



Comissão de Cultura e Extensão  
Instituto de Química de São Carlos  
Universidade de São Paulo



**Apostila**

# **Oficina de Bioquímica**

**Ministrantes:**

Prof. Dr. Andrei Leitão  
Profa. Dra. Fernanda Canduri  
Prof. Dr. Sérgio Yoshioka

Agosto de 2022

# SUMÁRIO

A – Objetivos Gerais das Aulas Práticas de Bioquímica.....	3
B – Normas Gerais do Laboratório Didático de Bioquímica .....	3
C – Material do Estudante .....	3
D – Apostila de Aulas Práticas de Bioquímica.....	3
E – Material Recebido e sua Limpeza .....	3
F - Reagentes .....	4
G – Execução dos Trabalhos Práticos.....	4
H – Regras Básicas para a Elaboração dos Relatórios das Aulas Práticas .....	4
I – Prevenção de Acidentes .....	4
<b>PRÁTICA Nº 1: DETERMINAÇÃO DE PKA DE UM AMINOÁCIDO E EFEITO TAMPÃO.....</b>	<b>5</b>
I. Objetivos .....	5
II. Material necessário.....	5
III. Procedimento .....	5
Parte 1: Determinação do pKa por titulação ácido-base.....	5
Titulações.....	5
Parte 2: Efeito Tampão.....	6
IV. Questões .....	6
<b>PRÁTICA Nº 2: ANÁLISE QUALITATIVA DOS CONSTITUINTES DO OVO .....</b>	<b>7</b>
I. Objetivos .....	7
II. Procedimento Experimental .....	7
III. Determinação da porcentagem de proteína na gema.....	7
IV. Determinação da porcentagem de lipídeos da gema.....	7
V. Determinação da porcentagem de proteína na clara .....	7
VI. Determinação do ponto isoelétrico da albumina do ovo .....	8
VII. Precipitação da albumina do ovo.....	8
VIII. Questões .....	9
<b>PRÁTICA Nº 3: DETERMINAÇÃO DE <math>K_M</math> E <math>V_{MAX}</math> PARA A HIDRÓLISE DE BAPNA COM TRIPSINA COM E SEM INIBIDOR .....</b>	<b>10</b>
I. Objetivos .....	10
II. Soluções a serem preparadas .....	10
II.1. Solução de BApNA 0,1 mM em 25% de DMSO e tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; CaCl <sub>2</sub> 10 mM. (Solução fornecida pelo técnico) .....	10
II.2. Solução tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; CaCl <sub>2</sub> 10 mM, 25 mL. ..	10
II.3. Solução de tripsina (Solução fornecida pelo técnico).....	10
II.4. Solução de ácido acético glacial 30% v/v. ....	10
II.5. Solução de Benzamidina 5 mM, 10 mL. (Solução fornecida pelo Técnico).....	11
III. Cinética Enzimática sem Inibidor .....	11
IV. Cinética Enzimática com Inibidor .....	12
V. Questões:.....	13
<b>PRÁTICA Nº 4: EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO .....</b>	<b>14</b>
I. Objetivos .....	14
II. Extração do amido da batata .....	14
Material necessário .....	14
III. Preparação de 100,0mL de uma solução de amido 1% m/v.....	14

<b>IV. Hidrólise do amido .....</b>	<b>15</b>
IV.1. Hidrólise ácida do amido .....	15
IV.2. Hidrólise enzimática do amido.....	15
<b>V. Questões:.....</b>	<b>15</b>
<b><i>PRÁTICA Nº 5: EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DNA.....</i></b>	<b>16</b>
<b>I. Objetivos .....</b>	<b>16</b>
<b>II. Material necessário.....</b>	<b>16</b>
<b>III. Procedimento .....</b>	<b>16</b>
Extração do DNA da Cebola.....	16
Determinação da concentração do DNA .....	17
Determinação da estabilidade térmica e da pureza do DNA.....	17
Determinação da massa molecular do DNA por eletroforese em gel de agarose .....	17
<b>IV. Questões .....</b>	<b>17</b>

## INTRODUÇÃO

### A – Objetivos Gerais das Aulas Práticas de Bioquímica

As aulas práticas de Bioquímica têm como objetivo criar condições para que os estudantes sejam capazes, ao final do curso, de:

1. Manipular equipamentos freqüentemente utilizados em laboratórios de bioquímica.
2. Conhecer, por meio de reações efetuadas no laboratório, as propriedades químicas das substâncias que compõem os organismos vivos.
3. Interpretar resultados experimentais.

### B – Normas Gerais do Laboratório Didático de Bioquímica

1. Balanças, espectrofotômetros, centrífugas, microscópios ou quaisquer outros aparelhos, somente deverão ser manuseados após instruções, a fim de evitar danos e acidentes.
2. Nos dias e horas destinados aos trabalhos práticos, os estudantes terão à sua disposição professores encarregados de orientá-los na execução e interpretação dos referidos trabalhos.
3. Após o uso de um bico de gás, ou de água, não deixá-los abertos inutilmente, tomando o cuidado de fechar as torneiras completamente.
4. Não lançar nas pias quaisquer materiais, com exceção de água, para evitar corrosão.
5. Não lançar nas pias e calhas papel de filtro usado ou quaisquer substâncias sólidas que possam obstruir os encanamentos.
6. Não lançar fósforos acesos nos locais destinados à coleta do lixo.

