



Universidade Federal do ABC

**BCL 0308-15**

**Bioquímica: estrutura, propriedade e  
funções de biomoléculas**

---

**APOSTILA DE LABORATÓRIO**

**2019.3**

**Coordenador:** Prof. Dr. César A. J. Ribeiro

**Autores:** Núcleo Docente da UFABC

## ÍNDICE

CRONOGRAMA 2019.1 .....	3
SEGURANÇA E NORMAS DE TRABALHO NO LABORATÓRIO .....	4
BIBLIOGRAFIA .....	5
CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO .....	6
ORIENTAÇÕES PARA O USO DE MICROPIPETAS .....	8
Prática 1. Propriedades físico-químicas relacionadas à estrutura e polaridade da água .....	13
Prática 2: Aminoácidos: estudo da estrutura e propriedades ácido-base. ....	21
Prática 3: Espectrofotometria – Conceitos e Aplicações .....	29
Prática 4: Desnaturação Proteica e Atividade enzimática.....	37
PRÁTICA 5: Propriedades de Surfactantes e Lipídeos .....	42
Prática 6: Carboidratos: estrutura e propriedades. ....	52
Prática 7: Extração de DNA vegetal. ....	57

**Coordenador**

**Prof. Dr. César A. J. Ribeiro**

cesar.ribeiro@ufabc.edu.br

## CRONOGRAMA 2019.3

TURMAS A & B

SEMANA	ATIVIDADE
23/set	Apresentação da disciplina
30/set	<b>PRÁTICA 1:</b> Propriedades físico-químicas relacionadas à estrutura e polaridade da água.
07/out	<b>PRÁTICA 2:</b> Aminoácidos: estudo da estrutura e propriedades ácido-base.
14/out	<b>PRÁTICA 3:</b> Espectrofotometria – Conceitos e Aplicações
21/out	<i>Discussão de resultados.</i>
28/out	<b>FERIADO</b>
04/nov	<b>PRÁTICA 4:</b> Desnaturação proteica e atividade enzimática
11/nov	<b>PRÁTICA 5:</b> Propriedades de Surfactantes e Lipídeos .
18/nov	<b>PRÁTICA 6:</b> Carboidratos: estrutura e propriedades.
25/nov	<b>PRÁTICA 7:</b> Extração de DNA vegetal.
02/dez	<b>Avaliação de laboratório.</b> <i>Poderá ser realizada em sala de aula a ser reservada pelo(a) docente de laboratório da turma.</i>
09/dez	<b>*Avaliação substitutiva de laboratório</b> (prova escrita) <b>*Vistas de Provas e Conceitos</b> (Resolução ConsEPE N.120)
23/set	Apresentação da disciplina

**\*Somente em caso de falta justificada** (Resolução ConsEPE 181). **O (A) docente de laboratório reservará o(s) local(is) de aplicação da(s) prova e informará a(s) turma(s) com antecedência.**

TURMA C

SEMANA	ATIVIDADES
25/set	Apresentação
02/out	<b>PRÁTICA 1:</b> Propriedades físico-químicas relacionadas à estrutura e polaridade da água.
09/out	<b>PRÁTICA 2:</b> Aminoácidos: estudo da estrutura e propriedades ácido-base.
16/out	<b>PRÁTICA 3:</b> Espectrofotometria – Conceitos e Aplicações
23/out	<i>Discussão de resultados.</i>
30/out	<b>PRÁTICA 4:</b> Desnaturação proteica e atividade enzimática
06/nov	<b>PRÁTICA 5:</b> Propriedades de Surfactantes e Lipídeos .
13/nov	<b>PRÁTICA 6:</b> Carboidratos: estrutura e propriedades.
20/nov	<b>FERIADO</b>
27/nov	<b>PRÁTICA 7:</b> Extração de DNA vegetal.
04/dez	<b>Avaliação de laboratório.</b> <i>Poderá ser realizada em sala de aula a ser reservada pelo(a) docente de laboratório da turma.</i>
11/dez	<b>*Avaliação substitutiva de laboratório</b> (prova escrita) <b>*Vistas de Provas e Conceitos</b> (Resolução ConsEPE N.120)

**\*Somente em caso de falta justificada** (Resolução ConsEPE 181). **O (A) docente de laboratório reservará o(s) local(is) de aplicação da(s) prova e informará a(s) turma(s) com antecedência.**

**As aulas práticas não serão repostas em caso de falta.**

## SEGURANÇA E NORMAS DE TRABALHO NO LABORATÓRIO

Leia integralmente o *Guia de Segurança, Experimentos e Atividades (3ªed.)* da disciplina de Base Experimental das Ciências Naturais. Destacam-se:

### Segurança

- Conheça a localização dos chuveiros de emergência, extintores e lavadores de olhos.
- Use sempre avental, mantenha os cabelos presos e use calçados fechados, mesmo na aula reservada para o preparo da prática seguinte;
- Os óculos são obrigatórios!
- Usar a capela sempre que possível;
- Nunca pipete com a boca, não cheire, nem experimente os produtos químicos;
- Coma e beba, só fora do laboratório;
- Consulte o professor cada vez que notar algo anormal ou imprevisto;
- Comunique qualquer acidente, por menor que seja ao professor;
- Se utilizar chama, mantenha longe de qualquer reagente!
- Nunca brinque no laboratório;
- Evite o contato de qualquer substância com a pele;
- Nunca aqueça o tubo de ensaio, apontando a extremidade aberta para um colega ou para si mesmo.
- Cuidado ao aquecer vidro em chama: o vidro quente tem exatamente a mesma aparência do frio.

### Procedimentos gerais

- Siga rigorosamente as instruções fornecidas pelo professor.
- Pesquise sempre a toxicidade dos reagentes antes das práticas.
- Nunca abra um recipiente de reagente antes de ler o rótulo.
- Evite contaminar reagentes, nunca retorne o excedente aos frascos de origem.
- Adicione sempre ácidos à água, nunca água a ácidos.
- Não coloque nenhum material sólido dentro da pia ou nos ralos.
- Não coloque resíduos de solventes na pia ou ralo; há recipientes apropriados para isso.
- Não atire vidro quebrado no lixo comum. **Deve haver um recipiente específico para fragmentos de vidro.**
- Verifique se as conexões e ligações estão seguras antes de iniciar uma reação/destilação
- Ao terminar a prática, lave o material utilizado e deixe-o em ordem.

## BIBLIOGRAFIA

### ***Básica***

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica. 4ed. SP: Sarvier, 2006. 1202 p.

VOET, D.; VOET, J.G. Bioquímica. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, 1596 p.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J.L; STRYER, L. Bioquímica, 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KOOLMAN, J.; ROEHM, K. H. Color Atlas of Biochemistry 2012, 3rd Edition ISBN: 9783131003737

### ***Complementar***

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. Biochemistry. 6.ed. New Jersey: John Wiley, 2006. 1026 p.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. Bioquímica Básica. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 386 p.

CHAMPE, P.C; Harvey, R.A.; Ferrier, D.R. Bioquímica ilustrada, 3 ed., Porto Alegre: Artmed, 2006. 533 p.

DEVLIN, T.M. Textbook of biochemistry with clinical correlations, 6.ed., New Jersey: WileyLiss, 2006. 1208p.

FERREIRA, C.P.; JARROUGE, M.G.; MARTIN, N.F. Bioquímica Básica. 9 ed. SP: MNP Ltda, 2010. 356 p.

GARRETT, R.H.; GRISHAM, C.M. Biochemistry. 3.ed. Belmont: Thomson, 2005. 1086 p. (International Student edition).

KAMOUN, P.; LAVOINNE, A.; VERNEUIL, H. Bioquímica e biologia molecular. RJ: Guanabara Koogan, 2006. 420 p.

VOET, D.; VOET, J.G. Biochemistry. 3.ed. New Jersey: John Wiley, 2003. 1590 p.

VOET, D.; VOET, J.G.; Pratt, C.W. Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level. 3ed., 2008. 1099 p.

### **Informações técnicas (propriedades físicas, toxicidade, preço, nomenclatura)**

1. CRC Handbook of Chemistry and Physics
2. Sigma-Aldrich - [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)
3. IUPAC Gold Book - <http://goldbook.iupac.org/>
4. Merck Index

### **Bases de Dados/Referências**

1. The Web of Science ([www.isiknowledge.com](http://www.isiknowledge.com))
2. SciELO - Scientific Electronic Library Online ([www.scielo.org](http://www.scielo.org))

## CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO

Os conceitos a serem atribuídos ao longo da disciplina estarão de acordo com os critérios contidos no Sistema de Avaliação do Processo de Ensino e Aprendizagem, parte do Projeto Pedagógico do BC&T.

Conceito	Desempenho
<b>A</b>	Desempenho excepcional, demonstrando excelente compreensão da disciplina e do uso do conteúdo.
<b>B</b>	Bom desempenho, demonstrando boa capacidade de uso dos conceitos da disciplina.
<b>C</b>	Desempenho mínimo satisfatório, demonstrando capacidade de uso adequado dos conceitos da disciplina, habilidade para enfrentar problemas relativamente simples e prosseguir em estudos avançados.
<b>D</b>	Aproveitamento mínimo não satisfatório dos conceitos da disciplina, com familiaridade parcial do assunto e alguma capacidade para resolver problemas simples, mas demonstrando deficiências que exigem trabalho adicional para prosseguir em estudos avançados. Nesse caso, o aluno é aprovado na expectativa de que obtenha um conceito melhor em outra disciplina, para compensar o conceito D no cálculo do CR. Havendo vaga, o aluno poderá cursar esta disciplina novamente.
<b>F</b>	Reprovado. A disciplina deve ser cursada novamente para obtenção de crédito.
<b>O</b>	Reprovado por falta. A disciplina deve ser cursada novamente para obtenção de crédito.

### • TEÓRICA

Serão realizadas 2 provas escritas, uma aplicada na metade e outra aplicada no final da disciplina. O conteúdo de cada prova é parcial, ou seja, será avaliado somente o que foi ministrado durante aquela área. O conceito da disciplina teórica será atribuído de acordo com critérios estabelecidos e divulgados pelo docente responsável pela turma.

### • PRÁTICA

Será realizada 1 avaliação da atividade prática. Essa avaliação poderá ser composta por prova teórico prática ou prova prática, conforme cada docente responsável pela turma prática.

### • DETERMINAÇÃO DO CONCEITO FINAL NA DISCIPLINA

A determinação do conceito final na disciplina envolverá a relação entre os desempenhos obtidos nas partes prática (Lab) e teórica (Teo) da disciplina, conforme a Tabela 1.

**Tabela 1: Determinação do Conceito Final a partir dos conceitos Teórico (CT) e Prático (CP):**

		Teoria (CT)				
Prática (CP)	Conceito	A	B	C	D	F
	A	A	B	B	C	F
	B	A	B	C	C	F
	C	B	B	C	D	F
	D	C	C	C	D	F
	F	F	F	F	F	F

**Atenção:** para cada avaliação não realizada será atribuído conceito “F”. Em caso de falta justificada, o aluno realizará uma prova escrita substitutiva com o mesmo conteúdo da avaliação não realizada (Resolução ConsEPE UFABC n. 181, de 23/10/14).

**Para ser considerado aprovado na disciplina, o aluno deverá cumprir, simultaneamente, as seguintes condições:**

- 1) ter comparecido, no mínimo, a 75% do total das aulas da disciplina (teoria e laboratório);
- 2) obter, no mínimo, o conceito final “D” na disciplina.

## RECUPERAÇÃO

**A avaliação de recuperação (exame) será uma prova escrita a ser realizada no dia 18.12.2018 em local e horário a serem combinados com o(a) professor(a) da teoria.**

A avaliação de recuperação (exame) poderá envolver todos os conhecimentos explorados na disciplina (aulas teóricas e de laboratório) e é destinado ao discente que for aprovado com Conceito Final D ou reprovado com Conceito Final F.

O(A) aluno(a) que obtiver conceito final D e tiver interesse em realizar o exame de recuperação deverá informar o(a) professor(a).

A determinação do novo conceito final na disciplina envolverá a relação entre os desempenhos obtidos na avaliação de recuperação (exame) e o conceito final obtido na disciplina durante o quadrimestre (CF), conforme tabela abaixo (**tabela 2**).

**Tabela 2: Determinação do Novo Conceito Final a partir do conceito final obtido durante o quadrimestre (CF) e o conceito obtido na avaliação de recuperação (Exame):**

		Exame				
	Desempenho	A	B	C	D	F
CF	D	B	B	C	D	F
	F	C	C	D	D	F

## ORIENTAÇÕES PARA O USO DE MICROPIPETAS



### Introdução

A transferência de volume exato de líquidos é fundamental para vasta maioria dos experimentos nas áreas de bioquímica, biologia molecular, química, etc. De uma maneira geral, o conhecimento sobre o pipetamento de líquidos, a compreensão de seus limites de precisão, bem como o estudo de sua importância na execução reprodutível de experimentos justifica a relevância e abordagem nesta apostila.

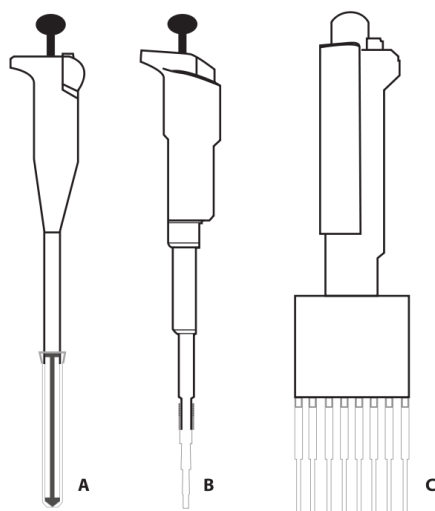
### Fundamentação Teórica

#### *Pipetas automáticas*

Micropipetas são aparelhos designados para a transferência de pequenos volumes (entre 0,2 a 5000  $\mu$ l) com máxima precisão. A construção das micropipetas consiste em um corpo anatômico de polipropileno (autoclavável) equipado com um botão dispensador e um ejetor de ponteiros no topo, um indicador de volume na lateral e uma haste para encaixe de ponteiros 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





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

### 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, hidrofiliicidade) 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.
- **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

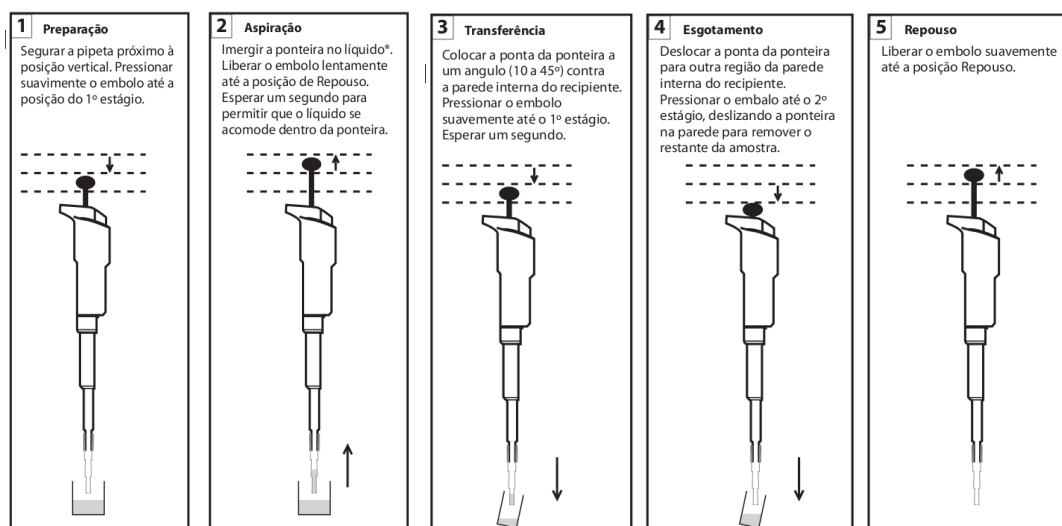
Volume (microlitro)	Porção imersa (milímetros)
0,1 - 1	1
1 - 100	2 - 3
101 - 1000	2 - 4
> 1001	3 - 6

- **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 2<sup>a</sup> 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.

