

**PLANO DE ENSINO DE DISCIPLINA**  
**Quadrimestre Suplementar 2020**  
**Bioquímica: EPFB - teoria**  
**Profa. Giselle Cerchiaro**

**1. Descrição das atividades didáticas**

- Todo o conteúdo será disponibilizado no ambiente virtual **Google Classroom** com acesso usando o e-mail da universidade.  
<https://classroom.google.com/u/1/c/MTQ4MTQ4Nzc0MTU4>
- O conteúdo teórico da disciplina será composto por aulas síncronas todas quintas-feiras, que serão gravadas e disponibilizadas na plataforma google classroom. As aulas síncronas (cronograma) serão ministradas por meio da ferramenta **Meet** nos dias descritos no mapa de atividades por semana mas que serão gravadas e disponibilizadas para os estudantes no ambiente virtual.
- Semanalmente serão solicitadas atividades que deverão ser postadas no ambiente virtual **Google Classroom, e farão parte da avaliação final**
- Os atendimentos poderão ainda ocorrer de maneira assíncrona por e-mail.

**2. Processos de avaliação**

- As atividades semanais deverão ser submetidas por cada aluno via **Google Classroom**. Essas atividades contabilizarão no conceito final da disciplina e os alunos terão pelo menos 72 horas para entrega-las.
- O estudante deverá ainda entregar um trabalho escrito na avaliação final com o valor até 50% do conceito final, tendo 72 horas para realiza-lo. O conceito desta avaliação será analisado juntamente com os conceitos das atividades.

**3. Frequência**

- A frequência das aulas remotas será contabilizada a partir da entrega das atividades de cada tema.

4. Plano de Ensino – mapa de atividades

Mapa de Atividades

Disciplina: Bioquímica: EPFB - teoria

Docente: Giselle Cerchiaro

Quadrimestre: suplementar

Carga horária total prevista teoria: 3 h (TPI: 3,2,5)

Aula/ Semana (período)	Hora s	(Unidade) Tema principal	(Subunidade) Subtema	Objetivos específicos	Atividades <b>teóricas</b> , recursos midiáticos e ferramentas	Atividades <b>práticas</b> , recursos midiáticos e ferramentas
Semana 1	3	Introdução a disciplina	Semana da integração	Haverá conhecimento dos estudantes e suas expectativas de aprendizado	-Conversas com o grupo, explicando como funcionará o curso neste quadrimestre suplementar	- Reunião com o grupo e conhecimento
Semana 2	3	Introdução, o que é vida	Noções básicas de bioquímica, como está estruturada a vida na terra	O estudante deverá entender como é a organização do sistema celular na manutenção da vida	-Leitura do capítulo 1 do livro Voet -Videoaula	-Fórum semanal de discussão no horário da aula semanal da disciplina com link a ser enviado pelo GoogleClassrom. -Exercícios indicados pela professora ao final de cada videoaula
Semana 3	3	Água, Interações	Entendimento da estrutura	Relembrar interações	-Leitura do capítulo 2 do livro Voet	-Fórum semanal de discussão no horário da aula semanal da

		intermoleculares e tampões	molecular da água, interações intermoleculares e tampões celulares	intermoleculares, e aprender a preparar tampões	-Videoaula	disciplina com link a ser enviado pelo GoogleClassrom. -Exercícios indicados pela professora ao final de cada videoaula
Semana 4	3	Termodinâmica aplicada a bioquímica	Entendimento da termodinâmica aplicada a vida	Aprender como a vida se organiza termodinamicamente	-Leitura do capítulo 3 do livro Voet -Videoaula	-Fórum semanal de discussão no horário da aula semanal da disciplina com link a ser enviado pelo GoogleClassrom. -Exercícios indicados pela professora ao final de cada videoaula
Semana 5	3	Aminoácidos e proteínas	Entendimento de estrutura primária, secundária, terciária e quaternária de proteínas	Aprender como as proteínas se organizam em seres vivos	-Leitura do capítulo 4, 7, 8 e 9 do livro Voet -Videoaula	-Fórum semanal de discussão no horário da aula semanal da disciplina com link a ser enviado pelo GoogleClassrom. -Exercícios indicados pela professora ao final de cada videoaula
Semana 6	3	Enzimas e cinética enzimática	Entendimento do funcionamento de enzimas e cinética enzimática	Aprender sobre catálise enzimática e enzimas	-Leitura do capítulo 13, 14 e 15 do livro Voet -Videoaula	-Fórum semanal de discussão no horário da aula semanal da disciplina com link a ser enviado pelo GoogleClassrom. -Exercícios indicados pela professora ao final de cada videoaula
Semana 7	3	Hemoglobina e colágeno	Entendimento do funcionamento	Aprender a estrutura e funções da	-Leitura do capítulo 8 e 10 do livro Voet -Videoaula	-Fórum semanal de discussão no horário da aula semanal da disciplina com link a ser

			da Hemoglobina e colágeno	hemoglobina		enviado pelo GoogleClassrom. -Exercícios indicados pela professora ao final de cada videoaula
Semana 8	3	Açúcares	Entendimento da estrutura de açúcares	Aprender sobre estrutura e funções de açúcares biológicos	-Leitura do capítulo 11 do livro Voet -Videoaula	-Fórum semanal de discussão no horário da aula semanal da disciplina com link a ser enviado pelo GoogleClassrom. -Exercícios indicados pela professora ao final de cada videoaula
Semana 9	3	Lipídeos	Entendimento da estrutura de lipídeos	Aprender sobre estrutura e funções de lipídeos biológicos	-Leitura do capítulo 12 do livro Voet -Videoaula	-Fórum semanal de discussão no horário da aula semanal da disciplina com link a ser enviado pelo GoogleClassrom. -Exercícios indicados pela professora ao final de cada videoaula
Semana 10	3	Ácidos nucleicos	Entendimento da estrutura e função de ácidos nucleicos:DNA e RNA	Aprender sobre estrutura e funções de ácidos nucleicos	-Leitura do capítulo 5 e 7 do livro Voet -Videoaula	-Fórum semanal de discussão no horário da aula semanal da disciplina com link a ser enviado pelo GoogleClassrom. -Exercícios indicados pela professora ao final de cada videoaula
Semana 11	3	Introdução ao metabolismo	Uma introdução ao metabolismo	Introdução ao metabolismo	-Leitura do capítulo 16 do livro Voet -Videoaula	-Fórum semanal de discussão no horário da aula semanal da disciplina com link a ser enviado pelo GoogleClassrom. -Exercícios indicados pela

						professora ao final de cada videoaula
Semana 12	3	Avaliação Final				Avaliação com trabalho a ser entregue
Semana 13	3	Recuperação				Avaliação com questionário a ser respondido e entrega de trabalho

Feedback, comunicação e avaliação:

O estudante será avaliado com base na participação nos fóruns de discussão, na entrega dos exercícios pedidos e na avaliação final, na forma de um trabalho escrito a ser entregue.



Universidade Federal do ABC

**BCL 0308-15**

**Bioquímica: Estrutura, Propriedade e  
Funções de Biomoléculas**

---

**APOSTILA DE LABORATÓRIO**

**2020 – Quadrimestre Suplementar**

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

**Autores:** Núcleo Docente da UFABC

## ÍNDICE

CRONOGRAMA 2020.1 .....	3
SEGURANÇA E NORMAS DE TRABALHO NO LABORATÓRIO .....	4
BIBLIOGRAFIA .....	5
CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO .....	6
Aula Prática Introdutória. USO DE MICROPIPETAS .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Prática 1. Propriedades físico-químicas relacionadas à estrutura e polaridade da água .....	8
Prática 2: Aminoácidos: estudo da estrutura e propriedades ácido-base. ....	18
Prática 3: Espectrofotometria – Conceitos e Aplicações .....	8
Prática 4: Desnaturação Proteica e Atividade enzimática.....	24
Prática 5: Propriedades de Surfactantes e Lipídeos .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Prática 6: Carboidratos: estrutura e propriedades. ....	45
Prática 7: Extração de DNA vegetal. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

**Coordenador**

**Prof. Dr. César A. J. Ribeiro**

cesar.ribeiro@ufabc.edu.br

## CRONOGRAMA 2020 – QUADRIMESTRE SUPLEMENTAR

SEMANA	ATIVIDADE
13/fev	Apresentação da Disciplina. Prática Introdutória de Pipetagem.
20/fev	<b>PRÁTICA 1:</b> Propriedades físico-químicas relacionadas à estrutura e polaridade da água.
27/fev	<b>PRÁTICA 2:</b> Aminoácidos: estudo da estrutura e propriedades ácido-base.
05/mar	<b>PRÁTICA 3:</b> Espectrofotometria – Conceitos e Aplicações
12/mar	<b>Discussão dos experimentos</b>
19/mar	<b>PRÁTICA 4:</b> Desnaturação proteica e atividade enzimática
26/mar	<b>PRÁTICA 5:</b> Propriedades de Surfactantes e Lipídeos .
02/abr	<b>PRÁTICA 6:</b> Carboidratos: estrutura e propriedades.
09/abr	<b>Não haverá atividade.</b>
16/abr	<b>Discussão dos experimentos</b>
23/abr	<b>Avaliação de laboratório.</b> <i>Poderá ser realizada em sala de aula a ser reservada pelo(a) docente de laboratório da turma.</i>
30/abr	<b>*Avaliação substitutiva de laboratório</b> (prova escrita) *Vistas de Provas
07/mai	Recuperação

**\*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.

### • DETERMINAÇÃO DO CONCEITO FINAL NA DISCIPLINA

A atribuição dos conceitos teórico e prático será feita de acordo com a proposição de cada docente responsável por cada uma das turmas da 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)				
		Conceito	A	B	C	D
Prática (CP)	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):**

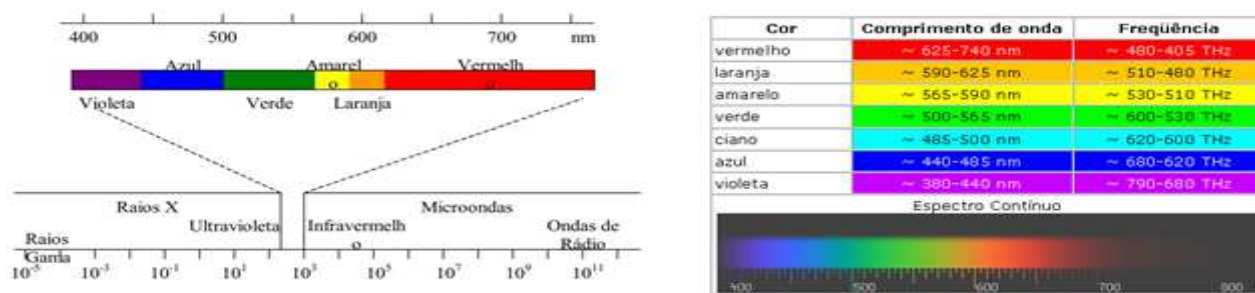
		Exame				
Desempenho		A	B	C	D	F
CF	D	B	B	C	D	F
	F	C	C	D	D	F

## PRÁTICA 1: ESPECTROFOTOMETRIA – CONCEITOS E APLICAÇÕES

### 1.1. 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).

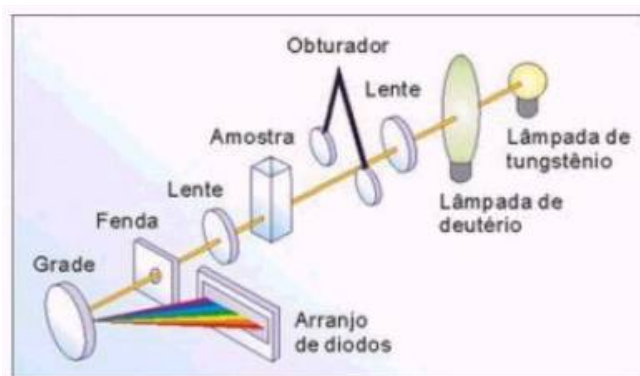


**Fig. 1.** Espectro eletromagnético evidenciando a faixa dos comprimentos de onda visíveis.

(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 (absorbância). A cor das substâncias se deve a não absorção (transmitância) de certos comprimentos de ondas da luz branca que incide sobre elas, deixando transmitir aos nossos olhos apenas aqueles comprimentos de ondas não absorvidos. Esse fenômeno pode ser usado para

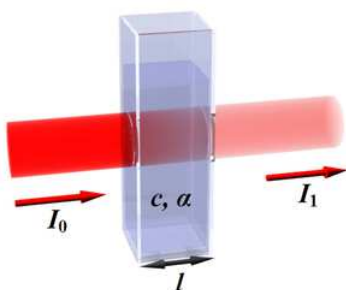
quantificação de substâncias por meio da intensidade de absorvância em um comprimento de onda específico, com base em uma curva-padrão, utilizando-se da Lei de Lambert-Beer (PUNGOR, 1995).



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

### 1.1.1. 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, absorvância ( $A$ ), que será diretamente proporcional à concentração. Portanto,

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

$$A = \log 1/T$$

Dessa forma, a absorvância 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 absorvância duas vezes maior. Essa relação é frequentemente referida como *Lei de Lambert-Beer*:

$$A = a.b.c$$

onde  $A$  = absorvância,  $a$  = 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 absorvância 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 absorvâncias 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).

## 1.2. 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 absorvância a 280 nm e pelo método indireto do Biureto; em ambos os casos com aplicação da Lei de Lambert-Beer.