### C – Material do Estudante

Todo estudante deverá trazer, para o trabalho prático, o material abaixo relacionado:

1. Avental (item obrigatório) - necessário para a sua proteção. Não será permitida a presença do aluno sem esse item.
2. Apostila de Aulas Práticas - sem a qual é impossível realizar qualquer trabalho no laboratório.
3. Caneta para retroprojeter - para marcar adequadamente a vidraria durante a execução dos trabalhos práticos.
4. Material para anotações.
5. Não serão permitidos alunos de bermudas, shorts ou saias e sandálias.

### D – Apostila de Aulas Práticas de Bioquímica

Constituída de roteiros para a execução do trabalho prático, com exposição completa das marchas das operações. O roteiro de cada trabalho prático deverá ser estudado previamente a fim de possibilitar a sua execução no laboratório. As dúvidas serão resolvidas antes do início dos trabalhos.

O roteiro consta dos seguintes itens:

1. Objetivos específicos - relação dos objetivos que deverão ser alcançados após o término de cada aula.
2. Material necessário - relação do material necessário à execução do trabalho.
3. Procedimento – etapas do trabalho a serem seguidas.
4. Questões sobre as reações, detalhes de técnicas ou cálculos empregados durante o trabalho prático.

### E – Material Recebido e sua Limpeza

1. Cada grupo de estudantes receberá o material necessário à execução do trabalho prático.
  - o aluno não deverá utilizar o material de seus colegas, a não ser com autorização prévia.

2. Será exigido dos estudantes o máximo cuidado com o seu lugar na bancada e com o respectivo material.
3. No caso de inutilização ou quebra de algum material recebido, o estudante deverá dar conhecimento aos professores responsáveis pela aula, a fim de se providenciar a sua substituição.
  - o aluno não deverá jogar no lixo o material inutilizado ou quebrado. Deposite-o em local apropriado. Neste caso, chamar o técnico responsável.
4. Terminado o trabalho, o estudante deverá realizar a limpeza de seu lugar, deixando-o em condições de ser utilizado novamente.

## **F - Reagentes**

1. Para cada trabalho prático haverá à disposição dos estudantes uma provisão dos reagentes relacionados nos roteiros;
2. Imediatamente após o uso cada reagente deverá ser colocado em seu lugar adequado;.
3. Deve-se tomar cuidado com os vidros de reagentes e as soluções neles contidas, a fim de se evitar contaminações;
4. Não trocar as rolhas;
5. Não retornar ao frasco original as soluções retiradas em excesso;
6. Caso seja autorizado pipetar diretamente do vidro de reagentes, usar sempre uma pipeta limpa.

## **G – Execução dos Trabalhos Práticos**

1. Exige-se para todos os trabalhos práticos a mesma atenção, rigor técnico e disciplina.
2. A inobservância de quaisquer dos requisitos técnicos pode induzir erros que invalidam, parcial ou totalmente, o trabalho realizado, não se levando em conta o desperdício de material, reagentes e tempo.
3. Para que o aluno alcance a eficiência desejada é necessário que o mesmo seja pontual, assíduo, ordeiro, aseado e tenha conhecimento prévio do trabalho prático a ser executado.

## **H – Regras Básicas para a Elaboração dos Relatórios das Aulas Práticas**

1. Os relatórios deverão ser feitos à **MÃO, LEGÍVEL, BEM ORGANIZADO** e em **TRIO** (com a letra LEGÍVEL de TODOS).
2. Deverão ser entregues, **NO MÁXIMO**, 2 semanas após o término da prática.
3. Os relatórios deverão constar de: 1) Introdução (envolvendo informações TEÓRICAS acerca da prática realizada), 2) Objetivos, 3) Metodologia (material e métodos utilizados), 4) Resultados e Discussão, 5) Conclusão, 6) Referências e 7) Respostas às questões apresentadas.

## **I – Prevenção de Acidentes**

1. Trabalhar sempre protegido por avental, usando calças (jeans de preferência) e sapato fechado.
2. Usar óculos de proteção.
3. Ter o cuidado de não abrir a torneira de gás do bico de bunsen antes de ter a mão um palito de fósforo aceso.
4. Não utilizar substâncias inflamáveis (álcool, éter, acetona, etc.) nas proximidades de uma chama. Usar banhos de água ou areia.
5. Os reagentes tóxicos e/ou que exalam vapores deverão ser manuseados na capela.

