

Apostila de Aulas Práticas de Bioquímica:

estrutura, propriedades e funções de

Biomoléculas para o BC&T

**Guia de Normas e Experimentos
3º quadrimestre/2016**

Coordenação: Profa. Dra. Iseli Lourenço Nantes

Equipe de elaboração: Adrianne M.M. Brito e Juliana Casares Araujo-Chaves

Autores: Núcleo Docente da UFABC

2016

Sumário

AULA	CONTEÚDO
Introdução	Apresentação e Disposições Gerais do Curso Experimental
Experimento 1	Água: propriedades físico-químicas relacionadas à sua estrutura e polaridade
Experimento 2	Espectrofotometria: Conceitos e Aplicações
Experimento 3	Propriedades ácido-base das proteínas e seus efeitos sobre a solubilidade das mesmas: Aplicação na purificação de proteínas.
Experimento 4	Propriedades de surfactantes e lipídios
Experimento 5	Açúcares para biologia e materiais avançados.
Experimento 6	Enzima : Catálise enzimática modulada por nanopartículas metálicas

Apresentação e Disposições Gerais do Curso Experimental

APRESENTAÇÃO

A disciplina **Bioquímica: Estrutura, Propriedades e Funções de Biomoléculas** é composta por aulas **expositivas** em sala de aula (3 horas semanais), por **aulas práticas** nos laboratórios didáticos (2 horas semanais) e atividades de estudo e resolução de problemas pelos alunos, em casa (6 horas semanais). Este guia traz ao estudante o conteúdo das aulas práticas, com introdução, objetivos, procedimentos e normas que regem a execução destas atividades.

OBJETIVOS E COMPETÊNCIAS

Os módulos práticos desta disciplina têm como objetivo apresentar uma sequência de experimentos que permitirá ao aluno identificar aspectos estruturais, funcionais e de reatividade da água, proteínas, açúcares, lipídeos incluindo surfactantes naturais e sintéticos, e enzimas. O aluno deverá correlacionar as estruturas com diferentes propriedades biológicas e de potencial aplicação em novos materiais e tecnologias. Dentre essas propriedades citamos: formação de agregados supramoleculares, tais como micelas e lipossomos, síntese e estabilização de nanopartículas, participação em reações de óxido-redução, propriedades catalíticas como enzimas e coenzimas, propriedades de captação de energia luminosa, propriedades de conversão de energia. Dentre as aplicações em diferentes ramos do conhecimento destacamos o uso ou participação de biomoléculas e seus miméticos em: controle de pH em diferentes meios incluindo o biológico, transporte através das membranas biológicas, desenvolvimento e terapia de doenças degenerativas, nutrição, carreamento de fármacos, produção de polímeros químico, foto e biodegradáveis, biocélulas a combustível, células solares, processos de remediação de danos ambientais, entre outros.

Espera-se que, após a realização das aulas práticas, o aluno seja capaz de compreender os conceitos fundamentais da Bioquímica, fazendo a conexão entre o macroscópico, acessível aos nossos sentidos, e os eventos que ocorrem em escala molecular.

AULAS PRÁTICAS

Existem **normas de segurança** para o trabalho em laboratório que **devem ser seguidas e respeitadas**. Um conjunto destas normas será entregue ao aluno no início das aulas de laboratório juntamente com um termo de compromisso (caso não o tenha recebido em disciplina anterior) no qual o aluno se compromete a ler e seguir as mesmas. Todos os trabalhos em laboratório serão realizados por **equipes de no máximo 5 alunos**. Espera-se que os resultados obtidos sejam obra de um esforço conjunto e que todos os componentes estejam presentes na hora marcada para o início das aulas. Haverá uma tolerância de 10 minutos e após esse tempo os alunos retardatários não poderão realizar as atividades do dia. A aula será encerrada no horário pré-

estabelecido, não havendo prorrogação para os alunos que não tenham concluído os experimentos dentro do prazo previsto por motivos alheios à prática.

IMPORTANTE: Não haverá reposição de experimentos no caso de falta, ficando o aluno prejudicado com o aprendizado daquele conteúdo.

AVALIAÇÃO

Para a **avaliação das atividades práticas**, será utilizado o conteúdo do **caderno de laboratório** elaborado individualmente pelo aluno sobre cada experimento. O aluno deverá fazer um **pré-relatório** no caderno anteriormente a aula em questão e utilizá-lo para as anotações durante a aula, bem como as anotações referentes à discussão dos resultados obtidos. Esse caderno deve ser apenas manuscrito e não poderá conter cópia xerográfica do caderno dos colegas ou de qualquer outro material. **O aluno não poderá participar, em hipótese alguma, da aula prática sem o caderno de laboratório contendo o pré-relatório.** O aprendizado na disciplina de Bioquímica: estrutura, propriedade e funções de Biomoléculas será avaliado continuamente ao longo da disciplina pelo acompanhamento direto do docente e também ao final por meio de provas teóricas e práticas. O componente da teoria da nota final terá peso 7 e o prático, peso 3. A prova prática envolverá a execução de experimentos no laboratório e resposta a questões propostas durante a execução.

Alunos com rendimento igual ou superior a 86% obterão conceito A; com rendimento entre 70 e 85%, conceito B; com rendimento entre 56 e 70%, conceito C; de 50 a 55%, conceito D e rendimento inferior a 50% com conceito F. **O aluno reprovado (conceito F) poderá fazer EXAME com o conteúdo todo do quadrimestre, cuja nota constituirá uma nova média aritmética com a média quadrimestral obtida previamente para chegar em seu conceito final.**

RECOMENDAÇÕES PARA AS AULAS EXPERIMENTAIS

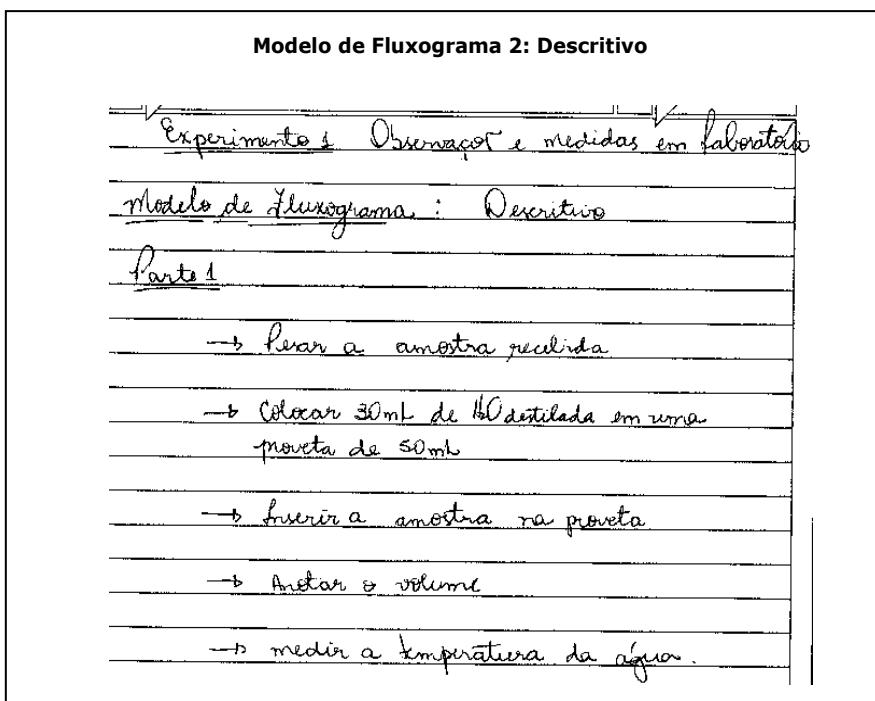
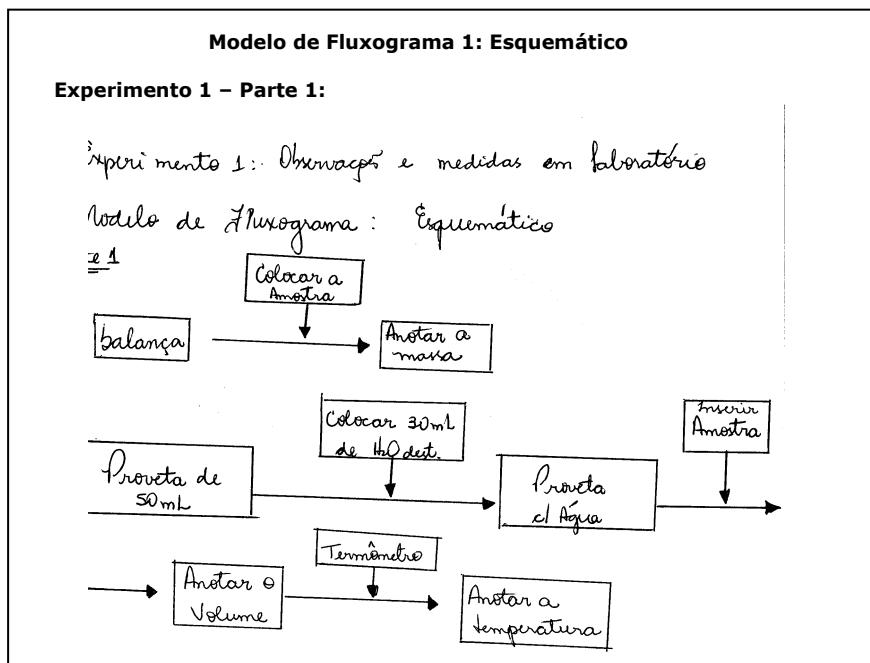
1. É obrigatório o uso de avental (jaleco) no laboratório; o mesmo deve ser comprido, de mangas compridas e ser usado fechado (com os botões fechados);
2. Não será permitido fazer a aula de laboratório usando sandálias, bermudas, shorts ou saia;
3. Não é permitida a execução da aula de Transformações Bioquímicas de boné, óculos escuros nos olhos ou na cabeça e fones de ouvido;
4. É proibido comer ou beber no laboratório;
5. Proibido o uso de telefone celular durante as aulas de Transformações Bioquímicas;
5. Cabelos compridos devem estar devidamente presos;
5. No dia da aula experimental todos devem apresentar um fluxograma individual (**PRÉ-RELATÓRIO**) e feito à mão no caderno de laboratório para dar início à aula, sendo que o mesmo poderá ser utilizado durante a execução do experimento;

5. Evitar ao máximo faltar ou chegar atrasado às aulas práticas para não ser prejudicado;

6. O aluno que faltou em aula prática terá prejuízo no componente da parte prática da nota e nos seus conhecimentos daquele tópico, uma vez que não há possibilidade de reposição da aula;

Modelo de Fluxograma

- O fluxograma pode ser feito de maneira esquemática ou na forma descritiva.
- O objetivo é fazer com que todos leiam os conteúdos do experimento e resumam as atividades experimentais, ou seja, cheguem sabendo exatamente o que será feito.
- Sem o fluxograma não será permitido realizar a aula experimental.



ORIENTAÇÕES PARA O USO DE MICROPIPETAS

A transferência de volume exato de líquidos é fundamental para vasta maioria dos experimentos nas áreas de bioquímica, biologia molecular, química, etc. *A medição de volume é um passo importante em qualquer laboratório porque um pequeno erro de pipetagem pode causar um erro significativo no resultado obtido.* Micropipetas são aparelhos designados para a transferência de pequenos volumes (entre 0,2 a 5000 µl) com máxima precisão. A construção das micropipetas consiste em um corpo anatômico de polipropileno (autoclavável) equipado com um botão dispensador e um ejetor de ponteiras no topo, um indicador de volume na lateral e uma haste para encaixe de ponteiras descartáveis na parte inferior. Existem vários tipos de micropipetas:

- pipetas monocanal ou multicanal
- pipetas com volume fixo ou com volume variável
- pipetas com deslocamento de ar ou com deslocamento positivo

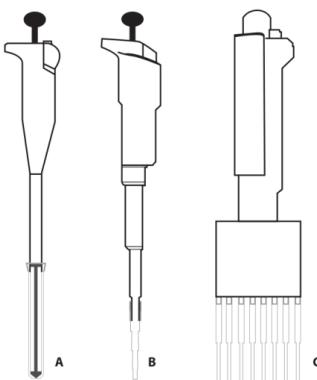


Fig. 1. A - Pipeta de Deslocamento Positivo; B - Pipeta Deslocamento de Ar (monocanal) e C - Pipeta Deslocamento de Ar (multicanal).

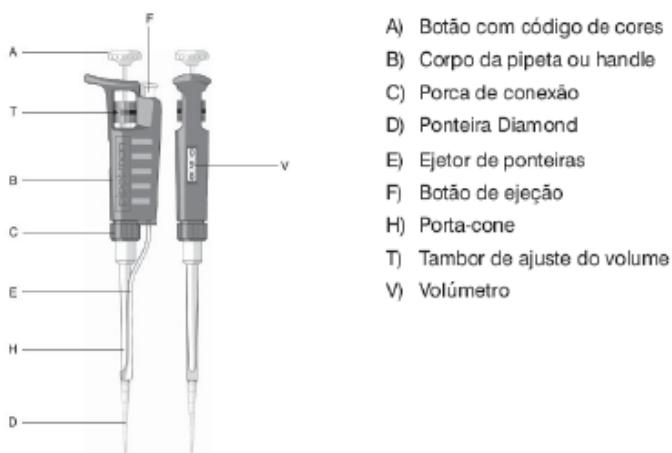


Fig. 2. Descrição de uma micropipeta. As micropipetas possuem os componentes indicados na figura pelas letras de A-V. O botão de ejeção apresenta duas fases de pressão cuja ordem será primeira e segunda na pipetagem direta e segunda e primeira fase na pipetagem reversa (Veja adiante).

Funcionamento de micropipetas com deslocamento de ar

Este tipo de pipetas é o mais utilizado, por ser muito versátil. O botão dispensador é ligado a um pistão dentro da pipeta. Ao pressionar o botão, o pistão se move deslocando o ar que por sua vez desloca um líquido para dentro ou para fora da ponteira. A trajetória de botão dispensador tem dois estágios que podem ser percebidos por diferença da resistência de molas que retornam o botão dispensador para posição de repouso após ele ser liberado. Os dois estágios permitem fazer a pipetagem usando duas técnicas diferentes: a **pipetagem direta** (esgotamento total) ou a **pipetagem reversa** (esgotamento parcial). A escolha da técnica depende das características do líquido a ser pipetado (viscosidade, volatilidade, hidrofilicidade) e do processo da pipetagem (pipetagem única, titulante ou repetida).

A precisão da pipetagem é influenciada por vários fatores:

- **encaixe da ponteira na haste:** antes de pipetar, a compatibilidade do tipo de ponteira (fabricante) com o tipo de haste deve ser verificada para evitar passagem de ar no encaixe. A ponteira deve ser encaixada por movimento circular que assegura boa vedação entre a ponteira e a haste, além de maior durabilidade pelo uso correto da haste. Por estas razões, o encaixe da ponteira por batimentos repetidos de haste na ponteira deve ser evitado.

- **ajuste de volume (pipetas com volume variável):** cada indicador de volume tem uma pequena folga. Assim, para a maior precisão, o volume deve ser ajustado sempre e somente de um lado (de preferência, no sentido horário). Quando o ajuste ultrapassa o volume desejado, recomenda-se voltar <1/3 da rotação e ajustar o volume de novo. Para ajustar corretamente o volume, deve ser considerado o erro paralático; o eixo da visão tem que ser perpendicular à escala do indicador do volume.

- Quando diminuir o volume, cuidadosamente chegue ao valor desejado e não ultrapasse a marca.
- Quando aumentar o volume, ultrapasse o valor desejado 1/3 de volta e depois, cuidadosamente, diminua o volume até chegar ao desejado, não ultrapassando a marca.



Modelo	Cor dos números do volúmetro	Preto	Vermelho
P2 a P200	μl	0,1 μl e 0,01 μl	
P1000, P5000	0,1 ml e 0,01 ml	ml	
P10ml	ml	0,1 ml	

Exemplo para cada modelo:

P2	P10	P20	P100	P200	P1000	P5000	P10ml
1 2 5	0 7 5	1 2 5	0 7 5	1 2 5	0 7 5	1 2 5	0 7 5
1,25 μl	7,5 μl	12,5 μl	75 μl	125 μl	0,75 ml	1,25 ml	7,5 ml

Fig. 3. Ajuste de volume em micropipeta.

O volúmetro é formado por três dígitos indicadores que são usados para ajustar o volume de líquido a ser transferido. São lidos desde o alto (dígito mais significativo) até a base (dígito menos significativo). Um marcador (ponta da seta) é usado para ajustar o volume exato ou intermediário contra a escala dos indicadores da base. Os dígitos possuem as cores preta ou vermelha para indicar a posição do ponto decimal, de acordo com o modelo. O volume é ajustado girando-se o tambor de ajuste do volume ou o botão da pipeta. O botão

da pipeta é a maneira mais fácil e rápida de acertar o volume, especialmente quando o operador estiver usando luvas. O tambor de ajuste deve ser utilizado para se alcançar lentamente o volume desejado.

- **a porção imersa no líquido:** por causa da compressibilidade do ar, existe uma medida ideal da imersão da ponta da ponteira que minimiza tais imprecisões (Tabela 1).

Tabela 1: Imersão ideal da ponta da ponteira em relação do tipo de ponteira - volume pipetado

Volume (μL)	Porção imersa (mm)
0,1 - 1	1
1 - 100	2-3
101 - 1000	2-4
> 1001	3-6

- **tensão lateral do líquido:** os líquidos podem molhar a parede da ponteira, o que pode resultar em perdas de volume ejetado (parte dele fica nas paredes). A minimização dessa imprecisão consiste em aspiração e ejeção de líquido sem efetuar a transferência (no mesmo recipiente). Assim, as paredes já estarão molhadas e o volume da 2ª aspiração será transferido por completo.

- **volatilidade do líquido:** para diminuir gotejamento do líquido durante a transferência e quando a natureza do líquido permite (não corrosivo, não infectante ou não radioativo), o líquido pode ser aspirado/ejetado no mesmo recipiente várias vezes até o ar em cima do líquido ser trocado completamente por vapor do líquido.

Cada micropipeta é calibrada para o valor indicado (valor teórico) corresponder ao valor efetivamente medido (valor real) na faixa da precisão de micropipeta (erro $\leq 2\%$ para pipetas P10, P20, P100, P200, P1000 e $\leq 5\%$ para pipetas P2 e P5000). Porém, com tempo e uso prolongado, os componentes mecânicos são sujeitos ao desgaste ou disfunção resultante de uso inadequado. Assim, é essencial a verificação da calibração das micropipetas nas mesmas condições em que são utilizadas no laboratório. Esta verificação consiste essencialmente em um conjunto de medições usadas para restabelecer/atualizar a relação entre o valor indicado e o valor efetivamente medido.

Normalmente, a verificação deve ser realizada nas seguintes situações:

- após uma manutenção e/ou troca de peças;
- após um período de uso (~ 1 ano);
- quando a pipeta sofre um dano: queda, contaminação da haste, etc;
- de acordo com orientações do fabricante;

Empregam-se geralmente três métodos de calibração de pipetas automáticas:

1. Método gravimétrico: uma série de medições do peso de líquido pipetado (considerando a temperatura, umidade, pressão atmosférica e coeficiente de expansão) posteriormente convertida em volume. Este método é realizado por laboratórios de calibração especializados.

2. *Método titrimétrico*: uma série de medições de quantidades de NaOH com concentração conhecida em volumes pipetados (sem interferência da temperatura, umidade ou pressão atmosférica). Exige uma padronização das soluções envolvidas.

3. *Método fotométrico*: uma série de medições fotométricas de diferentes diluições de um cromóforo com concentração conhecida. Este método pode ser facilmente implantado no laboratório.

Para a análise dos resultados da calibração, as séries de medições são convertidas para volume (valor efetivamente medido) e comparados com volumes ajustados no indicador da micropipeta (valores indicados). Calcula-se uma média (para mesmos volumes) ou regressão linear (para volumes diferentes) \pm desvio padrão.

Pipetagem direta (esgotamento total)

É a técnica de pipetagem mais conhecida. Utiliza-se para transferir volumes únicos de líquidos aquosos ou de líquidos não voláteis, não viscosos e não espumantes. O princípio de transferência de líquido é mostrado na Figura 4.

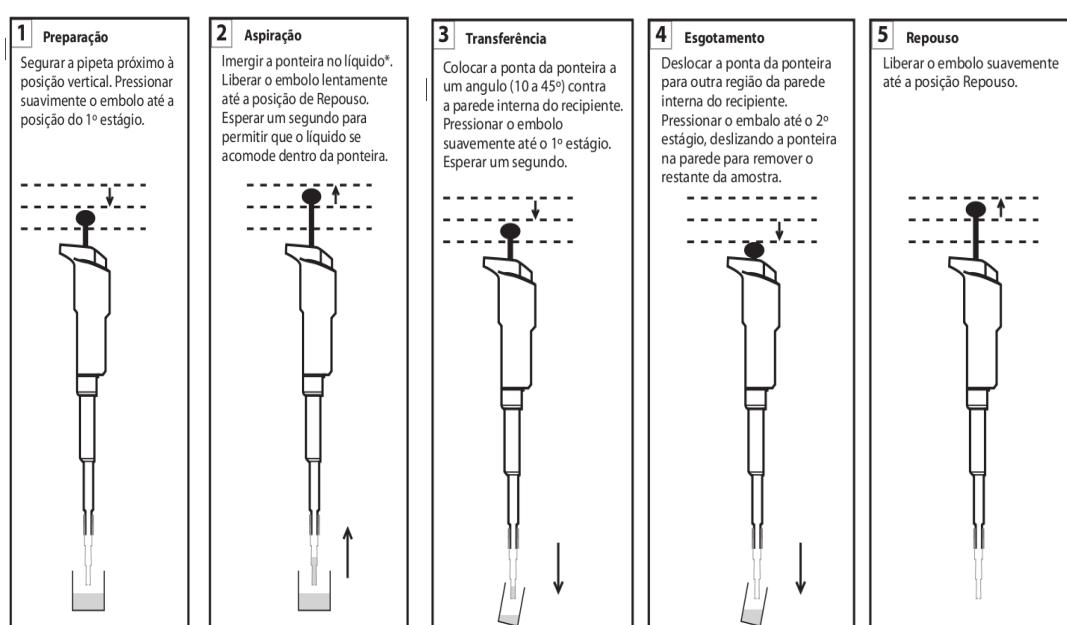


Fig. 4. Esquema de procedimento usado para a técnica de pipetagem direta. Linhas pontilhadas representam as posições de botão de esgotamento: Repouso (linha superior), 1º estágio (linha no meio) e 2º estágio (linha inferior).

Pipetagem reversa (esgotamento parcial)

É uma técnica de pipetagem pouco conhecida. Recomenda-se fortemente o uso desta técnica em casos de pipetagem de líquidos viscosos, voláteis e espumantes. Uso da pipetagem reversa em casos de pipetagem repetida de um volume do mesmo líquido (por exemplo, em dosagens de proteína – amostra e curva padrão) pode melhorar a confiabilidade do método até 10 vezes.

A transferência de líquidos por esta técnica resulta em um volume que sobra na ponteira após da transferência que pode ser uma desvantagem no caso de líquidos caros ou de volume limitado. Porém, a grande vantagem consiste em ejeção de líquido viscoso ou espumante, onde é praticamente impossível realizar o esgotamento total (da técnica direta). Caso de líquidos voláteis, a transferência do líquido pode ser acompanhada por gotejamento do líquido fora da ponteira (vapor do líquido volátil expande o ar dentro da pipeta). A técnica da pipetagem reversa garante um “volume de reserva” na ponteira que permite a transferência de volume correto até de líquido bastante volátil.

O princípio de transferência de líquido é mostrado na Figura 5.

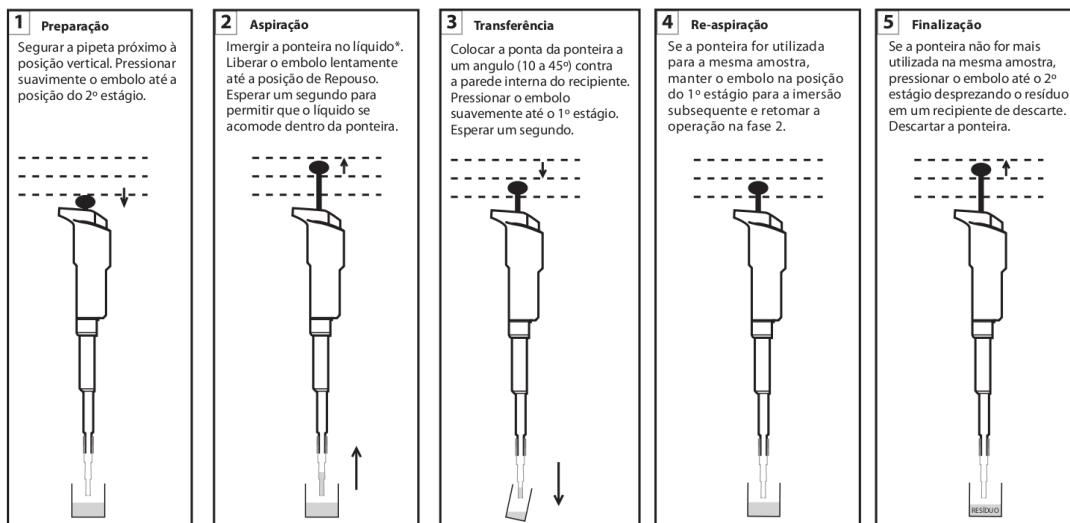


Fig. 5. Esquema de procedimento usado por a técnica de pipetagem reversa. Linhas pontilhadas representam as posições de botão de esgotamento: Repouso (linha superior), 1º estágio (linha no meio) e 2º estágio (linha inferior)

Experimento 1 – Água: propriedades físico-químicas relacionadas à sua estrutura e polaridade

Abstract

The peculiar structure of water molecule is responsible for the properties of this solvent which are crucial to the existence of life on earth in terms of modulating the structure and function of biomolecules as to control the climate. The properties of the water which determine the behavior of biomolecules are also used for technological applications and for this reason, the study of these properties is relevant to many areas of knowledge. In this lesson, we will study the formation of aqueous SDS and CTAB micelles, anionic surfactants and cationic respectively, influenced by the ionic strength of the medium with different concentrations of NaCl. In sequence, we will see the ability of the micelles have to kidnap the methylene blue dye and modulate the state of aggregation and optical properties thereof.

Resumo

A estrutura peculiar da molécula de água é responsável pelas propriedades desse solvente que são cruciais para a existência de vida na Terra tanto em termos de modular a estrutura e função das biomoléculas quanto ao controle do clima do planeta. As propriedades da água que determinam o comportamento das biomoléculas também são utilizadas para aplicações tecnológicas e por essa razão, o estudo dessas propriedades é relevante para diversas áreas do conhecimento. Nessa aula, estudaremos a formação de micelas aquosas de SDS e CTAB, surfactantes aniônico e catiônico, respectivamente, influenciadas pela força iônica do meio com diferentes concentrações de NaCl. Em sequência, veremos a capacidade que as micelas possuem de sequestrar o corante azul de metileno e modular o estado de agregação e as propriedades óticas do mesmo.

Introdução

As propriedades da água são de fundamental importância para a vida na Terra porque determinam a estrutura e função das biomoléculas, a associação dessas em agregados supramoleculares funcionais tais como as membranas biológicas, os complexos proteicos, os ribossomos e os cromossomos. A água também é importante para a vida na Terra, pois regula o clima do planeta. Além disso, o crescente desenvolvimento e novas aplicações da nanotecnologia e nanobiotecnologia dependem do domínio do conhecimento sobre as propriedades da água como agente fundamental para a construção e modulação das propriedades dos agregados supramoleculares naturais bem como os desenhados e construídos pelo homem.

A molécula de água possui a densidade eletrônica distribuída de forma desigual na estrutura molecular. Dentro de uma estrutura tetraédrica (Fig. 1), dois cantos do tetraedro são ocupados pelos orbitais moleculares

não ligantes (par de elétrons não compartilhados) do átomo de oxigênio e os outros dois são ocupados pelos átomos de hidrogênio.

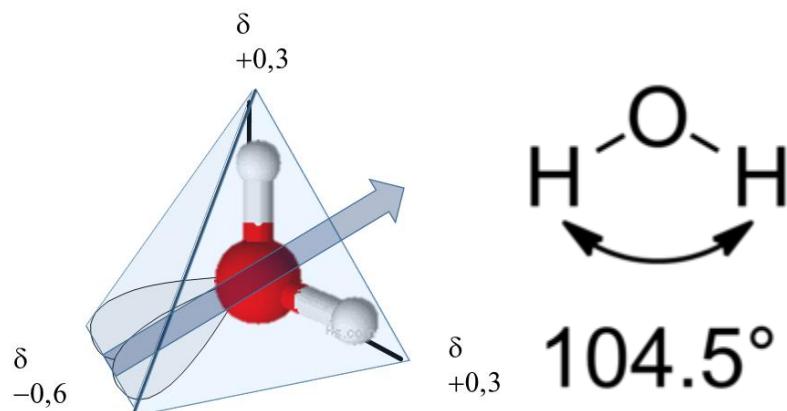


Fig. 1. Estrutura molecular da água inserida em uma estrutura tetraédrica e fórmula estrutural da água com o valor do ângulo entre os hidrogênios que se desvia do valor esperado de 109,5° do carbono tetraédrico com hibridização sp^3 .

Os átomos de hidrogênio na estrutura da água formam um ângulo de 104,5° que difere do valor esperado de 109,5° do carbono tetraédrico com hibridização sp^3 . Esse valor de ângulo entre os hidrogênios é explicado pela regra de Bent (Bent, 1961) segundo a qual em uma molécula AX_2 e AX_3 , o átomo central ligado a múltiplos grupos hibridizará de modo que orbitais com maior caráter *s* estarão direcionados para substituintes eletropositivos e orbitais com maior caráter *p* estarão direcionados para os substituintes mais eletronegativos. Um exemplo bem conhecido é o da molécula de água em comparação com o dimetil éter, metanol e difluoreto de oxigênio.

Tabela¹

Molécula	Ângulo de ligação entre os substituintes
$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{CH}_3}{\text{---}}}$ Dimetil éter	111°
$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{---}}}$ Metanol	107-109°
$\text{H}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{---}}}$ Água	104.5°
$\text{F}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{F}}{\text{---}}}$ Difluoreto de oxigênio	103.8°

¹ Tabela extraída de HENRY A . BENT AN APPRAISAL OF VALENCE-BOND STRUCTURES AND HYBRIDIZATION IN COMPOUNDS OF THE FIRST-ROW ELEMENTS. Chemical Reviews, 1961, Vol. 61(3), pp.275-311.

Em adição, as ligações O-H são polarizadas devido à alta eletronegatividade do oxigênio². Assim, um lado da molécula de água carrega uma carga parcial (δ) de -0,6 unidades e o outro lado é positivamente carregado de forma correspondente (Fig. 1). Essa separação espacial entre as cargas dá à molécula de água as características de um dipolo elétrico, de tal modo que, essas moléculas se atraem como magnetos e estabelecem ligações de hidrogênio (Fig. 2). Sendo assim, ao contrário do que acontece com metano (Fig. 3) que não é dipolar (momento de dipolo 0 C.m), para vaporizar a água (momento de dipolo $6,2 \cdot 10^{-30}$ C.m) é necessário colocar grande quantidade de energia para romper as pontes de hidrogênio. Disso decorre a enorme discrepância entre os pontos de ebulação da água ao nível do mar (100°C) e do metano (-162°C)^{1,2}.

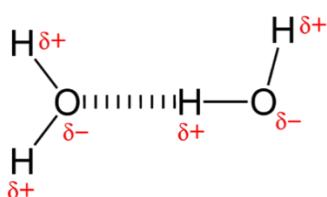


Fig. 2. Representação de duas moléculas de água ligadas por ligações de hidrogênio.

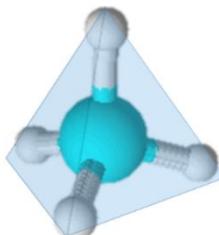


Fig. 3. Estrutura molecular do metano.

A polaridade da água a torna um excelente solvente para íons e um indutor da formação de agregados supramoleculares de moléculas surfactantes. Surfactantes com uma cauda apolar, como o SDS (surfactante aniónico, Fig. 4) e o CTAB (surfactante catiônico, Fig. 4) quando presentes em água em concentração acima da CMC (concentração micelar crítica) organizam-se como micelas aquosas (Fig. 5). Quando misturados com água e solventes orgânicos em proporções de cerca de 1/10 podem formar as chamadas micelas reversas (Fig. 5).

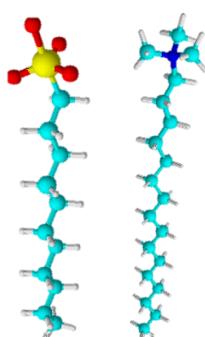


Fig. 4. Estruturas do SDS (esquerda) e CTAB (direita).

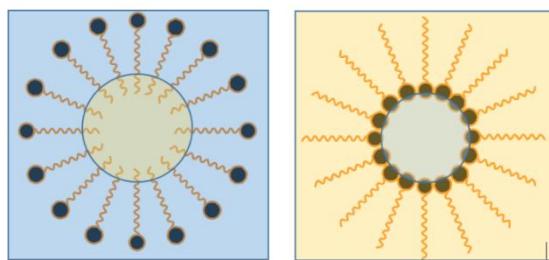


Fig. 5. Micela aquosa e micela reversa, mostradas à esquerda e direita repectivamente, sendo a água representada em azul e o solvente orgânico em amarelo.

Surfactantes com duas caudas apolares tais como os fosfolipídios organizam-se em meio aquoso como bicamadas e formam vesículas uni ou multilamelares. O tipo de estrutura formada é determinado pela geometria da molécula do lipídio anfipático (Figura 6). Lipídios com uma única cadeia carbônica, como sabões de detergentes, devido a forma cônica e afilada de suas moléculas, formam, preferencialmente, **micelas**. Nesta estrutura esférica, as cadeias carbônicas organizam-se no interior, isolando-se da água, e os grupos polares posicionam-se na superfície externa, interagindo com o solvente.

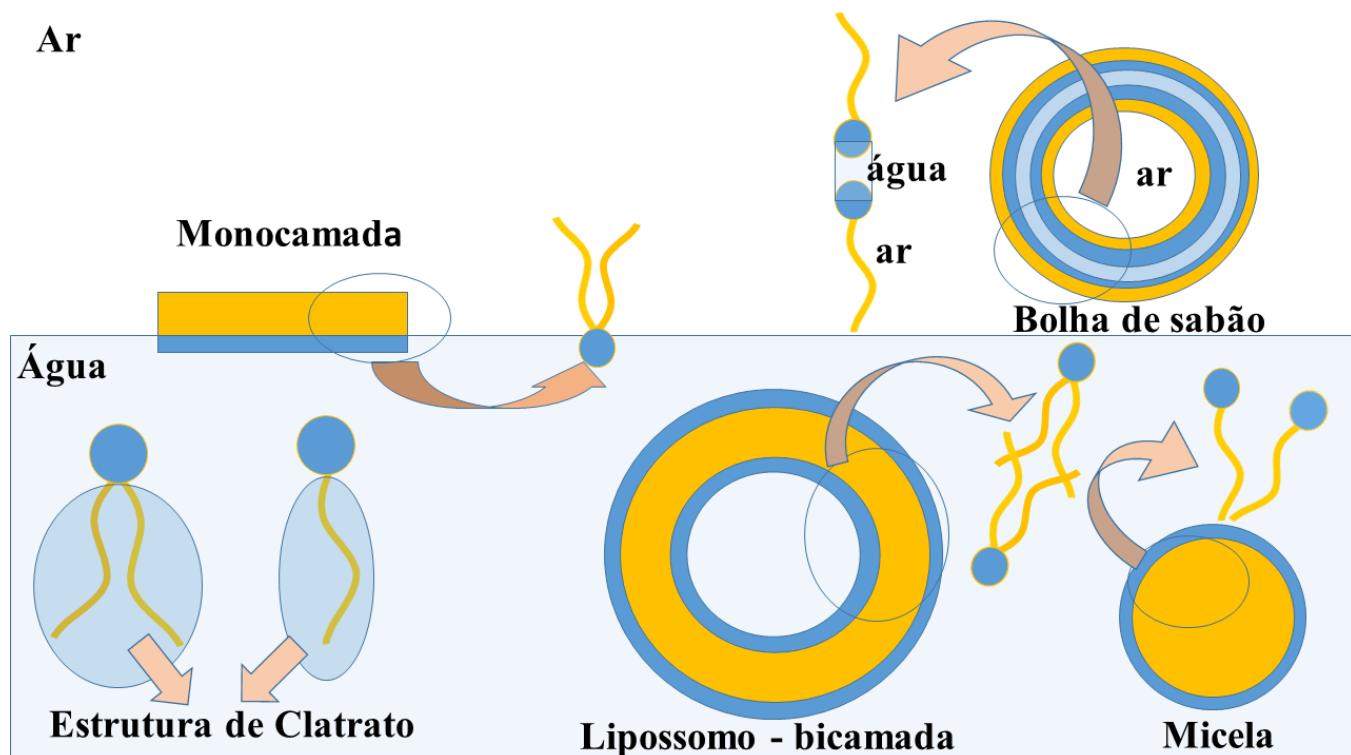


Fig. 6. Diferentes agregados supramoleculares formados por moléculas anfifílicas em meio aquoso e que são termodinamicamente favoráveis. A parte hidrofóbica dos anfifílicos em meio aquoso organiza a água ao seu redor em uma estrutura semelhante ao clatrato, o que diminui a entropia da água. A agregação das moléculas anfifílicas pelas porções hidrofóbicas exclui essas partes do contato com a água de tal forma que aumenta a entropia da água, sendo portanto, um processo com valor negativo de variação de energia livre de Gibbs. O valor negativo da energia livre de Gibbs vem do ganho de entropia da água, pois o processo é endotérmico ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Maiores detalhes, veja nos livros textos da bibliografia indicada. Figura inspirada em Jan Koolman, Klaus-Heinrich Roehm. Color Atlas of Biochemistry; Thieme, 2004, pag.29.

As micelas e os lipossomos possuem a capacidade de sequestrar moléculas hidrofóbicas como o corante azul de metileno (MB^+ do inglês, *methylene blue*) e modular o estado de agregação e as propriedades óticas do mesmo³. O corante possui uma estrutura molecular de baixa polaridade e se associa a micelas e não ao monômero de um detergente, ou seja, micelas formadas pelos surfactantes “aprisionam” moléculas de MB^+ . As micelas de SDS, um detergente aniónico, formam uma interface carregada negativamente e tem maior afinidade pelo MB (catiônico) que o CTAB (catiônico). Assim, para modular esse processo é necessário considerar a razão micela/corante.

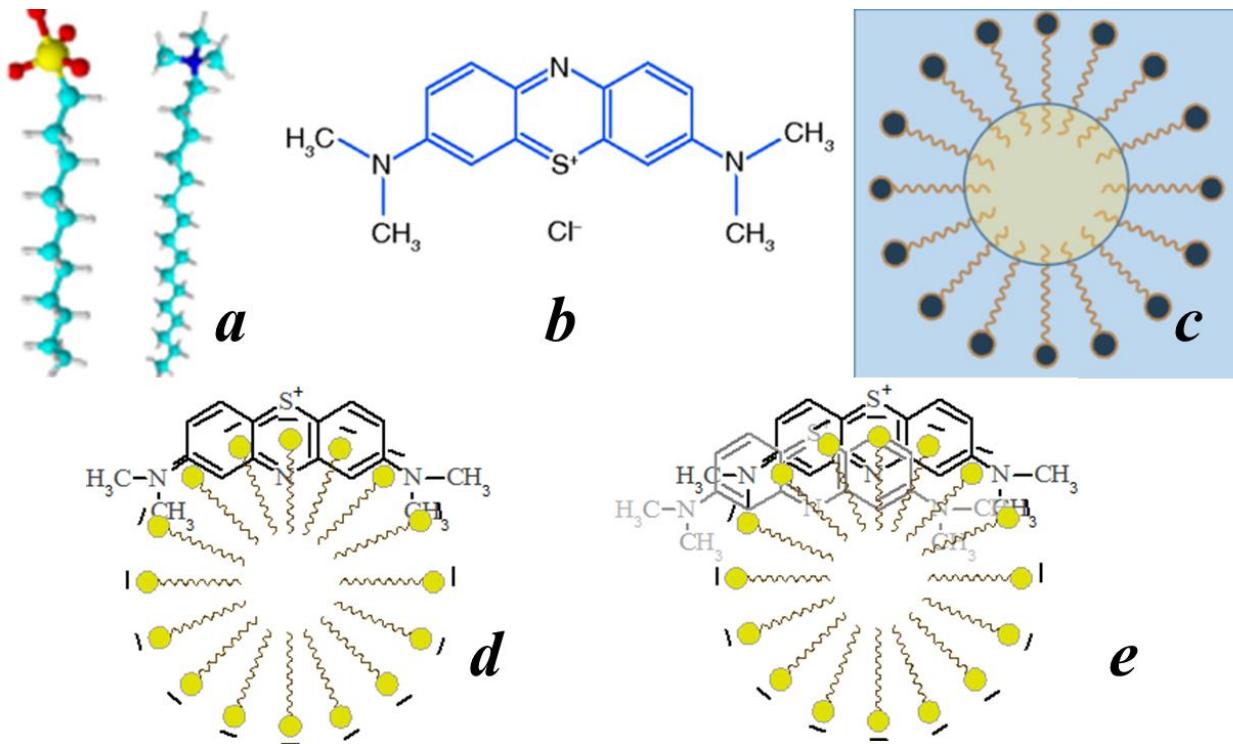


Fig. 7. Estrutura de surfactantes, do azul de metileno, de micelas e da associação do corante com as micelas na forma de monômero e dímero. a- modelo de preenchimento das estruturas de lauril sulfato (esquerda) e CTAB (direita), b – estrutura do azul de metileno, c – micela aquosa, d – micela aquosa com monômero de azul de metileno, e- micela aquosa com dímero de azul de metileno.

A relevância do estudo de surfactantes na disciplina de Bioquímica: estruturas, propriedades e funções de biomoléculas no BCT-UFABC está no diversificado emprego dessas moléculas na área biológica além das aplicações nas indústrias: farmacêutica (nanoformulações do tipo microemulsão), cosmética e têxtil até inibidores de corrosão e indústria do petróleo. Essas aplicações são devido às propriedades físico-químicas dos surfactantes tais como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, molhabilidade, solubilização e dispersão de fases. A palavra surfactante é derivada da contração da expressão *surface active agent*, a qual em sentido literal significa agente de atividade superficial. Os surfactantes são moléculas com características anfifílicas, ou seja, possuem na mesma molécula uma porção hidrofílica ou polar, denominada cabeça, e uma cadeia hidrofóbica ou apolar, a cauda⁴.

Um surfactante típico possui estrutura R-X , onde R é uma cadeia carbônica variando de 8 a 18 átomos (normalmente linear) e X é o grupo hidrofílico. Dependendo da característica do grupo X, os tensoativos podem ser classificados como não-iônicos (neutros) e iônicos. Os surfactantes iônicos contêm uma cabeça hidrofílica com carga líquida positiva (catiônicos), negativa (aniônicos) ou zero (zwitteriônicos). Os exemplos mais clássicos são o SDS (dodecil sulfato de sódio) que apresenta carga negativa no seu grupo sulfato e o CTAB (brometo de cetil trimetil amônio) que possui carga positiva no seu grupo trimetilamônio. Os surfactantes anionicos contêm geralmente um dos quatro grupos hidrofílicos solúveis (carboxilato, sulfonato, sulfato ou fosfato). Os surfactantes não-iônicos não contêm carga, mas apresentam grupos altamente hidrofílicos na parte polar. Em geral, a porção polar da molécula é formada por polioxido-etenos ou grupos glicosídeos (Ex.: Brij, Triton X-100, Tween CxEy, dodecyl-SDS- D-maltosídeo, digitonina) e esse tipo de surfactante não se dissocia em íons hidratados em meio aquoso. As propriedades hidrofílicas são observadas pela hidratação dos grupos amida, amina, ésteres e hidroxilos. Os surfactantes anfóteros (zwitteriônicos) são os únicos que apresentam propriedades combinadas de surfactantes iônicos e não-iônicos, de acordo com o pH do meio. Como os não-iônicos, não apresentam uma carga líquida; têm baixa condutividade e mobilidade eletroforética; e não se ligam em resinas de troca-iônica (Ex.: CHAPS, SB 3-10, ASB)⁵.

Conforme explicado na legenda da Figura 6, as moléculas anfifílicas tendem a se agregar espontaneamente em meio aquoso de tal forma a excluir suas porções hidrofóbicas do contato com a água. A agregação dos surfactantes em micelas e bicamadas aumenta a entropia da água, sendo portanto, um processo entropicamente dirigido que leva a um valor negativo de variação de energia livre de Gibbs ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Os surfactantes quando em meio aquoso, acima de uma determinada concentração, formam micelas e outros agregados, sendo que a porção lipofílica das moléculas fica orientada para o interior da micela enquanto os grupos hidrofílicos ficam na parte externa da micela em contato com a água. Forças eletrostáticas concentram compostos iônicos junto à superfície de micelas enquanto compostos lipofílicos adentram espontaneamente ao centro micelar. A faixa de concentração onde ocorre a formação das primeiras micelas é denominada concentração micelar crítica (CMC). A determinação da CMC pode ser realizada por uma variedade de métodos, alguns estudos têm relatado este parâmetro com base nas medidas de tensão superficial, condutividade elétrica, intensidade de espalhamento de luz, intensidade de fluorescência e titulação turbidimétrica.

Uma característica importante da micela é a existência de um equilíbrio dinâmico entre o agregado e moléculas livres de surfactante em solução. Portanto, a micela é uma estrutura dinâmica. A saída de um monômero que integra uma micela ocorre na escala de tempo de milionésimo de segundos e sua recaptura ocorre a velocidades similares àquelas provindas de processos controlados por difusão (por volta de $k = 10^8 - 10^9 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Uma vez que a estrutura da micela não é estática, sua forma e seu tamanho variam com o tipo de surfactante utilizado, além da temperatura, concentração e composição do surfactante, força iônica e pH, podendo adquirir configuração esférica, cilíndrica ou planar (discos ou bicamadas).

Utilizados largamente na indústria, a maioria dos surfactantes encontrados hoje no mercado é derivada de petróleo e pode causar graves problemas no meio ambiente, principalmente em ecossistemas aquáticos. Em ambientes com excesso de surfactantes nota-se acúmulo de espuma nos rios, diminuição de oxigênio dissolvido na água e da permeabilidade da luz. Além disso, esses compostos interferem em processos biológicos, como o ciclo do nitrogênio, e sua degradação pode aumentar as concentrações de compostos xenofóbicos (estranhos a um organismo ou sistema biológico) e causar a morte de organismos. Nesse contexto, e procurando por uma nova concepção de produtos a ser considerada no desenvolvimento de biorrefinarias e pela consolidação de novas plataformas tecnológicas no cenário nacional, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de fazer a produção biotecnológica de biosurfactantes utilizando leveduras, como agentes de fermentação, e subprodutos agrícolas e da agroindústria, como fontes de carbono⁶. Um exemplo de uso inovador de biosurfactantes é a sua aplicação no combate ao mosquito *Aedes aegypti*. Pesquisas tem demonstrado que o biosurfactante causa a morte de larvas do mosquito *Aedes aegypti* porque o composto interage com o sifão respiratório das larvas, deixando a região – formada por moléculas apolares, com umidade controlada e protegida pelo exoesqueleto – suscetível à interação com a água. Com isso, as larvas do mosquito sofrem asfixia. Além disso, a presença do biosurfactante na água onde o mosquito depositou seus ovos altera e dificulta o equilíbrio hidrostático das larvas, o que as leva a ter um gasto energético exacerbado e à morte por afogamento. Nessa mesma linha existe a perspectiva de utilizar biosurfactantes para o combate de outras doenças tropicais negligenciadas, como a leishmaniose e a esquistossomose.

O SDS (dodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio), utilizado nos experimentos dessa aula, é um detergente aniônico e agente umectante efetivo tanto em soluções alcalinas quanto ácidas. Na área biológica possui uma variedade de aplicações, sendo a mais comum o seu uso para solubilização de proteínas e lipídios. Para solubilização de proteínas, o SDS deve ser usado em sua concentração micelar crítica (CMC), sendo também um poderoso desnaturante de proteínas. Há estudos comparando o SDS com outros detergentes com relação à solubilização de lipídios e proteínas e seus efeitos sobre a atividade enzimática. Como muitos protocolos exigem a remoção do SDS de amostras protéicas, vários métodos de remoção do SDS por cromatografia por troca iônica têm sido descritos. Em alguns, o corante azul de metileno (MB^+) pode ser usado para determinar a quantidade remanescente de SDS após remoção por cromatografia por troca iônica. Além dessa aplicação, o MB^+ é utilizado como bactericida e fungicida; coloração temporária para examinar RNA ou DNA sob o microscópio; agente fotossensibilizador para a terapia fotodinâmica (TFD) de tumores, infecções e parasitoses; indicador redox em química analítica e na indústria têxtil. Devido ao seu uso na indústria textil o MB^+ , assim como outros corantes, é um problema ambiental na água de efluentes. Soluções de diferentes concentrações de MB^+ , associado ou não a surfactantes, apresentam diferentes tonalidade de azul, relacionada a predominância de dímero ou monômero. A tonalidade *royal* indica predominância de dímeros do corante e a tonalidade *cyan* indica predominância de monômero do corante. A mudança de cor conforme o estado de agregação decorre do fato de que a agregação afeta a estrutura molecular, que por sua vez, afeta os níveis de energia dos orbitais moleculares e assim, os comprimentos de onda de luz que são

absorvidos e transmitidos. A ampla utilização justifica o uso de SDS e do azul de metileno nos experimentos didáticos 1 e 2.