## 1.3. PROCEDIMENTO

### 1.3.1. Determinação do Espectro de Varredura da Albumina

Pelo **Método Direto**, a quantificação da concentração de albumina é feita pela contribuição de absorvância dos seus resíduos de aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano) e também dos resíduos de cistina.

- 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.

**Observação:** Este procedimento pode ser observado no vídeo disponível no link:  
[https://www.youtube.com/watch?v=5goEpF34p\\_I](https://www.youtube.com/watch?v=5goEpF34p_I).

### 1.3.2. Compreendendo a Lei de Lambert-Beer

Explorar o objeto de aprendizagem sobre Lei de Lambert-Beer disponível no link abaixo:

[https://phet.colorado.edu/sims/html/beers-law-lab/latest/beers-law-lab\\_en.html](https://phet.colorado.edu/sims/html/beers-law-lab/latest/beers-law-lab_en.html)

### 1.3.3. Determinação da concentração da solução de albumina com aplicação da Lei de Lambert-Beer

Para dosagem direta de proteínas utilizam-se valores de absorvância no comprimento de onda de absorvância 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 absorvância em 280 nm (eixo y) em função da concentração de albumina em mol . L<sup>-1</sup> (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 ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	Absorvância 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
<b>Amostra desconhecida</b>		<b>0,4289</b>

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 absorvância em 280 nm deve aumentar linearmente com a concentração de albumina. O ajuste linear do gráfico de intensidade de absorvância (A), em 280 nm, versus concentrações conhecidas de albumina, em concentração molar (C), X caminho óptico de leitura (l), em cm, fornece o



valor da constante de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) 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.

### **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.

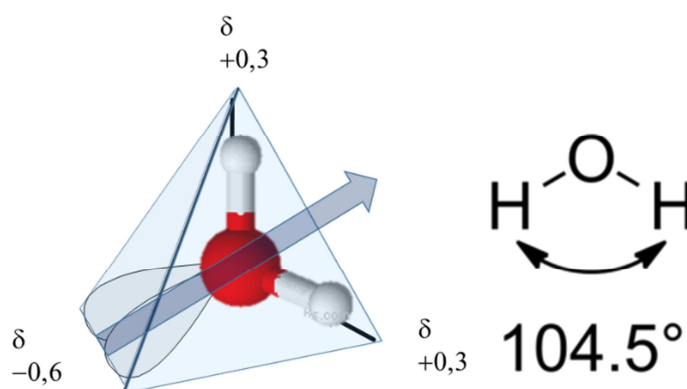
ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, v.21, n.6, p.787-793, 1998.

## PRÁTICA 2. 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.



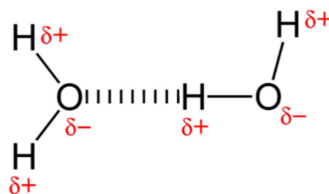
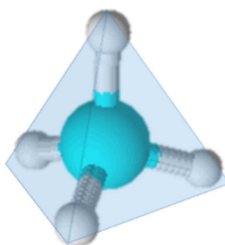
**Fig. 1:** Estrutura molecular da água inserida em uma estrutura tetraédrica e fórmula estrutural da água com o valor do ângulo entre os hidrogênios que se desvia do valor esperado de  $109,5^\circ$  do carbono tetraédrico com hibridização  $sp^3$ .

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°

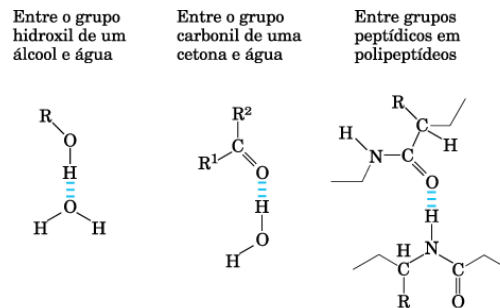
Em adição, as ligações O-H são polarizadas devido à alta eletronegatividade do oxigênio. Assim, um lado da molécula de água carrega uma carga parcial ( $\delta$ ) de -0,6 unidades e o outro lado é positivamente carregado de forma correspondente (Fig. 1). Essa separação espacial entre as cargas dá à molécula 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 formação de ligações de hidrogênio não acontece somente na molécula de água. Este tipo de

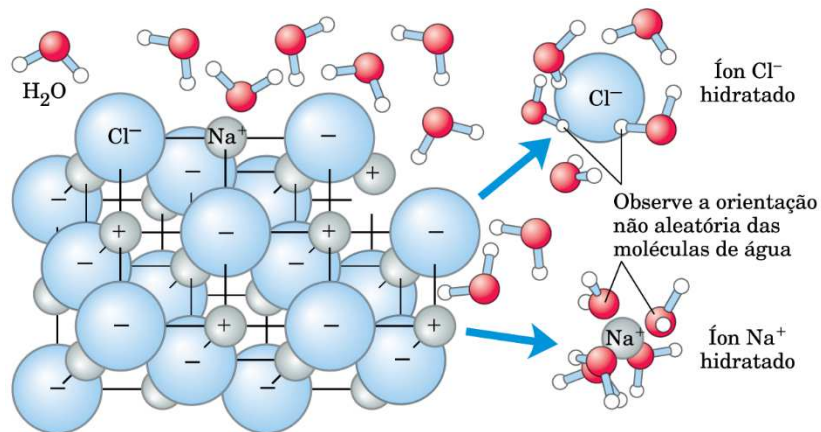
<sup>1</sup> Tabela extraída de HENRY A. BENT AN APPRAISAL OF VALENCE-BOND STRUCTURES AND HYBRIDIZATION IN COMPOUNDS OF THE FIRST-ROW ELEMENTS. Chemical Reviews, 1961, Vol. 61(3), pp.275-311.

ligação ocorre prontamente entre um átomo eletronegativo (aceptor de hidrogênio, geralmente oxigênio ou nitrogênio) e um átomo de hidrogênio **ligado covalentemente a outro átomo eletronegativo** (doador de hidrogênio). Nesse sentido, biomoléculas polares não carregadas, como os açúcares, dissolvem-se rapidamente em água devido ao efeito estabilizador das ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila ou o oxigênio da carbonila do açúcar com as moléculas polares da água. O mesmo acontece em álcoois, aldeídos, cetonas e compostos contendo ligações N-H, que formam ligações de hidrogênio com a água.



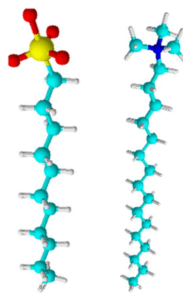
**Fig. 4.** Formação de pontes de hidrogênio entre as biomoléculas e a molécula da água.

Além disso, por ser um solvente polar, a água dissolve prontamente a maioria das biomoléculas, que em geral, são compostos carregados ou polares. A água dissolve sais, como o cloreto de sódio, por exemplo, pela hidratação e estabilização dos íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>, enfraquecendo as interações eletrostáticas entre eles e, assim, neutralizando a tendência de se associarem em uma rede cristalina



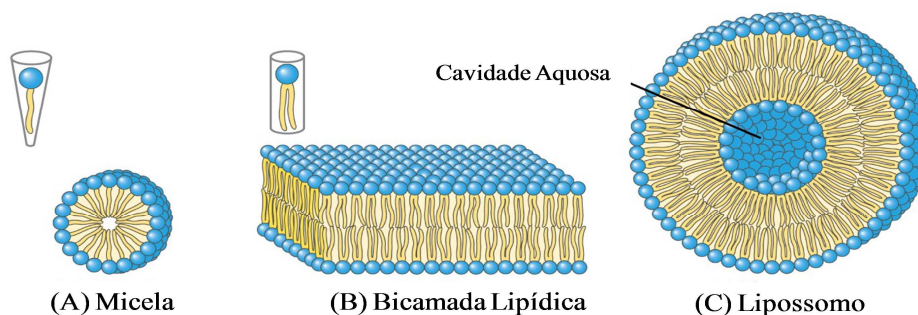
**Fig. 5.** Solubilização de moléculas polares e solvatação de íons pela molécula da água.

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

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



**Fig. 6:** Estruturas formadas por lipídios anfipáticos em meio aquoso. (A) Micelas são formadas por moléculas de lipídios com uma única cadeia carbônica, cadeias estas que se localizam no interior dessas estruturas. (B) Bicamada lipídica é uma estrutura bidimensional na qual as cadeias carbônicas formam um domínio central hidrofóbico, isolando-se da água, exceto nas extremidades da bicamada; é a estrutura comumente formada por lipídios anfipáticos com duas cadeias de hidrocarbonetos. (C) Lipossomo é uma vesícula oca, resultante do fechamento de uma bicamada lipídica, dotada de uma cavidade central preenchida por solvente.

## 1.2. 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.

## 1.3. PROCEDIMENTO

1) Assistir ao vídeo abaixo sobre as propriedades da água e formação de micelas;

<https://www.youtube.com/watch?v=3jwAGWky98c>

[https://www.youtube.com/watch?v=NjZDTiV2s\\_w](https://www.youtube.com/watch?v=NjZDTiV2s_w)

2) Interagir com os objetos de aprendizagem e compreender os conceitos relacionados à concentração e solubilidade:

[https://phet.colorado.edu/sims/html/molarity/latest/molarity\\_en.html](https://phet.colorado.edu/sims/html/molarity/latest/molarity_en.html)

<https://phet.colorado.edu/sims/cheerpj/soluble-salts/latest/soluble-salts.html?simulation=soluble-salts>

## 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 3: pH, ÁCIDOS, BASES, SISTEMAS TAMPÃO E AMINOÁCIDOS

### 2.1. INTRODUÇÃO

Embora diversas propriedades da água como solvente sejam explicadas em termos da molécula de água sem carga, o pequeno grau de ionização da água em íons  $H^+$  e  $OH^-$  exerce papel importante sobre os sistemas biológicos. Essa reação de ionização é reversível e pode ser descrita por uma constante de equilíbrio. As moléculas de água têm uma leve tendência de sofrer uma ionização reversível, produzindo um íon hidrogênio (próton) e um íon hidróxido:



A partir da determinação experimental do valor da constante de ionização da água é possível determinar a concentração das espécies  $H^+$  e  $OH^-$  para a água pura, a 25°C (essa demonstração matemática pode ser encontrada em todos os livros de bioquímica e não será demonstrada aqui). A partir desses dados, encontramos que o somatório das concentrações das espécies  $H^+$  e  $OH^-$  é  $1 \times 10^{-14}$ , e que a concentração das espécies  $H^+$  e  $OH^-$  é de  $1 \times 10^{-7}$  mol/L na água pura. Calculando-se o  $-\log$  da concentração de íons  $H^+$  podemos então calcular o pH da solução, onde o símbolo p denota “logaritmo negativo de”. Assim, soluções com excesso de íons  $H^+$  têm pH ácido e com excesso de íons  $OH^-$  (ou seja, quantidade reduzida de íons  $H^+$ ) tem pH básico.



**Fig. 1.** Escala de pH.

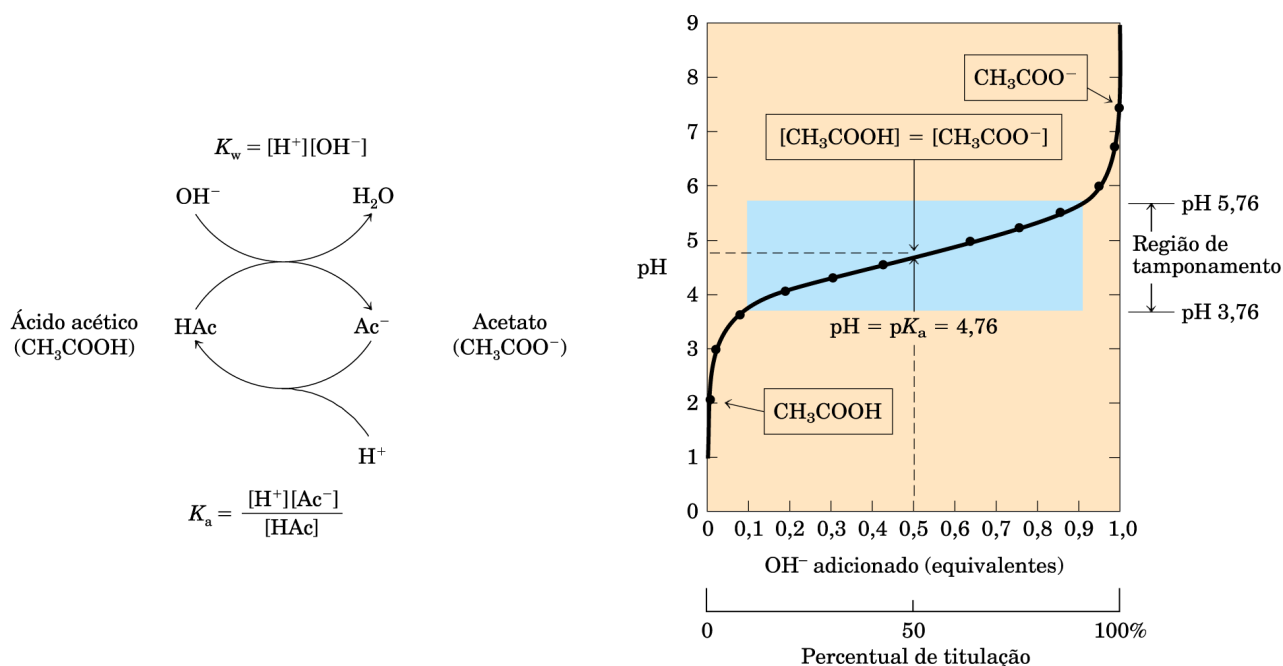
#### 2.1.1. Sistemas Tampão

Praticamente todos os processos biológicos dependem do pH. Assim, pequenas mudanças na concentração de íons  $H^+$  produzem grandes mudanças na velocidade dos processos. Um exemplo são as enzimas, e muitas moléculas sobre as quais elas agem, que contêm grupos ionizáveis que podem ser protonados e desprotonados de acordo com o pH do meio circundante.

