade enzimática calculada a partir da tangente da reta (inclinação da reta) obtida do gráfico: **absorbância x tempo**.

12.2.2. Procedimento

Os tubos de ensaios, onde será colocado a enzima (sobrenadante de fermento), devem ser mantidos em banho de gelo até iniciar a reação à temperatura desejada.

- Pipetar em 8 (oito) tubos de ensaio, 0,2 mL da enzima (sobrenadante de fermento) convenientemente diluída.
- Adicionar em cada tubo 0,2 mL de substrato (solução de sacarose 0,1 M pH 4,7 preparada em tampão acetato 0,25 M) o mais rápido possível. Agitar os tubos e colocar para incubar em banho-maria.
- Os tubos de 1 a 4 serão incubados à temperatura ambiente da água (medir a temperatura com o termômetro) e os tubos de 5 a 8 serão incubados à temperatura de 37 °C (conferir a temperatura da água com o termômetro).
- Após cada tempo interromper a reação adicionando 0,4 mL da solução alcalina de ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS).
- Após interromper a reação em todos os tubos colocá-los simultaneamente em água em ebulição durante exatamente 5 (cinco) minutos, para promover a reação entre a glicose e a frutose (açúcares redutores) formada durante o ensaio enzimático e o reagente de DNS.



- Retirar simultaneamente todos os tubos da ebulição, esfriar e adicionar 1,0 mL de água destilada.
- Agitar e fazer a leitura da transmitância a 550 nanômetros (nm), calibrando o espectrofotômetro com o tubo branco.

TABELA

Tubos	Enzima mL	Subst. mL	Tempo Min.	Temp. °C	DNS mL		Água mL	550 nm x B	
								T	A
1	0,2	0,2	5	20	0,4	E	1,0		
2	“	“	10	“	“	B	“		
3	“	“	15	“	“	U	“		
4	“	“	20	“	“	L	“		
5	0,2	0,2	5	40	0,4	I	1,0		
6	“	“	10	“	“	Ç	“		
7	“	“	15	“	“	Ã	“		
8	“	“	20	“	“	O	“		
B	0,4 mL de água				“	5'	“	100	0

12.2.3. Cálculos

A partir dos dados da tabela, calcular a inclinação média da reta da seguinte forma:

- Fazer o gráfico em papel milimetrado para cada temperatura, colocando o tempo em minutos na abcissa e a absorbância na ordenada.
- Calcular a inclinação (**a**) para cada tempo usando a equação da reta em que: **Y** é a absorbância, **X** é o tempo e **b** é o intercepto da reta com a ordenada (determinar **b** pelo gráfico).

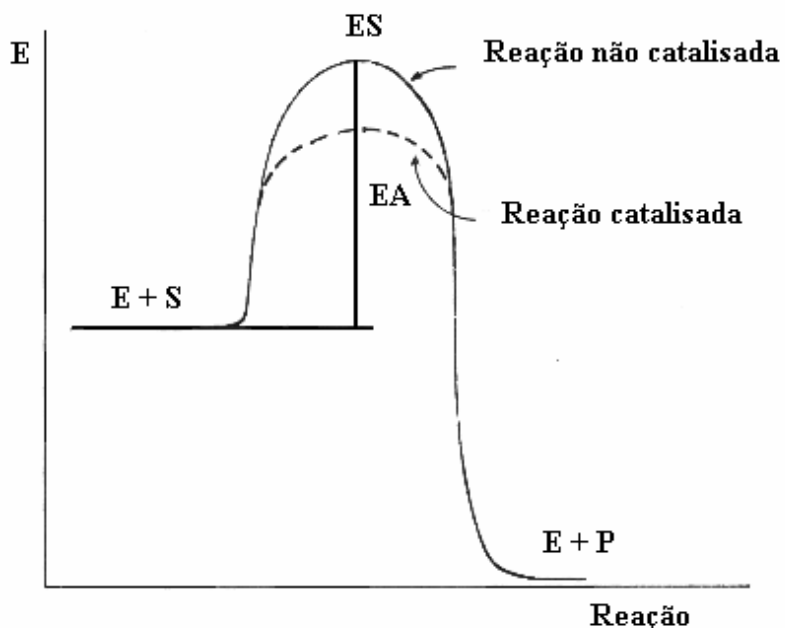
$$Y = aX + b$$

- Calcular a **inclinação média** da reta por meio da somatória da inclinação de cada tempo dividida pelo número de tempo. O valor da inclinação média equivale a absorbância obtida em um minuto de reação (absorbância por minuto).
- A partir dos dados da curva padrão de glicose (**Trabalho Prático 9**) e da inclinação média da reta calculada no item anterior (absorbância / minuto), calcular a quantidade de açúcar redutor (glicose e frutose) produzido por minuto na reação enzimática utilizando a equação de Lambert-Beer **A = KC**.
- Calcular a atividade enzimática (velocidade) em **unidades por mililitro** da preparação original (sem diluir). **Uma unidade de atividade é igual a 1 micromol de produto formado por minuto.**

13. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA SACARASE

13.1. Introdução

As reações químicas somente ocorrerão se os reagentes apresentarem energia suficiente para abalar a sua estabilidade. Este excesso de energia necessário para que uma reação tenha início é denominado de energia de ativação.



Observando o gráfico, nota-se que as moléculas dos reagentes encontram-se em um nível energético estável. Oferecendo-se a elas uma energia adicional (energia de ativação) as moléculas passam para um estado energético mais elevado denominado de estado de transição, quando apresentam energia suficiente para reagirem-se e formar os produtos. Se o nível energético dos produtos for maior que o nível energético dos reagentes, a energia de ativação não será totalmente recuperada e portanto, diz-se que a reação é endergônica; ao contrário, se o nível energético dos produtos for menor que dos reagentes, a energia de ativação será totalmente recuperada e ainda, uma fração de energia (ΔG) será liberada caracterizando uma reação exergônica. A energia de ativação é necessária apenas para que a reação ocorra, sendo recuperada total ou parcialmente após o término da reação.

A energia de ativação de uma reação pode ser facilmente calculada a partir da equação de Arrhenius.

$$\log Q = \frac{-E}{2,3R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right)$$

- E = energia de ativação
- R = constante dos gases (1,98 cal.Mol/K)
- T₁ e T₂ = temperaturas absolutas (Kelvin)
- T₁ = temperatura menor
- T₂ = temperatura maior
- Q = V₂/V₁ = coeficiente de temperatura
- V₁ = velocidade enzimática na temperatura menor
- V₂ = velocidade enzimática na temperatura maior

A relação Q = V₂/V₁ só é válida quando a reação for de ordem zero, ou seja, a concentração de substrato for elevada.

A energia de ativação é calculada (utilizando a equação de Arrhenius) a partir das velocidades de reação enzimática determinadas em duas temperaturas.

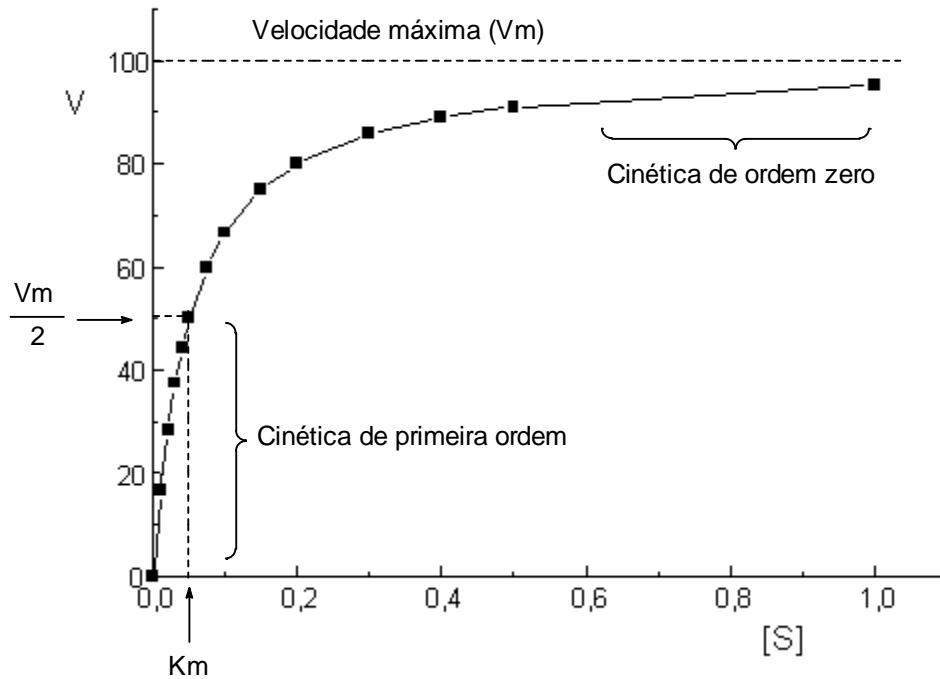
13.2. Trabalho Prático

Calcular a energia de ativação da sacarase utilizando as atividades enzimáticas determinadas no trabalho prático 11 “Determinação da Atividade da Sacarase de Fermento” e a equação de Arrhenius acima.

14. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE DA SACARASE DE FERMENTO

14.1. Introdução

Em uma reação catalisada por uma enzima (com uma concentração fixa de enzima), um aumento na concentração de substrato resultará, inicialmente, em um rápido aumento da velocidade da reação. Entretanto, com o aumento da concentração de substrato o aumento da velocidade de reação começa a diminuir até que, com uma alta concentração de substrato, a velocidade de reação tende a estabilizar-se.



Michaelis & Menten (1913), propuseram que uma reação catalisada por uma enzima em concentrações variáveis de substrato apresenta duas fases.

- Fase 1 - em baixas concentrações de substrato, o sítio ativo da enzima não está saturado pelo substrato, e a velocidade enzimática varia com a variação da concentração do substrato.
- Fase 2 - À medida que a concentração do substrato aumenta, os sítios ativos da enzima são preenchidos em maior quantidade, até que na saturação nenhum sítio esteja disponível. A enzima está trabalhando com sua capacidade máxima e a atividade enzimática não varia com a variação da concentração do substrato. A equação matemática que define a relação quantitativa entre a velocidade de uma reação enzimática e a concentração do substrato é denominada equação de Michaelis-Menten.

$$v = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

- v = velocidade de reação a uma dada concentração de substrato.
- V_m = velocidade máxima de reação a uma concentração saturante de substrato.
- $[S]$ = concentração de substrato
- K_m = constante de Michaelis-Menten.

Conceito de K_m : É uma concentração de substrato que corresponde a metade da velocidade máxima de reação.

14.2. Determinação do K_m e do V_m

O K_m e o V_m de uma determinada enzima podem ser facilmente determinados a partir das velocidades de reação obtidas a partir de diferentes concentrações de substrato. Entretanto, a utilização do gráfico de Michaelis-Menten acima, não permite uma determinação exata do valor do K_m e do V_m por isso, é necessário transformar a equação de Michaelis-Menten.

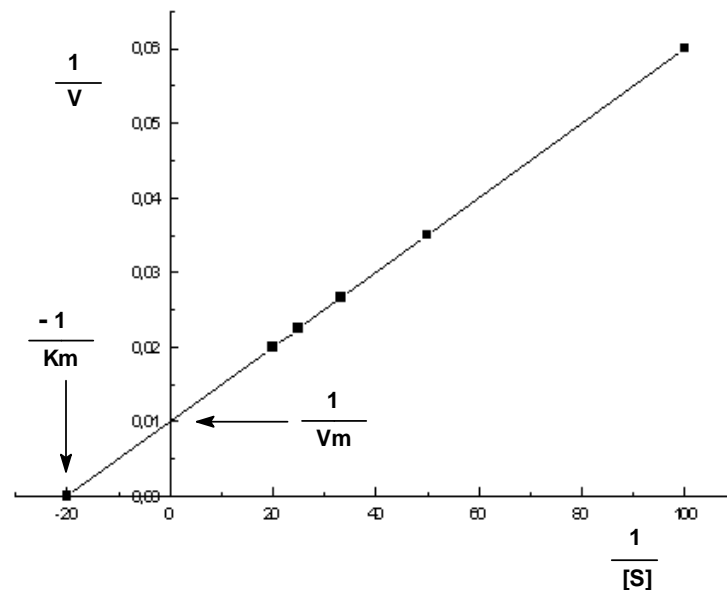
14.2.1. Transformação de Lineweaver – Burk

Um procedimento muito simples para a determinação gráfica do K_m e do V_m , consiste em fazer a transformação de Lineweaver-Burk. Essa transformação consiste em fazer os inversos de cada lado da equação de Michaelis-Menten com o objetivo de converter a hipérbole do gráfico de Michaelis-Menten em uma reta.

$$v = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} \longrightarrow \frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_m \cdot [S]}$$

$$= \frac{K_m}{V_m \cdot [S]} + \frac{[S]}{V_m \cdot [S]} \longrightarrow \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

Fazendo um gráfico colocando $1/v$ na ordenada e $1/[S]$ na abscissa tem-se uma reta (equação $Y = ax + b$) com o intercepto na ordenada igual a $1/V_m$, a inclinação igual a K_m/V_m e o intercepto com a abscissa, resultante do prolongamento da reta, igual a $-1/K_m$.