Objetivo Geral

Este experimento didático tem como proposta fazer com que os estudantes entendam as propriedades físico-químicas da água relacionadas à sua estrutura e polaridade e sua influência na formação de agregados supramoleculares de surfactantes que são capazes de sequestrar moléculas hidrofóbicas e interferir no estado de agregação e propriedades das mesmas. Ao manipular as soluções e fazer transferências de volumes devem adquirir conhecimento e desenvolver a habilidade no uso correto de micropipetas e modos de pipetagem dos líquidos.

Objetivos Específicos

Mais especificamente abordaremos o efeito dos estados de agregação nas propriedades óticas de um corante, o azul de metileno (Fig. 7), promovidas por altas concentrações do mesmo e associação a micelas. Adicionalmente veremos que a carga do surfactante pode influir na afinidade por determinadas moléculas.

Materiais

- 10 tubos de ensaio, por grupo, para Parte 1 (identificar como 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 1B, 2B, 3B, 4B e 5B , conforme a Tabela 1)
- 6 microtubos Eppendorfs® de 2 mL por grupo (Parte 2)
- Suporte para tubos e para microtubos
- 1 unidade de micropipeta automática de volume variável por grupo (P10, P20, P100, P200, P1000)
- Ponteiras
- 1 bêquer de 50 mL
- Papel absorvente
- Fita crepe para identificação dos tubos e Eppendorfs® (a equipe técnica pode fazer a identificação prévia)
- **Solução de NaCl** (Cloreto de sódio – M.M. 58,5 g/mol) a 1,14 mol/L. Para 10 mL de solução estoque utilizar uma massa de 0,6669 g.
- **Solução de SDS** (Sodium dodecyl sulfate / $C_{12}H_{25}NaO_4S$, M.M. 288 g/mol) a 40 mmol/L. Para 10 mL de solução estoque utilizar uma massa de 0,1152 g
- **Solução de CTAB** (N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammioniumbromid / $C_{19}H_{42}BrN$,M.M. 364,46 g/mol) a 40 mmol/L. Para 10 mL de solução estoque utilizar uma massa de 0,1458 g
- **Solução de Azul de Metileno** (Methylene Blue / $C_{16}H_{18}ClN_3S$, M.M. 319,85 g/mol) a 500 μ mol/L.
- **Água deionizada**
- Agitador Vortex

- Papel de alumínio

Procedimento

Para as pipetagens utilize a micropipeta de volume variável disponível para o seu grupo (P10, P20, P100, P200, P1000) que seja adequada para a transferência de volume exato do líquido.

Parte 1

A turma deverá ser dividida em grupos e cada grupo deverá preparar as amostras A (sem sal) e B (com sal).

- 1) Posicione os tubos no suporte e numere-os na seguinte ordem: 1A, 2A, 3A, 4A e 5A e outra fileira 1B, 2B, 3B, 4B e 5B.
- 2) Nos tubos de 1A a 5A e de 1B a 5B, coloque os respectivos volumes de água deionizada recomendados para cada tubo, conforme Tabela 1.
- 3) Em seguida adicione os volumes de solução estoque de **NaCl**, 0, 35, 175 e 350 µL respectivamente nos tubos **2B a 5B**.
- 4) Por fim adicione os respectivos volumes indicados da solução estoque de SDS nos tubos 2A a 5A e 2B a 5B para as concentrações finais de 16, 8, 4 e 1.5 mmol/L.
- 5) Após a adição do detergente em todos os tubos, agitar individualmente, manualmente e depois no agitador Vortex, e observar a formação de espuma (vide Fig. 8). Anotar (Tabela 1) e fotografar por grupo (A e B).

Tabela 1 – Volumes de adição referentes à Parte I do experimento 1 – Água.

Reagente	Amostra	A (Sem sal)					B (Com sal)				
		1A (controle)	2A	3A	4A	5A	1B (controle)	2B	3B	4B	5B
Água		2 mL	1200 µL	1600 µL	1800 µL	1925 µL	2 mL	1200 µL	1565 µL	1625 µL	1575 µL
Solução NaCl (concentração)		-	-	-	-	-	-	0	35 µL (20 mM)	175 µL (100 mM)	350 µL (200 mM)
Surfactante SDS (concentração)		0 (0)	800 µL (16 mM)	400 µL (8 mM)	200 µL (4 mM)	75 µL (1,5 mM)	0 (0)	800 µL (16 mM)	400 µL (8 mM)	200 µL (4 mM)	75 µL (1,5 mM)
Formação de espuma											

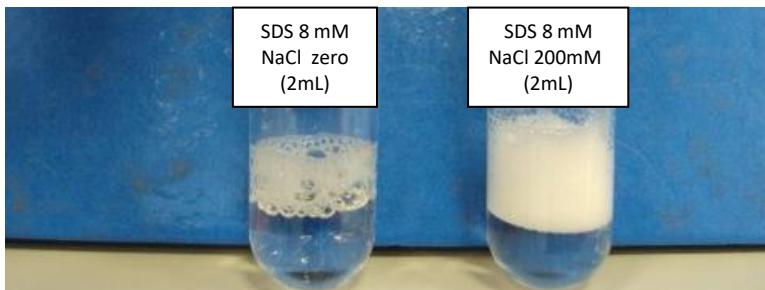


Fig. 8. Exemplo de resultado esperado. Efeito da força iônica sobre a CMC de um detergente. O tubo da esquerda contém 8 mmol/L de SDS em água deionizada o que equivale ao valor da CMC do detergente e o tubo da direita possui a mesma concentração de SDS em solução de NaCl 200 mmol/L. Nessa concentração a CMC do detergente cai para 1 mmol/L. Quando um detergente atinge a CMC, observa-se brusca queda na tensão superficial da água. Importante notar que concentrações acima da CMC favorecem a formação de espuma, mas esse método de avaliação da CMC não tem precisão. Para determinar valores precisos de CMC deve-se recorrer a medidas de variação da tensão superficial da água. Exemplos de determinação de CMC podem ser encontrados em vários trabalhos como a referência a seguir: **Braz. arch. biol. technol. vol.57 no.2 Curitiba Mar./Apr. 2014.**

Parte 2 .

A turma deverá ser dividida em 6 grupos e cada grupo deverá preparar somente as soluções relacionadas a uma determinada concentração de azul de metíleno (MB^+ , do inglês, methylene blue) conforme Tabela 2, ou seja, Grupo A (Aa e Ab) ou Grupo B (Ba e Bb) ou Grupo C (Ca e Cb).

- 1) Nos microtubos *Eppendorf*®, prepare soluções com concentrações finais de SDS de 0, 1.5 e 16 mmol/L e de CTAB com 0, 0.75 e 8 mM, nos volumes indicados na Tabela 2 referente ao seu grupo (A, B ou C), identificando-os respectivamente como 1a, 2a e 3a, e 1b, 2b e 3b e o nome do grupo (Exemplo: B1a).
- 2) Em seguida, adicione a solução de azul de metíleno (MB) nos Eppendorfs®, de acordo com o indicado para seu grupo: Aa e Ab q.s.p. 5 μM ; Ba e Bb q.s.p. 50 μM ; Ca e Cb q.s.p. 150 μM .
- (**Atenção para os volumes indicados para o seu grupo!**)
- 3) Observe a coloração das soluções e fotografe na ordem 1, 2 e 3.

Todas as amostras da Parte II desse experimento devem ser guardadas, no laboratório, para utilização no Experimento 2.

Tabela 2 – Volumes de adição referentes à Parte II do experimento 1 – Água.

Grupo A – q.s.p. 5 µM de MB						
Reagente	SDS (Aa)			CTAB (Ab)		
	1a	2a (1.5 mM)	3a (16 mM)	1b	2b (0,75mM)	3b (8 mM)
Água	1980 µL	1905 µL	1180 µL	1980 µL	1942,5 µL	1580 µL
Surfactante	0 µL	75 µL	800 µL	0 µL	37,5 µL	400 µL
Azul de Meliteno	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

Grupo B – q.s.p. 50 µM de MB						
Reagente	SDS (Ba)			CTAB (Bb)		
	1a	2a (1.5 mM)	3a (16 mM)	1b	2b (0,75mM)	3b (8 mM)
Água	1800 µL	1725 µL	1000 µL	1800 µL	1762,5 µL	1400 µL
Surfactante	0 µL	75 µL	800 µL	0 µL	37,5 µL	400 µL
Azul de Meliteno	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL

Grupo C – q.s.p. 150 µM de MB						
Reagente	SDS (Ca)			CTAB (Cb)		
	1a	2a (1.5 mM)	3a (16 mM)	1b	2b (0,75mM)	3b (8 mM)
Água	1400 µL	1325 µL	600 µL	1400 µL	1362,5 µL	1000 µL
Surfactante	0 µL	75 µL	800 µL	0 µL	37,5 µL	400 µL
Azul de Meliteno	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL



Fig. 9. Exemplo de resultado a ser obtido. Em cada foto, os tubos Eppendorfs da esquerda contém 0, 1,5 e 16 mM de SDS e os da direita contém 0, 0,75 e 8 mmol/L de CTAB. Nas foto da esquerda, centro e direita, as concentrações de azul de metileno são respectivamente, 5, 50 e 150 mmol/L. Observar as diferenças de tonalidade de azul. A tonalidade *royal* indica predominância de dímeros do corante e a tonalidade *cyan* indica predominância de monômero do corante.

Análise dos dados

As anotações e fotos de cada grupo (A, B e C) da Parte 2 devem ser compartilhadas.

- 1- Descreva as características da espuma formada nos tubos 1A a 5A e 1B a 5B e explique.
- 2- Qual a C.M.C. do SDS e do CTAB em água sem adição de sal ?
- 3- Após analisar a estrutura do MB, as fotos e as observações dos grupos A, B e C, indique e explique qual (quais) ficaram com a coloração cyan ou royal em todas as condições (presença ou não de surfactante e tipo de surfactante). Fundamente sua discussão com base na hidrofobicidade.

Referências Bibliográficas

1. VOET, D. *Bioquímica*. 4^a edição. Artmed. 2013.
2. LEHNINGER, D. *Princípios da Bioquímica*. Terceira edição, RR Donnelley, 2002.
3. JUNQUEIRA, H.C.; SEVERINO, D.; DIAS, L.G.; GUGLIOTTI, M.S.; BAPTISTA, M. S. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.*,(4) 2320–2328, 2002.
4. MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. *Quim. Nova*, Vol. 24, No. 1, 87-93, 2001.
5. NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 5, 772-776, 2002.
6. SILVA, S. S. Biosurfactantes como moléculas versáteis: um novo conceito de produtos para biorrefinarias e combate às doenças tropicais negligenciadas fase 1: seleção de leveduras, produção fermentativa e caracterização físico-química. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/pt/auxiliios/90924/biosurfactantes-como-moleculas-versateis-um-novo-conceito-de-produtos-para-biorrefinarias-e-combat/>. Acesso em 26 de ago. 2016.
7. M. Li *et al.* Accelerated methylene blue (MB) degradation by Fenton reagente exposed to UV or VUV/UV light in an innovative micro photo-reactor. *Applied Catalysis B: Environmental* 187, 83–89, 2016.

Experimento 2 – Espectrofotometria: Conceitos e Aplicação

Abstract

The light absorption phenomenon directly by macromolecules or by chromophores formed by secondary reactions is used for the spectral characterization and/or quantification of these substances through spectrophotometry. The purpose of this experiment is to present the technique of spectroscopy at the UV-vis range applied to Biochemistry using the Lambert-Beer's law and qualitative measurements by the analysis of a dye monomer and dimer composite spectra. To this class, it will be used direct absorbance at 280 nm and the colorimetric Biuret method for albumin quantification. The extinction coefficient (ϵ) of albumin at 280 nm and of the Biuret chromophore will be calculated by fitting a curve of absorbance intensity versus protein concentration. The calculation of the absorbance intensity at wavelength of maximum absorbance of dye monomer and dimer will provide to the students the identification of the experimental conditions that change the equilibrium between these species.

Resumo

O fenômeno de absorção de luz diretamente por macromoléculas ou cromóforos formados por reações secundárias é usado para a caracterização espectral e/ou quantificação dessas substâncias por espectrofotometria. Este experimento didático tem como proposta apresentar a técnica de espectrometria de absorção eletrônica na faixa de espectro eletromagnético UV-vis aplicada à Bioquímica para realizar medidas quantitativas de acordo com a Lei de Lambert-Beer e medidas qualitativas por meio da observação da relação monômero/dímero em agregados supramoleculares de um corante. Para esta aula, serão obtidos espectros de absorção de uma solução de concentração desconhecida da proteína albumina para dosagem dessa diretamente a 280 nm e pelo método do Biureto. O coeficiente de extinção (ϵ) da albumina a 280 nm e o do cromóforo do Biureto serão calculados por meio do ajuste de uma curva padrão de intensidade de absorbância em função da concentração do cromóforo. Também serão obtidos espectros de absorção de soluções de três diferentes concentrações do corante azul de metileno combinadas com três diferentes concentrações dos surfactantes SDS e CTAB. A diferença na absorção entre monômeros e dímeros facilita o cálculo da concentração de cada espécie presente em solução e permite uma estimativa qualitativa da concentração relativa de dímeros e monômeros na solução, o que será observado pelos estudantes em diferentes condições experimentais.

Introdução

O termo medida fotométrica foi definido originalmente como o ato de medir a intensidade da luz, independente do comprimento de onda (energia). A maioria dos instrumentos tem, contudo, mecanismos para isolar uma faixa estreita de comprimentos de onda do espectro. Os instrumentos que usam filtros para esse propósito são referidos como fotômetros de filtro ou colorímetros e os que utilizam prismas ou grades de difração são chamados de espectrofotômetros.

Comprimento de onda refere-se à distância entre dois picos da propagação da luz que ocorre na forma de onda, e essa distância normalmente é dada em nanômetros (nm). A radiação eletromagnética inclui desde a energia radiante dos comprimentos de onda curtos dos raios γ aos comprimentos de onda longos das ondas de rádio. O termo *luz* é usado para descrever a energia dos comprimentos de onda visíveis ao olho humano e àqueles limítrofes. O olho humano é capaz de detectar comprimentos de onda entre 380 e 750 nm, entretanto espectrofotômetros são capazes de medir também comprimentos de onda mais curtos (ultra-violeta, UV) ou mais longos (infra-vermelho, IV) (Fig. 1).

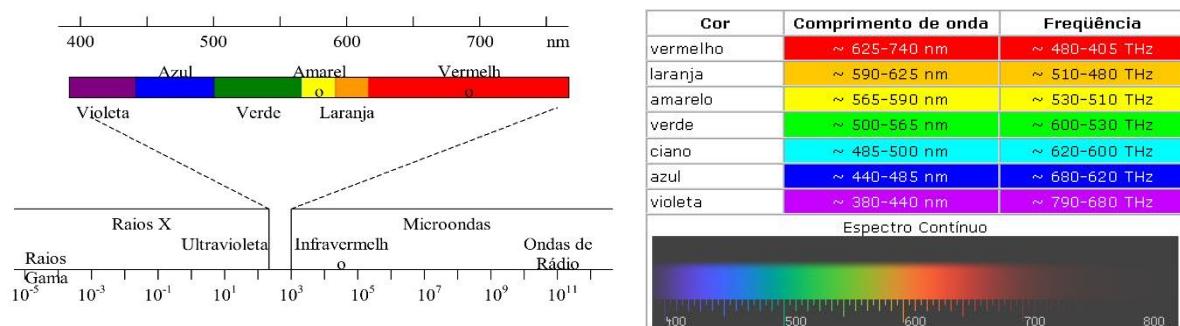


Fig. 1. Espectro eletromagnético evidenciando a faixa dos comprimentos de onda visíveis.

(fonte: http://www.arq.ufsc.br/labcon/arq5656/Curso_Iluminacao/07_cores/luz_01.htm e http://www.wordpress.com/2009/03/teoriadacor_01.jpg).

A espectrofotometria é um dos métodos ópticos de análises mais usados nas investigações bioquímicas (Fig. 2). O espectrofotômetro é um instrumento que permite comparar a intensidade de luz absorvida ou transmitida por uma solução que contém uma quantidade desconhecida de soluto, em relação a quantidade conhecida da mesma substância. Todas as substâncias podem absorver energia radiante, como por exemplo, a água que absorve fortemente na região do IV. A absorção das radiações ultravioletas, visíveis e infravermelhas dependem da estrutura molecular e é característica para cada substância química. Quando a luz atravessa uma solução de determinada substância, parte da energia é absorvida (absorbância). A cor das substâncias se deve a não absorção (transmitância) de certos comprimentos de ondas da luz branca que incide sobre elas, deixando

transmitir aos nossos olhos apenas aqueles comprimentos de ondas não absorvidos. Esse fenômeno pode ser usado para quantificação de substâncias por meio da intensidade de absorbância em um comprimento de onda específico, com base em uma curva-padrão, utilizando-se da Lei de Lambert-Beer¹.

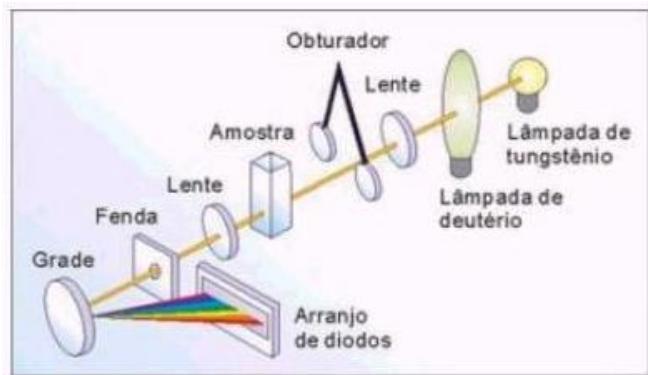


Fig. 2. Esquema óptico simplificado de um espectrofotômetro. (fonte: <http://www.ufpa.br/ccen/quimica/espect2.jpg>)

Fundamentação Teórica

Considere um feixe de luz incidente com intensidade I_0 passando por uma cubeta contendo uma solução de uma determinada substância que absorve luz de certo comprimento de onda (Fig. 3). A intensidade do feixe de luz transmitido (I) será sempre menor que I_0 , sendo que a transmitância (T) é definida como uma relação entre a intensidade da luz transmitida e a intensidade da luz incidente (*Lei de Beer*).

$$T = I/I_0$$

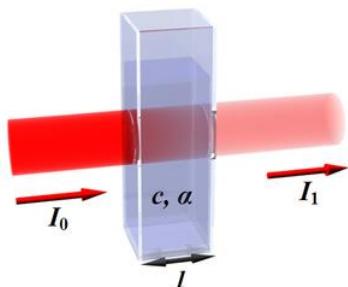


Fig. 3. Esquema demonstrando a incidência de um feixe de luz em uma cubeta e sua transmitância.

(fonte:http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/04/Beer_lambert.png/300px-Beer_lambert.png)

À medida que aumentamos a concentração da substância em solução, a transmitância varia em relação inversa ao logaritmo da concentração. Em consequência disso, pode-se definir um novo termo, absorbância (A), que será diretamente proporcional à concentração. Portanto,

$$A = -\log I/I_0 = -\log T$$

$$A = \log 1/T$$

Dessa forma, a absorbância é direta e linearmente proporcional à concentração. Esta varia também de forma direta com o caminho óptico (diâmetro interno) da cubeta, ou seja, se dobrarmos o caminho óptico mantendo a concentração constante, teremos um valor de absorbância duas vezes maior. Essa relação é frequentemente referida como *Lei de Lambert-Beer*:

$$A = a \cdot b \cdot c$$

Onde A = abosrbância, a = constante de proporcionalidade (absortividade ou coeficiente de extinção), b = caminho óptico (em centímetros) e c = concentração. Como os valores de A são adimensionais, a unidade de a são as recíprocas daquelas para b e c . Quando $b = 1\text{ cm}$ (geralmente é) e c é expresso em mol/L ou molL^{-1} , a constante a pode ser chamada de absortividade ou coeficiente de extinção molar (ϵ , epsilon) e é constante para dado **comprimento de onda**, temperatura, pH, solvente, etc.

Assim, a proporcionalidade direta entre absorbância e concentração pode ser usada para a determinação da absortividade de uma dada substância em determinada condição experimental por meio de realização de uma curva-padrão. Para a construção dessa curva, soluções de concentrações conhecidas da substância devem ser preparadas e as absorbâncias determinadas no comprimento de onda adequado. Posteriormente, essa absortividade pode ser utilizada para quantificação dessa substância em uma solução, cuja concentração é desconhecida². Esse é o princípio utilizado para medidas quantitativas obtidas pela Espectroscopia UV-visível.

A Espectroscopia UV-visivel também pode ser usada para análise qualitativa de substâncias, como será feita nessa aula com o azul de metileno (MB^+ , do inglês, methylene blue). O MB^+ é um corante tiazínico com aplicações variadas. Foi sintetizado pela primeira vez para ser usado como corante de tecidos durante o período de grande expansão da indústria têxtil europeia sendo que, atualmente, a água residual do processo de tingimento de tecidos representa um problema ambiental mundial. É largamente utilizado como um indicador redox em química analítica: soluções desta substância são azuis quando em um ambiente oxidante, mas tornam-se incolores quando expostas a um agente redutor. O MB^+ também desempenha papéis importantes na microbiologia e farmacologia há tempos, sendo muito utilizado para corar os organismos vivos; como coloração temporária para examinar RNA ou DNA sob o microscópio; para o tratamento metemoglobinizante, isto é, converte metemoglobina (Fe^{3+}) a hemoglobina (Fe^{2+}); como bactericida e fungicida. Ultimamente uma inovação de uso terapêutico tem tido sucesso na medicina e na veterinária: o MB^+ tem sido utilizado como agente fotossensibilizador para a terapia fotodinâmica (TFD) de tumores, infecções e parasitos. Essa terapia utiliza a aplicação de um corante na área a ser tratada, seguida de irradiação com luz de comprimento de onda longo que penetra melhor nos tecidos. A luz promove excitação eletrônica do corante que transfere sua energia ao oxigênio molecular do meio e o converte em uma espécie altamente oxidante, o oxigênio singlete, que leva à morte do tecido tumoral ou do agente infeccioso⁴.

A cor característica do MB^+ é causada pela forte banda de absorção na região espectral de 550-700 nm, sendo seu espectro de absorção dependente da concentração. Em solução aquosa o corante azul de metiletno encontra-se em equilíbrio entre as formas monômero e dímero. O equilíbrio encontra-se deslocado para a forma monomérica e dimérica, respectivamente em baixas e altas concentrações do corante. Monômeros e dímeros tem espectros de absorbância distintos: monômeros tem intensidade máxima em 664 nm ($\epsilon = 85,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e dímeros em 590 nm (Fig. 4). A diferença na absorção entre monômeros e dímeros facilita o cálculo da concentração de cada espécie presente em solução. A intensidade relativa dos picos indica em qual direção o equilíbrio está deslocado. A razão entre a absorbância a 580 e 665 nm (A_{580}/A_{665}) dá uma estimativa qualitativa da concentração relativa de dímeros para monômeros, assim dá uma estimativa de qual forma do corante prevalece no meio. Em solução, o estado fundamental do MB^+ forma dímeros com uma constante de associação de $4 \pm 1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ e que podem ser favorecidos pelo aumento da força iônica e presença de micelas em determinadas razões de corante/surfactante. A interação corante-surfactante tem sido estudada devido a sua grande relevância para a indústria de tingimento e fotografia.

A forma agregada de azul de metileno possui peculiares propriedades fotoquímicas^{3,4}. Quando os dímeros são expostos à luz branca ou vermelha observa-se a separação de carga dos pares, pois o triplete é oxidante e oxida seu par com formação do par radicalar formado pelo corante reduzido com um elétron (MB^\bullet) e o corante oxidado com menos um elétron ($\text{MB}^{\bullet+}$). Dessa forma, o rendimento quântico de produção de oxigênio singlete cai bastante para as formas agregadas. A forma reduzida com um elétron absorve luz em 420 nm e possui $pK_a = 9,0$. Essa espécie pode transferir o elétron ao oxigênio do meio e gerar íon superóxido ou prontamente dismutar para a forma reduzida com dois elétrons, ou seja, a forma leuco (MBH) e o estado fundamental MB^+ . O cátion radical do azul de metileno ($\text{MB}^{\bullet+}$) absorve em 520 nm.

O princípio que faz a fotoquímica interessante é o uso da luz como uma fonte de energia para promover reações químicas. Em comprimentos de onda de luz (λ) específicos, a energia pode ser absorvida por determinadas moléculas, levando-as a um estado molecular excitado no qual, devido à conformação menos estável ficam propensas a reagirem com outras moléculas. A maior parte das reações química realizadas em laboratório utiliza a faixa espectral visível ao olho humano (vis), ultravioleta (UV) e infravermelho (IR) próximo. Moléculas excitadas podem perder sua energia através das propriedades físicas ou por participar de reações químicas. Para quantificar cada um destes processos, utilizam-se as medidas dos rendimentos quânticos (ϕ). O ϕ é a razão entre o número de fôtons incidentes em uma amostra para um específico processo pelo número de fôtons absorvidos ou número de moléculas do produto formado por unidade de tempo pelo número de fôtons absorvidos por unidade de tempo. A fim de compreender o comportamento fotoquímico quando interage com biomoléculas, em particular com membranas, as propriedades do MB^+ foram estudados em soluções de SDS e CTAB em vários trabalhos como a referência a seguir: Helena C. Junqueira et al. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.*(4) 2320–2328, 2002.

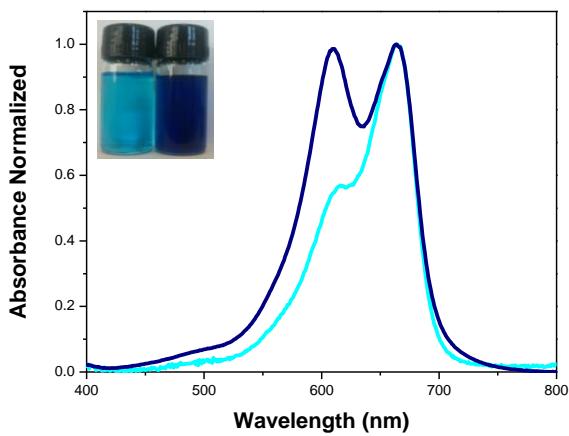


Fig. 4. Espectro UV-visível de MB^+ em água obtido com 25 (azul claro) e 250 (azul escuro) μM do corante. O inserto mostra a coloração diferenciada das soluções com elevada porcentagem de dímero (azul royal) e de monômero (azul turqueza).

O processo fotoquímico se inicia com a absorção de um fóton por uma molécula com a qual encontra condição de ressonância. A energia do fóton absorvida pela molécula no estado fundamental (S_0) leva ao deslocamento de um elétron de seu orbital ligante para um orbital anti-ligante desocupado de mais alta energia, o que leva a molécula ao estado eletronicamente excitado singlete S_1 ou S_n , dependendo da energia de excitação ou do solvente. Deve ser ressaltado que uma molécula pode atingir o estado eletronicamente excitado, na ausência de luz, um processo conhecido como Fotoquímica no Escuro^{5,6,7}. Nesse caso, o estado eletronicamente excitado resulta de uma reação química (clivagem térmica de um dioxetano⁸, por exemplo) ou bioquímica (reação da luciferina catalisada pela enzima luciferase dos vagalumes¹⁰, por exemplo). A molécula no estado eletronicamente excitado pode ter diferentes rotas de decaimento para o estado fundamental (processos fotofísicos). Os processos fotofísicos possíveis são: conversão interna ($S_n \rightarrow S_1 + \text{calor}$) quando a molécula encontra-se em estado excitado S_n acima de S_1 , fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$, sendo que S_1 pode ter sido atingido por excitação a partir de S_0 ou por conversão interna), cruzamento intersistemas ($S_1 \rightarrow T_1$ ou $S_2 \rightarrow T_2$ e $T_2 \rightarrow T_1$, via conversão interna), como esquematizado na figura 5. Outra possibilidade, válida especialmente para o estado eletronicamente excitado triplete que possui tempo de vida relativamente longo, o suficiente para colidir com outras moléculas ainda no estado excitado, é a reação fotoquímica. Portanto, há transições que resultam em emissão de fótons (fluorescência, F ou Fluo e fosforescência, P ou Phos); as transições sem a emissão de fótons, isto é, aquelas em que a desativação se dá através de processos de liberação de calor para o ambiente; processos de absorção de radiação eletromagnética produzindo estados eletrônicos e vibracionais excitados (S_2 ou S_n); processos de desativação molecular de estados eletrônicos e vibracionais excitados através de processos radiativos ou não radiativos (S_1 e T_2).

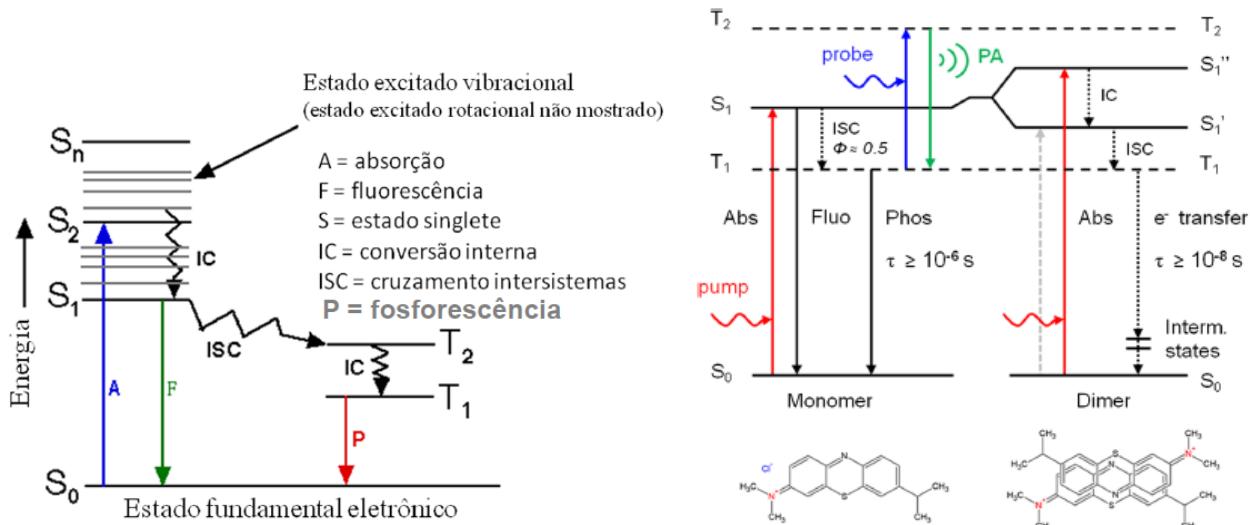


Fig. 5. Diagrama de Jablonski: à esquerda, para uma molécula genérica após interagir com um fóton em condições de ressonância; à direita, especificamente para as formas monomérica e dimérica do azul de metileno¹¹.

A Terapia Fotodinâmica, também conhecida como PDT (da sigla em inglês, Photodynamic Therapy), fotorradiação, fototerapia ou terapia fotoquímica, é uma modalidade de tratamento médico que vem apresentando ótimos resultados para o tratamento de câncer, infecções, parasitos e queimaduras e vem se destacando em relação às terapias tradicionais (cirurgia, quimioterapia e radioterapia), pois diferentemente dessas terapias não apresenta os graves efeitos colaterais já que o efeito é localizado e seletivo. A PDT visa a destruição localizada do tecido vivo tumoral, do agente infeccioso ou do tecido danificado por queimaduras, por meio do disparo de mecanismos de morte celular. No caso de infecções bacterianas, fúngicas e virais o tratamento fotodinâmico em geral promove a inativação fotodinâmica de micro-organismos (PDI). Assim, tem sido objeto de investigação para desinfecção de sangue, águas ou superfícies. Além disso, fotoinativação microbiana tem sido indicada como alternativa para reduzir o uso abusivo de antimicrobianos e, como consequência, diminuiria o desenvolvimento da resistência microbiana, principalmente nas áreas de dermatologia, otorrinolaringologia, oftalmologia, neurologia, gastroenterologia, urologia e odontologia. Essa terapia se baseia no emprego de um corante fotoativo, o fotossensibilizador (substância não tóxica) que combinado com irradiação em baixas doses de luz visível de comprimento de onda adequado, é ativado ao estado eletronicamente excitado e portanto, com potencial pro-oxidante. Quando no estado excitado triplete, e na presença de oxigênio, pode reagir com moléculas vizinhas por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de espécies reativas de oxigênio: superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (reação do tipo I) ou por transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), induzindo a produção do oxigênio singlete (¹O₂) (Fig.6). Todas essas são espécies altamente reativas, capazes de danificar lipídeos, ácidos nucleicos e outros componentes celulares, tendo como consequência a morte celular. O oxigênio singlete, é capaz de reagir com proteínas da membrana celular de micro-organismos, enzimas do citoplasma e destruir material genético. A principal vantagem dessa terapia quando aplicada às bactérias é que devido à

existência de múltiplas mecanismos é improvável o desenvolvimento de resistência bacteriana ao tratamento. O dano causado dependerá da quantidade de oxigênio singlete produzido e da concentração do PS.

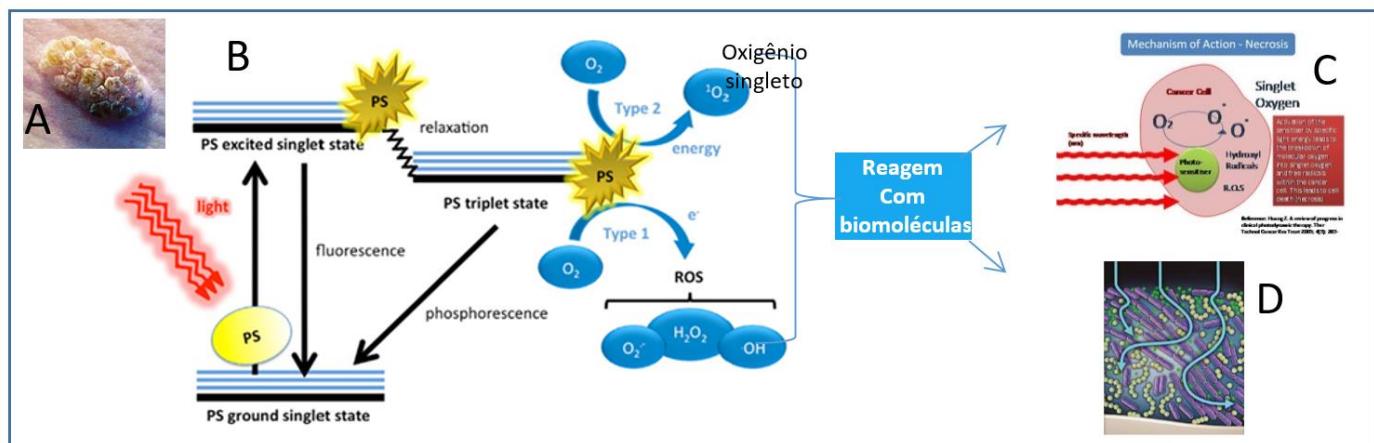
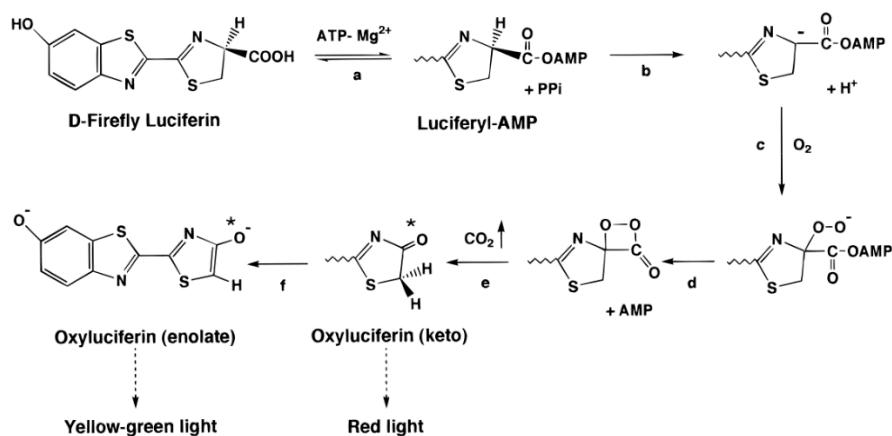


Fig. 6 . A- proliferação anormal de tecido. B- mecanismo de fotosensibilização e C – de morte celular. D- ação do PS na PDI.

Já foi observado que as interfaces de micelas carregadas negativamente induzem a formação de dímero de sensibilizadores de carga positiva e são capazes de deslocar um mecanismo de sensibilização tipo II para um tipo I, praticamente abolindo a geração de ${}^1\text{O}_2$. Estes achados são relevantes para PDT, em que o sensibilizador reage em contato direto com membranas, que podem variar desde membranas ligeiramente negativas, como a citoplasmática, a altamente negativa, como a membrana mitocondrial interna. Além disso, os corantes catiônicos também interagem com o DNA que possui carga negativa. As interfaces carregadas negativamente podem alterar o mecanismo e eficiência de sensibilização de fotosensibilizadores de carga positiva. Portanto, mudando a via fotoquímica também desloca o mecanismo e a eficiência de danos celulares.

Outro aspecto da fotoquímica que aparece nos sistemas biológicos é a Fotoquímica no Escuro⁵ que tem sido aplicada em kits para dosagem de ATP com diferentes finalidades. Nesse caso, utiliza-se a reação enzimática dos organismos bioluminescentes, sendo o vagalume, o mais conhecido. O mecanismo geral é apresentado abaixo.



Observem que o mecanismo envolve etapas intermediárias de ligação com AMP (um nucleotideo) formação de dioxetano (etapa d) que sofre clivagem espontânea e gera oxiluciferina no estado eletronicamente excitado singlete que decai, nesse caso, exclusivamente de forma radiativa. A cor da luz emitida depende da forma isomérica que decai ser o isômero ceto ou enol (etapa f).

Em relação à fotoquímica, vale ressaltar que o Prêmio Nobel de Química de 2008 esteve relacionado a descoberta da Proteína Verde Fluorescente (GFP) — uma proteína brilhante de águas-vivas, um dos organismos mais interessantes da bioquímica atual. Esses estudos permitiram que pesquisadores iluminassem tumores cancerígenos em crescimento, mostrassem o desenvolvimento do mal de Alzheimer no cérebro ou o crescimento de bactérias nocivas, entre outras aplicações¹¹.

A fotoquímica apresenta inúmeras aplicações biológicas e tecnológicas^{5,12} tais como síntese química, produção de biocombustíveis (envolve a fotossíntese¹⁴), conversão de energia (células solares), fotografia, sinalização de estradas com tintas fosforescentes, iluminação de ambientes, telas de televisores e computadores (OLEDs), entre outras¹⁴. Esses aspectos justificam a inclusão do presente tópico no BC&T da UFABC.

Objetivo Geral

Introduzir os conceitos de espectrofotometria ao aluno utilizando como exemplo a dosagem de proteínas em uma amostra por método direto, ou seja, pela intensidade de absorbância a 280 nm e pelo método indireto do Biureto; em ambos os casos com aplicação da Lei de Lambert-Beer. Observar mudanças espectrais que acompanham alterações no estado de agregação do corante azul de metíleno e assim, entender que a espectroscopia de absorbância também fornece informações qualitativas a respeito das moléculas.

Objetivos específicos

1. Obter o espectro de absorção UV da albumina decorrente da presença de aminoácidos aromáticos e de cistina, assim como o referido espectro visível do complexo formado entre os íons Cu²⁺ presentes no reagente de Biureto e as proteínas.
2. Utilizar valores de absorbância no comprimento de onda de absorbância máxima de concentrações conhecidas de uma solução para a elaboração de uma curva-padrão e determinação do coeficiente de extinção dos cromóforos para aplicação da Lei de Lambert-Beer na quantificação das substâncias.
3. Calcular a concentração de uma solução de albumina e dessa solução acrescida de biureto.

4. Observar o espectro de absorção de soluções do corante azul de metileno (MB) em três diferentes concentrações que interferem com seu estado de agregação e em três concentrações dos surfactantes SDS e CTAB relacionadas com a CMC dos detergentes. O uso de surfactantes catiônicos e aniônicos também fornecerá informações sobre a influência da carga da interface das micelas na associação com outras moléculas.

Materiais

- Solução-problema de BSA (*Bovine serum albumin* – albumina bovina) com concentração desconhecida (= solução estoque) (128 μ M)
- Reagente de Biureto
- H₂O destilada
- 1 unidade de micropipeta automática de volume variável por grupo (P10, P100, P200, P1000)
- Ponteiras
- Estante com 3 tubos de ensaio
- Béquer de 50 mL
- Espectrofotômetros de varredura (operado pelos técnicos de laboratório e utilizado para o método direto de dosagem de BSA e para as amostras da Aula 2) e de bancada (operado pelos alunos e utilizado para o método do biureto)
- Cubetas de quartzo e cubetas de plástico de caminho óptico 1 cm e cubeta de vidro de caminho óptico 0,1 cm
- Papel absorvente macio para limpeza das cubetas
- **Amostras preparadas pelos alunos na Aula 2 – “Experimento 1 – Água” = Grupo B (50 μ M de MB com SDS) amostras B1a, B2a e B3a)**

Observação: o reagente de Biureto é composto por CuSO₄ 0,15 % (m/v), tartarato de sódio e potássio 0,6 % (m/v) e NaOH 0,75 mol/L. Este reagente não deve ser guardado por mais de 30 dias, devido a possibilidade de precipitação do cobre na forma de óxidos ou sais insolúveis. Porcentagem m/v refere-se à massa do soluto, em grama, usada para preparar 100 mL de solução, isto é, 0,15 g de CuSO₄ para 100 mL de solução.

Parte 1 : Medidas quantitativas obtidas pela Espectroscopia UV-Vis

Albumina e Albumina+Biureto

Nesses experimentos determinaremos a concentração de uma solução de albumina por dois métodos¹⁵ de forma comparativa: diretamente pela absorbância de seus aminoácidos aromáticos e cistinas a 280 nm (método

direto) e pela formação de complexos com Cu²⁺ presentes no reagente de biureto e que absorvem luz com máximo em 550 nm (método do Biureto).

1. Método direto. Nesse método, a quantificação da concentração de albumina é feita pela contribuição de absorbância dos seus resíduos de aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano) e também dos resíduos de cistina.

Procedimento

A turma deverá ser dividida em dois ou três grupos dependendo do número de alunos presentes. Deverá ser utilizado um espectrofotômetro de varredura. A aquisição dos espectros e a manipulação da cubeta deverão ser feitas por um técnico de laboratório ou pelo professor. Os alunos deverão acompanhar o procedimento.

1) Cada grupo deverá diluir, em um tubo de ensaio, 200 µL da solução-problema de BSA em 1800 µL de água deionizada. Reservar essa solução diluída.

2) Utilizando um espectrofotômetro de varredura, **operado pelo técnico de laboratório**, deverá ser feito o “branco” em uma cubeta de quartzo de caminho óptico 1 cm, utilizando 2 mL de água deionizada e lendo na região espectral de 240 a 320 nm, com 1 nm de intervalo de λ . Discutir a função da leitura do “branco”. Após a leitura, a água deverá ser descartada.

3) Adquirir o espectro da solução-problema de BSA concentrada.

Analizar o espectro obtido, verificando se a intensidade de absorbância não ultrapassa o valor de 1 e se apresenta uma banda bem definida com pico em 280 nm (verificar se não “estourou o espectro”).

Obs: Após a aquisição retire a solução contida na cubeta e guarde-a em um tubo de ensaio, pois essa solução será reutilizada no Método do Biureto.) Lave muito bem a cubeta utilizada com solução de detergente e posteriormente água em abundância, para que não fique contaminada.

4) Utilizando a amostra previamente diluída 10 vezes (ítem 1 desse procedimento) fazer uma nova leitura. Comparar o espectro obtido nesse item com o obtido no item 3(solução concentrada) e discutir qual deles é confiável.

Obs.: salve ambos os espectros (“BSA” e “BSA diluída”), pois esses dados deverão ser plotados e compartilhados com os demais grupos.

Análise dos dados

1) Calcule a concentração da solução-problema de BSA.

Para dosagem direta de proteínas utilizam-se valores de absorbância no comprimento de onda de absorbância máxima de concentrações conhecidas de uma solução para a elaboração de uma curva-padrão, a partir dessa é determinado o coeficiente de extinção molar do cromóforo e então é aplicada a Lei de Lambert-

Beer para a quantificação da substância de interesse. Assim, você deverá construir uma curva padrão da albumina utilizando os dados da tabela a seguir (obtidos previamente por colaboradores da disciplina em cubeta de caminho óptico de 0,1 cm) para plotar um gráfico de absorbância em 280 nm (eixo y) em função da concentração de albumina em M (eixo x). A partir desse gráfico determine o valor de ϵ em 280 nm (contribuição conjunta dos aminoácidos aromáticos).

Concentração albumina (μM)	Concentração albumina (M)	Absorbância em 280 nm
0		0
20		0,0787
40		0,1547
60		0,2443
80		0,3414
100		0,3887
120		0,4750
140		0,5426
160		0,6217
180		0,7016
200		0,7632

Usando o valor de ϵ em 280 nm obtido (coeficiente angular), calcule a concentração de albumina nessa solução problema, aplicando a equação de Lambert-Beer $A = \epsilon \cdot C \cdot l$. Lembre-se que a concentração encontrada na leitura feita em aula foi da AMOSTRA DILUIDA e que é preciso calcular a concentração da AMOSTRA CONCENTRADA.

Dicas: $C_{\text{dil}} = A / (\epsilon \times l)$

$$C_{\text{dil}} \times V_{\text{solução}} = C_{\text{original}} \times V_{\text{retirado do estoque}}$$

Conforme pode ser verificado, de acordo com a equação de Lambert-Beer (equação de reta), a intensidade de absorbância em 280 nm deve aumentar linearmente com a concentração de albumina. O ajuste linear do gráfico de intensidade de absorbância (A), em 280 nm, versus concentrações conhecidas de albumina, em concentração molar (C), X caminho óptico de leitura (l), em cm, fornece o valor da constante de absorvidade molar (ϵ) do cromóforo, no caso, a contribuição simultânea dos resíduos aromáticos e de cistina. Deve-se ressaltar que o aumento linear da absorbância da albumina em função da concentração se restringe a condições de concentrações relativamente baixas nas quais não há agregação significativa das moléculas de proteínas. A formação de agregados a partir de determinadas concentrações leva a perda da linearidade do gráfico a partir de dada concentração, visto que o agregado se comporta como outro cromóforo, com propriedades distintas do monômero.

- 2) Compare os espectros da amostra concentrada e diluída e discuta qual deles é mais confiável. Qual seria a outra alternativa para não saturar a fotomultiplicadora caso não fosse possível diluir a amostra?

- 3) Plote os resultados das amostras diluídas de seu grupo e dos demais grupos do laboratório e discuta possíveis discrepâncias de dados. (Houve amostras diluídas de forma inadequada? Seu grupo chegou próximo ao valor correto da concentração de BSA do estoque?)

2. Método do Biureto. Esse método utilizará igualmente a lei de Lambert-Beer. A única diferença é que nesse método, cria-se um novo cromóforo na molécula de albumina capaz de absorver na região visível do espectro eletromagnético, no caso com pico máximo de absorção em 550 nm. Esse cromóforo resulta da complexação do cobre presente no reagente com as ligações peptídicas e assim, independe do tipo de proteína.

Procedimento.

Observação: A aquisição dos espectros da solução BSA+biureto deverá ser realizada pelos próprios alunos em ESPECTROFOTÔMETRO DE BANCADA, no λ de 550 nm, utilizando cubeta de plástico de caminho óptico de 10 mm (1 cm). Desse modo, a turma deverá ser dividida em grupos, estando a quantidade desses na dependência do número de equipamentos disponível.

- 1) Em um tubo de ensaio identificado prepare o “branco” com uma solução de água+biureto (1,5 mL de água destilada + 1,5 mL de Biureto).
- 2) Em outro tubo de ensaio prepare a solução BSA + biureto, colocando 0,5 mL de solução de albumina (utilize o BSA estoque que seu grupo guardou do método direto) no tubo e acrescente 1 mL de água destilada. Após agitação manual delicada, adicionar 1,5 mL do reagente de Biureto e tornar a agitar.
- 3) Após 5 minutos, fazer a aquisição do espectro de absorção no visível dessa solução, de forma pontual em 550 nm. Anote o valor de absorbância encontrado.

ATENÇÃO, fazer a leitura da absorbância do “branco” **antes** da leitura da amostra BSA + biureto.

Análise dos dados

Para dosar albumina pelo método do biureto você utilizará a constante de absorvidade molar de $15.100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ obtida a partir de uma curva padrão de albumina que reagiu com o biureto (Figura 7).