**Obs.: NÃO SERÁ PERMITIDA A PRESENÇA DE ESTRANHOS À TURMA DURANTE AS AULAS.**

# PRÁTICA Nº 1: DETERMINAÇÃO DE PKA DE UM AMINOÁCIDO E EFEITO TAMPÃO

## I. Objetivos

Conhecer o efeito tampão de soluções tamponantes. Determinar os pKas da glicina e seu efeito tampão.

## II. Material necessário

- 500,0 mL de NaOH 0,05 mol/L (a partir de uma solução estoque fornecida)
- 250 mL de HCl 0,05 mol/L (a partir da solução estoque de HCl 3 mol/L)
- 100 mL de HAc 0,1 mol/L
- 50,0 mL de NH<sub>4</sub>OH 0,1 mol/L

### Solução de Glicina pH 1,8 (fornecida)

Preparar 50,0 mL de Solução de Glicina 0,1 mol/L pH 1,8

- Dissolver a massa de glicina suficiente para a solução acima em 40,0 mL de água.
- Ajustar o pH para 1,8 com **solução de HCl 3 mol/L** (solução fornecida).
- Completar o volume para 50 mL e ajustar o pH para 1,8 novamente, se necessário.

### Solução tampão acetato de sódio 0,1mol/L a partir de ácido acético concentrado.

Pipetar volume suficiente para preparar 100 mL de solução de ácido acético 0,1 mol/L em 70 mL de água destilada. Ajustar o pH da solução para 4,75 com o auxílio de soluções de NaOH 1,0 mol/L e 0,1 mol/L. Finalmente, completar o volume para 100,0 mL. Se necessário, ajustar novamente o pH.

## III. Procedimento

### Parte 1: Determinação do pKa por titulação ácido-base

#### Titulações

- 1) Titulação potenciométrica de 10 mL de NH<sub>4</sub>OH 0,1 mol/L com HCl 0,05 mol/L.
- 2) Titulação potenciométrica de 10 mL HAc 0,1 mol/L com NaOH 0,05 mol/L.
- 3) Titulação potenciométrica de 10 mL de Glicina 0,1 mol/L com NaOH 0,05 mol/L

#### OBS.:

- # As titulações potenciométricas devem ser realizadas de 0,5 em 0,5 mL até pH 3,5 para a NH<sub>4</sub>OH, e até pH 10,5 para o ácido acético e glicina.
- # Anotar em uma tabela os valores de pH observados em função do volume de titulante adicionado.

Volume adicionado	pH aferido

Volume adicionado	pH aferido

# Representar os dados no relatório somente na forma de um gráfico.

## Parte 2: Efeito Tampão

### Preparar solução tampão acetato 0,1 mol/L pH 4,75. (fornecida)

Medir o volume suficiente para preparar 100 mL de solução de ácido acético 0,1 mol/L em 70 mL de água destilada. Ajustar o pH da solução para 4,75 com o auxílio de soluções de NaOH 3,0 mol/L e 0,1 mol/L. Finalmente, completar o volume para 100,0 mL. Aferir novamente o pH e, se necessário, ajustar para 4,75.

1. Preparar, por diluição da solução tampão acetato 0,1 mol/L (pH 4,75) preparada, 50 mL de tampão acetato (pH 4,75) nas seguintes concentrações: 0,05 e 0,01 mol/L.
2. Faça a leitura de pH de 20 mL de cada solução tampão acetato, conforme a Tab. 1, adicionando os volumes indicados de HCl 0,05 mol/L utilizando uma micropipeta. Anote os valores das leituras de pH aferidas antes e após as adições de HCl.
3. Repita o mesmo experimento adicionando NaOH como indicado na tabela 2, preenchendo-a.

Tabela 1. Valores de pH após adição de HCl (0,05 mol/L) em tampão acetato (pH 4,75).

Adição nº	Volume de HCl adicionado (mL)	Volume total de HCl adicionado (mL)	Número de mols de H <sup>+</sup> adicionados	pH aferido			
				Tampão acetato pH 4,75 (mol/L)			Água destilada
				0,10	0,05	0,01	
0	0,0						
1º	0,2						
2º	0,3						
3º	0,5						
4º	1,0						

Tabela 2. Valores de pH após adição de NaOH (0,05 mol/L) em tampão acetato (pH 4,75).

Adição nº	Volume de NaOH adicionado (mL)	Volume total de NaOH adicionado (mL)	Número de mols de OH <sup>-</sup> adicionados	pH aferido			
				Tampão acetato pH 4,75 (mol/L)			Água destilada
				0,10	0,05	0,01	
0	0,0						
1º	0,2						
2º	0,3						
3º	0,5						
4º	1,0						

## IV. Questões

1. Demonstre como você achou os valores dos pKas nos gráficos de titulação potenciométrica.
2. Explique o princípio do funcionamento do pHmetro.
3. Qual é a razão de utilizar o padrão primário para titulação potenciométrica? Explique.
4. Explique se é possível preparar uma solução tampão de cloreto de amônio a pH 4,5.