### 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 2:



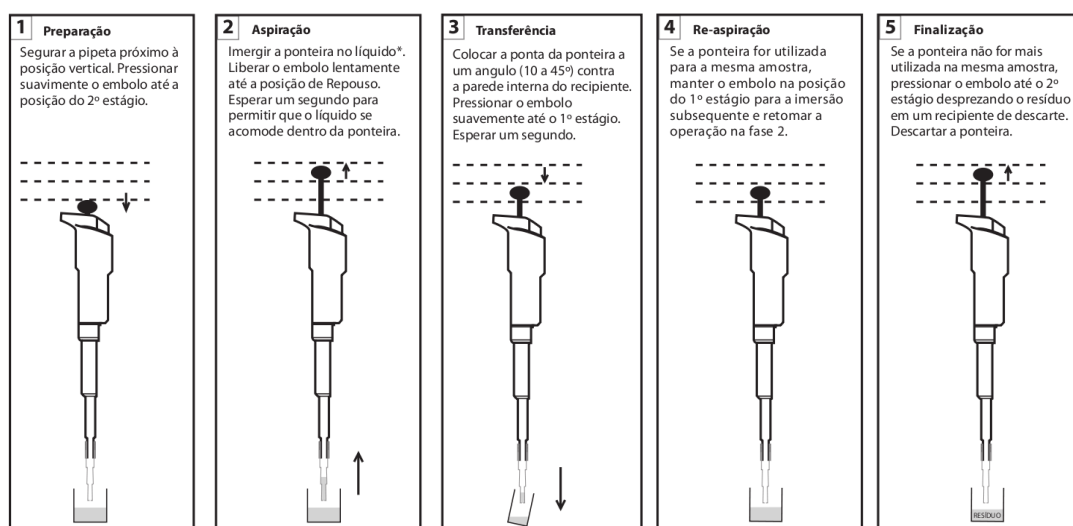
**Figura 2:** Esquema de procedimento usado por a técnica de pipetagem direta. Linhas pontilhadas representam as posições de botão de esgotamento: Repouso (linha superior), 1º estágio (linha no meio) e 2º estágio (linha inferior).

## 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 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 3:



**Figura 3:** 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)

## Teste de calibração

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.

*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.* 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 de 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.

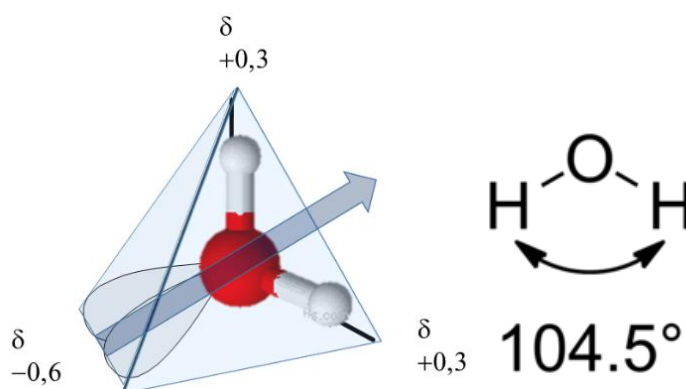
Para a análise dos resultados da calibração, as séries de medições são convertidas para volume (valor efetivamente medido) e comparados com volumes ajustados no indicador da micropipeta (valores indicados). Calcula-se uma média (para mesmos volumes) ou regressão linear (para volumes diferentes)  $\pm$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

## PRÁTICA 1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS RELACIONADAS À ESTRUTURA E POLARIDADE DA ÁGUA

### 1.1. 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.



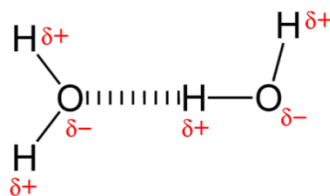
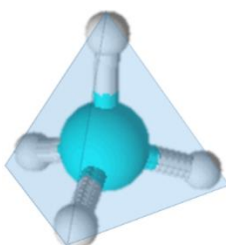
**Fig. 1:** Estrutura molecular da água inserida em uma estrutura tetraédrica e fórmula estrutural da água com o valor do ângulo entre os hidrogênios que se desvia do valor esperado de  $109,5^\circ$  do carbono tetraédrico com hibridização  $sp^3$ .

Os átomos de hidrogênio na estrutura da água formam um ângulo de  $104,5^\circ$ , que difere do valor esperado de  $109,5^\circ$  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 éter dimetílico, metanol e difluoreto de oxigênio.

**Tabela 1: Ângulos de ligação entre os substituintes de diversos compostos.<sup>1</sup>**

Composto	Fórmula Molecular	Ângulo de ligação entre os substituintes
Éter Dimetílico	$\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{CH}_3$	111°
Metanol	$\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{H}$	107-109°
Água	$\text{H}-\text{O}-\text{H}$	104.5°
Difluoreto de oxigênio	$\text{F}-\text{O}-\text{F}$	103.8°

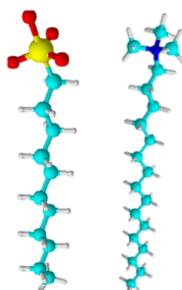
Em adição, as ligações O-H são polarizadas devido à alta eletronegatividade do oxigênio. Assim, um lado da molécula de água carrega uma carga parcial ( $\delta$ ) de -0,6 unidades e o outro lado é positivamente carregado de forma correspondente (Fig. 1). Essa separação espacial entre as cargas dá à molécula 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 ( $\text{CH}_4$ , 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 ebulição da água ao nível do mar (100°C) e do metano (-162°C).

**Fig. 2:** Representação de duas moléculas de água ligadas por ligações de hidrogênio.**Fig. 3:** Estrutura molecular do metano.

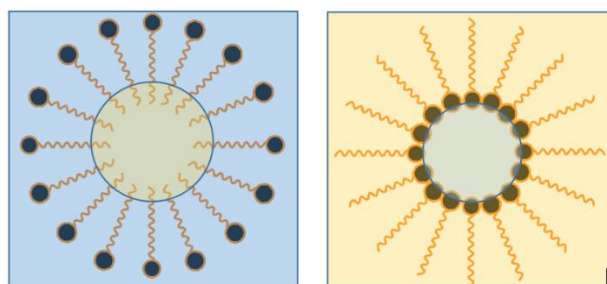
A polaridade da água a torna um excelente solvente para íons e um indutor da formação de agregados supramoleculares de moléculas surfactantes. Surfactantes com uma cauda apolar, como o

<sup>1</sup> 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.

dodecilsulfato de sódio (SDS, surfactante aniônico, Fig. 4) e o CTAB (brometo de N-cetil-N,N,N-trimetilamônio, 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).

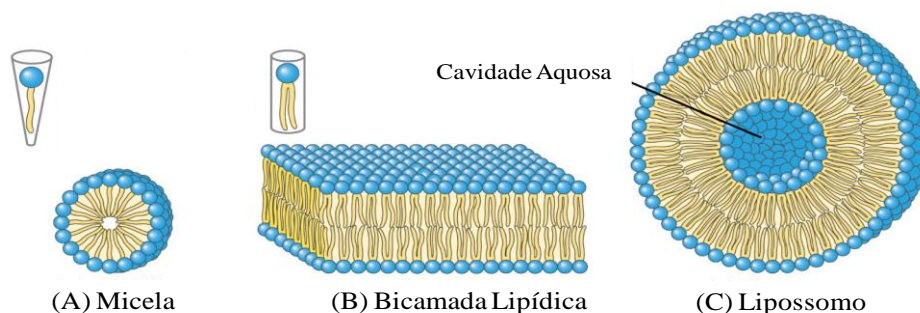


**Fig. 4:** Estruturas do SDS (esquerda) e CTAB (direita).



**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.

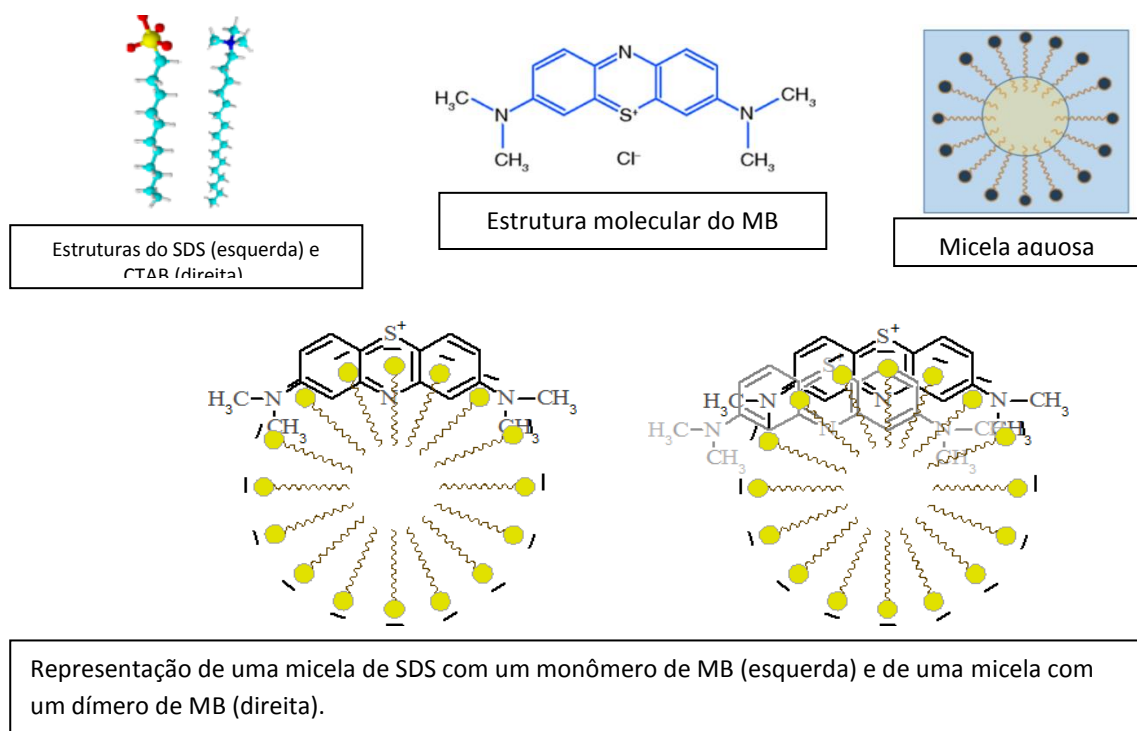
Surfactantes com duas caudas apolares tais como os fosfolípídios organizam-se em meio aquoso como bicamadas e formam vesículas uni ou multilamelares. O tipo de estrutura formada é determinado pela geometria da molécula do lipídio anfipático (Figura 6). Lipídios com uma única cadeia carbônica, como sabões 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:** 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.

As micelas e os lipossomos possuem a capacidade de sequestrar moléculas hidrofóbicas como o corante azul de metileno (MB) e modular o estado de agregação e as propriedades óticas do mesmo. 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 (aniônicos ou catiônicos) “aprisionam” moléculas de MB. As micelas de SDS, um detergente aniônico, 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.

## 1.2. 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.

### 1.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Entender o funcionamento e desenvolver a habilidade no uso de micropipetas;



- b) Estudar a formação de micelas aquosas de surfactantes, influenciadas por alterações na força iônica do meio.
- c) Estudar 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.

### 1.3. MATERIAIS

- 10 tubos de ensaio por grupo para a Parte 1 (identificar como 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 1B, 2B, 3B, 4B e 5B , conforme a Tabela 1)
- 4 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 béquer 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-ammoniumbromid /  $C_{19}H_{42}BrN$  ,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  $\mu$ mol/L.
- Água deionizada
- Agitador Vórtex

### 1.4. PROCEDIMENTO

Para as pipetagens SEMPRE 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.

#### 1.4.1. Parte 1

- a) 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.

- b) Nos tubos de 1A a 5A e de 1B a 5B, coloque os respectivos volumes de água deionizada recomendados para cada tubo, conforme Tabela 2.
- c) Em seguida adicione os volumes de solução estoque de **NaCl**, 0, 35, 175 e 350  $\mu\text{L}$  respectivamente nos tubos **2B a 5B**.
- d) 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 mM. Após a adição do detergente em todos os tubos, agitar individualmente, manualmente e depois no agitador Vórtex, e observar a formação de espuma (vide Fig. 8). Anotar (Tabela 2) e fotografar por grupo (A e B).

**Tabela 2:** Volumes em  $\mu\text{L}$  de adição referentes à Parte I do experimento 1 – Água.

Amostra Reagente	A (Sem sal)					B (Com sal)				
	1A (controle)	2A	3A	4A	5A	1B (controle)	2B	3B	4B	5B
<b>Água</b>	2000 $\mu\text{L}$	1200 $\mu\text{L}$	1600 $\mu\text{L}$	1800 $\mu\text{L}$	1925 $\mu\text{L}$	2000 $\mu\text{L}$	1200 $\mu\text{L}$	1565 $\mu\text{L}$	1625 $\mu\text{L}$	1575 $\mu\text{L}$
<b>Solução NaCl (concentração)</b>	-	-	-	-	-	-	0	35 $\mu\text{L}$ (20 mM)	175 $\mu\text{L}$ (100 mM)	350 $\mu\text{L}$ (200 mM)
<b>Surfactante SDS (concentração)</b>	0 (0)	800 $\mu\text{L}$ (16 mM)	400 $\mu\text{L}$ (8 mM)	200 $\mu\text{L}$ (4 mM)	75 $\mu\text{L}$ (1,5 mM)	0 (0)	800 $\mu\text{L}$ (16 mM)	400 $\mu\text{L}$ (8 mM)	200 $\mu\text{L}$ (4 mM)	75 $\mu\text{L}$ (1,5 mM)
<b>Formação de espuma</b>										

#### 1.4.2. Parte 2

(A turma deverá ser dividida em 6 grupos e cada grupo deverá preparar somente as soluções relacionadas ao seu índice em negrito conforme Tabela 3: **1<sub>SDS</sub>**, **1<sub>CTAB</sub>**, **2<sub>SDS</sub>**, **2<sub>CTAB</sub>**, **3<sub>SDS</sub>**, **3<sub>CTAB</sub>**)

- a) Nos microtubos *Eppendorf*®, prepare soluções com concentrações finais de SDS de zero, 1,5 e 16 mM e de CTAB com zero, 0,75 e 8 mM, nos volumes indicados na Tabela 3 referente ao seu grupo, identificando-os respectivamente como **1<sub>SDS</sub>**, **1<sub>CTAB</sub>**, **2<sub>SDS</sub>**, **2<sub>CTAB</sub>**, **3<sub>SDS</sub>**, **3<sub>CTAB</sub>** e o nome do grupo.
- b) Em seguida, adicione a solução de azul de metileno (MB) nos Eppendorfs®, de acordo com o indicado para seu grupo: **1<sub>SDS</sub>** e **1<sub>CTAB</sub>** MB 5  $\mu\text{M}$ , **2<sub>SDS</sub>** e **2<sub>CTAB</sub>** MB 50  $\mu\text{M}$  e **3<sub>SDS</sub>** e **3<sub>CTAB</sub>** MB 150  $\mu\text{M}$ . (**Atenção para os volumes indicados para o seu grupo!**)
- c) Observe a coloração das soluções e fotografe na ordem 1, 2 e 3.