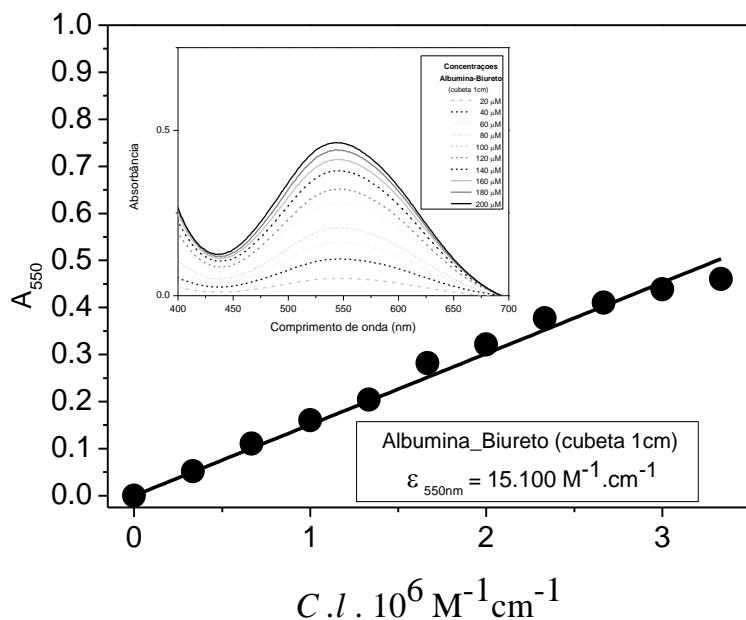
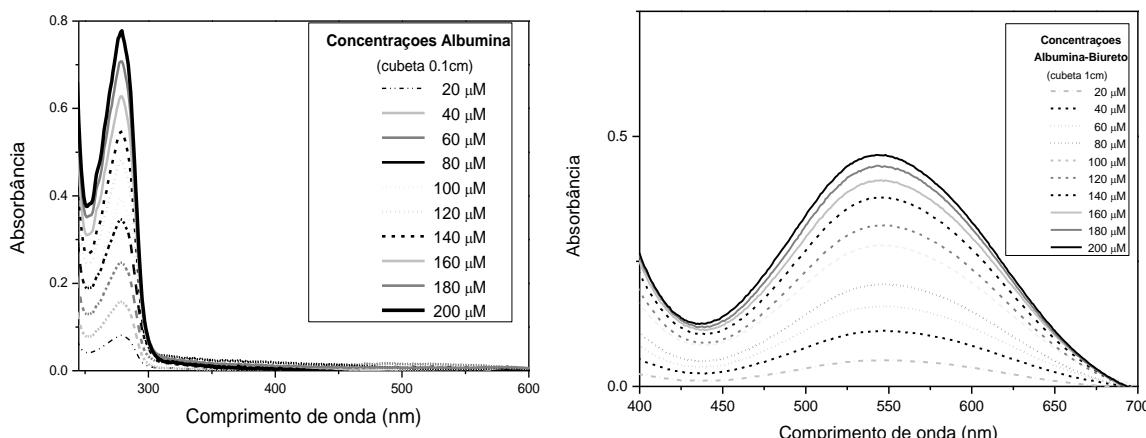


Fig. 7. Curva padrão de albumina determinada pelo método do biureto. O inserto mostra os espectros do cromóforo Biureto-Albumina, os quais forneceram os valores de absorbância em 550 nm usados na construção da curva padrão.

- 1) Determinar a concentração da solução-problema albumina+biureto, utilizando os dados obtidos. Lembre-se que a BSA nessa solução-problema está diluída na proporção de 1 para 6.
- 2) Na figura abaixo, à esquerda observa-se o gráfico da absorbância em função do comprimento de onda de várias concentrações de albumina, e à direita da mesma figura, está plotado o gráfico semelhante correspondente a albumina + biureto. Em que se baseia o Método do Biureto para a dosagem de proteína e porque é utilizada uma banda de absorção diferente em ambos os métodos?



- 3) Relacione as vantagens e desvantagens do método do biureto em relação a outros métodos para dosagem de proteínas. Utilize o artigo “Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes”¹⁵.

Parte 2 : Medidas qualitativas obtidas pela espectroscopia UV-Vis

Soluções de Azul de Metileno com surfactante

Nessa parte da aula serão usadas as amostras preparadas no Experimento 1. Somente as amostras com índice B (maiúsculo) devem ser lidas no espectrofotômetro de varredura em cubeta de caminho óptico de 1 mm (0,1 cm). Entretanto todas as amostras deverão ser analisadas visualmente em relação às diferenças de tonalidade de azul, relacionando-as a predominância de dímero e monômero. A tonalidade *royal* indica predominância de dímeros do corante e a tonalidade *cyan* indica predominância de monômero do corante. A mudança de cor conforme o estado de agregação decorre do fato de que a agregação afeta a estrutura molecular, que por sua vez, afeta os níveis de energia dos orbitais moleculares e assim, os comprimentos de onda de luz que são absorvidos e transmitidos. Monômeros e dímeros tem espectros de absorbância distintos: monômeros tem intensidade máxima em aproximadamente 664 nm ($\epsilon = 85,000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) e dímeros em 590 nm. A razão entre a absorbância a 580 e 665 nm (A_{580}/A_{665}) dá uma estimativa qualitativa da concentração relativa de dímeros para monômeros. Observe a coloração das soluções referentes ao seu grupo e compare com os grupos cuja concentração de MB é diferente, relacionando cor da solução, estado de agregação e aspecto do espectro apresentado. Espectros de absorbância obtidos de todas as condições preparadas no Experimento 1 estão disponibilizados no apêndice a seguir.

Procedimento para obtenção dos espectros de varredura. Essa parte do experimento será executada por um colaborador da disciplina e acompanhada pelos alunos. As soluções devem ser lidas na sequência especificada na Tabela 2, em cubeta de vidro ou quartzo com caminho óptico 0.1 cm, após realizar o “branco”. Após a leitura, voltar com a solução para o respectivo *Eppendorf*®.

Importante: fazer a IDENTIFICAÇÃO DE CADA AMOSTRA, atente para o nome marcado em cada *Eppendorf*® e na Tabela 2, que devem ser o mesmo.

Configuração do equipamento:

- Região espectral de 350 a 750 nm,
- Escala e unidades : auto
- λ de leitura de 1 em 1 nm

Observação: Combinar com o professor responsável pela turma como os dados obtidos nessa aula serão disponibilizados aos alunos (espectro de BSA de concentração desconhecida e das soluções de azul de metileno com surfactante).

Tabela 2 - Dados para orientação da identificação e ordem de leitura dos espectros de varredura das amostras da parte 2 do Experimento 2 .

Cubeta	Identificação da amostra	Número do arquivo	Check list
0,1 cm (vidro ou quartzo)	Branco : água destilada		
	B1a		
	B2a		
	B3a		

ATENÇÃO: para auxiliar no estudo das aulas 1 e 2, na análise dos dados e resolução dos exercícios, interaja com o objeto de aprendizagem “espectroscopia uv-vis – medidas qualitativas”, desenvolvido especificamente para essas aulas, por Adrianne M. M. Brito e pelo NTE-UFABC e disponibilizado no site da biblioteca da UFABC.

ANÁLISE DOS DADOS

1 . Plotar os gráficos absorbância X comprimento de onda e analisar a razão entre os picos de absorção das formas monômero e dímero em cada condição, conforme modelos no apêndice

APÊNDICE

Em solução aquosa o corante azul de metileteno encontra-se em equilíbrio entre as formas monômero e dímero. O equilíbrio encontra-se deslocado para a forma monomérica e dimérica, respectivamente em baixas e altas concentrações do corante. Mesmo em condições onde predomina a forma monomérica, pode-se deslocar o equilíbrio para a forma dimérica com o uso de detergentes como o SDS. Conforme mostrado na figura 1, monômeros e dímeros de MB^+ têm espectros de absorção distintos: monômeros tem intensidade máxima em, aproximadamente, 664 nm e dímeros em 590 nm. A intensidade relativa dos picos indica em qual direção o equilíbrio esta deslocado. Na presença do detergente SDS a razão entre a concentração de micelas e concentração do corante irá determinar se as moléculas do corante permanecerão distribuídas isoladamente ou em pares no interior das micelas e isso pode ser monitorado por espectroscopia UV-visível. Portanto, em presença de SDS, a predominância de dímero será dependente da concentração relativa de MB^+ e SDS. Conforme mostrado na fig. 1, mantendo fixa a concentração do corante, em concentração de SDS relativamente baixa o espectro observado com pico em 580 nm, é referente a forma dimérica. Por outro lado,

em concentração relativamente altas de detergente o espectro observado com pico em 665 nm é referente a forma monomérica do corante.

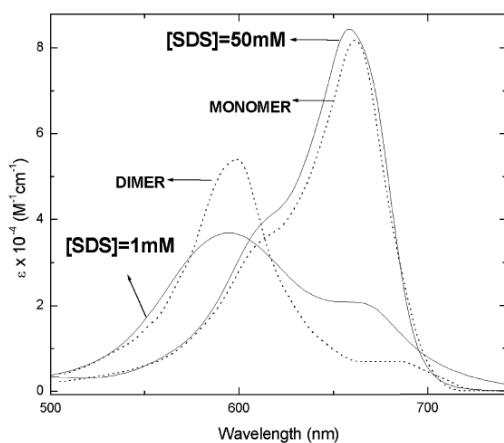


Fig. 1. Espectro de absorção de solução de MB^+ com concentrações de 1 e 50 mM de SDS (linha contínua, $[\text{MB}^+] = 30 \mu\text{M}$) e espectro de absorbância de monômero e dímero de solução de M^{B}^+ (linha pontilhada)³

Para analisar esses espectros e os espectros obtidos nessa aula, é importante entender algumas considerações³. Micelas aquosas são entidades dinâmicas e a estrutura micelar está em equilíbrio com os monômeros da solução e com a monocamada de surfactante na interface ar/água. A presença de um sal na solução diminui a repulsão eletrostática entre os monômeros na interface e consequentemente diminui a CMC (efeito da força iônica sobre a CMC de um detergente, visto no Experimento 1- parte 1). Esse efeito é observado apenas com altas concentrações do soluto (mM). Em uma solução de surfactante e corante MB^+ , dependendo da carga do surfactante, e consequentemente das interações eletrostáticas, bem como da razão molar entre esses, pode ocorrer ou não formação de complexos que mudam as propriedades de ambos e o equilíbrio da solução. O MB^+ , sendo positivamente carregado tem uma forte atração pelo SDS e tem sido sugerido que essa interação muda o equilíbrio da solução de SDS e os complexos formados têm uma grande tendência a ficar na interface (menor repulsão entre monômeros e menor solubilidade em água). Em solução de SDS e MB^+ , a CMC é alcançada com menores concentrações de SDS, em relação ao surfactante puro. Já foi observado³ que quando a concentração do MB^+ é aumentada de 0 para 45 μM , a CMC de SDS diminui de 7 mM para 70 μM conforme pode ser observado na figura 2A. Assim, concentrações em micromolar de MB^+ são suficientes para mudar a CMC em duas ordens de magnitude, o que indica que o MB^+ facilita a formação das micelas.

A diferença na absorção de monômeros e dímeros facilita o cálculo da concentração de cada espécie na solução. A razão entre a absorbância a 580 e 665 nm (A_{580}/A_{665}) dá uma estimativa qualitativa da concentração relativa de dímeros em relação a monômeros. A fig. 2B extraída da referência 3, mostra como varia a razão monômero/dímero de uma solução de azul de metileno titulada com concentrações crescentes de SDS. Nesse trabalho a razão monômero/dímero foi medida por espectroscopia de absorbância e

fluorescência. O monitoramento da formação de dímeros por fluorescência se baseia no fato de que o monômero fluoresce e o dímero, não. Portanto quanto mais agregado houver no meio menor a razão fluorescência observada com uma dada concentração de detergente / fluorescência inicial sem detergente (I_F/f_{580}). Na figura 2B, a curva com símbolos quadrados mostra a razão da absorbância 580nm/665nm em função da concentração de SDS. O aumento da concentração de SDS, abaixo da CMC forma agregados pré-micelares que aprisionam moléculas de corante aos pares e isso leva ao aumento progressivo da razão 580nm/665nm concomitantemente com a diminuição progressiva da I_F/f_{580} (inserto da fig. 2B). A partir de determinada concentração de SDS acima da CMC, o aumento do número de micelas no sistema leva ao progressivo aumento da ocupação das micelas por monômeros do corante o que faz cair progressivamente a razão 580nm/665nm e subir a razão I_F/f_{580} . Como o corante não tem afinidade por CTAB que é positivamente carregado, a razão 580nm/665nm não muda em função da concentração desse detergente (símbolos redondos na Fig. 2B) ³.

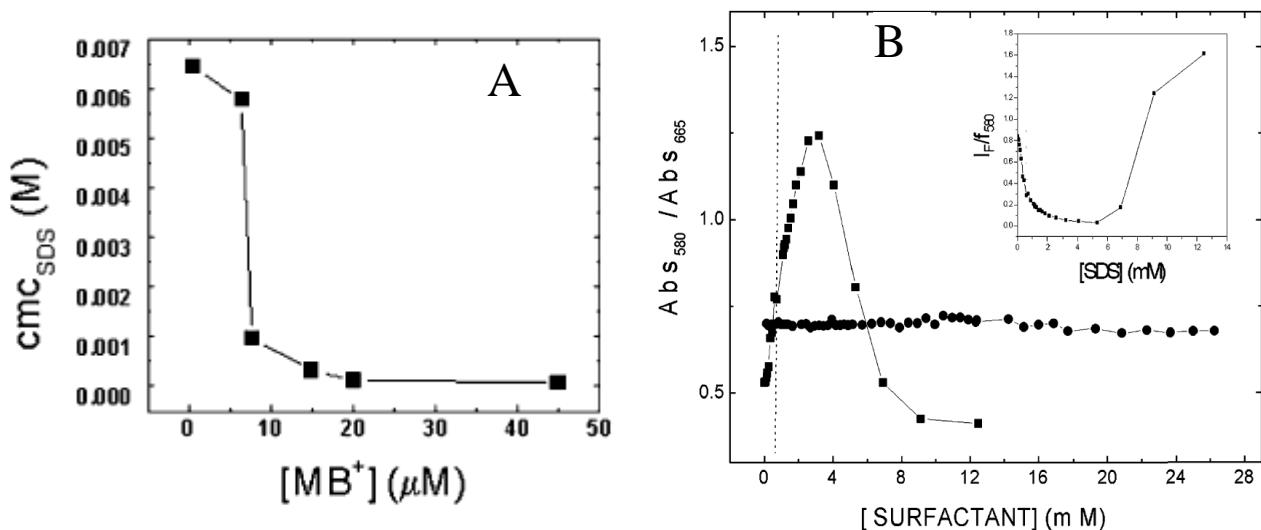


Fig. 2 . A- concentração micelar crítica do SDS em função da concentração de MB^+ . Com o aumento da concentração do MB^+ de 0 para 45 μM , ocorre a diminuição da CMC de SDS de 7 mM para 70 μM . B- razão dos valores de absorbância de MB^+ (8 μM) em 580 e 665 nm em função da concentração de SDS (■) e CTAB (●)³. Para soluções de SDS e MB^+ , a A_{580}/A_{665} aumenta em função do aumento da concentração de SDS até aproximadamente 3 mM e então começa a diminuir, indicando aumento da concentração de dímeros em relação a monômeros, o que é confirmado pela medida de intensidade de fluorescência (I_F/f_{580}) mostrada no inserto. A linha pontilhada na vertical representa a CMC do SDS (0,96 mM). Para solução de CTAB e MB^+ não há alteração na A_{580}/A_{665} . A CMC foi determinada por medida de tensão superficial do sistema.

Para explicar os espectros das soluções de SDS com MB^+ foi utilizada medidas de tensão superficial e a teoria termodinâmica de formação micelar (modelo de pseudo-fase) associadas a uma modelagem matemática que descreve a ligação e dimerização de moléculas de corantes em soluções micelares. Esse modelo emprega as equações de balanço das massas, da relação entre a concentração micelar “local” e a concentração analítica de cada espécie envolvida, bem como da constante de dimerização na fase micelar.

Representação gráfica do Experimento 2 – Parte 2: Medidas qualitativas obtidas pela Espectroscopia UV-Vis para a solução de Azul de Metileno com surfactante.

Espectros padrão de cada condição experimental mostrados de forma comparativa.

Observação : ao analisar os espectros atente para o fato de que cada espectro sobreposto ao outro foi plotado em uma escala diferente na ordenada (y), portanto as intensidades não são comparativas. O eixo y correspondente a cada gráfico está na mesma cor da linha do gráfico. Na legenda está indicado a concentração do surfactante (SDS ou CTAB) e do corante (MB), o “nome” da amostra preparada em aula (por exemplo, A1a) e o caminho óptico da cubeta na qual foi realizada a medida (caso não tenha indicação, o caminho óptico é 1 cm).

Os espectros a seguir correspondem aos dados obtidos de todas as soluções manipuladas na parte II do Experimento 1. Observem a forma e localização dos picos das bandas de absorção de acordo com a concentração de MB^+ , na ausência de surfactante (isto é, solução de MB^+ somente), conforme mostrado na Figura 4 e na Figura 10 e a seguir relate os a presença de MB na forma de monômero ou de dímero (Figura 3). Em seguida observem a forma e localização dos picos das bandas de absorção de acordo com a concentração de MB, na presença das diferentes concentrações de surfactante SDS ou CTAB. Lembrem-se que monômeros e dímeros tem espectros de absorbância distintos e a razão entre a absorbância a 580 e 665 nm (A_{580}/A_{665}) dá uma estimativa de qual forma do corante prevalece no meio. Atentem para o fato de que o corante se associa a micelas e não ao monômero do detergente, ou seja, micelas formadas pelos surfactantes “aprisionam” moléculas de MB^+ . As micelas de SDS, um detergente aniónico, formam uma interface carregada negativamente e tem maior afinidade pelo MB (catiônico) que o CTAB (catiônico). Assim, na modulação desse processo é necessário considerar a razão micela/corante conforme representado na Fig. 3 e para uma estimativa qualitativa de qual forma do corante prevalece no meio é necessário a observação do espectro de absorção no qual deve-se considerar a razão A_{580}/A_{665} .

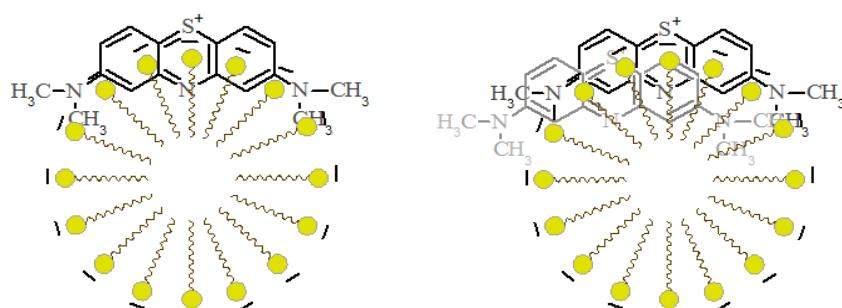


Fig. 3. Representação MB^+ em micela de SDS na razão 1:1 (forma monomérica do corante) e 2:1 (forma dimérica do corante).

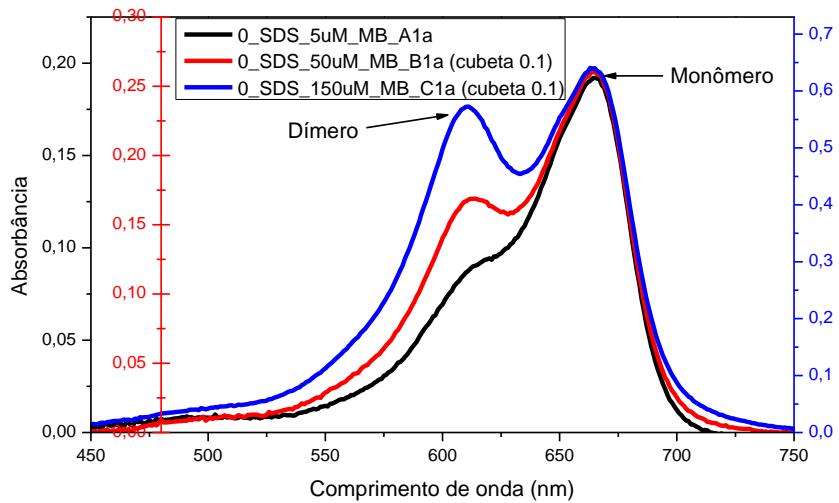


Fig. 4 . Espectros de absorbância das soluções de azul de metileno (MB) com concentrações de 5uM , 50uM e 150uM, sem surfactante (0_SDS).

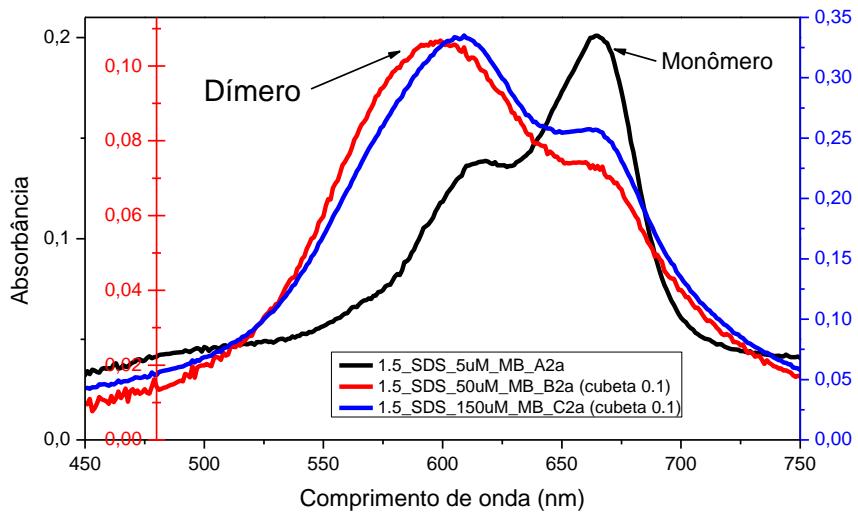


Fig. 5 . Espectros de absorbância das soluções de azul de metileno (MB) com concentrações de 5 μM, 50 μM e 150 μM e concentração de 1,5 mM do surfactante SDS.

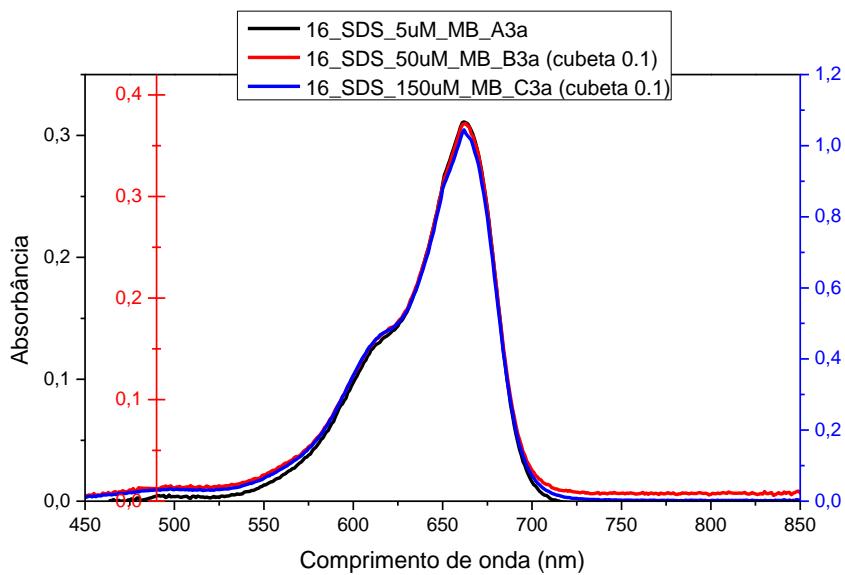


Fig. 6. Espectros de absorbância das soluções de azul de metileno (MB) com concentrações de 5 μM , 50 μM e 150 μM e concentração de 16 mM do surfactante SDS.

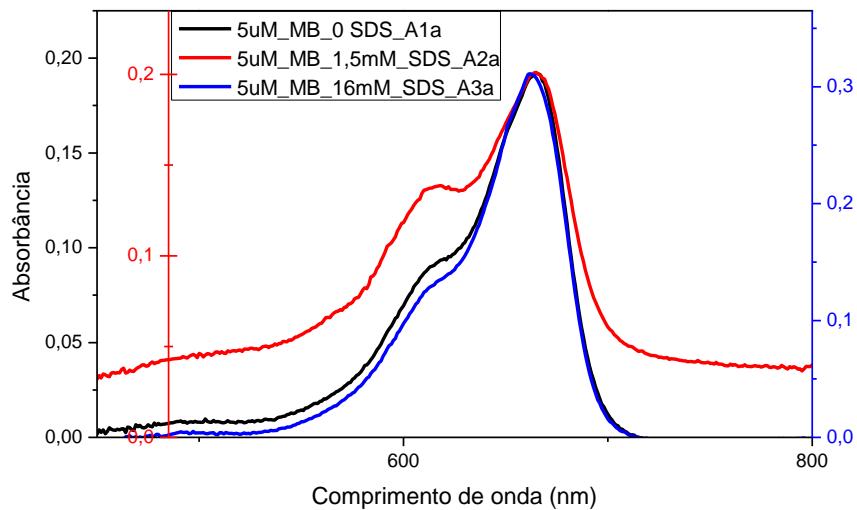


Fig. 7 . Espectros de absorbância das soluções de azul de metileno (MB) com concentração de 5 μM e concentrações de 0 mM, 1,5 mM e 16 mM do surfactante SDS.

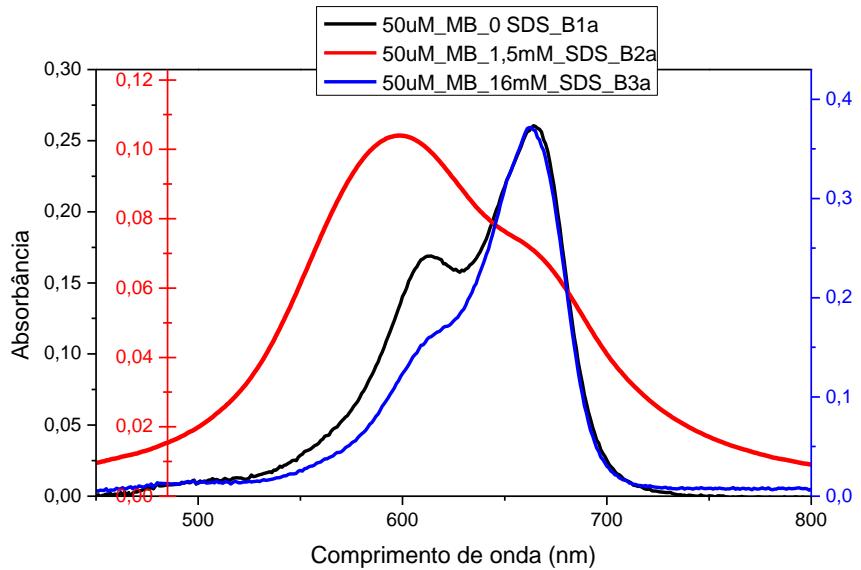


Fig. 8 . Espectros de absorbância das soluções de azul de metileno (MB) com concentração de 50 μM , e concentrações de 0 mM, 1,5 mM e 16 mM do surfactante SDS. O espectros obtidos dos dados adquiridos durante a aula a partir das amostras preparadas pelos alunos deve ser semelhante a esse, considerando as amostras B1a, B2a e B3a.

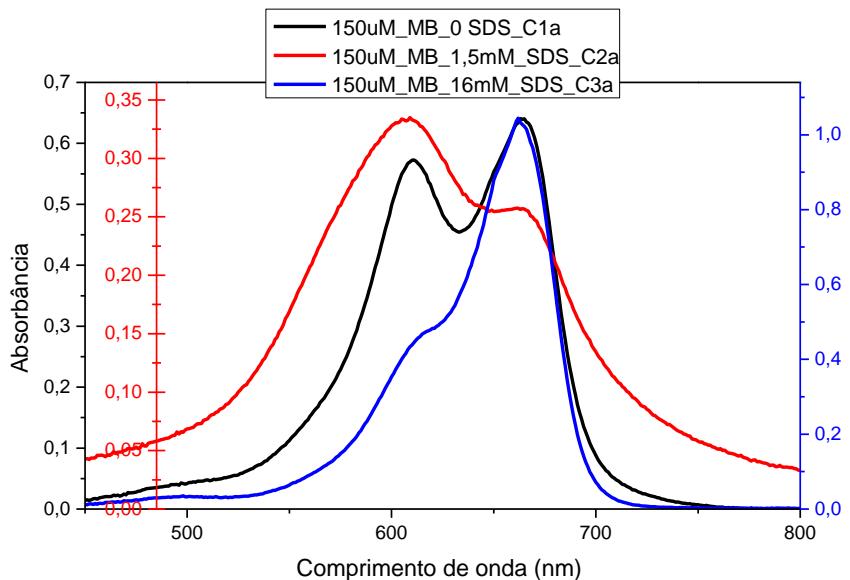


Fig. 9. Espectros de absorbância das soluções de azul de metileno (MB) com concentração de 150 μM , e concentrações de 0 mM, 1,5 mM e 16 mM do surfactante SDS.

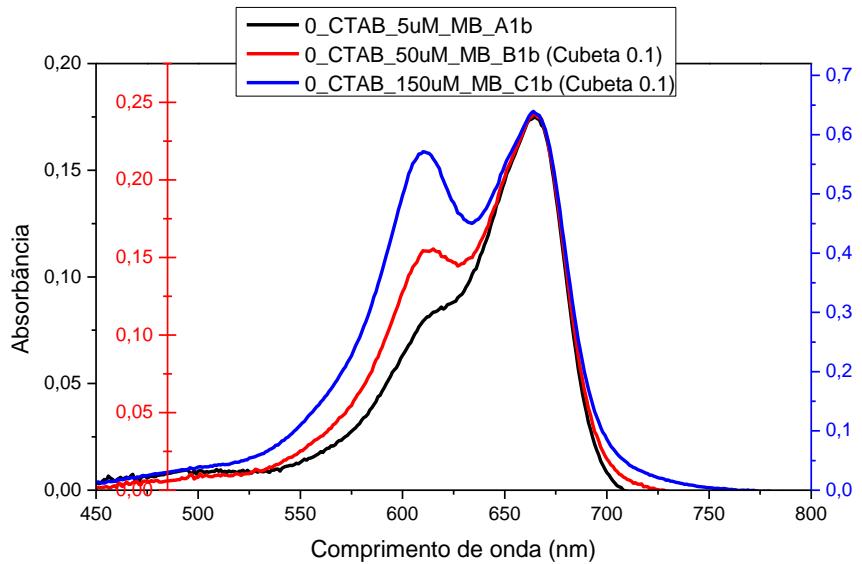


Fig. 10. Espectros de absorbância das soluções de azul de metileno (MB) com concentração de 5 μM , 50 μM e 150 μM e concentração de 0 mM do surfactante CTAB.

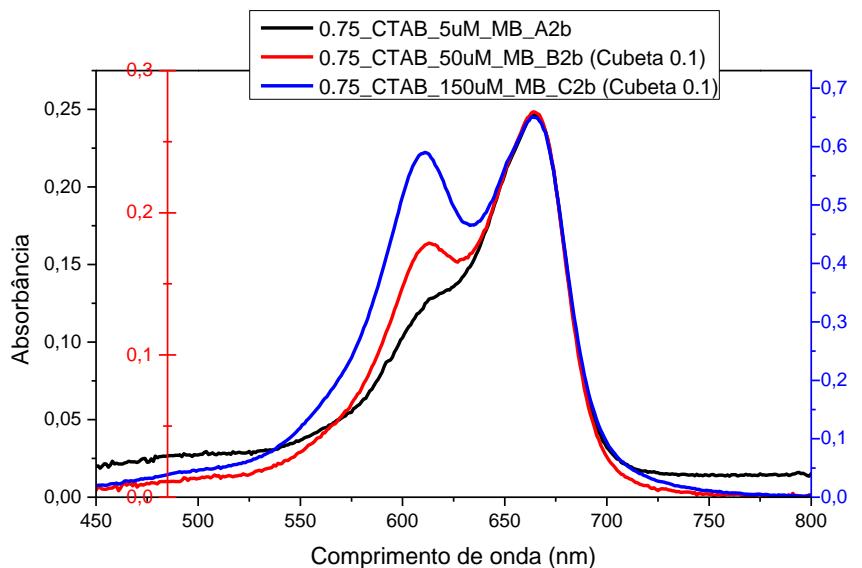


Fig. 11. Espectros de absorbância das soluções de azul de metileno (MB) com concentrações de 5 μM , 50 μM e 150 μM e concentração de 0,75 mM do surfactante CTAB.

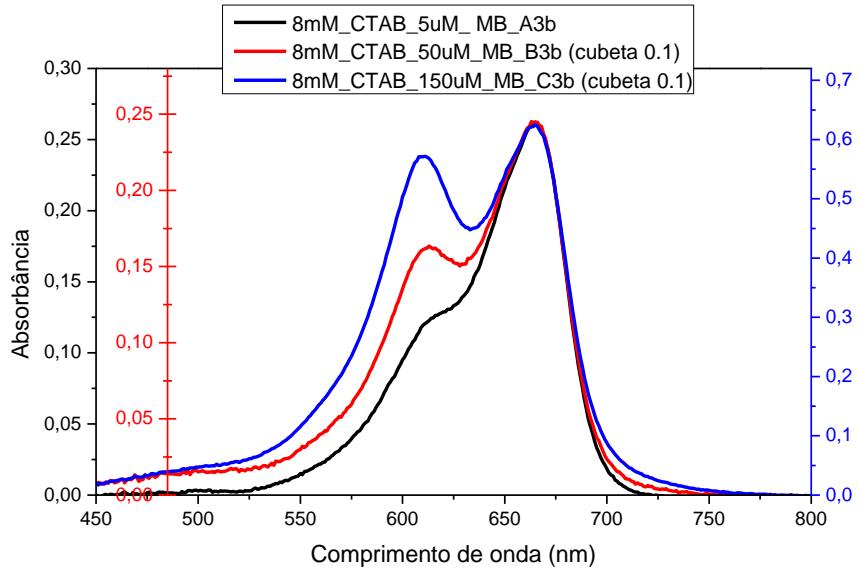


Fig. 12 . Espectros de absorbância das soluções de azul de metileno (MB) com concentrações de 5 μM , 50 μM e 150 μM e concentração de 8 mM do surfactante CTAB.

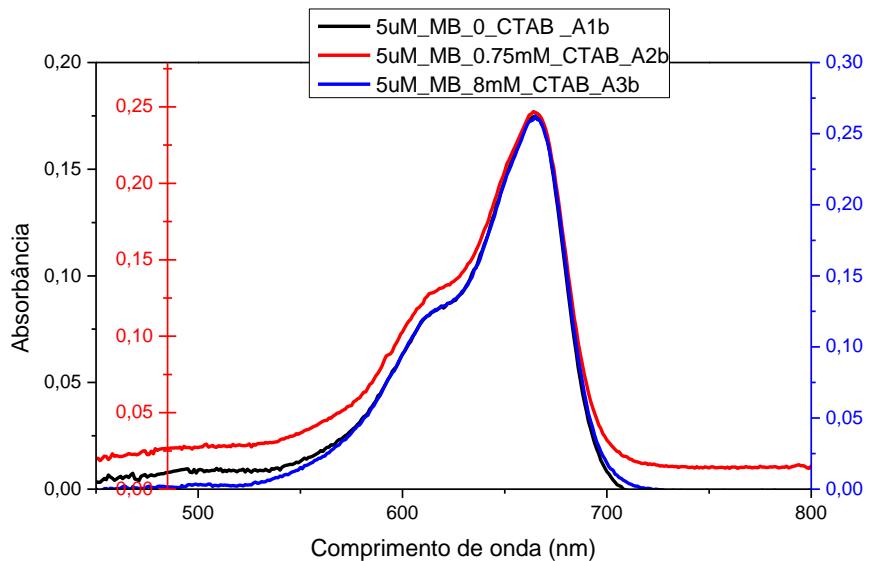


Fig. 13. Espectros de absorbância das soluções de azul de metileno (MB) com concentração de 5 μM , e concentrações de 0 mM, 0,75 mM e 8 mM do surfactante CTAB. O gráfico obtido dos espectros adquiridos durante a aula a partir das amostras preparadas pelos alunos deve ser semelhante a esse, considerando as amostras A1b, A2b e A3b.

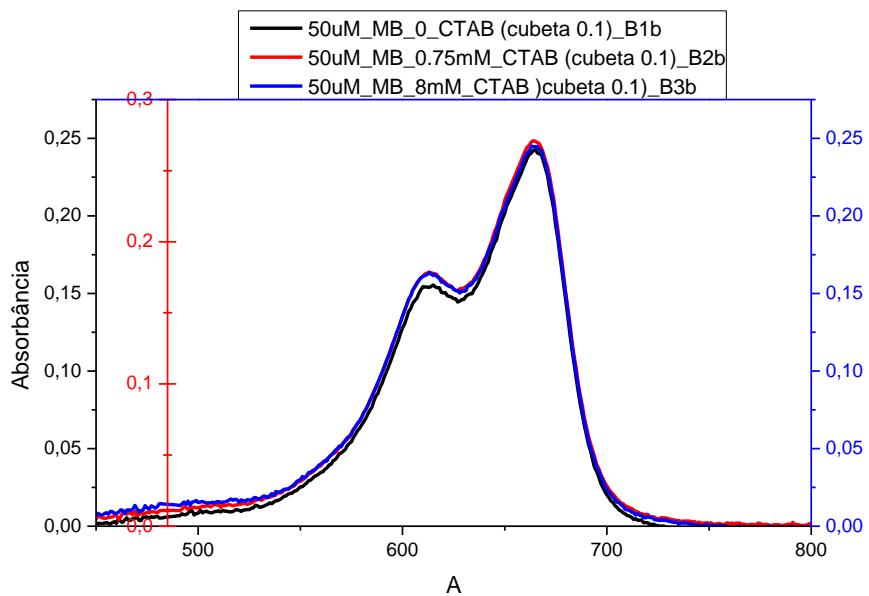


Fig. 14 . Espectros de absorbância das soluções de azul de metileno (MB) com concentração de 50 μM e concentrações de 0 mM, 0,75 mM e 8 mM do surfactante CTAB.

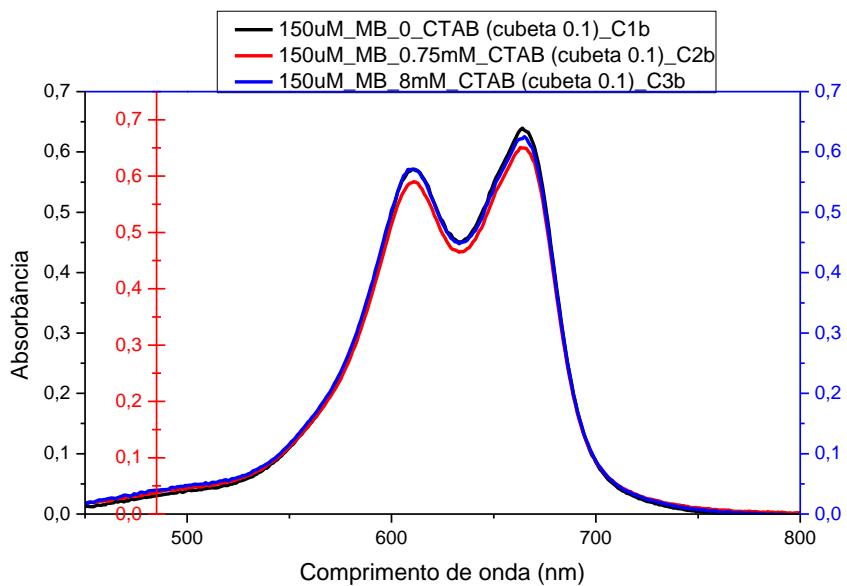


Fig. 15. Espectros de absorbância das soluções de azul de metileno (MB) com concentração de 150 μM e concentrações de 0 mM, 0,75 mM e 8 mM do surfactante CTAB.

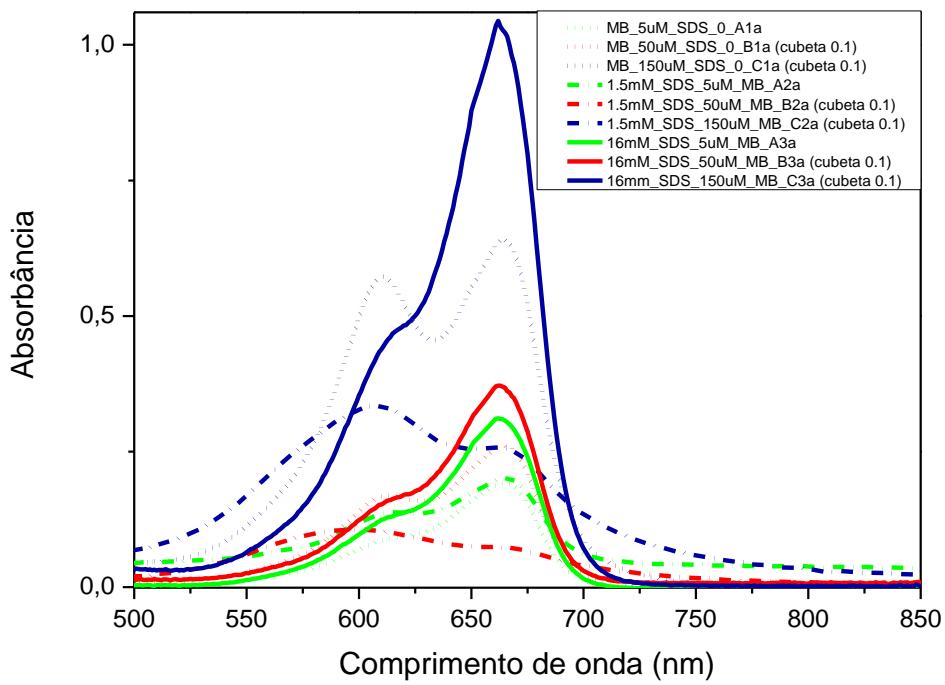


Fig. 16. Espectros de absorbância das soluções de azul de metileno (MB) e do surfactante SDS nas diversas concentrações.

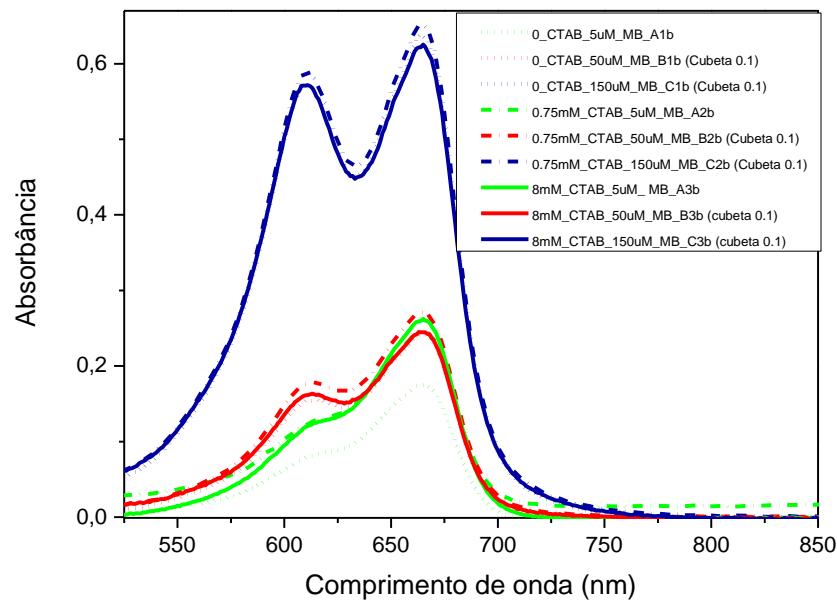


Fig. 17 . Espectros de absorbância das soluções de azul de metileno (MB) e do surfactante CTAB nas diversas concentrações.

Tabela 1 - Volumes de adição referentes às amostras apresentadas nos gráficos

Grupo A – q.s.p. 5 µM de MB						
Reagente	SDS (Aa)			CTAB (Ab)		
	1a	2a (1.5 mM)	3a (16 mM)	1b	2b (0,75mM)	3b (8 mM)
Água	1980 µL	1905 µL	1180 µL	1980 µL	1942,5 µL	1580 µL
Surfactante	0 µL	75 µL	800 µL	0 µL	37,5 µL	400 µL
Azul de Meliteno	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

Grupo B – q.s.p. 50 µM de MB						
Reagente	SDS (Ba)			CTAB (Bb)		
	1a	2a (1.5 mM)	3a (16 mM)	1b	2b (0,75mM)	3b (8 mM)
Água	1800 µL	1725 µL	1000 µL	1800 µL	1762,5 µL	1400 µL
Surfactante	0 µL	75 µL	800 µL	0 µL	37,5 µL	400 µL
Azul de Meliteno	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL

Grupo C – q.s.p. 150 µM de MB						
Reagente	SDS (Ca)			CTAB (Cb)		
	1a	2a (1.5 mM) 4 mL	3a (16 mM)	1b	2b (0,75mM)	3b (8 mM)
Água	1400 µL	1325 µL	600 µL	1400 µL	1362,5 µL	1000 µL
Surfactante	0 µL	75 µL	800 µL	0 µL	37,5 µL	400 µL
Azul de Meliteno	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL

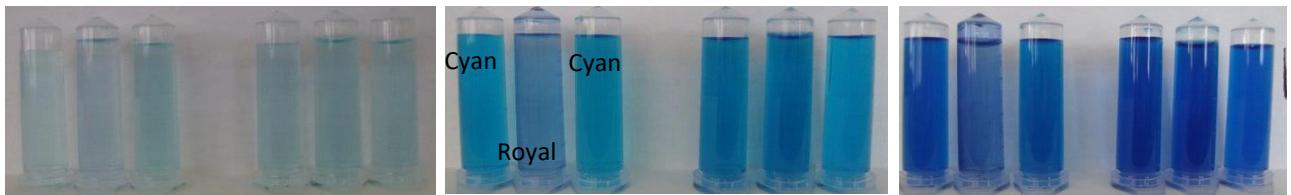


Fig. 18 . Fotos das soluções referentes à Tabela 1 e aos gráficos apresentados. Em cada foto, os tubos Eppendorfs da esquerda contém 0; 1,5 e 16 mmol/L de SDS e os da direita contém 0; 0,75 e 8 mmol/L de CTAB. Nas fotos da esquerda, centro e direita, as concentrações de azul de metileno são respectivamente, 5, 50 e 150 mmol/L. Observar as diferenças de tonalidade de azul. A tonalidade *royal* indica predominância de dímeros do corante e a tonalidade *cyan* indica predominância de monômero do corante.

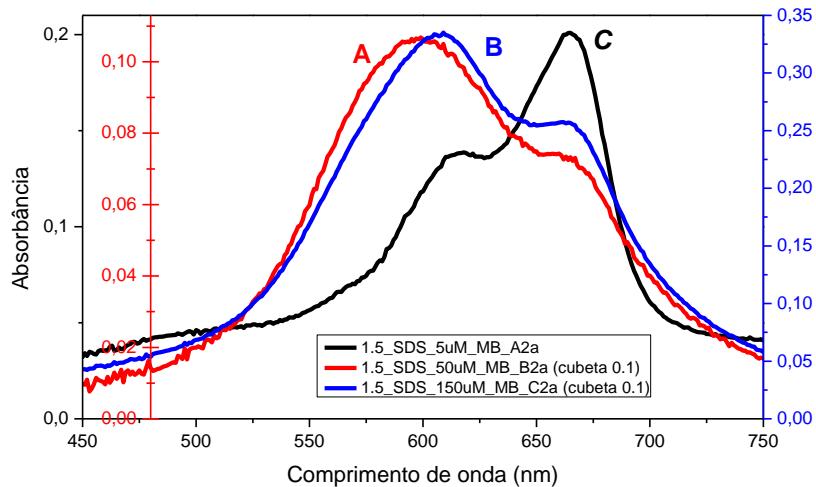
Exercícios

1) Analise os gráficos apresentados para o surfactante SDS, os quais estão todos representados na Figura 16, e as imagens da Figura 18. Considere os espectros A, B e C mostrados abaixo, que correspondem a diferentes condições de soluções aquosas de azul de metileno (MB) e indique o estado de agregação predominante e a tonalidade de cor da solução correspondente a cada espectro.

A-Estado de agregação e tonalidade da cor.

B-Estado de agregação e tonalidade da cor.

C-Estado de agregação e tonalidade da cor



Obs: Ao analisar os espectros desconsidere a intensidade de absorbância, está sendo feita uma análise apenas qualitativa. Cada espectro sobreposto ao outro foi plotado em uma escala diferente na ordenada (y), portanto as intensidades não são comparativas. Os valores do eixo y correspondente a cada gráfico estão na mesma cor da linha do gráfico.

Considere as condições listadas abaixo, em relação às possíveis combinações quanto à concentração de MB (baixa ou alta em relação a indução de sua própria agregação ou para modificar a CMC do SDS), concentração de micelas (excesso ou não) e a razão micela/corante (forma monomérica ou dimérica do corante na micela), e indique para cada uma delas a característica de seu respectivo espectro, ou seja, se será semelhante ao espectro A, B ou C.

- a- 50 microM azul de metileno em água: _____
- b- 50 microM azul de metileno em 1.5 mM SDS: _____
- c- 50 microM azul de metileno em 16 mM SDS: _____
- d- 5 microM azul de metileno em água: _____
- e- 5 microM azul de metileno em 16 mM SDS: _____
- f- 150 microM de MB em água: _____

Desafio: Explique o que levou a amostra de azul de metileno 150 microM em 1.5 mM SDS apresentar mais monômeros do que a amostra de menor concentração do corante, ou seja, 50 microM em 1.5 mM SDS.