## **PRÁTICA Nº 2: ANÁLISE QUALITATIVA DOS CONSTITUINTES DO OVO**

### **I. Objetivos**

No final deste trabalho prático o estudante deverá saber:

1. Determinar experimentalmente a porcentagem de proteína e lipídeos da gema do ovo.
2. Determinar experimentalmente a porcentagem de proteína na clara.
3. Determinar o ponto isoelétrico da albumina.
4. Identificar a presença de proteína em líquido biológico usando sua propriedade de precipitação por agentes físicos e químicos.
5. Determinar experimentalmente o valor calórico aproximado de um ovo.
6. Explicar o significado das reações e operações realizadas.

### **II. Procedimento Experimental**

1. Pesar 2 béqueres de 100 mL.
2. Separar bem a gema da clara e colocar cada uma das partes nos respectivos béqueres.
3. Pesar os béqueres e anotar o peso da gema e da clara.
4. Transferir a clara para um cilindro graduado de 100 mL e anotar o volume.

### **III. Determinação da porcentagem de proteína na gema**

**Nota: Durante esta operação não deve haver nenhum bico de gás ligado no laboratório.**

1. Adicionar à gema isolada, 15 mL de álcool à 95%. Agitar bem.
2. Adicionar 30 mL de éter. Agitar por 5 minutos.
3. Filtrar para um Erlenmeyer de 125 mL (com um chumaço de algodão).
4. Lavar o precipitado com 3 porções de 10 mL de éter. Adicionar somente nova porção de éter depois do precedente ter sido completamente drenado. Guardar o filtrado.
5. Pesar um papel de filtro.
6. Transferir o precipitado extraído para o papel de filtro desprezando o pedaço de algodão.
7. Secar o precipitado à temperatura ambiente. Não usar a estufa.
8. Pesar o papel de filtrado com o precipitado seco.
9. Calcular a porcentagem de proteínas na gema.
10. Interpretar.

### **IV. Determinação da porcentagem de lipídeos da gema**

1. Pesar um béquer seco de 100 mL.
2. Adicionar 3g de sulfato de sódio anidro ao filtrado obtido em III.4. Agitar por 5 minutos.
3. Filtrar em papel de filtro, recolhendo o filtrado no béquer pesado.
4. Evaporar o solvente em banho de areia.
5. Pesar o béquer com resíduo. Conservar o resíduo.
6. Calcular a porcentagem de lipídeos na gema.
7. Interpretar.

### **V. Determinação da porcentagem de proteína na clara**

1. Transferir 10 mL de clara de ovo para um béquer de 100 mL.
2. Adicionar 15 mL de álcool à 95%. Agitar bem por 2 minutos. Deixar em repouso por mais 3 minutos.
3. Pesar um papel de filtro.
4. Filtrar em papel de filtro pesado previamente. Desprezar o filtrado.



5. Abrir o papel de filtro e levá-lo à estufa para secar completamente.
6. Pesar o papel com o precipitado.
7. Calcular a porcentagem de proteína na clara;
8. Interpretar.

## VI. Determinação do ponto isoelétrico da albumina do ovo

**Nota: Preparar para esta análise e as subsequentes, uma solução de albumina do ovo a 5%, diluindo 5mL de clara em 95 mL de água destilada.**

1. Utilizar 5 tubos de ensaio.
2. Adicionar aos mesmos as soluções, conforme a tabela I.

**Tabela I**

Tubo	1	2	3	4	5
Acetato de sódio 0,1N (mL)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Ácido Acético 0,1N (mL)	0,25	0,50	2,00	--	--
Ácido Acético 1,0N (mL)	--	--	--	0,8	3,20
Água destilada (mL)	3,75	3,50	2,00	3,20	0,80
pH resultante	5,50	5,00	4,50	4,00	3,50
Albumina 5% (mL)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

3. Agitar bem os tubos.
4. Adicionar ao tubo 3, cuidadosamente e com agitação, empregando a pipeta graduada de 10 mL, álcool a 95% até produzir pequena turvação. Anotar a quantidade gasta.
5. Adicionar a mesma quantidade de álcool a cada um dos outros tubos.
6. Deixar em repouso por 10 minutos e anotar em qual dos tubos ocorreu maior formação de precipitado.
7. Interpretar.

## VII. Precipitação da albumina do ovo

### A - Precipitação pelo calor

1. Colocar 2 mL de solução de albumina preparada em VI em um tubo de ensaio.
2. Aquecer direto na chama. CUIDADO: manter vidros de álcool e éter longe da chama.
3. Observar a formação de precipitado.
4. Interpretar.

### B - Precipitação por ácidos fortes – Reação de Heller

1. Colocar 2 mL de solução de albumina em um tubo de ensaio.
2. Acrescentar lentamente, no fundo, 2 mL de ácido acético concentrado. Para isso, introduzir a ponta da pipeta no fundo do tubo de ensaio e deixar escoar o ácido lentamente.

3. Observar a formação de um anel branco na superfície de separação dos dois líquidos.
4. Interpretar.

### **C - Precipitação por agentes de alcaloides**

1. Colocar 2 mL de solução de albumina em um tubo de ensaio.
2. Adicionar 3 gotas de solução saturada de ácido pícrico.
3. Observar o precipitado formado.
4. Interpretar.