Nesse cenário, as soluções tampão são sistemas aquosos que tendem a resistir a mudanças de pH quando pequenas quantidades de ácido ( $H^+$ ) ou base ( $OH^-$ ) são adicionadas ao meio. Um sistema

tampão é composto por um ácido fraco (o doador de prótons) e a sua base conjugada (o acceptor de prótons).

O tamponamento resulta do equilíbrio entre duas reações reversíveis ocorrendo em uma solução. Sempre que  $H^+$  ou  $OH^-$  são adicionados em um tampão, ocorre uma pequena mudança na razão das concentrações relativas dos ácidos fracos e seus ânions. Um decréscimo na concentração de um componente do sistema é equilibrado exatamente pelo aumento do outro.



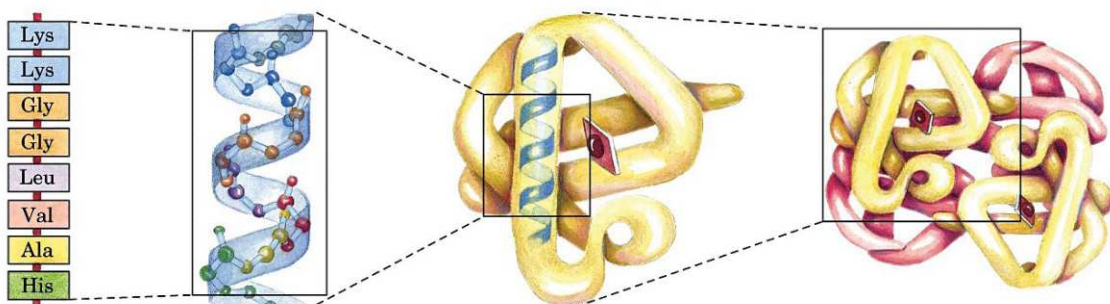
**Fig. 2.** Par ácido acético-acetato e sua curva de titulação. A região em azul indica a faixa de tamponamento, onde há menor variação do pH com a adição sucessiva de equivalentes de  $OH^-$ .

### 2.2.2. Propriedades ácido-base dos aminoácidos

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 amina 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.

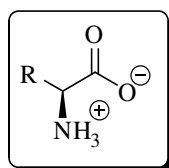


Existem dois aminoácidos com cadeias laterais ácidas, o ácido aspártico e o ácido glutâmico. Esses aminoácidos são geralmente chamados de aspartato e glutamato para salientar que suas cadeias laterais têm, quase sempre, cargas negativas no pH fisiológico. A glutamina e a asparagina são derivados não 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.



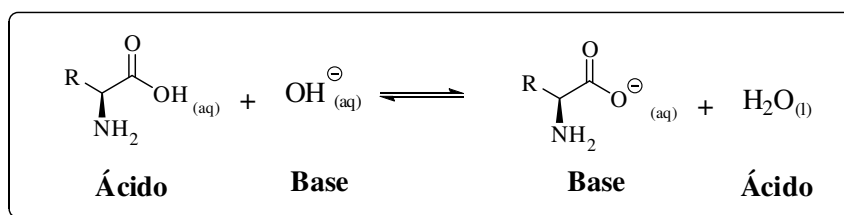
**Fig. 3.** Esquema representativo dos diferentes níveis de estrutura proteica da hemoglobina (LEHNINGER, NELSON & COX, 2006).

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

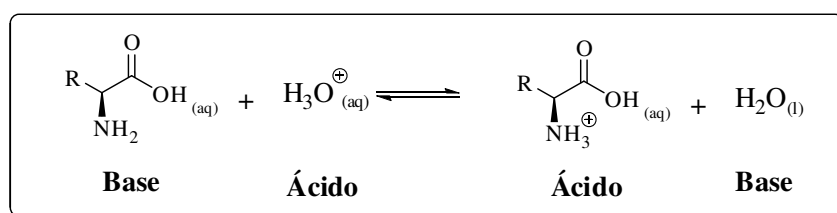


**Fig. 4.** Estrutura de um aminoácido na forma de “zwitterion”.

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.

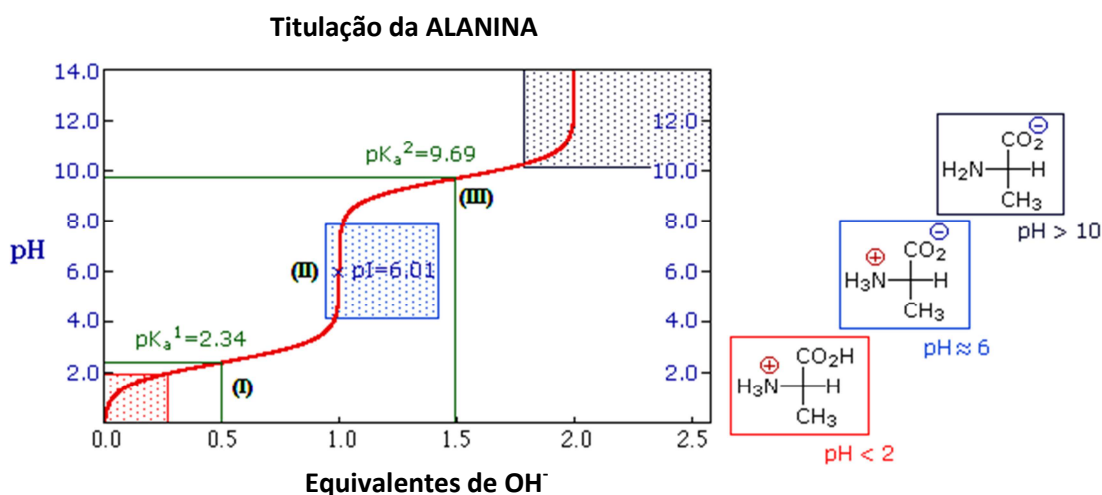


**Equação 1.** Aminoácido atuando como ácido.



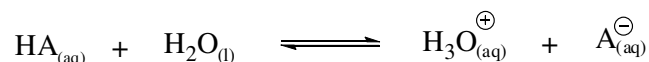
**Equação 2.** Aminoácido atuando como base.

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).



**Fig. 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):



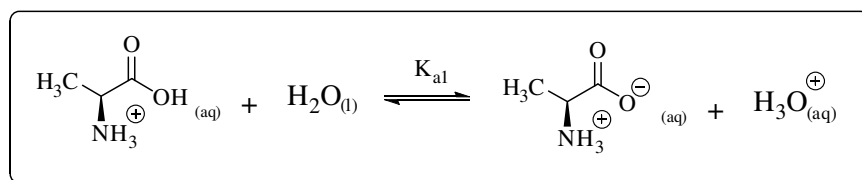
**Equação 3.** *Ácido de Brønsted em equilíbrio aquoso.*

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

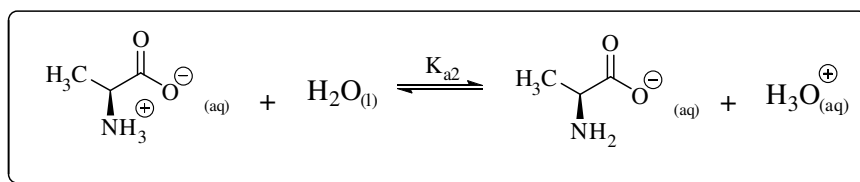
**Equação 4.** *Equação de Henderson-Hasselbach.*

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

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),  $\text{pK}_{a1}$ ) 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  $[\text{A}^-]/[\text{HA}]$  (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  $\text{pK}_{a2}$  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.

## 2.3. PROCEDIMENTOS

Assistir o vídeo e explorar os objetos de aprendizagem:

Vídeo: Titulação de aminoácidos

<https://www.youtube.com/watch?v=2vInVzyXluo>

### Ácidos e Bases

[https://phet.colorado.edu/sims/html/acid-base-solutions/latest/acid-base-solutions\\_en.html](https://phet.colorado.edu/sims/html/acid-base-solutions/latest/acid-base-solutions_en.html)

### Escala de pH

[https://phet.colorado.edu/sims/html/ph-scale/latest/ph-scale\\_en.html](https://phet.colorado.edu/sims/html/ph-scale/latest/ph-scale_en.html)

## 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.

## PRÁTICAS 4: DESNATURAÇÃO PROTEICA

### 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 disso, 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**

Neste experimento verificaremos como alterações da estrutura de proteínas provocam mudanças em suas propriedades e funções. Num primeiro momento verificaremos como a alteração estrutural do colágeno leva a perda de sua propriedade de hidratação e endurecimento da gelatina. Em seguida, estudaremos como variações na temperatura podem alterar a estrutura e a função de enzimas proteicas. Por último iremos verificar como mudanças estruturais da proteína albumina podem alterar suas propriedades e ser usadas no preparo de um ovo.

## **4.3. PROCEDIMENTOS**

### ***4.3.1. Experimento 1: Atividade enzimática de extratos vegetais em gelatina***

O objetivo desta prática é demonstrar como a preservação da integridade da estrutura da proteína colágeno é importante para a capacidade de endurecimento da gelatina. Para isso estudaremos o que acontece com a capacidade de endurecimento da gelatina quando durante seu preparo é colocada em presença de suco de abacaxi ou polpa de mamão. O procedimento completo é mostrado no vídeo que pode ser acessado pelo link abaixo:

<https://www.youtube.com/watch?v=lumJnUyfWyI&feature=youtu.be>

### ***4.3.2. Experimento 2: Efeitos Da Temperatura Na Atividade Enzimática De Extratos Vegetais***

Na prática 1 estudamos as consequências da ação de compostos presentes no suco de abacaxi, mamão e outros vegetais na estrutura e propriedades do colágeno. Estes compostos na verdade são proteínas que apresentam atividade catalítica, ou seja, são enzimas\*. A atividade catalítica das enzimas depende da manutenção da estrutura dessas moléculas numa conformação adequada chamada de conformação nativa. Quando em conformação nativa a enzima é capaz de catalisar uma reação levando a transformação dos substratos em produtos. Alterações na temperatura, pH, interação com solventes orgânicos e sais, entre outros fatores, podem induzir alterações na estrutura das enzimas fazendo com que percam a estrutura nativa e se tornem desnaturadas. (\*A grande maioria das enzimas são proteínas. Contudo, temos também em nosso organismo enzimas não proteicas que desempenham importantes funções, como é o caso dos RNAs presentes em ribossomos. Esses RNAs catalisam as reações de ligação entre aminoácidos, as ligações peptídicas, no momento de formação das proteínas.)

O objetivo desta segunda prática é verificar se a exposição do suco de abacaxi (enzima) à 25 °C, 60 °C e 100 °C é capaz de provocar sua desnaturação e, conseqüentemente, perda de atividade catalítica. A perda de atividade enzimática poderá ser verificada pela manutenção da estrutura íntegra do colágeno e endurecimento da gelatina.

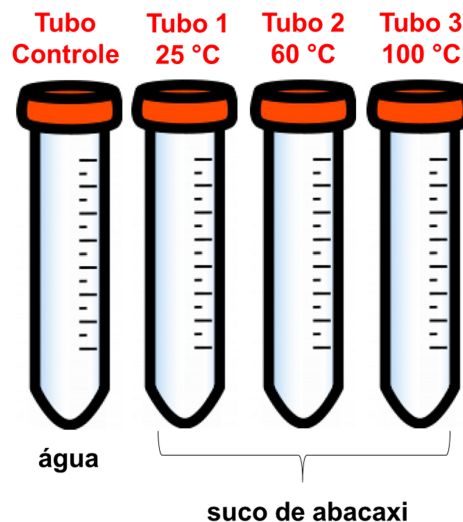
Para esta prática não temos um vídeo demonstrando todas as etapas do experimento que foi realizado da seguinte maneira:

a) Suco de abacaxi foi obtido pelo mesmo processo descrito no vídeo da prática 1.

b) O suco de abacaxi obtido foi distribuído em 3 tubos cônicos diferentes nomeados 1, 2 e 3. O tubo 1 permaneceu à temperatura ambiente (25 °C) enquanto os tubos 2 e 3 foram submetidos às temperaturas de 60 °C e 100 °C, respectivamente, por 5 minutos.

c) O próximo passo foi colocar os tubos contendo suco de abacaxi em contato com a gelatina líquida (ainda não solidificada) assim como feito na prática 1. Contudo, antes dessa etapa, foi necessário fazer com que todos os tubos estivessem na mesma temperatura e, dessa maneira, entrassem em contato com a gelatina na mesma condição. Dessa maneira, os tubos 2 e 3 foram colocados no gelo e mantidos até que atingissem a temperatura de 25 °C.

d) Com todos os tubos a 25 °C, adicionou-se gelatina líquida a cada um deles. A um tubo contendo apenas água a 25 °C (sem suco de abacaxi), denominado “Controle”, também foi adicionada a gelatina.