**Tabela 3:** Volumes de adição referentes à Parte II.

<b>Grupo 1 – MB 5 µM</b>						
Amostra Reagente	SDS ( <b>1<sub>SDS</sub></b> )			CTAB ( <b>1<sub>CTAB</sub></b> )		
	1 <sub>SDS</sub> 1	1 <sub>SDS</sub> 2 (1.5 mM)	1 <sub>SDS</sub> 3 (16 mM)	1 <sub>CTAB</sub> 1	1 <sub>CTAB</sub> 2 (0,75mM)	1 <sub>CTAB</sub> 3 (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

<b>Grupo 2 –MB 50 µM</b>						
Amostra Reagente	SDS ( <b>2<sub>SDS</sub></b> )			CTAB ( <b>2<sub>CTAB</sub></b> )		
	2 <sub>SDS</sub> 1	2 <sub>SDS</sub> 2 (1.5 mM)	2 <sub>SDS</sub> 3 (16 mM)	2 <sub>CTAB</sub> 1	2 <sub>CTAB</sub> 2 (0,75mM)	2 <sub>CTAB</sub> 3 (8 mM)
Água	1800 µL	1705 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

<b>Grupo 3 – MB 150 µM</b>						
Amostra Reagente	SDS ( <b>3<sub>SDS</sub></b> )			CTAB ( <b>3<sub>CTAB</sub></b> )		
	3 <sub>SDS</sub> 1	3 <sub>SDS</sub> 2 (1.5 mM)	3 <sub>SDS</sub> 3 (16 mM)	3 <sub>CTAB</sub> 1	3 <sub>CTAB</sub> 2 (0,75mM)	3 <sub>CTAB</sub> 3 (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

### 1.5. ANÁLISE DOS DADOS

As anotações e fotos de cada grupo 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 pesquisar a estrutura do MB e compartilhar as fotos e as observações dos grupos A, B e C, indique e explique qual (quais) ficaram com a coloração ciano ou royal em todas as condições (presença ou não de surfactante e tipo de surfactante). Fundamente sua discussão com base na hidrofobicidade.

**REFERÊNCIAS**

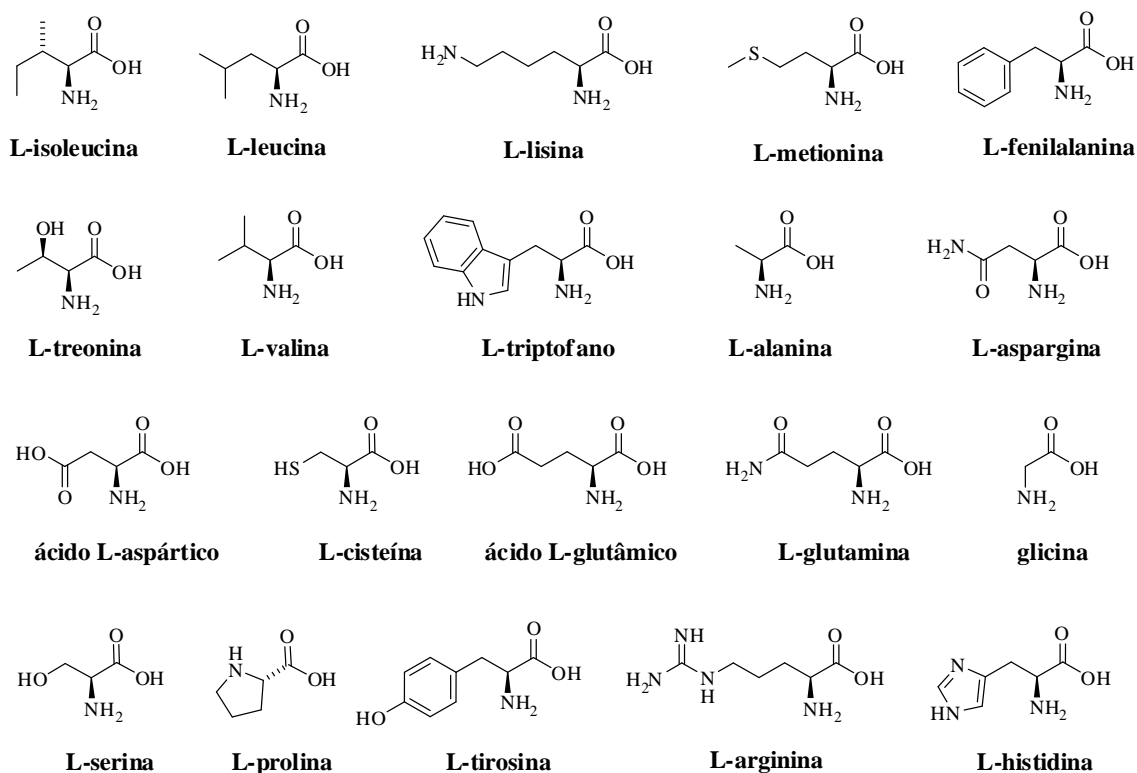
- KOOLMAN, J.; ROEHM, K. H. Color Atlas of Biochemistry 2012, 3rd.
- JUNQUEIRA, H.C., SEVERINO, D., DIAS, L. G., GUGLIOTTI, M. S. and. BAPTISTA, M. S. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.*(4) 2320–2328, 2002.
- VOET, D.; VOET, J.G. Bioquímica. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, 1596 p.
- H. A. Bent. *Chem Rev.* 61, 275-311 (1961).
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

## PRÁTICA 2: AMINOÁCIDOS: ESTUDO DA ESTRUTURA E PROPRIEDADES ÁCIDO-BASE.

### 2.1. INTRODUÇÃO

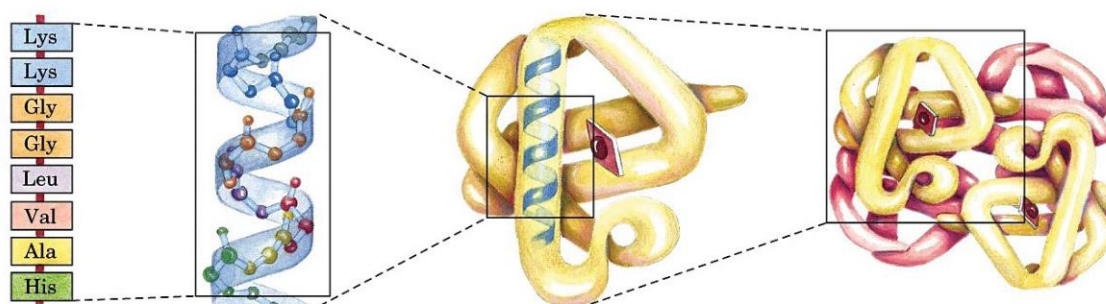
Em química, um aminoácido é qualquer molécula que contém simultaneamente grupos funcionais amina e ácido carboxílico. Em bioquímica, este termo é usado como termo curto e geral para referir os  $\alpha$ -aminoácidos, ou seja, ácidos carboxílicos em que as funções amino estão ligadas ao carbono  $\alpha$  (ou carbono 2 em relação à carboxila). Dentre os cerca de 200 a 300 aminoácidos existentes na natureza, somente 21 podem ser metabolizados pelo organismo humano, sendo 20 aqueles que geralmente constituem as proteínas. Dentre estes, 8 são chamados aminoácidos essenciais, isto é, não podem ser sintetizados pelo organismo humano, e precisam ser obtidos através de alimentos de origem animal ou vegetal. Os outros 12 aminoácidos que geralmente constituem as proteínas são produzidos por grande parte dos organismos superiores e são chamados não essenciais.

O aminoácido mais simples é a glicina (Figura 1), que possui apenas um átomo de hidrogênio em sua cadeia lateral. A alanina vem a seguir, com um grupamento metila. Cadeias laterais hidrocarbônicas 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 metileno. 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 metileno. 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”.



**Figura 1.** Estrutura dos 20 L-aminoácidos encontrados em proteínas.

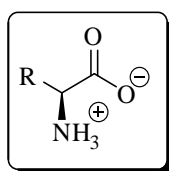
Existem dois aminoácidos com cadeias laterais ácidas, o ácido aspártico e o ácido glutâmico. Esses aminoácidos são geralmente chamados de aspartato e glutamato para salientar que suas cadeias laterais têm, quase sempre, cargas negativas no pH fisiológico. A glutamina e a asparagina são derivados não carregados de glutamato e aspartato que contêm uma amida terminal em vez de um carboxilato. Sete dos vinte aminoácidos têm cadeias laterais facilmente ionizáveis. Um átomo de enxofre está presente nas cadeias laterais de dois aminoácidos. A cisteína contém uma sulfidril (-SH) e a metionina possui um átomo de enxofre em uma ligação tioéter (-S-CH<sub>3</sub>). 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) e da glicina que não possui centro quiral (Figura 1); ainda, todos os aminoácidos comuns em proteínas são frequentemente 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.



**Figura 2.** Esquema representativo dos diferentes níveis de estrutura proteica da hemoglobina (LEHNINGER, NELSON & COX, 2006).

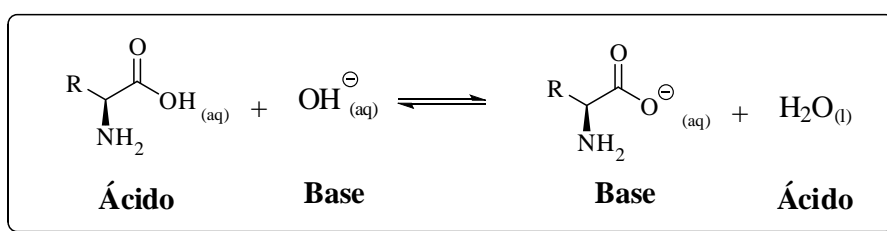
### 2.1.1. Propriedades ácido-base dos aminoácidos

No organismo, os aminoácidos existem na forma de “zwitterion”, ou seja, compostos com cargas positivas e negativas totalizando uma carga nula (Figura 3).

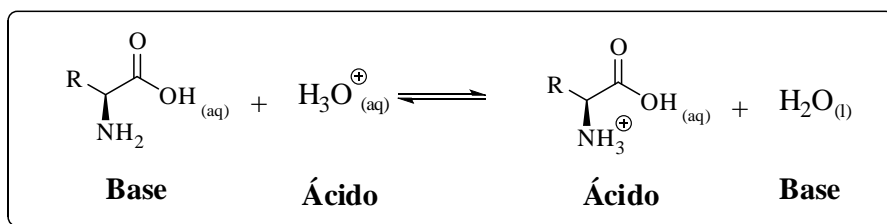


**Figura 3.** Estrutura de um aminoácido na forma de “zwitterion”.

Quimicamente, os aminoácidos podem ser considerados como compostos anfotéricos uma vez que podem atuar como ácidos na presença de bases (Equação 1) ou como bases na presença de ácidos (Equação 2), seguindo a definição de Brönsted.

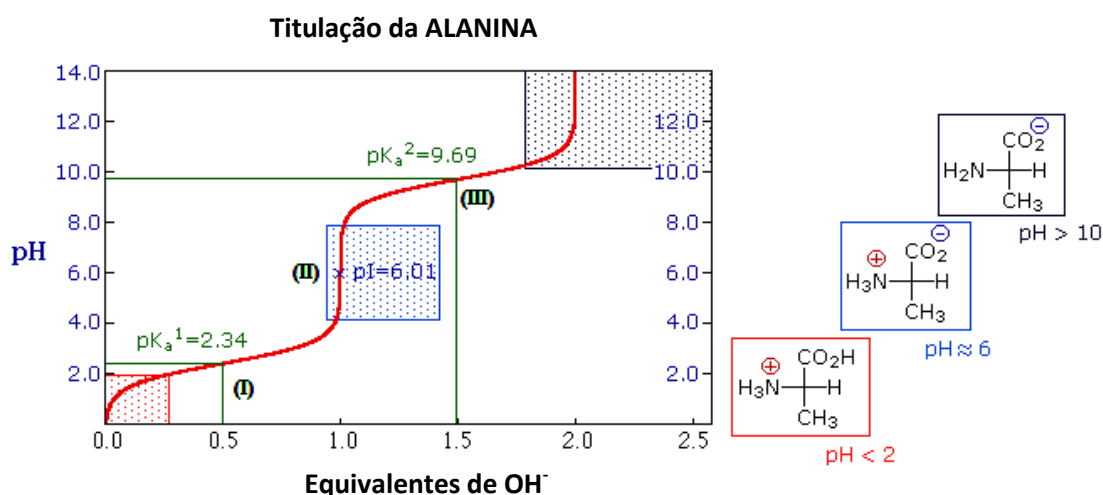


**Equação 1.** Aminoácido atuando como ácido.



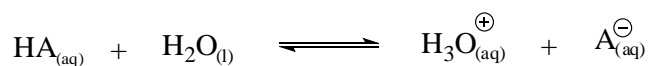
**Equação 2.** Aminoácido atuando como base.

Um estudo destas propriedades ácido-base pode ser realizado utilizando-se titulações partindo-se de aminoácidos contidos em soluções ácidas (com seus grupamentos amino completamente protonados). Nestes casos, quando se adiciona base ( $\text{OH}^-$ ) na solução, o pH aumenta gradativamente, sendo possível monitorar o seu valor em função das quantidades adicionadas pelo uso de pHmetros ou papel de indicador universal (0-14 unidades). Se forem lançados em gráfico o volume ou número de mols de base ( $\text{OH}^-$ ) em função do pH da mistura resultante, é possível obter algumas das propriedades intrínsecas dos aminoácidos como o  $\text{pK}_a$  (logaritmo negativo da constante de ionização) e pI (ponto isoelétrico – logaritmo negativo do pH em que os aminoácidos estão completamente na forma de “zwitterion”) (Figura 4).



**Figura 4.** Curva de Titulação da Alanina.

De uma maneira geral, quando consideramos um ácido do tipo HA ionizado em solução aquosa (Equação 3), podemos escrever a seguinte equação para descrever o pH do meio (Equação 4 – Equação de Henderson-Hasselbach):



**Equação 3.** Ácido de Brønsted em equilíbrio aquoso.

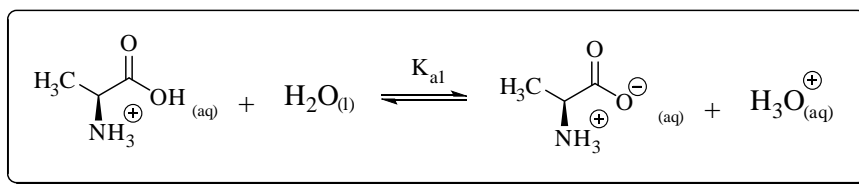
$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left( \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}\right)$$

**Equação 4.** Equação de Henderson-Hasselbach.

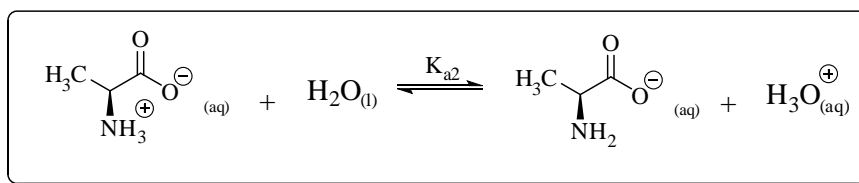


Uma análise simples da equação de Henderson–Hasselbach pode fornecer o  $pK_a$  de um determinado ácido de Brönsted. Se o termo logarítmico da *Equação 4* for igual a 0 (zero), ou seja, quando as  $[HA]$  e  $[A^-]$  são idênticas no equilíbrio, teremos que o pH do meio é igual ao  $pK_a$  ( $pH = pK_a$ ).

Tomando como exemplo o aminoácido alanina (Figura 4), pode-se verificar experimentalmente que durante sua titulação com base surge um primeiro ponto de inflexão na curva (ponto (I),  $pK_{a1}$ ) onde as variações de pH do meio são muito pequenas em função das adições de base. Assim, pode-se dizer que as concentrações relativas das espécies em equilíbrio  $[A^-]/[HA]$  (no caso, considere as duas espécies de aminoácidos da *Equação 5*) não variam significativamente nas imediações deste ponto porque o sistema está tamponado. O ponto de inflexão (II) é obtido numa faixa muito pequena da variação da quantidade de base adicionada, caracterizando o ponto de viragem na titulação da função ácido carboxílico (função mais acídica) e neste caso o pI (ponto isoelétrico). No ponto (III), de maneira similar ao que ocorre para o ponto (I), obtêm-se o  $pK_{a2}$  da função amina protonada. As *Equações 5 e 6* descrevem os equilíbrios das espécies químicas durante as titulações.



**Equação 5.** *Equilíbrio envolvido na primeira ionização.*



**Equação 6.** *Equilíbrio envolvido na segunda ionização.*

## 2.2. OBJETIVO GERAL

Este experimento didático tem como proposta fazer com que os estudantes tenham contato com os aspectos estruturais dos aminoácidos, estudem suas propriedades e diferenças estruturais e aprendam, por meio de titulação, as propriedades ácido-base das unidades monoméricas que constituem as proteínas. Do ponto de vista experimental, será utilizada a técnica de titulação ácido-base, que permitirá que o estudante correlacione diversas características estruturais destes compostos com seu comportamento químico compreendendo, assim, os conceitos teóricos.

