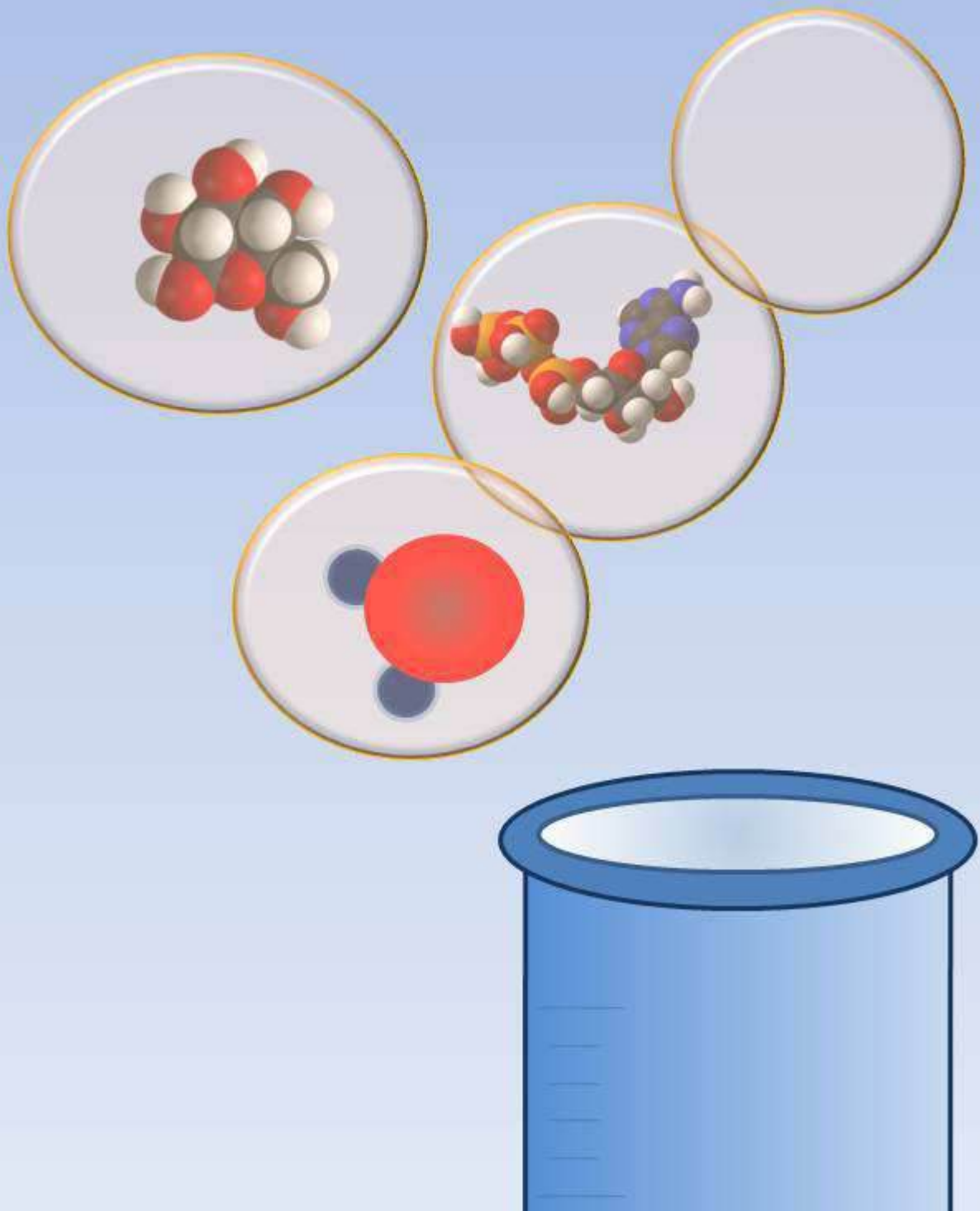


BIOQUÍMICA PRÁTICA

Protocolos para análise de biomoléculas e
exercícios complementares



BIOQUÍMICA PRÁTICA

Protocolos para análise de biomoléculas e exercícios complementares

BIOQUÍMICA PRÁTICA

Protocolos para análise de biomoléculas e exercícios complementares

Corpo técnico:

Profa. Dra. Ana Paula S. Azevedo dos Santos

Profa. Ms Barbara Tereza Fonseca Silva

Profa. Ms. Débora Luana Ribeiro

Profa. Dra. Elizabeth S. Barcelos Barroqueiro

Profa. Dra. Maria do Socorro S. Cartagenes

Profa. Dra. Sandra Nunes

Profa. Ms. Selma do Nascimento Silva

Profa. Ms. Serlyjane Penha H. Nunes

Colaboradores:

Cacionor Pereira da Cunha Junior

Flavio Protásio Veras

Gustavo Medeiros Frota

Jeniffer Guimarães de Sousa

Joberth Mendes Cerqueira

Maria Helena de Almeida Costa

Thais Cristina Sousa Madeira

Desing da capa:

Profa. Dra. Patrícia Silva de Azevedo

ÍNDICE

	Página
Apresentação	04
01 Regras gerais de segurança em laboratório	05
02 Preparo de soluções e reagentes	11
03 Caracterização de Carboidratos	25
04 Caracterização de Lipídios	34
05 Caracterização de Aminoácidos e Proteínas	41
06 Caracterização de Ácidos Nucléicos	48
07 Desnaturação protéica	53
08 Enzimas	59
09 Análise bioquímica da urina	69
10 Colorimetria e espectrofotometria	81
REFERÊNCIAS CONSULTADAS	89

APRESENTAÇÃO

A Bioquímica é a ciência que estuda as biomoléculas, isto é, moléculas envolvidas com a formação e viabilidade da menor unidade viva – a célula. Neste contexto, aspectos estruturais e funcionais são importantes para entendermos com estas estruturas estão envolvidas com os mecanismos de transformação ou metabolismo, permitindo a adaptação da célula ao ambiente. Outra característica da vida, a hereditariedade, só é possível devido a propriedade de algumas moléculas serem capazes de fazer cópias.

As principais biomoléculas são os carboidratos, lipídios, aminoácidos, proteínas, nucleotídeos e ácidos nucleicos. Estas juntamente com outras moléculas reguladoras como vitaminas e minerais atuam nos mecanismos de geração de energia, síntese e divisão celular. Com base em suas propriedades químicas alguns experimentos podem ser feitos de forma a caracterizar as biomoléculas e ajudar a compreender suas ações na célula.

A Bioquímica permite observar como a versatilidade das biomoléculas são determinantes para a formação da célula. Considerando que esta, compõe os tecidos, estes do sistema e por último o organismo, o entendimento das biomoléculas permite compreender como tudo funciona na sua condição mais simples.

Assim, nesta apostila iremos realizar alguns experimentos para determinar características estruturais e funcionais das principais biomoléculas e, desta forma, a facilitar o aprendizado da bioquímica e perceber esta ciência não está distante do nosso cotidiano, pelo contrário ela faz parte dele a todo momento.

1. REGRAS GERAIS DE SEGURANÇA EM LABORATÓRIO

As regras gerais de segurança em laboratório resultam de vários anos de esforços de pessoas preocupadas em tornar o trabalho no laboratório uma atividade segura. Assim, os laboratórios são lugares de trabalho que necessariamente não são perigosos, desde que certas precauções sejam tomadas.

Acidentes em laboratórios ocorrem freqüentemente em virtude da pressa excessiva na obtenção de resultados. Todo aquele que trabalha em laboratório deve ter **responsabilidade** no seu trabalho e evitar atitudes ou pressa que possam acarretar acidentes e possíveis danos para si e para os demais. Deve prestar **atenção** a sua volta e se prevenir contra perigos que possam surgir do trabalho de outros, assim como do seu próprio. O usuário de laboratório deve, portanto, adotar sempre uma atitude atenciosa, cuidadosa e metódica no que faz. Deve, particularmente, concentrar-se no trabalho que faz e não permitir qualquer distração enquanto trabalha. Da mesma forma não deve distrair os demais enquanto desenvolvem trabalhos no laboratório

PORTANTO, a observância das normas de segurança pessoal é importante para a integridade física das pessoas que atuam de forma permanente (professores e técnicos) ou eventual (pessoal de limpeza, alunos etc).

- **Vestuário Adequado**

1. Avental de mangas compridas, longos até os joelhos, com fios de algodão na composição do tecido.
2. Calça comprida de tecido **não** inteiramente sintético.
3. Sapato fechado, de couro ou assemelhado.
4. Óculos de segurança.
5. Luvas

- **Vestuário NÃO RECOMENDADO**

1. Bermuda ou short.
2. Sandália, Chinelo, Sapato aberto.
3. Uso de braceletes, correntes ou outros adereços.
4. Avental de naylon ou 100% poliéster.

HÁBITOS INDIVIDUAIS

- **Faça no Laboratório**

1. Lave as mãos antes de iniciar seu trabalho.
2. Lave as mãos entre dois procedimentos.
3. Lave as mãos antes de sair do laboratório.
4. Certifique-se da localização do chuveiro de emergência, lava-olhos, e suas operacionalizações.
5. Conheça a localização e os tipos de extintores de incêndio no laboratório.
6. Conheça a localização das saídas de emergências.

- **Não Faça no Laboratório**

1. Fumar
2. Comer
3. Correr
4. Beber
5. Sentar ou debruçar na bancada
6. Sentar no chão
7. Não use cabelo comprido solto
8. Não (ou evite) trabalhar solitário no laboratório
9. Não manuseie sólidos e líquidos desconhecidos apenas por **curiosidade**

- **Atitudes Individuais com Bicos de Gás**

1. Feche completamente a válvula de regulagem de altura de chama.
2. Abra o registro do bloqueador da linha de alimentação.
3. Providencie uma chama piloto e aproxime do bico de gás.
4. Abra lentamente a válvula de regulagem de altura de chama até que o bico de gás ascenda.
5. Regule a chama.

RISCOS RELACIONADOS AOS PRODUTOS QUÍMICOS

Os produtos químicos mais agressivos ao homem e ao meio ambiente podem ainda afetar pessoas que não têm conhecimentos de suas características, como é o caso do

pessoal da coleta de lixo, catadores de lixo etc. Estes, por serem leigos no assunto, ficam sobremaneira expostos às consequências do seu manuseio inadequado.

Além do contato direto com a pele, os diversos agentes químicos manuseados em laboratórios podem agredir o organismo humano por três vias:

a) **Por inalação:** constitui a principal via de intoxicação. A absorção de gases, vapores, poeiras e aerossóis pelos pulmões e a sua distribuição pelo sangue, que os leva às diversas partes do corpo, é extremamente facilitada pela elevada superfície dos alvéolos pulmonares. A equivocada cultura de que “laboratórios têm naturalmente odor de produtos químicos” com frequência leva a atitudes negligentes, provocando efeitos crônicos à saúde, com danos muitas vezes permanentes ou irreversíveis.

b) **Por absorção cutânea:** a pele e a gordura protetora são barreiras bastante efetivas, sendo poucas as substâncias que podem ser absorvidas em quantidades perigosas. Os efeitos mais comuns da ação de substâncias químicas sobre a pele são as irritações superficiais e sensibilizações decorrentes da combinação do contaminante com as proteínas. Como decorrência destes fatos, o agente químico pode penetrar pela pele, atingindo a corrente sanguínea. Neste sentido é necessário especial cuidado quando houver danos à integridade da pele – feridas expostas devem ser devidamente protegidas.

c) **Por ingestão:** pode ocorrer de forma acidental, ou ao ingerir partículas que estejam retidas no trato respiratório, resultantes da inalação de pós ou fumos. Os riscos de ingestão por contaminação das mãos e alimentos serão inexistentes se houver a devida atenção e higiene no trabalho.

- **Atitudes Individuais com Ácidos**

1. Adicione sempre o ácido à água; nunca faça o inverso.

- **Atitudes Individuais com Soluções**

1. Não transporte soluções em recipientes de boca largas, se tiver que efetuar-lo por certa distância, triplique sua atenção durante o percurso e solicite um colega que o acompanhe.
2. Não leve a boca a qualquer reagente químico, nem mesmo o mais diluído.
3. Certifique-se da **concentração e da data de preparação** de uma solução antes de usá-la.

4. Não pipete, aspirando com a boca, líquidos cáusticos, venenosos ou corantes, use pêra de segurança.
5. Não use o mesmo equipamento volumétrico para medir simultaneamente soluções diferentes.
6. Volumes de soluções padronizadas, tiradas dos recipientes de origem e não utilizadas, devem ser descartados e não retornados ao recipiente de origem

- **. Manuseio e cuidados com frasco de reagentes**

1. **Leia cuidadosamente o rótulo do frasco antes de utilizá-lo**, habitue-se a lê-lo, mais uma vez, ao pegá-lo, e novamente antes de usá-lo.
2. Ao utilizar uma substância sólida ou líquida dos frascos de reagentes, pegue-o de modo que sua mão proteja o rótulo e incline-o de modo que o fluxo escoe do lado oposto ao rótulo.
3. Muito cuidado com as tampas dos frascos, não permita que ele seja contaminada ou contamine-se. Se necessário use o auxílio de vidros de relógio, placas de Petri, etc. Para evitar que isso aconteça.
4. Ao acondicionar um reagente, certifique-se antes da compatibilidade com o frasco, por exemplo, substâncias sensíveis à luz, não podem ser acondicionadas em embalagens translúcidas.
5. Não cheire diretamente frascos de nenhum produto químico, [aprenda](#) esta técnica e passe a utilizá-la de início, mesmo que o frasco contenha perfume.
6. Os cuidados com o descarte de frascos vazios de reagentes não devem ser menores que os cuidados com o descarte de soluções que eles dão origem.

- **Descarte de sólidos e líquidos**

1. Deverá ser efetuado em recipientes apropriados separando-se o descarte de orgânicos de inorgânicos.

- **Cuidados com aquecimento, incluído: reação exotérmica, chama direta, resistência elétrica e banho-maria.**

1. Não aqueça bruscamente qualquer substância.
2. Nunca dirija a abertura de tubos de ensaio ou frascos para si ou para outrem durante o aquecimento.
3. Não deixe sem o aviso "**cuidado material aquecido**", equipamento ou vidraria que tenha sido removida de sua fonte de aquecimento, ainda quente e deixado repousar em lugar que possa ser tocado inadvertidamente.
4. Não utilize "chama exposta" em locais onde esteja ocorrendo manuseio de solventes voláteis, tais como éteres, acetona, metanol, etanol, etc.
5. Não aqueça fora das capelas, substâncias que gerem vapores ou fumos tóxicos.

CUIDADOS COM APARELHAGEM, EQUIPAMENTOS E VIDRARIAS LABORATORIAIS

1. Antes de iniciar a montagem, inspecione a aparelhagem, certifique-se de que ela esteja completa, intacta e em condições de uso.
2. Não utilize material de vidro trincado, quebrado, com arestas cortantes.
3. Não seque equipamentos volumétricos utilizando estufas aquecidas ou ar comprimido.
4. Não utilize tubos de vidro, termômetros em rolha, sem antes lubrificá-los com vaselina e proteger as mãos com luvas apropriadas ou toalha de pano.

SAIBA COMO AJUDAR A SI MESMO E A OUTROS MEMBROS DO LABORATÓRIO EM CASO DE EMERGÊNCIA

Memorize os número de telefone de segurança.

Bombeiros 193

Polícia 190

SAMU 192

Localize onde está o estojo de primeiros socorros

Não execute nada que você tenha dúvidas, sem antes esclarecê-las.

Relacionar os produtos químicos empregados, com danos e seus riscos, sintomas e tratamento específico.

- Em caso de acidentes deve-se, mantendo a calma, desligar todos os equipamentos e materiais próximos, evacuar a área e não permitir a entrada no laboratório de pessoas estranhas, enquanto aguarda a chegada de socorro.

Algumas providências imediatas devem ser tomadas:

- ✓ Havendo cortes não profundos, deve-se deixar sangrar um pouco e verificar se ficaram estilhaços de vidro. Lavar com água corrente e desinfetar com álcool, protegendo o ferimento com gaze esterilizada. Se houver sangramento ou hemorragia, pressionar o ferimento até cessar.
- ✓ Em caso de acidente com fogo, se as proporções não forem grandes, abafa-se a chama com pano úmido. Se alguma roupa pegar fogo nunca correr, e sim rolar no chão ou envolver-se num cobertor.
- ✓ Queimaduras térmicas, provocadas por chamas, água fervente ou placas quentes devem ser resfriadas com água e nunca gelo. Recomenda-se um jato fraco de água levemente morna ou fria, demoradamente, sobre a zona queimada. Para aliviar a ardência pode ser usado creme de sulfadiazina de prata a 1 %. Encaminhar para atendimento médico.
- ✓ Em caso de queimadura com ácido ou base, lava-se a região atingida com água corrente em abundância para remover todo o reagente. Se o produto cair no vestuário, removê-lo imediatamente. Em seguida se providencia cuidados médicos.