2) Um analista recebeu uma amostra de albumina bovina (BSA) e precisou determinar a concentração da solução antes de fazer os ensaios necessários. Para isso, fez uma análise por espectroscopia UV-Visível (espectrofotômetro de varredura) seguindo o protocolo:

A- adicionar água em uma cubeta de caminho óptico 1 cm e fazer o branco;

B- descartar a água e adicionar a amostra concentrada na mesma cubeta. Fazer o espectro da amostra.

O resultado encontrado foi um espectro muito ruidoso (Figura 17 , linha preta).

Após observar esse resultado, o analista resolveu diluir 8 vezes a amostra (125 µL de amostra + 875 µL de água deionizada) e fazer uma nova leitura usando a mesma cubeta (Figura 17, linha vermelha).

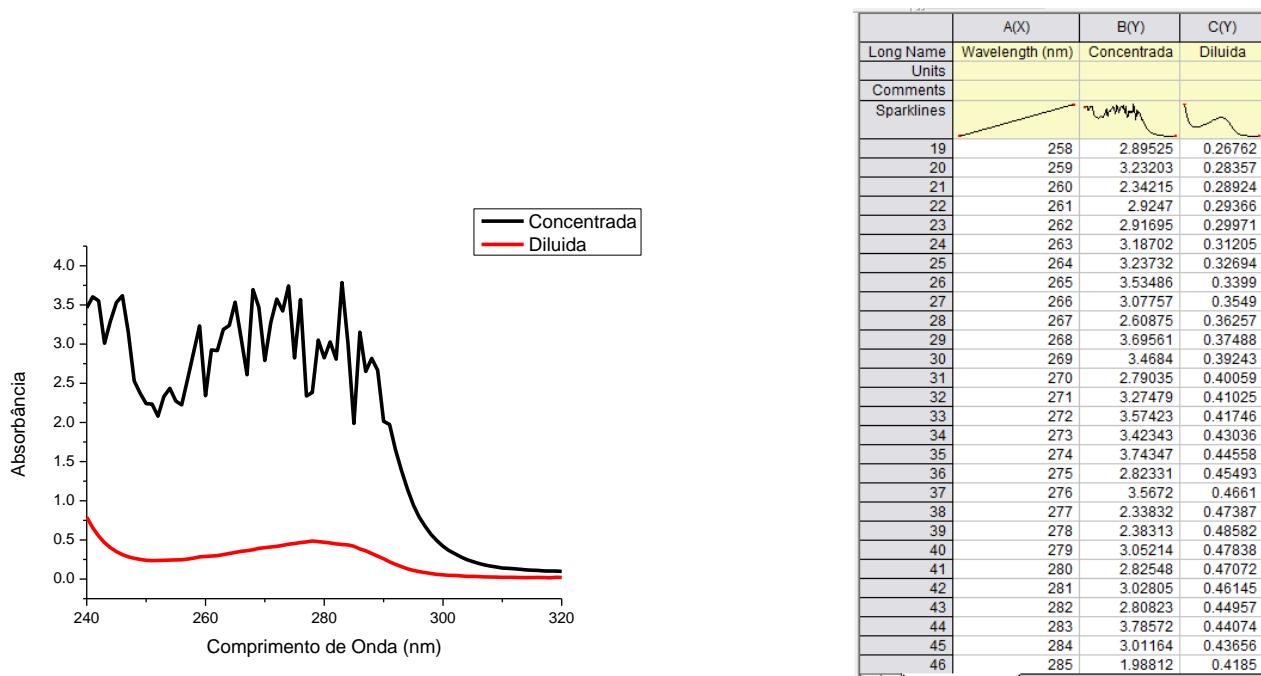


Fig. 17. Direita: Espectros UV-Vis de BSA em água. Linha preta: amostra concentrada. Linha vermelha: Amostra diluída. Esquerda: valores de absorbância das amostras concentrada e diluída nos devidos comprimentos de ondas (wavelength).

Sabendo que a BSA tem $\epsilon_{280\text{nm}} = 38360 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Calcule a concentração original da amostra de BSA e explique de forma sucinta por que ela precisou ser diluída.

Referências Bibliográficas

1. PUNGOR, E. A practical guide to instrumental analysis. Boca Raton: CRC Press, c1995.384.
2. VOET, D; VOET, J.G. *Bioquímica*, 3 ed., Porto Alegre: Artmed, 2006.
- 3 . JUNQUEIRA, H. C.; SEVERINO, D.; DIAS, L. G.; GUGLIOTTI, M. S.; BAPTISTA, M. S. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* (4) 2320–2328, 2002.
- 4 . TARDIVO J. P.; GIGLIO A. D.; OLIVEIRA C. S.; GABRIELLI D. S.; JUNQUEIRA H. C.; TADA D. B.; SEVERINO D.; TURCHIELLO R. F. and BAPTISTA M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2, 175-191, 2005.
5. BAADER, W. J.; STEVANI, C. V.; BECHARA, E. J. H. Fotoquímica “sem Luz”? *Rev. Virtual Quim.*, 7 (1), 74-10, 2015. Publicado em: 12 de dezembro de 2014. Disponível em <http://rvq.sbj.org.br/index.php/rvq/issue/view/41>. Acesso em 30/08/2016.
6. FIORAVANTI, C. ‘Resíduos de melanina danificam DNA’. *Pesquisa FAPESP On-line*. Publicado em 19/02/2015. Disponível em <http://revistapesquisa.fapesp.br/2015/02/19/residuos-de-melanina-danificam-dna/>. Acesso em 02/08/2016.
7. PREMI, S. *et al.* Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. *Science*, v. 347, n. 6224, p. 842-847. 19 fev 2015.
8. BECHARA, E. J. H. Luz, imagem, ciência – “Foto” química sem luz ? Disponível em http://boletim.sbj.org.br/anexos/ail/ail_bechara-A4.pdf
9. VIVIANI, V.R. ‘Luciferases: as enzimas da luz’. *Ciência Hoje On-line*. Publicado em 01/10/2004 . http://www.cienciahoje.org.br/revista/materia/id/40/n/luciferases:_as_enzimas_da_luz . Acesso em 02/08/2016.
10. MORGOUNOVA, E.; QI SHAO; HACKEL, B. J.; THOMAS, D. D. and ASHKENAZI, A. Photoacoustic lifetime contrast between methylene blue monomers. *Journal of Biomedical Optics* 18(5), 056004 (May 2013)
11. Mente – e proteinas – que brilham. Ciência Hoje On-line. Disponível em <http://www.cienciahoje.org.br/noticia/v/ler/id/2158/n/mentes - e proteinas - que brilham>. Acesso em 02/08/2016.
12. Luz animal. *Ciência Hoje On-line*. Disponível em http://www.cienciahoje.org.br/noticia/v/ler/id/1354/n/luz_animal. Acesso em 02/08/2016.
13. O big bang da evolução. *Ciência Hoje On-line*. Disponível em http://www.cienciahoje.org.br/noticia/v/ler/id/2974/n/o_big_bang_da_evolucao. Acesso em 02/08/2016.
14. Fotossíntese sintética. *Ciência Hoje On-line*. Disponível em http://www.cienciahoje.org.br/noticia/v/ler/id/1513/n/fotossintese_sintetica. Acesso em 02/08/2016.
15. ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Quím. Nova* 21(6):787-793, 1998

Experimento 3 – Propriedades ácido-base das proteínas e seus efeitos sobre a solubilidade das mesmas: Aplicação na purificação de proteínas.

Abstract

This educational experiment has the purpose of making the students of Biochemical Transformations understand that the side chains of the amino acid residues contribute to the properties of a protein. The basic properties of proteins depend on their amino acid composition and may be useful for separation and purification thereof using techniques that exploit the net charge of a protein as a function of pH. A strategy for the purification of a protein is the precipitation at the pH in which the net charge of the protein is zero (pI). One can use different strategies to precipitate proteins at the pI such as the use of organic solvents or the polymer polyethylene glycol. At the pI, the solubility of a protein can be increased by adding salt constituting the salting-in phenomenon. At pH higher than pI, a protein can be precipitated by the addition of salt at high concentrations (salting out). The specific pI values of each protein can also be used to separate a mixture of proteins by electrophoresis and electrofocusing.

Resumo

Este experimento didático tem como proposta fazer com que os estudantes de *Bioquímica: estrutura, propriedades e funções de Biomoléculas* entendam que os aminoácidos constituintes de uma proteína contribuem para as propriedades das mesmas por meio de suas cadeias laterais. As propriedades ácido-base das proteínas dependem de sua composição de aminoácidos e podem ser usadas para separação e purificação das mesmas por meio de técnicas que exploram a variação de carga de uma proteína em função do pH do meio. Uma técnica de purificação de proteínas é a precipitação no pH no qual a carga líquida da proteína é igual a zero (pI). Pode-se utilizar diferentes estratégias para precipitar proteínas no pI como por exemplo o uso de solventes orgânicos ou o polímero polietilenoglicol. No pI, a solubilidade de uma proteína pode ser aumentada pela adição de sal constituindo o fenômeno de *salting-in*. Em pH diferente do pI, uma proteína pode também ser precipitada pela adição de sal em altas concentrações (*salting out*). Os valores de pI específicos de cada proteína também permitem separar uma mistura de proteínas por meio de eletroforese e eletrofocalização.

Introdução

Aminoácidos

Em química, um aminoácido é qualquer molécula que contém simultaneamente grupos funcionais amina e ácido carboxílico. Em bioquímica^{1,2,3,4}, este termo é usado como termo curto e geral para referir os α -aminoácidos, ou seja, ácidos carboxílicos em que as funções amino estão ligadas às posições α (ou posição 2 em relação à carboxila).

Na natureza existem cerca de 200-300 aminoácidos, entretanto, somente 21 são utilizados para a síntese de proteínas (aminoácidos proteinogênicos) e outros aparecem como intermediários de vias metabólicas. Dentre estes, 8 são chamados aminoácidos essenciais, isto é, não podem ser sintetizados pelo organismo humano, e precisam ser obtidos a partir dos alimentos de origem animal ou vegetal. Os demais são chamados de não essenciais. Há um aminoácido, a taurina, que está presente nos organismos superiores, mas não na constituição das proteínas.

- ✓ Aminoácidos essenciais (não sintetizados pelo organismo humano): isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina.
- ✓ Aminoácidos não-essenciais (sintetizados pelo organismo humano): arginina, alanina, asparagina, cisteína, glicina, glutamina, histidina, prolina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina e tirosina.

Contudo, esta classificação não pode ser tomada como algo geral para todos os organismos superiores e em todas as etapas de seus ciclos de vida. Em crianças, por exemplo, os aminoácidos cisteína, tirosina, histidina e arginina são considerados *semi-essenciais* uma vez que as etapas metabólicas para sintetizar estes aminoácidos não estão completamente desenvolvidas. Portanto, esta classificação de *essencial* e *não-essencial* não reflete a importância destes α -aminoácidos, uma vez que, todos os 21 α -aminoácidos são necessários na constituição de proteínas e peptídeos, consequentemente, de toda a matéria viva.

O aminoácido mais simples é a glicina (Figura 1), e possui apenas um átomo de hidrogênio em sua cadeia lateral. A alanina vem a seguir, com um grupamento metila. Cadeias laterais hidrocarbonadas maiores são encontradas na valina, leucina e isoleucina. A prolina também tem uma cadeia lateral alifática, mas difere dos outros membros do “conjunto dos vinte” por sua cadeia lateral ser ligada tanto ao nitrogênio quanto ao átomo de carbono . Esta resultante estrutura

cíclica influencia fortemente a arquitetura das proteínas. Três aminoácidos com cadeias laterais aromáticas fazem parte do “conjunto dos vinte”. A fenilalanina contém um substituinte fenila ligado a um grupamento metíleno. O anel aromático da tirosina contém uma hidroxila, o que torna a tirosina menos hidrofóbica do que a fenilalanina. O triptofano tem um anel indólico ligado a um grupamento metíleno. Dois aminoácidos, serina e treonina, contêm hidroxilas alifáticas, o que as tornam muito mais hidrofílicas e reativas. Vamos agora aos aminoácidos com cadeias laterais muito polares, sendo altamente hidrofílicos. A lisina e a arginina têm cargas positivas em pH neutro. A histidina pode não ter carga ou tê-la positiva, dependendo de seu ambiente local. As cadeias laterais da arginina e da lisina são as mais longas no “conjunto dos vinte”.

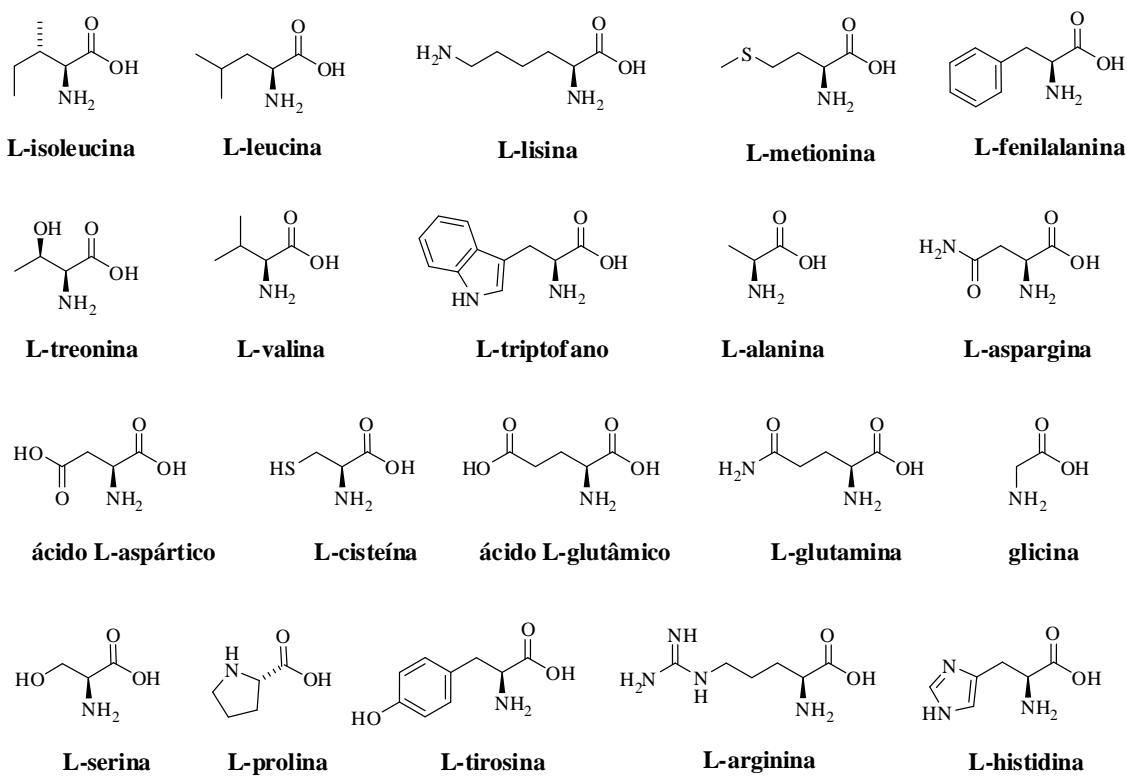


Fig. 1. Estrutura dos 20 L-aminoácidos encontrados em proteínas. O vigésimo primeiro aminoácido, não representado aqui é a selenocisteína. Nesse aminoácido, o átomo de enxofre da cisteína é substituído por um átomo de selênio.

Existem dois aminoácidos com cadeias laterais ácidas, o ácido aspártico e o ácido glutâmico. Esses aminoácidos são geralmente chamados de aspartato e glutamato para salientar que suas cadeias laterais têm, quase sempre, cargas negativas no pH fisiológico. A glutamina e a asparagina são derivados não carregados de glutamato e aspartato que contêm uma amida terminal em vez de um carboxilato. Sete dos vinte e um aminoácidos têm cadeias laterais facilmente ionizáveis. Um átomo de enxofre está presente nas cadeias laterais de dois

aminoácidos. A cisteína contém uma sulfidrila (-SH) e a metionina possui um átomo de enxofre em uma ligação tioéter (-S-CH₃). Ambas as cadeias laterais que contêm enxofre são hidrofóbicas. Deve-se destacar que a maioria destes aminoácidos presentes em proteínas possui pelo menos um centro quiral definido com estereoquímica (S) com exceção da cisteína que é (R) (notações de Cahn-Ingold-Prelog) e da glicina que não possui centro quiral (Figura 1); ainda, todos os aminoácidos comuns em proteínas são freqüentemente denominados L-aminoácidos, baseados na nomenclatura do gliceraldeído (configurações de Fisher). Estas características conferem a estes compostos uma grande diversidade química e estrutural, permitindo que estes possam constituir uma gama enorme de diferentes proteínas com diferentes arranjos espaciais e as mais diversas funções (Figura 2).

Alguns autores relatam que para formar uma proteína é necessária uma cadeia com mais de 70 aminoácidos. Já os peptídeos (“fragmentos de proteínas”) podem ser formados por dois ou mais aminoácidos.

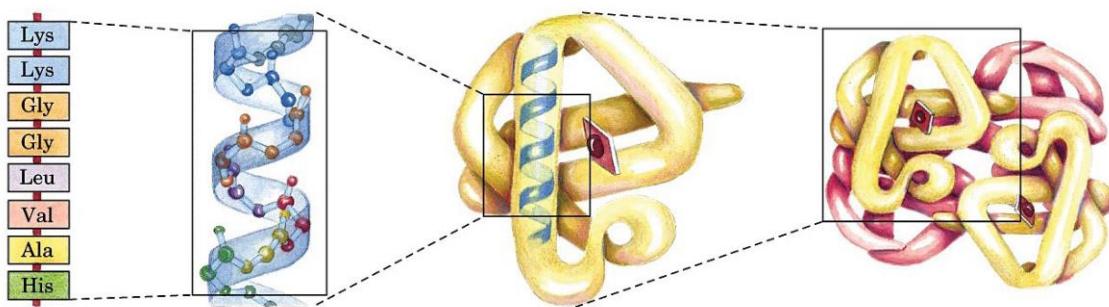
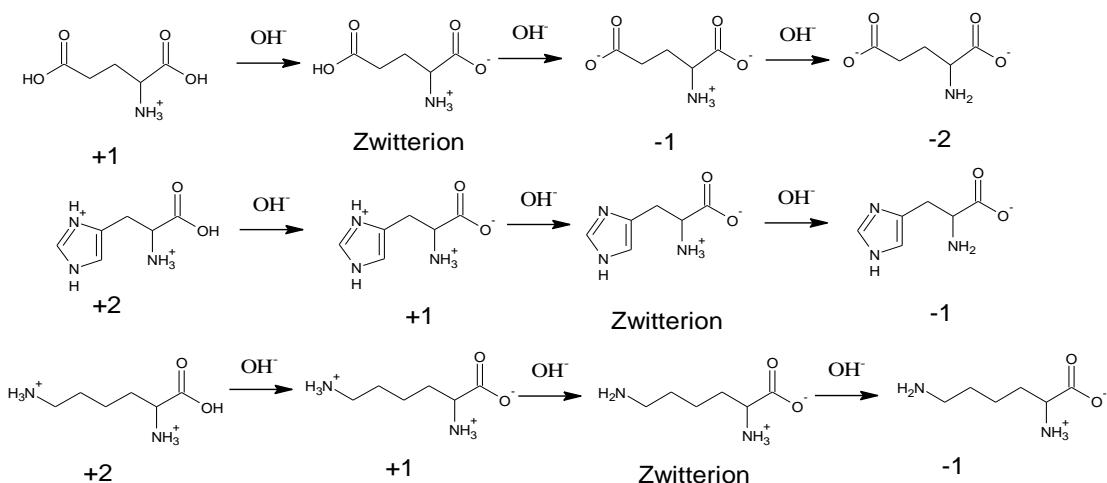


Fig. 2. Esquema representativo dos diferentes níveis de estrutura protéica da hemoglobina¹

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Propriedades ácido-base dos aminoácidos e proteínas

Os aminoácidos na forma livre possuem, no mínimo, dois grupos ionizáveis, que são os grupos α -carboxílico e α -amino. Alguns aminoácidos possuem um terceiro grupo ionizável na cadeia lateral. Os aminoácidos com cadeias laterais com grupos ionizáveis tais como lisina, arginina, glutamato, aspartato, histidina, cisteína e tirosina são os responsáveis pelas propriedades ácido-base das proteínas. Ao se fazer a titulação de um aminoácido com uma base forte na escala de pH de zero a 14, o aminoácido atuará como um tampão e apresentará alterações de carga líquida de sua estrutura conforme ilustrado abaixo.



Assim, os aminoácidos atuam como tampões duplos ou triplos. Abaixo temos o exemplo da curva de titulação da histidina na qual se observa a máxima capacidade tamponante exibida por esse aminoácido em 3 faixas de pH: de 0,8 a 2,8, de 5 a 7 e de 8,2 a 10,2.

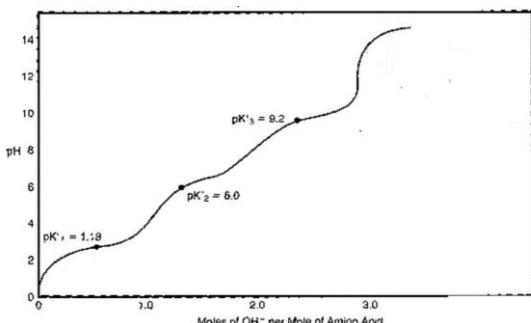


Fig. 3. Curva de titulação da histidina.

Quando os aminoácidos estabelecem as ligações peptídicas, suas cadeias laterais não perdem as propriedades de ionização, porém, podem ter seus valores de pK_a bastante alterados devido à vizinhança de outros grupos carregados. Assim, em um peptídeo ou em uma proteína, os grupos ionizáveis serão o *N*-terminal, o *C*-terminal e as cadeias laterais ionizáveis dos aminoácidos. Abaixo vemos o efeito da titulação, com uma base forte, de um peptídeo formado pelos mesmos 3 aminoácidos mostrados acima. Nesse caso, verificamos que a carga líquida também varia com o pH do meio e em um determinado pH o peptídeo também ficará na forma zwitterionica.

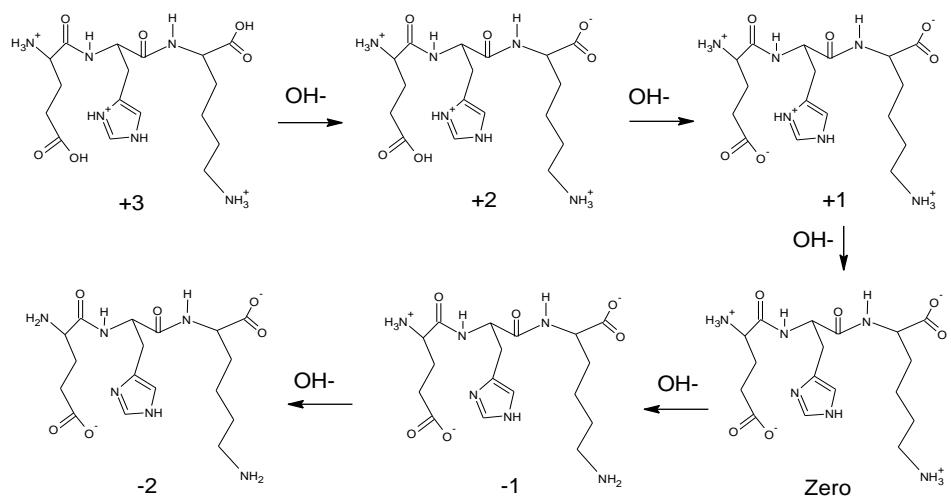


Fig. 4. Formas iônicas formadas durante a titulação de glutamilhistidinillisia com base forte.

No ponto isoelétrico, uma proteína apresenta carga líquida igual a zero e essa propriedade pode ser utilizada para separar e purificar proteínas. Uma estratégia bastante usada em proteômica é a eletrofocalização na qual uma mistura de proteínas é colocada em uma matriz (fita) que apresenta diferentes valores de pH ao longo de sua extensão. Ao submeter a amostra, nesse meio, a uma diferença de potencial, as proteínas migrarão para o polo oposto ao de sua carga líquida no pH da região de partida e estacionarão na região da fita no qual o pH é igual ao seu pI. Em seguida, efetua-se a separação das proteínas de mesmo pI e massas moleculares diferentes submetendo a amostra a uma eletroforese em sentido perpendicular (Fig.5). Essa técnica é chamada de eletroforese bidimensional.

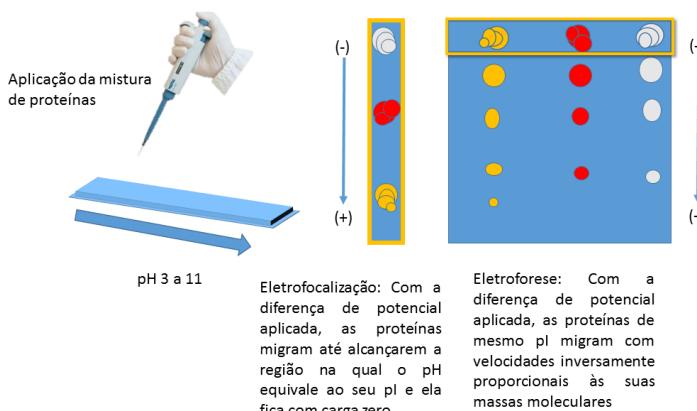


Fig. 5. Eletroforese bidimensional.

A precipitação de proteínas pode ser induzida por: adição de sais (Precipitação salina), adição de solventes, variação de pH (Precipitação isoelétrica) e adição de polímeros sintéticos. Esse último parece ter efeitos diferentes quando combinado com variação de pH e adição de sais e o mecanismo ainda não está totalmente elucidado. Sais se dissociam em solução aquosa e competem com as proteínas pela água de solvatação. Em baixa concentração salina, a

solubilidade das proteínas aumenta, pois os íons do sal ajudam a reforçar a camada de solvatação (*salting in*). Em alta concentração salina, a solubilidade das proteínas diminui pois os íons do sal competem pelas moléculas de água disponíveis para formar a sua própria camada de solvatação (*salting out*). Sais com ânions divalentes são mais eficientes do que os monovalentes na precipitação de proteínas. Solventes miscíveis com a água diminuem a constante dielétrica do meio e desorganizam a camada de solvatação das proteínas. Os mais utilizados são etanol e acetona. Proteínas colocadas em meio com pH igual ao seu pI tendem a precipitar, pois tendo carga neutra, suas moléculas não se repelem e tendem se agragar.

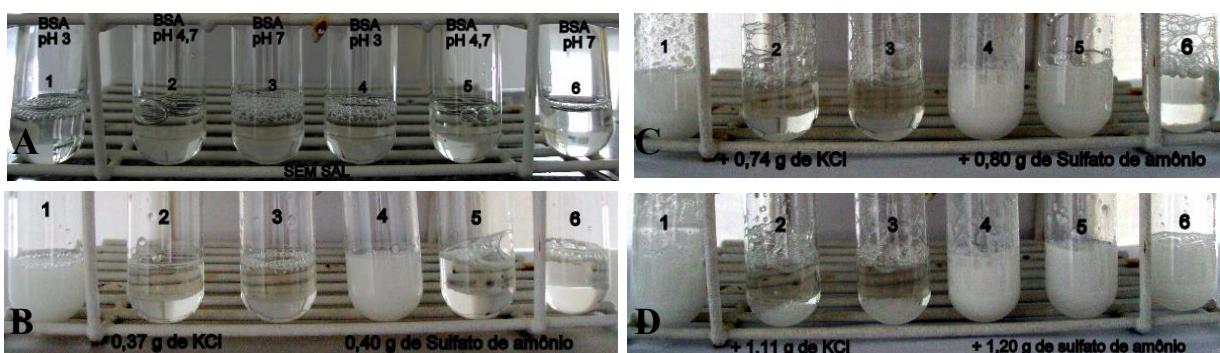


Fig. 6: Solubilidade da albumina modulada pelo pH do meio, de valor abaixo, igual e acima de seu pI (4,7) e pela adição salina (dois diferentes sais em diferentes concentrações). Em A, soluções de albumina bovina (BSA) em tampão acetato de potássio nos valores de pH indicados nos tubos, ou seja, 3, 4,7 e 7,0, respectivamente nos pares de tubos, 1/4, 2/5 e 3/6; em B, temos os tubos nas mesmas condições descritas para o quadro A, com a diferença que 0,37 g de KCl e 0,40 g de sulfato de amônio foram adicionadas os tubos 1, 2, 3 e 4, 5, 6, respectivamente. Em C e D as condições são idênticas às de B, exceto pelas concentrações de sal adicionadas que foram 0,74 g de KCl e 0,80 g de sulfato de amônio (C) e 1,11 g de KCl e 1,20 g de sulfato de amônio (D).

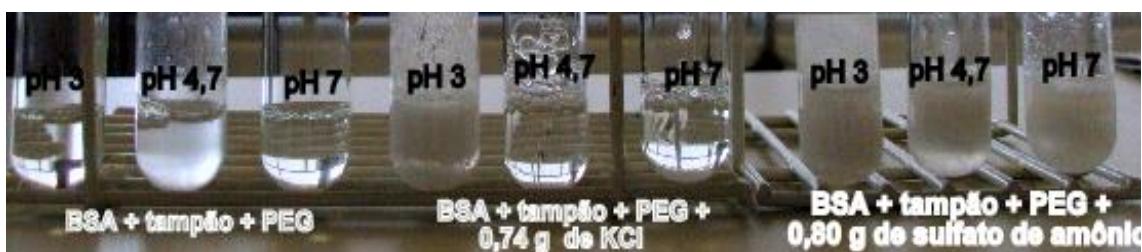


Fig. 7: Solubilidade da albumina em valores de pH do meio abaixo, igual e acima de seu pI (4,7), e modulada pela adição do polímero sintético polietilenoglicol na ausência e presença de sais de ânions monovalentes e divalentes (cloreto de potássio e sulfato de amônio, respectivamente): Cada tubo de ensaio contém 1,5 mL de solução de albumina bovina (BSA) em tampão acetato de potássio nos pHs 3, 4,7 e 7 e 0,5 ml de solução de PEG 4000 40%, seguida da adição de 0,74 g de KCl e de 0,80 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

No pI, uma proteína apresenta a mais baixa solubilidade em meio aquoso e pode ser facilmente precipitada pelo uso de solventes ou do polímero polietilenoglicol. Os fatores que

governam a precipitação da albumina pelo polímero sintético polietilenoglicol (PEG) foi previamente investigado por Ingham (1978)⁵ para determinar as bases moleculares da precipitação de proteínas por polímeros sintéticos. A concentração de PEG 4000 requerida para precipitação da albumina foi mínima no ponto isoelétrico da proteína. Porém, o aumento da concentração de sal desviou para valores mais altos a quantidade de PEG necessária para precipitação no pI. Efeito oposto do sal foi observado em pH abaixo do pI. Assim, essa propriedade pode ser explorada no processo de separação e purificação de proteínas. Se tivermos, por exemplo, uma mistura de duas proteínas sendo uma com pI = 4 e outra com pI = 7, podemos nos valer do uso de PEG para separá-las. Se ajustarmos o pH para um valor igual ao pI de uma delas e adicionarmos PEG, a proteína que esteja no pI irá precipitar em grande quantidade e a outra proteína permanecerá em solução. O uso de polietilenoglicol para precipitação de albumina no pI e o efeito de sal na solubilidade da albumina será o tema da presente aula.

Objetivo

Verificar o efeito da adição de polietilenoglicol sobre a solubilidade da albumina modulada pelo pH do meio (abaixo, igual e acima de seu pI), em condições de baixa e alta força iônica, para tanto, ajustaremos o pH da solução de proteína com KOH.

Materiais

Por grupo (para os 6 tubos de ensaio)

- 3,0 mL de solução aquosa de PEG (polietilenoglicol) 4000 40%,
- 14 mL de tampão acetato de potássio (H_3CCOOK) (0,2 M) preparado com ácido acético glacial
- 2,5 mL BSA (*Bovine serum albumin* – albumina bovina) (270 mg/mL),
- Solução de KOH (hidróxido de potássio) (1 M)
- Solução de HCl (1M)
- 2 copos de Becker de 10 mL cada, um identificado como “com PEG” e outro “pH 3”
- 1 copo de Becker de 25 mL.
- 1 bastão de vidro
- 1 estante para tubos de ensaio com 6 tubos numerados de 1 a 6,
- Pipetas automáticas de 10000, 1000, 200 e 10 μL com respectivas ponteiras,
- Medidor de pH (pHmetro).

Uso coletivo

- KCl (cloreto de potássio),
- Papel de alumínio (para pesar o KCl),
- Balança,

Observações para os técnicos de laboratório

- Solução aquosa de PEG a 40% : Em um bêquer, pesar a massa de PEG 4000, correspondente a 40% para o volume total da solução desejada (ex. 100 mL de solução, adicionar 40 g de PEG 4000). Nesse recipiente adicionar um pouco de água, observando o limite do volume total da solução e solubilizar o PEG 4000 sob aquecimento a 50 °C e agitação. Transferir o volume para o balão volumétrico e completar com água.
- O tampão acetato de potássio (200mM) é preparado com ácido acético glacial e titulado com KOH ou KCl até o valor de pH desejado. Vale ressaltar que o tampão acetato de potássio possui pKa 4,7 e portanto a faixa de máximo tamponamento fica entre 3,7 e 5,7. Ácido acético e acetato são as formas ácido e base conjugada do tampão acetato cujas proporções determinam o pH da solução tamponada. No caso específico dessa aula deverá ser preparada a solução com ácido acético glacial (0,2 mol/L) e, durante o experimento, os alunos irão acrescentar o KOH ou HCl, caracterizando assim o tampão acetato de potássio. Para preparar essa solução é só usar a fórmula da molaridade e usar o ácido acético glacial como tampão. Ex.: Para 30 mL de solução tampão, utilizar 343,5 µL de ácido acético e 29,656 mL de água deionizada. Ficará acetato de potássio quando os alunos adicionarem o KOH.
- A solução estoque de BSA pode ser preparada sob aquecimento controlado de até 40°C e agitação suave. Deve ser mantida na geladeira até o início da aula.

Procedimento

(Cada grupo deverá fazer os procedimentos dos seis tubos de ensaio)

- 1) Adicione 11 mL da solução tampão preparada com ácido acético (0,2 M) em um copo de **Becker de 25 mL**; meça e anote o valor do pH. _____
- 2) A essa solução tampão adicione 2 mL de BSA (270 mg/mL) e agite com um bastão de vidro, suavemente para evitar a formação de espuma; meça e anote o valor do pH. _____
- 3) Retire 6,0 mL dessa solução (tampão + BSA) e coloque em um **Becker de 10 mL** identificado como “**com PEG**”. Mantenha o restante na solução no Becker de 25 mL, identifique-o como “sem PEG” e reserve-o para o item 13 do procedimento;
- 4) Adicione 2,0 mL de solução aquosa de PEG (4000, 40%) no Becker de **10 mL** identificado como “com PEG” onde foi colocado os 6 mL da solução (tampão + BSA) e agite suavemente;
- 5) Verifique o valor do pH com o auxílio de um pHmetro e anote o valor encontrado; pH_____
- 6) Retire 2 mL dessa solução, coloque-a em um **novo Becker de 10 mL**, identificado como “**pH 3**” acrescente a esse aproximadamente **5µL** de solução de **HCl (1M)** para ajustar o pH

deixando-o em torno de 3. Transfira essa solução pH 3 para o tubo de ensaio 1. Anote na tabela 1. Lave cuidadosamente esse Becker.

7) Acrescente aproximadamente 220 μ L de solução de KOH 1M, gota a gota, à solução restante do Becker “com PEG” até que a solução fique turva (esbranquiçada). Verifique o valor do pH dessa solução nessa condição, esse deve corresponder ao pI da BSA.

Obs.: O KOH deve ser acrescentado aos poucos à solução de BSA para que não haja o risco da proteína desnaturar.

8) Retire 2,0 mL dessa solução e guarde-a no tubo de ensaio 2. Anote na tabela 1.

9) Continue ajustando a solução restante do Becker “com PEG” até pH neutro (pH=7). Faça esse procedimento cuidadosamente utilizando pipeta, acrescentando aproximadamente 500 μ L de solução de KOH, gota a gota. Meça o valor do pH a cada gota depositada. Quando estiver próximo de atingir o valor do pH desejado, vá adicione alíquotas de apenas 5 μ L de KOH, sempre conferindo o pH para que não haja o risco do valor ultrapassar o desejado.

10) Retire 2,0 mL dessa solução e guarde-a no terceiro tubo de ensaio (tubo 3), anotando o valor do pH na tabela 1;

11) Coloque os três tubos, na ordem 1, 2, 3, na estante de tubos de ensaio e fotografe. Anote na tabela 1 as observações quanto ao aspecto das soluções nos devidos pHs;

12) Pese e adicione 0,74 g de KCl **em cada** tubo de ensaio (1, 2 e 3). Agite vigorosamente as soluções, observe e fotografe. Anote na tabela 1 os aspectos das soluções após a adição de sal.

13) A partir desse ítem você irá utilizar a amostra sem PEG que foi reservada no Becker de 25 mL no ítem 3. Retire 2 mL dessa solução e transfira para o Béquer de 10 mL identificado com “pH 3” **limpo** e acrescente aproximadamente **5 μ L** de solução de **HCl** (1M) para ajustar o pH deixando-o em torno de 3. Guarde essa solução de pH 3 em um tubo de ensaio (tubo 4).

Anote na tabela.

14) Acrescente aproximadamente 220 μ L de solução de KOH 1M, gota a gota, à solução que havia ficado no Becker “sem PEG” até que essa fique turva (esbranquiçada). Verifique o valor do pH dessa solução nessa condição, esse deve corresponder ao pI da BSA.
Obs.: O KOH deve ser acrescentado aos poucos à solução de BSA para que não haja o risco da proteína desnaturar.

15) Retire 2,0 mL dessa solução e guarde-a no tubo de ensaio 5. Anote na tabela 1.

16) Continue ajustando a solução do Becker “sem PEG” até pH neutro , como no ítem 9.

17) Retire 2,0 mL dessa solução e guarde-a no terceiro tubo de ensaio (tubo 6).

18) Coloque os três tubos na estante de tubos de ensaio, na ordem 4, 5, 6, e fotografe. Anote na tabela 1 as observações em relação à turbidez das soluções (precipitação da proteína) nos devidos pHs;

19) Pese e adicione 0,74 g de KCl **em cada** tubo de ensaio (4, 5 e 6). Agite vigorosamente as soluções, observe e fotografe. Anote na tabela 1 os aspectos das soluções após a adição de sal.

Tabela 1: reagentes adicionados em cada tubo de ensaio.

	Tubo 1 pH _____	Tubo 2 pH _____ (pI)	Tubo 3 pH _____	Tubo 4 pH _____	Tubo 5 pH _____ (pI)	Tubo 6 pH _____
BSA + H ₃ CCOOK +PEG	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	-	-	-
BSA + H ₃ CCOOK	-	-	-	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Aparência da amostra (turbidez)						
KCl	0,74 g	0,74 g	0,74 g	0,74 g	0,74 g	0,74 g
Aparência da amostra (turbidez)						

Análise dos dados

Em casa, monte um texto com as fotos inseridas no qual se discute os fenômenos ocorridos durante as etapas do procedimento. Proponha uma explicação para o sal (KCl) ter promovido a precipitação da albumina com PEG em pH menor do que o pI. Recomendamos a leitura do artigo de Ingham, 1978 e a montagem de um resumo sobre os mecanismos propostos pelo autor para explicar a precipitação da albumina promovida pelo PEG.

EXERCÍCIOS

1) Atribua o nome de cada aminoácido (como exemplificado para a L-alanina) comparando as estruturas químicas (Figura 1) com as projeções moleculares 3D abaixo. Nas estruturas, considere os átomos de carbono em cinza, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, enxofre em amarelo e hidrogênio em branco. Não se esqueça de considerar as múltiplas ligações que estão implícitas nestes modelos (por exemplo, uma única ligação entre um dos carbonos e um dos oxigênios da L-alanina, significando que há uma dupla ligação pois o oxigênio é bivalente – veja a posição circulada).

A	L-alanina	
	Chemical Formula C ₃ H ₇ NO ₂ Molecular Weight 89.09 Da Polarity Nonpolar Acidity/ Basicity Neutral Hydrophobicity 0.616 Hydropathy Index 1.8 Isoelectric Point 6.01 pKa (α -COOH) 2.35 pKa (α -NH ₂) 9.87	Chemical Formula C ₃ H ₇ NO ₂ S Molecular Weight 121.16 Da Polarity Polar Acidity/ Basicity Neutral Hydrophobicity 0.680 Hydropathy Index 2.5 Isoelectric Point 5.05 pKa (α -COOH) 1.92 pKa (α -NH ₂) 10.70
Canonical SMILES	CAS Number	PubChem CID
CC(N)C(=O)O	56-41-7	5950
	CAS Number	PubChem CID
	52-90-4	5862

	Chemical Formula C ₄ H ₇ NO ₄ Molecular Weight 133.10 Da Polarity Polar Acidity/ Basicity Acidic Hydrophobicity 0.028 Hydropathy Index -3.5 Isoelectric Point 2.85 pKa (α -COOH) 1.99 / 3.9 pKa (α -NH ₂) 9.90	Chemical Formula C ₅ H ₉ NO ₄ Molecular Weight 147.13 Da Polarity Polar Acidity/ Basicity Acidic Hydrophobicity 0.043 Hydropathy Index -3.5 Isoelectric Point 3.15 pKa (α -COOH) 2.10 / 4.3 pKa (α -NH ₂) 9.47
Canonical SMILES	CAS Number	PubChem CID
NC(CC(=O)O)C(=O)O	56-84-8	5960
	CAS Number	PubChem CID
	56-86-0	611

	<p>Chemical Formula <chem>C9H11NO2</chem></p> <p>Molecular Weight 165.19 Da</p> <p>Polarity Nonpolar</p> <p>Acidity/ Basicity Neutral</p> <p>Hydrophobicity 1.00</p> <p>Hydropathy Index 2.8</p> <p>Isoelectric Point 5.49</p> <p>pKa (α-COOH) 2.20</p> <p>pKa (α-NH₂) 9.31</p>
Canonical SMILES	CAS Number 63-91-2
<chem>NC(Cc1ccccc1)C(=O)O</chem>	PubChem CID 994

	<p>Chemical Formula <chem>C2H5NO2</chem></p> <p>Molecular Weight 75.07 Da</p> <p>Polarity Nonpolar</p> <p>Acidity/ Basicity Neutral</p> <p>Hydrophobicity 0.501</p> <p>Hydropathy Index -0.4</p> <p>Isoelectric Point 6.06</p> <p>pKa (α-COOH) 2.35</p> <p>pKa (α-NH₂) 9.78</p>
Canonical SMILES	CAS Number 56-40-6
<chem>NCC(=O)O</chem>	PubChem CID 750

	<p>Chemical Formula <chem>C6H9N3O2</chem></p> <p>Molecular Weight 155.15 Da</p> <p>Polarity Polar</p> <p>Acidity/ Basicity Basic (Weak)</p> <p>Hydrophobicity 0.165</p> <p>Hydropathy Index -3.2</p> <p>Isoelectric Point 7.60</p> <p>pKa (α-COOH) 1.80</p> <p>pKa (α-NH₂) 9.33</p>
Canonical SMILES	CAS Number 71-00-1
<chem>NC(Cc1ncnc[nH]1)C(=O)O</chem>	PubChem CID 773

	<p>Chemical Formula <chem>C6H13NO2</chem></p> <p>Molecular Weight 131.17 Da</p> <p>Polarity Nonpolar</p> <p>Acidity/ Basicity Neutral</p> <p>Hydrophobicity 0.943</p> <p>Hydropathy Index 4.5</p> <p>Isoelectric Point 6.05</p> <p>pKa (α-COOH) 2.32</p> <p>pKa (α-NH₂) 9.76</p>
Canonical SMILES	CAS Number 73-32-5
<chem>CCC(C)C(N)C(=O)O</chem>	PubChem CID 791

	<p>Chemical Formula <chem>C6H14N2O2</chem></p> <p>Molecular Weight 146.19 Da</p> <p>Polarity Polar</p> <p>Acidity/ Basicity Basic</p> <p>Hydrophobicity 0.283</p> <p>Hydropathy Index -3.9</p> <p>Isoelectric Point 9.60</p> <p>pKa (α-COOH) 2.16</p> <p>pKa (α-NH₂) 9.06</p>
Canonical SMILES	CAS Number 56-87-1
<chem>NCCCC(N)C(=O)O</chem>	PubChem CID 866

	<p>Chemical Formula <chem>C6H13NO2</chem></p> <p>Molecular Weight 131.18 Da</p> <p>Polarity Nonpolar</p> <p>Acidity/ Basicity Neutral</p> <p>Hydrophobicity 0.943</p> <p>Hydropathy Index 3.8</p> <p>Isoelectric Point 6.01</p> <p>pKa (α-COOH) 2.33</p> <p>pKa (α-NH₂) 9.74</p>
Canonical SMILES	CAS Number 61-90-5
<chem>CC(C)CC(N)C(=O)O</chem>	PubChem CID 6106

	<p>Chemical Formula <chem>C5H11NO2S</chem></p> <p>Molecular Weight 149.21 Da</p> <p>Polarity Nonpolar</p> <p>Acidity/ Basicity Neutral</p> <p>Hydrophobicity 0.738</p> <p>Hydropathy Index 1.9</p> <p>Isoelectric Point 5.74</p> <p>pKa (α-COOH) 2.13</p> <p>pKa (α-NH₂) 9.28</p>
Canonical SMILES	CAS Number 63-68-3
<chem>CSCCC(N)C(=O)O</chem>	PubChem CID 876

	<p>Chemical Formula <chem>C4H8N2O3</chem></p> <p>Molecular Weight 132.12 Da</p> <p>Polarity Polar</p> <p>Acidity/ Basicity Neutral</p> <p>Hydrophobicity 0.236</p> <p>Hydropathy Index -3.5</p> <p>Isoelectric Point 5.41</p> <p>pKa (α-COOH) 2.14</p> <p>pKa (α-NH₂) 8.72</p>
Canonical SMILES	CAS Number 70-47-3
<chem>NC(CC(=O)N)C(=O)O</chem>	PubChem CID 236

	Chemical Formula C ₅ H ₉ NO ₂
	Molecular Weight 115.13 Da
	Polarity Nonpolar
	Acidity/ Basicity Neutral
	Hydrophobicity 0.711
	Hydropathy Index -1.6
	Isoelectric Point 6.30
	pKa (α -COOH) 1.95
	pKa (α -NH ₂) 10.64
Canonical SMILES	CAS Number 147-85-3
OC(=O)C ₁ CCCN ₁	PubChem CID 614
	Chemical Formula C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃
	Molecular Weight 146.14 Da
	Polarity Polar
	Acidity/ Basicity Neutral
	Hydrophobicity 0.251
	Hydropathy Index -3.5
	Isoelectric Point 5.65
	pKa (α -COOH) 2.17
	pKa (α -NH ₂) 9.13
Canonical SMILES	CAS Number 56-85-9
NC(CCC(=O)N)C(=O)O	PubChem CID 5950

	Chemical Formula C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂
	Molecular Weight 174.20 Da
	Polarity Polar
	Acidity/ Basicity Basic (Strong)
	Hydrophobicity 0.000
	Hydropathy Index -4.5
	Isoelectric Point 10.76
	pKa (α -COOH) 1.82
	pKa (α -NH ₂) 8.99
Canonical SMILES	CAS Number 74-79-3
NC(CCCNC(=N)N)C(=O)O	PubChem CID 5950
	Chemical Formula C ₃ H ₇ NO ₃
	Molecular Weight 105.09 Da
	Polarity Polar
	Acidity/ Basicity Neutral
	Hydrophobicity 0.359
	Hydropathy Index -0.8
	Isoelectric Point 5.68
	pKa (α -COOH) 2.19
	pKa (α -NH ₂) 9.21
Canonical SMILES	CAS Number 56-45-1
NC(CO)C(=O)O	PubChem CID 617

	Chemical Formula C ₄ H ₉ NO ₃
	Molecular Weight 119.12 Da
	Polarity Polar
	Acidity/ Basicity Neutral
	Hydrophobicity 0.450
	Hydropathy Index -0.7
	Isoelectric Point 5.60
	pKa (α -COOH) 2.09
	pKa (α -NH ₂) 9.10
Canonical SMILES	CAS Number 72-19-5
CC(O)C(N)C(=O)O	PubChem CID 6288
	Chemical Formula C ₅ H ₁₁ NO ₂
	Molecular Weight 117.15 Da
	Polarity Nonpolar
	Acidity/ Basicity Neutral
	Hydrophobicity 0.825
	Hydropathy Index 4.2
	Isoelectric Point 6.00
	pKa (α -COOH) 2.39
	pKa (α -NH ₂) 9.74
Canonical SMILES	CAS Number 72-18-4
CC(C)C(N)C(=O)O	PubChem CID 1182

	Chemical Formula C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂
	Molecular Weight 204.23 Da
	Polarity Nonpolar
	Acidity/ Basicity Neutral
	Hydrophobicity 0.878
	Hydropathy Index -0.9
	Isoelectric Point 5.89
	pKa (α -COOH) 2.46
	pKa (α -NH ₂) 9.41
Canonical SMILES	CAS Number 73-22-3
NC(Cc1cc2cccc2[nH]1)C(=O)O	PubChem CID 6305
	Chemical Formula C ₉ H ₁₁ NO ₃
	Molecular Weight 181.19 Da
	Polarity Nonpolar
	Acidity/ Basicity Neutral
	Hydrophobicity 0.880
	Hydropathy Index -1.3
	Isoelectric Point 5.64
	pKa (α -COOH) 2.20
	pKa (α -NH ₂) 9.21
Canonical SMILES	CAS Number 60-18-4
NC(Cc1ccc(O)cc1)C(=O)O	PubChem CID 1153

2) Durante uma aula de bioquímica o professor propôs aos seus alunos que observassem as propriedades ácido-base da albumina bovina (BSA). Para isso os alunos prepararam três soluções de BSA (270 mg/mL) em tampão acetato de potássio (0,2 M): uma em pH 3, outra em pH 4,7 e a terceira em pH 7. Em seguida, os alunos numeraram seis tubos de ensaio como: pH 3; pH 4,7; pH 7; pH 3 + KCl; pH 4,7 + KCl; pH 7 + KCl e adicionaram 1,5 mL de solução em cada tubo, respeitando os pHs descritos nos rótulos (figura 1).