### 2.2.1. Objetivos Específicos

- Determinar os valores de  $pK_a$  de aminoácidos por titulações ácido-base.
- Construir os gráficos e comparar os perfis das curvas, correlacionando os valores de  $pK_a$ .
- Estudos da estrutura de aminoácidos, equilíbrios químicos, solução tampão e reação ácido-base.

### 2.3. MATERIAIS

- pHmetro
- 1 bureta de 25 mL
- 1 proveta de 50 mL
- 2 béquer de 100 mL
- Soluções 0,001 mol/L do aminoácidos glutamato e histidina.
- Solução 0,125 mol/L de NaOH
- Solução 0,125 mol/L de HCl

### 2.4. PROCEDIMENTOS

Para as titulações, poderão ser utilizados vários aminoácidos, sendo recomendado didaticamente o uso de histidina e ácido glutâmico. Cada grupo fará duas titulações de **um aminoácido, uma com NaOH e outra com HCl**, e os resultados deverão ser compartilhados entre os grupos de modo que cada grupo possua resultados referentes às titulações dos aminoácidos.

- Transferir 50 mL de uma solução 0,01 mol/L da solução de aminoácido no béquer de 100 mL. Inserir o eletrodo do pHmetro (devidamente calibrado) no tubo, fazer a medida do pH e anotar o valor.
- Completar uma bureta de 25mL com solução de NaOH 0,125 mol/L, iniciar a titulação adicionando porções de 0,5 mL do titulante e medir o pH após cada adição. Agitar com cuidado a mistura titulada e então aferir o pH.
- Efetuar adições sucessivas até que o pH do meio apresente valor entre 12,0 a 13,5. Após isso, lave o eletrodo com água destilada e coloque-o imerso na solução tampão de armazenamento do eletrodo.
- Descartar a solução de NaOH da bureta e lavá-la com água destilada para iniciar a segunda titulação.

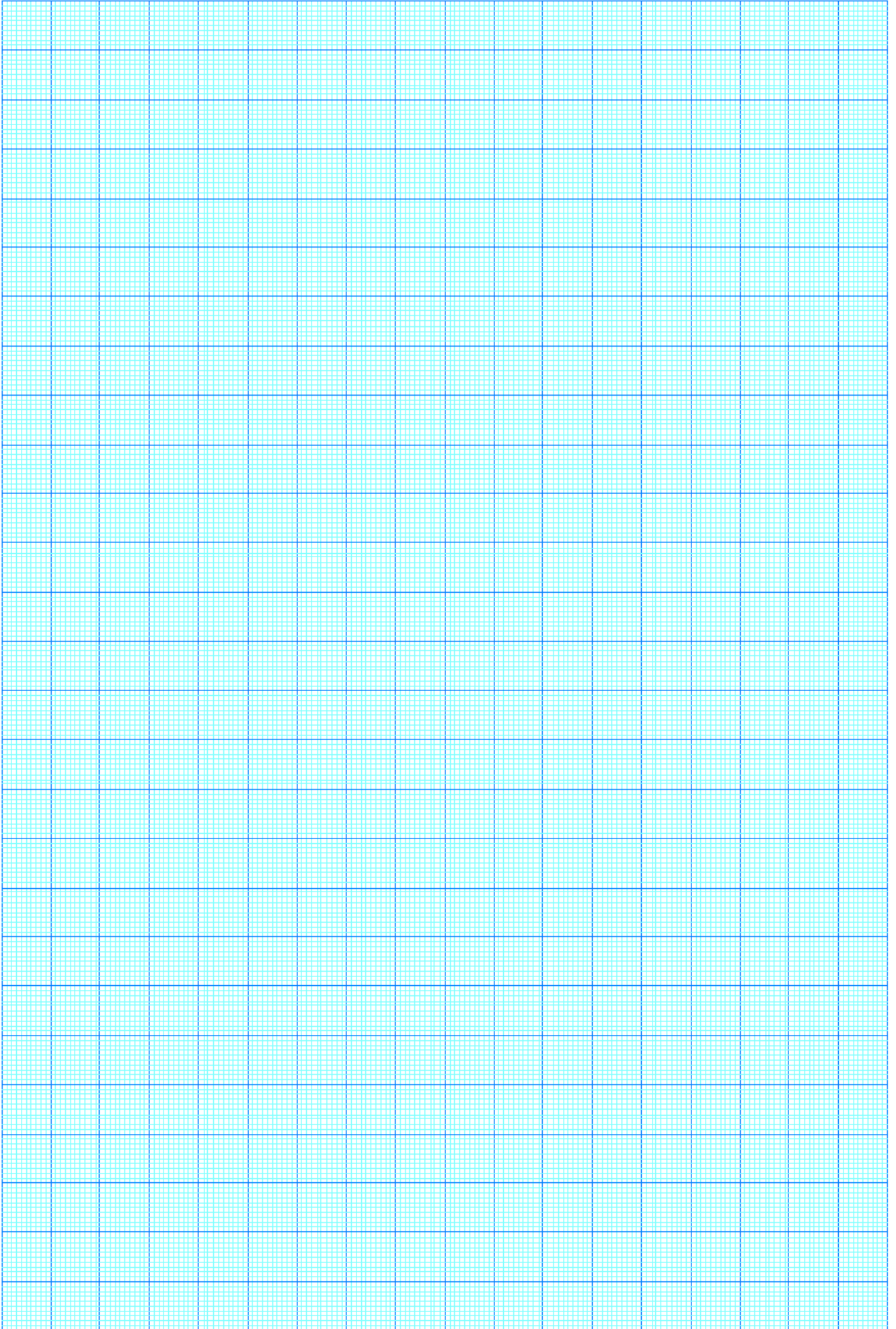
- e) Transferir 50 mL de uma solução 0,01 mol/L da solução de aminoácido no béquer de 100 mL. Inserir o eletrodo do pHmetro (devidamente calibrado) no tubo, fazer a medida do pH e anotar o valor.
- f) Completar uma bureta de 25mL com solução de HCl 0,125 mol/L, iniciar a titulação adicionando porções de 0,5 mL do titulante e medir o pH após cada adição. Agitar com cuidado a mistura titulada e então aferir o pH.
- g) Efetuar adições sucessivas até que o pH do meio apresente valor próximo à 1,3. Após isso, lave o eletrodo com água destilada e coloque-o imerso na solução tampão de armazenamento do eletrodo.

## 2.5. ANÁLISE DOS DADOS

1. Construir uma tabela contendo os valores de pH juntamente com os respectivos volumes de titulante adicionados para cada aminoácido titulado.
2. Expressar os dados graficamente em papel milimetrado, com os valores de pH (eixo y) em função dos volumes da solução titulante (eixo x).
3. Indicar nos gráficos os valores dos  $pK_a$  ( $pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$  e  $pK_{aR}$  se houver), o ponto isoelétrico (pI) e as zonas de tamponamento.
4. Comparar os valores de  $pK_a$  determinados experimentalmente com os valores da literatura.
5. Escrever as equações de equilíbrio das espécies químicas envolvidas nas titulações.

## REFERÊNCIAS

- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.
- VOET, D.; VOET, J.G. Bioquímica. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, 1596 p.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J.L; STRYER, L. Bioquímica, 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- KOOLMAN, J.; ROEHM, K. H. Color Atlas of Biochemistry 2012, 3rd Edition.

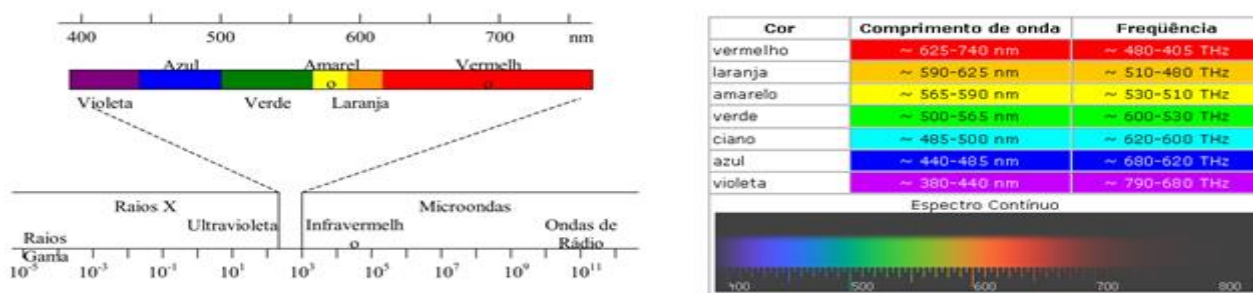


## PRÁTICA 3: ESPECTROFOTOMETRIA – CONCEITOS E APLICAÇÕES

### 3.1. 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 a 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  $\gamma$  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 (ultravioleta, UV) ou mais longos (infravermelho, IV) (Fig. 1).



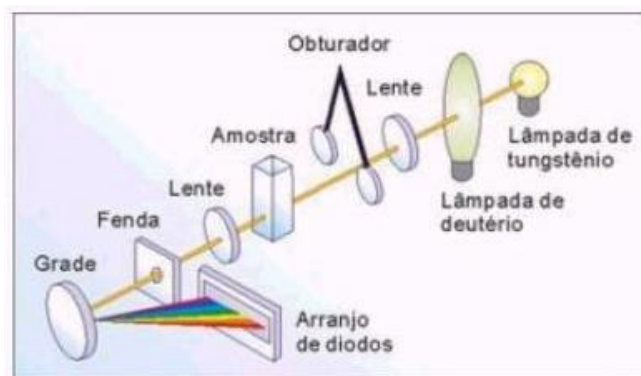
**Fig. 1.** Espectro eletromagnético evidenciando a faixa dos comprimentos de onda visíveis.

(Fonte: [http://www.arq.ufsc.br/labcon/arq5656/Curso\\_Iluminacao/07\\_cores/luz\\_01.htm](http://www.arq.ufsc.br/labcon/arq5656/Curso_Iluminacao/07_cores/luz_01.htm) e

[http://www.wordpress.com/2009/03/teoriadacor\\_01.jpg](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, e uma 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 (absorvância). 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-Beer (PUNGOR, 1995).

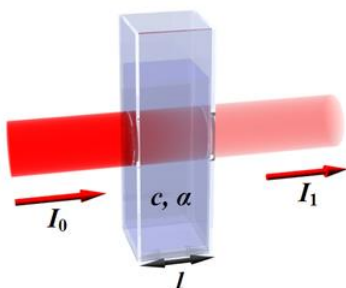


**Fig. 2.** Esquema óptico simplificado de um espectrofotômetro.

(fonte: <http://www.ufpa.br/ccen/quimica/espect2.jpg>)

### 3.1.1. 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*).



$$T = \frac{I_1}{I_0}$$

**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](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*:

$$A = a.b.c$$

onde  $A$  = absorbância,  $a$  = 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  $b = 1$  cm (geralmente é) e  $c$  é expresso em  $\text{mol.L}^{-1}$ , a constante  $a$  pode ser chamada de absortividade ou coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ , épsilon, unidade =  $\text{cm}^{-1} \cdot \text{L.mol}^{-1}$ ) 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 determinada 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 em determinado comprimento de onda. Posteriormente, essa absortividade pode ser utilizada para quantificação dessa substância em uma solução, cuja concentração é desconhecida (VOET & VOET, 2006).

### 3.2. 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 metileno e assim, entender que a espectroscopia de absorbância também fornece informações qualitativas a respeito das moléculas.

#### 3.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o espectro de varredura da 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  $\text{Cu}^{2+}$  presentes no reagente de Biureto e as proteínas.
- 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 molar dos cromóforos para aplicação da Lei de Lambert-Beer na quantificação das substâncias.

- c) Calcular a concentração de uma solução de albumina e dessa solução acrescida de biureto.
- d) 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.

### 3.3. MATERIAIS

- Soluções-padrão de albumina bovina (BSA) com concentração de 20, 40, 60, 80, 140, 160, 180 e 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .
- Solução-problema com concentração desconhecida.
- Reagente de Biureto
- $\text{H}_2\text{O}$  destilada
- 1 unidade de micropipeta automática de volume variável por grupo ( P10, P100, P200, P1000)
- Ponteiras para micropipetas
- Estante com 10 tubos de ensaio
- Espectrofotômetros (de Varredura e de bancada)
- Cubetas de quartzo caminho óptico 1 cm para análise de UV.
- Cubetas de plástico de caminho óptico 1 cm para análise no visível.
- Papel absorvente macio para limpeza das cubetas

As soluções de albumina e a solução de Biureto a serem utilizadas deverão ser previamente preparadas pelos colaboradores da disciplina. A concentração desconhecida da solução de BSA deverá estar dentro do intervalo das concentrações de 80 a 140  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , apresentadas na Tabela 3, evitando-se as extremidades desse. A massa de BSA utilizada para o preparo de 1mL de solução deverá estar informada no recipiente para que ao final do experimento os estudantes possam conferir a exatidão da concentração desejada. As soluções devem ser preparadas com o maior rigor possível a fim de garantir a exatidão da concentração desejada.

O reagente de Biureto é composto por  $\text{CuSO}_4$  0,15 % (m/v), tartarato de sódio e potássio 0,6 % (m/v) e  $\text{NaOH}$  0,75  $\text{mol.L}^{-1}$ . 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  $\text{CuSO}_4$  para 100 mL de solução.



### 3.4.1. Parte 1: Medidas quantitativas obtidas pela Espectrofotometria UV da Albumina

Nesses experimentos determinaremos a concentração de uma solução de albumina por dois métodos de forma comparativa: diretamente pela absorbância de seus aminoácidos aromáticos e cistinas a 280 nm (método direto) e pela formação de complexos com  $\text{Cu}^{2+}$  presentes no reagente de biureto e que absorvem luz com máximo em 550 nm (método do Biureto).

Pelo **Método Direto**, 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) Aquisição do espectro da solução-problema de BSA: coloque 2 mL da solução de BSA de concentração desconhecida na cubeta de caminho óptico 1 cm e faça a aquisição do espectro **em ESPECTROFOTÔMETRO DE VARREDURA**, na região espectral de 240 a 320 nm, com 1 nm de intervalo de onda. **NÃO ESQUECER de fazer o “branco”**, isto é, a aquisição de um espectro com água no lugar da amostra, antes do início da leitura da solução-problema de BSA.

**Observação:** Esse procedimento deverá ser realizado por um colaborador da disciplina e acompanhado pelos estudantes. Dividir a turma em dois ou três grupos, dependendo do número de alunos. O arquivo deverá ser identificado como BSA e ser disponibilizado posteriormente para os alunos. Os alunos deverão anotar o valor da massa de BSA usada para o preparo da solução-problema, informada no recipiente da solução.

#### 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  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (eixo x). A partir desse gráfico determine o valor de  $\epsilon$  em 280 nm (contribuição conjunta dos aminoácidos aromáticos).

Concentração albumina ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	Concentração albumina ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	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  $\epsilon$  em 280 nm obtido (coeficiente angular), calcule a concentração de albumina nessa solução problema, aplicando a equação de Lambert-Beer  $A = \epsilon.C.l$ .

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 absortividade molar ( $\epsilon$ ) 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.

### 3.4.2. Parte 2: Medidas quantitativas obtidas pela Espectrofotometria Visível da Albumina-Biureto

O **Método do Biureto** 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.

- Para obtenção da curva padrão de albumina-Biureto, identifique os tubos de ensaio com os valores das concentrações das soluções-padrão de albumina fornecidas, inclusive a

desconhecida e o “branco”. Coloque 0,5 mL de solução de cada concentração em seu respectivo tubo e acrescente 1 mL de água destilada. Após agitação manual delicada, adicionar 1,5 mL do reagente de Biureto e tornar a agitar. Após 5 minutos, no ESPECTROFOTÔMETRO DE BANCADA, fazer a leitura da absorbância de cada solução no  $\lambda$  de 550 nm, em ordem crescente de concentração e lendo a amostra desconhecida após a concentração de  $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (20, 40, 60, 80, desconhecida, 140, 160, 180, 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).