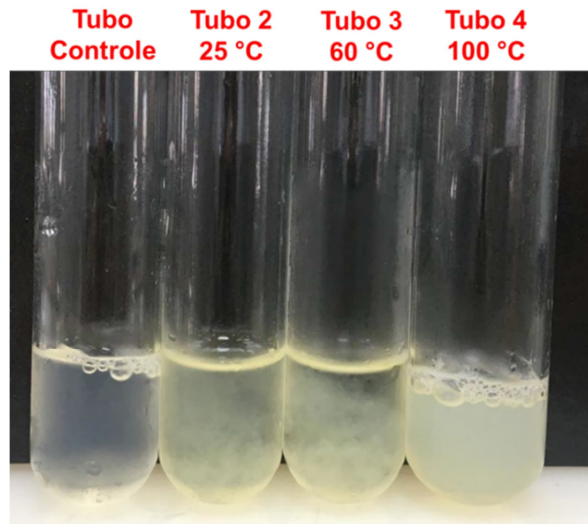


**Figura 1.** Visão geral dos tubos antes da adição de gelatina líquida. Antes da adição de gelatina líquida três amostras de suco de abacaxi foram aquecidas em temperaturas diferentes: 60° C e 100 °C. Uma amostra não foi aquecida permanecendo em temperatura ambiente de 25 °C. Para o controle da reação um tubo contendo apenas água a 25 °C foi utilizado.

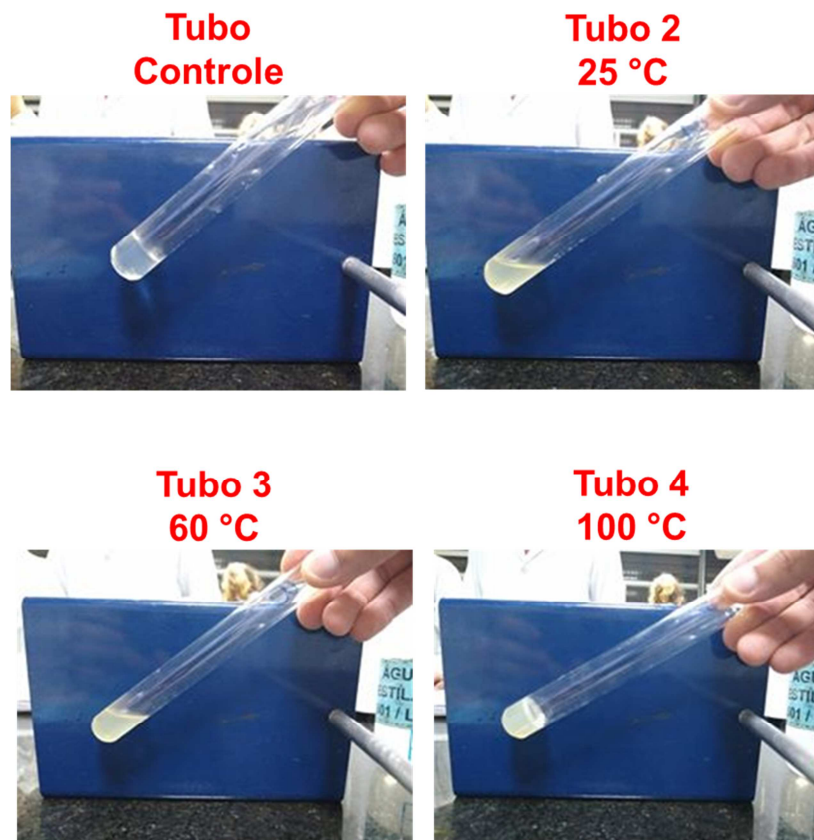
e) Os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C por 10 minutos.

f) Ao final os tubos foram mantidos em gelo por 7 minutos e os resultados obtidos são mostrados abaixo.





**Figura 2.** Aspecto dos tubos ao final do experimento. Após adição de gelatina líquida, os tubos foram incubados em 37 °C por 10 minutos e, posteriormente, a reação foi paralisada pela redução da temperatura à 0 °C através da inserção dos tubos em gelo.



**Figura 3.** Aspecto da gelatina ao final do experimento. Ao final do experimento, como esperado, observou-se o endurecimento da gelatina no tubo controle onde não havia suco de abacaxi. Resultado semelhante foi observado no tubo 4 onde o suco de abacaxi sofreu choque térmico a 100 °C antes da reação com a gelatina. Já para os tubos onde o suco de abacaxi permaneceu a temperatura ambiente (25 °C) ou foi aquecido a 60 °C a gelatina permaneceu líquida.

**Observação:** Para facilitar a visualização deste experimento leve em consideração que ele foi feito exatamente como o experimento da prática 1 com a diferença de que somente o suco de abacaxi foi testado e que esse suco foi testado em 3 condições diferentes: um que não foi exposto a nenhum tipo de choque térmico, outro que sofreu choque térmico a 60 °C e outro que sofreu choque térmico a 100 °C.

#### 4.3.3. Experimento 3: Efeitos Do Etanol Em Clara De Ovo

Como até aqui, a perda da estrutura e a desnaturação das proteínas pode ser indicada pela alteração de suas atividades biológicas. Uma outra maneira de detectarmos a desnaturação proteica é avaliar o grau de interação entre as moléculas de proteínas. Geralmente a desnaturação é acompanhada pela perda ou diminuição da interação proteína-solvente (perda de solubilidade) e aumento da interação proteína-proteína. Como resultado, podemos observar a agregação das moléculas proteicas levando ao embranquecimento (turbidez) da solução ou até mesmo ao aparecimento de precipitados.

O objetivo desta terceira prática é avaliar os efeitos de um solvente orgânico como o etanol na estrutura da albumina presente na clara do ovo. O procedimento completo é mostrado no vídeo que pode ser acessado pelo *link* abaixo:

<https://www.youtube.com/watch?v=OLxq2fzxITU>

#### QUESTÕES PARA ESTUDO

1. Discutir o efeito do suco de abacaxi sobre o colágeno (gelatina).
2. Discutir o efeito da temperatura sobre as enzimas (proteases) presentes no suco do abacaxi.
3. Discutir o efeito do etanol sobre as proteínas em solução. Qual o princípio do efeito?
4. Enzimas peptidases: o que são e sobre qual tipo de substrato atuam?
5. Gelatina: composição e processo de gelificação
6. Discuta o efeito da temperatura sobre a desnaturação de proteínas no processo de cozimento dos alimentos. Qual a importância disso?
7. 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: ATIVIDADE ENZIMÁTICA

### 6.1. INTRODUÇÃO

As enzimas são catalizadores biológicos capazes de aumentar a velocidade de reações químicas em muitas ordens de grandeza e, desta maneira, são essenciais para a existência da vida. Nesta atividade prática temos como objetivo compreender a diferença entre os termos velocidade inicial ( $V_0$ ) e velocidade média ( $V$ ) de uma reação química catalisada por enzima (E). Também avaliaremos como a concentração do(s) substrato(s) e a presença de inibidores (I) podem afetar a velocidade de uma reação enzimática.

O objetivo aqui é analisar a atividade de enzimas em função da concentração de substrato, tempo de reação e ausência/presença de inibidores competitivos e não competitivos, através do estudo da velocidade das reações enzimáticas, chamado “Cinética Enzimática”, sabendo apenas como calcular a velocidade de uma reação, o que é mostrado na primeira parte do *software* utilizado. Por isso, “brinque” à vontade com a simulação e tente obter o máximo possível de entendimento do que ocorre nos experimentos pois estes conceitos simples serão muito importantes para que vocês entendam conceitos mais complexos durante a aula teórica.

Apesar de ser recomendada a execução das simulações antes do contato com conceitos teóricos, caso você queira ler um pouco mais sobre o assunto pode recorrer a qualquer livro de Bioquímica na parte de estudo de enzimas e cinética enzimática. Você também pode estudar o assunto através do *software* livre “Enzyme” que pode ser obtido na página da Biblioteca Digital de Ciências (Unicamp) através do *link* abaixo:

<https://www.bdc.ib.unicamp.br/bdc/visualizarMaterial.php?idMaterial=528#.XpYJ8shKjIU>



## 6.2. PROCEDIMENTOS

Para esta atividade será necessário fazer o download do *software* “A Cinética da Reação Enzimática” disponível gratuitamente em:

<https://www.bdc.ib.unicamp.br/bdc/visualizarMaterial.php?idMaterial=527#.XpNwCshKjIU>



Após instalar o programa em seu computador siga as instruções abaixo:

1. Abra o programa e leia a “Introdução” e os “Objetivos”.
2. No “**Experimento 1**” verificaremos como o tempo de uma reação catalisada enzimaticamente afeta a sua velocidade. Para isso, simularemos uma reação com uma concentração fixa de substrato e enzima e mediremos sua velocidade após 10, 20 ou 30 minutos de reação. Na tela do “Experimento 1” vocês podem visualizar uma bancada de laboratório e, acima dela, um tubo de ensaio, um recipiente contendo o substrato da reação e um tubo cônico contendo a enzima.
  - a) Posicione o cursor em cima do recipiente contendo o substrato da reação. Você perceberá que, neste momento, aparecerá a imagem de uma mão segurando uma micropipeta.
  - b) Clique com o botão esquerdo do *mouse* e mantenha o botão apertado. Você perceberá que um determinado volume do substrato foi captado pela micropipeta.
  - c) Arraste a figura com o auxílio do *mouse* até o tubo de ensaio que aparece à esquerda. Solte o botão esquerdo do *mouse*. Neste momento, o substrato é liberado pela micropipeta dentro do tubo de ensaio.
  - d) Agora adicione a enzima ao tubo de ensaio contendo o substrato. Para isso siga os mesmos procedimentos descritos anteriormente: posicione o cursor sobre o tubo cônico contendo a enzima, aperte e segure o botão esquerdo do *mouse*, arraste a imagem para cima do tubo de ensaio e solte o botão esquerdo do *mouse*.

e) O próximo passo é escolher o tempo de reação clicando em uma das opções (10, 20 ou 30 minutos) que aparecem no temporizador localizado do lado direito da tela. Num primeiro momento, selecione a opção de 10 minutos de reação.

f) Clique em “Reagir”. Neste momento é dado início à reação e a formação de produtos o que pode ser observado pela mudança da cor inicial da solução contida no tubo de ensaio de azul para arroxeadado.

g) Após a reação ter sido completada, clique em “Dosar” do lado direito da tela.

h) Uma nova tela será aberta exibindo o resultado de dosagem da massa dos produtos obtidos nos 10 minutos de reação. Abaixo é perguntado qual a velocidade da reação. Clique na resposta correta e, a seguir, em “Pronto”. Uma nova janela será aberta indicando se sua resposta está correta ou não.

**Atenção:** Responda à pergunta tendo atenção as unidades de medida com que o resultado é mostrado!!

i) Faça as repetições do experimento com reações ocorrendo por 20 e 30 minutos. Para isso, clique novamente em “Experimento 1” e siga os passos descritos anteriormente alterando apenas o tempo de reação desejado.

3. No “**Experimento 2**” verificaremos como a concentração de substrato [S] influencia na velocidade da reação enzimática. Para entender este experimento é preciso que você leve em consideração que **em todos os tubos de ensaio mostrados a concentração da enzima [E] foi constante e sempre menor que a do substrato [S]**! De fato, o experimento 2 é exatamente igual ao experimento 1 mas realizado com vários tubos de ensaio contendo concentrações diferentes de substrato. Então, vamos lá!

a) Na tela do “Experimento 2” clique e “Substrato” na parte superior esquerda da tela. Repare que ao fazer isso os tubos de ensaio (mostrados na parte inferior da tela) são preenchidos com o substrato em valores crescentes de concentração (0-100 mM, como mostrado na tabela). Esse aumento de concentração pode ser facilmente observado pelo gradual aumento da tonalidade das soluções contidas nos tubos de ensaio.

b) Agora clique em “Enzima” para adicionar enzima em cada um dos tubos de ensaio previamente preenchidos com o substrato. Repare que a mesma quantidade de enzima foi adicionada em cada tubo (1  $\mu\text{M}$ , segundo a tabela mostrada), ou seja, os tubos de ensaio contêm quantidades diferentes de substrato mas exatamente a mesma concentração de enzima!

c) Clique na opção “10 minutos” como tempo de reação.

d) Clique em “Reagir”.

e) Clique em “Dosar” para obter de concentração dos produtos gerados em cada tubo. Repare que esses valores são mostrados em vermelho na tabela central e, também, no gráfico. Dica: Repare na coloração de cada tubo após a reação. Veja que essa coloração aumenta de tonalidade mostrando aumento de produtos formados exatamente como mostrado no gráfico! Dica: Copie a imagem da tabela (e cole em um arquivo indicando que os valores são referentes a 10 minutos de reação) para ter acesso aos valores de concentração dos produtos formados!

f) Clique na opção “20 minutos” como tempo de reação.

g) Clique em “Reagir”.

h) Clique em “Dosar” para obter de concentração dos produtos gerados em cada tubo. Repare que, novamente, esses valores são mostrados em vermelho na tabela central e, também, no gráfico. Adicionalmente, no gráfico, podemos comparar os valores obtidos na primeira reação (10 minutos) com os obtidos na reação de 20 minutos. Dica: Copie a imagem da tabela (e cole em um arquivo indicando que os valores são referentes a 20 minutos de reação) para ter acesso aos valores de concentração dos produtos formados!

i) Clique na opção “30 minutos” como tempo de reação.

j) Clique em “Reagir”.

k) Clique em “Dosar” para obter a concentração dos produtos gerados em cada tubo. Repare que, novamente, esses valores são mostrados em vermelho na tabela central e, também, no gráfico. Adicionalmente, no gráfico, podemos comparar os valores obtidos na primeira reação (10 minutos) e segunda reação (20 minutos) com os obtidos na reação de 30 minutos. Dica: Copie a imagem da tabela (e cole em um arquivo indicando que os valores são referentes a 30 minutos de reação) para ter acesso aos valores de concentração dos produtos formados!