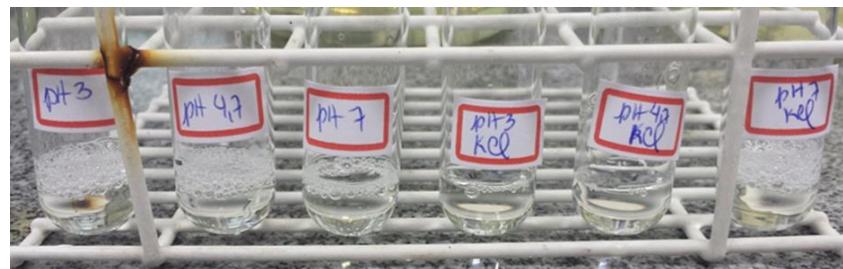


Fig. 1: Soluções de albumina (270 mg/mL) em tampão acetado de potássio (2 M), nos pHs indicados nos tubos de ensaio.

Em seguida os alunos adicionaram 0,5 mL de PEG 4000 (40%) em cada tubo e observaram que os tubos em pH 4,7 turvaram (figura2).

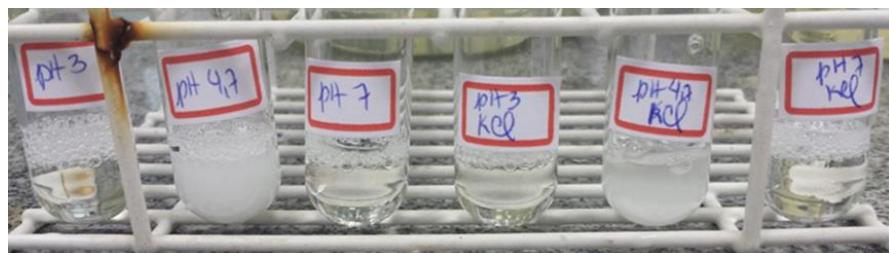


Fig. 2. Soluções de albumina (270 mg/mL) em tampão acetado de potássio (2 M) e 0,5 mL de PEG 4000 (40%), nos pHs indicados nos tubos de ensaio.

Na sequência, os alunos adicionaram 7,4 mg de KCl nos tubos indicados com KCl. Esses tubos foram agitados e verificou-se alterações nos pHs 3 e 4,7 (figura 3).

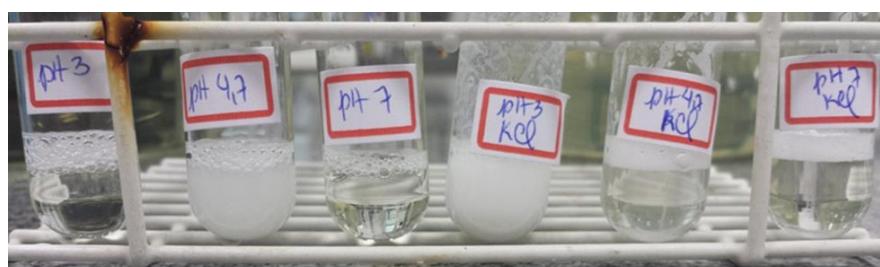


Fig. 3. Soluções de albumina (270 mg/mL) em tampão acetado de potássio (2 M) e 0,5 mL de PEG 4000 (40%). Foram adicionados 7,4 mg de KCl nos três tubos da direita. Os pHs estão indicados nos tubos de ensaio.

Após esse experimento, pergunta-se:

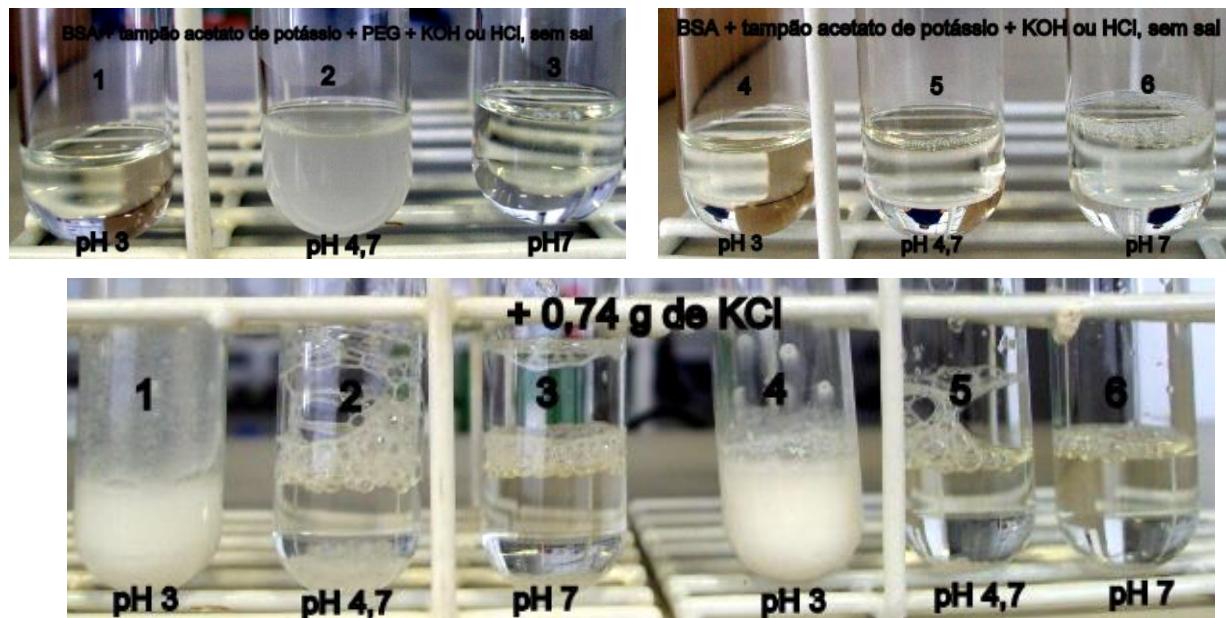
A- Por que o PEG 4000 (40%) precipitou a BSA em pH 4,7 e não precipitou a albumina nos demais valores de pH (figura 2)?

B- Por que o KCl solubilizou a BSA em pH 4,7 e precipitou a BSA em pH 3 (figura 3)?

Referências Bibliográficas

1. LEHNINGER, A.L; NELSON, D.L; COX, M.M. Princípios de bioquímica. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.
2. BERG, M.J.; TYMOCZKO, J.L., STRYER, L. Biochemistry 5th. Edition. W. H. Freeman and Company. New York, 2002.
3. BETTELHEIM, F.A.; LANDESBERG, J.M. Laboratory Experiments for General, Organic & Biochemistry, Harcourt College Pub, New York, 2000.
4. VOET, D.; VOET, J.G. Bioquímica, 3 ed., Porto Alegre: Artmed, 2006.
5. INGHAM. K. C. Precipitation of Proteins with Polyethylene Glycol: Characterization of Albumin. Arch. Biochem. Biophys. **186**, 106-113, 1978.

Resultados esperados



Experimento 4 - Propriedades de surfactantes e lipídios

Abstract

The aim of this experiment is to introduce the students of the Federal University of ABC to the procedures related to the characterization of lipids employing soybean as a source of triacylglycerol, one type of biologic lipids. Furthermore the students will learn the saponification concept through the alkaline hydrolysis of soybean triacylglycerol and the physical and chemical properties of the soap obtained will be exploited.

Resumo

O presente experimento visa apresentar aos alunos de Bacharelado em Ciências e Tecnologia, da Universidade Federal do ABC, características físico-químicas de lipídios. Serão utilizados o sabão de coco para explorar as características físico-químicas dos surfactantes e diferentes tipos de gorduras para explorar o efeito do grau de insaturação de seus ácidos graxos constituintes no ponto de fusão das mesmas.

Introdução

Os **lipídios** são representados por um grupo de biomoléculas de baixa massa molecular que apresentam **estruturas químicas bastante variadas**, baixa solubilidade em água de tal forma que são extraídos dos tecidos biológicos com uso de solventes de baixa polaridade tais como éter e clorofórmio . A diversidade de estruturas apresentadas pelos lipídios faz com que esses compostos tenham a capacidade de exercer diversas funções biológicas atuando desde componentes de membranas celulares, isolantes térmicos, sinalizadores celulares, pigmentos e reservas de energia (óleos e gorduras). Adicionalmente, os próprios lipídios ou seus derivados, podem também exercer funções de vitaminas e hormônios. As principais classes de compostos pertencentes ao grupo dos lipídios são os triacilgliceróis, glicerofosfolipídeos, esfingolipídios, glicolipídios e esteróides (Figura 1).

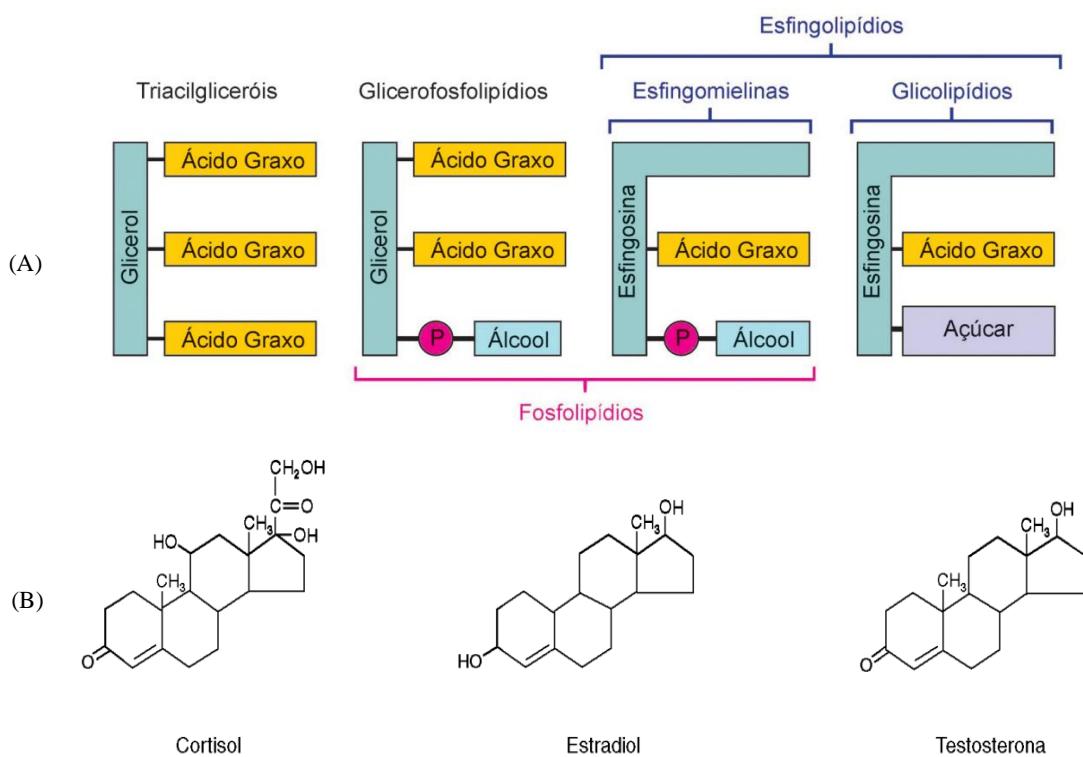


Fig. 1. As principais classes de lipídios biológicos. Em (A) todos os lipídios mostrados apresentam glicerol ou esfingosina, estrutura central, ligados a ácidos graxos. (B) Estrutura de três hormônios esteróides.

Tipicamente, os lipídios apresentam em suas estruturas longas cadeias carbônicas, como os **ácidos graxos** e **isoprenos**, ou múltiplos anéis interligados, como no caso dos **esteróides**. Várias classes de lipídios apresentam **ácidos graxos** como componentes estruturais. Ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos, **moléculas anfipáticas** que apresentam uma **região polar**, representada pelo grupo carboxila (ionizado em pH neutro), e uma **região apolar**, representada por uma cadeia carbônica com comprimento variando entre 4 a 36 átomos de carbono (Figura 2). Estruturalmente, a cadeia carbônica dos ácidos graxos é caracterizada pela presença de número par de carbonos formando uma estrutura não ramificada que pode ser saturada ou conter uma, duas ou mais insaturações.

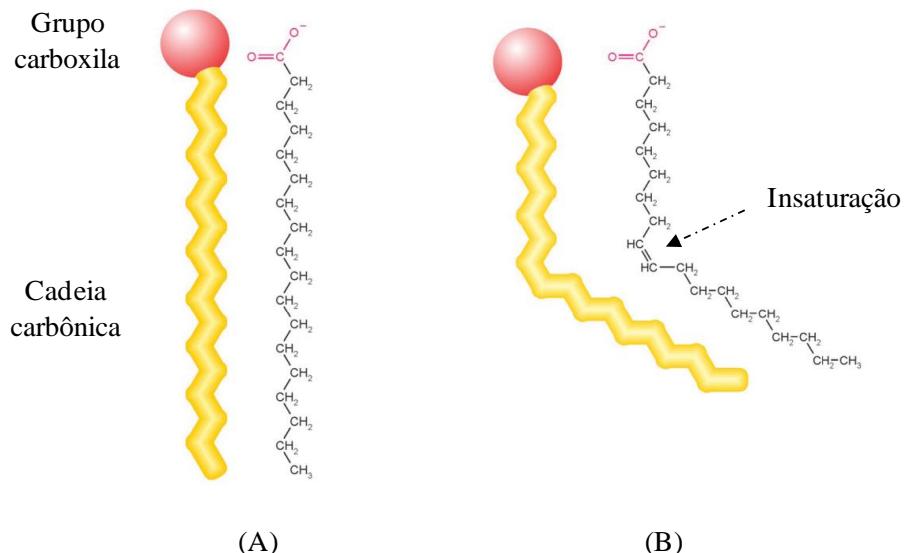


Fig. 2. Estrutura de ácidos graxos. Os ácidos graxos são compostos anfipáticos formados por uma longa cadeia carbônica apolar e um grupo carboxila polar. As cadeias carbônicas dos ácidos graxos não possuem ramificações e podem ser saturadas, como no caso do ácido esteárico, (A) ou insaturadas, como no caso do ácido oleico (B).

Lipídios como triacilgliceróis, fosfolipídios, glicolipídios e esfingolipídios apresentam ácidos graxos esterificados em suas estruturas. Uma das funções mais importantes dos ácidos graxos nas células é a participação na construção das membranas celulares, finas camadas lipídicas que circundam todas as células e suas organelas internas. As membranas celulares são compostas em grande parte por **fosfolipídios**, pequenas moléculas constituídas principalmente por ácidos graxos e glicerol. Outra importante função desempenhada pelos ácidos graxos está associada à manutenção de uma reserva energética celular. De fato, os ácidos graxos podem ser estocados no citoplasma celular na forma de gotículas lipídicas constituídas por moléculas de **triacilgliceróis**. Os triacilgliceróis, também conhecidos como triglycerídeos, triglicérides ou gorduras neutras, representam os lipídios mais abundantes na natureza sendo formados pela esterificação de três ácidos graxos a uma molécula de glicerol. É este estabelecimento de ligações éster entre os precursores polares dos triacilgliceróis (hidroxilos do glicerol e carboxilas dos ácidos graxos) que confere ao composto caráter essencialmente apolar, permitindo com que seja armazenado nas células de forma praticamente anidra (Figura 3).

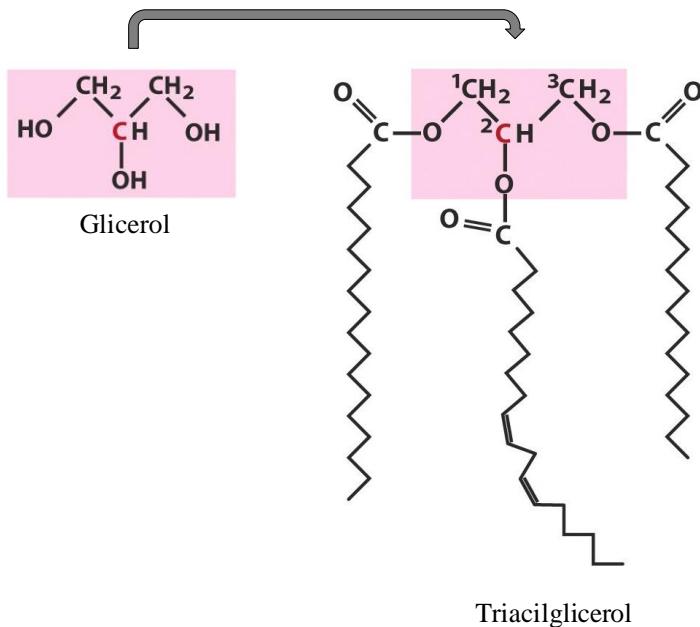


Fig. 3. Triacilglicerois são compostos apolares resultantes da formação de ligações éster entre as hidroxilas livres de uma molécula de glicerol e os grupos carboxila dos ácidos graxos.

As gorduras animais e óleos vegetais são misturas de triacilgliceróis, que diferem na sua composição em ácidos graxos e, consequentemente, no seu ponto de fusão. Os triacilgliceróis das gorduras animais são ricos em ácidos graxos saturados, o que atribui a esses lipídeos uma consistência sólida à temperatura ambiente. Já os triacilgliceróis origem vegetal são ricos em ácidos graxos poliinsaturados sendo, portanto, líquidos à temperatura ambiente. Os óleos vegetais são utilizados para a fabricação de margarinas através de um processo de hidrogenação que reduz parte de suas duplas ligações e os torna sólidos à temperatura ambiente.

- ✓ **Ácidos graxos saturados** → Cadeia carbônica não apresentam ligações duplas entre os átomos de carbono e, assim, contém o número máximo possível de hidrogênios.
- ✓ **Ácidos graxos insaturados** → Cadeia carbônica possui uma ou mais ligações duplas entre átomos de carbono contendo o número máximo possível de hidrogênios.

Os lipídios anfipáticos, tais como os ácidos graxos, quando são adicionados a um meio aquoso, tendem a agregar-se, organizando-se espontaneamente em estruturas plurimoleculares. Essas estruturas permitem maximizar as interações hidrofóbicas entre as cadeias carbônicas, isolando-as da água, e deixar os grupos polares em contato com o solvente, com o qual podem interagir. Tais arranjos moleculares constituem o estado de menor energia livre para esses lipídios em água e resultam da presença de duas regiões com solubilidades diferentes na mesma molécula.

O tipo de estrutura formada é determinado pela geometria da molécula do lipídio anfipático (Figura 4). Lipídios com uma única cadeia carbônica, como sabões de detergentes, devido a forma cônica e afilada de suas moléculas, formam, preferencialmente, **micelas**. Nesta estrutura esférica, as cadeias carbônicas organizam-se no interior, isolando-se da água, e os grupos polares posicionam-se na superfície externa, interagindo com o solvente. A formação de micelas é uma etapa importante na digestão dos lipídios da dieta. A maioria dos fosfolipídios e glicolipídios associam-se em uma camada dupla de moléculas, chamada **bicamada lipídica**. Esta estrutura permite uma agregação mais estável das moléculas desses lipídios, que têm forma cilíndrica pela presença de duas cadeias apolares.

As moléculas de lipídios alinham-se lado a lado, compondo duas monocamadas e as cadeias carbônicas das monocamadas agrupam-se frente a frente de modo a criar um domínio hidrofóbico no meio da bicamada; os grupos hidrofílicos dispõem-se na superfície das duas faces da bicamada, interagindo com a água. Bicamadas lipídicas tendem a se converter em estruturas fechadas, chamadas **lipossomos**, que são mais estáveis porque não apresentam caudas hidrofóbicas expostas ao solvente, como acontece na periferia das bicamadas planas. Lipossomos são, portanto, vesículas sintéticas esféricas formadas por uma bicamada lipídica contínua, que delimita uma cavidade interna preenchida por solvente.

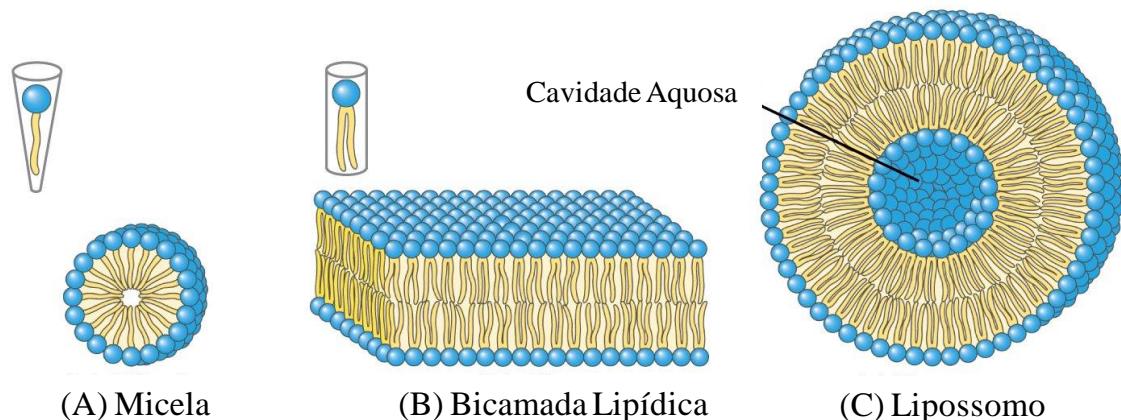


Fig. 4. Estruturas formadas por lipídios anfipáticos em meio aquoso. (A) Micelas são formadas por moléculas de lipídios com uma única cadeia carbônica, cadeias estas que se localizam no interior dessas estruturas. (B) Bicamada lipídica é uma estrutura bidimensional na qual as cadeias carbônicas formam um domínio central hidrofóbico, isolando-se da água, exceto nas extremidades da bicamada; é a estrutura comumente formada por lipídios anfipáticos com duas cadeias de hidrocarbonetos. (C) Lipossomo é uma vesícula oca, resultante do fechamento de uma bicamada lipídica, dotada de uma cavidade central preenchida por solvente.

1. Fundamentação Teórica

Os lipídios representam um grupo de compostos com estrutura bastante variada. Várias classes de lipídios apresentam ácidos graxos como componentes estruturais entre eles, os fosfolipídeos, glicolipídeos e os triacilgliceróis. Os lipídios podem ser caracterizados por suas propriedades físico-químicas. Em geral, possuem baixa solubilidade em água enquanto apresentam alta solubilidade em solventes orgânicos como clorofórmio, éter, benzeno, mistura de Folch (clorofórmio:metanol), entre outros.

Os triacilgliceróis, que constituem o principal grupo de lipídios, podem ser hidrolisados liberando ácidos graxos e glicerol. Se esta hidrólise é feita mediante aquecimento em meio alcalino (hidrólise alcalina), formam-se sais de ácidos graxos (sabões) e o processo é chamado **saponificação** (Figura 5). Este é o princípio da fabricação dos sabões a partir de gordura animal fervida em presença de NaOH ou KOH.

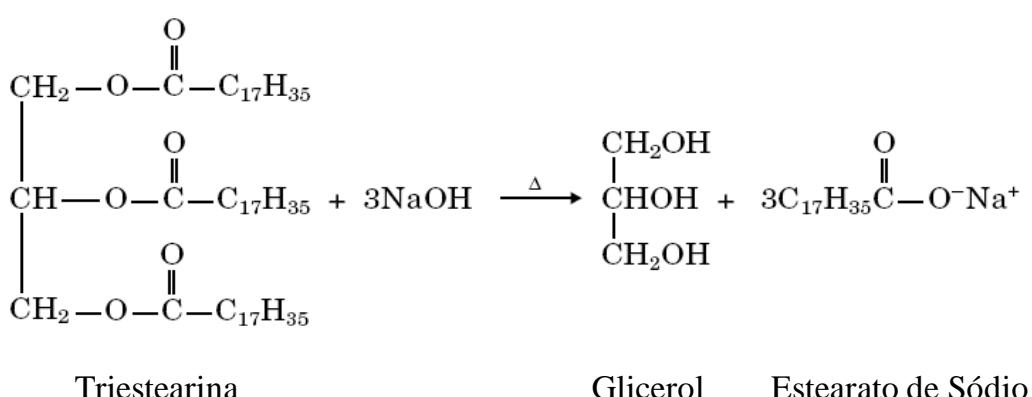


Fig. 5. Hidrólise alcalina de triacilgliceróis. Triacilgliceróis, mediante aquecimento em presença de bases fortes, como hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio (KOH), sofrem hidrólise produzindo sais de ácidos graxos (sabões). No esquema acima é mostrada a hidrólise do triestearina na presença de NaOH dando origem a glicerol e sal sódico (estearato de sódio).

Como são ácidos graxos, os sabões obtidos da hidrólise de gorduras são moléculas anfipáticas apresentando em sua estrutura uma longa cadeia carbônica (cauda apolar, lipofílica) e um grupo carboxilato (cabeça polar, hidrofílica). Dessa maneira, os sabões, quando em solução aquosa, associam-se por interações hidrofóbicas entre as caudas apolares formando um uma película lipídica na superfície do líquido ou dando origem a estruturas como as micelas (Figura 6).

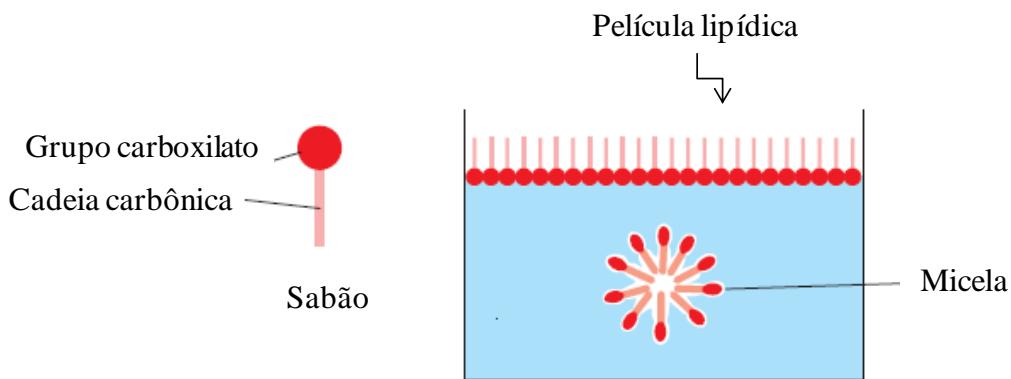


Fig. 6. Formação de micelas a partir das interações entre sabões dispersos em solução aquosa.

Propriedades dos sabões:

Sob condições específicas, os ácidos graxos dos sabões podem ser precipitados. A adição de ácidos fracos, como ácido acético, leva a formação de ácidos graxos insolúveis por causa do baixo grau de dissociação (Figura 7).

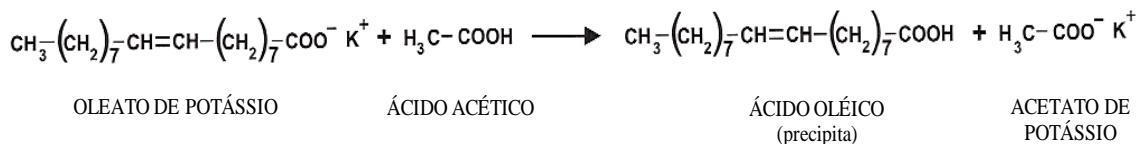


Fig. 7. Precipitação de ácidos graxos devido ao protonamento do grupo carboxílico promovido pelo ácido acético . Em presença de ácido acético (ácido fraco), ácido oléico (ácido graxo) é precipitado a partir da hidrólise ácida do oleato de potássio (sabão).

Os sabões precipitam quando são usados em águas ricas em sais de cálcio ou magnésio (águas duras). Os íons cálcio e magnésio da água reagem com ácidos graxos formando sais insolúveis. Os sabões também podem precipitar pela adição de excesso de eletrólitos, os quais reprimem a dissociação dos sabões, fazendo com que as micelas percam a carga e precipitem.

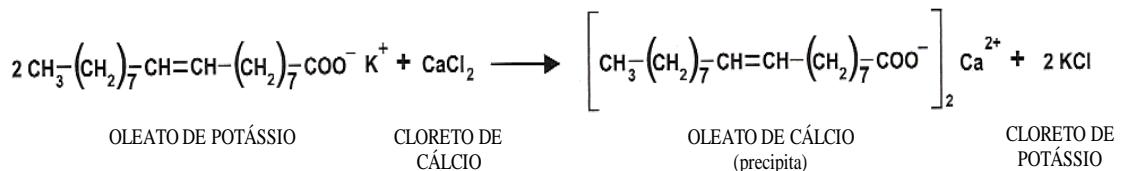


Fig. 8. Reação de precipitação de sabão através de salificação. A exposição de sabões, como o oleato de potássio, à ambientes ricos em sais de cálcio ou magnésio induz a formação de sabões insolúveis.

Os sabões possuem propriedades emulsificantes. Emulsão é a mistura entre dois líquidos imiscíveis em que um deles (fase dispersa) encontra-se na forma de pequenos glóbulos dispersos em meio ao outro (fase contínua). Minúsculas partículas de óleo ou solventes orgânicos são mantidas em suspensão numa solução aquosa. Porém, quando as duas fases são misturadas ou agitadas vigorosamente, essas partículas formam uma emulsão onde os óleos ou os solventes orgânicos tendem a dispersar-se pela solução. Com o tempo, as emulsões tendem a retornar para o estado estável podendo se observar duas ou mais fases distintas (Figura 9A). Os sabões são agentes emulsificantes, pois quando adicionados às emulsões, tendem a torná-las mais estáveis e homogêneas (Figura 9B).

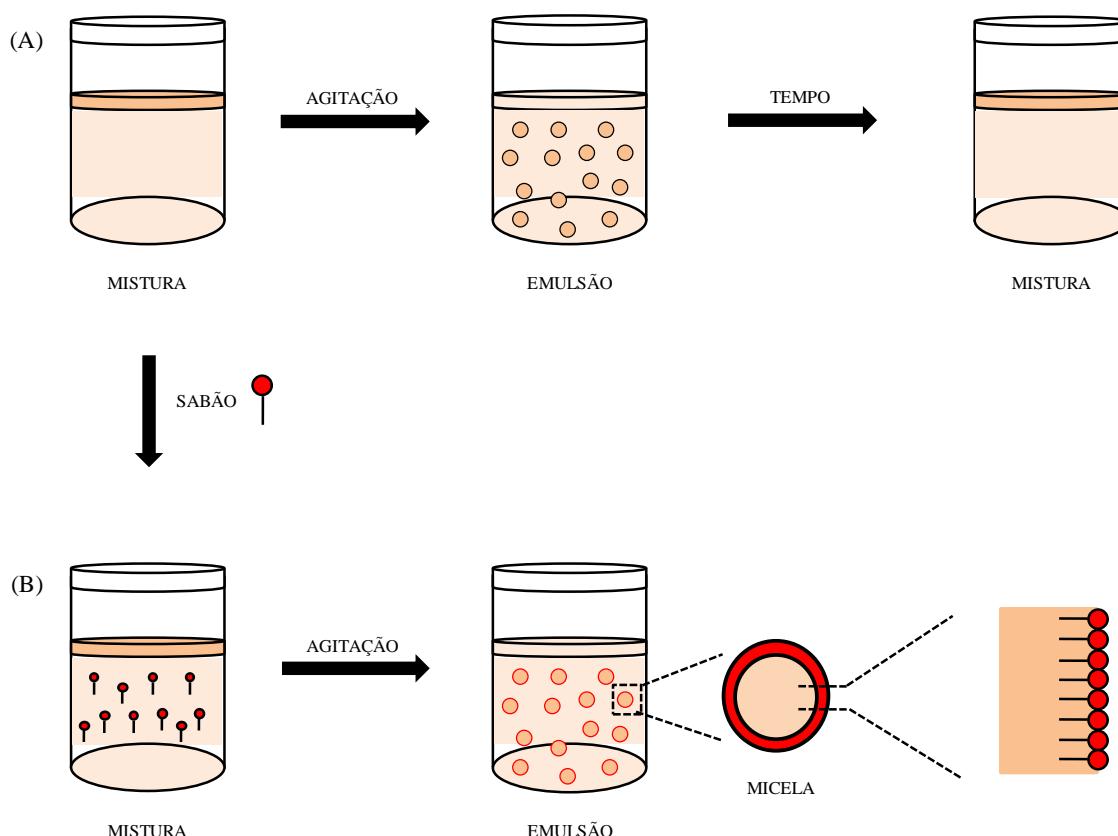


Fig. 9. Propriedade emulsificante dos sabões. Uma mistura de dois líquidos imiscíveis pode formar uma emulsão através de agitação (fornecimento de energia). Contudo, as emulsões são instáveis e tendem a tornar-se misturas com o passar do tempo (A). Os sabões agem como surfactantes estabilizando a emulsão formada através da formação de micelas com óleos ou solventes orgânicos. As cadeias hidrocarbonadas não-polares dos sabões dissolvem-se no óleo ou solvente orgânico enquanto os grupos iônicos polares na fase aquosa. As gotículas carregadas negativamente repelem-se mutuamente (B).

Curiosidade: Um subproduto da manufatura de sabões é a glicerina (glicerol), da qual se pode obter a nitroglycerina, um poderoso explosivo. Durante a I e II Guerras Mundiais, as donas de

casa guardavam o excesso de óleo e gorduras de cozinha e o devolviam para a recuperação da glicerina.

2. Objetivos da aula

A aula apresenta como objetivos verificar o efeito de pH na formação de agregados supramoleculares de surfactantes, no caso, sabão de coco fabricado a partir da hidrólise da gordura de coco (saponificação). Adicionalmente a aula terá por objetivo verificar o efeito do grau de insaturação dos ácidos graxos no ponto de fusão dos mesmos e das gorduras que integram.

OBS: Nessa aula também deverá ser iniciado o experimento referente a aula de “Açúcares” (Aula 5), o qual encontra-se na Parte III dessa aula.

3. Procedimento experimental (A turma deverá ser dividida em 6 grupos)

Parte I

Materiais e vidrarias

- Azeite de oliva extra virgem e óleo de algodão puro (armazenados em temperatura ambiente) manteiga, gordura vegetal hidrogenada e banha de porco (armazenados em geladeira)
- 5 tubos de ensaio por grupo, identificados e contendo individualmente cerca de 1mL ou 1 g de cada um dos lipídeos listados acima. Os óleos serão pipetados pelos alunos e os sólidos serão disponibilizados já fracionados pelos colaboradores da disciplina.
- Estante para tubos de ensaio
- Banho-maria (béquer de 250 mL na chapa de aquecimento regulada inicialmente para aproximadamente 40°C e se necessário ajustar para temperatura mais elevada)
- Termômetro
- 1 recipiente com gelo e sal de cozinha, por bancada, contendo um tubo de ensaio com 2 mL de azeite de oliva extra virgem e um tubo de ensaio com 2 mL de óleo de algodão que foram mantidos no freezer por no mínimo 30 min

a) Numa primeira etapa, cada grupo deverá pipetar 1 mL de cada óleo e colocar em tubos de ensaio separados. Fotografar lado a lado o tubo de ensaio contendo o óleo de algodão e o tubo de ensaio contendo o azeite de oliva à temperatura ambiente.

Em seguida comparar os referidos óleos com o seu similar que se encontra no recipiente com gelo colocado sobre cada bancada. Observar o turvamento das amostras. Fotografar lado a lado as amostras semelhantes.

b) Numa segunda etapa, cada grupo deverá colocar os tubos de ensaio contendo a manteiga, a gordura vegetal hidrogenada e a banha de porco em banho-maria, partindo de cerca de 30°C. Ligar o aquecimento somente após colocar os tubos de ensaio. Acompanhar, através do termômetro, a faixa de temperatura de fusão de cada lipídeo e anotar. Fotografar as amostras após todas atingirem o ponto de fusão.

Discuta:

- 1) O que explica a ordem de fusão dos diferentes lipídeos concomitante com o aumento de temperatura?
- 2) O que explica a mudança de estado físico (evidenciada pela turbidez da amostra) para os dois óleos colocados no gelo? Pesquise a composição de ácidos graxos desses óleos indicando o ponto de fusão dos principais.
- 3) O que explica as diferentes colorações dos lipídeos apresentados?
- 4) Pesquise e indique de maneira sucinta os processos industriais de geração de gordura vegetal hidrogenada.

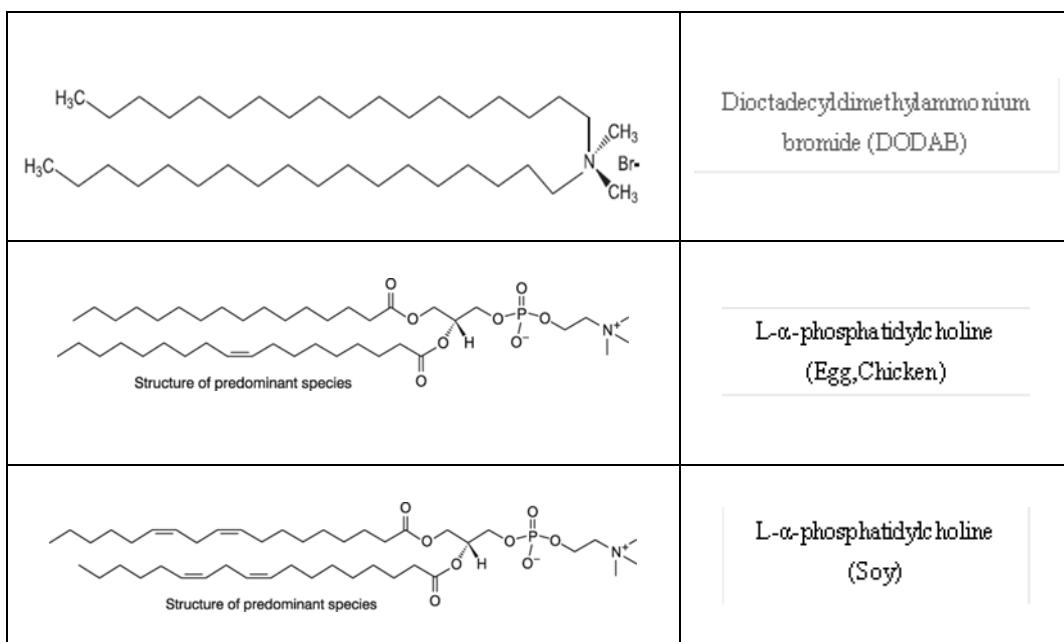
As tabelas a seguir, baseadas na referência (6), indicam o total em ácidos graxos saturados e insaturados de 21 óleos e gorduras vegetais, avaliados por cromatografia a gás (GC-FID).

Óleo	Total ácidos
BOR	12.96
CAN	6.98
CRN	13.46
COR	13.87
SUN	12.36
SUR	11.92
COT	25.73
EPR	8.11
FCO	8.15
SOY	15.10
SYB	15.12
OEV	12.98
OPR	13.53
ORF	15.28
PEA	18.38
RBO	20.68
RIO	18.22
PAL	49.45
PLK	80.34
CO _C	90.69

Óleo	Total ácidos graxos	Total ácidos graxos	Índice
BOR	25.25	61.79	4.77
EPR	7.99	83.90	10.34
CAN	64.42	28.60	4.10
CRN	26.11	60.43	4.49
COR	24.76	61.37	4.42
SUN	15.93	71.71	5.80
SUR	17.11	70.97	5.95
COT	17.49	56.78	2.20
FCO	22.04	69.81	6.56
SOY	21.73	63.17	4.18
SYB	23.92	60.64	4.01
OEV	77.44	9.58	0.74
OPR	75.37	11.10	0.82
ORF	77.00	7.72	0.50
PEA	50.33	31.29	1.70
RBO	41.41	37.91	1.83
RIO	44.51	37.27	2.04
PAL	39.66	10.83	0.22
PLK	16.90	2.76	0.03
CO _C	7.51	1.80	0.02

*BOR = borage; CAN = canola; CRN/COR = corn; SUN/SUR = sunflower; COT = cottonseed; EPR = evening primrose; FCO = linseed; SOY/SYB = soybean; OEV = extra virgin olive; POR = olive pomace; ORF = olive; PEA = peanut; RBO/RIO = rice bran; PAL = palm; PLK = palm kernel; COC = coconut;

Desafio: Considerando que lipossomos de fosfatidilcolina de ovo e de soja são feitos à temperatura ambiente e após pesquisar sobre a metodologia de preparo de lipossomos (itens 2.1, 2.2 e 2.3) no artigo “Interaction of gramicidin with DPPC/DODAB bilayer fragments” de Ana Maria Carmona-Ribeiro, explique porque os lipossomos de DODAB são feitos sob aquecimento.



Parte II

Materiais

Reagentes

- Solução de sabão de coco obtida da diluição em água deionizada aquecida e sob agitação de sabão de coco puro em barra na proporção de 1:9 (m/v)
- Solução de NaOH (10 M)
- Solução de HCl (1 M)
- Água deionizada

Materiais e vidrarias

- 3 tubos de ensaio por grupo
- Estante para tubos de ensaio
- Pipetador automático e ponteiras de 1000 e de 100 μL
- Béquer pequeno

1. Identificar os tubos de ensaio: 1, 2 e 3. Em cada um deles colocar 1 mL da solução de sabão de coco fornecida e acrescentar 1 mL de água deionizada.
2. No tubo 2 acrescentar 100 μL de HCl, observar e anotar a mudança ocorrida.
3. No tubo 3 acrescentar 100 μL de HCl, em seguida 50 μL de NaOH e agitar suavemente misturando a solução. Observar a mudança ocorrida. Fotografe os 3 tubos juntos.

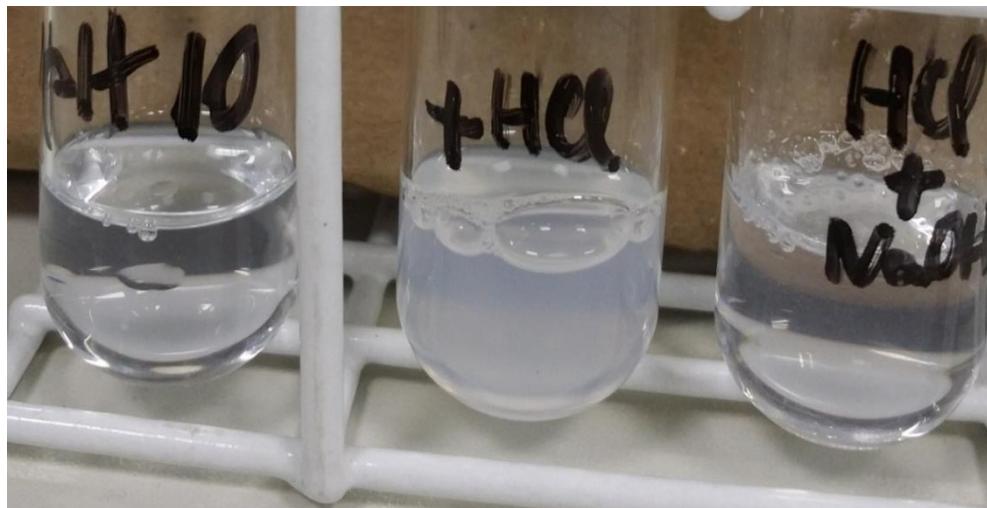
	1 (controle)	2	3
Solução sabão de coco	1 mL	1 mL	1 mL
Água	1 mL	1 mL	1 mL
Solução HCl (1 M)	-	100 μL	100 μL
Solução NaOH	-	-	50 μL
Aspecto da solução (turvo, precipitado, límpido)			

Discuta:

- 1) Qual a natureza química do detergente do sabão de coco e como ele é produzido.
- 2) Qual a organização supramolecular que o surfactante do sabão de coco forma em água.
- 3) Pesquise quais os outros surfactantes que frequentemente são usados nos produtos de limpeza comerciais e suas estruturas.

Exercícios:

- 1) Para a produção de sabão caseiro usa-se uma mistura denominada potassa alcoólica (1,75M KOH, 95% etanol) misturada ao óleo desejado (óleo de cozinha, por exemplo), seguido de aquecimento lento. Responda as questões abaixo:
- A) Sabendo que a peso molecular do KOH é 57, demonstre como preparar 2 litros de potassa alcoólica. B) Se adicionarmos um ácido forte em uma solução de sabão, qual o resultado observado? Justifique.
- 4) Com o objetivo de caracterizar ácidos graxos, um professor de bioquímica resfriou uma amostra de azeite de oliva e outra de óleo de amendoim a 0 °C. Ele observou a solidificação do óleo de amendoim, mas o azeite de oliva permaneceu líquido. Explique os resultados obtidos com base na estrutura molecular dos ácidos graxos e seus respectivos pontos de solidificação.

Resultado esperado

Parte III (início do experimento referente a Aula 5)

Materiais e vidrarias (para uma turma dividida em 6 grupos)

- 8 frascos de vidro com tampa (um por grupo e dois frascos para os controles – PLA e PLA /10% TPS)
- Micropipetas de 10 µL, 100 µL e de 1000 µL (um conjunto para cada grupo)

Reagentes

- 3 placas de PLA (grupos A,B e C – uma placa por grupo) mais uma placa controle
- 3 placas de PLA /10% TPS (grupos D, E e F – uma placa por grupo) mais uma placa controle
- Solução alcoólica de Cumeno hidroperóxido 300 mM
- Solução aquosa de Cloreto de ferro II (FeCl_2) 2 mM

Observações:

- 1 - Preparar a solução estoque de cumeno hidroperóxido (300 mM) em etanol P.A. (110,8 µL de cumeno e 1889,2 µL de etanol = volume final de 2 mL)
- 2 - A solução de Cumeno hidroperóxido deve ser armazenada protegida da luz no freezer.e descongelada a temperatura ambiente no momento da utilização.
- 3 - A solução de cloreto de ferro II deve ser armazenada protegida da luz a temperatura ambiente.
- 4 - Agitar as soluções antes da utilização.
- 5 - Manipular as soluções utilizando luvas.
- 6- As placas serão fornecidas pelo professor Derval Rosa. Essas deverão ser cortadas com tamanho médio de 0,8 cm² (ou adequado para ser colocada nos frascos).

Procedimento:

- 1) Separar a TURMA em 6 grupos (A, B, C, D, E e F)
- 2) Cada GRUPO deverá seguir o PROTOCOLO proposto PARA A SUA LETRA, conforme especificado abaixo e na tabela 1. O grupo A e o grupo D deverão fazer também, respectivamente, os grupos CONTROLE PLA e CONTROLE PLA/10% TPS. Cada controle corresponde a respectiva placa mantida individualmente em um frasco com água durante todo o experimento.

GRUPO A:

- 1) Fotografar a placa de PLA antes do início do experimento. Observar o aspecto da sua superfície.
- 2) Anotar em seu frasco o nome do seu grupo (A) e adicionar no interior desse frasco 1990 µL de água deionizada.

- 3) Adicionar 10 μ L de FeCl₂ (2mM). Agitar a solução.
- 4) Adicionar a placa de PLA.
- 5) Deixar a placa reagindo com a solução por 7 (sete) dias.
- 6) Após o período de incubação fotografar a placa de PLA e observar as mudanças ocorridas.

GRUPO B:

- 1) Fotografar a placa de PLA antes do início do experimento. Observar o aspecto da sua superfície.
- 2) Anotar em seu frasco o nome do seu grupo (B) e adicionar no interior desse frasco 1938 μ L de água deionizada.
- 3) Adicionar 62 μ L de cumeno hidroperóxido (300 mM). Agitar a solução.
- 4) Adicionar a placa de PLA.
- 5) Deixar a placa reagindo com a solução por 7 (sete) dias. Obs.: O técnicos do laboratório irão adicionar mais 62 μ L de cumeno hidroperóxido a esse frasco, diariamente, até o dia da próxima aula (de 4 a 5 adições).
- 6) Após o período de incubação fotografar a placa de PLA e observar as mudanças ocorridas.

GRUPO C:

- 1) Fotografar a placa de PLA antes do início do experimento. Observar o aspecto da sua superfície.
- 2) Anotar em seu frasco o nome do seu grupo (C) e adicionar no interior desse frasco 1928 μ L de água deionizada.
- 3) Adicionar 10 μ L de FeCl₂ (2mM) e 62 μ L de cumeno hidroperóxido (300 mM). Agitar a solução. Obs.: O técnicos do laboratório irão adicionar mais 62 μ L de cumeno hidroperóxido a esse frasco, diariamente, até o dia da próxima aula (de 4 a 5 adições).
- 4) Adicionar a placa de PLA.
- 5) Deixar a placa reagindo com a solução por 7 (sete) dias.
- 6) Após o período de incubação fotografar a placa de PLA e observar as mudanças ocorridas.