- b) **ATENÇÃO**, obter o “branco” com uma solução de água+biureto ( 1,5 mL de água destilada + 1,5 mL de Biureto ) e fazer a leitura da absorbância dessa solução **no início** da série de leituras espectrais.
- c) Anote atentamente o valor de absorbância de cada solução na tabela abaixo.

**Tabela 1** - Valores de absorbância das diversas soluções de água+biureto

<b>Padrão de albumina (<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Padrão de albumina (<math>\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Absorbância em 550 nm</b>
<b>0</b>		
<b>20</b>		
<b>40</b>		
<b>60</b>		
<b>80</b>		
<b>100</b>		
<b>120</b>		
<b>140</b>		
<b>160</b>		
<b>180</b>		
<b>200</b>		
<b>Amostra Desconhecida</b>		

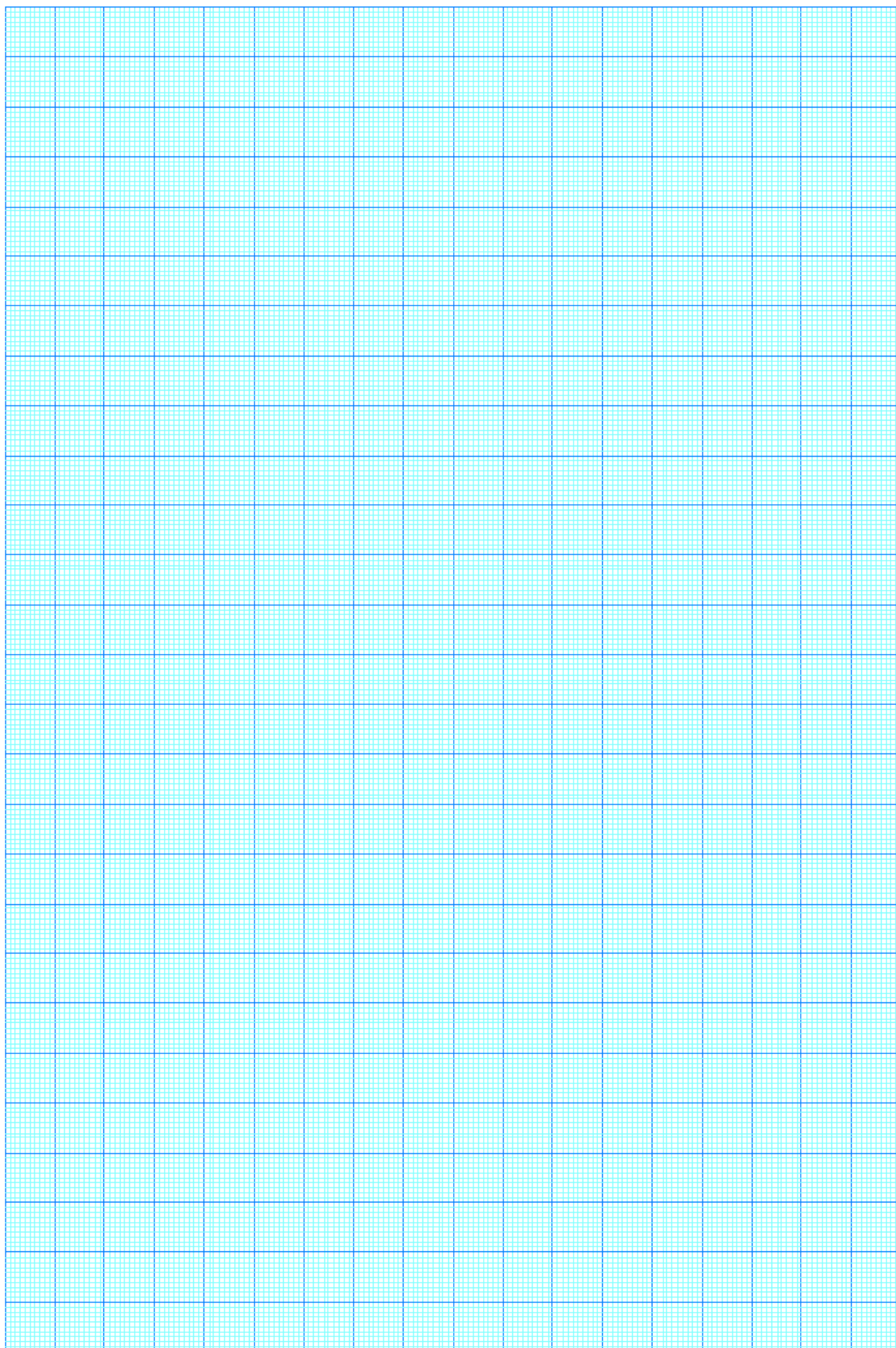
### Análise dos dados

1. Plotar as absorbâncias das soluções padrão em função da concentração e calcular a absortividade.
2. Determinar a concentração da amostra desconhecida.
3. Descrever o princípio do método de Biureto para a dosagem de proteínas, relacionando suas vantagens e desvantagens em relação a outros métodos para dosagem de proteínas.

### Leituras complementares

ALMEIDA, V.V., CANESIN, E.A., SUZUKI, R.M., PALIOTO, G.F. Análise qualitativa de proteínas em alimentos por meio de reação de complexação do íon cúprico. *Química Nova na Escola*, v.35, n.1, p.34-40, Fev/2013.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, v.21, n.6, p.787-793, 1998.



## **PRÁTICA 4: DESNATURAÇÃO PROTEICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

### **4.1. INTRODUÇÃO**

Enzimas proteolíticas ou proteases 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), cisteína- (EC 3.4.22), aspártico-proteinases ou endopeptidases (EC 3.4.23) e metaloproteinases ou metaloendopeptidases (EC 3.4.24). As enzimas cujo mecanismo de ação não está completamente elucidado são classificadas no subgrupo EC. 3.4.99.

#### **4.1.1. 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).

#### **4.1.2. 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 metaloendopeptidases. 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.

#### **4.1.3. 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 farmacologicamente 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 nutrição.

#### **4.1.4. 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 tradicionais (YOUNG et al, 2005).

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 respectivamente (YOUNG et al, 2005).

## 4.2. OBJETIVO GERAL

Este experimento didático tem como proposta fazer com que os estudantes entendam como a estrutura tridimensional proteica pode ser alterada física e quimicamente, bem como observem a ação de uma enzima proteolítica.

### 4.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estudar os efeitos da desnaturação proteica causada por temperatura;
- b) Avaliar os efeitos de álcool e sais sobre a solubilidade de uma solução de gelatina;
- c) Demonstrar a atividade proteolítica presente no suco de abacaxi.

## 4.3. MATERIAIS

- 8 tubos de ensaio de 20 mL
- 1 tubo de ensaio de 30 mL
- Estante para tubos de ensaio
- Béquer de vidro de 100 mL (para aquecer água)
- Béquer de 25 ou 50 mL (para água destilada)
- Funil de vidro pequeno e gaze, tesoura para cortar o papel de filtro
- Recipiente com gelo
- Almofariz e pistilo
- Solução de sulfato de amônio 3 mol/L
- Abacaxi maduro (1 fatia média)
- Água destilada
- Pipetadores automáticos de 1 mL e ponteiras, ou pipetas de vidro de 5mL
- Faca ou estilete
- 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
- papel alumínio para pesagem da gelatina
- Etanol absoluto ou comercial 99,3° INPM
- Gelatina incolor e sem sabor

## 4.4. PROCEDIMENTO

### 4.4.1. Efeitos da Adição de Sal de Amônio ou Etanol sobre a Solubilidade de Proteínas.

Pipetar nos tubos de ensaio de 20 mL os reagentes conforme a Tabela 1, realizar o experimento em temperatura ambiente ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ). Observar e anotar o resultado para posterior discussão.

**Tabela 1.** *Resumo do procedimento experimental.*

	<b>Tubo 1</b>	<b>Tubo 2</b>	<b>Tubo 3</b>
<b>Água</b>	2,0 mL	-	-
<b>Sulfato de amônio</b>	-	2,0 mL	-
<b>Etanol Absoluto</b>	-	-	2,0 mL
<b>Gelatina</b>	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL

### 4.4.2. Atividade enzimática do suco de abacaxi e desnaturação proteica por aquecimento.

#### 4.4.2.1. Extração do suco de abacaxi

- Cortar a fatia de abacaxi em pedaços pequenos e macerá-la, utilizando-se almofariz e pistilo, para extração do suco.
- Filtrar o suco utilizando funil de vidro, fixo em argola presa à suporte universal, e gaze para um tubo de ensaio de 20 mL.
- Manter o tubo de ensaio contendo o filtrado em gelo.

#### 4.4.2.2. Preparo da gelatina

- Pesar em papel alumínio 2 g de gelatina incolor e sem sabor de qualquer marca comercialmente disponível.
- Adicionar a gelatina a um béquer de 50 mL contendo 20 mL de água destilada aquecida a  $60^{\circ}\text{C}$ .
- Mexer com bastão de vidro até a total solubilização.
- Após solubilização transferir para um tubo de ensaio.
- Manter esse tubo em banho de  $60^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização.

#### 4.4.2.3. Ensaio

- Pipetar, conforme a Tabela 2, 2,0 mL de água no tubo 1 e 2,0 mL do extrato de abacaxi nos tubos 2, 3 e 4.
- Manter o tubo 2 deve ser mantido à temperatura ambiente, o tubo 3 aquecido à  $60^{\circ}\text{C}$  (banho de aquecimento) e o tubo 4 deve ser fervido por 5 minutos.



- c) Após este tempo de tratamento de cada uma das amostras, resfriar no gelo imediatamente por 1 minuto.
- d) Após o resfriamento das amostras fervidas, adicionar em todos os tubos 2 mL da solução de gelatina.
- e) Homogeneizar e incubar os tubos por 10 minutos a 37°C .
- f) Ao término da incubação, resfriar TODOS os tubos em gelo por 7 minutos, observar e anotar o resultado.

**Tabela 2.** *Resumo do procedimento experimental.*

	<b>Tubo 1</b>	<b>Tubo 2</b>	<b>Tubo 3</b>	<b>Tubo 4</b>
<b>Água</b>	2,0 mL	-	-	-
<b>Amostra Abacaxi</b>	-	2,0 mL	-	-
<b>Amostra Abacaxi 60°C</b>	-	-	2,0 mL	-
<b>Amostra Abacaxi Fervida</b>	-	-	-	2,0 mL
<b>Gelatina</b>	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL

### **Análise dos dados**

1. Preparar uma tabela indicando os resultados observados de cada experimento.
2. Tirar uma fotografia dos resultados para anexar ao caderno de laboratório como figura.
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. Pesquisar qual(is) protease(s) está(ão) presente(s) no suco de abacaxi.
  - 6.1 Como poderia ser realizada a purificação dessa(s) proteína(s)?
  - 6.2 A atividade das proteases pode ser otimizada? Como?
7. Discuta o efeito da temperatura sobre a desnaturação de proteínas no processo de cozimento dos alimentos. Qual a importância disso?
8. Por que se pode utilizar abacaxi para amaciar carnes? Qual a relação entre o suco do abacaxi e os amaciantes de carnes comerciais.

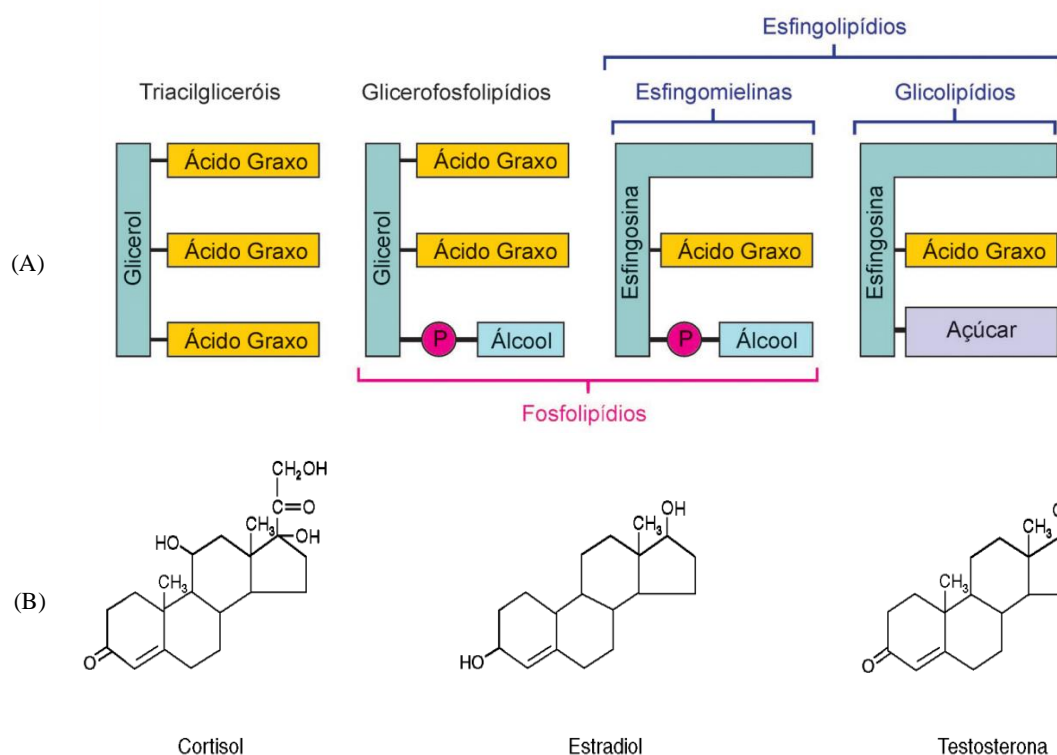
### **REFERÊNCIAS:**

- FRANCISCO JR., W.E., FRANCISCO, W. Proteínas: hidrólise, precipitação e um tema para o ensino de química. Química Nova na Escola, n.24, p.12-16, Nov./2006.
- YOUNG, S. et al. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. Journal of Controlled Release ,109, 256–274, 2005.

## PRÁTICA 5: PROPRIEDADES DE SURFACTANTES E LIPÍDEOS

### 5.1. INTRODUÇÃO

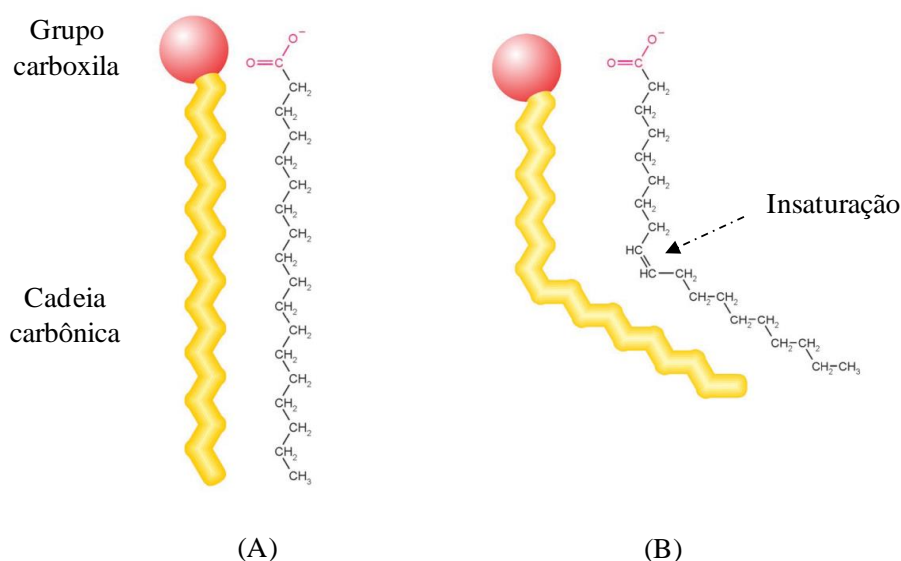
Os **lipídios** são representados por um grupo de biomoléculas baixa massa molecular que apresentam **estruturas químicas bastante variadas** esãoopraticamente **insolúveis em água**. A diversidade de estruturas apresentadas pelos lipídios faz com que esses compostos tenham a capacidade de exercer diversas 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).