### **VIII. Questões**

1. De posse dos dados obtidos nas pesquisas anteriores, calcular o valor calórico do ovo.
2. Qual o ponto isoelétrico da albumina?
3. Por que foi adicionado álcool 95% aos tubos de 1 a 5 da Tabela 1?
4. Em caso de envenenamento por sais de metais pesados, é indicado administrar clara de ovo aos pacientes. Por quê?

# **PRÁTICA Nº 3: DETERMINAÇÃO DE $K_M$ E $V_{MAX}$ PARA A HIDRÓLISE DE BApNA COM TRIPSINA COM E SEM INIBIDOR**

## **I. Objetivos**

Determinação da Constante de Michaelis-Menten e da velocidade máxima e  $K_{cat}$  da reação de hidrólise de BApNA (**Benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida**) pela tripsina. Estudo da influência de um inibidor de tripsina na Constante de Michaelis-Menten e da velocidade máxima da reação e identificação do tipo de inibição.

## **II. Soluções a serem preparadas**

### **Material necessário**

- Tampão Tris-HCl pH 8,0
- BApNA
- Tripsina
- Ácido Acético glacial
- Benzamidina
- DMSO

### **II.1. Solução de BApNA 0,1 mM em 25% de DMSO e tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; CaCl<sub>2</sub> 10 mM. (Solução fornecida pelo técnico)**

→ OBS.: Considerar Massa Molecular do BApNA = 434,88 g/mol para os cálculos das concentrações em mol/L.

### **II.2. Solução tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; CaCl<sub>2</sub> 10 mM, 25 mL.**

1. Preparar 25,0 mL de uma solução tampão Tris-HCl 100 mM dissolvendo a massa correspondente de Tris, de NaCl e de CaCl<sub>2</sub> em 15 mL de água destilada.
2. Ajustar o pH para 8,0 com HCl 3M (fornecido).
3. Completar o volume para 25,0 mL e checar o pH. Se necessário ajustá-lo novamente.

### **II.3. Solução de tripsina (Solução fornecida pelo técnico)**

Pesar 1,0 mg de tripsina e dissolver em 10,0 mL do tampão Tris 100 mM pH 8,0 previamente preparado.

→ OBS: Considerar Massa Molecular da tripsina = 23,8 KDa ou 23300 g/mol para os cálculos das concentrações em mol/L.

### **II.4. Solução de ácido acético glacial 30% v/v.**

Diluir 3,0 mL de ácido acético glacial em água destilada e completar o volume para 10,0 mL.

**CUIDADO! SEMPRE COLOCAR O ÁCIDO NA ÁGUA E NUNCA O INVERSO.**

### II.5. Solução de Benzamidina 5 mM, 10 mL. (Solução fornecida pelo Técnico)

Diluir 1 mL da solução estoque 50 mM em água destilada e completar o volume para 10 mL em balão volumétrico.

### III. Cinética Enzimática sem Inibidor

Pipetar em tubos de ensaio as soluções de tampão Tris-HCl pH 8,0, H<sub>2</sub>O e BApNA como mostrado na TABELA I a seguir e então colocar no banho termostático a 37°C por 2 min.

TABELA I

Número do tubo	Tampão Tris-HCl pH8,0 (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	Volume de BApNA (mL)	Volume de tripsina (mL)	Volume de ácido acético 30% (mL)	Tempo de incubação (min)
1	0,25	0	2,75	0,5	0,5	30
2	0,25	0,25	2,5	0,5	0,5	30
3	0,25	0,75	2,0	0,5	0,5	30
4	0,25	1,25	1,5	0,5	0,5	30
5	0,25	1,75	1,0	0,5	0,5	30
6	0,25	2,25	0,5	0,5	0,5	30
Controle	0,25	0,5	2,75	0	0,5	30

# O volume final de reação é 4 mL, após a adição do ácido acético 30%.

**ATENÇÃO: Não continuar a prática sem ler previamente o texto abaixo com muita atenção.**

→ Após término da montagem dos tubos de 1 à 6, conforme mostrado na TABELA I, adicione 0,5 mL de solução de tripsina no tubo 1 ao tubo 6.

→ Observe um intervalo de 1 minuto entre eles para a adição subsequente da solução de tripsina.

→ Observe o tempo de incubação dos respectivos tubos conforme especificado na TABELA I.

→ Após o devido tempo de incubação de cada tubo individualmente (ver TABELA I), retirar o tubo do banho e adicione 0,5 mL de ácido acético glacial 30% e agite.

#### Leitura de absorvância

→ Faça as leituras de Absorvância (Abs) das amostras dos tubos 1 ao 6 no espectrofotômetro em 410 nm.

→ Complete assim a Tabela II do relatório.