GRUPO D:

- 1) Fotografar a placa de PLA /10% TPS antes do início do experimento. Observar o aspecto da sua superfície.
- 2) Anotar em seu frasco o nome do seu grupo (D) e adicionar no interior desse frasco 1990 μ L de água deionizada.
- 3) Adicionar 10 μ L de FeCl₂ (2mM). Agitar a solução.
- 4) Adicionar a placa de PLA /10% TPS.
- 5) Deixar a placa reagindo com a solução por 7 (sete) dias.
- 6) Após o período de incubação fotografar a placa de PLA /10% TPS e observar as mudanças ocorridas.

GRUPO E:

- 1) Fotografar a placa de PLA /10% TPS antes do início do experimento. Observar o aspecto da sua superfície.
- 2) Anotar em seu frasco o nome do seu grupo (E) e adicionar no interior desse frasco 1938 μ L de água deionizada.
- 3) Adicionar 62 μ L de cumeno hidroperóxido (300 mM). Agitar a solução.
- 4) Adicionar a placa de PLA /10% TPS.
- 5) Deixar a placa reagindo com a solução por 7 (sete) dias. Obs.: O técnicos do laboratório irão adicionar mais 62 μ L de cumeno hidroperóxido a esse frasco, diariamente, até o dia da próxima aula (de 4 a 5 adições).
- 6) Após o período de incubação fotografar a placa de PLA /10% TPS e observar as mudanças ocorridas.

GRUPO F:

- 1) Fotografar a placa de PLA /10% TPS antes do início do experimento. Observar o aspecto da sua superfície.
- 2) Anotar em seu frasco o nome do seu grupo (F) e adicionar no interior desse frasco 1928 μ L de água deionizada.
- 3) Adicionar 10 μ L de FeCl₂ (2mM) e 62 μ L de cumeno hidroperóxido (300 mM). Agitar a solução. Obs.: O técnicos do laboratório irão adicionar mais 62 μ L de cumeno hidroperóxido a esse frasco, diariamente, até o dia da próxima aula (de 4 a 5 adições).

- 4) Adicionar a placa de PLA /10% TPS.
- 5) Deixar a placa reagindo com a solução por 7 (sete) dias.
- 6) Após o período de incubação fotografar a placa de PLA /10% TPS e observar as mudanças ocorridas.

GRUPO CONTROLE PLA e GRUPO CONTROLE PLA /10% TPS

- 1) Identificar nos frascos o nome do grupo (em um “controle PLA” e no outro “controle PLA /10% TPS” e adicionar no interior de cada frasco 2000 µL de água deionizada.
- 2) Adicionar a respectiva placa.
- 3) Deixar em incubação por tempo semelhante aos demais grupos.

OBSERVAÇÃO PARA OS COLABORADORES DA DISCIPLINA:

- As placas deverão permanecer reagindo com a solução em média por 7 dias, sendo que a adição de reagente quando indicado deverá ser feita por 4 ou 5 dias, de acordo com o permitido pelo calendário do quadrimestre.
- Antes da aula, descartar a solução de todos os frascos, mantendo a placa no respectivo recipiente destampado, para que essa esteja seca no momento da observação ao microscópio óptico. Disponibilizar as placas no frasco para os alunos.

Tabela 1 - Resumo do procedimento experimental sobre o uso do amido termoplástico como aditivo ao poliácido láctico para produção de material compósito de mais fácil degradação no meio ambiente por mecanismos oxidativos.

Grupo \	A	B	C	D	E	F	CONTROLE PLA (grupo A)	CONTROLE PLA /10% TPS (grupo D)
Placa	PLA	PLA	PLA	PLA /10% TPS	PLA /10% TPS	PLA /10% TPS	PLA	PLA /10% TPS
Água deionizada (microlitros=µL)	1990	1938	1928	1990	1938	1928	2000	2000
Cloreto de Fe II (2mM) (microlitros=µL)	10	--	10	10	--	10	--	--
Cumeno hidroperóxido (300mM) (microlitros=µL)	--	62	62	--	62	62	--	--
Adição diária de cumeno Hidroperóxido (microlitros=µL)	--	62*	62*	--	62*	62*	--	--
*Feito pelos técnicos de laboratório								

Referências Bibliográficas

1. MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. *Bioquímica Básica*, 3 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
2. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*, 5 ed., Garland Science, New York, 2008.
3. LEHNINGER, ALBERT L.; NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. *Princípios de bioquímica*, 4 ed., São Paulo: Sarvier, 2006.
4. NEPOMUCENO, M. F.; RUGGIERO, A. C. *Manual de Bioquímica: Roteiros de Análises Bioquímicas Qualitativas e Quantitativas*, 1 ed., Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.
5. PETKOWICZ, I.; DE OLIVEIRA, C. L. *Bioquímica: Aulas Práticas*, 7 Ed., Editora UFPR, Paraná, 2007.
6. ZAMBIAZI, R.C.; PRZYBYLSKI, R.; ZAMBIAZI, M.W.; MENDONÇA; C.B. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. *B.CEPPA*, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 111-120, jan./jun. 2007.
7. CARVALHO, C.A.; OLIVARES-ORTEGA, C.; SOTO-ARRIAZA, M.A.; CARMONA-RIBEIRO A. M. Interaction of gramicidin with DPPC/DODAB bilayer fragments. *Biochimica et Biophysica Acta* 1818, 3064–3071, 2012.

Experimento 5 – Açúcares para biologia e materiais avançados.

Resumo

O objetivo da aula é estudar o poder redutor dos açúcares não hidrolisáveis e hidrolisáveis com uso de método colorimétrico qualitativo. Para tanto serão usados a glicose, o amido e a sacarose. Os resultados obtidos serão discutidos em função da estrutura química espacial adquirida em meio aquoso por este polissacarídeo. O poder redutor dos açúcares possui aplicações como por exemplo para fins de diagnóstico em exames laboratoriais. Será também estudada a aplicação dos açúcares, no caso o amido, na produção de materiais que tenham propriedades de resistência associada com maior rapidez e intensidade de degradação ambiental. Para tanto, vamos comparar a degradação do poliácido láctico (do Inglês, PLA) com o material compósito contendo 10% de amido termoplástico (do Inglês, TPS). Placas dos dois materiais serão expostas à degradação oxidativa promovida por ferro, cumeno-hidroperóxido e a combinação dos dois agentes. Os materiais serão analisados a olho nu e ao microscópio ótico. Essas observações serão complementadas por medidas previamente feitas de micro-FTIR e microscopia eletrônica de varredura.

Estes experimentos permitem a aplicação dos conceitos teóricos adquiridos durante as aulas sobre a conformação espacial do amido e o estudo dos mecanismos oxidativos para a degradação de PLA associados com o efeito da mistura com TPS. Assim, há a junção da ciência fundamental com o interesse prático no desenvolvimento de novos materiais para garantir a sustentabilidade, o que justifica a inclusão desses tópicos na disciplina de Bioquímica: Estrutura, Propriedades e Funções de Biomoléculas para o BCT da UFABC.

Introdução

Os acúcares são os componentes essenciais de todos os organismos vivos e representam a classe mais abundante de biomoléculas. A unidade básica dos açúcares são os chamados monossacarídeos ou açúcares simples (glicose, frutose, manose, ribose, etc...). Os polissacarídeos são constituídos de um grande número de unidades monossacarídeas ligadas covalentemente, sendo dessa classe o amido, o glicogênio, a celulose, dentre outros.

O amido constitui uma das mais abundantes fontes de açúcar. O amido é um polissacarídeo que tem como função reserva energética na forma de açúcares em plantas, que são consumidas por organismos heterotróficos como principal fonte de glicose para geração de ATP por meio de reações catabólicas oxidativas¹. Embora a distribuição do amido seja ampla no reino vegetal, poucas plantas o produzem em grandes quantidades. O amido constitui de 50% a 65% do peso das sementes de cereais secos, e até 80% da substância seca dos tubérculos. Milho e outros cereais, como o arroz, o sorgo e o trigo, contribuem significativamente para o suprimento mundial de amido. Nos Estados Unidos mais de 95% do amido comercializado é proveniente do milho. Em muitos países, como por exemplo, no Brasil, o amido também é extraído da batata, dos rizomas da araruta e das raízes da mandioca². O amido ocorre em grânulos (ou grãos) que têm estrias típicas. Estas, aliadas ao tamanho e à forma dos grânulos, são específicas de cada espécie de planta e esta característica morfológica pode servir de meio de identificação microscópica da origem botânica do amido³ (Fig. 1).



Fig. 1 . Microscopia eletrônica de varredura (MEV) à esquerda e microscopia óptica à direita de um grânulo de amido.

(fonte: <http://www.cheng.cam.ac.uk/research/groups/polymer/RMP/nitin/Granule.jpg>).

O amido tem estrutura química muito parecida com o glicogênio, porém possui menos ramificações. Tem função nos vegetais semelhante à do glicogênio nas células animais, ou seja, de reserva energética. Sua síntese em plantas também é bastante semelhante à síntese do glicogênio em animais, com a substituição da forma ativada da glicose de UDP-glicose por ADP-glicose, com catálise pela enzima amido sintase. No processo de digestão, a hidrólise do amido é catalisada enzimaticamente pelas α -amilases salivar e pancreática, que clivam as ligações glicosídicas $\alpha 1 \rightarrow 4$ da amilose originando uma mistura de maltose, amilopectina e glicose, e também as ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ da amilopectina, originando uma mistura de polissacarídeos denominados dextrinas¹.

Estruturalmente, o amido é classificado como um homopolissacarídeo e a hidrólise de suas ligações glicosídicas fornece unidades de glicose livres¹. Tal hidrólise pode ser química ou enzimática e a glicose formada pode ter diversos destinos, desde aplicações biológicas, até

aplicações biotecnológicas, servindo como fonte de açúcares para reações fermentativas para produção de etanol em indústrias químicas, na indústria de alimentos, de bebidas ou de combustíveis. Nos países europeus e nos Estados Unidos, mais de 50% da produção de amido é destinada à produção de hidrolisados, tais como glicose, maltose, dextrinas e maltodextrinas. Esses hidrolisados, por suas propriedades específicas e seus diferentes usos no setor alimentício, constituem uma excelente valorização da fécula, sendo usado na fabricação de xaropes, preparo de colas e gomas, como excipiente farmacêutico, etc².

No entanto, as aplicações comerciais do amido estão sendo ampliadas. Atualmente os cientistas estão sendo desafiados a pesquisas focadas no desenvolvimento e avaliação de polímeros e compósitos de fontes renováveis para a substituição de polímeros à base de petróleo. O amido é considerado promissor, pois pode ser usado como matéria prima para a produção de polímeros sintéticos ou diretamente como polímero termoplástico, possui baixo custo e é derivado de fonte abundante. O amido, em especial o amido termoplástico (TPS, do inglês Thermoplastic Starch), tem sido pesquisado para aplicações sob a forma de filmes e em produtos da área biomédica, devido sua biocompatibilidade e biodegradabilidade nos sistemas biológicos⁸. O TPS tem sido usado como um bom substituto para os plásticos baseados em petróleo em muitas aplicações, com grande potencial para novas aplicações e consequentes impactos positivos, econômicos e ambientais. Essa é uma questão de grande relevância, pois atualmente os polímeros sintéticos se tornaram indispensáveis devido sua aplicação em diversas áreas, tais como embalagens, alimentos, agricultura, construção civil, materiais espaciais, etc. No entanto, quando aplicados em produtos plásticos de curto tempo de vida tem-se observado a eliminação de milhões de toneladas, muitas vezes, de forma inadequada. Esse fato tem causado sérios impactos ambientais devido os polímeros sintéticos serem resistentes à degradação abiótica e biótica⁴.

Os monossacarídeos são definidos como poli-hidroxialdeídos ou poli-hidroxicetonas ou compostos que os liberem por hidrólise. Apresentam a fórmula geral $[C(H_2O)]_n$ e apresentam uma propriedade química muito importante em meio aquoso devido à reatividade da carbonila: ciclização em meio aquoso. Este processo de ciclização leva a formação de um carbono anomérico, sendo que a hidroxila formada ligada a esse carbono apresenta propriedades redutoras^{1,5,6}.

Diversos reagentes são utilizados para a análise de poder redutor em açúcares. Alguns desses métodos utilizam agentes oxidantes suaves, tais como íons ferroso (Fe^{3+}) e cúprico (Cu^{2+}) em meio alcalino, fazendo detecção qualitativa^{1,6}. Métodos quantitativos utilizam técnicas

espectrofotométricas, titulométricas ou gravimétricas⁵. Dissacarídeos ligados pelas suas hidroxilas redutoras como é o caso da sacarose não apresentam poder redutor, porém quando hidrolisados passam a exibir esta característica. Tais propriedades são muito importantes e, por muitas vezes, utilizadas para identificação de açúcares, verificação de adulteração e falsificação de alimentos, entre outros⁵.

1. Fundamentação Teórica

Estruturalmente, o amido é formado pela mistura de dois polímeros, a amilose e a amilopectina, que são homopolissacarídeos constituídos por resíduos de α -D-glicopiranose ligados entre si por ligações glicosídicas mas que apresentam diferentes estruturas e propriedades. A amilopectina constitui aproximadamente 80% do peso seco dos polissacarídeos existentes no grão de amido e é menos hidrossolúvel que a amilose. É formada por resíduos de α -D-glicose unidos entre si por ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 4$) com ramificações ($\alpha 1 \rightarrow 6$), enquanto que a amilose não possui tais ramificações, formando um polímero linear (Fig. 2). A cristalinidade do grânulo de amido se deve basicamente à molécula de amilopectina. A amilose, embora linear, não é responsável pela cristalinidade do amido, provavelmente devido ao fato de se conformar como hélice (Fig. 3)¹ o que dificulta sua associação regular com outras cadeias. A organização da amilopectina em domínios amorfos (pontos de ramificação) e cristalinos gera a estrutura em camadas e radialmente orientada (Fig. 4)³ dos grânulos densos de estocagem do amido, já mostrados na Fig. 1

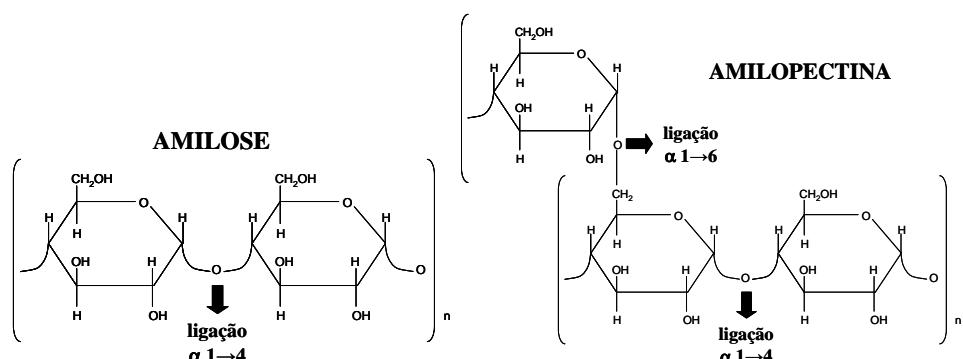


Fig. 2 . Estruturas químicas da amilose e amilopectina, evidenciando as ligações glicosídicas¹.



Fig. 3. Representação da estrutura helicoidal de uma cadeia de amilose, polímero que compõe a estrutura do amido¹.

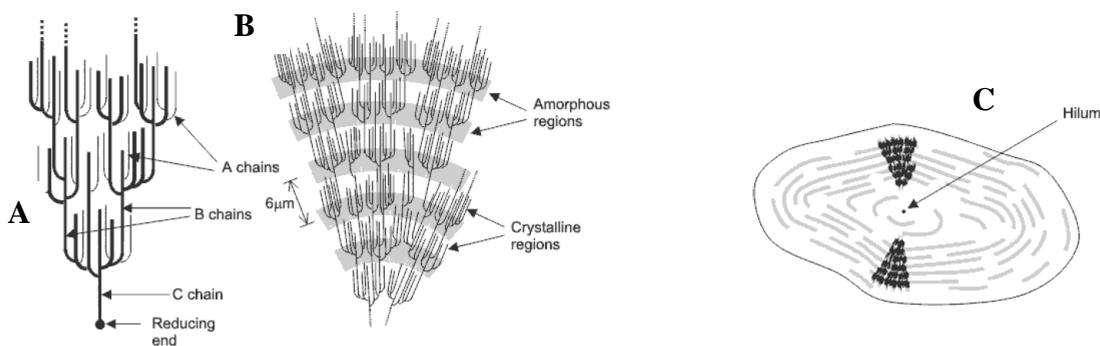


Fig. 4. A) Classificação das cadeias da amilopectina em tipo A, B e C. B) Estrutura da amilopectina formando as regiões amorfas e cristalinas no grânulo de amido. C) Modelo da estrutura interna do grânulo de amido com a visualização dos anéis de crescimento e centro ou hilum³.

Conforme pode ser verificado na Fig. 2, há a presença de vários grupos hidroxila na estrutura do amido, o que acarreta uma natureza altamente hidrofílica a esse. A insolubilidade do grânulo em água fria é devida às fortes ligações de hidrogênio que mantêm as cadeias de amido unidas. No entanto, na presença de água e aquecimento, a água é incorporada na estrutura do grânulo fazendo com que componentes mais solúveis, como a amilose, se dissociem e difundam-se para fora do grânulo. Este processo é conhecido como gelatinização. Com a gelatinização, ocorre um aumento da viscosidade do meio, os grânulos são totalmente quebrados e as regiões cristalinas desaparecem⁷.

Devido as características do amido nativo, materiais poliméricos com grandes concentrações de amido, ou com base exclusivamente desse, apresentam muitas deficiências, tais como elevada hidrofilicidade, pouca resistência mecânica, sensibilidade térmica, ausência de plasticidade e baixa miscibilidade com outros polímeros. Além disso, como a temperatura de fusão cristalina do amido é superior à sua temperatura de degradação térmica, seu processamento só é possível com a plastificação do material⁴.

O TPS, também denominado amido plastificado ou amido desestruturado, é formado com o processamento do amido a cerca de 130°C e posterior resfriamento, após o qual apresenta-se como um material amorfó ou semicristalino, no qual as cadeias de amilose e

amilopectina estão intercaladas. É produzido pelo aquecimento do amido na presença de plastificantes (moléculas pequenas que interagem com cadeias poliméricas como um solvente, formando uma “solução sólida”), sendo o glicerol o mais empregado por possuir estrutura molecular pequena, polar e com elevado ponto de ebulição. Durante o processamento, os grânulos de amido absorvem o plastificante; e posteriormente, ao absorver energia têm seu grau de cristalinidade显著mente reduzido, o que favorece a formação de novas ligações (ou interações) entre o amido e o plastificante⁴.

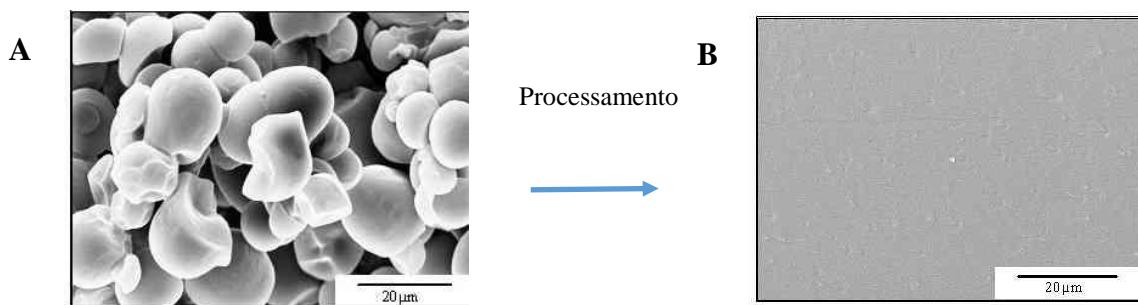


Fig. 5 - Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície do amido granular (A) e do Amido TPS com grãos desestruturados (B)⁷.

Considerando que há limitantes tecnológicas para o uso em processos industriais, alguns métodos são empregados para melhorar as propriedades de materiais a base de amido: preparação de misturas com outros polímeros naturais (blendas polimérica), compósitos, nanocompósitos e modificação química⁴. O estudo de blendas de amido com outros materiais biodegradáveis, oriundos de fontes renováveis, tem sido foco de vários pesquisadores nos últimos anos^{8,9}. Vários poliésteres biodegradáveis sintéticos ou obtidos por processos biológicos (Fig. 6) tem sido usados em blendas com o amido termoplástico: o poli(ácido-lático) (PLA), policaprolactona (PLC), poli(succinato-co-adipato de butileno (PBSA),etc. Destes, o PLA tem sido largamente estudado devido à suas características físico-químicas que são apropriados para a maioria dos usos comuns destes materiais⁸.

O poli(ácido-lático) é um termoplástico da família dos poliésteres alifáticos com características hidrofóbicas, obtido a partir da policondensação do D- ou L-ácido lático, um ácido orgânico encontrado em muitos produtos naturais, produzido por síntese química ou fermentação microbiana. O PLA ser encontrado em duas formas: (i) materiais enantioméricos feito a partir de ácido D- e L-láctico (PLLA e PDLA), esses são polímeros semicristalinos quando enantiomericamente puro; e (ii) materiais amorfos que contêm ambas as formas D e L de ácido láctico (PLLA). Suas principais desvantagens são sua fragilidade e baixa estabilidade

térmica. Estudos com blendas poliméricas de TPS com PLA tem mostrado que as propriedades do PLA podem ser moduladas pela variação da proporção dos enantiômeros na composição do material e pelo uso de aditivos^{7,8,9}.

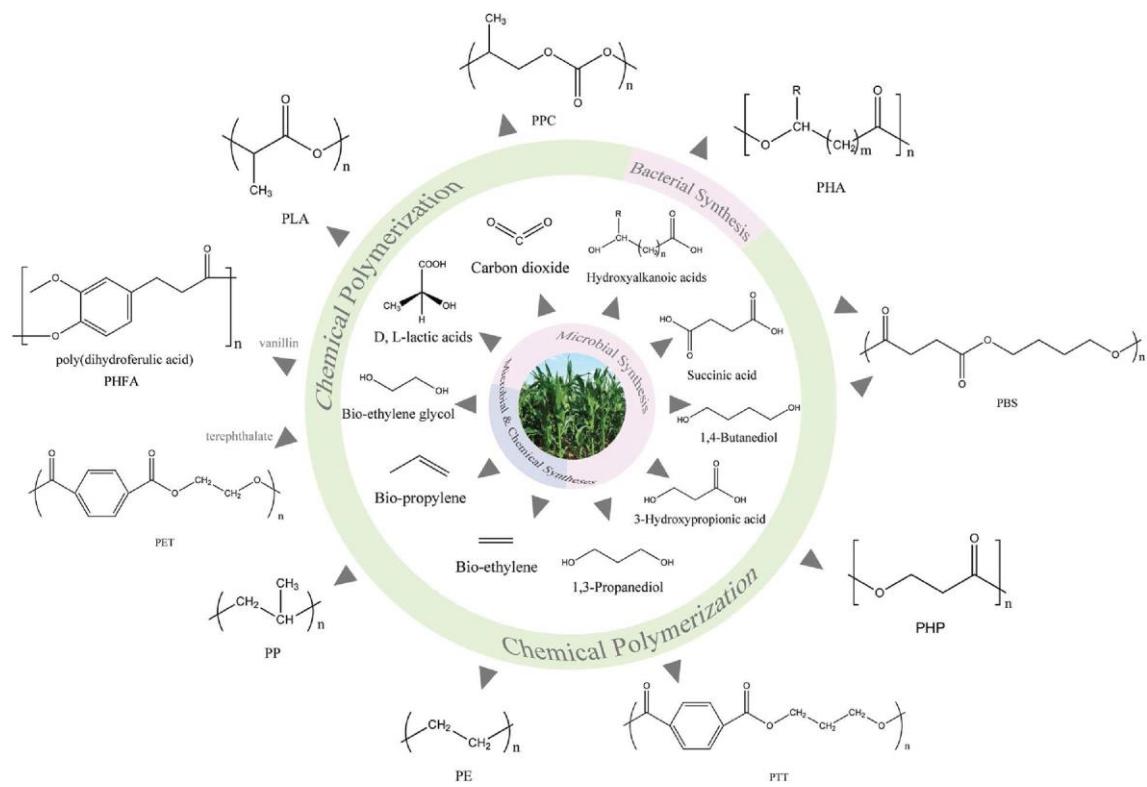


Fig. 5. Polímeros bioplásticos e seus monômeros relacionados com o processo de origem e moléculas precursoras⁸.

Apesar dos avanços recentes no desenvolvimento de composições de TPS, sua aplicação ainda é muito limitada em função de algumas deficiências: baixa resistência mecânica, elevada sensibilidade à água, alteração de suas propriedades devido a cristalização durante o armazenamento e elevada viscosidade do material fundido, além da baixa compatibilidade do amido com os polímeros atuais, o que pode dificultar seu processamento⁴. Assim, novas abordagens de produção são necessárias para uma maior utilização do amido como material plástico, já que blendas de PLA com TPS resultam em materiais que têm sua degradação favorecida pois alguns microrganismos podem utilizar o amido como fonte de nutrientes e secretar enzimas que consomem o polímero⁹.

Polímeros biodegradáveis são decompostos em fragmentos de menor massa molar pela ação de microrganismos, ou seja, fungos, bactérias que podem excretar enzimas que podem promover a degradação destes materiais em um período de tempo (principalmente quando se compara com relativamente curto quando com os polímeros convencionais). O processo irreversível da biodegradação ocorre em certas condições de umidade, luz, calor e nutrientes

orgânicos e gera CO₂, CH₄, H₂O, entre outros. É claro que esses compostos são diferentes quando os processos são aeróbio (com a presença de oxigênio) ou anaeróbio (sem a presença de oxigênio). Há muitas enzimas no solo as quais podem ser ativas tanto em ambientes bióticos quanto abióticos. Estas enzimas são produzidas por microrganismos nativos do solo, bem como por raízes das plantas. Os fungos são importantes produtores de enzimas oxidativas, tais como Mn-peroxidase e peroxidase de lignina que podem contribuir para a degradação de biopolímeros e polímeros sintéticos. Enzimas do solo são encontradas em células proliferativas ou latentes, detritos celulares, argilas, húmus em coloides ou em fase aquosa. A contribuição de proteínas heme e peróxidos para a degradação do PLA modulada pela presença da TPS foi o foco de um estudo⁹ realizado na UFABC o qual inspirou essa aula.

O estudo dos mecanismos oxidativos para a degradação de PLA associados com o efeito da mistura com TPS combina a ciência fundamental com o interesse prático no desenvolvimento de novos materiais para garantir a sustentabilidade, o que justifica a inclusão desse tópico na disciplina de Bioquímica: Estrutura, Propriedades e Funções de Biomoléculas.

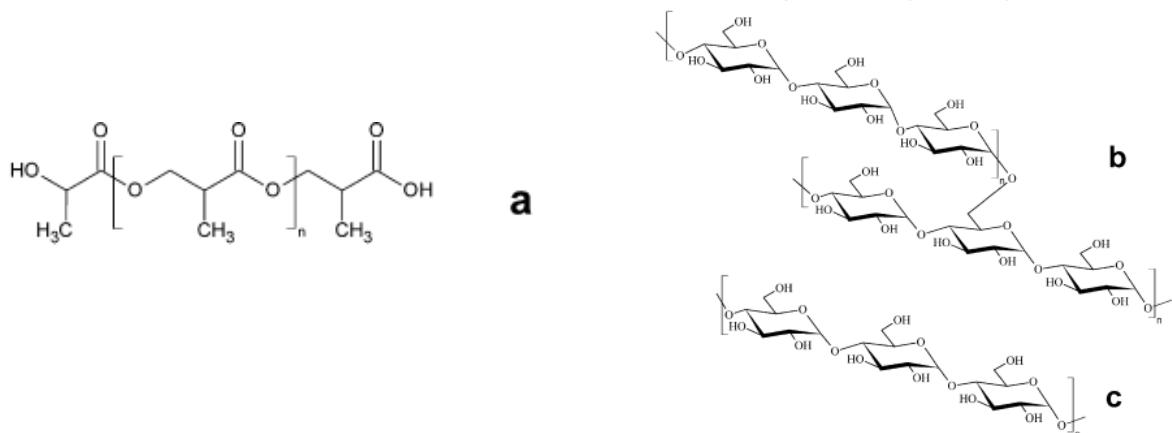


Fig. 6. Estrutura de (a) Poli(ácido lático) e amido: (b) amilopectina e (c) amilose.

2.Caracterização do PLA e PLA/TPS por micro-ATR-FTIR

Técnicas espectroscópicas

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas, obtendo informações físicas e químicas sobre o material analisado. Há dois tipos de técnica espectroscópica: espectroscopia de emissão e espectroscopia de absorção. Na espectroscopia de emissão, ocorre a excitação dos átomos do material estudado por meios térmicos e

eletrônicos. Quando os átomos decaem de volta ao estado fundamental estável, a energia absorvida pode ser parcialmente emitida em forma de ondas eletromagnéticas, sendo essa energia detectada e utilizada para a análise do material. Na espectroscopia de absorção, a substância a ser analisada é posicionada entre o detector e uma fonte de energia que emite a radiação eletromagnética com o comprimento de onda desejado, sendo a análise feita comparando-se a radiação transmitida ou refletida pela amostra, com a radiação da fonte. A escolha da técnica depende do material ou substância a ser analisado, da informação desejada e da radiação eletromagnética utilizada^{10,11}.

Espectroscopia de absorção

O processo de absorção ocorre quando a frequência da radiação incidente é a mesma que a frequência de vibração molecular. Sabe-se que as moléculas e átomos de um material não são estáticos; eles possuem uma frequência natural de vibração. Assim, quando a vibração molecular ou rotacional origina um momento dipolo da molécula, surge um campo elétrico. Se a radiação eletromagnética tiver a mesma frequência da vibração molecular, o campo elétrico alternante da radiação incidente interage com o campo elétrico originado pela mudança de momento dipolo, e ocorre uma transferência de energia da radiação para a molécula (absorção), originando um espectro. Essa frequência pode ser calculada através de uma expressão que relaciona a frequência vibracional com a constante de ligação química (uma medida de rigidez) e a massa reduzida em relação às massas dos átomos que formam a molécula^{10,11}.

A vibração dos átomos no interior de uma molécula apresenta energia correspondente a região do espectro eletromagnético do infravermelho (IR). Além disso, a radiação infravermelha não possui energia suficiente para que sua absorção possa alterar o nível energético orbital da molécula, sendo assim, seu uso envolve a espectroscopia de absorção e o sinal analisado será o transmitido ou o refletido, dependendo do equipamento utilizado e do material analisado. Em relação a análise quantitativa e qualitativa de compostos orgânicos, a espectroscopia de absorção é de grande utilidade e a mais indicada, pois existe uma diversidade de compostos que apresentam bandas de absorção na região espectral entre 4000 a 670 cm⁻¹ que é o segmento, dentre as regiões espectrais do infravermelho mostradas na Tabela 1, mais frequentemente usado nos equipamentos disponíveis^{10,11}.

Tabela 1 - Subdivisões da região espectral do infravermelho¹⁰.

	Número de onda (cm ⁻¹)	Frequência (Hz)	Comprimento de onda (μm)
Infravermelho próximo	12800 - 4000	$3,8 \times 10^{14} - 1,2 \times 10^{14}$	0,78 – 2,5
Infravermelho médio	4000 – 200	$1,2 \times 10^{14} - 6,0 \times 10^{12}$	2,5 – 50
Infravermelho distante	200 - 100	$6,0 \times 10^{12} - 3,0 \times 10^{11}$	50 - 1000

Como a energia fornecida pela radiação no IR tende a afetar os níveis vibracionais de uma ligação química, classifica-se as vibrações moleculares em dois tipos: deformações axiais e deformações angulares, simétricas ou assimétricas. Quando a deformação ocorre na direção do eixo da molécula, a distância interatômica aumenta e diminui alternadamente, o modo de vibração é denominado estiramento ou deformação axial. As vibrações de deformação angular correspondem ao movimento de um grupo de átomos em relação ao resto da molécula, sem que as posições relativas dos átomos do grupo se alterem, entretanto, ocorre a variação do ângulo entre duas ligações e podem ser de quatro tipos: tesoura, balanço, sacudida e torção^{10,11}.

Conforme esquematizado na Fig. 7, o espectro de absorção no infravermelho tem origem quando a radiação eletromagnética incidente tem uma componente com frequência correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais, refletindo esse movimento vibracional, o que aparece em forma de bandas. Embora o espectro no IR seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem próximas a uma mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. É justamente a presença destas bandas características de grupos que permite a obtenção de informações estruturais úteis. A frequência ou o comprimento de onda de uma banda de absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de forças das ligações e da geometria dos átomos. Átomos leves vibram a frequências mais altas do que os átomos mais pesados. As ligações triplas são mais rígidas do que as duplas, que são mais rígidas que as ligações simples, logo as ligações triplas vibram a frequências mais altas. A intensidade de uma banda de absorção é proporcional à concentração do componente que causou essa banda. Essa intensidade pode ser expressa como transmitância ou absorbância. A transmitância é a razão entre a energia radiante transmitida por uma amostra e a energia radiante que nela incide. A absorbância é o logaritmo decimal do inverso da transmitância¹⁰.

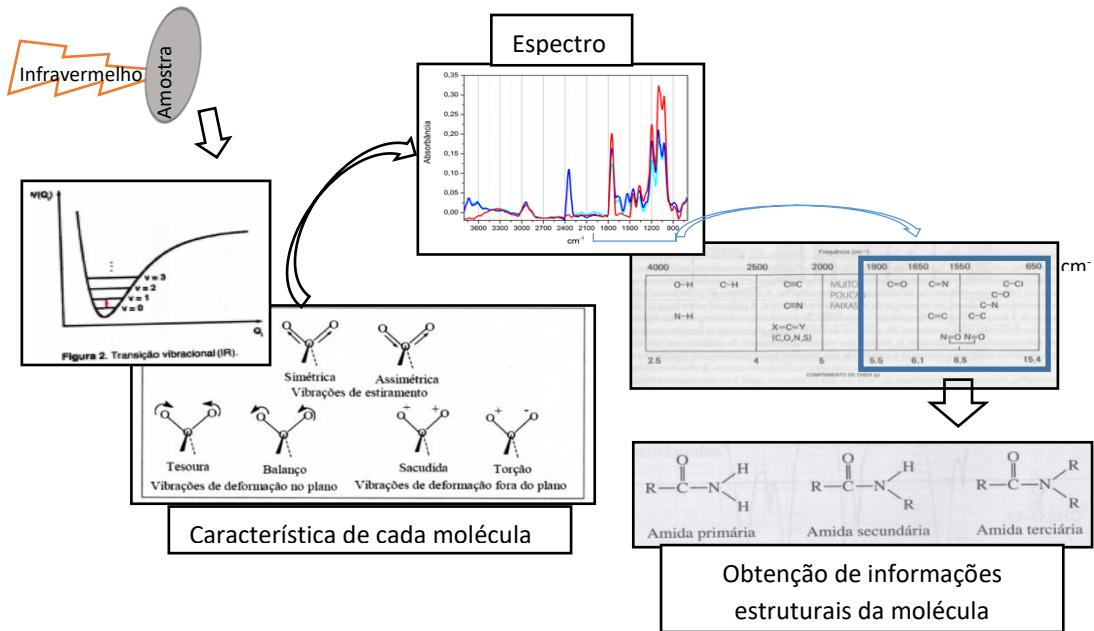


Fig. 7 - Esquema do processo de identificação de estruturas moleculares por espectroscopia de absorção no infravermelho.

Na espectroscopia de absorção no infravermelho a radiação proveniente de uma luz contínua (usualmente na regiãopectral de 2.5 a 25 μm ou 4000 a 400 cm^{-1}) atravessa a amostra a ser analisada, a radiação transmitida é comparada com aquela transmitida na ausência de amostra e o espetrômetro registra o resultado na forma de uma banda de absorção. A técnica de medição mais sofisticada atualmente envolve o uso de um interferômetro de Michelson e a posterior transformada de Fourier do interferograma, a chamada Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Há várias técnicas de FTIR que devem ser escolhidas de acordo com o tipo de amostra e as informações que se deseja obter. Assim, há disponíveis as seguintes técnicas: de Transmissão, de Absorção, Reflexão Total Atenuada (ATR), Refletância Especular e Refletância Difusa. Além dessas, com o acoplamento do microscópio ao equipamento é possível realizar a microespectroscopia pelas técnicas de Transmissão, Absorção, ATR, e Refletância Especular¹¹.

A técnica de reflexão total atenuada (ATR) (Figura 8A) possibilita a obtenção de espectros qualitativos e quantitativos de amostras sólidas independente de sua espessura. Essa técnica consiste na reflexão de um feixe que passa de um meio menos denso (cristal) para um meio mais denso (amostra). No entanto, uma pequena parcela da radiação incidente penetra poucos micrometros na amostra, podendo ser absorvida. Essa radiação que penetra no material² é chamada de onda evanescente. O cristal, um material de alto índice de refração, pode ser de

²A profundidade de penetração depende do comprimento de onda do feixe, do ângulo de incidência deste com a amostra, do índice de refração do cristal do equipamento e do material analisado

diamante, ZnSe (Seleneto de Zinco) ou Ge (Germânio) o qual deve ser escolhido de acordo com o material a ser analisado. A proporção de feixe refletido varia com o ângulo de incidência, havendo um ângulo crítico onde a reflexão é total, que depende do tipo de cristal. Com a absorção da radiação que penetrou na amostra, o feixe refletido tem sua intensidade atenuada, e assim se consegue identificar as bandas de absorção. A utilização do microscópio como acessório do equipamento caracteriza a técnica de μ -ATR (Figuras 8B e 9), que proporciona uma profundidade de penetração da radiação da ordem de 0.66 μm com o uso do cristal de Ge e de 2 μm de profundidade de penetração obtida com o cristal de Seleneto de Zinco, ou com o de diamante, disponível no modo ATR. Isso permite que o sinal analisado fique restrito à superfície da amostra. No modo microscópio é possível realizar a análise numa área de interesse previamente visualizadas¹¹.

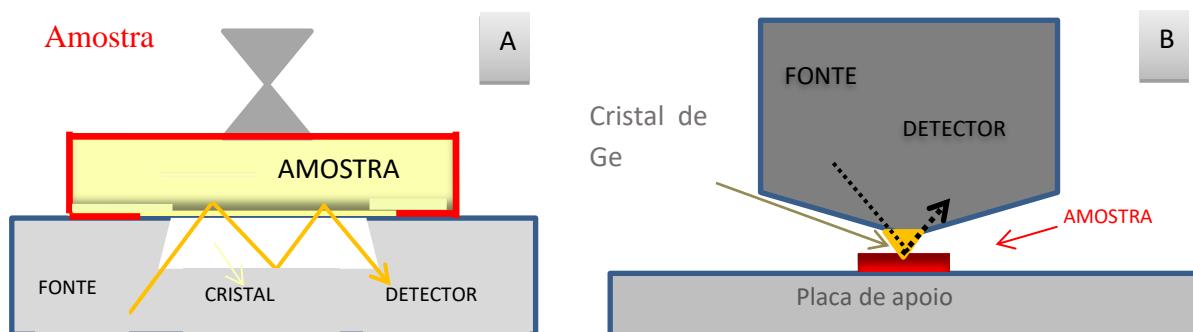


Fig. 8 - Esquema de funcionamento. A - FTIR com acessório ATR; B - μ -ATR¹¹.

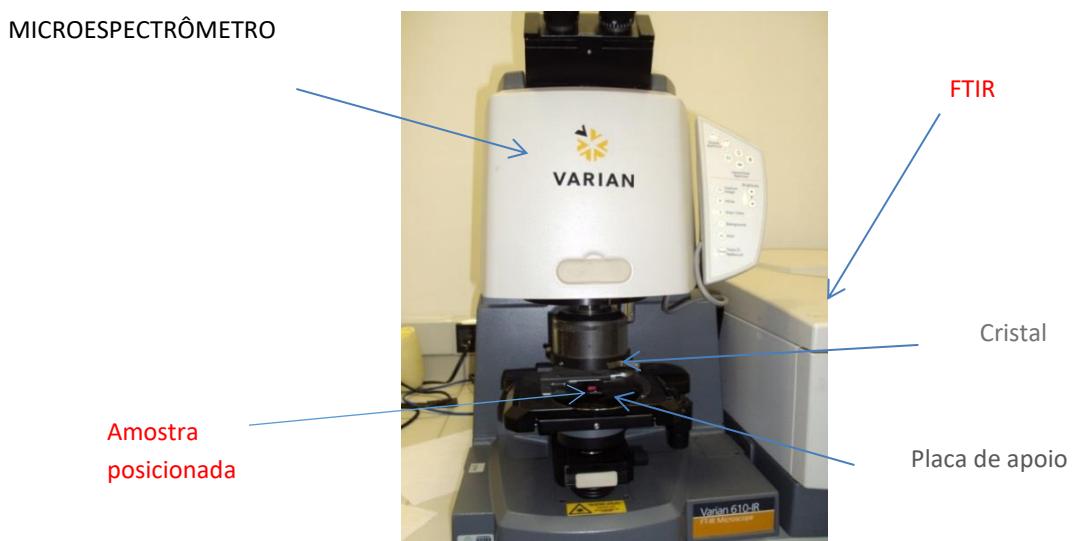


Fig. 9 - Microespectrômetro Varian 610 da CEM-UFABC, onde foram tomados os dados para análise composicional das placas de PLA e PLA/10%TPS.

2. Objetivos da aula

Permitir a compreensão da aplicação dos conceitos teóricos adquiridos durante as aulas sobre a conformação espacial do amido. Para isso, são propostos os seguintes objetivos específicos:

- fazer a reação qualitativa de identificação de açúcares redutores no amido utilizando o reagente de Benedict, em comparação com soluções de glicose e sacarose.
- estudar a aplicação dos açúcares, no caso o amido, na produção de materiais que tenham propriedades de resistência associada com maior rapidez e intensidade de degradação ambiental.
- familiarização dos discentes com a técnica espectroscópica FTIR, com imagens de microscopia eletrônica de varredura e de microscopia óptica para caracterização de materiais.

3. Procedimento Experimental

Reagentes

- reagente de Benedict;
- solução de glicose 1,0 % (m/v);
- solução de sacarose 1,0 % (m/v);
- suspensão de amido 1,0 % (m/v);

Materiais e Vidrarias

- estante para tubos de ensaio;
- 4 tubos de ensaio
- banho de aquecimento fervente (~ 100°C);
- pipetador automático e ponteiras de 500 e 1000 µL;
- pinça de madeira
- microscópio óptico com lâminas
- amostras de PLA e PLA-TPS preparadas na aula anterior

3.1. Pesquisa de poder redutor. Tomar 4 tubos de ensaio e seguir o procedimento abaixo:

Tubos	Amostras (mL)	H ₂ O (mL)	Benedict (mL)
B	-	1,5	1,0
1*	1,0	0,5	1,0
2*	1,0	0,5	1,0
3*	1,0	0,5	1,0

*onde, 1, 2 e 3 são as amostras numeradas fornecidas para o experimento.

Em seguida, ferver os tubos em banho-maria por 5 minutos e observar as possíveis alterações. Sabendo que entre as amostras 1, 2 e 3 tratam-se de glicose, amido e sacarose, identifique as amostras em função da coloração observada e discuta os resultados.

Uso do amido termoplástico como aditivo ao poliácido láctico para produção de material compósito de mais fácil degradação no meio ambiente por mecanismos oxidativos.

3.2. Exame a olho nu e ao microscópico óptico das placas de PLA e PLA/10% TPS submetidas à degradação desde a aula anterior, conforme procedimento resumido na Tabela 2.

- 1) Observe e fotografe as mudanças perceptíveis a olho nu na placa do seu grupo. As fotos deverão ser compartilhadas com os outros grupos.
- 2) Coloque as placas de mesmo tipo (por exemplo as 4 de PLA) sobre uma lâmina e observe em microscópio óptico as diferentes alterações ocorridas na superfície dessas, promovidas pelos diferentes reagentes. Faça uma descrição das alterações observadas nas placas degradadas em relação à placa controle.

Tabela 2 - Resumo do procedimento experimental sobre o uso do amido termoplástico como aditivo ao poliácido láctico para produção de material compósito de mais fácil degradação no meio ambiente por mecanismos oxidativos

Grupo \ Placa	A	B	C	D	E	F	CONTROLE PLA	CONTROLE PLA /10% TPS
Placa	PLA	PLA	PLA	PLA /10% TPS	PLA /10% TPS	PLA /10% TPS	PLA	PLA /10% TPS
Água deionizada (microlitros= μ L)	1990	1938	1928	1990	1938	1928	2000	2000
Cloreto de Fe II (2mM) (microlitros= μ L)	10	--	10	10	--	10	--	--
Cumeno hidroperóxido (300mM) (microlitros= μ L)	--	62	62	--	62	62	--	--
Adição diária de cumeno Hidroperóxido (microlitros= μ L)	--	62*	62*	--	62*	62*	--	--

*Feito pelos técnicos de laboratório

2) Analisar as imagens da Tabela 3 que mostram a superfície das diversas placas a olho nu e por meio de microscopia eletrônica de varredura. Faça uma descrição das alterações observadas nas placas degradadas em relação à placa controle e entre as placas com e sem TPS.

Tabela 3 - Resumo dos resultados esperados

Solução para degradação Imagens da superfície das placas	Cloreto de Fe II	Cumeno hidroperóxido	Cloreto de Fe II + Cumeno hidroperóxido	Controle
Imagens a olho nu (PLA)				
Imagens de MEV (PLA)				
Imagens a olho nu (PLA /10% TPS)				
Imagens de MEV (PLA /10% TPS)				

3.3. Discussão das análises feitas previamente por μ -ATR-FTIR:

Nas figuras a seguir são apresentados os espectros de FTIR de placas de PLA e de placas de blendas de PLA com 10% de TPS (PLA_TPS) nas diversas condições experimentais trabalhadas em aula. Em cada condição observe as mudanças químicas decorrentes dos mecanismos oxidativos por meio da identificação do aparecimento ou desaparecimento de diferentes bandas de absorção.

Obs: Em cada painel, o eixo Y à esquerda indica a intensidade de absorção correspondente à região espectral plotada no terço esquerdo de cada gráfico (A); o eixo Y à direita indica a intensidade correspondente à região espectral plotada nos terços central e direito.

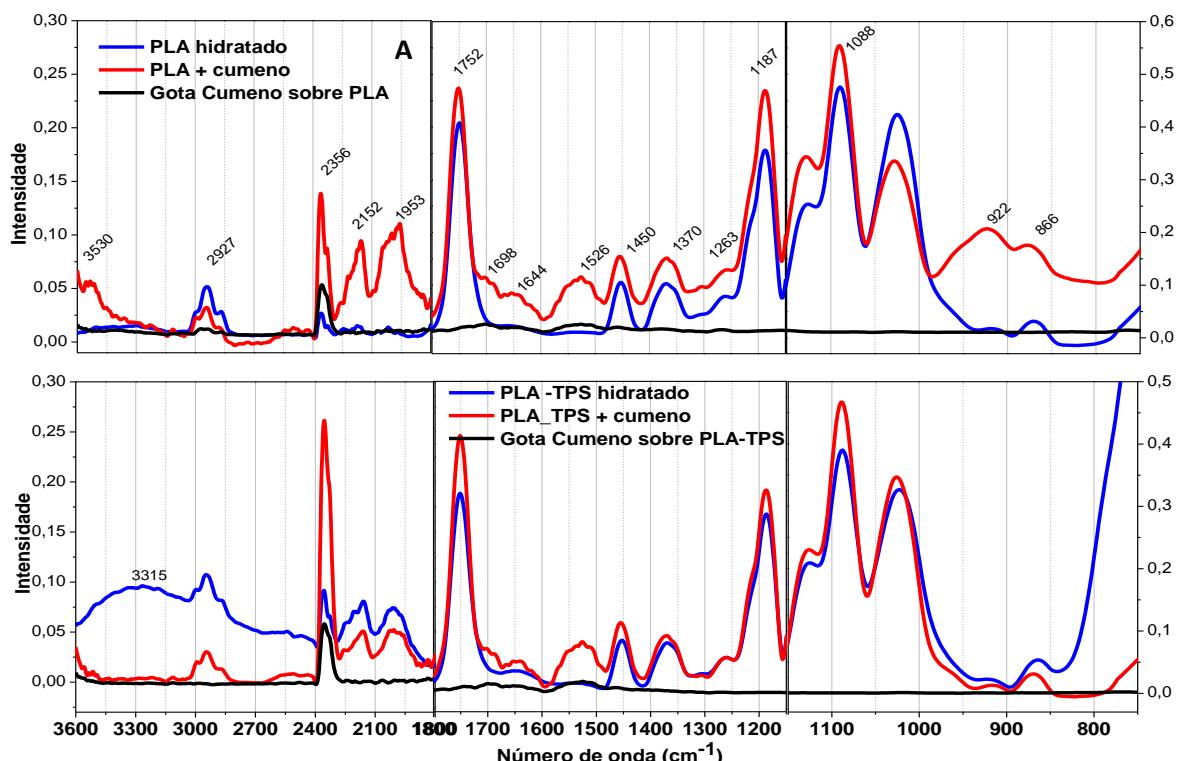


Fig. 10 - Espectros μ ATR/FTIR de PLA (pained superior) e de PLA_ 10% TPS (pained inferior); Amostra controle (linha azul), região da amostra tratada com Cumeno hidroperóxido - CumOOH (linha vermelha) e espectro de uma gota de CumOOH imediatamente após ser colocado sobre a amostra (linha preta).