l) Observe o gráfico obtido. Dica: Antes de continuar a simulação vamos pensar um pouco em como imaginamos ser o gráfico de representação da velocidade ( $V_0$ ) x concentração de substrato [S] para este experimento? Para isso, com os valores de [P] obtidos anteriormente calcule a velocidade da reação para cada tubo em cada um dos tempos de reação estudados e represente graficamente.

m) Ao final, clique em “Velocidade” e observe o gráfico obtido. **Repare que para um mesmo tubo (ou seja, para uma mesma concentração de substrato), a velocidade da reação não muda sendo independente do tempo de reação! (Isso, claro, levando em consideração que tenhamos no tubo uma concentração bem maior de substrato que de enzima durante todo o tempo de reação, como foi o caso do experimento realizado!)**

4. No “**Experimento 3**” estudaremos o que acontece com a velocidade de uma reação na ausência e presença de um inibidor não-competitivo. Leve em consideração que em todos os tubos de ensaio mostrados a concentração da enzima [E] foi constante e sempre menor que a do substrato [S]! Além disso, para todos os tubos o tempo de reação foi o mesmo, 20 minutos!

a) Na tela do “Experimento 3” clique em “Substrato” na parte superior esquerda da tela. Repare que ao fazer isso os tubos de ensaio (mostrados na parte inferior da tela) são preenchidos com o substrato em valores crescentes de concentração (0-100 mM, como mostrado na tabela). Esse aumento de concentração pode ser facilmente observado pelo gradual aumento da tonalidade das soluções contidas nos tubos de ensaio.

b) Agora clique em “Enzima” para adicionar enzima em cada um dos tubos de ensaio previamente preenchidos com o substrato. Repare que a mesma quantidade de enzima foi adicionada em cada tubo (1  $\mu$ M, segundo a tabela mostrada), ou seja, os tubos de ensaio contêm quantidades diferentes de substrato mas exatamente a mesma concentração de enzima!

c) Clique em “Inibidor”. Uma nova janela será aberta mostrando três opções de concentrações de inibidores disponíveis: i, 2i ou 3i. Escolha (clique) a opção de menor concentração, ou seja, “i”.

d) Clique “20 minutos” para determinar o tempo de reação.

e) Clique em “Reagir”.

f) Clique em “Dosar” para obter os valores de concentração dos produtos gerados em cada tubo, os quais serão mostrados (em vermelho) tabela central. Dica: Antes de continuar a simulação vamos pensar um pouco em como imaginamos ser o gráfico de representação da velocidade ( $V_0$ ) x concentração de substrato [S] para este experimento? Para isso, com os valores de [P] obtidos calcule a velocidade da reação para cada tubo e represente graficamente. Insira no mesmo gráfico os valores de velocidade para cada tubo quando a reação ocorre na ausência de inibidor (calculados previamente no experimento 2 quando o tempo de reação também é selecionado em 20 minutos). Compare os valores!

g) Clique em “Velocidade”. Será mostrado no gráfico  $V_0$  x [S] a velocidade da reação na presença de inibidor e em sua ausência.

h) Agora você fará novamente a mesma reação nas mesmas condições anteriores mudando apenas a concentração do inibidor que será o dobro da anterior. Para isso, faça o indicado nos passos “a” e “b” já descritos anteriormente e no passo “c” selecione uma concentração de inibidor igual a “2i”.

i) Proceda como já descritos nos passos “d”, “e”, “f” e “g”.

j) Agora você fará novamente a mesma reação nas mesmas condições anteriores mudando apenas a concentração do inibidor que será o triplo da primeira reação realizada. Para isso, faça o indicado nos passos “a” e “b” já descritos anteriormente e no passo “c” selecione uma concentração de inibidor igual a “3i”.

k) Proceda como já descrito nos passos “d”, “e”, “f” e “g”.

5. No “**Experimento 4**” estudaremos o que acontece com a velocidade de uma reação na ausência e presença de um inibidor competitivo. Leve em consideração que em todos os tubos de ensaio mostrados a concentração da enzima [E] foi constante e sempre menor que a do substrato [S]! Além disso, para todos os tubos o tempo de reação foi o mesmo, 20 minutos!

a) Na tela do “Experimento 4” clique em “Substrato” na parte superior esquerda da tela. Repare que ao fazer isso os tubos de ensaio (mostrados na parte inferior da tela) são preenchidos com o substrato em valores crescentes de concentração (0-100 mM, como mostrado na tabela). Esse aumento de concentração pode ser facilmente observado pelo gradual aumento da tonalidade das soluções contidas nos tubos de ensaio.

b) Agora clique em “Enzima” para adicionar enzima em cada um dos tubos de ensaio previamente preenchidos com o substrato. Repare que a mesma quantidade de enzima foi adicionada em cada tubo (1  $\mu$ M, segundo a tabela mostrada), ou seja, os tubos de ensaio contêm quantidades diferentes de substrato mas exatamente a mesma concentração de enzima!

c) Clique em “Inibidor”. Uma nova janela será aberta mostrando três opções de concentrações de inibidores disponíveis: i, 2i ou 3i. Escolha (clique) a opção de menor concentração, ou seja, “i”.

d) Clique “20 minutos” para determinar o tempo de reação.

e) Clique em “Reagir”.

f) Clique em “Dosar” para obter os valores de concentração dos produtos gerados em cada tubo os quais serão mostrados (em vermelho) tabela central. Dica: Antes de continuar a simulação vamos pensar um pouco em como imaginamos ser o gráfico de representação da velocidade ( $V_0$ ) x concentração de substrato [S] para este experimento? Para isso, com os valores de [P] obtidos calcule a velocidade da reação para cada tubo e represente graficamente. Insira no mesmo gráfico os valores de velocidade para cada tubo quando a reação ocorre na ausência de inibidor (calculados previamente no experimento 2 quando o tempo de reação também é selecionado em 20 minutos)\*. Compare os valores!

\*Infelizmente os valores mostrados no software para a reação sem inibidor não são compatíveis para comparação com os experimentos na presença de inibidor competitivo. Neste caso, suponha que no experimento 2 os valores de produtos obtidos tenham sido os mostrados na tabela abaixo:

Sem Inibidor	
[Substrato] mM	[Produto] mM
0	0
10	95
20	130
30	149
40	161
50	170
60	176
70	181
80	185
90	188
100	190

g) Clique em “Velocidade”. Será mostrado no gráfico  $V_0$  x [S] a velocidade da reação na presença de inibidor e em sua ausência.

h) Agora você fará novamente a mesma reação, nas mesmas condições anteriores mudando apenas a concentração do inibidor que será o dobro da anterior. Para isso, faça o indicado nos passos “a” e “b” já descritos anteriormente e no passo “c” selecione uma concentração de inibidor igual a “2i”.

i) Proceda como já descritos nos passos “d”, “e”, “f” e “g”.

j) Agora você fará novamente a mesma reação, nas mesmas condições anteriores mudando apenas a concentração do inibidor que será o triplo da primeira reação realizada. Para isso, faça o indicado nos passos “a” e “b” já descritos anteriormente e no passo “c” selecione uma concentração de inibidor igual a “3i”.

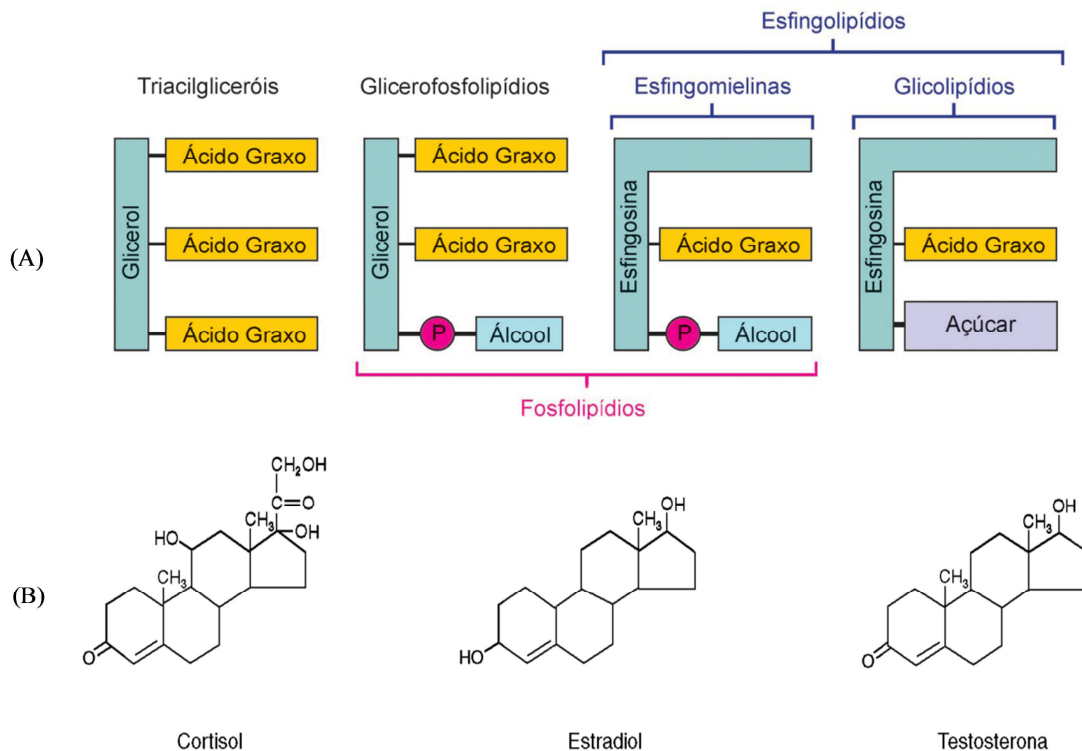


k) Proceda como já descrito nos passos “d”, “e”, “f” e “g”.

## PRÁTICA 6: PROPRIEDADES DE SURFACTANTES E LIPÍDEOS

### 5.1. INTRODUÇÃO

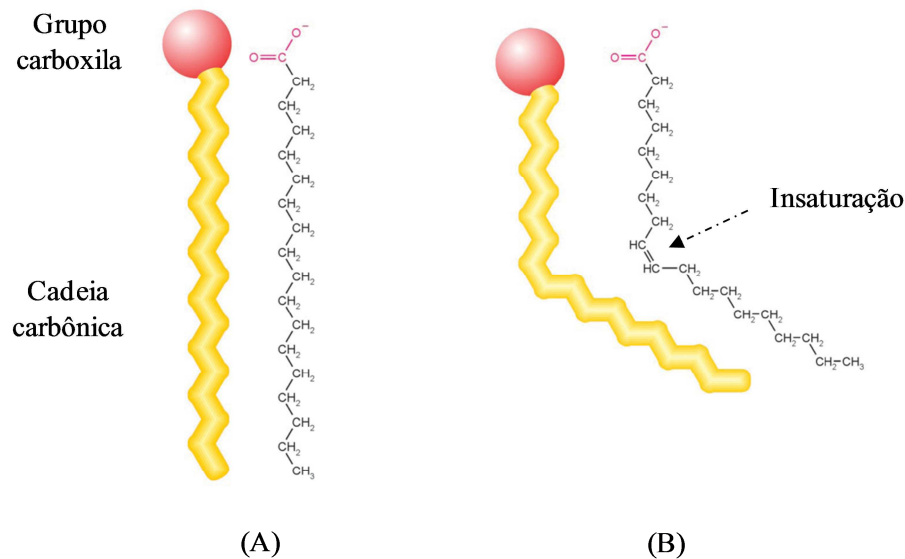
Os **lipídios** são representados por um grupo de biomoléculas baixa massa molecular que apresentam **estruturas químicas bastante variadas** esão praticamente **insolúveis em água**. A diversidade de estruturas apresentadas pelos lipídios faz com que esses compostos tenham a capacidade de exercer diversas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

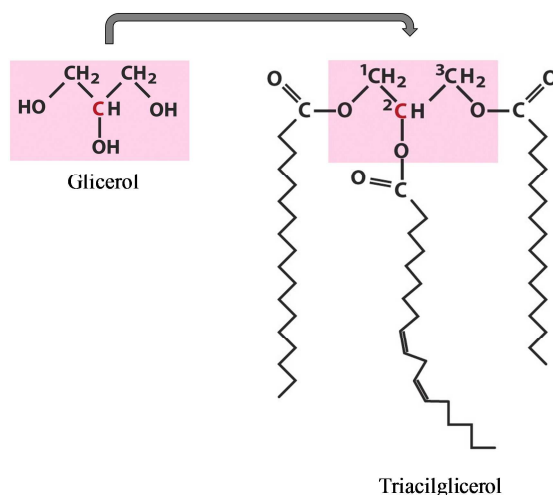
Tipicamente, os lipídios apresentam em suas estruturas longas cadeias carbônicas, como os **ácidos graxos** e **isoprenos**, ou múltiplos anéis interligados, como no caso dos **esteróides**. Várias classes de lipídios apresentam **ácidos graxos** como componentes estruturais. Ácidos graxos são ácidos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