→ Para calcular a concentração de p-nitroanilida hidrolisada em mol/L consideramos seu coeficiente de extinção molar a 410 nm como sendo  $\epsilon = 8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e a equação de Beer-Lambert  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ , onde temos que  $l = 1 \text{ cm}$  logo:

$$[\text{BApNA hidrolizada}]_x = \frac{((\text{Abs tubo } x))}{(8800)}$$

⇒ Considere a concentração em 4 mL como volume final de incubação

Os valores obtidos, inclusive os de absorvância (Abs), deverão ser colocados na Tabela II do relatório e os dados utilizados para construir o gráfico de Michaelis-Menten e o do Linerwever-Burk para estimar os valores de Vmax, Kcat e Km para a hidrólise típica de BApNA.

TABELA II

Tubo	Abs. <sup>@</sup> (UA)	Concentração de BApNA hidrolizada (mol/L)	Tempo de incubação (min)	Velocidade de hidrólise (mol/L.min)
1				
2				
3				
4				
5				
6				

#### IV. Cinética Enzimática com Inibidor

Pipetar em tubos de ensaio as soluções de tampão Tris-HCl pH 8,0, H<sub>2</sub>O, BApNA e Benzamidina como mostrado na TABELA III a seguir e então colocar no banho termostático a 37°C por 2 min. ATENÇÃO: pipetar a benzamidina na lateral do tubo e verter o tubo para misturar as soluções.

TABELA III

Número do tubo	Tampão Tris-HCl pH8,0 (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	Volume de BApNA (mL)	Volume de Benzamidina 5 mM (mL)	Volume de tripsina (mL)	Volume de ácido acético 30% (mL)	Tempo de incubação (min)
1	0,25	0	2,75	0,020	0,5	0,5	30
2	0,25	0,25	2,5	0,020	0,5	0,5	30
3	0,25	0,75	2,0	0,020	0,5	0,5	30
4	0,25	1,25	1,5	0,020	0,5	0,5	30
5	0,25	1,75	1,0	0,020	0,5	0,5	30
6	0,25	2,25	0,5	0,020	0,5	0,5	30
Controle	0,25	0,5	2,75	0,020	0	0,5	30

# O volume final de reação é 4 mL, após a adição do ácido acético 30%.

**ATENÇÃO: Não continuar a prática sem ler previamente o texto abaixo com muita atenção.**

→ Após término da montagem dos tubos de 1 à 6, conforme mostrado na TABELA III, adicione 0,5 mL de solução de tripsina no tubo 1 ao tubo 6.

→ Observe um intervalo de 1 minuto entre eles para a adição subsequente da solução de tripsina e o mesmo intervalo após os 30 min para a adição do Ácido acético.

→ Observe o tempo de incubação dos respectivos tubos conforme especificado na TABELA III.

→ Após o devido tempo de incubação de cada tubo individualmente (ver TABELA III), retirar o tubo do banho e adicione 0,5 mL de ácido acético glacial 30% e agite.

### Leitura de absorbância

→ Faça as leituras de Absorbância (Abs) das amostras dos tubos 1 ao 6 no espectrofotômetro em 410 nm.

→ Complete assim a Tabela IV do relatório.

Os valores obtidos, inclusive as Abs, deverão ser colocados na Tabela IV do relatório e os dados utilizados para construir o gráfico de Michaelis-Menten e o do Linerwever-Burk para estimar os valores de  $V_{max}$ ,  $K_{cat}$  e  $K_m$  para a hidrólise típica de BApNA.

TABELA IV

tubo	Abs. <sup>@</sup> (UA)	Concentração de BApNA hidrolizada (mol/L)	Tempo de incubação (min)	Velocidade de hidrólise (mol/L.min)
1				
2				
3				
4				
5				
6				

### V. Questões:

1. Explique o uso do ácido acético glacial na prática.
2. Que tipo de inibidor é a benzamidina?
3. Sugira o modo de interação do substrato e do inibidor, com a tripsina.

## **PRÁTICA Nº 4: EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO**

### **I. Objetivos**

Obtenção e caracterização do amido de batata por hidrólise ácida e enzimática.

### **II. Extração do amido da batata**

#### **Material necessário**

1 batata média  
Folhas de gaze  
Solução de HCl concentrado (solução fornecida)  
Solução de iodo - fornecida  
Reagente de Benedict – fornecido

#### **Procedimento**

1. Descascar, picotar e pesar uma batata de tamanho médio, transferindo os pedaços (1 cm<sup>3</sup>) para um béquer.
2. Adicionar 100,0 mL de água destilada e homogeneizar durante cerca de 30 s com o liquidificador na velocidade máxima.
3. Filtrar em duas folhas de gaze (completamente abertas) dobradas apenas uma vez, recolhendo o filtrado em um béquer de volume apropriado, e espremendo a gaze no final.
4. Deixar o amido depositar no fundo do béquer (+20 min), e a seguir decantar cuidadosamente, desprezando o líquido sobrenadante com uma pipeta pasteur conectada a uma trompa de vácuo. Caso o amido obtido não esteja completamente branco, lave-o novamente com 100,0 mL de água destilada repetindo, se necessário, a filtração em gaze, e deixando-o depositar para nova decantação (lavar pelo menos 3 vezes).
5. Retirar o líquido sobrenadante e deixar secar no fundo do béquer por um período de uma semana. Manter tampado com papel alumínio perfurado.
6. Pesar e calcular o rendimento.