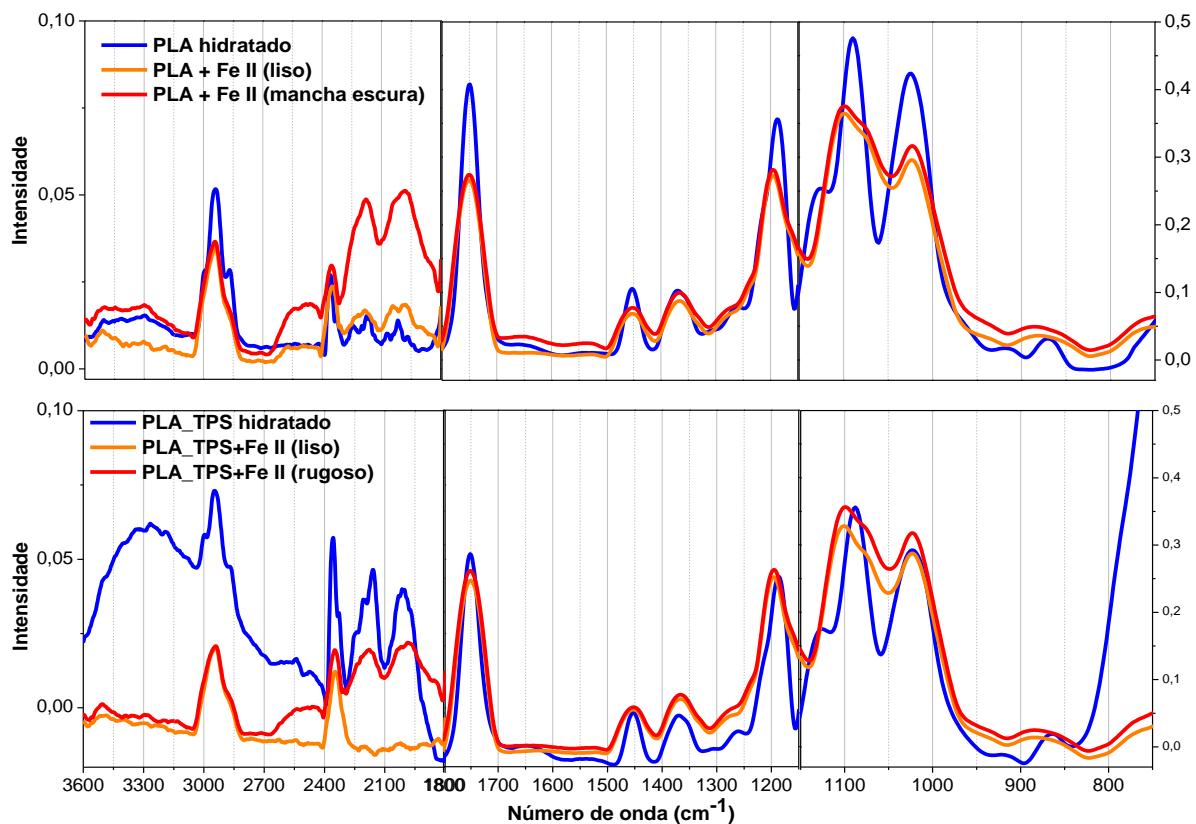


Fig. 11 – Espectros μATR/FTIR de PLA (painel superior) e de PLA_10% TPS (painel inferior). Amostra controle (linha azul), região lisa da amostra tratada com Cloreto de Ferro II tetrahidratado – Fe II (linha alaranjada) e região de mancha escura ou rugosa da amostra tratada com Fe II (linha vermelha). As regiões lisas, de mancha escura ou rugosa foram identificadas por meio de microscópio ótico acoplado ao equipamento de FTIR (imagens não mostradas).

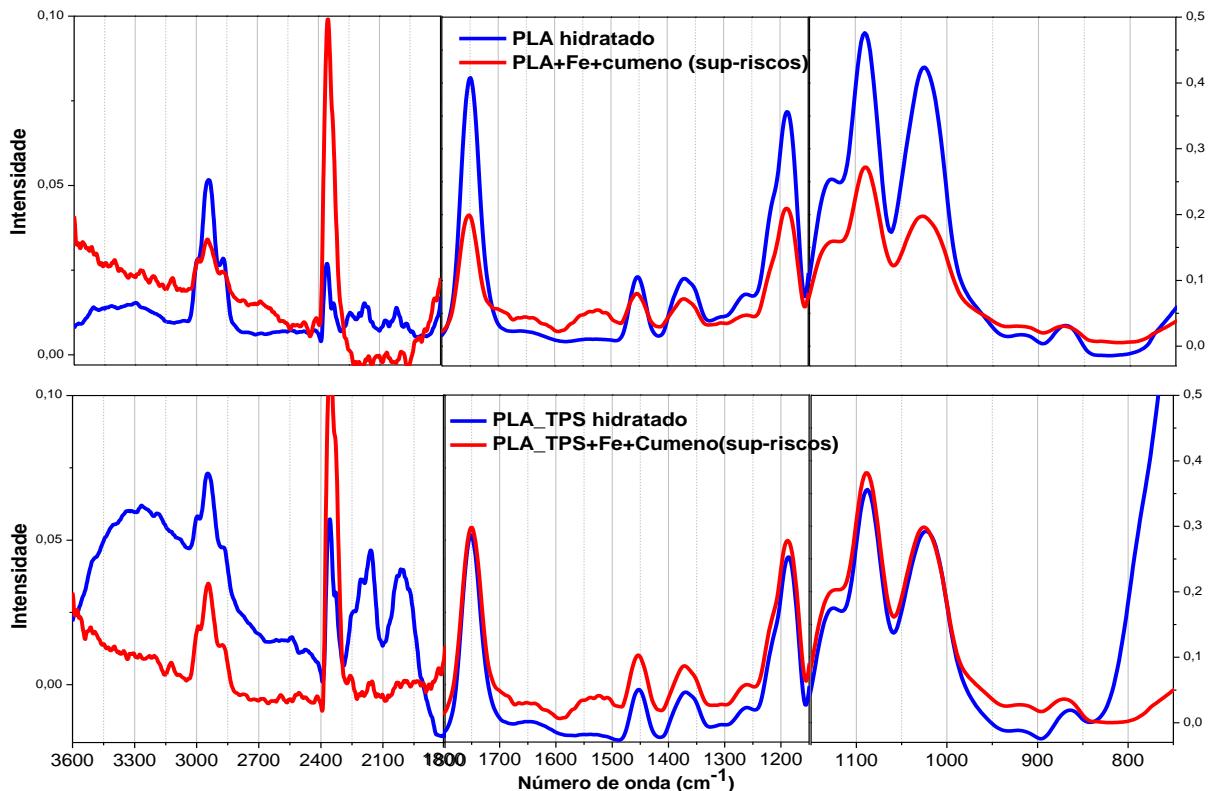


Fig. 12 – Espectros μATR/FTIR de PLA (papel superior) e de PLA_10% TPS (papel inferior); Amostra controle (linha azul), região de riscos da amostra tratada com Cloreto de Ferro II tetrahidratado – Fe II e Cumeno hidroperóxido - CumOOH (linha vermelha) As regiões de riscos foram identificadas por meio de microscópio ótico acoplado ao equipamento de FTIR (imagens não mostradas).

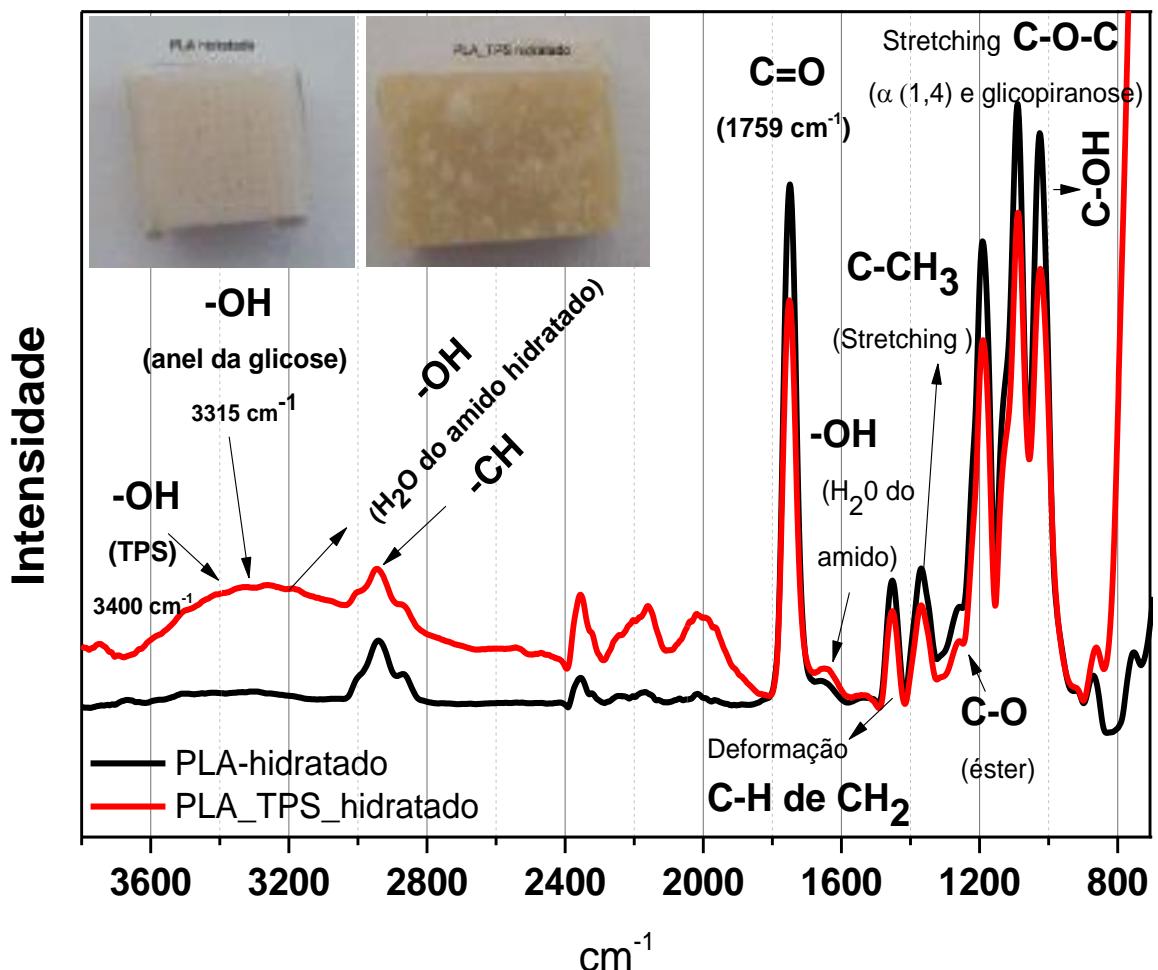


Fig. 13 - Espectros FTIR de PLA (linha preta) e PLA_10 % TPS (linha vermelha), com indicação de modos de vibrações (estiramento), grupos funcionais (OH) ou ligações químicas (C=O) correspondentes a alguns picos ou banda de absorção consideradas para o presente estudo.

A região espectral de 2998-2985 cm⁻¹ corresponde à vibração de estiramento (stretching) do grupo –CH das cadeias alquila. Essa região geralmente não fornece informação importante porque quase todos compostos orgânicos possuem esse grupo. Entretanto, informações significativas sobre o tamanho da cadeia alquila podem ser obtidas pela comparação da intensidade desses picos em relação a outros. Assim, os picos de baixa intensidade nessa região para o PLA e PLA/TPS são consistentes com a ausência de longas cadeias alquila na estrutura do PLA e do TPS. Para o compósito de PLA com 10 % de TPS, aparece um pico de absorção forte e largo próximo a 3380 cm⁻¹, o qual é geralmente atribuído ao álcool OH de resíduos de glicose. Nessa região, há também a sobreposição da contribuição da vibração δOH da água da camada de hidratação do amido (3230 e 3114 cm⁻¹). A região de 1800 a 1700 cm⁻¹ contém uma banda com pico em 1752 cm⁻¹ atribuída a forte estiramento C=O típico de PLA. Para PLA

amorfo, o pico dessa banda é 1759 cm^{-1} e esse sofre um desvio de 10 cm^{-1} (blue-shifted) depois da cristalização térmica. O pico em 1752 cm^{-1} encontrado para essas amostras sugerem a presença de material polimórfico. Essa banda está ligeiramente menos intensa e desviada (red-shifted) na presença de TPS, mas sem perda das bandas adicionais. Esse resultado é consistente com uma modificação não-covalente da PLA no compósito. Na região de 1500 a 1300 cm^{-1} , o espectro de FTIR apresenta outras bandas típicas de PLA, nomeadas estiramento assimétrico $\delta_{as}(\text{CH}_3)$ e estiramento simétrico $\delta(\text{CH}_3)$ na região espectral de 1453 e 1359 cm^{-1} , respectivamente. Essas bandas diminuíram de intensidade na presença de 10% de TPS. Um efeito similar foi observado para $\nu_{as}(\text{COC})$ e $\nu_s(\text{COC})$ em 1182 e 1037 cm^{-1} , $\nu(\text{C}-\text{CH}_3)$ em 1017 cm^{-1} e $\nu(\text{OCC})$ em 870 cm^{-1} . O alargamento da banda na região de 960 cm^{-1} pode ser atribuído a sobreposição da contribuição de unidades de glicopiranose na conformação de cadeira^{9,12}.

Tabela 4- Resumo da caracterização espectral por FTIR de PLA e PLA/TPS

Região espectral da banda ou pico de absorção	Grupo característico	Atribuição	Peculiaridade
2998 - 2985 cm^{-1}	estiramento do grupo $-\text{CH}$	tamanho cadeia alquila quando comparada com intensidade de outros picos	baixa intensidade= ausência cadeias longas
3380 cm^{-1}	álcool OH	de resíduos de glicose	pico de absorção forte e largo
3230 e 3114 cm^{-1}	vibração δOH	água da camada de hidratação do amido	sobreposição na contribuição
1800 a 1700 cm^{-1}	estiramento $\text{C}=\text{O}$	típico de PLA	forte intensidade
1500 a 1300 cm^{-1}	Estiramento assimétrico e simétrico	típico de PLA	diminuíram de intensidade na presença de 10% de TPS
960 cm^{-1}	conformação de cadeira da glicopiranose	sobreposição da contribuição de glicorananose.	alargamento da banda

4. Discussão:

A reação de ferro e peróxidos (Reação de Fenton) gera radicais livres. Pesquise esses mecanismos de reação. Como você explicaria que cada um dos componentes isolados também foi capaz de causar danos? Veja a referência 8.

5. Exercícios

1-Desenhe com uso de um programa como o ChemSketch (versão gratuita para uso educacional), ou pegue imagens pela internet da estrutura do PLA e do amido. Identifique nessas estruturas os grupos funcionais que aparecem na tabela 4 e Fig. 13.

2- Com base na identificação dos grupos funcionais presentes nas estruturas do PLA e do amido termoplástico, faça uma análise de cada gráfico de FTIR que foi apresentado. Exemplo para orientar as respostas: no espectro ... observa-se que a degradação do material contendo 10% de amido resultou em aumento do sinal vindo da contribuição da glicopiranose o que é consistente com a hidrólise do amido (...).

3-Um pesquisador precisava identificar qual era o tipo de açúcar dominante em um extrato vegetal. Decidiu aplicar a reação de Benedict³. Para isso preparou dois tubos de ensaio. O primeiro, com 1,5 mL de H₂O destilada. O segundo, com 1,5 mL de extrato aquoso da planta. Então adicionou 1 mL do reagente de Benedict e incubou os tubos em H₂O fervente por 5 minutos. Ele obteve os seguintes resultados:



Responda: A) Qual a função do tubo 1 no experimento? B) Qual tipo de açúcar é prevalente neste tecido vegetal? Justifique.

Referências Bibliográficas

- ^{1.} LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*, 4. ed. New York: Worth Publishers, 2006, p.685-686.
- ^{2.} SUMERLY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino-americanas. Em: Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas. v. 3, p. 377-448, 2002.
- ^{3.} DENARDINI, C.C.; SILVA, L.P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. *Ciência Rural*, v.39, n.3, mai-jun, 2009.
- ^{4.} NOSSA, T.S. Novas composições poliméricas obtidas a partir da modificação do amido via extrusão reativa.2014. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Carlos-SP.
- ^{5.} SILVA, R.N.; MONTEIRO, V.N.; ALCANFOR, J.D.X.; ASSIS, E.M.; ASQUIERI, E.R. Comparação de Métodos para a Determinação de Açúcares Redutores e Totais em Mel. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 23, n. 3, p. 337-341, 2003.
- ^{6.} <http://www.ufrgs.br/gcoeb/glicideos/glicideos.swf> (objeto de aprendizagem sobre estrutura e detecção de açúcares em amostras biológicas)
- ^{7.} CORRADINI, E.; TEIXEIRA, E.M.; AGNELLI, J.A.M.; MATTOSO, L.H.C. Amido Termoplástico; *Documentos 30, 27 p. Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos;* 2007.
- ^{8.} CHEN, G-Q; PATEL, M.K. Plastics Derived from Biological Sources: Present and Future: A Technical and Environmental Review. *Chem. Rev.*, **2012**, 112 (4), pp 2082–2099.
- ^{9.} RODRIGUES, C.A.; TOFANELLO, A.; NANTES, I.L.; ROSA, D.S. Biological Oxidative Mechanisms for Degradation of Poly(lactic acid)Blended with Thermoplastic Starch; *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2015, 3, 2756–2766; DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b00639.
- ^{10.} SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R.; HOLLER, F.J. *Principles of instrumental analysis.* 6th. Cengage Learning, 2006.
- ^{11.} BRITO, A. M.M. Efeitos químico-estruturais promovidos pelo laser de Nd:YAG, associado ou não ao fluoreto, quando empregado para prevenção da progressão de lesões de cárie radicular.2014. *Dissertação (Mestrado em Biotecnociência) UFABC, Santo André.*
- ^{12.} LOPES, W.A.; FASCIO, M.; Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Quim. Nova.* Vol. 27, No. 4, 670-673, 2004.

Experimento 6 – Catálise enzimática modulada por nanopartículas metálicas

Resumo

Por meio de experimentos simples, nessa aula pretende-se estudar a correlação entre estrutura proteica e atividade enzimática, resgatar, ampliar e aplicar conceitos básicos, como teorias de ligação metálica, estrutura atômica, reações de oxidação-redução e espectroscopia UV-Vis, ao mesmo tempo em que são introduzidos conceitos de nanociência, como o efeito de confinamento quântico e a ressonância de plasmons de superfície, conceitos de interesse tecnológico.

Para esse estudo será analisada a atividade enzimática de gelatinase (a gelatina contém colágeno desnaturalizado) presente no extrato da polpa do abacaxi que possui um conjunto de enzimas diversas conhecido como bromelaína. A modulação da estrutura/atividade será feita por meio de aquecimento das amostras em duas temperaturas para promover desnaturação parcial e total das enzimas e pela associação das enzimas com nanopartículas de ouro. Também será estudada a precipitação protéica pela adição de álcool (coagulação) ou sulfato de amônio (*salting out*) na solução de colágeno, mostrando a alteração da solubilidade protéica.

Nanopartículas de ouro serão produzidas em aula por meio de dois protocolos: a) uso simultâneo do HEPES e dos próprios componentes do suco de abacaxi como agentes redutores do íon ouro (Au^{3+}) à sua forma atômica (Au^0); b) uso do HEPES como único agente redutor, seguido pela adição do suco de abacaxi após a formação das nanopartículas. Os dois protocolos produzirão nanopartículas de ouro que estarão recobertas por HEPES e pelas biomoléculas do suco de abacaxi, inclusive a bromelaína.

1. Fundamentação Teórica

Enzimas

Enzimas proteolíticas ou proteases¹ catalisam o rompimento das ligações peptídicas em proteínas. São enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem uma grande família (EC 3.4), dividida em endopeptidases ou proteinases (EC 3.4. 21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), de acordo com a posição da

ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica. Estas endopeptidases podem ser ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise em serina-(EC 3.4.21)², cisteína- (EC 3.4.22)³, aspártico-proteinases⁴ ou endopeptidases (EC 3.4.23) e metalloproteinases⁵ ou metalloendopeptidases (EC 3.4.24). As enzimas cujo mecanismo de ação não está completamente elucidado são classificadas no subgrupo EC. 3.4.99.

- Exopeptidases

As exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região N ou C terminal. Aquelas que atuam na região amino terminal livre liberam um único resíduo de aminoácido (aminopeptidases), um dipeptídeo (dipeptidil-peptidases) ou um tripeptídeo (tripeptidil-peptidases). As exopeptidases que atuam na região carboxi terminal livre liberam um único aminoácido (carboxipeptidases) ou um dipeptídeo (peptidil-dipeptidases).

- Endopeptidases

Endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal.

- Tipos catalíticos

Segundo Barret, 1994 as proteases são classificadas em carboxipeptidases e as endopeptidases e são divididas em subclasses, tendo como base o seu mecanismo catalítico. As carboxipeptidases foram subdivididas em serino-, metalo- e cisteíno- carboxipeptidases e as endopeptidases em serino-, cisteíno-, aspártico- e metalloendopeptidases. Serino peptidases possuem um resíduo de serina em seu centro ativo, enquanto as aspártico-peptidases têm duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico. Cisteíno-proteases apresentam um aminoácido cisteína e as metalo-proteases usam um íon metal no seu mecanismo catalítico.

- Proteases: função e aplicação

Proteases representam uma classe de enzimas com importantes papéis em processos fisiológicos. Além disto, elas possuem aplicação comercial, estando entre os três maiores grupos de enzimas industriais, sendo responsáveis por 60% da venda internacional de enzimas. Estas enzimas estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como a coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos. Várias etapas proteolíticas importantes ocorrem no mecanismo invasivo de tumores, assim como no ciclo de infecção de um grande número de vírus e microrganismos patogênicos. Estes fatos tornam as proteases um alvo quimioterápico valioso para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos. As enzimas

proteolíticas também participam no catabolismo de proteínas, tanto nas vias degradativas como nas biossintéticas, e na liberação de hormônios peptídeos farmaceuticamente ativos a partir de proteínas precursoras. Certas modificações específicas e seletivas de proteínas durante a ativação de enzimas ocorrem via proteólise, que também colabora no transporte de proteínas secretórias na membrana. As proteases têm também uma variedade de aplicações principalmente na indústria de detergentes e de alimentos. Tendo em vista os recentes acordos mundiais para uso de tecnologias não poluentes, as proteases começaram a ser usadas em larga escala no tratamento do couro, em substituição aos compostos tóxicos e poluentes até então usados. Na indústria farmacêutica, as proteases são usadas em pomadas cicatrizantes e têm um uso potencial para outros medicamentos. Proteases hidrolisam as proteínas em peptídeos e aminoácidos, facilitando a sua absorção pelas células; devido a seu papel despolimerizante, as enzimas extracelulares têm um papel importante na nutrição⁶.

Gelatina

Gelatina é uma mistura heterogênea de proteínas desnaturadas solúveis em água, derivada da hidrólise parcial do colágeno tipo I nativo e que possuem alta média de massa molecular. Tradicionalmente são usadas na indústria alimentar e de cosméticos. Entretanto, recentemente vem sendo muito usada em pesquisas na área biomédica (devido sua alta biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa imunogenicidade, além de baixo custo) como estrutura para adesão celular, biomaterial para engenharia de tecidos e sistema de entrega de fármacos diferente das cápsulas tradicionais⁷.

Na conversão do colágeno à gelatina, que ocorre acima da temperatura de desnaturação do colágeno, tropocolágenos perdem a estrutura de hélice tripla característica, há quebras de ligações intermoleculares e de ligações peptídicas resultando em cadeias polipeptídicas que pela análise *SDS-PAGE* apresentam peso molecular de menos de 300 kDa com distribuição muito ampla. Assim, os constituintes moleculares da gelatina são heterogêneos em relação ao colágeno, apresentam cadeias com menor peso molecular relativo e variada distribuição de estrutura primária. Como alguns dos aminoácidos na estrutura peptídica do colágeno contêm grupos funcionais que são hidrolisados sob condições ácidas ou básicas, há dois tipos de gelatina, dependentes do processo de extração: tipo A e tipo B, obtidas de pré-tratamento ácido e básico respectivamente⁷.

Considerando-se a forma e tamanho da molécula de gelatina, observa-se que essa tem baixo ponto isoelétrico (pI), a conformação de suas moléculas é predominantemente de random coil com perda da habilidade de formar fibrilas e é facilmente atacada por proteinase. A gelatina possui uma grande habilidade de ligação com a água (5 a 10 vezes seu peso) e suas cadeias peptídicas de configuração helicoidal são importantes para a formação do gel. Por ser um hidrocolóide de origem proteica possui caráter anfótero, associado à presença de grupos amina e carboxílicos nos aminoácidos. A viscosidade em solução é afetada pela concentração e pela temperatura⁷.

Nanopartículas e Nanoestruturas Metálicas

Avanços tecnológicos estão relacionados com a descoberta ou desenvolvimento de produtos com características inovadoras. Nas duas últimas décadas, tem sido crescente o interesse da comunidade científica na Nanociência e Nanotecnologia (NN), o que tem resultado no desenvolvimento de novos campos científicos tais como a nanotecnologia molecular e o desenvolvimento de nanossistemas, nanomateriais, nanodispositivos e nanomáquinas. Duas são as estratégias para o desenvolvimento da nanotecnologia: a top-down e a bottom-up (Fig. 1A). A primeira está relacionada com o grande desenvolvimento da indústria eletroeletrônica e a segunda abrange a engenharia dos materiais em nível supramolecular e hierárquico, utilizando moléculas, biomoléculas, polímeros, semicondutores e dielétricos, metais, óxidos metálicos, entre outros, associados a métodos de modificação/funcionalização de superfície. Entre os processos envolvidos na estratégia bottom-up observa-se a automontagem, montagem coordenativa, montagem eletrostática, adsorção e outros⁸.

Por definição, nanoestruturas devem possuir pelo menos uma dimensão na escala nanométrica (1 a 100 nm) (Fig.1B), ter uma alta razão superfície/volume e suas propriedades devem mudar em relação ao material na escala macroscópica (material *bulk*)⁹. Assim, a nanociência e a nanotecnologia apresentam a possibilidade e o desafio de controle sobre os componentes estruturais do nanosistema em escalas de átomos ou moléculas individuais de dimensões submicrométricas, bem como a integração de nanoestruturas resultantes em sistemas maiores, buscando a miniaturização de dispositivos e a montagem de estruturas organizadas e funcionais para gerar produtos inovadores (Fig. 1B- *Things Manmade*). Dentre esses produtos, encontra-se dispositivos de conversão e armazenamento de energia, estruturas para uso em eletrônica e fotônica, melhores catalisadores de reações químicas e sensores para uso em áreas estratégicas como as de energia, medicina, informação, segurança, ambiente e indústria⁸.

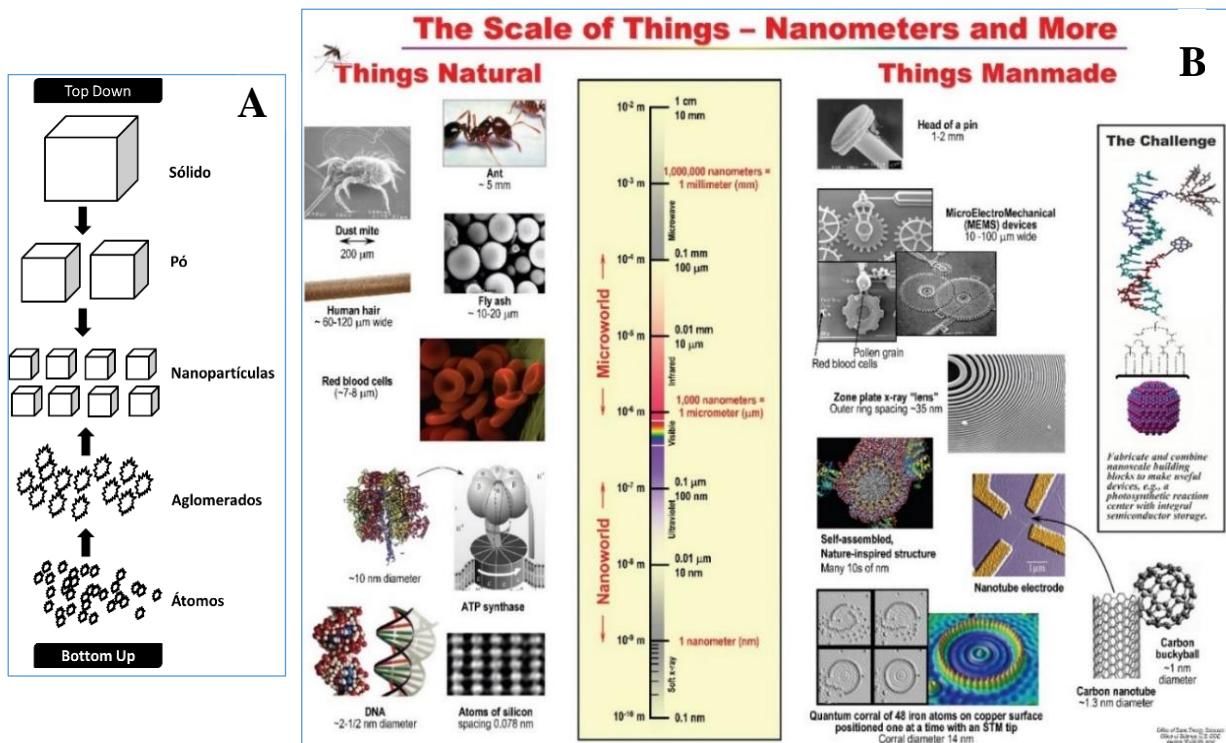


Fig. 1: A- “A escala das coisas”¹⁰; B- esquema dos métodos *top down* e *bottom up* de síntese de nanopartículas, os quais são também aplicáveis para outros nanomateriais e para a nanotecnologia.

Para superar os desafios, são utilizadas estratégias baseadas nas propriedades moleculares, tais como, absorção, reflexão e emissão de luz, transferência e transporte de elétrons, reações térmicas, magnetização, sinalização química, reconhecimento molecular e química de coordenação (interações metal-ligante). Como essas propriedades são utilizadas na superfície das nanoestruturas e, nessa escala, as interações podem ser potencializadas em várias ordens de grandeza devido aos efeitos de tamanho e de superfície, as nanoestruturas apresentam propriedades distintas das propriedades das moléculas, dos sólidos cristalinos típicos e de dispositivos convencionais^{8,9}.

Os sistemas biológicos apresentam a mais eficiente organização sistemática de estruturas e processos na escala nanométrica, tais como as enzimas e outros tipos de proteína. Por exemplo, a miosina, responsável pela contração e extensão muscular, pode ser classificada como motores moleculares proteicos que convertem energia química em trabalho, com base nos movimentos coletivos de seus componentes moleculares. O desenvolvimento de tecnologias que possibilitam a monitorização da interação de nanomateriais com estruturas biológicas tem impulsionado a criação de novas técnicas e dispositivos de diagnóstico e terapêutica, como por exemplo, nanosensores de biomoléculas⁸. Assim também, as propriedades físico-químicas de nanopartículas e diversificadas moléculas ou biomoléculas

podem ser combinadas, visando o desenvolvimento de novos nanomateriais funcionais e nanoaditivos^{8,9,11}. Neste sentido, torna-se cada vez mais importante e fundamental a abordagem da nanociência no BC&T da UFABC, e especificamente, nas aulas práticas de Bioquímica: estrutura, propriedades e funções de Biomoléculas.

Nanopartículas (NPs) e outras nanoestruturas metálicas envolvem, pelo menos em uma dimensão, de dezenas a centenas de dezenas de átomos de metais os quais, nesse arranjo, possuem características bem diferenciadas dos seus átomos individuais ou materiais massivos (*bulk*), tais como grandes energias de superfície, estrutura eletrônica específica (densidade local de estados), excitação de plasmons de superfície, confinamento quântico, ordenação de curto alcance, entre outras. As propriedades únicas dessas nanoestruturas são observadas em nível eletrônico, óptico, catalítico e magnético ^{11,12}. As propriedades eletrônicas notáveis têm despertado o interesse dos físicos; as relacionadas as monocamadas orgânicas da superfície, dos químicos. Suas aplicações vêm sendo ampliadas à medida que ocorre uma maior compreensão do efeito da ressonância de plasmon de superfície localizado (LSPR), o qual explica o comportamento óptico destes materiais e é um dos tópicos de estudo da plasmônica. Plasmônica é uma nova ciência, um termo híbrido entre oscilação de plasma (plasmon) e eletrônica, que indica o acoplamento de fôtons na determinação da oscilação da densidade de carga nos elétrons de condução em metais, seguindo o modelo de oscilador harmônico da mecânica clássica (ressonância). Um de seus focos é o estudo das propriedades ópticas singulares de NPs metálicas que permitem a manipulação ativa da luz na escala nanométrica¹³.

As nanopartículas de ouro (GNPs, do Inglês *gold nanoparticles*) têm sido utilizadas nas mais diferentes áreas da pesquisa científica fundamental bem como aplicada no setor produtivo. Essa diversidade de áreas de aplicação ocorre porque mudanças de propriedades das GNPs são observadas em função da morfologia, tamanho e grau de agregação. Ainda, nanoestruturas podem criar microambientes capazes de modular propriedades estruturais e catalíticas de outras moléculas, bem como servir como sistemas de entrega de diferentes compostos para células e tecidos. GNPs exibem excelente compatibilidade com biomoléculas e associadas a essas também possuem a capacidade de reconhecer, de maneira muito específica, o seu alvo correspondente, tal como ocorre com as cadeias de DNA, que reconhecem suas cadeias complementares, e com os anticorpos, que reconhecem seus抗ígenos. Assim, as duas características mais populares das GNPs - a mudança de cor após a agregação e a ressonância de plasmons de superfície localizada - têm sido exploradas em imunoensaios e química analítica¹³.

O comportamento óptico das nanopartículas metálicas (NPs-M) tem fascinado a humanidade desde a antiguidade. Na figura 2A, visualiza-se a Taça de Lycurgus (século 4 a. C) talvez o exemplo mais antigo conhecido de utilização de nanomaterial. A análise deste vidro revelou que ele contém uma pequena quantidade de nanocristais metálicos (~ 70 nm) contendo Ag e Au. Ainda em 1857, Faraday estudando a interação da luz em soluções coloidais de ouro percebeu que a cor vermelha era atribuída ao ouro nessa forma. É conhecido que o ouro, na forma macroscópica, é um sólido dourado dúctil e com brilho metálico, que pode ser dissolvido em água-régia, gerando uma solução de ácido tetracloroaurico ($\text{H}[\text{AuCl}_4]$) (figura 2B). O ácido tetracloroaurico ao ser reduzido em solução, pode gerar nanopartículas de ouro com a coloração da suspensão de nanopartículas variando do vermelho ao roxo azulado dependendo do tamanho da nanopartícula e do estado de agregação (figura 2C)^{11,12}.

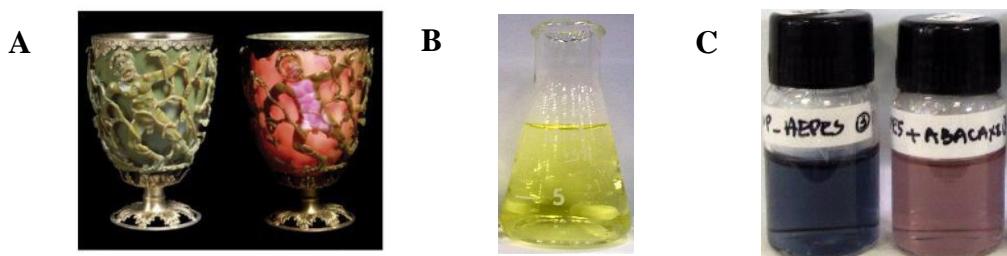


Fig.2: Propriedades de nanopartículas de ouro. Em A, imagem da Taça de Lycurgus: à esquerda visualiza-se em luz refletida e a direita em luz transmitida; em B, solução de ácido tetracloroaurico; em C, suspensão de nanopartículas de ouro semelhante as que serão sintetizadas nessa aula.

Quanto ao formato, GNPs podem ser isotrópicas (ex. esféricas) ou anisotrópicas (figura 3). No caso das esféricas, as suas propriedades independem da direção em que são consideradas, no entanto dependem do tamanho da NP. Diferentes tipos de nanopartículas anisotrópicas de ouro têm sido produzidas, tais como os nanobastões, nanoprismas, nanocubos, nanoconchas e as NPs multi ramificadas (NPMR) com características de nanoestrelas, nanoflores, e a forma de ouriço do mar¹⁴. Nanopartículas de ouro anisotrópicas são interessantes porque possuem propriedades e aplicações específicas dependentes da sua forma e do seu tamanho e, dentre essas, destacamos os eletrônicos em nanescalas, energia fotovoltaica (figura 4A), marcadores biológicos (figura 4B), sensores químicos e outros^{15,16}.

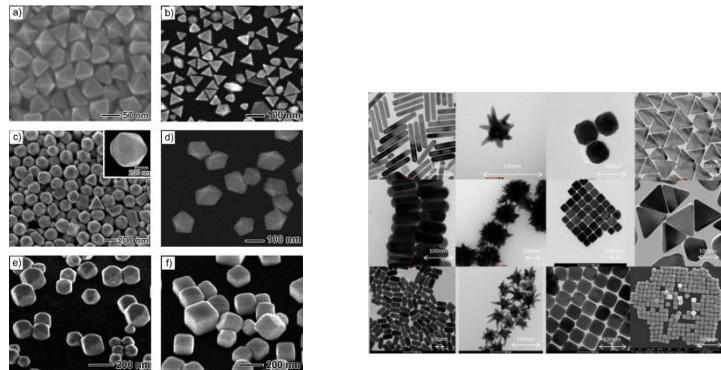


Fig. 3: Imagens de microscopia de nanopartículas de ouro (TEM e SEM)¹⁶.

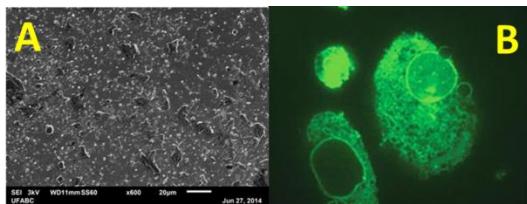


Fig. 4: Energia fotovoltaica¹⁷. Marcador biológico¹⁸.

Nanopartículas metálicas (ouro e prata) e semicondutoras exibem propriedades ópticas peculiares que são resultado direto da interação da radiação eletromagnética (ultravioleta ao infravermelho) com suas propriedades eletrônicas. A diversidade de cores das soluções de nanopartículas metálicas em função do tamanho, é explicada pelo efeito de confinamento quântico e a própria origem física dessas cores, à ressonância de plasmons de superfície localizado (LSPR).^{11,12} A interação da luz visível com NPs-M dispersas no solvente (Fig. 5) está na origem das interessantes cores observadas, sendo que base teórica desses estudos tem sido a Teoria de Mie (absorção e espalhamento da radiação eletromagnética por esferas de pequenas dimensões) associada com o modelo de elétrons livres de condução, considerando o volume da partícula e as funções dielétricas do meio e do material. Para entender a coloração de soluções de NPs-M é importante lembrar que os materiais transparentes apresentam uma aparência colorida como consequência da absorção seletiva de faixas específicas de comprimento de onda (λ) da luz. Geralmente a fração da luz absorvida pelo objeto está relacionada à excitação dos elétrons entre níveis de energia eletrônicos dos compostos que constituem o objeto em questão. A cor observada é resultado da combinação dos comprimentos de onda que chegam aos olhos humanos e são decodificados pelo cérebro. Na nanoscalas, as cores são explicadas por uma teoria que considera o fenômeno de plásmons¹².



Figura 5: Propriedades ópticas de nanopartículas de ouro: uma solução avermelhada de nanopartículas de ouro de 20 nm (à direita) – no detalhe, imagem das partículas por microscopia eletrônica – pode ter sua agregação induzida por agentes químicos, o que muda a coloração da solução para azul. A agregação também altera a intensidade do fenômeno de espalhamento de luz, o que interfere na visibilidade de um feixe de luz laser que incide na solução. Essas propriedades abrem amplas possibilidades de aplicação⁸.

A palavra plasmon veio da língua inglesa como representação da quantidade da oscilação do plasma (“quantum of plasma oscillation”). O plasmon de superfície (SP, do inglês *surface plasmons*) é uma oscilação dos elétrons livres da banda de condução de um metal quando estes são submetidos a uma onda eletromagnética, podendo ocorrer em filmes metálicos e nanopartículas metálicas. Nanopartículas de metal nobre possuem um plasmon característico associado com cada tipo de material e quando essas estruturas têm de 10 a 100 nm, o caminho livre médio dos elétrons excede o tamanho da NP e a oscilação coletiva de elétrons concentra-se na superfície. Quando uma luz com frequência apropriada incide nessas NPs, excita o plasmon de superfície da nanoestrutura (essa frequência ressonante depende, dentre outros parâmetros, da função dielétrica do metal e do meio circundante) e nessa condição, o campo elétrico oscilante da irradiação direciona a oscilação dos elétrons de condução da NP no sentido contrário ao campo elétrico da onda incidente, levando a separação das cargas (fig. 6A). Este deslocamento das cargas promove a indução de um dipolo elétrico na partícula. O dipolo induzido promove o aparecimento de um campo elétrico restaurador na partícula, o qual tem a função de restaurar o equilíbrio dado pela distorção das cargas. Esta força restauradora e a indução do dipolo, quando acopladas, geram uma série de oscilações coerentes de densidade de carga e campo elétrico denominadas ressonância plasmônica, a qual quando é observada em nanopartículas metálicas, é denominada ressonância plasmônica de superfície localizada (fig. 6C e D)^{13,19}.

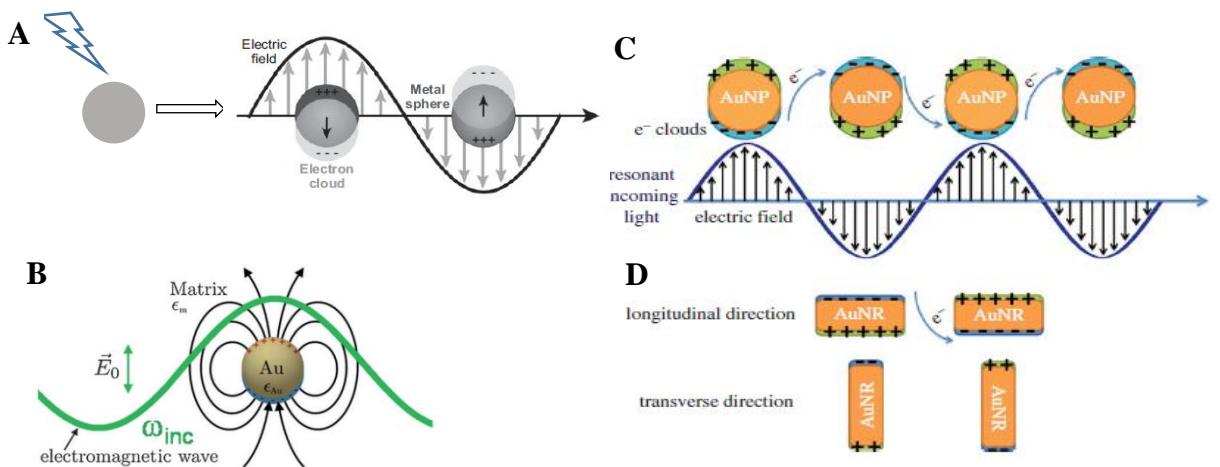


Fig. 6. Representação esquemática da origem de um dipolo elétrico induzido e efeito da força restauradora devido à separação de cargas nas nanopartículas metálicas. A LSPR ocorre quando a oscilação coletiva dos elétrons de valência na nanopartícula metálica está em ressonância com a frequência da luz incidente. Em A, excitação de plasmon de superfície em nanopartícula esférica. Em B, a nanopartícula de ouro (Au) age como uma nanoantena pela excitação de uma ressonância de plasmon de superfície localizada dipolar, e essa nanoantena pode emitir radiação na mesma frequência (ω_{inc})¹⁹. Em C, indução de plasmons para formação de bandas de LSPR em nanopartículas de ouro esféricas (AuNP) e em D, em nanobastões de ouro (AuNR)¹¹.

A magnitude do dipolo induzido é determinada pela polarizabilidade da esfera de metal e a força do campo elétrico incidente. O sinal do dipolo induzido localizado muda periodicamente com a frequência angular da onda eletromagnética (figuras 6C). Assim, uma nanoantena é gerada, a qual pode emitir radiação na mesma frequência (fig. 6B). Desse modo, uma simples NP metálica esférica é capaz de capturar e concentrar ondas de luz em volumes nanométricos e, por conseguinte, permite o estudo fundamental das interações luz-matéria nessa escala. Outra propriedade interessante associada aos plasmons de superfície é sua capacidade de aumentar o campo elétrico local, principalmente na região entre NPs próximas, levando a intensificação do espalhamento Raman das moléculas que se encontram nesse *hot-spot*. Esse fenômeno está relacionado ao espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS, na sigla em inglês). Assim, diversas aplicações têm emergido nos últimos anos decorrente da LSPR, tais como microscopia eletrônica de transmissão, técnicas espectroscópicas, sensores biológicos, nano-aquecedores, células solares, gravação magnética assistida termicamente, crescimento de nanoestruturas, manufatura de circuito para computadores, geração de imagens e terapia fototérmica contra o câncer.^{12,13}

A LSPR é uma propriedade eletrônica de NPs-M, que para os metais nobres ouro e prata se manifesta na região espectral do visível, sendo assim também pode ser considerada uma propriedade óptica. A LSPR, em coloides de ouro e prata, induz uma forte absorção (ou extinção) da luz e os comprimentos de onda não absorvidos são os responsáveis pela coloração da suspensão de NPs que os olhos humanos percebem. Essa propriedade é muito sensível ao formato da partícula e a agregação dessas, gerando mudanças de coloração da solução bastante intensas. A LSPR pode ser medida usando um espectrômetro de absorção UV-Vis e gera uma banda de absorção no espectro visível denominada banda de ressonância plasmônica de superfície localizada, ou simplesmente “banda plasmônica” (BP)²⁰. A localização espectral, a intensidade e a largura da banda plasmônica dependem de fatores que afetam a densidade de carga de elétrons sobre a superfície da partícula tais como o tipo de metal, tamanho, forma e estrutura da partícula, agregação, a constante dielétrica do meio circundante e temperatura. Não há BP para GNPs com diâmetro inferior a 2 nm nem para ouro maciço (*bulk*).

A cor de coloides de GNPs de forma aproximadamente esférica pode ir desde o azul até o laranja (quando o tamanho da NP é reduzido até cerca de 3 nm), passando por diversos tons de vermelho. A figura 7A ilustra os espectros de absorção de bandas plasmônicas de partículas isotrópicas de ouro de diferentes diâmetros. Na figura 7B observa-se as mudanças na coloração da suspensão em função do diâmetro das GNPs conforme mostrado por imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Para GNPs esféricas, existe apenas uma frequência SPR, na região espectral de 520 nm , a qual é responsável pela cor vermelha intensa dessas NPs . No entanto, para nanopartículas maiores, ocorre um desvio da aproximação de Mie, uma vez que o campo elétrico da onda incidente gera induções eletromagnéticas não uniformes sobre a partícula, as quais ocasionam modos de excitação e relaxação diferentes para os elétrons. Assim, o aumento da dimensão gera deslocamentos da frequência de excitação plasmônica para energias menores (*redshifts*). Ocorre também o alargamento da banda plasmônica pois devido a densidade eletrônica não oscilar em fase (homogeneamente), diferentes densidades eletrônicas são excitadas em diferentes frequências.

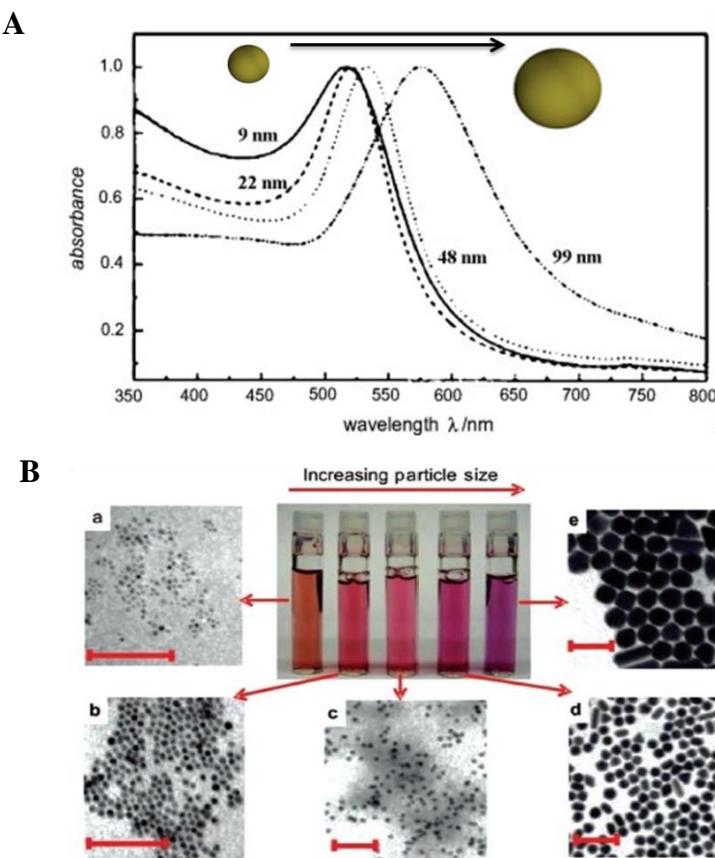


Figura 7. A. Banda de ressonância plasmônica localizada das nanopartículas isotrópicas. B. Diferentes cores das suspensões de nanopartículas de ouro em função do tamanho e microscopia eletrônica de transmissão (todas as escalas correspondem a 100 nm)¹⁵.