- ✓ Se houver queimaduras químicas nos olhos, lavá-los abundantemente com água (lava-olhos) e em seguida procurar atendimento médico.
- ✓ Quando houver inalação de gases, vapores ou poeiras, deve-se afastar a pessoa afetada da área contaminada e levá-la para outro bem arejado, afrouxar-lhe a roupa e mantê-la deitada de lado enquanto aguarda socorro médico. Nunca dar água, leite ou qualquer líquido.
- ✓ Se houver ingestão acidental de sólidos ou líquidos deve-se levar a pessoa imediatamente a um hospital, cuidando para levar junto a anotação das especificações da substância ingerida. Jamais provocar o vômito.
- ✓ Todos os acidentes devem ser imediatamente relatados ao professor responsável.

2. PREPARO DE REAGENTES E SOLUÇÕES

O preparo das soluções e reagentes consiste de uma etapa importante para um experimento bem sucedido. Para isso é necessário verificar as normas técnicas relacionadas ao preparo de soluções, observar os rótulos dos produtos a serem manipulados, averiguar possíveis incompatibilidades e condições físico-químicas para manipulação e atentar para a concentração.

A validade dos produtos é variável dependendo do local de armazenamento (temperatura, umidade, incidência de luz, entre outros). Entretanto qualquer modificação no aspecto da solução se faz prudente descartá-la, atentando para as normas de segurança quanto à eliminação de resíduos.

Assim para evitar desperdícios, observamos a rotina do laboratório e manipulamos um volume de solução suficiente para, no máximo, um ano de duração.

SOLUÇÕES

Soluções são misturas homogêneas unifásicas constituídas de duas ou mais substâncias miscíveis, que não reagem quimicamente entre si. As partículas dispersas são moléculas ou íons invisíveis a olho nu e ao microscópio. São formados por dois compostos, o soluto e o solvente. O solvente é a substância que dissolve o soluto e o soluto é a substância que está dissolvida no solvente.

Nas soluções de sólido em líquido ou de gás em líquido, o solvente é o líquido. Porém, quando a solução é de dois líquidos ou de dois sólidos, o solvente é o que existe em maior proporção.

Solução Diluída

Solução em que a proporção de soluto numa determinada solução é pequena. O parâmetro é solução que apresenta no máximo um décimo de mol de soluto por litro de solução.

Solução Concentrada

Solução em que a proporção de soluto numa determinada quantidade de solução é grande. O parâmetro é solução que apresenta mais de um décimo de mol de soluto por litro de solução.

Solução Saturada

Solução saturada é a que contém a quantidade máxima possível de um soluto em uma determinada temperatura e pressão, perfeitamente dissolvido no solvente.

Coefficiente de Solubilidade

Coefficiente de solubilidade é a quantidade de soluto necessária para saturar uma quantidade padrão de solvente, em determinadas condições de temperatura e pressão.

A variação do coeficiente de solubilidade em função da temperatura em um sistema de coordenadas produz uma curva, chamada de curva de solubilidade.

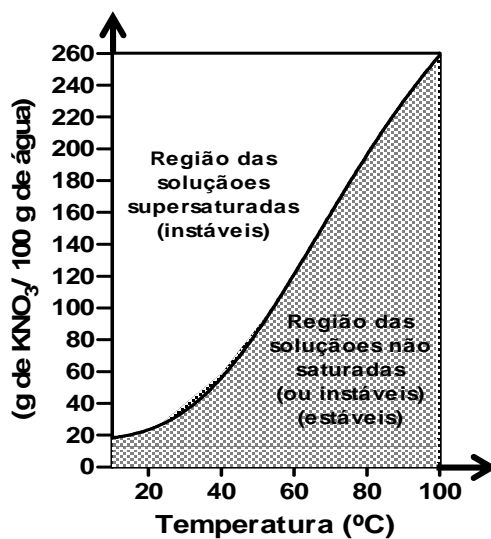


Figura 1: Curva de solubilidade do nitrato de potássio (kno₃)

As soluções podem ser classificadas segundo o grau de solubilidade:

- **Solução insaturada:** apresenta quantidade de soluto inferior ao coeficiente de solubilidade nessa temperatura.
- **Solução saturada:** apresenta quantidade de soluto dissolvido exatamente igual ao coeficiente de solubilidade nessa temperatura. Pode ou não conter precipitado.

- **Solução supersaturada:** apresenta quantidade de soluto dissolvido superior ao coeficiente de solubilidade nessa temperatura. É uma solução instável.

UNIDADES DE CONCENTRAÇÃO

Concentração comum é a relação entre a massa do soluto, em gramas, e o volume da solução, em litro.

$$C = \frac{\text{Massa do soluto}}{\text{Volume da solução}}$$

Densidade da solução é a relação entre a massa, em gramas, e o volume da solução, em centímetros cúbicos.

$$D = \frac{\text{Massa da solução}}{\text{Volume da solução}}$$

Título é a relação entre a massa do soluto e a massa da solução, ambos na mesma unidade.

$$\zeta = \frac{\text{Massa do soluto}}{\text{Massa da solução}}$$

Título em volume é a relação entre o volume de soluto e o volume de solução, ambos na mesma unidade.

$$\zeta_v = \frac{\text{Volume do soluto}}{\text{Volume da solução}}$$

Molaridade ou Concentração em Quantidade de Matéria é a relação entre a quantidade de matéria, número de mol, do soluto e o volume da solução em litros.

$$M = \frac{\text{Número de mol do soluto}}{\text{Volume da solução}}$$

Fração Molar é relação entre o número de mol do soluto ou o número de mol do solvente com o número de mol da solução.

$$X = \frac{\text{Número de mol do soluto/ solvente}}{\text{Número de mol da solução}}$$

Molalidade é a relação entre a quantidade de matéria em número de mol absoluto e a massa do solvente em quilogramas.

$$M = \frac{\text{Número de mol do soluto}}{\text{Massa da solução}}$$

Normalidade é a relação entre o número de equivalente-grama do soluto dissolvido e o volume da solução em litros.

$$N = \frac{\text{Número de equivalente-grama de soluto}}{\text{Volume da solução}}$$

*Obs.: O equivalente-grama de um elemento químico é a relação entre átomo-grama e sua valência no composto considerado. **Equivalente-grama de um ácido** é a relação entre o mol do ácido e o número de hidrogênios ácidos ou ionizáveis. **Equivalente-grama de uma base** é a relação entre o mol da base e o número de hidroxilas. **Equivalente-grama de um sal** é a relação entre o mol do sal e valência total do cátion ou ânion. **Equivalente-grama de um oxidante ou redutor** é a relação entre o mol da substância e o número total de elétrons cedidos ou recebidos pela molécula.*

REAGENTES E SOLUÇÕES DE TRABALHO

SOLUÇÃO DE GLICOSE A 1%

Soluto: glicose (C₆H₁₂O₆).

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Pesar 1g de Glicose e completar com água destilada para 100mL, homogeneizando bem.

Condições de armazenamento: manter em geladeira.

Prazo de validade: aproximadamente 2 meses.

SOLUÇÃO DE FRUTOSE A 1%

Soluto: frutose (C₆H₁₂O₆).

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Meça em uma proveta 1mL de Frutose. Transferir para um béquer, lavando várias vezes a proveta. Completar com água destilada para 100mL, homogeneizando bem.

Condições de armazenamento: manter em geladeira.

Prazo de validade: aproximadamente 2 meses.

SOLUÇÃO DE SACAROSE A 1%

Soluto: sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$).

Solvente: água destilada (H_2O).

Procedimento: Pesar 1g de Sacarose e completar com água destilada para 100mL, homogeneizando bem.

Condições de armazenamento: manter em geladeira.

Prazo de validade: devido à sua instabilidade deve ser preparada pouco antes da realização dos experimentos.

SOLUÇÃO ALCOÓLICA DE KOH 5%

Soluto: Hidróxido de Potássio (KOH).

Solvente: álcool etílico (C_2H_6O).

Procedimento: Dissolver 5g de Hidróxido de Potássio (KOH) em álcool etílico e completar o volume para 100mL.

Condições de armazenamento: manter a temperatura ambiente em frasco emético.

Prazo de validade: aproximadamente 6 meses.

SOLUÇÃO DE NaOH (HIDRÓXIDO DE SÓDIO) 2N

Soluto: Hidróxido de Sódio (NaOH).

Solvente: água destilada (H_2O).

Procedimento: Dissolver cerca de 8 a 9g de NaOH puro em água e completar ao volume de 100mL com água destilada, ou: diluir 33mL de NaOH 6N com água e completar o volume para 100mL.

Obs.: Imediatamente após a pesagem do NaOH, cubra-o com filme plástico.

Substância é muito higroscópica.

Condições de armazenamento: manter à temperatura ambiente em frasco emético.

Prazo de validade: solução estável indefinidamente.

SOLUÇÃO DE NaOH (HIDRÓXIDO DE SÓDIO) 10%

Soluto: Hidróxido de Sódio (NaOH).

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Pesar 10g de NaOH e dissolver em 70mL de água destilada. Completar o volume para 100mL, homogeneizando bem.

Obs.: Imediatamente após a pesagem do NaOH, cubra-o com filme plástico. Substância é muito higroscópica.

Condições de armazenamento: manter à temperatura ambiente em frasco emético.

Prazo de validade: solução estável indefinidamente.

SOLUÇÃO DE ACETATO DE CHUMBO A 1%

Soluto: Acetato de Chumbo (C₄H₆O₄Pb).

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Dissolver 1g de Acetato de Chumbo em água destilada e completar o volume para 100mL.

Condições de armazenamento: manter à temperatura ambiente em frasco âmbar e emético.

Prazo de validade: aproximadamente um ano.

SOLUÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO A 5%

Soluto: Cloreto de Cálcio (CaCl₂).

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Dissolver 5g de Cloreto de Cálcio em água e completar o volume a 100mL.

Condições de armazenamento: manter à temperatura ambiente em frasco emético.

Prazo de validade: aproximadamente um ano.

SOLUÇÃO DE ÁCIDO CLORÍDRICO (HCl) 1:2

Soluto: Ácido Clorídrico (HCl).

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Adiciona-se 100mL de Ácido Clorídrico em 100mL de água.

Condições de armazenamento: manter à temperatura ambiente em frasco âmbar e emético.

Prazo de validade: esta solução é estável indefinidamente.

SOLUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO 1:2

Soluto: ácido acético (CH_3COOH).

Solvente: água destilada (H_2O).

Procedimento: Diluem-se 100mL de ácido acético glacial com água destilada para 200mL.

Condições de armazenamento: manter a temperatura ambiente em frasco emético.

Prazo de validade: esta solução é estável indefinidamente.

SOLUÇÃO ALCOÓLICA DE PIRAMIDO A 5%

Soluto: Piramido ($\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_{3}\text{O}$).

Solvente: água destilada (H_2O).

Procedimento: Dissolver 5g de Piramido em álcool etílico, completando o volume para 100mL.

Condições de armazenamento: manter a temperatura ambiente em frasco âmbar e emético.

Prazo de validade: aproximadamente 6 meses.

SOLUÇÃO DE ÁCIDO SULFOSALICÍLICO A 20%

Soluto: Ácido Sulfosalicílico.

Solvente: álcool etílico ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$).

Procedimento: Dissolver 20g de Ácido Sulfosalicílico em água destilada e completar o volume para 100mL.

Condições de armazenamento: manter a temperatura ambiente em frasco âmbar e emético.

Prazo de validade: esta solução é estável indefinidamente.

SOLUÇÃO DE ÁCIDO TRICLOROACÉTICO A 20%

Soluto: Ácido Tricloroacético (CCl_3COOH).

Solvente: água destilada (H_2O).

Procedimento: Diluem-se 20mL de Ácido Tricloroacético com água destilada até 100mL.

Condições de armazenamento: manter a temperatura ambiente em frasco âmbar e emético.

Prazo de validade: Esta solução é estável indefinidamente.

SOLUÇÃO DE OVOALBUMINA A 10%

Soluto: clara de ovo.

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Adiciona-se 50mL de água destilada em 10mL de clara de ovo fresco, completa-se o volume para 100mL, em seguida homogeneizando bem.

Condições de armazenamento: acondicionada em geladeira.

Prazo de validade: Esta solução deve ser preparada no momento do uso.

SOLUÇÃO DE TUNGSTATO DE SÓDIO A 10%

Soluto: Tungstato de Sódio (Na₂WO₄).

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Dissolver 10g de Tungstato de Sódio em água destilada e completar o volume para 100mL.

Condições de armazenamento: Manter a temperatura ambiente em frasco âmbar e emético.

Prazo de validade: aproximadamente 1 ano.

SOLUÇÃO CLOROFÓRMICA DE COLESTEROL

Soluto: Colesterol (C₂₇ H₄₆O).

Solvente: clorofórmio (CHCl₃).

Procedimento: Diluir 0,5g de Colesterol em 50mL de clorofórmio.

Condições de armazenamento: Diluir 0,5g de Colesterol em 50mL de clorofórmio.

Prazo de validade: aproximadamente 1 dia.

SOLUÇÃO DE VERMELHO DE FENOL A 4%

Soluto: Vermelho de Fenol (C₁₉H₁₄O₅S).

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Dissolver 4g Vermelho de Fenol em água destilada e completar o volume para 100ml.

Condições de armazenamento: Manter a temperatura ambiente em frasco âmbar e emético.

Prazo de validade: aproximadamente 1 ano.

REAGENTE DE MILLON

Soluto: ácido nítrico (HNO₃) e mercúrio (Hg).

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Adiciona-se 40mL de ácido nítrico concentrado frio em 20g de ácido nítrico, deixa-se dissolver por aquecimento e dilui-se com água duas vezes em volume. Deixa-se decantar durante 24 horas e usa-se a solução superficial. Para recuperar a eficiência desta solução, adicionam-se diversas gotas de solução aquosa de NaNO₂ a 1% ou KNO₂ a 1%.

Condições de armazenamento: Manter a temperatura ambiente em frasco e emético.

Prazo de validade: aproximadamente 6 meses.

SOLUÇÃO DE α -NAFTOL

Soluto: α -Naftol (C₁₀H₈O).

Solvente: álcool etílico (CH₃CH₂OH).

Procedimento: Pesar 5g de α -Naftol e completar com álcool etílico para 100mL.

Condições de armazenamento: Manter a temperatura ambiente em frasco âmbar e emético.

Prazo de validade: aproximadamente 6 meses.

REAGENTE DE LUGOL

Soluto: Iodato de Potássio (KIO₃).

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Pesar 5g de Iodo e 10g de Iodato de Potássio. Misturar em 60mL de água destilada, em seguida completar o volume para 100mL, homogeneizando bem.

Condições de armazenamento: Manter a temperatura ambiente em frasco âmbar e emético.

Prazo de validade: aproximadamente 1 ano.

SOLUÇÃO DE LUGOL A 1%

Soluto: Reagente de Lugol.

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Diluir 1mL do reagente de Lugol em 100mL de água destilada.

Condições de armazenamento: Manter a temperatura ambiente em frasco âmbar e emético.

Prazo de validade: aproximadamente 1 ano.

SOLUÇÃO DE AMIDO A 1%

Soluto: amido (C₆H₁₀O₅)_n.

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Misturar 2g de amido com 20mL de água destilada. Derramar a pasta lentamente, agitando em um béquer com 200mL de água fervente. Cessar a ebulição e deixar esfriar e sedimentar. Separar, por decantação, aspiração ou centrifugação a parte sobrenadante sem grumos. Para maior estabilidade da solução, convém adicionar 1% de ácido salicílico.

Condições de armazenamento: Preparar um dia antes do experimento e manter na geladeira em frasco emético.

Prazo de validade: aproximadamente 6 meses.

REATIVO DE BENEDICT

Solutos: citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇), carbonato de sódio anidro (Na₂CO₃) e sulfato de cobre (CuSO₄) cristalizado.

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Dissolver 85g de citrato de sódio e 50g de carbonato de sódio anidro em cerca de 350mL de água quente. Dissolver à parte, em 50mL de água quente, 0,5g de sulfato de cobre cristalizado. Transferir lentamente, com agitação constante, a solução cúprica para a primeira. Completar o volume para 500mL com água destilada, e filtrar se necessário.