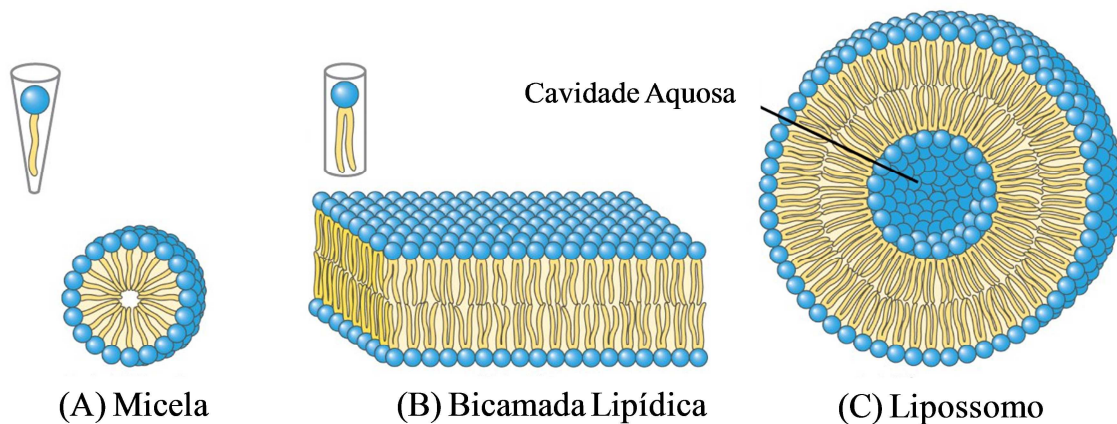
- ✓ **Ácidos graxos saturados** → Cadeia carbônica não apresentam ligações duplas entre os átomos de carbono e, assim, contem o número máximo possível de hidrogênios.
- ✓ **Ácidos graxos insaturados** → Cadeia carbônica possui uma ou mais ligações duplas entre átomos de carbono contendo o número máximo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



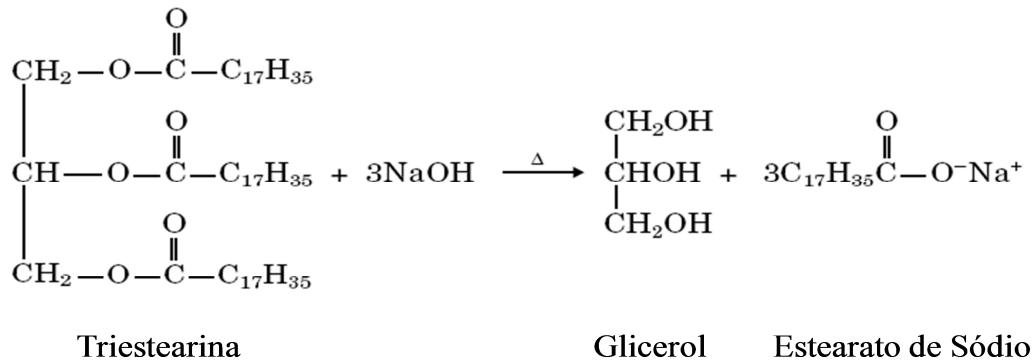
**Figura 4.** Estruturas formadas por lipídios anfipáticos em meio aquoso. (A) Micelas são formadas por moléculas de lipídios com uma única cadeia carbônica, cadeias estas que se localizam no interior dessas estruturas. (B) Bicamada lipídica é uma estrutura bidimensional na qual as cadeias carbônicas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

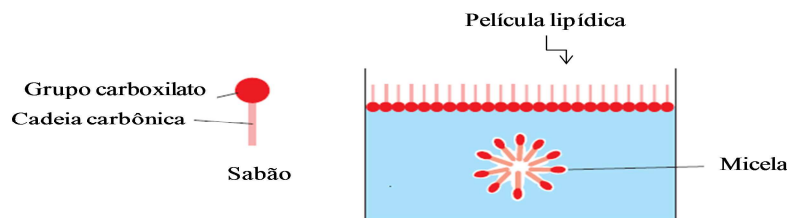
Os triacilgliceróis, que constituem o principal grupo de lipídios, podem ser hidrolisados liberando ácidos graxos e glicerol. Se esta hidrólise é feita mediante aquecimento em meio alcalino (hidrólise alcalina), formam-se sais de ácidos graxos (sabões) e o processo é chamado **saponificação**

(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 (estereato de sódio).

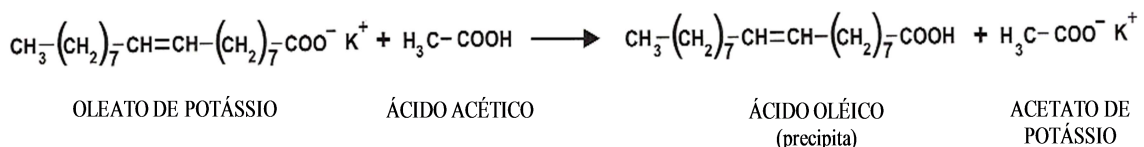
Assim como os ácidos graxos, os sabões são moléculas anfipáticas apresentando em sua estrutura uma longa cadeia carbônica (cauda apolar, lipofílica) e um grupo carboxilato (cabeça polar, hidrofílica). Dessa maneira, os sabões, quando em solução aquosa, associam-se por interações hidrofóbicas entre as caudas apolares formando um 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

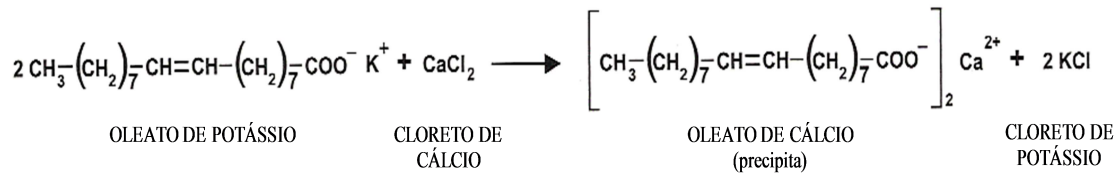
Sob condições específicas, os ácidos graxos dos sabões podem ser precipitados. A adição de ácidos fracos, como ácido acético, leva a formação de ácidos graxos insolúveis por causa do baixo grau de dissociação (Figura 7).



**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).

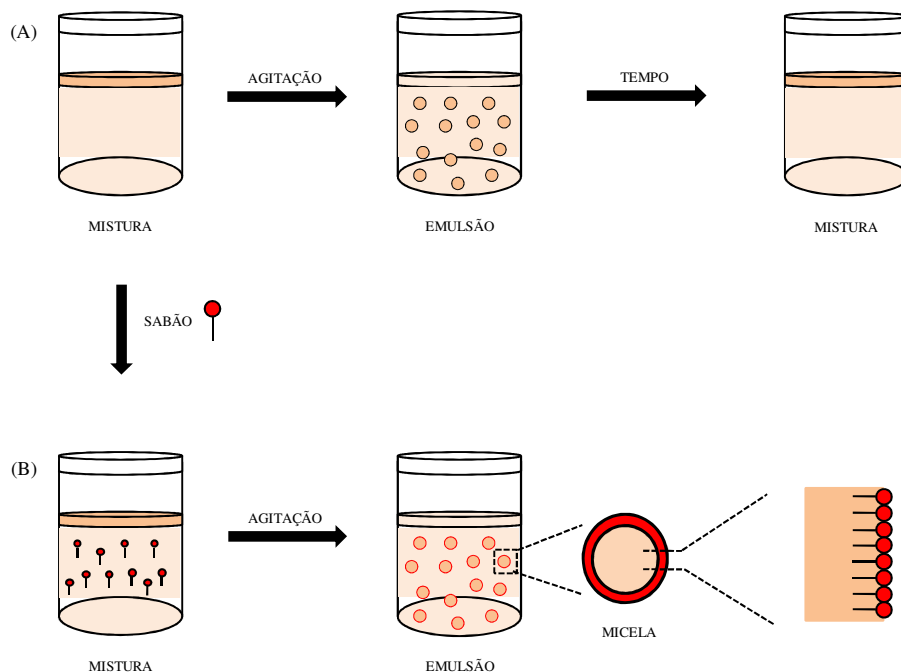
Os sabões precipitam quando são usados em águas ricas em sais de cálcio ou magnésio (águas duras). Os íons cálcio e magnésio da água reagem com ácidos graxos formando sais insolúveis. Os

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 7.** 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 8.** 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 hidrocarbonáticas 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. PROCEDIMENTOS

### 5.2.1. Experimento 1: Ponto De Fusão De Gorduras

Neste primeiro experimento temos como objetivo correlacionar a estrutura dos lipídeos presentes na manteiga, gordura vegetal hidrogenada e banha de porco com seus respectivos valores de ponto de fusão. Para isso os seguintes procedimentos devem ser realizados:

- a) Colocar 1 g de manteiga, gordura vegetal hidrogenada e banha de porco em tubos de ensaio diferentes.
- b) Colocar os tubos de ensaio em banho-maria, partindo de cerca de 30°C.
- c) Acompanhar, através do termômetro, a faixa de temperatura onde dá-se o início da fusão de cada amostra e anotar.
- d) Determinar a ordem em que as amostras começam a fundir. Para isso você pode assistir ao vídeo encontrado no *link*: <https://www.youtube.com/watch?v=kyKbqalG05U>

### 5.2.2. Experimento 2: Teste Do Azeite Extra Virgem

O objetivo desta prática é demonstrar a relação entre a presença de insaturações em óleos vegetais e seus pontos de fusão. Para isso estudaremos o que acontece com óleos de oliva virgem e extra virgem de diferentes marcas quando submetidos à baixas temperaturas por 2 horas. O procedimento completo é mostrado no vídeo que pode ser acessado pelo *link* abaixo:

<https://www.youtube.com/watch?v=slmgGaD00Rg>

### 5.2.3. Experimento 3: Saponificação

Como mencionado anteriormente, esterificar os ácidos graxos ao glicerol é uma estratégia do organismo para conseguir armazenar energia na forma de uma molécula anidra. Se num momento de oferta de alimentos podemos armazenar o excesso de nutrientes na forma de triacilglicerol, no jejum ou durante o exercício físico podemos recorrer a esta reserva para obter energia. Para isso, a molécula de triacilglicerol é hidrolisada a ácidos graxos e glicerol, ou seja, as mesmas moléculas usadas para sua síntese. Em nosso organismo essa reação só ocorre quando necessário sendo catalisada por enzimas chamadas lipases. Os ácidos graxos liberados, assim como o glicerol, podem ser oxidados para a obtenção de energia. Mas não é somente no jejum que ocorre a quebra dos triacilgliceróis. Durante o exercício físico a adrenalina também induz a quebra das moléculas de triacilgliceróis do tecido adiposo através da ativação de lipases. Neste caso, os ácidos graxos liberados são usados como fonte de energia

principalmente pelo tecido muscular que tem sua demanda energética aumentada durante o exercício físico.

Neste experimento verificaremos o que ocorre quando a quebra de triacilgliceróis ocorre em uma situação diferente: na presença de íons sódio e ambiente alcalino! Para isso assista aos vídeos indicados que podem ser acessados através dos *links* abaixo:

Vídeo 1: <https://www.youtube.com/watch?v=uLp7Uyc1H6I>

Vídeo 2: [https://www.youtube.com/watch?v=V8\\_XjFpKg2A](https://www.youtube.com/watch?v=V8_XjFpKg2A)

Os vídeos mostram o processo de saponificação onde triacilgliceróis (presentes em óleos ou gorduras) quando em presença de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio e ambiente alcalino são convertidos em glicerina e um sal de ácido graxo, o sabão.

#### **5.3.4. Experimento 4: Propriedade Emulsificante Dos Sabões**

No experimento anterior aprendemos como os ácidos graxos livres e aqueles obtidos da hidrólise alcalina de triacilgliceróis podem ser convertidos em sabão. É a partir de sabões e detergentes que derivam os sabonetes, os xampus, os cremes dentais, os sabões especiais para máquinas de lavar louça e roupas, os detergentes desinfetantes, o sabão comum e outros. O sabão e seus derivados têm uma característica importante: agem como tensoativos (surfactantes) e são capazes de limpar sujeiras! O objetivo deste experimento é mostrar como a estrutura da molécula de sabão lhe confere propriedades capazes de induzir a remoção de sujeiras quando em contato com a água. Para isso será necessário que você assista ao vídeo disponibilizado pelo *link*:

<https://www.youtube.com/watch?v=xkYH9ghFuw0>

Como este vídeo auxilia no entendimento de como os sabões removem sujeiras?

Bom, para entender como isso ocorre devemos antes descrever o que entendemos ser a “sujeira” removida pelos sabões. Quando dizemos que limpamos uma superfície apenas lavando com água podemos supor que conseguimos retirar da superfície apenas aqueles materiais cujas moléculas têm capacidade de se ligar ou interagir com as moléculas de água. Basicamente seria jogar água numa superfície, a água se ligar a “sujeira hidrofílica” que então deixa a superfície sendo removida junto com a água. Contudo nós sabemos que lavar roupas, louça, uma superfície ou mesmo as mãos não é algo que se possa fazer apenas com água. Isso se deve ao fato de que todo tipo de sujeira que tem sua molécula com caráter hidrofóbico (a maioria das sujeiras!) não pode ser removida com água. Ao tentarmos lavar uma panela com óleo vemos o quanto isso é difícil. O óleo parece permanecer aderido à panela. De fato, o óleo não interage com a água como é mostrado no vídeo onde óleo e água formam duas fases distintas. Contudo, quando um sabão ou detergente é utilizado conseguimos remover facilmente o óleo da panela, assim como o sabonete é capaz de remover as sujeiras hidrofóbicas das mãos, o xampu a sujeira dos cabelos e assim por diante. Para isso utilizamos o sabão, detergente ou xampu e logo após fazemos o enxague com água! O experimento mostrado no vídeo nos ajuda a



entender como isso acontece. No vídeo, o detergente de alguma maneira consegue fazer o óleo “interagir” com a água o que seria equivalente a fazer a gordura da panela se solubilizar na água que usaremos para enxaguá-la. Como o detergente, assim como os sabões, sabonetes e produtos de limpeza conseguem fazer isso?