**Figura 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.

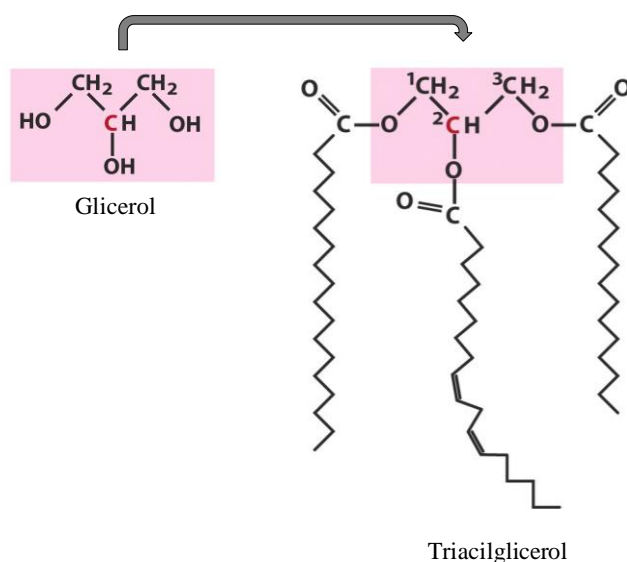
Tipicamente, os lipídios apresentam em suas estruturas longas cadeias carbônicas, como os **ácidos graxos** e **isoprenos**, ou múltiplos anéis interligados, como no caso dos **esteróides**. Várias classes de lipídios apresentam **ácidos graxos** como componentes estruturais. Ácidos graxos são ácidos 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.



**Figura 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 triglicerídeos, 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 (hidroxilas 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).



**Figura 3.** Triacilgliceróis 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, conseqüentemente, 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.

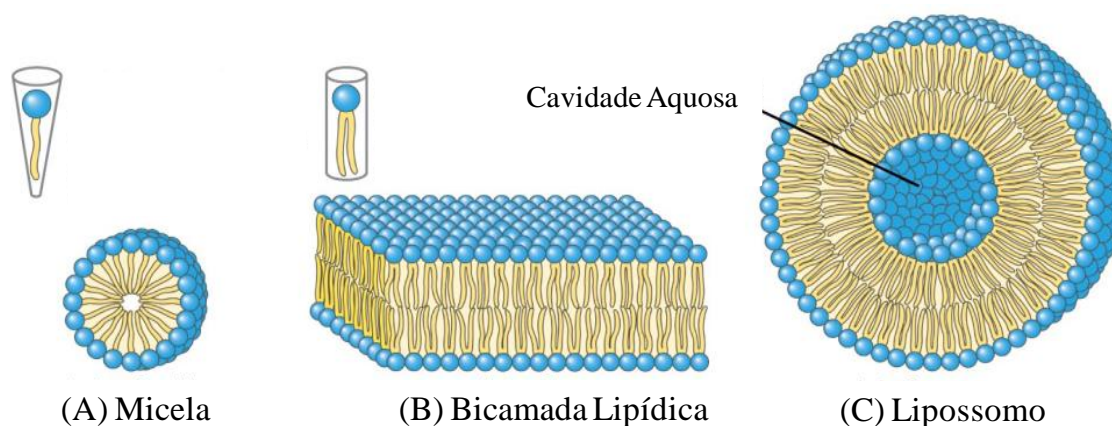
- ✓ **Ácidos graxos saturados** → Cadeia carbônica não apresentam ligações duplas entre os átomos de carbono e, assim, contem o número máximo possível de hidrogênios.
- ✓ **Ácidos graxos insaturados** → Cadeia carbônica possui uma ou mais ligações duplas entre átomos de carbono contendo o número máximo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



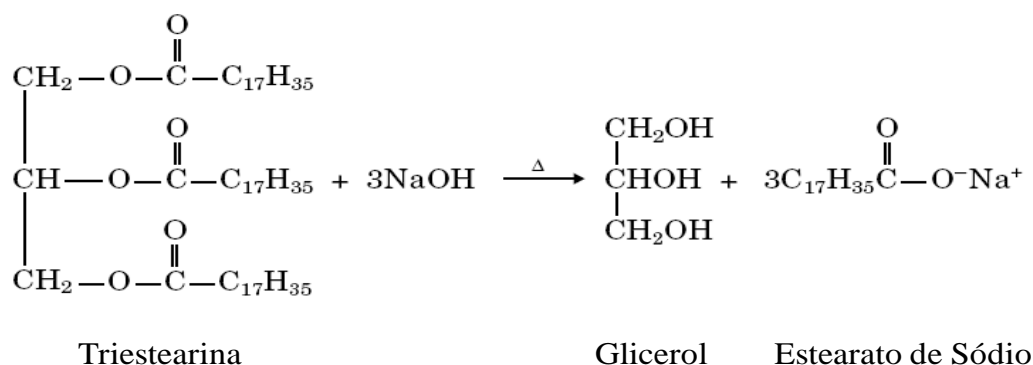
**Figura 4.** Estruturas formadas por lipídios anfipáticos em meio aquoso. (A) Micelas são formadas por moléculas de lipídios com uma única cadeia carbônica, cadeias estas que se localizam no interior dessas estruturas. (B) Bicamada lipídica é uma estrutura bidimensional na qual as cadeias carbônicas 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.

### 5.1.1. 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, são praticamente insolúveis em água enquanto apresentam alta solubilidade em solventes orgânicos como clorofórmio, éter, benzeno, mistura de Folch (clorofórmio:metanol), entre outros.

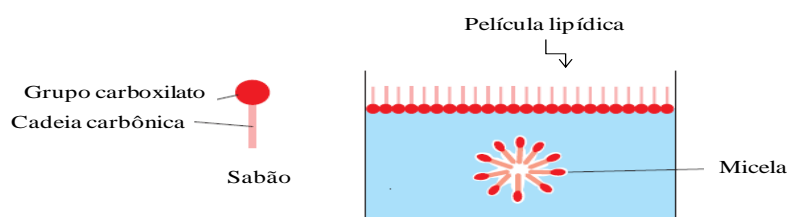
Os triacilgliceróis, que constituem o principal grupo de lipídios, podem ser hidrolisados liberando ácidos graxos e glicerol. Se esta hidrólise é feita mediante aquecimento em meio alcalino (hidrólise alcalina), formam-se sais de ácidos graxos (sabões) e o processo é chamado **saponificação**.

(Figura 5). Este é o princípio da fabricação dos sabões a partir de gordura animal fervida em presença de NaOH ou KOH.



**Figura 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).

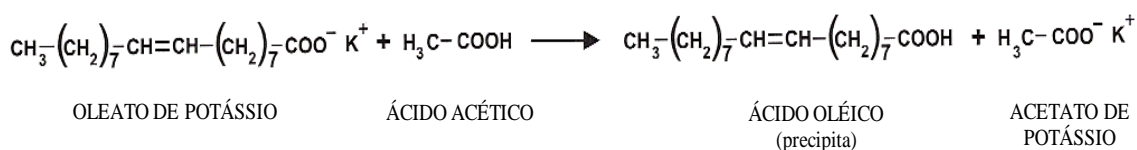
Assim como os ácidos graxos, os sabões são moléculas anfipáticas apresentando em sua estrutura uma longa cadeia carbônica (cauda apolar, lipofílica) e um grupo carboxilato (cabeça polar, hidrofílica). Dessa maneira, os sabões, quando em solução aquosa, associam-se por interações hidrofóbicas entre as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



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

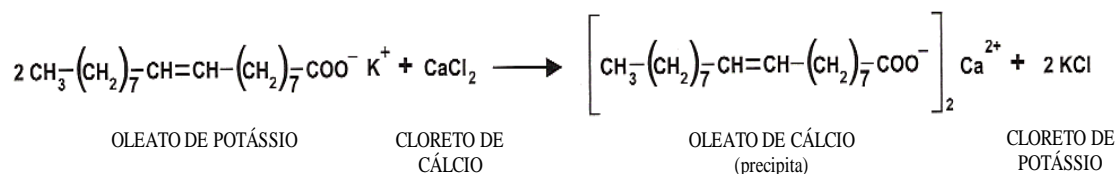
#### 5.1.1.1. Propriedades dos sabões

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).



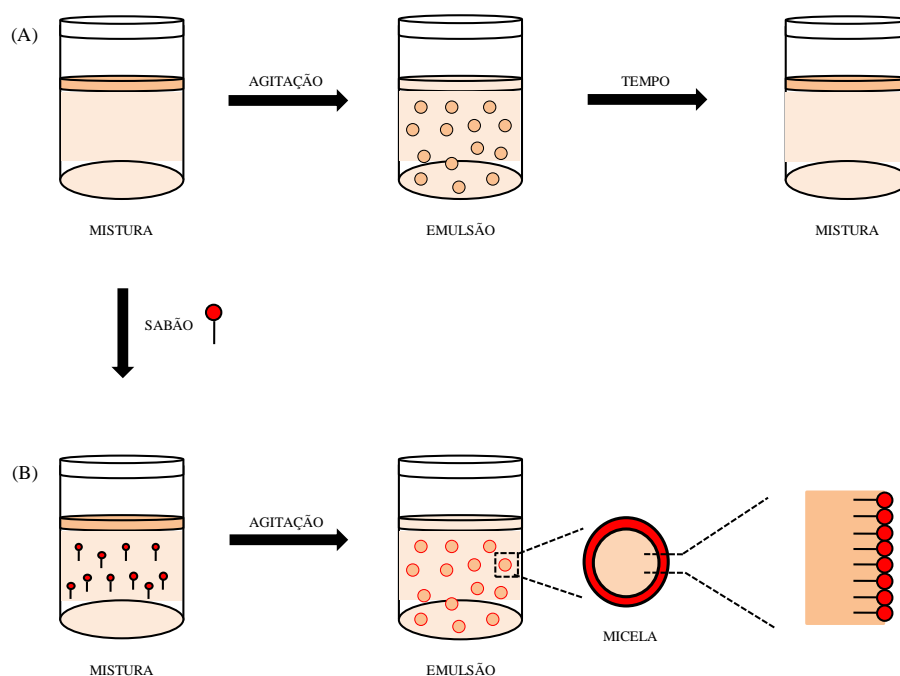
**Figura 7.** Precipitação de ácidos graxos a partir da hidrólise ácida de sabões. Em presença de ácido acético (ácido fraco), ácido oléico (ácido graxo) é precipitado a partir da hidrólise ácida do oleato de potássio (sabão).

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.



**Figura 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 sustentadas 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).



**Figura 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 hidrocarbônicas 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 nitroglicerina, 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.

## 5.2. OBJETIVO GERAL

Este experimento didático tem como proposta fazer com que os estudantes entendam as propriedades físico-químicas dos lipídeos relacionadas à sua estrutura e sua influência na formação de agregados supramoleculares de surfactantes.

### 5.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar o efeito da composição e do grau de insaturação dos ácidos graxos no ponto de fusão dos mesmos e das gorduras que integram.
- b) Verificar o efeito do pH na formação de agregados supramoleculares de surfactantes, no caso, sabão de coco fabricado a partir da hidrólise da gordura de coco (saponificação).

## 5.3. MATERIAIS

### *Parte I*

- 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 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



## ***Parte II***

- 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
- 3 tubos de ensaio por grupo
- Estante para tubos de ensaio
- Pipetador automático e ponteiros de 1000 e de 100  $\mu$ L
- Béquer pequeno

## **5.4. PROCEDIMENTO**

### ***5.4.1. Parte I***

- a) Pipetar 1 mL de cada óleo e colocar em tubos de ensaio separados.
- b) 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.
- c) 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.
- d) Numa segunda etapa, 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.
- e) Ligar o aquecimento somente após colocar os tubos de ensaio.
- f) Acompanhar, através do termômetro, a faixa de temperatura de fusão de cada lipídeo e anotar.
- g) Fotografar as amostras após todas atingirem o ponto de fusão.

### ***5.4.2. Parte II***

Pipetar 3 tubos de ensaio conforme a Tabela 1:

- a) Identificar e pipetar em 3 tubos de ensaio 1 mL da solução de sabão de coco fornecida e acrescentar 1 mL de água deionizada, conforme a Tabela 1.
- b) No tubo 2 acrescentar 100  $\mu$ L de HCl, observar e anotar a mudança ocorrida.
- c) No tubo 3 acrescentar 100  $\mu$ L de HCl, em seguida 50  $\mu$ L de NaOH e agitar suavemente misturando a solução.
- d) Observar a mudança ocorrida. Fotografe os 3 tubos juntos.

**Tabela 1:** Volumes de adição referentes à Parte II.

	Tubo de Ensaio		
	1 (controle)	2	3
<b>Solução de Sabão de Côco</b>	<b>1 mL</b>	<b>1 mL</b>	<b>1 mL</b>
<b>Água</b>	<b>1 mL</b>	<b>1 mL</b>	<b>1 mL</b>
<b>Solução de HCl 1M</b>	-	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>
<b>Solução de NaOH 10 M</b>	-	-	<b>50 µL</b>
<b>Aspecto da Solução (turvo, precipitado, límpido)</b>			

### 5.5. ANÁLISE DOS DADOS

- O que explica a ordem de fusão dos diferentes lipídeos concomitante com o aumento de temperatura?
- 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.
- O que explica as diferentes colorações dos lipídeos apresentados?
- Pesquise e indique de maneira sucinta os processos industriais de geração de gordura vegetal hidrogenada.
- Qual a natureza química do detergente do sabão de coco e como ele é produzido?
- Qual a organização supramolecular que o surfactante do sabão de coco forma em água?
- 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.

A tabela a seguir, baseada em ZAMBIAZI et al, 2007, indicam o total em ácidos graxos saturados e insaturados de 21 óleos e gorduras vegetais, avaliados por cromatografia a gás (GC-FID).

**Tabela 2:** Composição percentual de ácidos graxos em óleos vegetais.

Óleo	Total Ácidos Saturados	Total Ácidos Graxos Monoinsaturados	Total Ácidos graxos Poliinsaturados	Índice P/S
BOR	12,96	25,25	61,79	4,77
CAN	6,98	7,99	83,90	10,34
COC	90,6	7,51	1,80	0,02
COR	13,87	26,11	60,43	4,49
COT	25,73	17,11	70,97	5,95
CRN	13,46	64,42	28,60	4,10
EPR	8,11	17,49	56,78	2,20
FCO	8,15	22,04	69,81	6,56
OEV	12,98	77,44	9,58	0,74
OPR	13,53	75,37	11,10	0,82
ORF	15,28	77,00	7,72	0,50
PAL	49,45	39,66	10,83	0,22
PEA	18,38	50,33	31,29	1,70
PLK	80,34	16,90	2,76	0,03
RBO	20,68	41,41	37,91	1,83
RIO	18,22	44,51	37,27	2,04
SOY	15,10	21,73	63,17	4,18
SUN	12,36	24,76	61,37	4,42
SUR	11,92	15,93	71,71	5,80
SYB	15,12	23,92	60,64	4,01

BOR = borragem; CAN = canola; COC = coco; CRN / COR = milho; COT = algodão; EPR = prímula da noite; FCO = linhaça; OEV = oliva extra virgem; ORF = oliveira; PAL = palma; PEA = amendoim; PLK = palmiste; POR = bagaço de azeitona; RBO / RIO = farelo de arroz; SOY / SYB = soja; SUN / SUR = girassol.

## REFERÊNCIAS

- MERÇON, F. O que é uma gordura trans? *Química Nova na Escola*, v.32, n.2, p.78-83, Mai./2010.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger - Princípios de Bioquímica*. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.
- VOET, D.; VOET, J.G. *Bioquímica*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, 1596 p.
- 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.

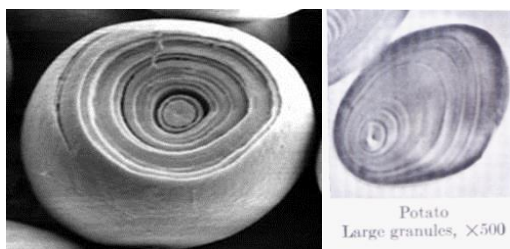
## PRÁTICA 6: CARBOIDRATOS: ESTRUTURA E PROPRIEDADES.