Condições de armazenamento: Manter a temperatura ambiente em frasco emético.

Prazo de validade: aproximadamente 1 ano.

REATIVO DE FEHLING

SOLUÇÃO A

Soluto: sulfato de cúprico (CuSO₄).

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Dissolver 34,64g de sulfato de cobre cristalizado em 300mL de água quente. Completar o volume para 500mL.

Condições de armazenamento: Manter a temperatura ambiente em frasco emético de vidro.

Prazo de validade: aproximadamente 1 ano.

SOLUÇÃO B

Soluto: Hidróxido de Potássio (KOH) e Tartarato duplo de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆·4H₂O).

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Dissolver 125g de Hidróxido de Potássio e 173g de Tartarato duplo de sódio e potássio em 400mL de água destilada. Completar o volume para 500mL.

Condições de armazenamento: Manter a temperatura ambiente em frasco emético de polietileno.

Prazo de validade: aproximadamente 1 ano.

REAGENTE DE SELIWANOFF

Soluto: Resorcinol (C₆H₄(OH)₂)

Solvente: Ácido clorídrico (HCl).

Procedimento: Dissolver 0,05g de Resorcinol em 100mL de HCl diluído (na proporção 1:2).

Condições de armazenamento: Manter a temperatura ambiente em frasco âmbar e emético.

Prazo de validade: aproximadamente de 1 ano.

REAGENTE DO BIURETO

Solutos: sulfato cúprico (CuSO₄), hidróxido de sódio (NaOH) e tartarato de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆·4H₂O).

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Dissolver 150mg de sulfato cúprico em 50mL de água quente. Misturar esta solução com 30mL de solução de NaOH a 10% e 600mg de tartarato de sódio e potássio. Completar o volume com água destilada para 100mL.

Condições de armazenamento: Armazenar em frasco de polietileno e ao abrigo da luz direta.

Prazo de validade: Este reativo é estável indefinidamente, porém deve ser desprezado caso aparecer precipitado escuro.

SOLUÇÃO DE UREASE A 1%

Soluto: urease

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Pesar 0,1g de urease e completar com água destilada para 10mL, homogeneizando bem.

Condições de armazenamento: Manter na geladeira em frasco emético e âmbar.

Prazo de validade: aproximadamente 2 meses.

SOLUÇÃO DE FENOL SATURADO EM ÁGUA

Soluto: fenol (C₆H₅OH)

Solvente: água destilada (H₂O).

Procedimento: Pesar 100g de fenol e adicionar 39,5mL de água destilada, homogeneizar bem.

Condições de armazenamento: Manter a temperatura ambiente em frasco emético.

Prazo de validade: aproximadamente 1 ano.

SOLUÇÃO DE NINHIDRINA

Soluto: ninhidrina (C₉H₆O₄).

Solvente: acetona (C₃H₆O).

Procedimento: Pesar 0,2g de ninhidrina e diluir em 100mL de acetona, homogeneizar e acondicionar em frasco emético.

Condições de armazenamento: Manter a temperatura ambiente em frasco emético.

Prazo de validade: aproximadamente 1 dia.

EXERCÍCIOS

1- Cada litro de água do mar possui cerca de 3,5g de cloreto de sódio (NaCl), ou seja C = 3,5 g/L. Qual o volume de água do mar é necessário ser evaporado para ter-se 700g de sal?

2- Uma solução de sacarose (açúcar comum) possui concentração $C = 90,0 \text{ g/L}$. Quanto de açúcar existirá em uma garrafa de 330 mL (miliLitros, ou 0,330L)?

3- Quantos mols existem um 0,4L de solução Na_2S 1,5M?

4 - Qual o volume de solução AlCl_3 0,8M é necessário para conter 2,0 mols deste sal?

5 - Quantas gramas de Na_2CO_3 existem em 0,8L deste sal, da concentração $M = 2,5 \text{ mol/L}$? (dados ^{23}Na , ^{32}C , ^{16}O)

RESULTADOS

1- Resolução: $3,5 \text{ g} / 1,0\text{L} = 700\text{g} / (x)\text{L}$

$3,5\text{g} \cdot (x)\text{L} = 700\text{g} \cdot 1,0\text{L}$ ou seja, $x = 200 \text{ L}$ de água do mar.

2- Resolução: $90,0 \text{ g} / 1,0\text{L} = (x)\text{g} / (x)0,330\text{L}$

$90,0\text{g} \cdot 0,330\text{L} = (x)\text{g} \cdot 1,0\text{L}$ ou seja, $x = 29,7\text{g}$ de açúcar.

3- Resolução:

$M = 1,5 \text{ mol} / 1,0\text{L} = (x)\text{mol} / 0,4\text{L}$

onde $1,0\text{L} \cdot (x)\text{mol} = 1,5\text{mol} \cdot 0,4\text{L}$

$x = 0,6 \text{ mol}$ deste ácido.

4 - Resolução:

$M = 0,8 \text{ mol} / 1,0\text{L} = 2\text{mol} / (x)\text{L}$

onde $0,8\text{mol} \cdot (x)\text{mol} = 2,0\text{mol} \cdot 1,0\text{L}$

$x = 0,25 \text{ litros}$ desta solução.

5 - Resolução: Primeiro achamos quantos mols existem em 0,8 litros desta solução

$M = 2,5 \text{ mol} / 1,0\text{L} = (x)\text{mol} / 0,8\text{L}$

onde $1,0\text{L} \cdot (x)\text{mol} = 2,5\text{mol} \cdot 0,8\text{L}$

$x = 2,0 \text{ mol}$ deste ácido.

Depois transformamos estes 2,0 mols em gramas, pois 1 mol de $\text{Na}_2\text{CO}_3 = 106 \text{ gramas}$

$106\text{g} \cdot 0,8 \text{ mol} = 84,8 \text{ gramas}$ de Na_2CO_3

3. CARACTERIZAÇÃO DE CARBOIDRATOS

O termo carboidrato denota hidratos de carbono, designação oriunda da fórmula geral $(\text{CH}_2\text{O})_n$ sendo substâncias orgânicas constituídas por carbono, hidrogênio e oxigênio. Esses dois últimos elementos, na maioria dos casos, estão presentes nos carboidratos na mesma proporção que na água. Quimicamente são representados como poliidroxi-aldeídos ou poliidroxi-cetonas ou substâncias que liberam tais grupos por hidrólise. Estes grupos conferem aos carboidratos a capacidade de participar de várias reações como oxidação, redução, esterificação, isomerização e capacidade de formar ligações glicosídicas. Algumas dessas reações envolvem a formação de complexos corados, e a especificidade da identificação depende da estrutura dos carboidratos.

1. Teste de Molisch (reação geral para carboidratos)

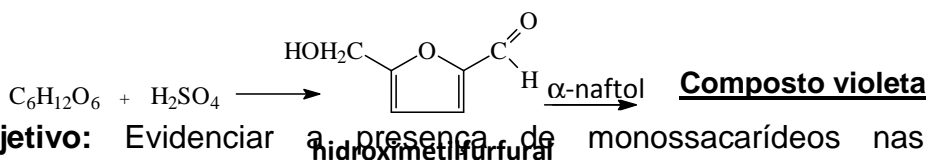
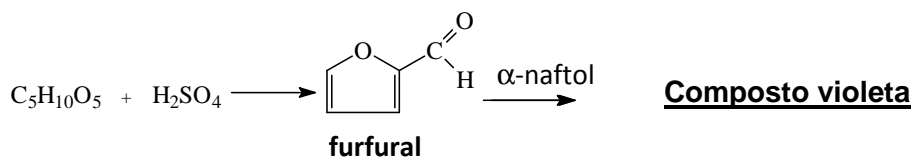
a) Fundamentação teórica:

Os monossacarídeos mais importantes são formados por cinco ou seis átomos de carbono (pentoses e hexoses respectivamente). Por serem moléculas muito ricas em grupamentos hidroxila (-OH), os monossacarídeos podem ser facilmente desidratados por ação de ácidos fortes concentrados como, o ácido sulfúrico (H_2SO_4). O ácido rompe facilmente as ligações glicosídicas presentes em moléculas de polissacarídeos, quebrando-os e fornecendo seus monossacarídeos. Esses, por sua vez, são desidratados e podemos ter como produto: o furfural, quando o monossacarídeo desidratado for uma pentose, e o hidroximetilfurfural (HMF), quando for uma hexose.

Tanto o furfural quanto o HMF são substâncias incolores, impedindo que a reação seja visualizada. Para resolver esse problema, adiciona-se um composto fenólico

ao meio (alfa-naftol, conhecido como reativo de Molisch). O fenol reage com os produtos, incolores e provoca o aparecimento de um anel de coloração lilás.

A reação que ocorre é a seguinte:



b) Objetivo: Evidenciar a presença de monossacarídeos nas amostras analisadas.

c) Materiais:

Vidrarias:

- 4 pipetas de vidro de 5mL
- 1 pipeta de vidro de 1mL
- 3 Tubos de ensaio

Reagentes:

- Solução alcoólica de alfa-naftol a 5%
- Ácido Sulfúrico concentrado
- Solução de Glicose 1%
- Solução de Frutose 1%

Acessórios:

- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas
- Frasco com água destilada

d) Procedimento:

Identificar os tubos de ensaio como Glicose (Tubo 1), Frutose (Tubo 2) e Água (Tubo 3). Pipetar para primeiro tubo 2mL de glicose, ao segundo 2mL de frutose e

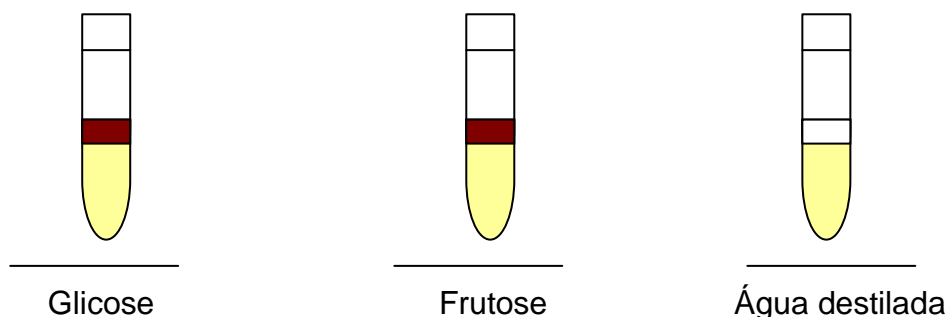
ao terceiro 2mL de água destilada, que vai servir como um controle negativo. Acrescentar 5 gotas da solução de alfa-naftol e agitar. Pipetar cuidadosamente 2 mL de ácido sulfúrico concentrado com o tubo inclinado, deixando escorrer pelas paredes do tubo sem agitar.

e) Resultado esperado:

Tubo 1 (Glicose): Ocorre a formação de um anel vermelho na interface da reação indicando resultado positivo.

Tubo 2 (Frutose): Ocorre a formação de um anel vermelho na interface da reação indicando resultado positivo.

Tubo 3 (Água): Não há formação de anel na interface indicando resultado negativo.



f) Resultado obtido:

Tubo 1: _____

Tubo 2: _____

Tubo 3: _____

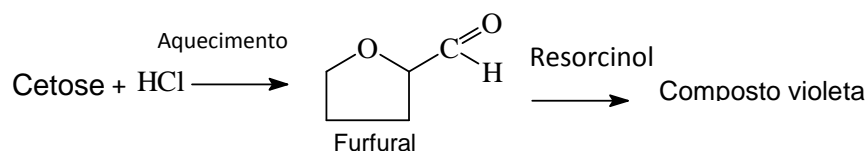
2. Reação de Seliwanoff (Reação para distinção entre aldoses e cetoses)

a) Fundamentação teórica:

Este teste permite diferenciar aldoses de cetoses que, sob ação de ácidos fortes, são transformadas em derivados de furfural que se condensam com o resorcinol, presente no reativo de seliwanoff formando um produto vermelho de composição incerta. A reação com cetoses é rápida e mais intensa pela maior facilidade de

formação do derivado furfural. Logo, a frutose e o mel de abelha, por conter frutose reagem positivamente.

A reação que ocorre é a seguinte :



b) Objetivos: Identificar a presença de cetoses presentes nas soluções pela reação de Seliwanoff.

c) Materiais:

Vidrarias:

- 1 pipeta de vidro de 5mL
- 4 pipetas de vidro de 1mL
- 3 Tubos de ensaio

Reagentes:

- Reagente de Seliwanoff
- Ácido Clorídrico concentrado
- Solução de Glicose 1%
- Solução de Frutose 1%
- Mel de abelha

Equipamentos:

- Banho-Maria

Acessórios:

- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Pinça
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas
- Frasco com água destilada

d) Procedimentos:

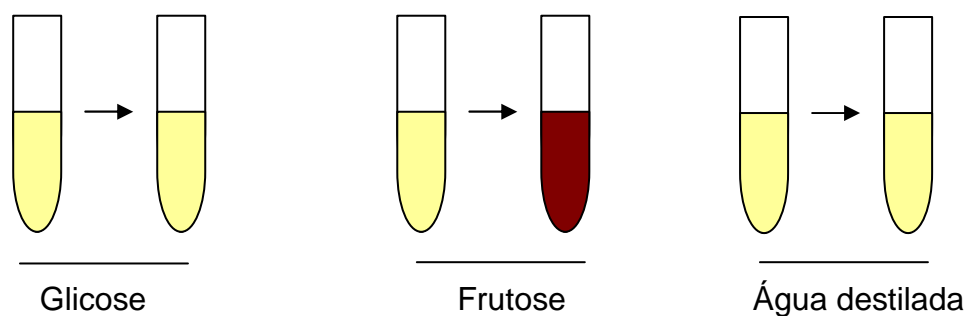
Identificar os tubos de ensaio como Glicose (Tubo 1), Frutose ou mel de abelha (Tubo 2) e água (Tubo 3). Pipetar para o primeiro tubo 1mL de glicose, ao segundo 1mL de frutose ou mel de abelha e ao terceiro 1mL de água destilada, que vai servir como um controle negativo, com pipetas de 1mL. Adicionar em todos os tubos de ensaio 1,5mL de ácido clorídrico e 0,5mL de reativo de Seliwanoff*. Agitar cuidadosamente. Deixar em banho-maria fervente até completar a reação. Observar.

e) Resultado esperado:

Tubo 1 (Glicose): Não há mudança do reativo indicando resultado negativo.

Tubo 2 (Frutose): Ocorre a formação de uma solução vermelha indicando resultado positivo.

Tubo 3 (Água): Não há mudança do reativo, indicando resultado negativo.



f) Resultado Obtido:

Tubo 1: _____

Tubo 2: _____

Tubo 3: _____

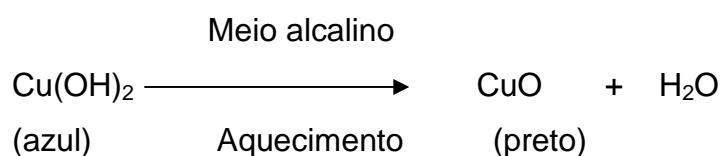
3. Reação de Benedict (Identificação de Açúcares Redutores)

a) Fundamentação teórica:

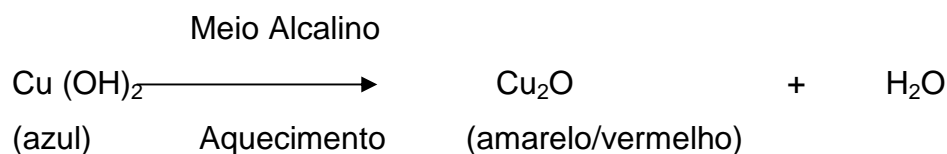
Reação para identificar carboidratos redutores. Nas estruturas cíclicas dos monossacarídeos os átomos de carbono anoméricos (C1 nas aldoses e C2 nas cetoses) são susceptíveis de oxidação por vários agentes oxidantes contendo íons cúpricos (Cu^{2+}) devido a presença de grupos aldeídos ou cetonas livres ou potencialmente livres. Na reação de Benedict os íons cúpricos são reduzidos pela carbolina dos carboidratos a íons cuprosos formando óxido cuproso que tem cor vermelho tijolo. Tal princípio é útil na análise de açúcares e, por muitos anos, foi utilizado na determinação dos níveis sanguíneos de glicose no sangue e na urina como diagnóstico da diabetes melito. Atualmente, há testes mais sensíveis para dosagem rápida da glicose, baseadas em ensaios enzimático (glicofita/glicose-oxidase) e que são muito mais práticos, por não exigirem a disponibilidade dos reagentes mencionados.