## **BIBLIOGRAFIA E ORIENTAÇÕES PARA ESTUDO**

Para o melhor entendimento das práticas realizadas são sugeridas leituras relacionadas aos seguintes temas:

- Ácidos graxos: composição, estrutura, propriedades
- Saponificação
- Emulsão, surfactantes

Para o estudo dos tópicos acima pode ser utilizado qualquer livro de Bioquímica. Abaixo algumas sugestões de bibliografias:

Apostila **Trabalhando A Química Dos Sabões E Detergentes**. Odone Gino Zago Neto e José Claudio Del Pino. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química. Ótima apostila com textos didáticos e esclarecedores sobre os tópicos abordados nesta aula prática. Pode ser obtido pelo link: [http://www.quimica.seed.pr.gov.br/arquivos/File/AIQ\\_2011/saboes\\_ufrgs.pdf](http://www.quimica.seed.pr.gov.br/arquivos/File/AIQ_2011/saboes_ufrgs.pdf)

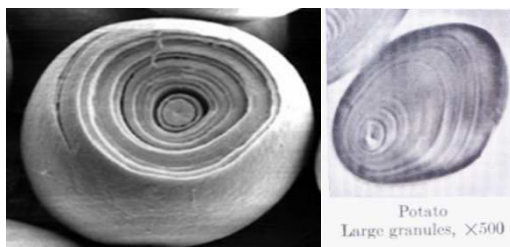
## PRÁTICA 7: CARBOIDRATOS: ESTRUTURA E PROPRIEDADES.

### 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).

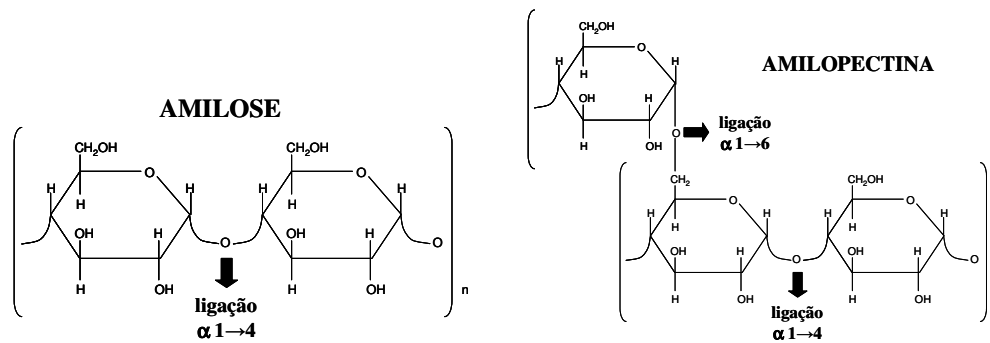


**Fig. 1.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) à esquerda e microscopia óptica à direita de um grânulo de amido.

(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).

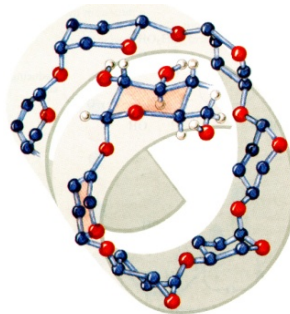
O amido é um polissacarídeo sintetizado pelos vegetais e tem a função de reserva energética, semelhante ao glicogênio nas células animais. Estruturalmente, o amido é formado pela mistura de dois polímeros, a amilose e a amilopectina, que são homopolissacarídeos constituídos por resíduos de  $\alpha$ -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-hidroxi aldeídos ou poli-hidroxi cetonas 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) fazer a reação de identificação com iodo, variando condições de temperatura, utilizando tubos abertos e tampados;
- b) 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. PROCEDIMENTOS

### 6.3.1. Experimento 1: Reação Do Amido Com O Lugol

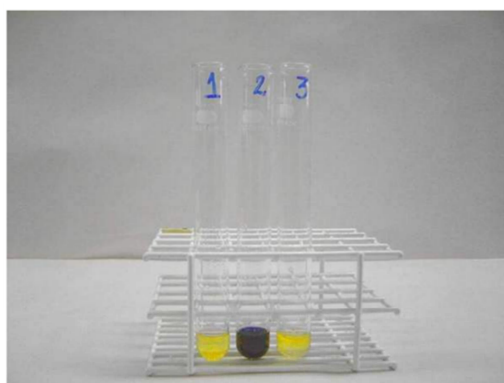
O amido é um polissacarídeo de extrema importância em alimentos sendo produzido em grandes quantidades nas folhas dos vegetais como forma de armazenamento dos produtos da fotossíntese. De fato, o amido nada mais é que um polímero formado pela ligação de moléculas de glicose. Neste experimento uma solução de amido e outra de moléculas de glicose livre são misturadas ao reagente de lugol, uma mistura de iodo ( $I_2$ ) e iodeto de potássio (KI). A princípio poderíamos pensar que o resultado seria o mesmo para as duas soluções já que ambas são formadas apenas de glicose. Contudo ... o resultado não é o mesmo! O experimento abaixo, dividido em parte I e parte II, nos ajuda a compreender melhor o que acontece nesta situação.

#### PARTE 1

1. Identifique 3 tubos de ensaios como tubo 1, tubo 2 e tubo 3
2. Ao tubo 1 adicione 2 mL de água destilada (tubo controle)
3. Ao tubo 2 adicione 2 mL de solução de amido
4. Ao tubo 3 adicione 2 mL de solução de glicose

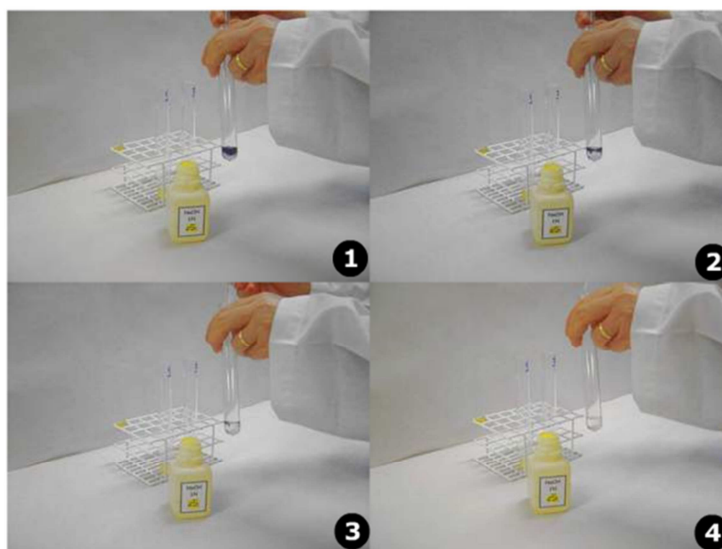


5. A cada um dos tubos adicione 4 gotas do reagente de lugol. Observe a coloração obtida em cada tubo

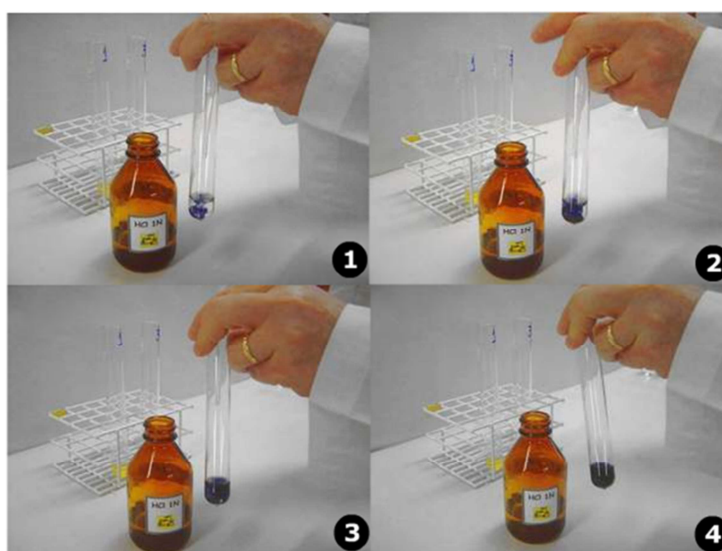


## PARTE 2

1. Ao tubo 2, contendo amido, adicione 5 gotas de NaOH 1M. Observe o resultado.



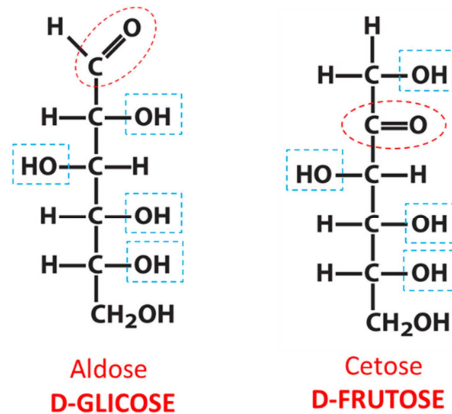
2. Em seguida, adicionar 5 gotas de HCl 1M. Observe o resultado.



### 6.3.2. Experimento 2: Pesquisa De Açúcares Redutores Com Reagente De Benedict

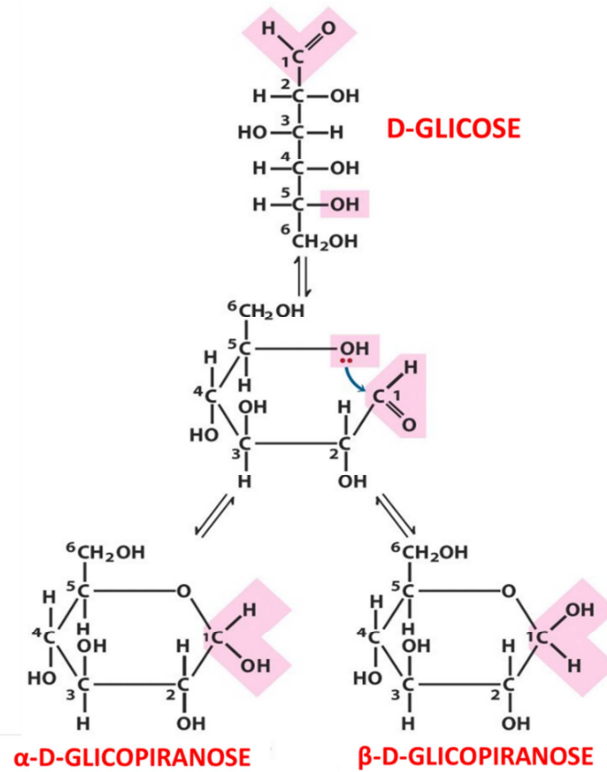
Nesta prática utilizaremos o reagente de Benedict (uma fonte de  $\text{Cu}^{2+}$ ) para determinar o poder redutor de diferentes açúcares (amido, glicose, sacarose, frutose, lactose e maltose). Todos os monossacarídeos apresentam a capacidade de agir como agentes redutores. Contudo, dissacarídeos e outras estruturas nem sempre apresentam esta propriedade. Para entendermos por que isso ocorre, precisamos saber um pouco mais sobre açúcares redutores, como são caracterizados quanto a estrutura e porque possuem a capacidade de reduzir outras moléculas.

Você deve se lembrar que na aula teórica sobre carboidratos essas moléculas foram definidas como polioidroxialdeídos ou polioidroxicetonas, certo? A própria definição nos ajuda a entender a estrutura dessas moléculas: polioidroxi = vários grupos hidroxila (OH) ; aldeído, cetona = possuem grupo carbonila (carbono ligado por ligação dupla ao oxigênio) na extremidade da cadeia carbônica (no caso das aldoses) ou em carbono dentro da cadeia (no caso de cetonas). Veja abaixo a figura onde as moléculas de glicose e frutose são apresentadas.

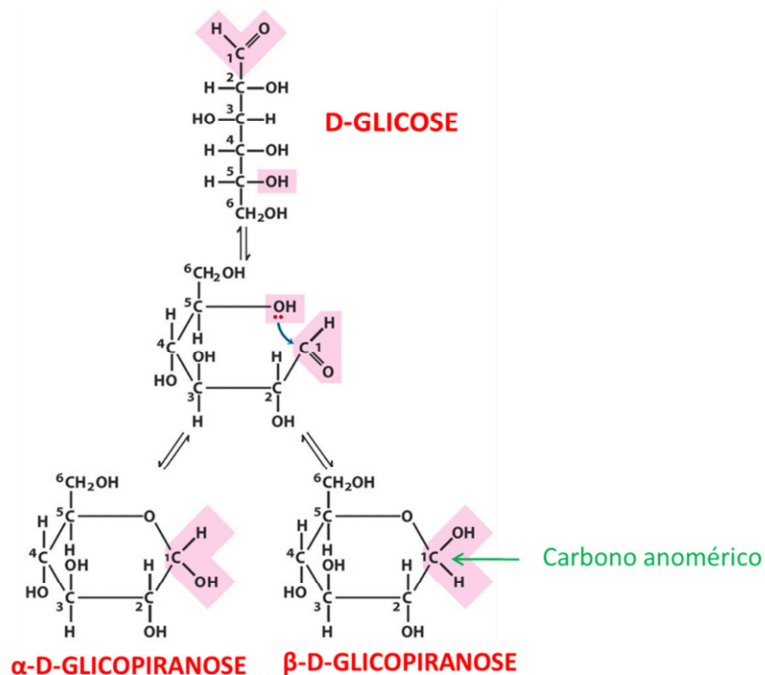


Repare que a molécula de glicose é uma aldose pois tem a carbonila posicionada no carbono 1 (extremidade da cadeia). Já a frutose é uma cetose pois a carbonila se posiciona no carbono 2 (dentro da cadeia). Para você compreender como um açúcar funciona como molécula redutora é sempre importante que saiba exatamente qual de seus carbonos possuem a carbonila pois é justamente os ligantes desse carbono que determinarão a capacidade de redução do açúcar.