As figuras 8A e 8B ilustram, respectivamente, os espectros de absorção das bandas plasmônicas de GNPs anisotrópicas e as colorações das soluções. Essas diferentes formas possuem diferentes espectros de absorção ou coloração e isto se deve a múltiplas ressonâncias na complexa estrutura. Por exemplo, em partículas alongadas (elipsoides e bastonetes) são observadas duas bandas plasmônicas que estão relacionadas com os modos de oscilação transversal e longitudinal (fig. 6D)²¹ e correspondem a sobreposição de todas as contribuições de oscilações de diferentes energias decorrentes da distribuição da nuvem eletrônica induzida na NP relacionada com o tamanho e forma dessa. A banda transversal está relacionada às oscilações de elétrons que ocorrem ao longo da direção transversal, é uma banda de absorção localizada na região espectral do visível e é semelhante à das GNPs esféricas. A banda longitudinal refere-se as oscilações de elétrons ao longo do eixo longitudinal e é uma banda de absorção na região Vis- NIR.

A distância entre NPs vizinhas determina o acoplamento plasmônico entre partículas, de modo que quando GNPs se aproximam, para distâncias comparáveis com o seu diâmetro (agregação), a banda LSPR característica da NP isolada começa a desviar-se para regiões de

menor energia (região espectral do vermelho e infravermelho próximo) e apresenta-se alargada. Estruturas complexas como NP agregadas apresentam um amplo espectro de absorção²¹.

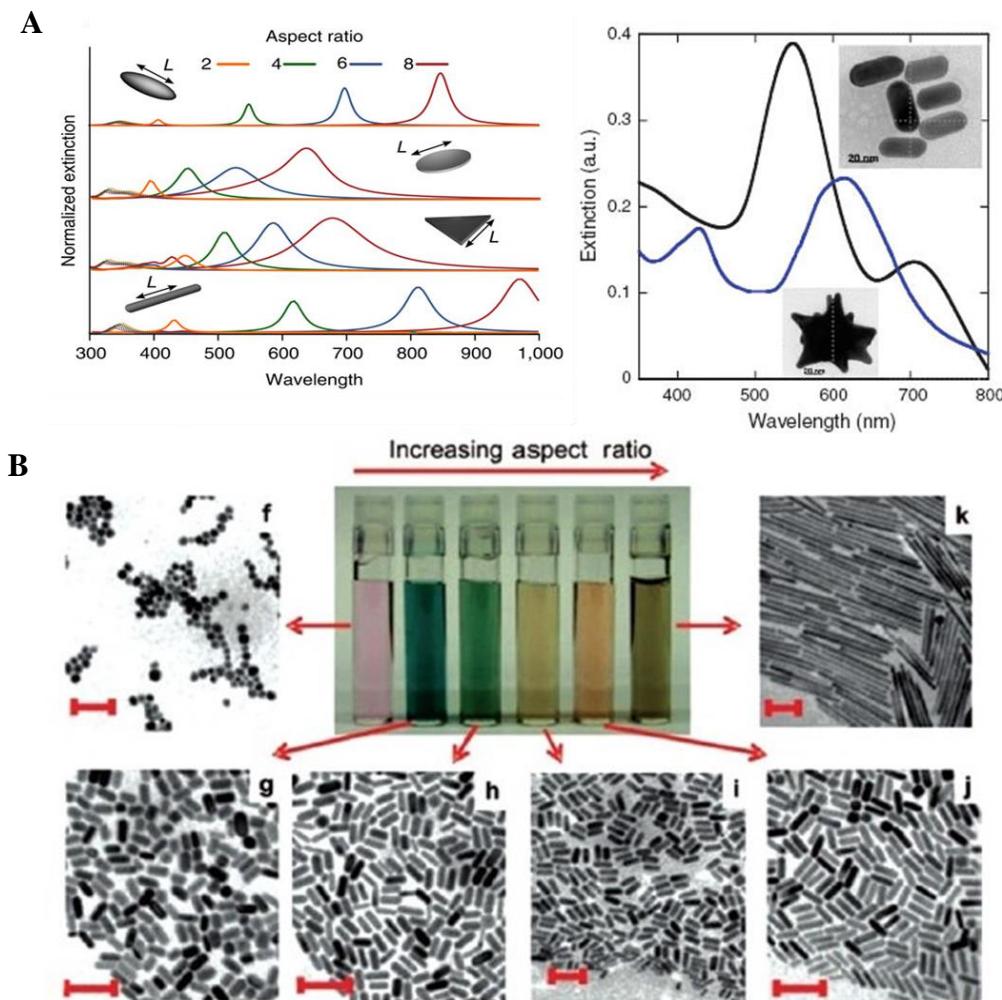


Fig. 8. A. Bandas de ressonância plasmônica de nanopartículas anisotrópicas. B. Banda de ressonância plasmônica de um nanobastão e uma nanopartícula multiramificadas. C. Diferentes cores das suspensões de GNP em função do tamanho e microscopia eletrônica de transmissão (todas as escalas correspondem a 100 nm)²¹.

O efeito de confinamento quântico está relacionado com a restrição espacial, nas três dimensões geométricas, dos portadores de carga (elétrons e lacunas), fazendo com que as propriedades eletrônicas e físico-químicas sejam fortemente dependentes da relação superfície/volume da nanoestrutura. Para o entendimento desse efeito nas NPs, é necessário considerar alguns conceitos relacionados às propriedades eletrônicas de materiais condutores, semicondutores e isolantes no estado sólido. Pela mecânica quântica, é conhecido que as órbitas eletrônicas estão a distâncias bem definidas em relação ao núcleo do átomo e esse fato faz com que entre uma órbita e outra exista uma região onde **não** é possível existir elétrons, denominada banda proibida de energia (*gap* de energia), pois não há níveis eletrônicos que os comportaria.

O tamanho dessa banda proibida relativo ao último orbital ocupado e o primeiro vazio define o comportamento elétrico do material conforme pode ser observado na figura 9. Isolantes apresentam uma grande banda proibida. Apenas quando a excitação é feita com uma energia superior em vários eV da banda proibida (*bandgap*) a condução é possível. Semicondutores têm um *bandgap* mais estreito e mesmo à temperatura ambiente poucos elétrons podem ser conduzidos para a banda de condução. Semicondutores dopados têm maior condutância elétrica, porque dopantes adicionais fornecem elétrons de condução, pois estes se encontrarão em níveis de energia inseridos no *gap* do material. Condutores não apresentam *gap*. Os metais em escala macroscópica (*bulk*) apresentam um arranjo periódico de uma enorme quantidade de átomos em uma rede cristalina e muitos elétrons livres, alta condutividade e alta refletividade da luz (desde que a frequência não seja muito alta) e não possuem uma banda proibida de energia. Porém ocorre a mudança dessa estrutura de energia quando as partículas metálicas se tornam pequenas o suficiente para que efeitos de quantização ocorram, ou seja, ao se considerar as nanopartículas metálicas como aglomerado nanométrico de poucas dezenas ou até de milhares de átomos.

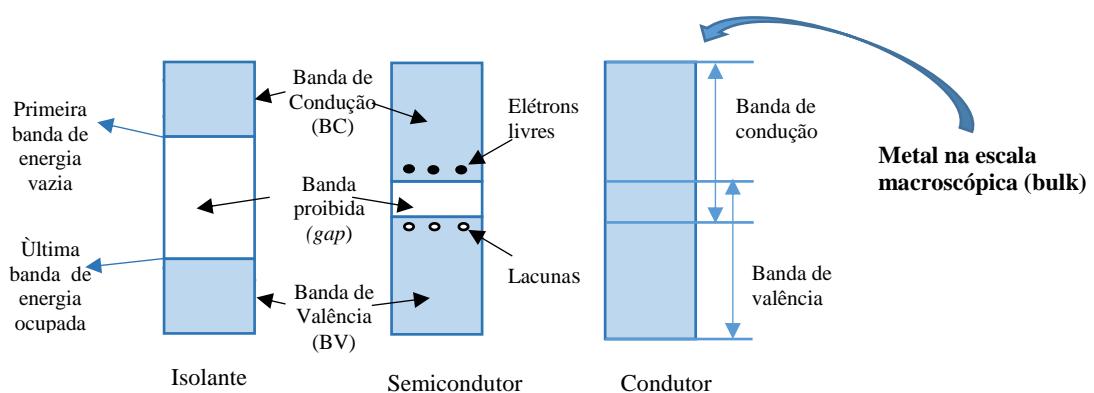


Fig. 9. Esquema da estrutura de bandas de energia de materiais no estado sólido. O tamanho da banda proibida [diferença entre a última banda de energia ocupada na banda de valéncia e o primeira vazia na banda de condução] define o comportamento elétrico do material. Isolantes apresentam uma grande banda proibida. Condutores não apresentam um gap de energia. Os metais na escala macroscópica apresentam alta condutividade.

Na figura 10A e 10B observa-se, respectivamente, uma representação esquemática dos níveis de energia eletrônica em espécies semicondutores e em espécies metálicas. É sabido que átomos isolados possuem níveis de energia eletrônica discretos (quantizados). No entanto, transições eletrônicas, podem ocorrer, por exemplo, devido a excitação óptica e pode mudar o estado do átomo. As moléculas também podem ter níveis de energia discretos, mas como possuem uma estrutura mais complexa apresentam um diagrama dos estados eletrônicos muito mais complexo. Além disso, vibrações e rotações modulam os níveis de energia observados.

Ao aglomerarem-se para formação de *clusters*, ou nanopartículas com algumas dezenas ou mais de nanômetros, os orbitais eletrônicos dos átomos formadores das estruturas sobrepõem-se interagindo entre si, o que resulta na formação de orbitais moleculares. Com o aumento progressivo da quantidade de átomos e, portanto, do tamanho da NP, os níveis centrais da banda de energia se aproximam, tornando-se quase contínuos, enquanto as regiões da base e topo da banda ainda se mostram discretizadas (Fig. 10B – nanopartícula). Com o aumento do número de átomos a partir de determinados valores, as bandas de energia adquirem o caráter contínuo de volume metálico (*bulk*).

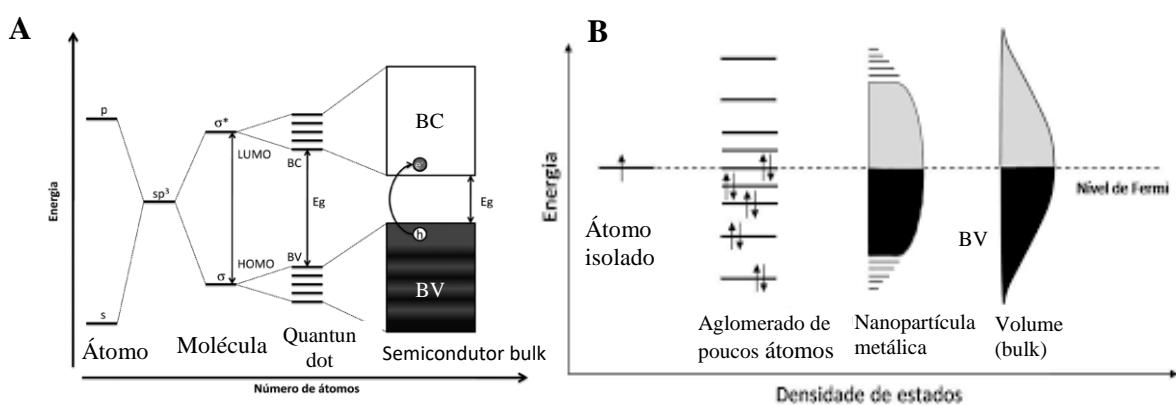


Fig. 10. Representação esquemática da estrutura de energia eletrônica em relação ao número de átomos e à densidade de estados. O diagrama de níveis de energia em um sólido cristalino depende do número de átomos combinados quimicamente. O aumento da quantidade de átomos (e da densidade de estados) provoca a transição do discreto para o contínuo. Em A, representação comparativa para uma nanoparticula de semicondutor (quantum dot): os níveis de energia discretos das orbitais atômicos tendem para bandas de energia com o aumento do número de átomos. Em B, representação comparativa para NP metálica: com o aumento progressivo da quantidade de átomos e, consequentemente, com o aumento do tamanho da NP, os níveis centrais da banda de energia se aproximam, tornando-se quase contínuos, enquanto as regiões da base e topo da banda ainda se mostram com valores discretos. Assim, dependendo das dimensões da NP, há a variação do *gap* entre o último nível de valência e o primeiro de condução, diferente do metal em escala macroscópica. No limite em que o número de átomos apresenta-se suficientemente grande, consistindo em um volume metálico, as bandas de energia adquirem o caráter contínuo. Em cinza, estados eletrônicos desocupados. (Adaptado das referências 13 e 20)

Conforme mostrado na fig. 7, o aumento da dimensão da NP gera deslocamento da frequência de excitação plasmônica para energias menores (ou λ maior ou frequência menor ou redshift). A figura 11A tem o objetivo de explicar esse comportamento de uma maneira simplificada e didática. Assim, pode ser observado que com o aumento de tamanho das nanopartículas metálicas o *gap* passa a apresentar-se menor (devido ao efeito de confinamento quântico), a energia necessária para promover elétrons da última banda de energia ocupada na banda de valência para a primeira vazia na banda de condução é menor e, portanto, está relacionada com fôtons com valores maiores de comprimento de onda. Essa característica se mantém até

que o diâmetro da NP seja tal que os efeitos de confinamento quântico não mais estejam presentes e sua estrutura de banda de energia aproxima-se do comportamento do material bulk metálico (sem *gap*). De modo análogo, com a diminuição do tamanho da nanopartícula a quantidade de energia necessária para promover elétrons da última banda de energia ocupada na banda de valência para a primeira vazia na banda de condução torna-se maior, estando então relacionada com fôtons com valores menores de comprimento de onda (maior energia). As diferentes energias de excitação estão relacionadas com os diferentes tamanhos de *gap* e esses por sua vez estão relacionados aos diferentes diâmetros das NPs metálicas. Assim, com o aumento do tamanho de GNPs esféricas, a solução coloidal passa dos tons de vermelho para a cor azulada¹⁴. É importante lembrar que a cor observada na solução coloidal é resultado da combinação dos comprimentos de onda que interagiram com a matéria e chegaram aos olhos humanos sendo então decodificados pelo cérebro.

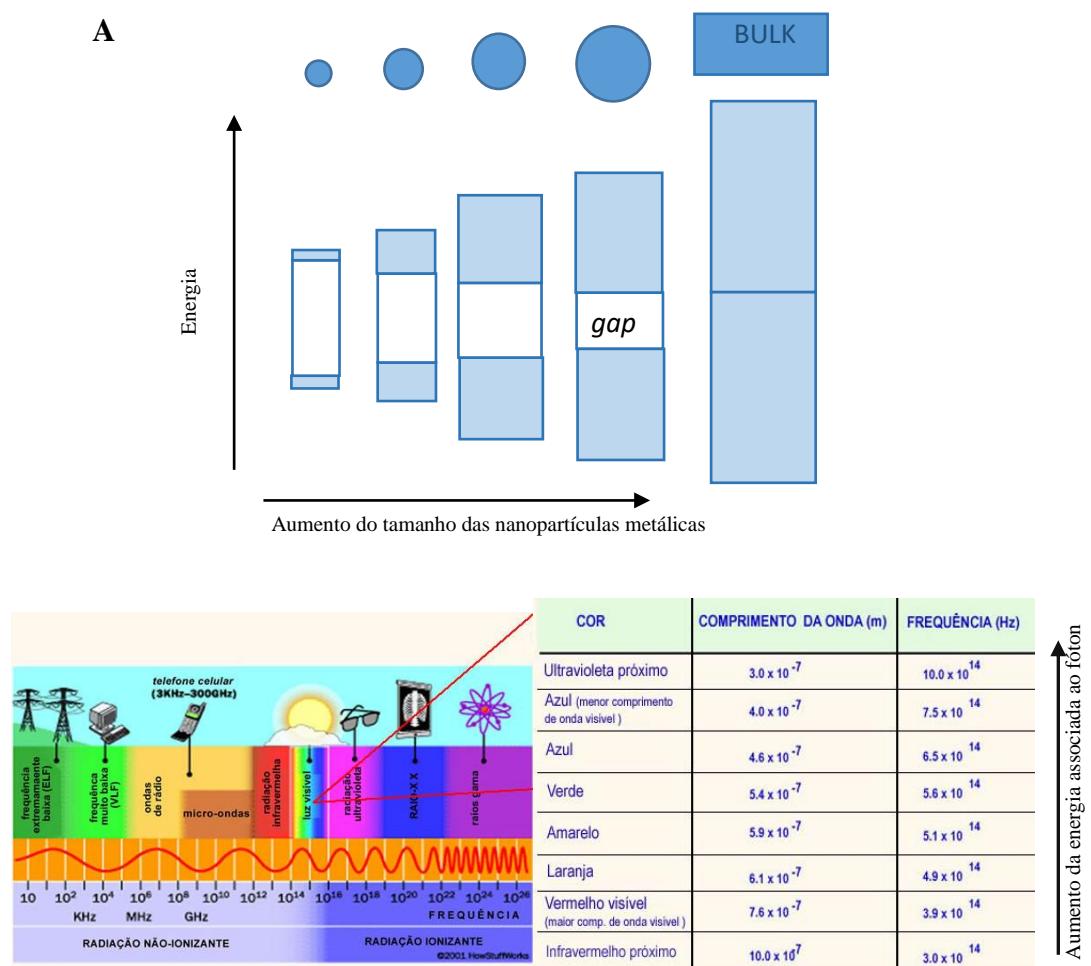


Fig. 11. Em A, representação esquemática da relação entre diâmetro de nanopartícula de ouro esférica e quantidade de energia da radiação eletromagnética necessária para promover elétrons da banda de valência para a banda de condução. Com o aumento de tamanho dessas nanopartículas, o *gap* é menor, a radiação eletromagnética absorvida apresenta um valor de energia menor e, portanto, relacionada com comprimento de onda maiores. Em B, espectro eletromagnético e no destaque a regiãopectral do visível com os comprimentos de onda, frequência e cores relacionadas.

Métodos físicos, químicos e eletroquímicos têm sido desenvolvidos e aprimorados para o preparo de GNPs. Atualmente, as abordagens mais comuns para a síntese por métodos químicos de GNPs envolvem a redução do cloreto de ouro (HAuCl_4) em solução aquosa. Os íons Au^{3+} são introduzidos ao meio reacional a partir do ácido tetracloroáurico, que é a forma ácida do cloreto de ouro (III). A redução de HAuCl_4 com reagentes redutores comuns, tais como boro-hidreto de sódio (NaBH_4) ou citrato de sódio, permite a produção de nanopartículas esféricas. Utilizando o citrato de sódio, ocorre a redução de Au^{3+} para Au^0 , resultando na formação de nanopartículas que possuem rede cúbica de face centrada, com tamanho de partículas definido pela concentração de citrato de sódio presente no meio¹².

Uma das principais dificuldades na realização do experimento de síntese de nanopartículas metálicas é a obtenção de suspensões coloidais estáveis, já que nanopartículas metálicas possuem uma alta energia superficial, favorecendo termodinamicamente a imediata agregação destas para a formação de ligações metal-metal. Para evitar a agregação das NPs, a preparação de sistemas coloidais geralmente é efetuada em presença de espécies denominadas estabilizadores, que se adsorcem sobre as superfícies das NPs, formando uma camada auto-organizada que impede a coalescência. Assim, têm sido usados agentes que introduzem cargas elétricas em sua superfície aumentando a repulsão, ou essas têm sido recobertas com moléculas de surfactantes e polímeros, impedindo a atração. Alguns dos estabilizadores mais eficazes são os poliméricos, como, por exemplo, poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(álcool vinílico) (PVA) e ácido poliacrílico (PAA), que possuem, em suas estruturas, sítios básicos de Lewis com alta afinidade pelas nanopartículas, e cadeias orgânicas suficientemente compridas que criam um impedimento estérico, evitando interações entre as mesmas. Entretanto, a agregação de NPs pode ser útil para certas aplicações, como por exemplo, para detectar o reconhecimento molecular de抗ígenos e anticorpos tratados com GNPs. Nesse caso, a agregação leva a uma interação que dá origem a uma coloração violeta-azulada característica⁹. Também as moléculas do solvente e de outras espécies coordenantes presentes em solução podem se ligar à superfície da partícula, o que somado a força de ligação e a densidade dos átomos (que dependem da face cristalina exposta) tornam desigual a velocidade de crescimento em certas direções e geram nanoestruturas de maior dimensão e com diferentes formas. As propriedades da camada de recobrimento da NP definem sua dispersibilidade, compatibilidade e interações entre si e com outros materiais e moléculas.

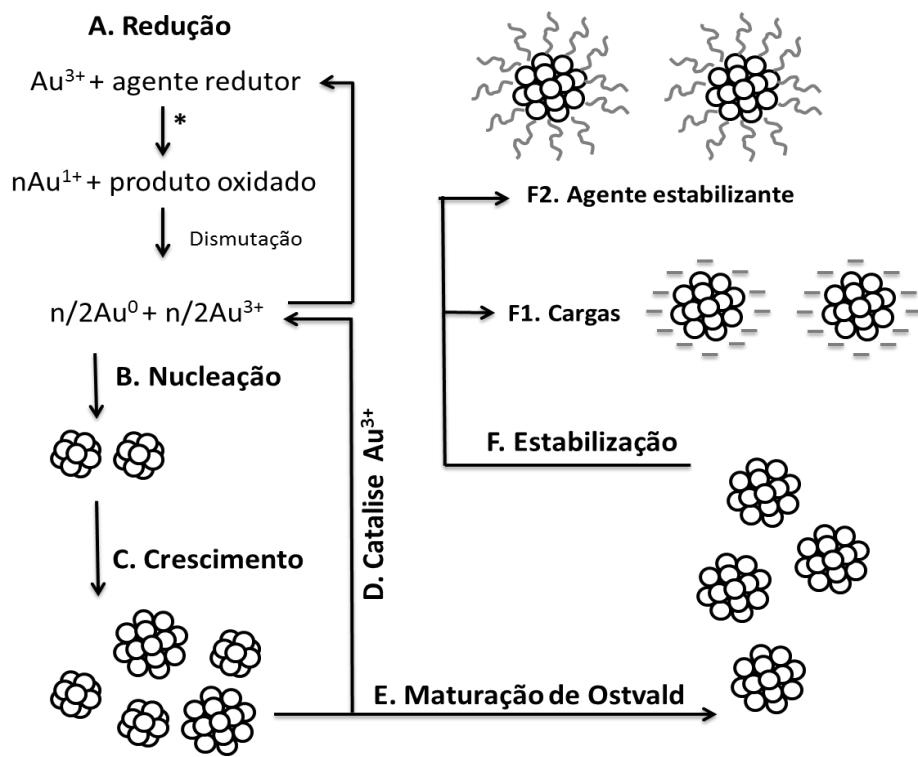


Figura 12. Esquema das etapas ocorridas no processo da síntese química para obtenção de nanopartículas de ouro.

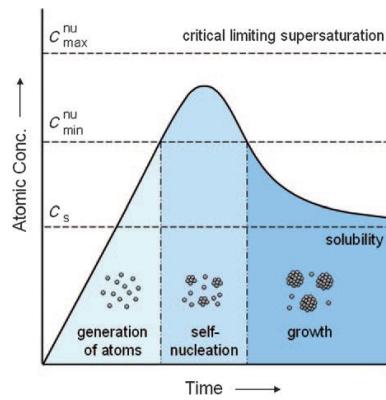


Figura13 : Gráfico da concentração atômica versus time, ilustrando a geração de átomos, nucleação e consequente crescimento das nanopartículas²².

O tampão HEPES tem sido usado na síntese verde de NPMRs. Dependendo da concentração do tampão HEPES e das moléculas presentes no meio, as nanopartículas possuem diferentes colorações (figura 15 C e D). Na síntese das NPMR de ouro, o HEPES atua como agente redutor e agente de crescimento e direcionamento, porque sua piperazina é capaz de gerar radicais livres no nitrogênio central e isso reduz o íon ouro.

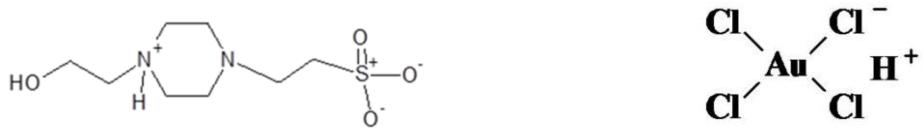


Figura 14: Tampão HEPES (esquerda) e ácido tetracloraurico (direita).

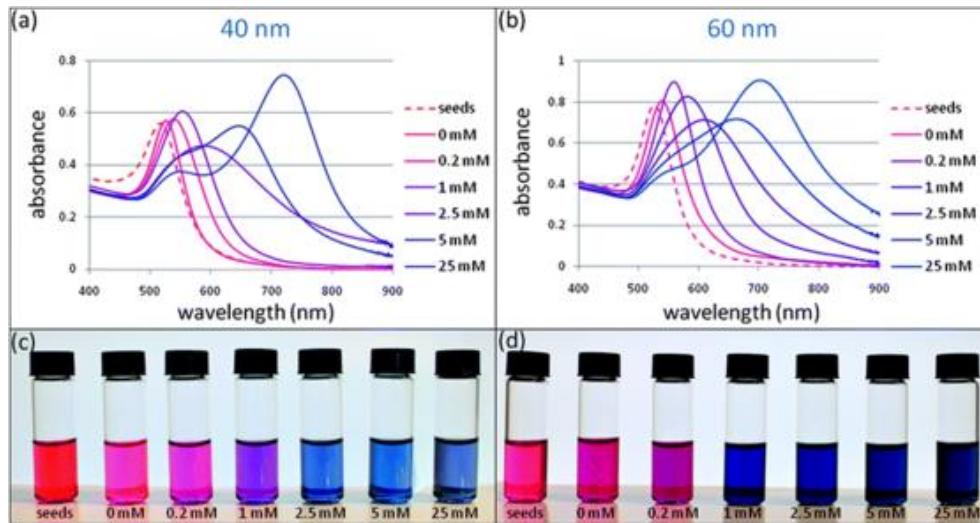


Figura 15: Espectros eletrônicos de soluções coloidais de nanoparticulas de ouro sintetizadas com diferentes concentrações de HEPES evidenciando as bandas de ressonância plasmônica e as diferentes cores das soluções¹⁵.

A diversidade de usos das GNPs requer nanopartículas com propriedades específicas e como essas propriedades são determinadas por forma, tamanho, estado de agregação e agentes de recobrimento (estabilizantes), existe um grande interesse científico por novos métodos de síntese. Essa busca visa também o baixo custo (os produtos comerciais são caros e pouco diversificados), condições amigáveis ao meio ambiente e biocompatibilidade para a indústria farmacêutica e outras aplicações biomédicas. Assim, novos processos de síntese mais simples são desejáveis e utilização de macromoléculas biológicas, tais como as proteínas, são de grande interesse para desenvolvimento de métodos verdes para a síntese de NPs metálicas. Esse interesse decorre da presença de grupos químicos redutores, de oferecerem a vantagem de agir como biotemplates para dirigir o crescimento e a geometria de NPs além do processo de síntese ser modulado por fatores como temperatura, pH do meio, a concentração e proporção dos reagentes, o molde fornecido pela estrutura molecular e a solvatação.

O método de síntese proposto nessa aula permite a síntese de GNPs em condições de bancada à temperatura ambiente, com poucos reagentes e extrato de frutas. Essas características

potencialmente ampliam o uso de GNPs como uma ferramenta para pesquisadores com pouca ou nenhuma experiência em síntese química, além do uso didático. A síntese e caracterização dessas NPs têm sido estudadas no Laboratório de Nanoestruturas para Biologia e Biomateriais Avançados da UFABC.

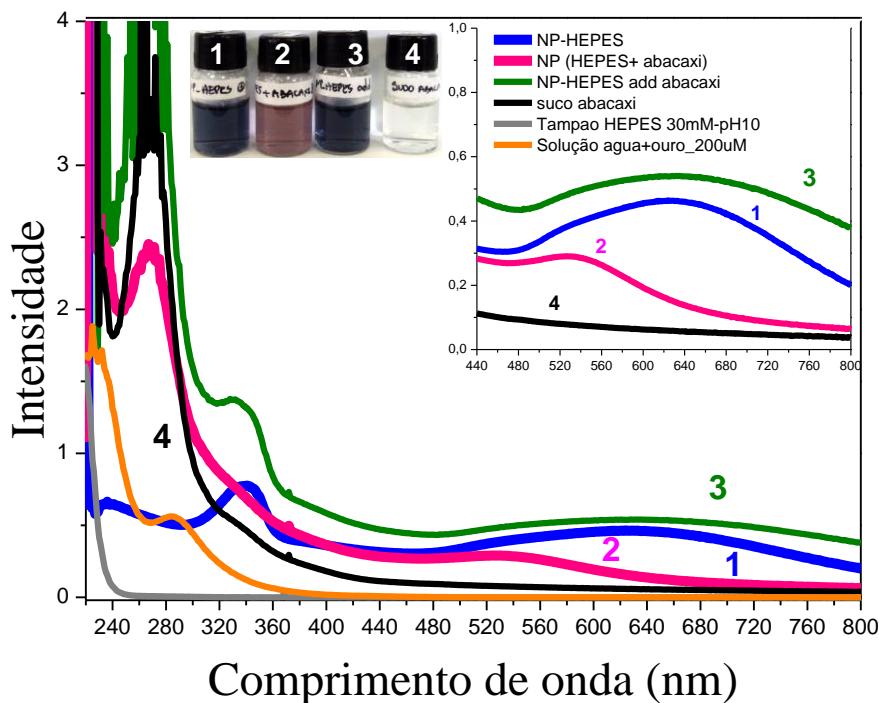


Figura 16: Espectros de absorbância das soluções coloidais de nanoparticulas de ouro sintetizadas nessa aula, evidenciando as bandas de ressonância plasmônica e a coloração das soluções.

A fig. 16 mostra o espectro de absorbância de GNPs sintetizadas com uso de diferentes substâncias como agentes redutores e estabilizantes. A linha azul (1) mostra o espectro de GNPs sintetizadas com uso de HEPES como agente redutor do íon Au^{3+} a Au^0 (primeira etapa de síntese da GNP) e estabilizante da GNP formada. O espectro mostra bandas de absorção em duas regiões: a região visível onde se observa uma banda larga com pico em 640 nm que é consistente com GNPs multi ramificadas, anisotrópicas com dimensões acima de 50 nm²³ e a região UV onde aparece uma banda em 340 nm que é consistente com a presença de HEPES e seus produtos de oxidação, coordenados na superfície da GNP. A linha vermelha mostra um espectro de GNPs sintetizadas com uso de HEPES e uma solução de suco de abacaxi. Nessa condição as GNPs formadas apresentam banda plasmônica em 520 nm, consistente com a formação de GNPs esféricas e de menor dimensão do que as formadas somente com HEPES. O tamanho das GNPs formadas é controlado por fatores termodinâmicos e cinéticos. Observa-se que as GNPs formadas em presença de suco de abacaxi com HEPES não apresentam a banda sugestiva da coordenação desse composto ou seus produtos de oxidação com a superfície das

GNPs, mas, ao contrário, apresenta uma banda em 280 nm típica dos aminoácidos aromáticos e pontes dissulfeto das proteínas. Portanto, nessa condição, provavelmente, as proteínas do suco de abacaxi foram mais competitivas do que o HEPES e seus produtos para coordenação com a superfície das GNPs. Porém, no tempo observado nesse experimento, as proteínas do suco de abacaxi, quando esse foi adicionado nas GNP previamente sintetizadas com uso de HEPES (linha verde), não conseguiram deslocar o HEPES e seus produtos da coordenação com ouro e o espectro registrado apresenta a banda do suco de abacaxi sobreposta ao espectro do HEPES e seus produtos coordenado com as GNPs.

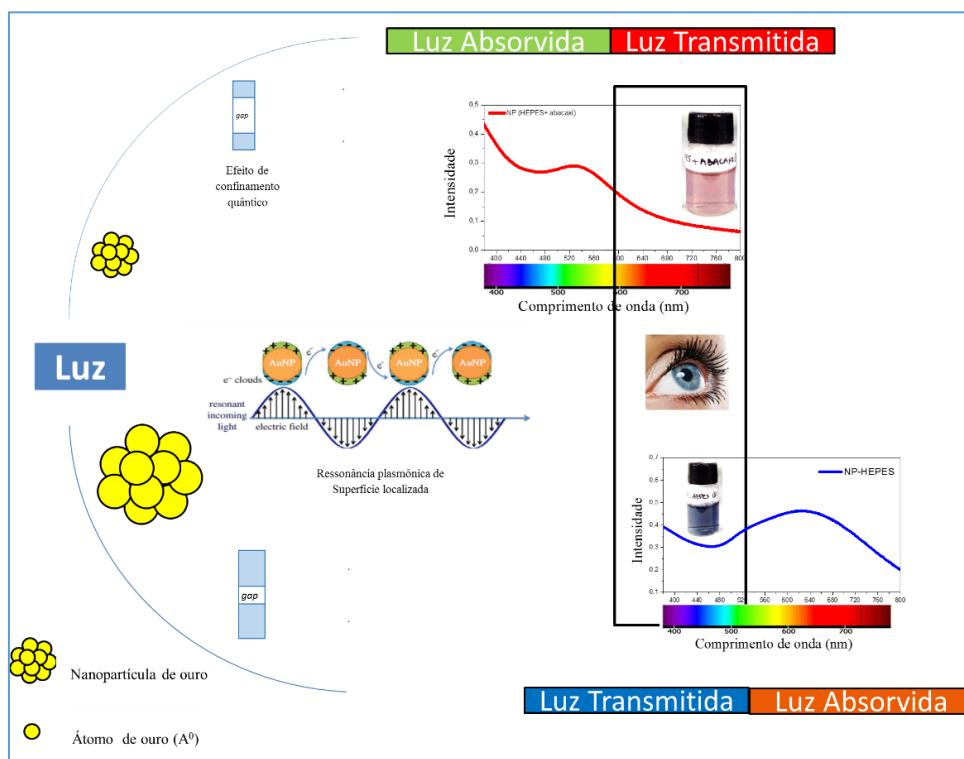


Fig. 17. Representação esquemática das propriedades eletrônicas e ópticas na nanoscalas relacionadas com a diversidade de cores apresentadas pelas suspensões de nanopartículas metálicas em função do tamanho, morfologia e estado de agregação.

2. Objetivos da aula

- Estudar a correlação entre estrutura proteica e atividade enzimática.
- Aprendizagem de um método verde, de uma etapa, de síntese de nanopartículas de ouro biocompatíveis com capacidade de modular a atividade biológica de proteínas. Esse estudo resgata e coloca em prática conceitos básicos de Química, como teorias de ligação metálica, estrutura atômica, reações de oxidação-redução e espectroscopia, ao mesmo tempo em que introduz novos conceitos, como o efeito de confinamento quântico e a ressonância de plasmons de superfície.

3. Procedimento Experimental

Materiais

- 8 tubos de ensaio de 20 mL
- 1 tubo de ensaio de 30 mL
- 8 flaconetes de vidro com tampa (5 mL) – por turma
- 5 eppendorfs de 2mL
- Estante para tubos de ensaio
- Estante para Eppendorfs
- Béquer de vidro de 100 mL (para aquecer água)
- Béquer de 25 ou 50 mL (para água destilada)
- Funil de vidro pequeno e papel de filtro, tesoura para cortar o papel de filtro
- Recipiente com gelo
- Almofariz e pistilo
- Luvas de látex
- Bastão de vidro (para dissolver a gelatina)
- Placa aquecida ou banho-maria 100°C
- Banho-maria 60°C
- Banho-maria 30°C
- Balança
- Micropipetas de 10 µL, 100 µL e de 1000 µL (um conjunto para cada grupo)

Reagentes

- Abacaxi maduro (1 fatia média de polpa de abacaxi picado por grupo)
- Gelatina incolor e sem sabor
- Água destilada
- Tampão com HEPES e Fosfato de Sódio (30 mM) pH 10
- Solução de sal de ouro (30 mM)
- Solução de sulfato de amônio 3 mol/L
- Etanol absoluto ou comercial 99,3° INPM

Planejamento: Turma dividida em 6 grupos, sendo 3 grupos por bancada.

1^a etapa : Extração do suco de abacaxi (por grupo)

A extração do suco será feita macerando-se os pedaços de abacaxi utilizando almofariz e pistilo. O suco deve em seguida ser filtrado utilizando funil de vidro e papel de filtro em um tubo de ensaio de 20 mL. O tubo deverá ser armazenado no gelo.

2^a etapa : Síntese de nanopartículas de fruta com sal de ouro (GNP) - por bancada

Essa etapa deverá ser feita com a TURMA separada em 2 grupos, ou seja, cada bancada constitui um grupo.

Cada GRUPO (bancada) deverá seguir o PROTOCOLO indicado na tabela 1 e preparar em frascos de vidro com tampa identificados, 1500 µL de cada um dos 4 tipos de solução, fazendo a adição na ordem em que aparecem os reagentes. Realizar a síntese em temperatura ambiente (~ 25°C).

Após a síntese, reservar os frascos tampados para serem usados na 6^a etapa dessa aula.

Observar a mudança de coloração das soluções. Fotografar os frascos imediatamente após a síntese e após 30 minutos quando da adição do extrato de abacaxi à solução de “GNP-HEPES adicionado abacaxi”.

Tabela 1. Resumo do procedimento experimental de síntese de nanopartículas

Solução Reagente	GNP- HEPES	GNP-HEPES + abacaxi	GNP-HEPES adicionado abacaxi	Extrato de abacaxi
Tampão HEPES+Fosfato de sódio (30 mM) pH 10 µL (microlitros)	1390 µL	1390 µL	1390 µL	1400 µL
Água destilada	100 µL	--	--	--
Extrato de abacaxi	--	100 µL	--	100 µL
Solução de sal de ouro (30 mM)	10 µL	10 µL	10 µL	--
Cor da solução				
--	--	--	Depois de 30 minutos acrescentar 100 µL extrato de abacaxi	--
Cor da solução				

3 ª etapa : Preparo da gelatina (por grupo)

Pesar 2 g de gelatina incolor e sem sabor de qualquer marca comercialmente disponível e dissolver em 20 mL de água destilada, em tudo de ensaio de 30 mL, após solubilização a solução de gelatina deve ser aquecida a 60°C e mantida nessa temperatura até o uso.

4 ª etapa : Atividade enzimática do suco de abacaxi e desnaturação protéica por aquecimento (por grupo).

1) Primeiramente, deve-se preparar as amostras de abacaxi. Para isso, utilizando tubos de ensaio de 20 mL, deve-se pipetar 2,0 mL de água no tubo 1 (controle) e 2,0 mL do extrato de abacaxi nos tubos 2, 3 e 4, conforme indicado na tabela 2.

2) Tratamento das amostras durante 5 minutos:

- O tubo 2 deve ser mantido à temperatura ambiente.
- O tubo 3 deve ser aquecido à 60°C .
- O tubo 4 deve ser fervido .

3) Após este tempo de tratamento de cada uma das amostras, imediatamente resfriar no gelo por 1 minuto.

4) Após o resfriamento da amostra fervida adicionar em todos os tubos a solução de gelatina. Homogeneizar.

5) Incubar todas as amostras por 10 minutos a 37°C .

6) Em seguida resfriar todas as amostras no gelo por 7 minutos, observar e anotar o resultado.

Tabela 2. Resumo do procedimento experimental.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
Água	2,0 mL	-	-	-
Amostra Abacaxi	-	2,0 mL	-	-
Amostra Abacaxi 60°C	-	-	2,0 mL	-
Amostra Abacaxi Fervida	-	-	-	2,0 mL
Gelatina	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Resultado (geleificação ?)				

5 ª etapa : Precipitação de proteínas (por grupo).

Pipetar nos tubos de ensaio de 20 mL os reagentes conforme a tabela 3, realizar o experimento em temperatura ambiente (~ 25°C). Observar e anotar o resultado para posterior discussão.

Tabela 3. Resumo do procedimento experimental de precipitação de proteínas.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
Água	2,0 mL	-	-
Sulfato de amônio	-	2,0 mL	-
Etanol Absoluto	-	-	2,0 mL
Gelatina	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Precipitação? Características do precipitado			

6 ª etapa : Modulação da estrutura/atividade das enzimas pela associação com nanopartículas de ouro (por grupo).

- 1) Identifique os Eppendorfs como: A,B,C,D e E.
- 2) Adicione a cada um os reagentes conforme tabela 4, colocando inicialmente a solução de gelatina mantida a 60°C e logo depois a respectiva solução. Homogeneizar.

Tabela 4. Resumo do procedimento experimental da 6^a etapa

Reagentes \ Grupo	A	B	C	D	E
Gelatina	250 µL				
Água deionizada	250 µL	--	--	--	--
Solução de NP- HEPES	--	250 µL	--	--	--
Solução de NP- HEPES + abacaxi	--	--	250 µL	--	--
NP-HEPES adicionado abacaxi	--	--	--	250 µL	--
Solução de extrato de abacaxi	--	--	--	--	250 µL
Digestão da gelatina ? (nº de dias após síntese)					

3) **Feche bem os Eppendorfs.** Esses deverão ser mantidos a temperatura ambiente por 10 minutos e logo após incubados no gelo por 7 minutos.

4) Após o período de incubação, observe as características da gelatina em relação a geleificação e viscosidade e anote os resultados. Fotografe.

5) Na próxima aula (aula de discussão) cada grupo deverá observar seus Eppendorfs em relação à digestão da gelatina (perda da consistência de gel), anotando e fotografando os resultados.

ATENÇÃO : NÃO ABRIR OS EPPENDORFS EM NENHUM MOMENTO DO PERÍODO DE OBSERVAÇÃO PARA QUE NÃO OCORRA CONTAMINAÇÃO DAS AMOSTRAS.
O descarte dos Eppendorfs deverá ser feito no laboratório em local adequado.

4. Análise dos dados:

1. Preencha as tabelas indicando os resultados observados de cada experimento.
2. Utilize as fotografias dos resultados para fazer suas análises.
3. Discutir o efeito do suco de abacaxi sobre o colágeno (gelatina).
4. Discutir o efeito da temperatura sobre as enzimas (proteases) presentes no suco do abacaxi.
5. Discutir o efeito do etanol e do sulfato de amônio sobre as proteínas em solução. Qual o princípio de cada efeito.
6. Quais as etapas de síntese de nanopartículas metálicas? Baixe o seguinte artigo como material de estudo : <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2016.00013> Analise a figura 7 desse artigo e o texto correspondente e faça um resumo para responder a pergunta.
7. Pesquise em artigos científicos publicados em revistas indexadas os efeitos que a interação com nanopartículas metálicas provoca na estrutura das proteínas globulares.

5. Para discussão:

1. Pesquisar: qual(is) protease(s) está(ão) presente(s) no suco de abacaxi.
2. Como poderia ser realizada a purificação dessa(s) proteína(s)?
3. A atividade das proteases pode ser otimizada? Como?
4. Discuta o efeito da temperatura sobre a desnaturação de proteínas no processo de cozimento dos alimentos, qual a importância disso?
5. Por que se pode utilizar abacaxi para amaciar carnes? Qual a relação entre o suco do abacaxi e os amaciadores de carnes comerciais?
6. Pesquise o que é efeito SERS (do Inglês, Surface Enhanced Raman Spectroscopy) quanto a sua origem e utilidade para técnicas de espectroscopia.

(Sugestão de artigo: <http://www.mdpi.com/1996-1944/8/6/3024>)

6. Exercício

Ana, uma dona de casa, resolveu fazer uma sobremesa a base de gelatina e abacaxi para os amigos que viriam visitá-la, procurou na internet uma receita bem simples e que parecia ser muito boa.

Abacaxi Refrescante	
Ingredientes	Modo de Preparo
1 abacaxi	Descasque o abacaxi e corte em cubos.
1 litro de água	Leve ao fogo com a água e o açúcar.
8 colheres (sopa) de açúcar	Deixe ferver por 30 minutos.
4 caixinhas de gelatina de abacaxi	Agregue a gelatina e misture bem.
1 lata de creme de leite	Apague o fogo e deixe esfriar um pouco.
	Adicione o creme de leite e misture bem.
	Despeje em um refratário e leve à geladeira por 3 horas.
	Sirva gelado.



Como Ana estava com pressa deixou o abacaxi pouco tempo no fogo (cerca de 2 minutos) e já adicionou a gelatina. Após deixar a sobremesa esfriar, observou que a gelatina não havia endurecido. Explique por que nessa situação a gelatina não endureceu depois de resfriada. Por que a sobremesa postada na internet tinha a gelatina com pedaços de abacaxi sólida?

Referências Bibliográficas

- 1.URL: <http://www.protease.ufrj.br/ProteaseApres.htm>
- 2.RAWLING, N.D., BARRET, A. 1994. Families of serine peptidases. *Meth. Enzymol.* 244:18-61.
- 3.RAWLING, N.D., BARRET, A. 1994. Families of cysteine peptidases. *Meth. Enzymol.* 244:461-486.
- 4.RAWLING, N.D., BARRET, A. 1994. Families of aspartic peptidases, and those of unknown mechanism. *Meth. Enzymol.* 248:105-120.
- 5.RAWLING, N.D., BARRET, A. 1994. Families of metallopeptidases. *Meth. Enzymol.* 248:183-228.
- 6.FRANCISCO JR, W.E. ; FRANCISCO, W. Proteínas: hidrólise, precipitação e um tema para o ensino de química. *Química Nova na Escola*, 24, 2006.
- 7.YOUNG, S. et al. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release* ,109, 256–274, 2005.
8. Química Hoje.Alicia Ivanissevich e Angelo da Cunha Pinto (Orgs.).Rio de Janeiro, 2012, Instituto Ciênciaca Hoje.
- 9.ALVES, W.A., Química supramolecular e nanotecnologia - Série química: ciência e tecnologia. São Paulo; Editora Ateneu, 2014.
- 10.“The Scale of Things - Nanometers and More,” <https://nanohub.org/resources/13842,2012>.
11. MARTINS, M.A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico, *Quim. Nova*, Vol. 35, No. 7, 1434-1446, 2012.

12. MELO JR., M. A.; SANTOS, L. S. S.; GONÇALVES, M. C.; NOGUEIRA, A. F.; Preparação de Nanopartículas de Prata e Ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. *Química Nova*, Vol. 35, Nº 9, 1872-1878, 2012.
13. NETTO-FERREIRA, J. C. Reações Catalíticas Empregando o Efeito Plasmônico de Nanopartículas Metálicas Suportadas, *Rev. Virtual Quim.*, 7 (1), 165-217, 2015.
14. SANTOS, J. F. L.; SANTOS, M. J. L., THESING, A., TAVARES, F., GRIEP, J.; RODRIGUES, M. R. F. Ressonância de plasmon de superfície localizado e aplicação em biossensores e células solares. *Quim. Nova*, Vol. XY, No. 00, 1-14, 200_
15. MAIORANO, G.; RIZZELLO, L.; MALVINDI, M.A.; SHANKAR, S.S.; MARTIRADONNA L.; FALQUI A.; CINGOLANI,R.; POMPA, P.P. Monodispersed and size-controlled multibranched gold nanoparticles with nanoscale tuning of surface morphology. *Nanoscale*, 2227, 2011.
16. K. Dawson, Nanomaterial's functionality, 2015, 2.
17. YASUN, E.; KANG, H.; ERDAL, H.; CANSIZ, S.; OCSOY, I.; HUANG, Y-F.; TAN, W. Cancer cell sensing and therapy using affinity tag-conjugated gold nanorods. *Interface Focus* 3: 20130006, 2013.
18. ARAÚJO-CHAVES, J. C.; TOFANELLO, A. ; YOKOMIZO, C. H. ; CARVALHO-JR, W. M. ; SOUZA, F. L. ; NANTES, I. L. Cytochrome C as an electron acceptor of nanostructured titania and hematite semiconductors. *Journal of Energy Challenges and Mechanics.*, v. 1, p. 1, 2014.
19. BYRNE, S. J.; CORR, S.A.; RAKOVICH, T.Y.; GUN'KO, Y.K.; RAKOVICH, Y.P.; DONEGAN, J.F; MITCHELL, S.; VOLKOV, Y. Optimisation of the synthesis and modification of CdTe quantum dots for enhanced live cell imaging. *J. Mater. Chem.*, 2896, 2006.
20. SCHLICKER, S. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 4756 – 4795.
21. PEREIRA, M.K. Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado e Espalhamento Raman em Soluções Coloidais de Ouro. (Dissertação de mestrado) Programa de Pós-graduação em Física. Instituto de Física da UFRGS, Porto Alegre, 2009.
22. MURPHY et al. Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications, *J. Phys. Chem. B*, Vol. 109, No. 29, 2005
23. YOUNAN XIA; YUJIE XIONG; BYUNGKWON LIM; SKRABALAK, S. E. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics?, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 60 – 103
24. RODRÍGUEZ-OLIVEROS, R.; SÁNCHEZ-GILM, J. A. Gold nanostars as thermoplasmonic nanoparticles for optical heating. *Opt. Express* v. 20, p. 621-626, 2012.