14.3. Trabalho Prático

Determinar o K_m e o V_m da sacarase de fermento utilizando a transformação de Lineweaver - Burk. A determinação é feita fazendo a reação da enzima com várias concentrações de substrato.

14.3.1. Procedimento

- Preparar um série de 7 tubos de ensaios e adicionar em cada tubo 0,2 mL de sobrenadante de fermento (sacarase) convenientemente diluído.
- Adicionar mais rápido possível 0,2 mL das seguintes soluções de sacarose preparada em tampão acetato 0,25 M pH 4,7: 0,02 M; 0,03 M; 0,04 M; 0,05 M; 0,06 M; 0,08 M e 0,10 M.
- Incubar os tubos em banho-maria a 30 °C durante 20 minutos.
- Interromper a reação adicionando 0,4 mL de DNS.
- Colocar os tubos simultaneamente em água em ebulição durante exatamente 5 minutos.
- Retirar simultaneamente todos os tubos da ebulição, esfriar e adicionar 1,0 mL de água destilada.
- Fazer a leitura da transmitância a 550 nanômetros (nm), zerando o espectrofotômetro com o tubo branco.

Observação: Para determinar o K_m e o V_m sem fazer uma curva de tempo (quatro tempos) para cada concentração de substrato, deve-se fazer pelo menos o tempo ZERO MINUTOS para cada concentração de substrato.

- **Tempo zero:** adicionar a enzima, o DNS (para desnaturar a enzima) e posteriormente o substrato.

TABELA

Tubos	Enzima mL	Substrato		Tempo Min.	DNS mL		Água mL	550nm x B		
		[M]	mL					Trans	Abs	
1	0.2	0,02	0,2	20	0,4	E	1,0			
2	“	0,03	“	“	“	B	“			
3	“	0,04	“	“	“	U	“			
4	“	0,05	“	“	“	L	“			
5	“	0,06	“	“	“	I	“			
6	“	0,08	“	“	“	C	“			
7	“	0,10	“	“	“	Á	“			
B		0,4 mL de água					O		100	0

- Fazer o gráfico em papel milimetrado colocando a absorbância na ordenada e o tempo na abscissa para cada concentração de substrato.
- Calcular a absorbância por minuto (inclinação) utilizando a equação da reta.
- Calcular a atividade enzimática (velocidade) para cada concentração de substrato utilizando a curva padrão de glicose.
- Fazer o gráfico de Michaelis-Menten em papel milimetrado colocando a concentração do substrato na abscissa e a atividade enzimática na ordenada.
- Fazer o gráfico de Lineweaver-Burk (gráfico dos duplos recíprocos) em papel milimetrado colocando o inverso da concentração do substrato na abscissa e o inverso da atividade enzimática na ordenada.
- Calcular a inclinação da reta (K_m/V_m) do gráfico anterior, para cada concentração de substrato, utilizando a equação da reta.
- Determinar o V_m de acordo com o valor do intercepto da reta com a ordenada ($1/V_m$).
- Determinar o K_m de acordo com o valor do intercepto do prolongamento da reta com a abscissa ($-1/K_m$).

15. INIBIÇÃO DO CICLO DE KREBS

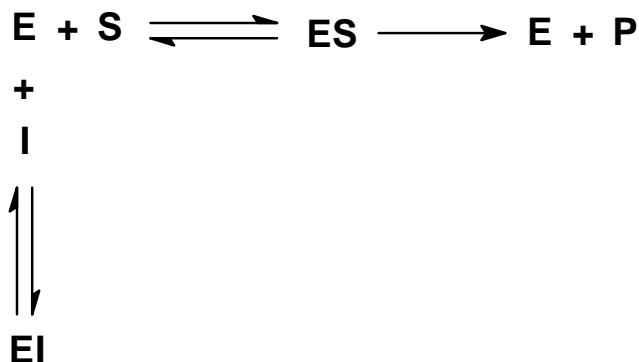
15.1. Introdução

Certos compostos têm a capacidade de combinar com as enzimas, mas não servem como substratos e, portanto, bloqueiam a catálise dessas enzimas. Esses compostos são denominados inibidores.