Na natureza, monossacarídeos com 4 ou mais carbonos tendem a apresentar-se na forma cíclica quando em solução aquosa. Veja só o que acontece com a molécula de glicose neste processo;

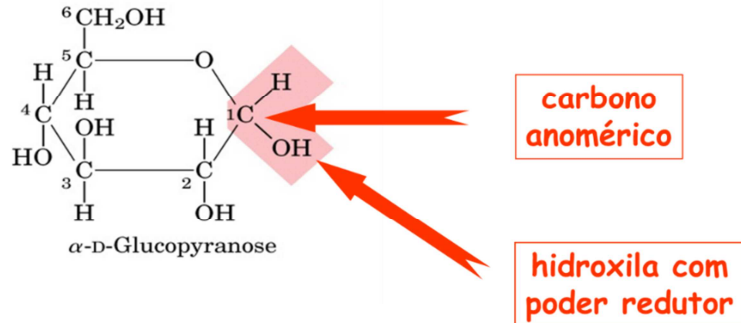


Perceba que o carbono 1 (aquele que apresenta a carbonila) reage com uma hidroxila presente no carbono 5 dando origem a uma molécula de estrutura cíclica e que agora possui mais um grupo hidroxila (OH) ligado ao carbono que antes apresentava a carbonila. Este carbono que agora se apresenta ligado a hidrogênio e hidroxila é chamado de carbono quiral ou anomérico. Isso porque agora ele está ligado a 4 grupos diferentes (H, OH, C, O) e pode dar origem a isômeros. Veja que antes esse carbono não apresentava essa propriedade pois estava ligado por ligação dupla ao oxigênio.

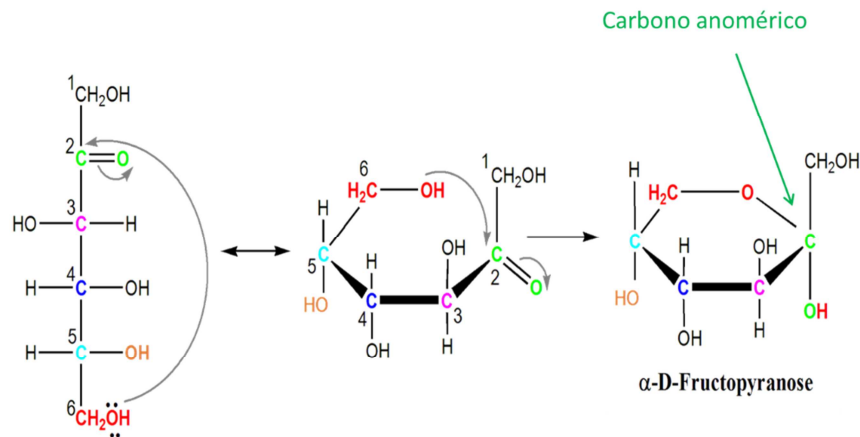




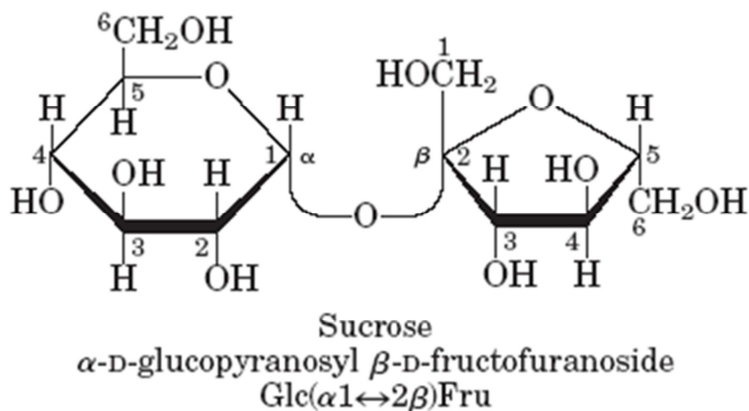
Resumindo, aquele carbono que apresentava a carbonila na molécula de glicose, deu origem a um carbono quiral na molécula de glicose ciclizada o qual apresenta uma ligação a hidroxila. É justamente essa hidroxila que dá característica a molécula de poder redutor já que ela pode transferir elétrons para outra molécula.



No caso da frutose, outro monossacarídeo, acontece a mesma coisa. Contudo, como o carbono da carbonila era o 2 então é este carbono que dá origem ao carbono quiral, como mostrado abaixo.

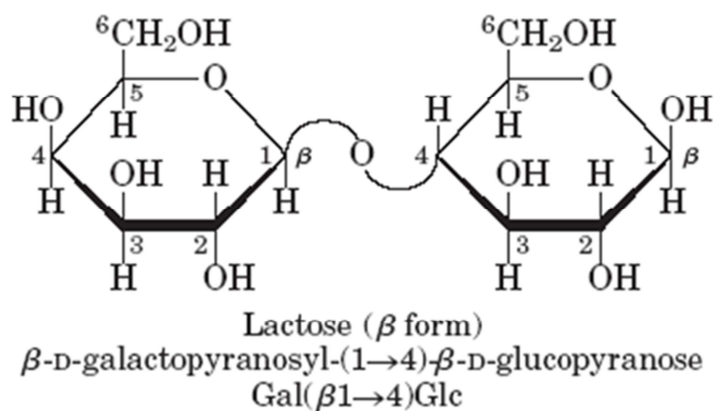


Todo monossacarídeo será redutor pois apresenta a hidroxila do carbono quiral livre para reagir com outras moléculas. Mas o que acontece quando essa molécula se une a outro monossacarídeo formando um dissacarídeo? O que acontece com a capacidade de redução dos monossacarídeos quando estão em estruturas moleculares maiores? Para saber se essas moléculas ainda apresentam a capacidade de redução é simples: veja se o carbono quiral e a hidroxila redutora ainda estão livres ou se participaram da união das moléculas e não se encontram mais disponíveis. No primeiro caso a molécula continua sendo redutora e no segundo caso já não apresenta mais essa característica justamente pelo fato da hidroxila com capacidade redutora ter sido utilizada em outra reação. Veja o exemplo abaixo da molécula de sacarose.



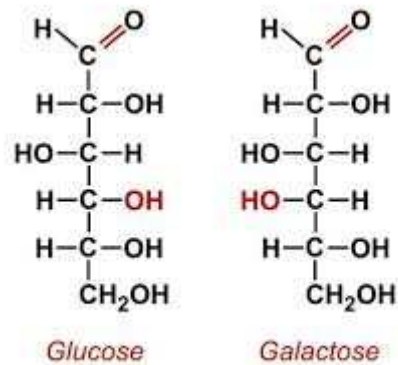
A molécula de sacarose é um dissacarídeo formado pela ligação covalente entre dois monossacarídeos, a glicose e a frutose. Repare que essa ligação ocorre exatamente entre o carbono 1 da glicose e o carbono 2 da frutose. Se lembrarmos da estrutura da glicose na forma livre vamos lembrar que o carbono 1 era justamente aquele carbono que se tornou o carbono anomérico com a hidroxila com poder redutor. Logo, essa molécula de glicose não é mais redutora pois essa hidroxila reagiu com a frutose formando a ligação entre as duas moléculas. E a frutose, ainda conserva seu poder redutor após se ligar à glicose formando a sacarose? Veja que o carbono da frutose que reagiu com a glicose é o carbono 2, exatamente o carbono quiral da molécula de frutose ciclizada. Logo, a hidroxila com poder redutor que estava neste carbono também foi perdida durante a ligação à glicose. Podemos então concluir que ambos os carbonos quirais, tanto da glicose quanto da frutose, participaram da ligação entre as moléculas durante a formação da sacarose. Com isso, ambas das hidroxilas redutoras foram perdidas e a molécula final formada, a sacarose, não tem poder redutor.

Vejamos agora um segundo exemplo com a lactose, o açúcar presente no leite. A lactose é um dissacarídeo formado pela ligação covalente entre galactose e glicose.

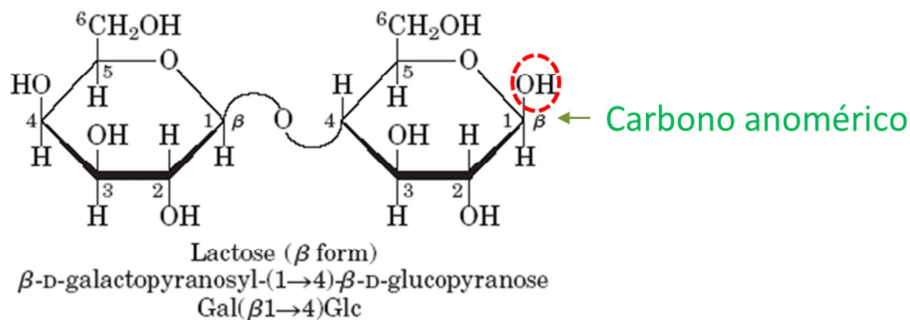


Acima podemos ver que a ligação entre as duas moléculas se dá pela reação do carbono 1 da galactose com o carbono 4 da glicose. A primeira pergunta que nos fazemos é: o carbono 1 da

galactose é o carbono quiral? Para responder a essa pergunta vamos recorrer a uma figura que mostra a estrutura da galactose na forma aberta.



Veja que a molécula de galactose é uma aldose assim como a glicose, ou seja, possui a carbonila na extremidade da cadeia, no carbono 1. Logo, o carbono 1 é o carbono quiral na molécula de galactose ciclizada. Na formação da lactose é justamente este carbono que participa da ligação covalente então podemos concluir que na molécula de lactose a galactose perde seu potencial redutor. E a molécula de glicose? Veja que na ligação à galactose é o carbono 4 quem participa da reação. Como vimos anteriormente, a hidroxila com poder redutor da glicose está no carbono 1 e não no carbono 4. Veja que a hidroxila redutora do carbono 1 está livre na molécula da lactose.



Dessa maneira podemos dizer que a molécula de lactose é redutora já que ainda apresenta uma hidroxila redutora livre (na molécula de glicose).

Agora vamos verificar o poder redutor de outras moléculas através do uso do reagente de Benedict que nada mais que uma fonte de  $\text{Cu}^{2+}$  em ambiente alcalino. Neste teste, a presença de um açúcar redutor promove a redução do cobre.

## PARTE 1

1. Numere 5 tubos de ensaio
2. Ao tubo 1 adicione 1 mL de solução de amido

3. Ao tubo 1 adicione 1 mL de solução de sacarose
4. Ao tubo 1 adicione 1 mL de solução de glicose
5. Ao tubo 1 adicione 1 mL de solução de frutose
6. Ao tubo 1 adicione 1 mL de água destilada (controle)



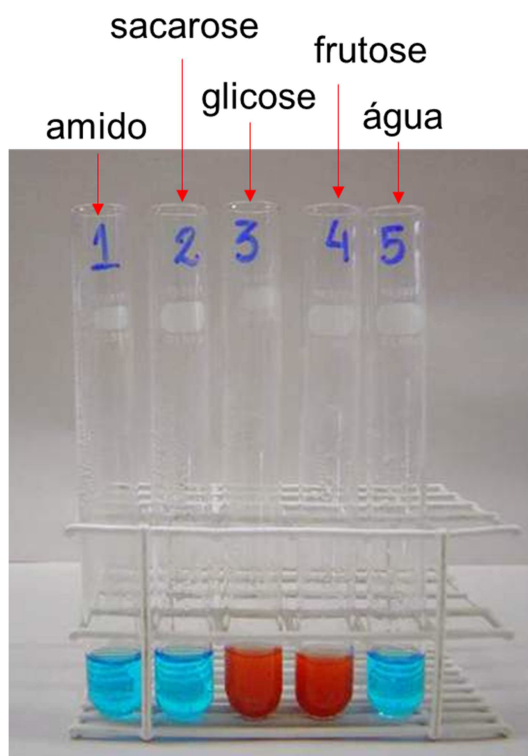
7. Adicionar 2 mL de reagente de Benedict a cada um dos tubos



8. Aquecer em banho-maria fervente durante 5 minutos.



9. Após esfriar, observar e descrever os resultados.



## PARTE 2

Assista ao vídeo disponível pelo link abaixo onde lactose, maltose e sacarose são avaliadas quanto ao poder redutor com reagente de Benedict.

<https://www.youtube.com/watch?v=N5OSEbHb5us>

Observação: Neste vídeo o produto formado pela reação do cobre com o açúcar redutor também é vermelho (tijolo). Contudo, os tubos aparecem esverdeados pois neste caso o azul da reagente de Benedict acaba se sobressaindo e alterando a visualização do precipitado que ainda é de vermelho!

## ORIENTAÇÕES PARA ESTUDO

Para o melhor entendimento das práticas realizadas são sugeridas leituras relacionadas aos seguintes temas:

- Carboidratos: composição, estrutura, propriedades
- Amido: estrutura
- Ciclização de monossacarídeos

## 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. Technol. 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.