### **III. Preparação de 100,0mL de uma solução de amido 1% m/v**

1. Pesar amido suficiente para preparar 100 mL de uma solução 1,0% (m/v).
2. Adicionar aproximadamente 25 mL de água destilada fria e agitar fortemente até deixar todo amido em suspensão.
3. Ferver 75 mL de água destilada em um béquer de 250 mL.
4. Adicionar esta suspensão à água em ebulição, lentamente sob agitação constante.
5. Manter o aquecimento e a agitação até que forme uma solução opalescente (transparente).
6. Rotulá-lo como: Solução de amido e o número do grupo.

## **IV. Hidrólise do amido**

### **IV.1. Hidrólise ácida do amido**

1. Colocar um erlenmeyer contendo 25 mL da solução de amido (1,0%) no banho-maria a ~70°C por 10 min.
2. Retirar 2 mL da mistura para utilizar como branco (fazer dois tubos de branco com 1 mL cada).
3. Adicionar 1 mL de HCl concentrado ao erlenmeyer (que deve permanecer no banho a 70°C até o final do tempo de coleta), agitar, marcar o tempo (tempo zero) e imediatamente retirar 2 mL da mistura, colocando 1,0 mL em cada um dos dois tubos de ensaio já numerados.
4. Esfriar os dois tubos em água corrente.
5. Adicionar a um dos tubos 2 mL de reagente de Benedict e deixar em banho-maria à quente (~70°C) por, no mínimo, 15 min para testar a presença de sacarídeos redutores.
6. Adicionar ao 2º tubo 3 gotas de solução de iodo e agitar a temperatura ambiente.
7. Repetir o procedimento descrito acima após 5, 10, 20 e 40 min de reação, dividindo cada amostra em dois tubos de ensaio enumerados, procedendo como indicado acima (em um tubo adicione 2 mL do reagente de Benedict e ao outro 3 gotas de solução de iodo)
8. Anotar os resultados.

Obs: O teste de Benedict e do Iodo devem ser feitos com o branco também.

### **IV.2. Hidrólise enzimática do amido**

1. Coletar 2 mL de saliva em um tubo de ensaio grande.
2. Colocar 15 mL de solução de amido em um segundo tubo de ensaio.
3. A seguir, colocar os dois tubos em banho de água a 37 °C por 10 min para equilibrar as temperaturas da enzima e do substrato.
4. Retirar 2 mL da solução de amido para utilizar como branco (fazer dois tubos de branco com 1 mL cada).
5. Adicionar 0,5 mL de saliva ao tubo contendo amido, agitar, marcar o tempo (tempo zero) e imediatamente retirar 2 mL da mistura, colocando 1,0 mL em cada um dos tubos de ensaio numerados. (Deixar o tubo com o resto da reação em banho de água a 37 °C).
6. Sem demora, adicionar 3 gotas de solução de iodo em um dos dois tubos e agitar.
7. Ao outro tubo, adicionar 2 mL de reagente de Benedict e deixar em banho-maria à quente (~70°C) por, no mínimo, 15 min para testar a presença de sacarídeos redutores.
8. Retirar amostras de 2 mL do tubo de reação após 5, 10, 20 e 40 min, dividindo cada amostra em dois tubos de ensaio e procedendo como indicado acima (em um tubo adicione 2 mL do reagente de Benedict e ao outro 3 gotas de solução de iodo)
9. Anotar os resultados.

## **V. Questões:**

1. Demonstre, com estruturas químicas, a reação de Benedict e do iodo com o amido hidrolisado ou não.
2. Mostre outra reação que possa ser utilizada para determinar qualitativamente a presença do açúcar redutor (com estruturas químicas).
3. Mostre as reações que ocorrem na hidrólise ácida e enzimática do amido com estruturas químicas.



## **PRÁTICA Nº 5: EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DNA**

### **I. Objetivos**

Conhecer as propriedades físico-químicas fundamentais do DNA através da extração do material genético da cebola, a partir dos tecidos do bulbo e de suas propriedades óticas.

### **II. Material necessário**

- 100,0 mL de uma **Solução Extratora** contendo:
  - citrato de sódio 0,15 mol/L
  - dodecil sulfato de sódio 5% m/v
  - NaCl 0,15 mol/L
  - EDTA 0,001 mol/L partindo de uma solução estoque 0,05 mol/L (fornecida).
  
- 50,0 mL de uma **Solução de Solubilização** Tris-HCl (pH 8) contendo:
  - tris-HCl 0,01 mol/L partindo de uma solução estoque de 0,2 mol/L (fornecida)
  - EDTA 0,001 mol/L partindo de uma solução estoque 0,05 mol/L (fornecida).