### 6.1. INTRODUÇÃO

O amido é um polissacarídeo que tem como função reserva energética na forma de carboidratos em plantas, que são consumidas por organismos heterotróficos como principal fonte de glicose para geração de ATP (NELSON, & COX, 2006). O amido constitui de 50% a 65% do peso das sementes de cereais secos, e até 80% da substância seca dos tubérculos. 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, etc (SUMERLY et al., 2002).

Embora a distribuição do amido seja ampla no reino vegetal, poucas plantas o produzem em grandes quantidades. 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 mandioca.

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 amido (Fig. 1).

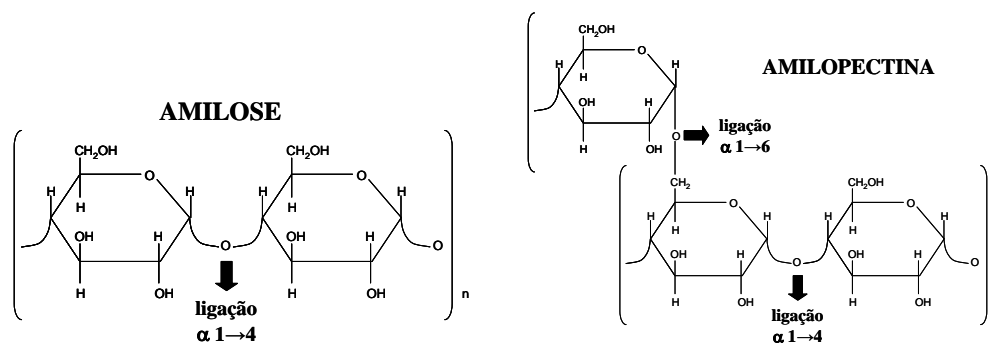


**Fig. 1.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) à esquerda e microscopia óptica à direita de um grânulo de amido.

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

Estruturalmente, o amido é classificado como um homopolissacarídeo, sendo que a hidrólise de suas ligações glicosídicas fornece unidades de glicose livres. Tal hidrólise pode ser química ou enzimática e a glicose formada que pode ter diversos destinos, variando desde uma aplicação biológica, sendo fundamental fonte de energia para as células vivas sendo convertida em ATP por reações catabólicas oxidativas, até aplicações biotecnológicas, servindo como fonte de carboidratos para reações fermentativas para produção de etanol em indústrias químicas, de alimentos, de bebidas ou de combustíveis (NELSON & COX, 2006).

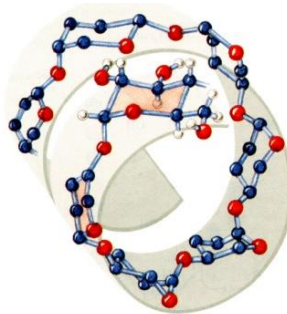
O amido é um polissacarídeo sintetizado pelos vegetais e tem a função de reserva energética, semelhante ao glicogênio nas células animais. Estruturalmente, o amido é formado pela mistura de dois polímeros, a amilose e a amilopectina, que são homopolissacarídeos constituídos por resíduos de  $\alpha$ -D-glicopirranose ligados entre si por ligações glicosídicas. 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  $\alpha$ -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).



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

A presença de vários grupos hidroxila na estrutura do amido confere à este uma natureza altamente hidrofílica. 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 desaparecem (CORRADINI et al, 2007).

Os tipos de ligações presentes na amilose e amilopectina forçam esses polímeros a adquirirem uma conformação espacial helicoidal (Fig. 3). Estas estruturas compactas produzem os grânulos densos de estocagem do amido, já mostrados na Fig. 1.



**Fig. 3.** *Representação da estrutura helicoidal de uma cadeia de amilose, polímero que compõe a estrutura do amido* (fonte: NELSON & COX, 2006).

O amido tem estrutura química muito parecida com o glicogênio, porém possui menos ramificações. 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  $\alpha$ -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 dextrinas.

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.

Diversos reagentes são utilizados para a análise de poder redutor em açúcares. Alguns desses métodos utilizam agentes oxidantes suaves, tais como íons férrico ( $Fe^{3+}$ ) e cúprico ( $Cu^{2+}$ ) em meio alcalino, fazendo detecção qualitativa. Métodos quantitativos utilizam técnicas espectrofotométricas, titulométricas ou gravimétricas (SILVA et al., 2003). Dissacarídeos ligados pelas suas hidroxilas redutores 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 outros.

## 6.2. OBJETIVO GERAL

Este experimento didático tem como proposta fazer com que os estudantes compreendam a aplicação dos conceitos teóricos adquiridos durante as aulas sobre a conformação espacial do amido.

### 6.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) extrair e purificar o amido da batata;
- b) fazer a reação de identificação com iodo, variando condições de temperatura, utilizando tubos abertos e tampados;
- c) fazer a reação qualitativa de identificação de açúcares redutores no amido utilizando o reagente de Benedict, em comparação com soluções de glicose e sacarose.

### 6.3. MATERIAIS

- béquer 200 mL;
- gaze;
- estufa de secagem;
- papel de filtro;
- balança analítica;
- papel de pesagem (ou vidro de relógio) e espátulas;
- proveta 50 mL;
- estante para tubos de ensaio;
- 5 tubos de ensaio de 20ml
- pedaço de papel alumínio para fechar tubo de ensaio;
- banho de aquecimento fervente (~ 100°C);
- pipetador automático e ponteiros de 500 e 1000 µL.
- batatas *in natura*;
- água destilada;
- lugol;
- reagente de Benedict;
- solução de glicose 1,0 % (m/v);
- solução de sacarose 1,0 % (m/v);
- suspensão de amido 1,0 % (m/v);
- conta-gotas ou pipeta de Pasteur;
- pinça de madeira
- lamparina;

### 6.4. PROCEDIMENTOS

#### 6.4.1. Extração do amido da batata (já realizado previamente pelo técnico de laboratório).

Homogeneizar 50g de batata descascada em liquidificador com 200 mL de água destilada. Filtrar em gaze dobrada, recolhendo a suspensão de amido em um béquer. Deixar o amido depositar no fundo do béquer (~ 5 min). Desprezar cuidadosamente o sobrenadante. Adicionar cerca de 100 mL de água. Agitar, deixar decantar (~5 min), remover o sobrenadante. Repetir esse procedimento de lavagem por 5 vezes. Juntar ao amido 200 mL de água destilada, filtrar em Büchner e deixar secar em estufa.

#### 6.4.2. Preparo da suspensão de amido.

Pesar 0,5 g do amido seco e ressuspender em 50 mL de água destilada [suspensão de amido 1,0 % (m/v)].

#### 6.4.3. Reação de caracterização com iodo.

- a) Tomar 4 tubos de ensaio, sendo um deles com tampa, e adicionar em dois deles (sendo um com tampa) 1 mL de amido 1 % (m/v) e nos demais 1 mL de água destilada e 1 mL de glicose 1 % (m/v).
- b) Em seguida, adicionar 1 gota da solução de lugol em cada um dos tubos de ensaio e observar o resultado.

- c) Aquecer cuidadosamente o tubo tampado contendo amido (direto na chama) e observar o resultado.  
Deixar o tubo resfriar e observar o resultado.

- d) Repetir o procedimento para o tubo sem tampa contendo amido e anotar o resultado.

#### CUIDADOS ESPECIAIS:

1. O tubo com tampa deve estar com a mesma pouco (frouxa) e não muito apertada.
2. O aquecimento direto na chama deve ser feito com auxílio da pinça, com quantos ciclos forem necessários (CADA CICLO: no máximo 2 segundos na chama – agitação fora da chama).

#### 6.4.4. Pesquisa de poder redutor

- a) Tomar 4 tubos de ensaio e seguir procedimento abaixo:

Tubos	Amostras (mL)	H <sub>2</sub> 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.

- b) Ferver os tubos em banho-maria por 5 minutos e observar as possíveis alterações.  
c) Sabendo que entre as amostras 1, 2 e 3 tratam-se de glicose, amido e sacarose, identificar as amostras em função da coloração observada.  
d) Discutir os resultados.

#### REFERÊNCIAS

- FRANCISCO JR., W.E. Carboidratos: estrutura, propriedades e funções. Química Nova na Escola, n.29, p.8-13, Ago/2008.  
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. Ciên. Tecnol. Aliment., v.23, n.3, p.337-341, 2003.  
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.  
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.  
NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger - Princípios de Bioquímica. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.



## PRÁTICA 7: EXTRAÇÃO DE DNA VEGETAL.

### 7.1. INTRODUÇÃO

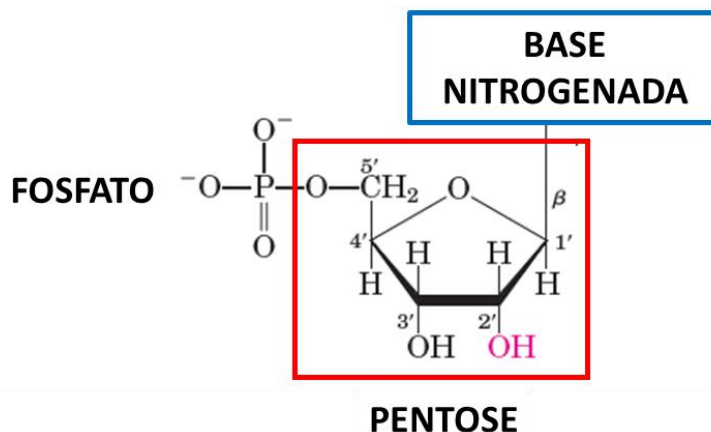
O DNA (do inglês, *deoxyribonucleic acid*) é a macromolécula responsável pelo armazenamento e transmissão das informações genéticas dos seres vivos. De fato, os genes situados nos cromossomos nada mais são do que segmentos de DNA em forma de dupla hélice. É a partir da informação contida nos genes, na forma de sequência de bases nitrogenadas, que moléculas de RNA (do inglês, *ribonucleic acid*) e proteínas são produzidas. Estas exercem dentro das células as mais variadas funções que vão desde a determinação do grau de pigmentação da nossa pele até o controle e regulação de processos metabólicos responsáveis pelo crescimento, desenvolvimento e sobrevivência dos organismos.

Para compreender como o DNA atua como fonte de informação é necessário o conhecimento da estrutura da molécula. A natureza química do DNA começou a ser estudada ainda no século XIX quando Johann Friederich Miescher, em 1869, verificou que quase todas as células vivas continham um núcleo e, dentro dele, uma substância denominada por Miescher como “nucleína”. Em 1889, Richard Altmann observou que a nucleína apresentava caráter ácido, motivo pelo qual alterou seu nome para **ácido nucleico**. Hoje sabe-se que o DNA é um polímero formado por unidades monoméricas denominadas **nucleotídeos**. Os nucleotídeos ligam-se entre si por ligações covalentes do tipo fosfodiéster formando uma longa cadeia de ácido nucleico. A partir do estabelecimento de ligações fracas entre toda a extensão de duas longas cadeias de ácidos nucleicos formadas por **desoxinucleotídeos**, ocorre a formação da molécula de DNA. No século XX (1953) a estrutura tridimensional da molécula de DNA foi elucidada por James Watson e Francis Crick, consagrando a descoberta da estrutura da dupla hélice de DNA formada pelas duas cadeias de ácidos nucleicos enroladas entre si.

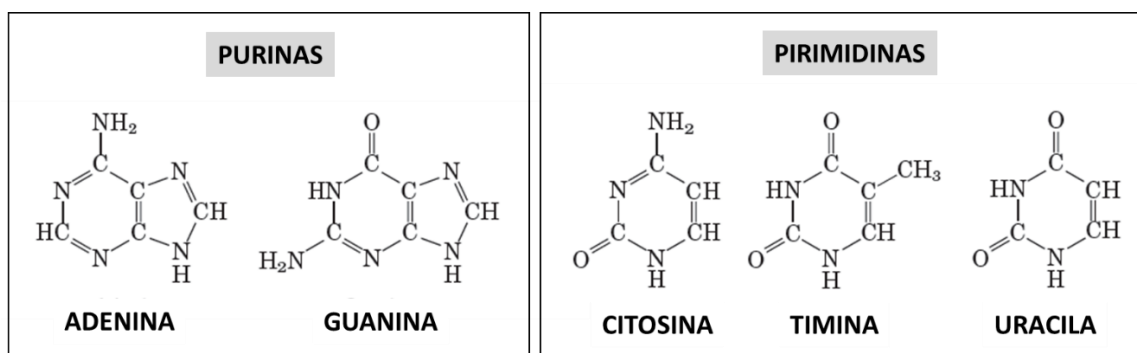
#### *Composição química e estrutura do DNA*

Moléculas como o DNA e RNA são ácidos nucleicos que podem ser definidos de maneira simplificada como polímeros de nucleotídeos. Um nucleotídeo é formado pela ligação covalente entre uma base nitrogenada, um açúcar e um resíduo de ácido fosfórico (Figura 1). De acordo com a estrutura, as bases nitrogenadas podem ser do tipo **purínicas** ou **pirimidínicas**. As bases purínicas são representadas pela adenina (A) e guanina (G) e as pirimidínicas por citosina (C), timina (T) e uracila (U), esta última ausente em nucleotídeos formadores de DNA (Figura 2). O açúcar presente na estrutura do nucleotídeo é uma pentose que pode ser representada pela ribose ou a desoxirribose. Nucleotídeos de RNA apresentam a ribose em sua constituição sendo denominados ribonucleotídeos. Nucleotídeos de DNA apresentam a desoxirribose em sua constituição sendo denominados

desoxirribonucleotídeos. O ácido fosfórico da estrutura dos nucleotídeos, seja de um ribonucleotídeo ou desoxirribonucleotídeo, apresenta-se esterificado na hidroxila presente no carbono 5' do açúcar.

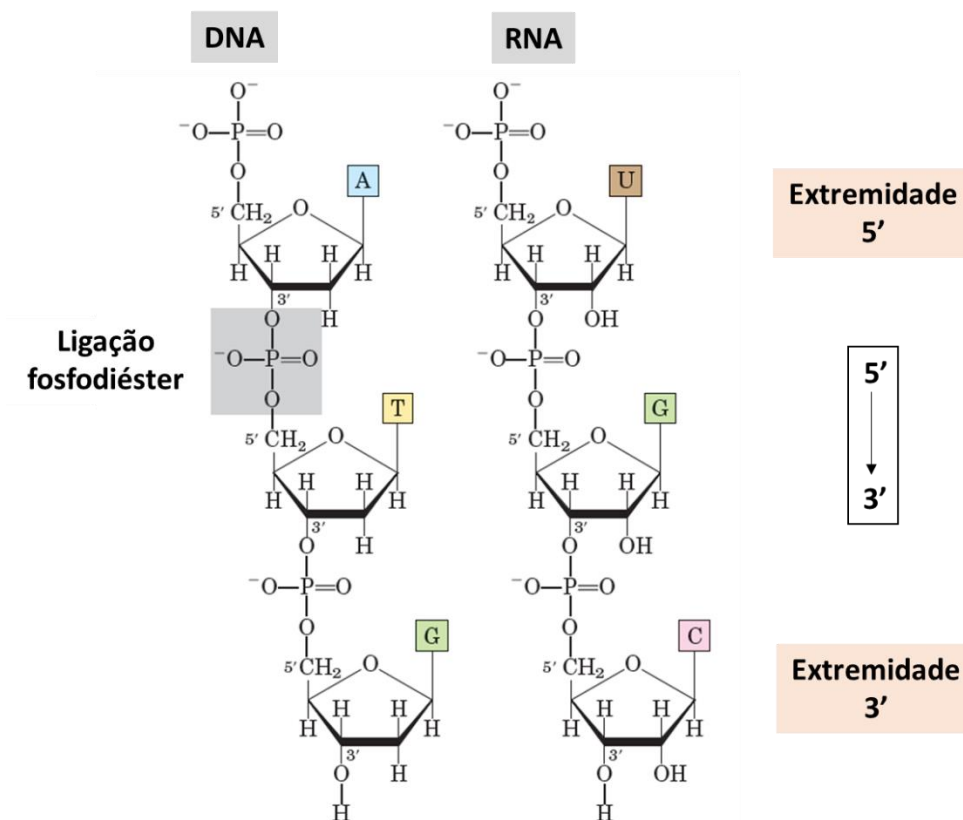


**Figura 1.** Estrutura de um ribonucleotídeo. Um nucleotídeo é formado pela ligação covalente entre uma base nitrogenada, um açúcar e um resíduo de ácido fosfórico. Os desoxirribonucleotídeos formadores do DNA apresentam um H no lugar do grupo OH ligado ao carbono 2' da pentose.