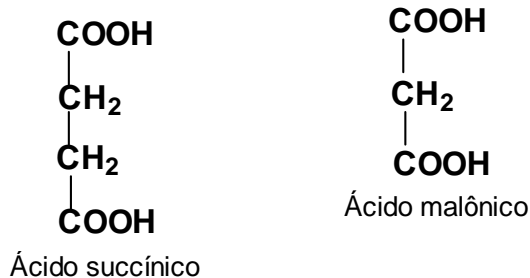
No estudo dos inibidores tem-se obtido informações valiosas a respeito das enzimas, tais como especificidade pelo substrato, natureza dos grupos funcionais no sítio ativo, mecanismo da atividade catalítica, etc.

A inibição do ciclo de Krebs pode ser realizada inibindo qualquer uma das enzimas pertencentes ao ciclo. Entretanto, por motivos históricos, dois pontos de inibição são característicos: a **ACONITASE** inibida pelo **FLÚOR CITRATO** e a **SUCCINATO DESIDROGENASE** inibida pelo **ÁCIDO MALÔNICO**. A inibição da succinato desidrogenase será utilizada para demonstrar a inibição do ciclo de Krebs.

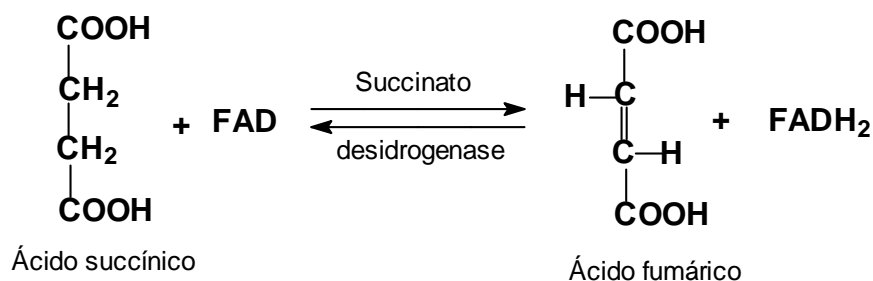
Quando um composto compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima e reduz a atividade catalítica dessa enzima, o composto é denominado inibidor competitivo. Um exemplo característico de inibição competitiva, é a inibição da enzima **succinato desidrogenase** por **ácido malônico**, que tem uma estrutura semelhante ao substrato (o ácido succínico) ligando-se, portanto, no sítio ativo da enzima. Por isso, uma parte da enzima vai reagir com o inibidor, formando o complexo EI, segundo o esquema abaixo.



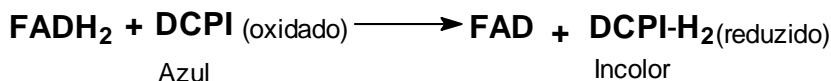
15.2. Estruturas



15.3. Reação



Para a determinação da atividade enzimática, o FADH_2 produzido será medido colorimetricamente mediante redução do composto diclorofenolindofenol (DCPI).



Para que essa reação ocorra em sua totalidade, é necessária a inibição da cadeia de transporte de elétrons (impedir a oxidação do FADH_2 pelo oxigênio). Essa inibição é feita por meio da adição de ácido cianídrico (KCN) no meio de reação (ver substratos 1 e 2).

15.4. Obtenção da Enzima

Preparar um homogeneizado de fígado fresco (fígado de frango), em liquidificador, utilizando um fígado para 100 mL de solução de sacarose 0,25M em tampão fosfato 0,05M pH 7,4.

Após a homogeneização (30 segundos a 4 °C) filtrar o homogeneizado em gaze dobrada (4 folhas) para eliminar pedaços de tecidos não homogeneizados.

O filtrado é então centrifugado a 3.300 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante é descartado e o sedimento enriquecido com mitocôndrias será utilizado como fonte de succinato desidrogenase.

15.5. Trabalho Prático

O trabalho prático consiste em determinar a atividade da succinato desidrogenase na presença de ácido malônico (substrato 2) e na ausência de ácido malônico (substrato 1).

Analisar também a ordem de grandeza (maior, menor ou igual) do K_m e do K_i trabalhando com concentrações de substrato e inibidor iguais.