A reação que ocorre é a seguinte:

- **Ausência de composto redutor:**



- **Presença de composto redutor:**



b) Objetivos: caracterizar a presença de açúcares redutores através da reação de Benedict em soluções de carboidrato.

c) Materiais:

Vidrarias:

- 1 pipeta de vidro de 5mL
- 3 pipetas de vidro de 1mL
- 3 Tubos de ensaio

Reagentes:

- Reagente de Benedict
- Solução de Glicose 1%
- Solução de Sacarose 1%

Equipamentos:

- Banho-Maria

Acessórios:

- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Pinça
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas
- Frasco com água destilada

d) Procedimento

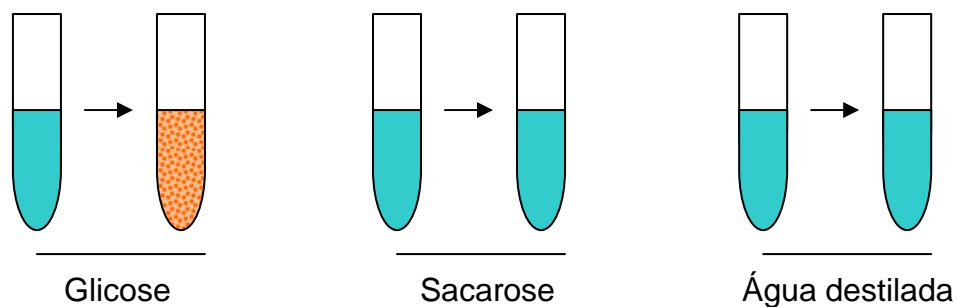
Identificar os tubos de ensaio como Glicose (Tubo 1), Sacarose (Tubo 2) e Água (Tubo 3). Pipetar, com auxílio da pipeta de 5mL, para os três tubos de ensaio 5mL do reativo de Benedict. Acrescentar ao primeiro tubo 5mL de glicose, ao segundo 5mL de sacarose e ao terceiro 5mL de água destilada, que vai servir como um controle negativo, com pipetas de 5mL. Agitar até completa homogeneização. Deixar em banho-maria fervente por cinco minutos. Observar a reação.

e) Resultado esperado:

Tubo 1 (Glicose): A presença de um precipitado vermelho tijolo ou solução amarelo-esverdeada indica a redução do cobre, possibilitando um resultado positivo.

Tubo 2 (Sacarose): Não há mudança do reativo, a cor permanece azul, indicando resultado negativo.

Tubo 3 (Água): Não há mudança do reativo, a cor permanece azul, indicando resultado negativo.



f) Resultado obtido:

Tubo 1: _____

Tubo 2: _____

Tubo 3: _____

5. Reação do Lugol (Identificação de Polissacarídeos)

a) Fundamentação teórica:

O iodo metálico presente no lugol forma complexos com a cadeia de alfa-amilose do amido que é um polissacarídeo formado um composto de cor roxo a azulado.

b) Objetivo: Identificar a presença do amido pela formação de complexos com iodo presente no reativo de lugol.

c) Material:

Vidrarias:

- 2 pipetas de vidro de 1mL
- 2 Tubos de ensaio

Reagentes:

- Lugol
- Solução de amido 1%

Acessórios:

- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas
- Frasco com água destilada

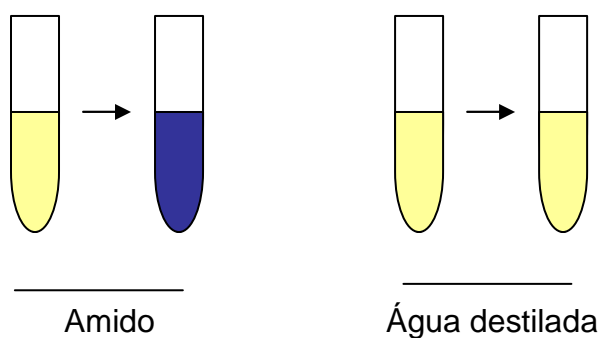
d) Procedimento:

Em um tubo de ensaio identificado colocar 1 mL de solução de amido e em outro 1 mL de água destilada. Adicionar 5 gotas de lugol e observar os resultados

e) Resultado esperado:

Tubo 1 (Amido): Mudança de cor da solução transparente ou leitosa para uma cor azul intensa, resultado positivo.

Tubo 2 (Água destilada): Não há mudança de cor da solução, reação negativa.



f) Resultado obtido:

Tubo 1: _____

Tubo 2: _____

PESQUISA

1. Qual o princípio da reação de Molish e o que acontece quando a mesma é aplicada a um monossacarídeo?

2. Na reação de Benedict carbonos anoméricos são susceptíveis de oxidação por vários agentes oxidantes contendo íons cúpricos isso devido a presença de quais grupos livres?
3. O princípio que é utilizado na reação de Benedict foi por muito tempo um método que permitia analisar açúcares a níveis sanguíneos contribuindo para determinação do diabetes melitos. Explique o princípio que é utilizado na reação de Benedict que permite a análise dos açúcares?
4. Qual reação que permite diferenciar aldoses e cetoses é?
5. Em que consiste a reação de lugol?

4. CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDIOS

Os Lipídeos são substâncias orgânicas hidrofóbicas que podem ser extraídos de células e tecidos por solventes não polares como clorofórmio e éter. Fazem parte as gorduras, óleos, ceras, esteróides e outros. Em contato com a água, alguns lipídeos podem vir a formar micelas, devido ao fato de possuírem caráter anfipático, ou seja, um grupo carboxila em uma de suas extremidades, o que confere certo grau de hidrofilia à molécula de lipídeo, e um grupo apolar na outra.

1. MANCHA CARACTERÍSTICA EM PAPEL DE FILTRO

a) Fundamentação teórica

Os lipídios são substâncias capazes de em contato com as fibras do papel formar uma mancha que não se desfaz, deixando um aspecto transparente.

b) Objetivo: Observar a formação de uma mancha no papel de filtro característico dos lipídios.

c) Material

Vidrarias:

- 2 pipetas de vidro de 1mL

Reagentes:

- Óleo vegetal

Acessórios:

- Papel de filtro

Água destilada

d) Procedimento

Pipetar para o centro do primeiro papel de filtro 0,5 ml de água, e para o centro do outro 0,5 ml de óleo. Espere secar 20 min e observe.

e) Resultado Esperado

Formação de uma mancha translúcida característica da presença de lipídeos permanece no papel de filtro. O aluno pode ler o roteiro da aula prática através do papel de filtro

f) Resultado Obtido

2. SOLUBILIDADE DOS LIPÍDIOS

a) Fundamentação Teórica

Devido a natureza apolar, os lipídeos apresentam baixa solubilidade em água e boa solubilidade em solventes orgânicos.

b) Objetivo : verificar a solubilidade dos lipídeos nos mais variados tipos de solventes.

c) Materiais

Vidrarias:

- 5 pipetas de vidro de 1mL
- 5 Tubos de ensaio

Reagentes:

- Ácido Clorídrico 0,1N
- Hidróxido de Sódio 0,1N
- Etanol
- Éter etílico

Acessórios:

- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Papel Toalha

d) Procedimento: Colocar em tubos de ensaio os respectivos reagentes:

Tubo 1: 3ml de água destilada

Tubo 2: 3ml de ácido clorídrico 0,1N

Tubo 3: 3ml de hidróxido de sódio 0,1N

Tubo 4: 3ml de etanol

Tubo 5: 3ml de éter etílico

Adicionar em cada tubo 1ml de óleo de soja, e observar.

Colocar 2ml de éter etílico em dois tubos de ensaio. Adicionar a cada tubo duas gotas de NaOH 0,1N, e uma gota de fenolftaleína. Observar.

No primeiro tubo adicionar óleo rançoso gota a gota até descorar. Contar o número de gotas adicionadas.

No segundo tubo adicionar o mesmo número de gotas da experiência anterior e observar os resultados.

e) Resultado Esperado: o óleo apresentar solubilidade no tubo 5, baixa no tubo 4 e insolúvel nos 1, 2 e 3.

f) Resultado obtido

- Banho-Maria

Acessórios:

- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Pinça
- Termômetro
- Cronômetro
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas
- Frasco com água destilada

d) Procedimento

Pipetar para um tubo de ensaio rotulado 2 mL de óleo e 5mL da solução de potassa alcóolica. Aquecer no banho-maria fervente durante cinco minutos. A reação de hidrólise alcalina estará completa quando o tubo de ensaio apresentar uma fase. Pipetar para o tubo de ensaio rotulado (tubo 1) 1mL de água e 2 mL da solução de sabão. Agitar vigorosamente e observar.

Pipetar para outro tubo de ensaio rotulado (tubo 2) 2 mL da solução de sabão. Adicionar 5 gotas da solução de cloreto de cálcio. Agitar bem e observar.

e) Resultado esperado

Tubo 1: Formação de espuma indica a presença de sais de ácidos graxos

Tubo 2: formação de precipitado indica a presença de sabões de cálcio que não formam espuma

f) Resultado obtido

Tubo 1: _____

Tubo 2: _____

4. DETECÇÃO DE COLESTEROL (MÉTODO DE SALKOWISKI)

a) Fundamentação teórica:

O colesterol apresenta em sua estrutura o anel ciclopentanoperidro fenantreno, representado por quatro anéis fundidos (A,B,C e D), apresenta uma função alcoólica na posição do carbono 3 do anel A, uma insaturação entre os carbonos 5 e 6 do anel B e uma cadeia alquila no carbono 17 do anel D. Embora as propriedades de solubilidade sejam análogas as dos lipídios, os esteroides como o colesterol possuem estrutura e propriedades químicas diferentes, podendo ser diferenciado através de reações de coloração específica. A reação de Salkowski é específica para esteróide contendo dupla ligação na molécula, ocorrendo desidratação na insaturação formando um composto colorido.

b) Objetivo: Caracterizar a presença do colesterol pela reação de Salkowski.

c) Materiais

Vidrarias:

- 2 pipetas de vidro de 1mL
- 1 Tubo de ensaio

Reagentes:

- Solução Clorofórmica de colesterol
- Ácido Sulfúrico concentrado

Acessórios:

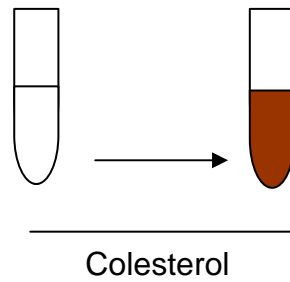
- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas

d) Procedimento:

Em um tubo de ensaio identificado pipetar 1mL da solução cloroformica de colesterol e adicionar 1mL de ácido sulfúrico concentrado, cuidadosamente pela parede.

e) Resultado esperado

Tubo 1: reação positiva com a formação de compostos de vermelho amarronzada.



f) Resultado obtido

Tubo 1: _____

PESQUISA

1. Quais as características químicas e estruturais dos lipídios e como eles se classificam?
2. Quais as funções biológicas desempenhadas pelos lipídios na célula?
3. Explique a baixa solubilidade dos lipídios em solventes polares:
4. Descreva como ocorre o transito de lipídios pela corrente sanguínea?

5. CARACTERIZAÇÃO DE AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS

Todas as proteínas existentes nos seres vivos, desde os vírus até os seres humanos, são constituídas por combinações de apenas vinte aminoácidos. Esses blocos constituintes da vida se unem entre si, como contas de um colar, para formar longas cadeias e moléculas complexas que configuram a estrutura de todos os organismos vivos. O aminoácido é um composto orgânico que apresenta, em sua molécula, um grupo ácido (-COOH) e um grupo amino (-NH₂), além de um radical -R, que vai ser responsável pela diferenciação entre os diversos tipos de aminoácidos existentes.

As proteínas podem ser caracterizadas e diferenciadas por propriedades específicas como a carga elétrica, massa molar, solubilidade e afinidade por certos compostos de caráter sintético ou natural. Além disso podem também ser caracterizadas por reações de precipitação e/ou coloração.

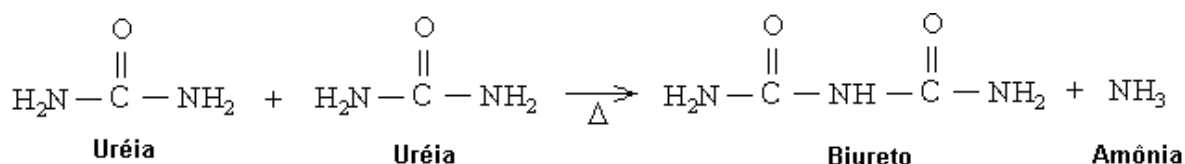
Todas as reações desenvolvidas baseiam-se na presença de ligações peptídicas e também na presença de diferentes aminoácidos, evidenciadas pela afinidade específica que essas moléculas possuem a certos compostos.

1. REAÇÃO DE BIURETO

a) Fundamentação teórica:

Esta reação é específica para substâncias que possuem pelo menos dois grupos CO-NH unidos por carbono ou nitrogênio como ocorre no biureto, que empresta o seu nome para a reação. Biureto é o nome dado à estrutura originada a partir da

decomposição da uréia, quando esta é submetida a uma temperatura de, aproximadamente, 180°C:



As proteínas e seus produtos de hidrólise que contém duas ou mais ligações peptídicas dão resultado positivo neste teste. A reação é também positiva para as substâncias que contém 2 grupos carbamínicos (-CO-NH₂) ligados diretamente ou através de um único átomo de carbono ou nitrogênio. Esta é uma reação geral para proteínas. Esse fenômeno deve-se à formação de um complexo entre o íon Cu²⁺, presente no reativo, e os átomos de nitrogênio presentes na molécula:

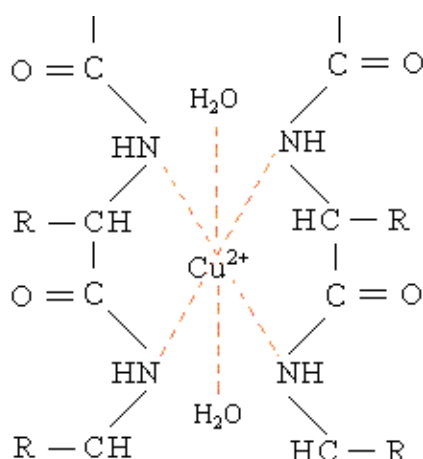


Figura 2: Representação da reação do íon cobre com os grupos polarizados presente nos resíduos de aminoácidos

b) Objetivo: Identificar a presença de peptídios na amostra através do reativo de biureto.

c) Materiais

Vidrarias:

- 1 pipeta de vidro de 5mL
- 2 pipetas de vidro de 1mL

- 2 Tubos de ensaio

Reagentes:

- Reativo de Biureto
- Solução de ovoalbumina 10%

Acessórios:

- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas

Frasco com água destilada

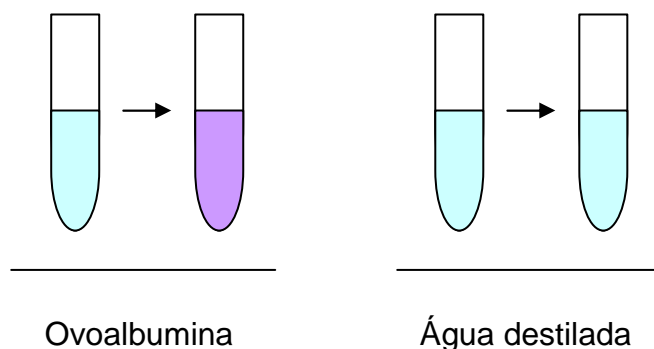
d) Procedimento

Colocar 2 mL de reativo de biureto em dois tubos de ensaio. Ao primeiro juntar 1 mL de ovoalbumina e no segundo 1 mL de água destilada. Agitar e observar a reação.

e) Resultado esperado

Tubo 1 (ovoalbumina): formação de coloração violácea indicando positivo para proteína

Tubo 2 (Água destilada): Não há mudança de cor, indicando reação negativa



f) Resultado obtido:

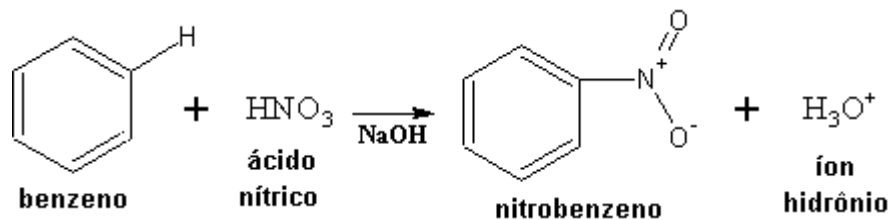
Tubo1: _____

Tubo 2: _____

2. REAÇÃO XANTOPROTÉICA

a) Fundamentação teórica

Os aminoácidos são identificados pela presença de seus radicais que podem ser de cadeia alifática ou cíclica. Esta reação acontece devido à presença nas proteínas do grupamento fenil da tirosina e triptofano, com qual o ácido nítrico forma nitroderivados que são coloridos no meio alcalino. É uma reação específica para identificação dos aminoácidos tirosina e triptofano.