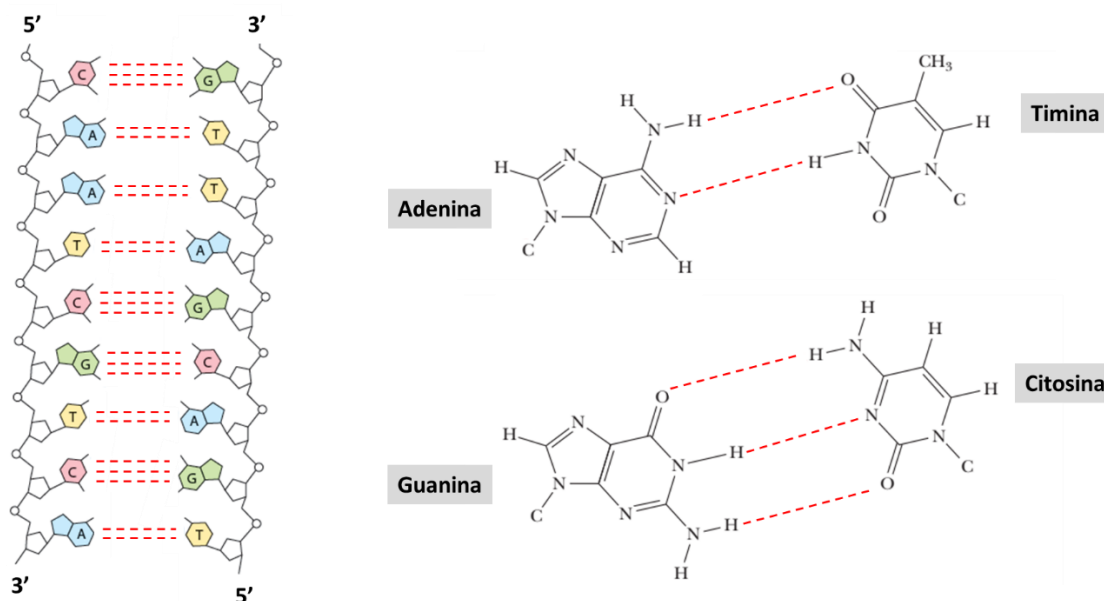
**Figura 2.** Bases nitrogenadas constituintes de nucleotídeos. Bases purínicas e pirimidínicas fazem parte da constituição dos nucleotídeos formadores de DNA e RNA. A uracila não está presente nas moléculas de DNA mas faz parte da constituição do RNA onde substituiu a timina no pareamento com a adenina.

A polimerização dos nucleotídeos para a formação dos ácidos nucleicos envolve a formação de ligação fosfodiéster entre o ácido fosfórico (presente na extremidade 5') de um nucleotídeo com a hidroxila do carbono 3' do açúcar presente no nucleotídeo que o sucede na cadeia nucleotídica. Esse “esqueleto açúcar-fosfato” repete-se por toda a extensão da cadeia nucleotídica (Figura 3).



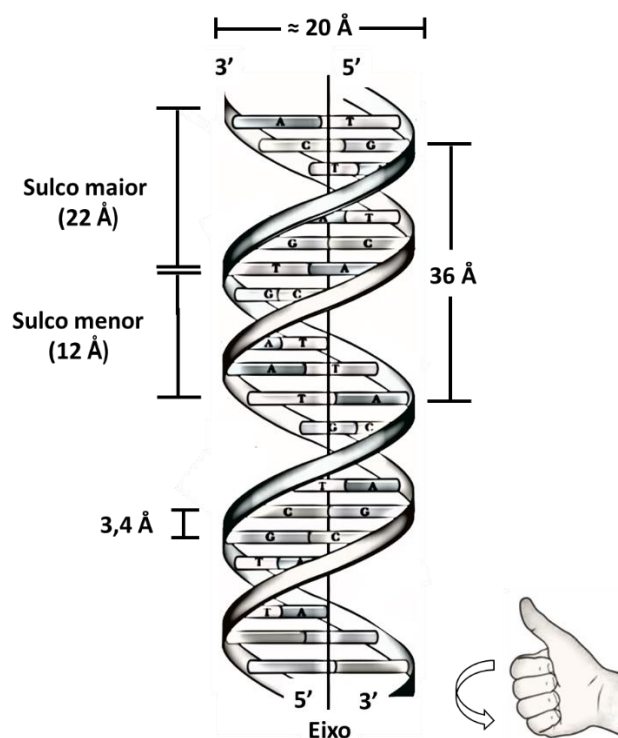
**Figura 3.** Representação de pequeno trecho das cadeias nucleotídicas de moléculas de DNA e RNA. Em ácidos nucleicos como DNA e RNA, a cadeia nucleotídica pode ser descrita como um esqueleto fosfato-açúcar altamente polar. Ligações fosfodiéster são estabelecidas entre nucleotídeos sucessivos da cadeia nucleotídica enquanto ligações glicosídicas são responsáveis pela ligação das bases nitrogenadas à pentose. A síntese de ácidos nucleicos ocorre dentro das células e envolve a ação catalítica de enzimas que promovem a síntese da cadeia nucleotídica no sentido 5'→3' (Adaptado de Nelson & Cox, 2014).

No ambiente celular, a formação da cadeia nucleotídica é catalisada por enzimas denominadas DNA polimerases e, devido à posição dos grupos envolvidos na reação, é realizada no sentido 5' → 3'. A estrutura final da molécula de DNA é resultado da ligação entre duas cadeias nucleotídicas que se “enrolam” dando origem a uma estrutura em formato de dupla hélice. Nesta estrutura, bases nitrogenadas presentes em uma das cadeias estabelecem ligações de hidrogênio com bases nitrogenadas presentes na cadeia nucleotídica oposta. Este pareamento de bases ocorre de maneira complementar e, como regra, uma base do tipo purínica liga-se a uma base pirimidínica. Dessa maneira, temos um padrão de ligações onde guanina liga-se a citosina e adenina a timina. Um par de bases adenina-timina (A-T) é estabelecido através de duas pontes de hidrogênio enquanto três pontes de hidrogênio unem o par guanina-citosina (G-C) (Figura 4).



**Figura 4.** Pareamento de bases nitrogenadas na molécula de DNA. A união das cadeias nucleotídicas do DNA dá-se pelo estabelecimento de ligações de hidrogênio (linhas tracejadas) entre as bases nitrogenadas. A adenina une-se a timina através de duas ligações de hidrogênio enquanto três ligações de hidrogênio unem guanina a citosina.

Como o pareamento complementar de bases ocorre ao longo de toda dupla-hélice, as duas cadeias nucleotídicas também são chamadas de **fitas complementares**. Ligações de hidrogênio entre as bases em cadeias opostas determinam o alinhamento da hélice, com os pares de bases posicionados em planos perpendiculares ao eixo da hélice. O esqueleto açúcar-fosfato forma a parte externa da hélice. As cadeias estendem-se em direções **antiparalelas**, uma da extremidade 3' para a extremidade 5' e a outra de 5' para 3'. O diâmetro interno do esqueleto açúcar-fosfato da dupla hélice é de 11 Å (1,1 nm) enquanto o diâmetro externo é de 20 Å (2,0 nm). A extensão de uma volta completa da hélice ao longo do seu eixo é de 36 Å (3,6 nm) e contém 10 pares de bases. No limite do contorno cilíndrico da dupla hélice há dois sulcos, sulco maior e sulco menor, os quais são grandes o suficiente para acomodar polipeptídeos ou outros tipos de moléculas que interagem com o DNA. Outra característica da molécula de DNA é apresentar a hélice enrolada para a direita (sentido horário), ou seja, na direção em que os dedos da mão direita giram quando o polegar está apontado para cima (Figura 5).



**Figura 5.** Estrutura em dupla hélice de DNA. O modelo da molécula de DNA determinado por Watson e Crick consiste em duas fitas antiparalelas (uma no sentido 5' → 3' e outra no sentido 3' → 5') em formato de hélice que se enrolam formando uma dupla hélice voltada para a direita, ou seja, na direção em que os dedos da mão direita giram quando o polegar está apontado para cima. A estrutura em dupla hélice formada apresenta um diâmetro externo de 20 Å e um diâmetro interno de 11 Å. A distância entre pares de bases adjacentes é de 3,4 Å e uma volta completa da hélice apresenta dez pares de bases em uma extensão de 36 Å. Dois “sulcos”, denominados sulco maior e sulco menor, medindo cerca de 22 Å e 12 Å, respectivamente, podem ser observados no limite do contorno cilíndrico da dupla hélice.

Cabe aqui esclarecer que a estrutura descrita acima, denominada DNA-B, é considerada a principal forma do DNA encontrada na natureza. Contudo, outros tipos de estruturas da molécula, como DNA-A e DNA-Z, também podem ocorrer dependendo, entre outros fatores, da sequência de bases que forma as moléculas.

Em pH fisiológico neutro, cada grupo fosfato do esqueleto açúcar-fosfato do DNA carrega uma carga negativa. Íons com carga positiva, como  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ , e polipeptídeos com cadeias laterais carregadas positivamente são frequentemente associados ao DNA a fim de neutralizar as cargas negativas. No DNA eucariótico, proteínas com carga positiva, entre elas as histonas, formam complexos com o DNA e o material resultante é conhecido como **cromatina**. Em micrografias eletrônicas, a cromatina apresenta-se “enrolada” e assemelha-se a um colar de contas, onde cada “conta”, um **nucleossomo**, consiste em DNA envolto em um núcleo de histonas (Figura 6). O enrolamento adicional do DNA produz a forma compacta da cromatina encontrada nas células.

De acordo com o exposto acima observa-se que, assim como no caso das proteínas, os ácidos nucleicos como o DNA podem ser caracterizados por quatro níveis de estrutura: primária, secundária,

terciária e quaternária. A estrutura primária dos ácidos nucleicos consiste na sequência de bases dos nucleotídeos ao longo da cadeia nucleotídica. As estruturas secundária e terciária representam, respectivamente, a conformação tridimensional do esqueleto açúcar-fosfato (a dupla hélice) e o enrolamento final adotado pela molécula pela condensação da cromatina em nucleossomos e outras estruturas, no caso do DNA eucariótico.



**Figura 6.** Estrutura de um nucleossomo. A molécula de DNA pode interagir com proteínas formando uma estrutura conhecida como nucleossomo. No nucleossomo, o DNA circunda um núcleo proteico formado por histonas o que pode ser comparado à formação de uma estrutura terciária da molécula (Adaptado de Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts e Walter, 2008).

## 7.2. OBJETIVO GERAL

Este experimento didático tem como proposta fazer com que os estudantes compreendam a aplicação dos conceitos teóricos adquiridos durante as aulas sobre a conformação espacial do DNA.

### 7.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Extração de DNA vegetal.
- b) Estudo das interações intermoleculares e de estruturas químicas.
- c) Análise da pureza do material obtido.

## 7.3. MATERIAL

- |  |   |
|--|---|
| • Amostra vegetal (cebola)                             | • solução de sacarose $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$   |
| • liquidificador                                       | • solução salina EDTA ( $\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ , EDTA $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 8,0). |
| • argola e suporte universal                           | • Solução de SDS 10%  |
| • funil e gaze para filtração                          | • Clorofórmio   |
| • Tubo falcon de 50 mL para centrifugação              | • álcool gelado 95% - <b>DEVE SER MANTIDO NO FREEZER</b>  |
| • 3 Tubos Falcon (de polipropileno) de 15 mL por grupo | • gelo  |
| • 2 tubos eppendorf de 2 mL mL por grupo               | • Micropipetas P1000 e P200   |
| • um bastão ou pipeta Pasteur de vidro                 | • Ponteiros para micropipetas   |

#### 4.4. PROCEDIMENTO

As manipulações não serão realizadas em gelo somente quando indicado. Os de isolamento da fração nuclear serão realizados previamente pelos técnicos de laboratório.

##### 4.4.1. Isolamento da Fração Nuclear

- a) Para cada turma, pesar 20 g da fruta e homogeneizar na proporção em 80 mL da solução de sacarose  $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$  em liquidificador.
- b) Filtrar o homogeneizado em funil com gaze e adicionar 30 mL em 2 tubos Falcon de 50 mL.
- c) Centrifugar a  $600 \times g$  durante 10 minutos.
- d) Descartar o sobrenadante
- e) Ressuspender os sedimento em 6 mL da solução NaCl-EDTA e combiná-los em um único tubo.
- f) Transferir 2 mL do homogeneizado obtido no passo “e” para um tubo Falcon de 15 mL e armazenar até o início da aula.

##### 4.4.2. Lise dos Núcleos e Isolamento dos Ácidos Nucleicos

- a) Aos 2 mL de homogeneizado acrescentar 0,5 mL de solução de SDS 10% e deixar o material à temperatura ambiente durante 10 minutos. Observar que após esse período há um grande aumento da viscosidade, causado pela lise nuclear e liberação dos ácidos nucleicos.
- b) Na capela, acrescentar ao lisado nuclear 2,5 mL de clorofórmio.
- c) Fechar o tubo e agitar a cada 5 minutos durante 30 minutos.
- d) A emulsão resultante será separada em 3 camadas por centrifugação a  $3.000 \times g$  durante 10 minutos. ATENTAR AO HORÁRIO PARA QUE TODOS OS GRUPOS FAÇAM ESSA CENTRIFUGAÇÃO AO MESMO TEMPO.
- e) A camada superior (aquosa), contendo os ácidos nucleicos, deve ser transferida para um novo tubo Falcon. Determinar o volume obtido.
- f) Adicionar LENTAMENTE, com auxílio de micropipeta, à solução de ácidos nucleicos 2 volumes de etanol 95% gelado, de modo que os dois líquidos não se misturem. Observar que na interfase há formação de uma nuvem esbranquiçada.
- g) Introduzir um bastão fino de vidro (ou pipeta Pasteur de vidro) no tubo, atravessando a interfase e em seguida imprimir-lhe um movimento circular. Verifica-se que um material filamentosos vai aderindo ao mesmo (filamentos de DNA).
- h) Retirar o bastão e dissolver o filamento a ele aderido em 1,5 mL de água destilada, previamente pipetada em tubo eppendorf.

#### 4.4.3. Determinação do Espectro de Absorção e Pureza do DNA

Observação: A realização desta parte do experimento depende da disponibilidade de espectrofotômetros nos laboratórios.

- Pipetar 1,5 mL da solução de DNA em cubeta de quartzo.
- Ler as absorbâncias em espectrofotômetro, em intervalos de 5 nm, entre 220 e 300 nm.
- Plotar o gráfico de comprimento de onda (x) versus absorbância (y).
- Determinar a pureza do DNA fita dupla pela análise da relação das absorbâncias a 260 nm e 280 nm.

A curva do espectro de absorção varia com a composição de bases que compõem o DNA dupla fita puro, apresentando a razão  $A_{260}/A_{280}$  igual a 1,8, enquanto RNA puro apresenta razão  $A_{260}/A_{280}$  em torno de 2,0. Proteínas apresentam relação  $A_{260}/A_{280}$  menor do que 1 (e geral em torno de 0,5).

Uma solução de DNA com relação  $A_{260}/A_{280} > 1,8$  sugere contaminação com RNA, enquanto aquela com relação  $A_{260}/A_{280} < 1,8$  sugere presença de proteínas na amostra.

O DNA forma filamentos muito finos, semelhantes a fios de algodão.



#### REFERÊNCIAS

- CAMPBELL, M.K., FARREL, S.O. Bioquímica. 8 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015. 812 p.
- PINHATI, F.R. Eletroforese de DNA: dos laboratórios de biologia molecular para as salas de aula. Química Nova na Escola, v.37, n.4, p.316-319, Nov/2015.
- THIEMANN, O.H. A descoberta da estrutura do DNA: de Mendel a Watson e Crick. Química Nova na Escola, n.17, p.13-19, Mai/2003.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger - Princípios de Bioquímica. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.