15.6. Procedimento

- Adicionar em 4 tubos de ensaios 0,2 mL de enzima (sedimento de fígado) convenientemente diluída.
- Adicionar 1,7 mL do substrato 1 (ver abaixo) no tubo 2 e 1,7 mL do substrato 2 (ver abaixo) no tubo 4 o mais rápido possível.
- Agitar os tubos e colocar para incubar em banho-maria a 30 °C durante 10 minutos.
- Após a incubação adicionar 0,2 mL de ácido malônico 0,3M pH 7,4 em todos os tubos para interromper a reação da succinato desidrogenase que está ocorrendo nos tubos 2 e 4 e inibir a enzima presente nos tubos 1 e 3.
- Adicionar 1,7 mL do substrato 1 no tubo 1 e 1,7 mL do substrato 2 no tubo 3 (nos tubos 1 e 3 não haverá reação porque a enzima já foi inibida).
- Fazer a leitura da absorbância a 630 nanômetros zerando o espectrofotômetro com água.

TABELA

Tubos	Enzima mL	Substrato 1 mL	Substrato 2 mL	Tempo Min.	A 630nm x água
1	0,2	1,7	--	0	
2	"	1,7	--	10	
3	0,2	--	1,7	0	
4	"	--	1,7	10	

- Fazer o gráfico em papel milimetrado colocando a absorbância na ordenada e o tempo na abscissa.
- Calcular a inclinação da reta (absorbância por minuto) para os substratos 1 e 2, utilizando a equação da reta.
- Como não foi feita uma curva padrão para o sistema de reação acima (redução do DCPI) não é possível calcular a atividade da succinato desidrogenase.
- Para calcular a porcentagem de succinato desidrogenase que foi inibida no substrato 2, considerar a inclinação da reta com o substrato 1 (na ausência de inibidor), como 100% de atividade.

15.7. Substratos

Substrato 1:

- 8,5 mL de água
- 5,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4
- 1,0 mL succinato de sódio 0,1 M preparado em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4.
- 0,5 mL KCN 0,05 M preparado em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4.
- 2,0 mL de DCPI 0,0004 M preparado em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4.

Substrato 2:

- 7,5 mL de água.
 - 5,0 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,4.
 - 1,0 mL succinato de sódio 0,1 M preparado em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4.
 - 1,0 mL ácido malônico 0,1M preparado em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4.
 - 0,5 mL KCN 0,05 M preparado em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4.
 - 2,0 mL de DCPI 0,0004 M preparado em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4.
-

16. BIBLIOGRAFIAS CONSULTADAS

ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

BAUM, S. J.; BOWEN, W. R. **Exercises in organic and biological chemistry**. New York: Macmillan, 1972. 228 p.

CLARK, J. M. **Bioquímica experimental**. Zaragoza: Acribia, 1966. 287 p.

COELHO, A. P. **Práticas de bioquímica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1979. 204 p.

CONN, E. E.; STUMPF, P. K. **Introdução à bioquímica**. 4. ed. São Paulo: E. Blucher, 1980. 525 p.

COOPER, T. G. **The tools of biochemistry**. New York: J. Wiley & Sons, 1977. 423 p.

GORNALL, G. A.; BARDAWILL, J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 177, p. 751-766, 1949.

GUIA dos trabalhos práticos de bioquímica. Belo Horizonte: UFMG, [199_]. 45 p.

LITWACK, G. **Experimental biochemistry**: a laboratory manual. 3. ed. New York: J. Wiley & Sons, 1964. 313 p.

NOELTING, G.; BERNFELD, P. Sur les enzymes amylolytiques: III la beta amylase: dosage d'activité et controle de l'absence d'alfa amylase. **Helvetica Chemica Acta**, Basel, v. 31, p. 286-290, 1948.

PERRIN, D. D.; DEMPSEY, B. **Buffers for pH and metal ion control**. London: Chapman and Hall, 1974. 176 p.

RAW, I.; COLLI, W. **Fundamentos de bioquímica**. Brasília, DF: UnB, 1965. 133 p.

RENDINA, G. **Experimental methods in modern biochemistry**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1971. 333 p.

SANTOS, C. D. Fisiologia e bioquímica da digestão em *Erinnyis_ello* (Lepidoptera: Sphingidae). 1985. 178 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

SMITH, I.; FEINBERG, J. G. Paper & thin layer chromatography and electrophoresis. 2. ed. Glasgow: Bell and Bain LTD, 1965. 241 p.