b) Objetivo: evidenciar a presença de resíduos de tirosina e triptofano na solução de ovoalbumina testada.

c) Materiais

Vidrarias:

- 1 pipeta de vidro de 5mL
- 2 pipetas de vidro de 1mL
- 1 Tubo de ensaio

Reagentes:

- Ácido Nítrico concentrado
- Hidróxido de sódio 2N
- Solução de ovoalbumina 10%

Equipamentos:

- Banho-Maria

Acessórios:

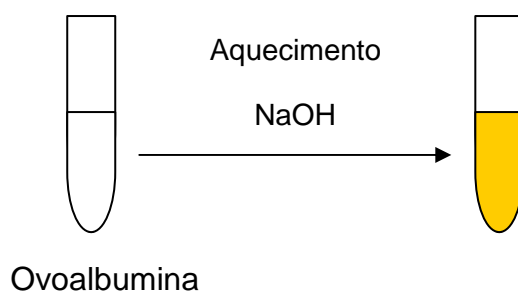
- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Pinça
- Termômetro
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas

d) Procedimento

Pipetar para um tubo de ensaio 1 mL de ovoalbumina, adicionar 10 gotas de ácido nítrico e aquecer até ferver. Acrescentar 4 mL da solução de hidróxido de sódio. Observar a reação.

e) Resultado esperado

Reação é positiva quando há a formação de uma solução amarelada.



f) Resultado obtido

Tubo1: _____

Tubo 2: _____

3. REAÇÃO DE MILLON

a) Fundamentação teórica

Quando se aquece um composto que contém tirosina com o reativo de Millon, observa-se a formação de um produto colorido avermelhado. Explicado pela formação de um fenolato de mercúrio por reação ao grupo hidroxifenil da tirosina com o mercúrio do reativo.

b) Objetivo: identificar a presença de tirosina, através do reativo de Millon, na solução amostra.

c) Materiais

Vidrarias:

- 2 pipetas de vidro de 1mL
- 1 Tubo de ensaio

Reagentes:

- Reativo de Millon
- Solução de ovoalbumina 10%

Equipamentos:

- Banho-Maria

Acessórios:

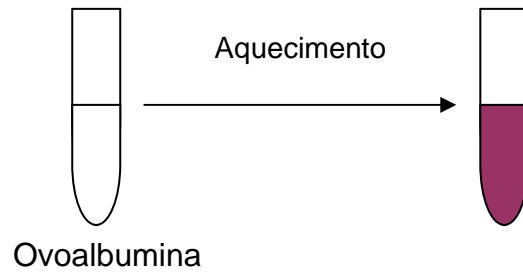
- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Pinça
- Termômetro
- Cronômetro
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas

d) Procedimentos

Pipetar para um tubo de ensaio 1 mL de ovoalbumina e acrescentar 5 gotas do reativo de Millon. Aquecer em Banho-Maria por 10 minutos e observar a reação.

e) Resultado esperado

Tubo 1 (Ovoalbumina): a solução adquire coloração vermelha à roxa, indicando positividade da reação.



f) Resultado obtido

Tubo1: _____

Tubo 2: _____

PESQUISA

- 1) Em que se baseia a reação do biureto?
- 2) Em que se fundamenta a reação xantoprotéica e que grupos de aminoácidos são responsáveis por esta reação?
- 3) Que aminoácido pode ser identificado pela reação de Millon e de que forma isto acontece?
- 4) O que é proteinúria?
- 5) Qual significado e importância da detecção da proteína de Bence-Jones em urina de indivíduos?

6. CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS

Os ácidos nucleicos são macromoléculas poliméricas constituídas de subunidades nucleotídicas unidas por ligações fosfodiéster, responsáveis pelo armazenamento e expressão da informação genética. Existem dois tipos de ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA).

Cada nucleotídeo é formado pela união de uma base nitrogenada, um açúcar e um fosfato. As bases nitrogenadas podem ser de dois tipos: purinas (adenina ou guanina) e pirimidinas (citosina, timina ou uracila). O açúcar pode ser a desoxirribose, que caracteriza a molécula de DNA, ou a ribose, encontrada nas moléculas de RNA (Fig.1).

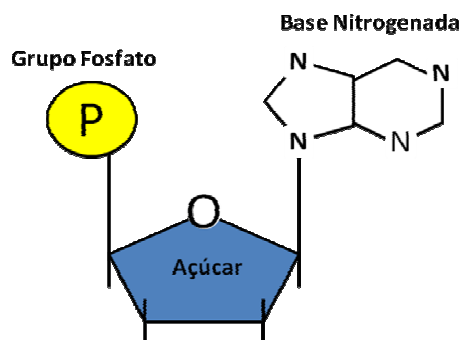


Figura 3: Desenho esquemático da estrutura dos nucleotídios

No genoma humano são encontrados 46 cromossomos, cada um formado por uma molécula de DNA. O DNA é uma longa molécula helicoidal constituída de dois filamentos de nucleotídeos enrolados de forma helicoidal. Os dois filamentos são unidos por pontes de hidrogênio que se estabelecem entre as bases nitrogenadas, obedecendo ao seguinte pareamento: uma adenina se liga a uma timina por duas pontes de hidrogênio (A=T); uma citosina se une a uma guanina por três pontes de hidrogênio (C≡G). Note que na molécula de DNA não é encontrada a base uracila (U), exclusivas das moléculas de RNA.

Se compararmos a molécula de DNA a uma escada veremos que o corrimão será constituído pelas moléculas de desoxirribose e fosfato, enquanto as bases nitrogenadas correspondem aos degraus.

A separação das duas fitas de DNA pode ser obtida ao serem rompidas as pontes de hidrogênio entre as bases, o que se faz submetendo-se o DNA a temperaturas elevadas, por exposição a pH extremos ou diminuindo-se a força iônica.

Na célula podemos encontrar dois tipos de DNA: o DNA nuclear e o DNA mitocondrial. Enquanto o primeiro codifica cerca de 100.000 genes, o segundo representa apenas 1 a 2% do DNA celular, codificando apenas 37 genes. Na mitocôndria são encontrados de 1 a 10 moléculas de DNBA mitocondrial, cuja forma é circular e formada por dois filamentos: um filamento leve rico em citosina (L de *light* = leve) e outro filamento pesado rico em guanina (H de *heavy* = pesado).

Diferente das moléculas de DNA, as moléculas de RNA são constituídas por um único filamento. Elas são produzidas a partir da informação contida nas moléculas de DNA e podem ser dos seguintes tipos:

- **RNA mensageiro (mRNA)**

A sequência de nucleotídeos nessa molécula corresponde à sequência de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica. Antes disso, entretanto, a estrutura imediatamente formada a partir de DNA sofre modificações, como a remoção de alguns segmentos (os íntrons), para adquirir características particulares, únicas para cada proteína a ser sintetizada.

- **RNA ribossomal (rRNA)**

Unidos a proteínas, constituem os ribossomos, responsáveis por “ler” a informação genética levada pelos RNAs mensageiros até o citosol. Podem permanecer livres no citosol ou ligados ao retículo endoplasmático. São formados por duas subunidades (uma maior, outra menor) que se unem no momento da síntese protéica.

- **RNA transportador (tRNA)**

São responsáveis por transportar os aminoácidos até o local onde se dará a sua incorporação na cadeia polipeptídica em crescimento. Embora a molécula seja constituída de uma fita única, pode se dobrar sobre si mesma, assumindo um aspecto de trevo ou semelhante a um crucifixo.

- **Pequenas moléculas de RNA**

Servem como iniciadores para a replicação de DNA, auxiliam na remoção dos íntrons durante a preparação do transcrito primário do RNA mensageiro para tradução e alguns intervêm no movimentos dos ribossomos no citosol.

1. Extração de DNA

a) Fundamentação Teórica

A extração de DNA é hoje uma técnica extensamente utilizada com diversos fins, como na medicina forense, em investigações criminais, na exclusão de paternidade, na busca de marcadores tumorais ou agentes infecciosos, entre outros.

A obtenção do DNA pelos métodos convencionais inclui lise celular e procedimentos que tornam o DNA disponível para a extração. Para isso, vários são os passos laboratoriais necessários e muitas vezes é necessário ajustar um protocolo dependendo do material utilizado para extração e da finalidade do procedimento.

A extração de DNA é realizada basicamente utilizando-se detergentes, sais e álcool. Veja as funções de cada um desses componentes.

- *Detergentes*

Rompem as membranas celulares pela desestruturação da bicamada lipídica

- *Sais*

Fornecem cátions que diminuir neutralizam as cargas negativas do grupo fosfato do DNA , diminuindo sua solubilidade e facilitando a aglomeração dessas moléculas

- *Álcool*

Como o DNA tende a não ser solúvel em álcool, sua desidratação com esse componente impede que fique dissolvido no meio aquoso, facilitando seu agrupamento. Quanto mais gelado o álcool, menos solúvel será o DNA.

Além dessas soluções, são comumente utilizados tampões, soluções de fenol/clorofórmio, antioxidantes, além de procedimentos como banho-maria e centrifugação que variam dependendo do protocolo utilizado para cada tipo de extração. Estão listados abaixo alguns reagentes utilizados em diversos protocolos e suas funções.

1. EDTA (ácido etileno diamono tetracético) e tampões – Soluções quelantes de cátions divalentes ou que mantêm o pH por volta de 8.0. Impedem a ação de DNAses, enzimas que degradam o DNA usando esses cátions como cofatores ou quando o pH fica em torno de 7.0;
2. Fenol/clorofórmio – Permitem a separação do DNA das proteínas, desnaturando estas últimas e tornando-as insolúveis em fase aquosa, onde são encontradas as moléculas de DNA;
3. Agentes antioxidantes, como PVP (polivinilpirrolidona), BSA (albumina de soro bovino) ou mercaptoetanol – protegem o DNA da ação de compostos fenólicos, que oxidam o DNA, impedindo a ação de enzimas de restrição

b) Objetivo: Verificar a existência de moléculas de DNA em amostra de vegetais através da visualização a olho nu.

c) Materiais

Vidrarias

- Vidro de relógio
- 2 béqueres

- 1 proveta de 100 mL
- 2 Bastões de vidro
- Funil de vidro

Amostra e Reagentes

- 1 banana
- Água destilada
- NaCl (sal de cozinha)
- Detergente para louça
- Álcool etílico a 95% gelado (-10°C)

Acessórios

- Banho-maria (60°C)
- Balança analítica
- Papel de filtro
- Caixa de isopor com gelo

d) Procedimento

1. Corte e amasse a banana utilizando o bastão de vidro
2. Em um béquer contendo 100 mL de água, adicione 60 mL de detergente e 5 g de NaCl
3. Mexa até a total dissolução
4. Adicione a banana amassada a essa solução recém preparada
5. Deixe em banho-maria por 15 minutos
6. Resfrie a solução rapidamente, colocando o béquer no gelo durante 5 minutos
7. Filtre
8. Adicione ao filtrado 100 mL de álcool gelado, deixando-o escorrer vagarosamente pela borda.
9. Observe
10. Com o bastão de vidro limpo, faça movimentos circulares misturando as fases.

11. Observe o resultado final.

e) Resultado esperado

Precipitação das moléculas de DNA com formação de “nuvem” na fase alcoólica.

PESQUISA

1. Por que o material precisa ser macerado para isolar o DNA?
2. Qual o papel do detergente presente no processo de extração do DNA?
3. De que é composta a molécula de DNA?
4. Visto que o DNA não é solúvel em álcool, o que ocorre com suas moléculas quando colocadas neste meio?

7. DESNATURAÇÃO PROTÉICA

Proteínas são polímeros de aminoácidos unidos por ligações covalentes. Os tipos de aminoácidos (polares ou apolares) e as seqüências em que eles se encontram direcionam o enovelamento da cadeia polipeptídica, levando a uma conformação tridimensional específica, que é indispensável para sua função biológica. Devido às diferenças nessas características estruturais, as proteínas possuem diferentes propriedades físico-químicas, tais como: tamanho, massa molecular, carga elétrica e solubilidade. Essas propriedades, por sua vez, permitem que as proteínas contidas em uma mistura sejam separadas umas das outras.

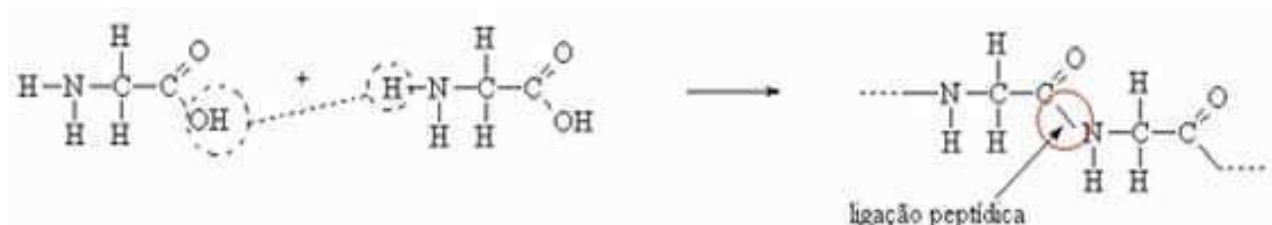


Figura 4: Representação da ligação peptídica

A perda da estrutura tridimensional levando a perda da função da proteína é chamada de **desnaturação**. Muitas proteínas podem ser desnaturadas pelo calor,

assim como por mudanças do pH, ácidos e bases, íons de metais pesados, certos solventes orgânicos, como o álcool ou as cetonas, por certos solutos como a uréia ou, por detergentes. Muitas destas substâncias ligam-se às cadeias de proteínas formando precipitados.

O princípio da precipitação das proteínas consiste de que as mesmas são moléculas eletricamente carregadas. A carga elétrica das proteínas está na dependência dos grupos ionizáveis presentes nos radicais que fazem parte da molécula protéica, podendo se apresentar de três maneiras, ou como cátions, ou como ânions ou como molécula neutra. A dissociação destas proteínas em solução depende da dissociação dos radicais dos aminoácidos presentes na molécula, e conseqüentemente do diversos pKs. De uma maneira geral, considera-se que em pH neutro (ponto isoelétrico) a solubilidade destas proteínas é mínima.

1. Precipitação por Ácidos fortes e metais pesados

a) Fundamentos teórica

Os íons positivos de metais pesados (Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+}) formam compostos insolúveis com as proteínas. Os metais positivos reagem com as cargas negativas de proteínas, principalmente se o pH estiver acima do ponto isoelétrico da proteína (ponto neutro), formando precipitados.

Quando a proteína está com pH abaixo do ponto isoelétrico, as bases provenientes de ácidos fortes são exemplos de íons negativos que combinam-se com partes positivas de proteínas, formando complexos insolúveis, que precipitam na solução. Como exemplos dessas bases podemos citar os alcalóides, uma classe de compostos naturais, e as bases derivadas do ácido tricloroacético (TCA). Esses reagentes também têm ação desnaturante, ou seja, provocam a perda da conformação tridimensional da proteína de forma irreversível. Conseqüentemente, a proteína separada por esse método perde a sua função. Esse método é bastante utilizado para remover proteínas de amostras de soro, plasma e leite, quando se deseja analisar a presença de minerais, tais como cálcio e magnésio, ou a contaminação por metais pesados, como chumbo e níquel.

b) Objetivos: Provocar a desnaturação de proteínas em presença de ácidos fortes

c) Materiais

Vidrarias

- 1 pipeta de vidro de 5mL
- 1 pipeta de vidro de 1mL
- 1 Tubo de ensaio

Reagentes:

- Solução de Ácido tricloroacético 20%
- Solução de ovoalbumina 10%

Acessórios:

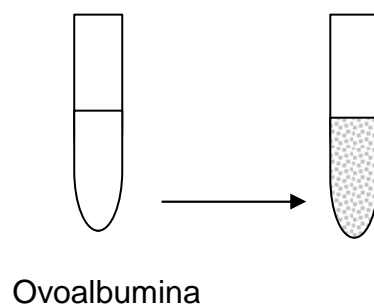
- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas

d) Procedimento

Pipetar para um tubo de ensaio 2 mL da solução de ovoalbumina. Acrescentar 1 mL da solução de ácido tricloroacético.

e) Resultado esperado

Tubo1: resultado positivo com a formação de uma solução leitosa com precipitados brancos



f) Resultado Obtido

2. Desnaturação da proteína através de ácidos

a) Fundamentação teórica

Os ânions de reagentes alcalóides (tricloroacético, pícrico, etc.) são capazes de se combinar com proteínas que possuam resíduos de aminoácidos na forma de cátions (carregados positivamente) formando complexos insolúveis.

b) Objetivo: Provocar a desnaturação de proteínas em presença de metais pesados.

c) Materiais

Vidrarias:

- 1 pipeta de vidro de 5mL
- 1 pipeta de vidro de 1mL
- 1 Tubo de ensaio

Reagentes:

- Solução de Acetato de chumbo a 10%
- Solução de ovoalbumina 10%

Acessórios:

- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas

d) Procedimentos

Pipetar para um tubo de ensaio 2 mL da solução de ovoalbumina. Acrescentar 5 gotas de solução de acetato de chumbo. Observar a reação.

e) Resultados esperados

Tubo1: resultado positivo com a formação de uma solução leitosa com precipitados brancos

f) Resultado Obtido

3. Precipitação fracionada por soluções salinas concentradas

a) Fundamentação teórica:

Os sais neutros têm efeitos pronunciados na solubilidade das proteínas globulares, podendo tanto aumentar quanto diminuir a solubilidade da proteína na solução. A capacidade desses sais de influenciar a solubilidade das proteínas é uma função de sua **força iônica**, que depende tanto de sua concentração como do número de cargas elétricas dos cátions e ânions que formam o sal. Entretanto, o efeito do aumento ou da redução da força iônica na solubilidade pode ser diferente para cada tipo de proteína, o que permite que elas sejam separadas de uma mistura apenas variando-se a concentração de sal na solução. À medida que a concentração do sal é aumentada, a solubilidade da proteína se reduz gradativamente. Em forças iônicas suficientemente elevadas, uma proteína pode ser quase completamente precipitada de sua solução, um efeito denominado **precipitação por salificação** ou “**salting – out**”. Um dos fatores é que a concentração elevada de sais pode remover a água de hidratação das moléculas de proteína, reduzindo, dessa maneira, sua solubilidade; além disso, outros fatores podem estar envolvidos como a competição entre os íons salinos adicionados e o soluto (proteína), diminuindo a capacidade de solvatação do solvente aquoso.

Os precipitados protéicos resultantes da precipitação por salificação mantêm sua conformação nativa e podem ser dissolvidos novamente, em geral sem haver desnaturação. Conseqüentemente, a função da proteína pode ser recuperada após o término do processo e remoção do sal.

b) Objetivos: Correlacionar a concentração de sais neutros com a solubilidades das proteínas

c) Materiais

Vidrarias:

- 1 pipeta de vidro de 5mL
- 1 pipeta de vidro de 1mL
- 1 Tubo de ensaio

Reagentes:

- Solução de concentrada de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Solução de ovoalbumina 10%

Acessórios:

- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas

d) Procedimento

Pipetar para um tubo de ensaio (A) 2 mL da solução de ovoalbumina. Adicionar, pelas paredes, 2mL da solução concentrada de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$

Pipetar para um tubo de ensaio (B) 2 mL da solução de ovoalbumina. Adicionar, pelas paredes, 2mL da solução concentrada de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ e 2mL de água destilada

e) Resultado esperado

Tubo A: resultado positivo com a formação de uma solução leitosa com precipitados brancos

Tubo B: Sem alteração

f) Resultado Obtido

PESQUISA

1. De quais formas se pode promover a desnaturação de proteínas?
2. O que é desnaturação protéica?
3. No que consiste a precipitação por salificação?

8. ENZIMOLOGIA

As enzimas possuem, em geral, estrutura protéica, sendo que foram descritas algumas moléculas de RNA com atividade catalítica

As enzimas, como todas as proteínas, são sintetizadas pelas células e constituem catalizadores biológicos, muito mais eficientes do que os catalizadores inorgânicos.

Os catalisadores são substâncias, que aceleram a velocidade de uma reação química, diminuindo a energia de ativação, sem serem consumidos no processo. Embora toda a estrutura da molécula seja necessária para o papel catalítico, a ligação com o substrato dá-se apenas numa porção bem definida da enzima – o sítio ou centro ativo, formado por alguns resíduos de aminoácidos presentes na cadeia polipeptídica, que se aproximaram devido aos dobramentos inerentes da estrutura terciária. Portanto, a estrutura e a forma do centro ativo são uma decorrência da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura protéica.

As enzimas não alteram a constante de equilíbrio nem a variação de energia livre das reações, sendo regeneradas, sob a forma original, ao final da catálise. As moléculas reagentes são denominadas substratos (S) e produtos (P)

são formados ao final. As enzimas são, geralmente, bastante específicas com relação aos substratos, formando um complexo com estes durante a catálise:



Algumas teorias procuram explicar esta especificidade: 1- teoria de Fischer (“chave-fechadura”) , onde enzima e substrato seriam complementares; 2- teoria de Koshland do encaixe induzido, ou seja, o substrato durante a catálise se encaixa na enzima; 3- teoria que propõe o perfeito encaixe no estado de transição, estado onde a barreira energética (energia de ativação) foi vencida. Diversos são os fatores que influenciam a velocidade de uma reação enzimática. Por terem estrutura protéica, alterações no pH, na temperatura, compostos orgânicos como a uréia, na força iônica do meio reacional podem modificá-las (às vezes, até a estrutura dos substratos é alterada), modificando, assim, a velocidade das reações. Como esperado, a concentração de substrato e de enzima no meio reacional são determinantes para a velocidade reacional.

Neste capítulo apresentamos como objetivo geral evidenciar o comportamento enzimático como catalisador biológico, tanto nas condições ideais, como sob as mais variadas mudanças de temperatura, pH, substratos (especificidade enzimática), tempo de reação e concentrações do substrato.

1) Atividade catalítica da Amilase salivar

a) Fundamentação teórica

O amido é um polissacarídeo formado da união de várias moléculas de glicose por meio das ligações glicosídicas. Amido é formado por moléculas de alfa-D-glicose.

O amido é uma mistura de dois polissacarídeos: o amido solúvel, ou Amilose, possui apenas cadeias lineares de glicose unidas em ponte alfa-osídicas 1:4.

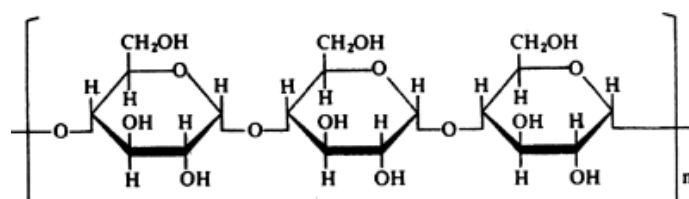


Figura 5: Representação das ligações glicosídicas presentes no amido

Cadeias de alfa-D-glicose costumam enrolar-se em espiral, formando essa estrutura helicoidal na qual as hidroxilas estão voltadas para o exterior.

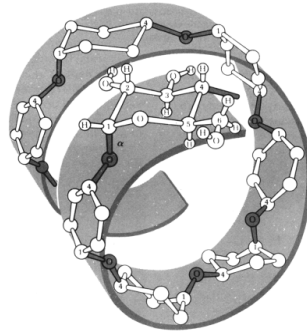


Figura 6: Estrutura helicoidal característica da amilose

O lugol cora o amido porque o iodo fica preso no interior dessas hélices.

Amilopectina corresponde ao amido ramificado, o segundo componente dos grãos de amido. Ramificações surgem sempre que são montadas pontes osídicas 1:6.

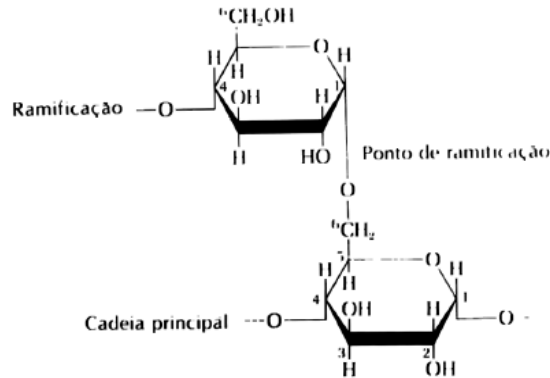


Figura 7: Representação das ligações glicosídicas comuns nas ramificações da amilopectina

Nos carboidratos complexos ramificados (amilopectina), os pontos de ramificação (pontes 1:6) dão origem a cadeias laterais cujas extremidades são não redutoras. Durante o processo de digestão, a alfa-amilase quebra as pontes osídicas 1:4, mas não as 1:6, resultando numa estrutura bastante ramificada chamada dextrina-limite. Somente a amilo-1:6 glicosidase (enzima

desramificadora) é capaz de hidrolisar essas pontes 1:6, permitindo a completa digestão da amilopectina.

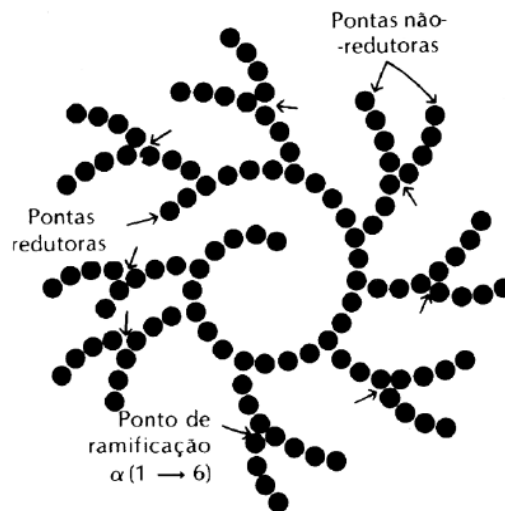


Figura 8: Aspecto estrutural do amido

Quimicamente, a hidrólise também pode ser desencadeada pela ação de ácidos fortes.

b) Objetivos: realizar a hidrólise química e enzimática do amido.

c) Material

- Solução de amido a 1%
- Solução de lugol
- Solução de HCl 1:2
- Solução salina a 0,95%
- Solução de saliva: secretar 1ml d saliva em um tubo de ensaio adicionar 9ml de saliva e misturar

d) Procedimento da Hidrólise Química

- Rotular um erlenmeyer para a análise ácida (amido+HCl)
- Adicionar com auxílio de uma proveta 30ml da solução de amido a 1%
- Acrescentar 3ml de HCl 1:2

- Rotular três tubos de ensaio em AA1, AA2 e AA3, cada um deles contendo 5ml de água destilada.
- No tubo de ensaio rotulado em AA1, em tempo 0' pipetar uma alíquota de 5ml do erlenmeyer e deixar em banho de gelo.
- No tubo de ensaio rotulado em AA2 pipetar uma alíquota de 5ml do erlenmeyer, levar para o banho de água fervente em tempo 10' e depois levar para o banho de gelo.
- No tubo de ensaio rotulado em AA3 pipetar uma alíquota de 5ml do erlenmeyer, levar para o banho de água fervente em tempo 20' e depois levar para o banho de gelo.
- Retirar os tubos de banho de gelo
- Quando todos os tubos estiverem em temperatura ambiente adicionar 10 gotas de sol. De lugol em cada tubo.

e) Procedimento da Hidrolise enzimática

- Rotular um erlenmeyer para a análise enzimática (amido+sol. saliva)
- Adicionar com auxílio de uma proveta 30ml da solução de amido a 1%
- Acrescentar 1ml de sol. de saliva a 1%
- Rotular três tubos de ensaio em AE1, AE2 e AE3, cada um deles contendo 5ml de água destilada.
- No tubo de ensaio rotulado em AE1, em tempo 0' pipetar uma alíquota de 5ml do erlenmeyer e deixar em banho de gelo.
- No tubo de ensaio rotulado em AE2 pipetar uma alíquota de 5ml do erlenmeyer, deixar em temperatura ambiente pelo tempo 10' e depois levar para o banho de gelo.
- No tubo de ensaio rotulado em AE3 pipetar uma alíquota de 5ml do erlenmeyer, deixar em temperatura ambiente pelo tempo 20' e depois levar para o banho de gelo.

- Retirar os tubos de banho de gelo

- Quando todos os tubos estiverem em temperatura ambiente adicionar 10 gotas de sol. De lugol em cada tubo.

f) Resultado esperado: desaparecimento gradativo da cor azul do lugol, indicando a quebra do amido.

g) Resultado Obtido

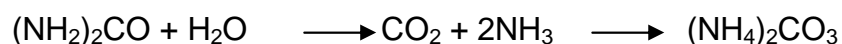
PESQUISA

- 1) Explique como a concentração de substrato pode interferir na velocidade da reação
- 2) Faça um gráfico, que evidencie o efeito da temperatura na atividade enzimática
- 3) Discorra sobre a ação do pH na atividade enzimática observada *in vitro*
- 4) Explique por que desnaturação implica em perda da atividade enzimática.

2) Caracterização da Urease

a) Fundamentação teórica

A uréase é uma enzima responsável pela catalise da uréia em amônia e dióxido de carbono, de acordo com a reação abaixo:



Esta enzima é encontrada em diversos microrganismos como bactérias, fungos e também em seres superiores como algumas plantas. Como grande parte dos catalisadores biológicos a estrutura bioquímica da uréase é protéica, apresentando características compatíveis com esta classe de biomoléculas.

b) Objetivos: demonstrar a natureza protéica da enzima.

c) Materiais

Vidrarias

- 3 Tubos de ensaio
- 8 pipetas de vidro de 2 ou 5 mL

Reagentes

- Solução de urease
- Reativo de Biureto
- Ácido Nítrico Concentrado

Acessórios

- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas

Água destilada

d) Procedimentos

1) Reação do Biureto

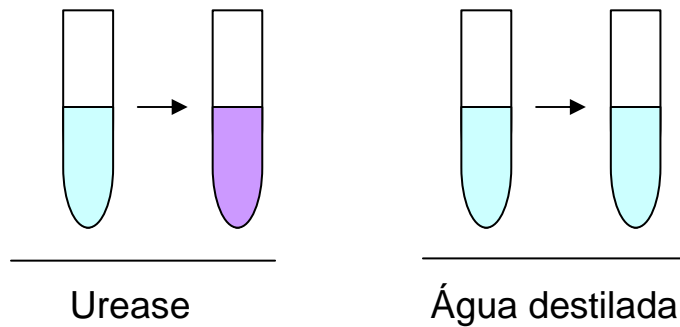
Em um tubo de ensaio marcado "A" colocar 2 gotas de solução de urease e juntar 2ml de água destilada. Agitar e adicionar 2ml do reativo de biureto.

Em um tubo marcado de "B" colocar 2 ml de água destilada e 2 ml do reativo de biureto. Misturar e compara os tubos

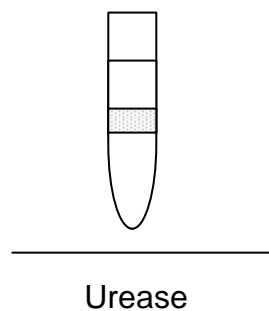
2) Reação de Heller

Em outro tubo de ensaio colocar 4 gotas de solução de urease e 2ml de água destilada. Agitar. Manter o tubo inclinado e juntar pela parede 1ml de ácido nítrico concentrado, sem agitar.

e) Resultado esperado: Positivo na reação de biureto no tubo “A” ocorrendo mudança de cor para lilás.



Positivo no teste de Heller com o surgimento de um anel branco na interface de reação dos líquidos



f) Resultado Obtido

PESQUISA

- 1) Qual é a reação catalisada pela uréase?
- 2) Qual a fonte da uréase usada nos experimentos?

- 3) Explique a ausência de atividade da uréase, quando previamente fervida
- 4) Explique a inibição da enzima por sais de mercúrio

3) Enzimas – Oxiredutases: Polifenol Oxidase

a) Fundamentação Teórica

As oxidoredutases são enzimas relacionadas com as reações de óxido-redução em sistemas biológicos. As polifenóis oxidases são enzimas responsáveis pela oxidação de compostos fenólicos. Frutas e vegetais que contem compostos polifenólicos, quando cortados e expostos ao ar sofrem escurecimento, causando pela ação da polifenol oxidase sobre os compostos fenólicos que são oxidados a ortoquinonas. Essas ortoquinonas polimerizam com facilidade formando compostos escuros, as melaninas. Essas reações de escurecimento enzimático podem ser mais facilmente observadas em vegetais de cores claras como batatas, bananas e maçãs.

A reação enzimática é do tipo: $AH_2 + O_2 \rightarrow A + H_2O$. As enzimas que catalisam essas reações contêm cobre na estrutura.

Os compostos produzidos na reação absorvem luz na região do espectro entre 320 a 450nm e portanto pode-se avaliar espectrofotometricamente a atividade da polifenol oxidase.

b) Objetivo: Extrair e avaliar a atividade da polifenol oxidase da banana.

c) Procedimento

- Extração da polifenol oxidase da banana

Pesar 23g de banana e homogeneizar em um liquidificador juntamente com 100mL de tampão citrato-fostato (ácido cítrico 0,1M + K₂HPO₄ 0,1M, pH 6,0). Centrifugar a 3000 rpm por 20min. O sobrenadante é um substrato aquoso que contém a polifenol oxidase.

- Determinação da atividade da polifenol oxidase

Preparar 2 tubos de ensaio contendo em cada um deles de pirogalol 0,1M e 3mL do tampão citrato-fosfato, pH 6,0. Um tubo será o branco (B) e o outro tubo teste (T).

Tubos	Substrato – pirogalol (mL)	Tampão Ac, Cítrico-Fostafo pH 6 (mL)	H2O (mL)
B	2,0	3,0	-
T	2,0	3,0	-
C	-	3,0	2,0

Obs: Zerar o espectrofotômetro com água em 390 nm.

Fazer as seguintes adições, na ordem:

Tubo B (branco) – 0,1 mL de água

Tubo C (controle) – 0,1 mL do extrato (não contém o substrato)

Tubo T (teste) – 0,1mL do extrato. Disparar imediatamente o cronômetro e proceder a leitura das absorvâncias nos tempos indicados na tabela:

Tempo (minutos)	TESTE – Absorbâncias (390 nm)
0,5 (30 seg)	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
10	

Terminada a leitura de todos os tempos indicados proceder a leitura dos tubos branco (B) e controle (C).

Para cada um dos tempos fazer a seguinte subtração:

Abs = Absorbância do teste – (Leitura do branco – leitura do controle).

Representar graficamente a absorvância em função do tempo.

A atividade comumente é expressa nos laboratórios de controle das indústrias como aumento da absorvância / min / g de material seco.

PESQUISA

1. Qual o intervalo de tempo no qual a velocidade da reação cresce linearmente? Justifique.
2. Qual a atividade da enzima por mL da preparação enzimática?
3. Qual a importância dessa reação enzimática na indústria de frutas?
4. Sugira uma forma de evitar o escurecimento enzimático na industrialização da banana.

9. ANÁLISE BIOQUÍMICA DA URINA

O exame simples de urina, exame sumário de urina ou urina tipo I é um dos métodos mais práticos para diagnóstico e acompanhamento de pacientes com alterações do trato urinário.

O exame deve ser feito com urina recém-colhida, no meio do jato urinário, em frasco limpo. A melhor amostra para exame é a primeira urina da manhã, por ser mais concentrada e ter pH mais baixo, permitindo melhor conservação dos elementos figurados e de cilindros, além de facilitar a determinação semi-quantitativa da proteinúria (presença de proteína na urina).

O exame tem início pela avaliação da cor, turvação e cheiro da urina. Presença de espuma em abundância indica proteinúria. Vários medicamentos podem alterar a cor da urina. Utilizam-se métodos físico-químicos para análise da densidade, do pH, pesquisa de proteínas, glicose, e cetonas. O sedimento urinário é examinado ao microscópio. E o exame bacteriológico da urina compreende a microscopia direta e a cultura.

Neste livro, nos deteremos ao exame qualitativo de urina (EQU), que nos fornece informações de grande utilidade clínica, não apenas no âmbito do funcionamento do sistema urinário, mas também de outros órgãos, como o pâncreas endócrino e o fígado. A presença de glicosúria e/ ou cetonúria são bons indicativos de Diabetes Mellitus, já a presença de bilirrubinúria, urobilinogenúria, cristais de bilirrubina, e/ ou cristais de urato de amônia são indicativos de doença hepática. Neste exame são analisados aspectos físico-químicos da urina que, somados a outros exames laboratoriais e aos achados clínicos, ajudam no diagnóstico de vários quadros patológicos.

Caracterização de Glicose na Urina – Método de Benedict

a) Fundamentação teórica

A glicose é um monossacarídeo que apresenta o grupo aldeído livre. A presença de glicose na urina pode ser evidenciada na reação de Benedict, onde a ação redutora do carboidrato age sobre os sais de cobre em meio alcalino, produzindo um precipitado amarelo ou vermelho tijolo de óxido cuproso.

b) Objetivo: Determinar a presença de glicose em uma amostra de urina.

c) Materiais

Vidrarias:

- 1 pipeta de vidro de 5 mL
- 1 pipeta de vidro de 1 mL
- 1 Tubo de ensaio

Reagentes: Reagente de Benedict

Amostra: Urina

Equipamentos:

- Banho-Maria

Acessórios:

- Estante para tubos de ensaio

- Pêra de borracha
- Pinça
- Termômetro
- Cronômetro
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas

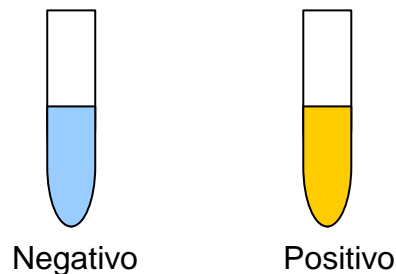
d) Procedimento

Em um tubo de ensaio identificado, limpo e seco, pipetar 5 mL do Reativo de Benedict e adicionar 10 gotas de urina límpida agitar e ferver em banho-maria por 5 minutos.

e) Resultados esperados

Resultado positivo para glicose: líquido de cor vermelho tijolo

Resultado negativo para glicose: líquido de cor azul ou verde



f) Resultado obtido

g) Interpretação do resultado

A glicosúria acompanhada de hiperglicemia é indicativo de *Diabetes melitus*, entretanto, sem hiperglicemia pode ser doença tubular renal ou síndrome de Fanconi

(defeito reabsortivo generalizado dos túbulos renais). Resultados falso-positivos podem ocorrer em ingestão elevada de carboidrato pouco antes da coleta da urina.

Determinação de Albumina na Urina – Método de Heller

a) Fundamento da técnica

A reação se baseia na coagulação da proteína, presente na urina, pelo ácido nítrico, manifestada através de anel branco leitoso. A coagulação é causada pela perda da solubilidade da proteína no estado desnaturado, provocado pelo ácido.

b) Objetivo: Evidenciar a presença de proteinúria pela desnaturação com ácido nítrico.

c) Materiais

Vidrarias:

- 2 pipetas de vidro de 5 mL
- 1 Tubo de ensaio
- Funil de vidro
- Béquer de 25 mL

Reagentes: Ácido Nítrico

Amostra: Urina filtrada

Acessórios:

- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Suporte para funil
- Papel de filtro
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas

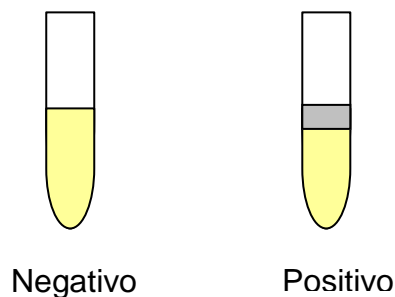
d) Procedimento

Em um tubo de ensaio limpo e seco pipetar 3 mL de urina filtrada e adicionar 2 mL de ácido nítrico, lentamente no fundo do tubo, de modo que os dois líquidos não se misturem.

e) Resultado esperado

Resultado positivo para proteína: Formação de anel branco leitoso na superfície de contato dos dois líquidos.

Resultado negativo: Formação de anel transparente na superfície de contato dos dois líquidos.



f) Resultado obtido

g) Interpretação do resultado

O resultado de proteinúria positiva é indicativo de lesão glomerular com perda da proteína de alto peso molecular que normalmente não é filtrada pelo glomérulo intacto.

Determinação de Albumina na Urina – Método Sulfossalicílico

a) Fundamentação teórica

A reação consiste da desnaturação da proteína pelo ácido sulfossalicílico com formação de metalproteína.

b) Objetivo: Evidenciar a presença de proteína na urina pela desnaturação com ácido nítrico.

c) Materiais

Vidrarias:

- 1 pipeta de vidro de 5 mL
- 1 pipeta de vidro de 1 mL
- 1 Tubo de ensaio
- Funil de vidro
- Béquer de 25 mL

Reagentes: Ácido Sulfossalicílico 20%

Amostra: Urina filtrada

Acessórios:

- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Suporte para funil
- Papel de filtro
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas

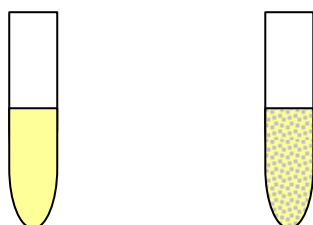
d) Procedimento

Em um tubo de ensaio identificado, limpo e seco, colocar 5 mL de urina filtrada e adicionar 5 gotas de solução de ácido sulfossalicílico e misturar.

e) Resultado esperado

Resultado positivo para proteína: Turvação ou precipitação do líquido.

Resultado negativo: Líquido translúcido.



Negativo

Positivo

f) Resultado obtido

g) Interpretação do resultado

O resultado de proteinúria positiva é indicativo de lesão glomerular com perda da proteína de alto peso molecular que normalmente não é filtrada pelo glomérulo intacto.

Determinação de Corpos Cetônicos na Urina

a) Fundamentação teórica

Os corpos cetônicos (acetona, ácido diacético e beta-hidroxibutírico) são procedentes do metabolismo dos ácidos graxos. Tem maior relevância clínica no diagnóstico da cetoacidose diabética, entretanto, cetonúria pode ser encontrada em outras situações: dieta rica em gordura, cetoacidose alcoólica, jejum prolongado, febre, após exercícios físicos, gravidez, pós-operatórios. Com o auxílio do reagente de Imbert, apresentando na sua composição o nitroprussiato de sódio, este reage em meio acético sobre a acetona formando composto colorido.

b) Objetivo: Evidenciar a presença de corpos cetônicos em uma amostra de urina

c) Materiais

Vidrarias:

- 2 pipetas de vidro de 5 mL
- 1 pipeta de vidro de 1 mL
- 1 Tubo de ensaio

Reagentes: Reagente de Imbert

Hidróxido de amônio

Amostra: Urina filtrada

Acessórios:

- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Suporte para funil
- Papel de filtro
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas

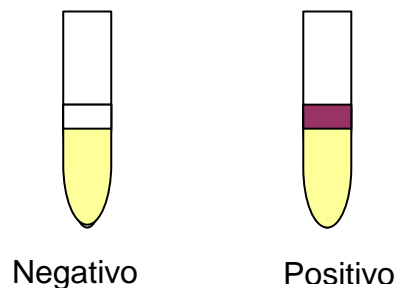
d) Procedimento

Em um tubo de ensaio limpo, seco e identificado, colocar 5 mL de urina, 1mL do reativo de Imbert. Agitar e inclinar o tubo deixando escorrer pela parede de tubo 2 mL de hidróxido de amônio, cuidadosamente de modo a não se misturarem os líquidos.

e) Resultado esperado

Resultado positivo para cetonúria: aparecimento de anel violáceo a roxo na superfície de contato dos líquidos.

Resultado negativo para cetonúria: formação de anel transparente na superfície de contato dos líquidos.



f) Resultado obtido

g) Interpretação do resultado

A cetonúria é característica em pacientes diabéticos e pode ocorrer em indivíduos normais quando submetidos a jejum prolongado.

Reações falso-positivas podem ocorrer no uso de levodopa, metildopa e captopril. O ácido beta-hidroxibutírico não é detectado pela reação do nitroprussiato de sódio, podendo a cetonúria ser negativa caso este seja o corpo cetônico predominante.

Detecção de Fadiga Muscular por meio da Urina – “Test de Donnaggio”

a) Fundamentação teórica

A fadiga muscular é capaz de provocar desequilíbrio bioquímico, facilmente constatado pela reação de Donnaggio, a qual somente ocorre em meio ácido, sendo indispensável verificar o pH da urina a ser examinada. Se a mesma apresentar pH neutro ou alcalino, deverá ser acidulada com algumas gotas de ácido acético, em quantidade suficiente para que ela se torne ácida. Esta exigência é sumamente importante, porque sem a sua observância, observa-se resultados irregulares e duvidosos.

b) Objetivo: Determinar fadiga muscular por intermédio de amostra de urina.

c) Materiais

Vidrarias:

- Tubos de ensaios
- Funis de vidro
- Pipetas graduadas de 10 mL

Reagentes:

- Solução aquosa de tionina “Merck” a 0,1% (esta solução deve ser preparada a quente para que o corante se dissolva completamente)
- Solução aquosa de tionina a 0,01%
- Solução de molibdato de amônia a 4% (preparada a solução acidula-se com 1 gota de ácido clorídrico para cada 25 mL de solução)
- Ácido acético

Amostra: Urina filtrada

Acessórios:

- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Suporte para funil
- Papel de filtro
- Papel de “Tournesol”
- Papel Toalha
- Descarte para pipetas

d) Procedimento

Após coleta e verificação de pH (a urina deve ter $\text{pH} < 7$), filtra-se a urina. Em seguida ferve-se durante 1 minuto, espera-se esfriar e filtra-se novamente. Nestas condições, a amostra pode ser submetida ao “Test de Donnaggio”, constituído em 2 fases.

1ª Fase:

A reação é feita em uma série de 6 tubos de ensaio, designados por A1, A2, A3, A4, B1 e B2, nos quais os reativos serão colocados em diferentes proporções, dentro da ordem exposta no quadro abaixo e que deve ser atentamente observada. Deve se ter o cuidado de agitar a cada nova mistura.

	1º lugar	2º lugar	3º lugar
Tubo A1	2 mL mol. de am.	2 mL de urina	1 mL tion. 0,1%

Tubo A2	2 mL de urina	1 mL tion. 0,1%	2 mL mol. de am.
Tubo A3	2 mL de urina	1 mL mol. de am.	1 mL tion. 0,1%
Tubo A4	2 mL de urina	2 mL tion. 0,1%	1 mL mol. de am.
Tubo B1	1 mL mol. de am.	1 mL de urina	2 mL tion. 0,01%
Tubo B2	1 mL de urina	2 mL tion. 0,1%	1 mL mol. de am.

Após repouso de 24h, procede-se a leitura desta 1ª fase.

Os resultados obtidos nos diversos tubos são expressos por números que obedecem a uma graduação que vai de 0 (negativo) a 5 (fortemente positivo), graduação esta correspondente ao maior ou menor depósito de tionina formado e à coloração mais ou menos intensa do líquido sobrenadante.

Designa-se por 0 (zero), quando a tionina precipita-se completamente no fundo do tubo e a urina apresenta-se completamente límpida e clara.

Designa-se por 5 (cinco), quando pelo contrário, a coluna líquida fica inteiramente corada, não havendo precipitação alguma de tionina.

Os graus são, pois, os seguintes:

1 – Levíssima positividade (urina ligeiramente corada e quase total precipitação da tionina);

2 – Leve positividade (urina um pouco mais corada e grande precipitação de tionina);

3 – Mediana positividade (acentuada coloração da urina e média precipitação de tionina);

4 – Grande positividade (forte coloração da urina e pouca precipitação de tionina);

5 – Forte positividade (intensa coloração da urina e nenhuma precipitação de tionina).

A soma dos graus de cada tubo constitui o resultado da primeira fase da reação.

2ª Fase:

Tomam-se os tubos que apresentaram reação positiva na 1ª fase e verifica-se a reação ácida do líquido, reação esta que poderia ter sido modificada eventualmente pela fermentação da urina. Caso não seja ácida, procede-se nova acidulação pelo ácido acético e ferve-se durante 1 minuto. Após 12 ou 14h de sedimentação, faz-se a leitura do resultado parcial desta 2ª fase, pelo mesmo método adotado na 1ª fase. O resultado obtido, somado ao da 1ª fase, dará a soma global, com que se constrói o diagrama, que representará o grau de fadiga do examinado.

e) Resultado obtido

f) Interpretação do resultado

A reação de Donnaggio é sempre positiva após esforço muscular. Com o treinamento, porém, há diminuição e mesmo desaparecimento de positividade da reação, o que torna este teste um ótimo meio para o controle do treinamento dos desportistas.

PESQUISA

- 1)** A presença de glicose na urina (glicosúria) é determinada por agentes redutores não-específicos, como na reação de Benedict, ou com tiras com reagentes específicos para a glicose. Os primeiros, além de menos sensíveis, produzem reação falso-positivo em presença de vários açúcares, ácidos e alguns medicamentos. Explique a reação de Benedict, identificando os agentes responsáveis pelo processo de oxidação-redução.

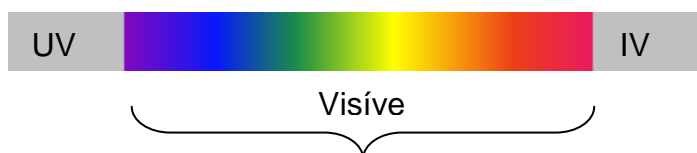
- 2) Com o passar do tempo, além da eventual alteração de pH devido à fermentação da urina, que outra alteração podemos esperar no tubo positivo para a reação de Benedict?
- 3) A determinação do teor de glicose circulante (glicemia) é o elemento básico para o diagnóstico de diabetes, não sendo fundamental a pesquisa de glicosúria, pois resultados falsamente positivos ou negativos podem ser encontrados. Exemplifique estas situações.
- 4) Concentrações elevadas de glicose na urina estão associadas a algumas condições não necessariamente patológicas. Exemplifique situações fisiológicas em que podemos encontrar glicosúria.
- 5) Qual o papel do nitroprussiato de sódio, presente no reativo de Imbert, na caracterização de corpos cetônicos na urina?
- 6) Em que condição a cetonúria pode estar presente mesmo que não seja detectada pela análise da urina?
- 7) Presença de cetonúria em pacientes diabéticos indica descompensação metabólica grave. Por outro lado, indivíduos normais após jejum prolongado também podem apresentar cetonúria. Explique os mecanismos envolvidos nas duas situações.
- 8) O que representa o anel branco leitoso formado no tubo positivo para a reação de Heller?
- 9) Explique o método sulfossalicílico para detecção de proteinúria (proteína na urina).
- 10) Qual a importância clínica da detecção precoce de microalbuminúria (excreção urinária de albumina entre 30 e 300mg/24h ou entre 20 e 200µg/min, na ausência de infecção urinária ou doenças agudas) em pacientes diabéticos e ou hipertensos?

10. COLORIMETRIA E ESPECTROFOTOMETRIA

Na bioquímica, as análises de biomoléculas podem ser realizadas de forma **qualitativa**, onde a molécula pesquisada está presente ou ausente em uma amostra, ou de forma **quantitativa**, onde se pode determinar a quantidade exata da molécula pesquisada em um determinado material biológico.

Um dos principais instrumentos para as análises quantitativas na bioquímica são os métodos de ópticos como a colorimetria e a espectrofotometria. Estas análises se baseiam na capacidade de algumas soluções absorverem a luz.

Considerando que a luz é definida como uma radiação electromagnética composta de é uma gama de comprimentos de ondas (nm), as análises colorimétricas se baseiam na absorção da **luz visível** pela substância a ser dosada e na espectrofotometria o princípio é semelhante, entretanto, o espectro de luz absorvido apresenta comprimentos de onda entre o **ultravioleta** e o **infravermelho**. Assim, quanto maior a concentração da molécula pesquisada, maior a absorção de luz, sendo relações diretamente proporcionais.



Cor	Comprimento de onda (nm)
Violeta	390-455
Azul	455-492
Verde	492-577
Amarela	577-597
Laranja	597-622
Vermelho	622-780

Tabela 1: Relação das cores com os respectivos comprimentos de onda

Um raio de luz monocromática ao atravessar uma solução contendo uma substância, uma parte da luz será absorvida (Absorbância) e outra parte será transmitida atravessando a solução (Transmitância). A luz pode ser refletida pelo

$$I_0 = I_A + I$$

recipiente que contém a solução, entretanto, nas análises bioquímicas este fenômeno pode ser desconsiderado já que a natureza das cubetas (quartzo ou vidro) onde as soluções são depositadas para a leitura ou eliminadas por comparação de amostra. Pode-se escrever portanto que:

I_0 é a intensidade da luz incidente na amostra será igual a luz absorvida (I_A) e a luz transmitida (I_T) de acordo com o esquema abaixo:

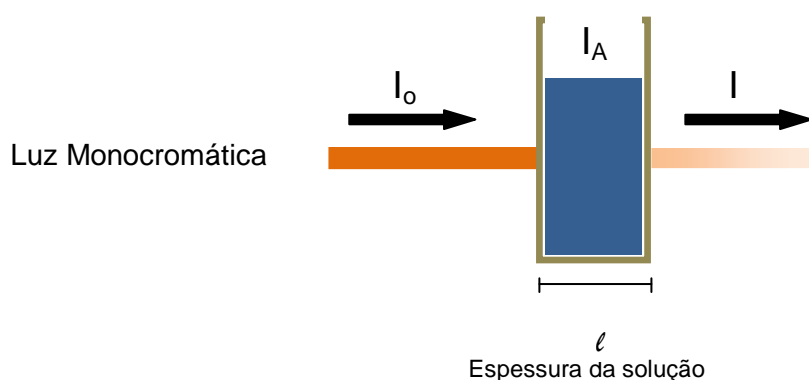


Figura 10: Representação dos fenômenos ópticos

A Transmitância é a razão a intensidade da luz emergente (I) e a intensidade da luz incidente (I_0), isto é:

$$T = I / I_0$$

A absorbância (A) é definida como logaritmo negativo da transmitância e, experimentalmente, é um parametro mais adequado por apresentar uma relação linear com a concentração da substância absorvente.

Esta relação é determinada pela Lei de Lambert-Beer que é obtida da relação de duas leis distintas: a lei de Lambert que diz que cada camada sucessiva do meio absorve uma fração igual da radiação, destacando a importância da espessura da cubeta usada; a lei de Beer determina a relação entre a absorção e a concentração da substância em solução, sendo razões diretamente proporcionais.

Os fotocolorímetros e espectrofotômetros são aparelhos que se baseiam nestes fenômenos físico-químicos para quantificar uma determinada amostra tendo um padrão de referência.

Para a medida da absorção de luz visível ou invisível, as indústrias oferecem vários modelos de aparelhos com o objetivo de viabilizar as análises bioquímicas. Para o seu funcionamento, todo fotocolorímetro ou espectrofotômetro apresenta uma fonte de luz, que em geral é uma lâmpada de tungstênio para luz visível e uma de lâmpada de deutério para ultravioleta. O feixe de luz é direcionado para um monocromador, onde um comprimento de onda é selecionado, permitindo então a emissão de uma luz monocromática. A luz incide no compartimento onde a cubeta, contendo a amostra, é encaixada. A luz transmitida pela amostra alcança um fotomultiplicador que converte o estímulo óptico em elétrico que é então convertido em valores de absorbância, transmitância ou até mesmo em concentração, dependendo dos recursos do aparelho em uso.

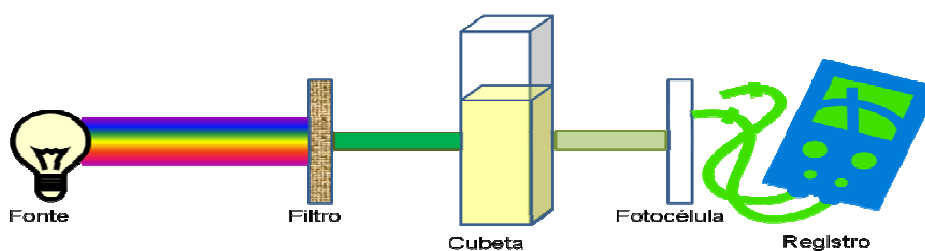


Figura 11: Esquema funcional do espectrofotômetro

As vantagens deste método são na simplicidade do seu fundamento, fácil aplicação e emprego amplo, entretanto, apresenta algumas desvantagens como incompatibilidade com alguns tipos de amostra (suspensões ou amostras diferentes que absorvem no mesmo comprimento de onda).

1. Determinação quantitativa de glicose

a) Fundamentação teórica

A glicose pode ser determinada pelo método da ortotoluidina a partir da reação com uma amina aromática que reage com a glicose em solução de ácido acético a quente. A ortotoluidina se condensa com o grupo

aldeido da glicose formando uma glicosilamina e uma base de Schiff correspondente.

b) Objetivo: determinar a concentração de glicose e montar uma curva dose resposta.

c) Material

Vidraria

- Pipetas
- Tubos de ensaio
- Provetas
- Bequer

Reagentes

- Solução Padrão de glicose (10mg de glicose diluída em 100 mL de água destilada e contendo 0,2g de ácido benzóico)
- Ortotoluidina a 5% (colocar 950 mL de ácido acético glacial em um bequer de 1000mL e colocar 1,5g de tiuréia e misturar, adicionar 50mL de ortotoluidina; manter em frasco âmbar e temperatura ambiente)

Acessórios:

- Estante de tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Papel toalha
- Descarte para pipetas

d) Procedimento

Monte os tubos de ensaio de acordo com a tabela abaixo:

Tubos	Glicose-padrão	Água destilada	Sol. Ortotoluidina	Absorbância
B	-	1,0mL	10,0mL	
T1	0,08mL	1,92mL	10,0mL	

T2	0,16mL	1,84mL	10,0mL	
T3	0,24mL	1,76mL	10,0mL	
T4	0,32mL	1,68mL	10,0mL	
T5	0,40mL	1,60mL	10,0mL	

Homogeneizar os tubos e levar para o banho-maria por 10 minutos. Ler em filtro de 630nm. Calcule a concentração da glicose para cada alíquota e monte uma curva correlacionando a concentração e a absorbância.

e) Resultado obtido

2. Determinação quantitativa de proteínas

a) Fundamentação teórica

Substâncias contendo ligações peptídicas forma um complexo corado com sais de cobre em solução alcalina. Se também tiverem grupos aromáticos, estes reduzem o reagente formando complexos coloridos.

b) Objetivo: Determinar quantitativamente a concentração de proteínas

c) Material

Vidraria

- Pipetas
- Tubos de ensaio
- Provetas
- Bequer

Reagentes

- Reativo de Biureto

- Solução padrão de proteína: pesar soroalbumina bovina (B.S.A.) 5mg/mL de NaOH a 1%

Acessórios:

- Estante de tubos de ensaio
- Pêra de borracha
- Papel toalha
- Descarte para pipetas

d) Procedimento

Monte os tubos de ensaio de acordo com a tabela abaixo:

Tubos	Glicose-padrão	Água destilada	Sol. Ortotoluidina	Absorbancia
B	-	1,0mL	10,0mL	
T1	0,10mL	1,90mL	10,0mL	
T2	0,20mL	1,80mL	10,0mL	
T3	0,30mL	1,70mL	10,0mL	
T4	0,40mL	1,60mL	10,0mL	
T5	0,50mL	1,50mL	10,0mL	

Homogeneizar os tubos e por 10 minutos em temperatura ambiente. Ler em filtro de 540nm. Calcule a concentração de proteína para cada alíquota e monte uma curva correlacionando a concentração e a absorbância.

e) Resultado obtido

3. Determinação de Vitamina A

a) Fundamentação teórica

O retinol, retinal e ácido retinóico são formas ativas da vitamina A, uma vitamina lipossolúvel sintetizada pelas plantas como carotenóides mais complexos. A vitamina A participa de várias funções biológicas principalmente na manutenção da visão e da pele.

b) Objetivo: Determinar a concentração de vitamina A em uma amostra

c) Materias

Vidrarias

- Erlenmeyer 150mL
- Tubos de ensaio
- Proveta
- Pipetas
- Funil de separação
- Bequer

Reagentes

- Hidróxido de potássio 33%
- Etanol amínico
- Ácido clorídrico a 25%
- Éter de petróleo
- Sulfato de sódio anidro
- Hexano
- Ácido Trifluoacético (1mL de ácido trifluoroacético + 3mL de cloroformio)

Equipamentos

- Banho-Maria
- Espectrofotometro
- Balança

Acessórios

- Estante para tubos de ensaio
- Pêra de Borracha
- Suporte para funil
- Papel toalha

d) Procedimento

Pese 5-10g de amostra (manteiga) e coloque em um erlenmeyer e adicione 10mL de hidróxido de potássio de 33% e 40 mL de etanol amílico. Aqueça por 30 minutos em refluxo. Resfrie rapidamente em banho de gelo e adicione 17mL de ácido clorídrico a 25% mantendo sempre a amostra resfriada. Adicione 50mL de éter de petróleo. Feche o erlenmeyer e agite vigorosamente por 3 minutos. Transfira para um funil de separação, espere a separação das duas fases e reserve a fase orgânica. Filtre em sulfato de sódio anidro e evapore em 35°C. Dissolva o extrato em 1mL de cloroformio. Adicione 4 mL de ácido trifluoacético. Determine a absorvância a 620nm contra um branco contendo todos os reagentes exceto o extrato. Compare a com uma curva padrão.

e) Resultado obtido

REFERENCIAS CONSULTADAS

BRASIL. Ministério da Saúde. **Normas e Manuais Técnicos: Lavar as Mãos – Informações para Profissionais de Saúde**. Série A. Brasília, Centro de Documentação, 1989.

COSTA, M.A.F. **Biossegurança: segurança química básica para ambientes biotecnológicos e hospitalares**. São Paulo: Ed. Santos, 1996.

COSTA, M.A..F. **Qualidade e Biossegurança: uma necessidade de integração**. Revista Biotecnologia, N.4, jan/fev, 32-33, 1998.

E.; VARELLA, M.D.; ASSAD, A.L.D. **Biosafety in Brazil and it´s Interface with other Laws**. <http://www.bdt.org.br/bdt/oeaproj/biosseguranca>, 1998.

Percepção de Riscos em Biossegurança de Laboratórios Centrais de Saúde Pública no Brasil, Núcleo de Biossegurança – Fiocruz-RJ - CGLAB-BSB,2001.

www.usp.br/fo/biossecur/biosseguranca.htm/

LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L. & COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª ed., Editora Sarvier, São Paulo, 1995.

ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C. de; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. **Química orgânica**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1978.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes: Padronização, Preparação, Purificação**. 2ª Edição. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., 1972.

CAMPBELL, J.M.; CAMPBELL,J.B. **Matemática de Laboratório Aplicações Médicas e Biológicas**. 3.ed. São Paulo: Livraria Roca, 1986.

HART, A.; SCHUETZ, R. D. **Química orgânica**. Rio de Janeiro: Editora Campus LTDA, 1983.

AMARAL, L. **Química orgânica**. São Paulo: Editora Moderna Ltda, 1981.

FELTRE, R. **Soluções**. In.: Química - Físico-Química. 2.ed. São Paulo, SP. Editora Moderna. 1983. p. 1-75.

SOLOMONS, T.W G., **Química orgânica**. Rio de Janeiro: LTC, 1983. V. 2.

NEPOMUCENO, M.F; RUGGIERO, A.C. **Manual de Bioquímica: Roteiros de Análises Bioquímicas Qualitativas e Quantitativas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, 2004.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Setor de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica. **Bioquímica: aulas práticas**. Curitiba: Scientia et Labor, 1987. 116p.

VOET, D.; VOET, J.G. **Bioquímica**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

CHAMPE, Pamela C., HARVEY, Richard A, FERRIER, Denise R. **Bioquímica Ilustrada**. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2006.

CISTERNAS, José Raul, Varga, José, Monte Osmar. **Fundamentos De Bioquímica Experimental**. São Paulo: Atheneu, 1997.

KAMOUN, P. LAVOINNE, A. VERNEUIL, H. **Bioquímica e Biologia Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006.

VALIM, Yara Maria Lucisano (Coord). **Práticas de Bioquímica- Conceitos Gerais**. USP: Ribeirão Preto, 2008.

REMÃO, José Oscar dos Reis; SIQUEIRA, Antonio João Sá; AZEVEDO, Ana Maria Ponzio. **Bioquímica: Guia de Aulas práticas**. PUCRS: Porto Alegre, 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE. **Roteiro de Aulas Práticas**. Instituto de Biologia – Departamento de Biologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro, 2007.

ALMEIDA, F. A. **Microalbuminúria como marcador precoce de comprometimento da função renal**. Disponível em: <http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/8-3/micro.pdf> Acesso em: 09 de março de 2009.

GUYTON, Arthur C. & HALL, John E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

PORTO, Celmo Celeno. **Semiologia Médica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara.

MILLER, O. et al. **Laboratório para o Clínico**. 8 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.

MURRAY, Robert K. et al. **Harper: Bioquímica**. 9 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002.

STUDART, Lauro & ALMEIDA, Otacílio. **O controle da Fadiga pela Urina**. Disponível em: http://www.revistadeeducacaofisica.com.br/artigos/1939/46_ocontroledafadiga.pdf. Acesso em: 09 de março de 2009.