### **III. Procedimento**

#### ***Extração do DNA da Cebola***

1. Aquecer 100 mL da solução extratora, em um béquer plástico de 500 mL, à 60 °C em um banho térmico.
2. Adicionar uma cebola picotada e agitar suavemente por 2 min.
3. Deixar descansar por 15 min nesta temperatura (60°C), a qual não deverá ser ultrapassada.
4. Colocar imediatamente o béquer em banho de gelo até atingir a temperatura entre 15 e 20°C, sempre com agitação suave para permitir o esfriamento homogêneo. O tempo de resfriamento não pode ultrapassar 6 minutos.
5. Agitar por 45 s em baixa velocidade com o auxílio de um agitador magnético, retirar a barra magnética (“pulga”) e em seguida agitar por 15 s em alta velocidade com auxílio de um Mixer.
6. Colocar o homogeneizado em um béquer de 500 mL e deixar em repouso por mais 20 min no banho de gelo.
7. Filtrar a mistura utilizando um filtro formado por 4 camadas de gaze (completamente abertas) para um béquer de plástico de 250 mL, tomando cuidado para não deixar passar a espuma. Deixar filtrar por pelo menos 15 min.
8. Colocar o béquer de plástico em banho de gelo até atingir a temperatura entre 10 e 15°C.
9. Resfriar em banho de gelo um volume de etanol 95%. Esse volume de etanol deverá ser o mesmo que o obtido na filtração da etapa anterior.
10. Adicionar ao filtrado o etanol previamente resfriado. Esta adição deve ser lenta com o etanol escorrendo pela parede do béquer, sem agitação.
11. Quando a solução estiver viscosa, utilizar um bastão de vidro para coletar o DNA em suspensão. Para isso, tocar rapidamente a superfície da fase líquida superior com a ponta do bastão e girar o bastão somente em um sentido. A substância aderida ao bastão é o DNA existente nas células da cebola.
12. Colocar o bastão com o DNA dentro de uma proveta de 25,0 mL contendo 5,0 mL da solução de solubilização para dissolver o material.

### **Determinação da concentração do DNA**

1. Medir a solução concentrada de DNA em 260 nm, se a leitura de absorbância for superior a 0,7 diluir a amostra como sugere o restante do procedimento.
2. Diluir em um tubo de ensaio 0,5 mL da solução estoque de DNA preparada anteriormente para 10 mL em solução de solubilização.
3. Agitar suavemente o tubo.
4. Fazer a leitura da absorbância em 260 nm. Um valor de absorbância de 0,5 corresponde a 25 µg da dupla hélice do DNA/mL. Se a leitura de absorbância for maior que 0,7 ou menor que 0,1 → conversar com os responsáveis.

### **Determinação da estabilidade térmica e da pureza do DNA**

1. Dissolver toda a amostra do DNA obtida no item 12 com a solução de solubilização para dar origem a uma solução de DNA de 25 µg/mL. Se persistir a presença de material insolúvel, filtrar a solução utilizando um chumaço de algodão.
2. Transferir para 3 tubos de ensaio alíquotas de pelo menos 2-3 mL cada um, sendo que dois tubos serão aquecidos em banho-Maria (água em ebulição) por 15 min, e o terceiro tubo mantido em temperatura ambiente.
3. Após este período, um dos tubos aquecidos deve ser esfriado rapidamente em banho de gelo por 15 min e o outro tubo deve ser esfriado lentamente em temperatura ambiente.
4. Em temperatura ambiente, fazer uma curva de absorção entre 245 e 320 nm (1 medida a cada 5 nm) dos 3 tubos, usando como branco o tampão de solubilização.
5. Outra informação importante obtida do espectro de UV é referente à pureza da preparação do DNA. Soluções de alta pureza apresentam uma razão de absorbâncias  $A_{260}/A_{280} > 1,8$ .

### **Determinação da massa molecular do DNA por eletroforese em gel de agarose**

1. *Preparar o gel de agarose 0,8%:* em um erlenmeyer dissolver 0,2 g de agarose em 25 mL de tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA). Em seguida, colocar por 30 segundos no micro-ondas. Retirar do micro-ondas e agitar. Colocar por mais 10 segundos no micro-ondas. Resfriar em água corrente até que se consiga colocar as mãos (não esfriar totalmente).
2. Verter a solução no suporte para gel e esperar que este fique esbranquiçado e duro (como uma gelatina).
3. Posicionar o gel na cuba e adicionar as amostras já colocadas no corante Blue Green Loading Dye I com o auxílio de uma micropipeta. (1 µL de corante para 10 µL de amostra).
4. Adicionar tampão TAE até cobrir totalmente o gel (a faixa preta no suporte para o gel deve estar voltada para a faixa preta na cuba – pólo negativo)
5. Fechar a cuba e conectar os fios vermelho e preto (vermelho com vermelho e preto com preto)
6. Ajustar para aproximadamente 100 – 110 Volts e aguardar a corrida por aproximadamente 30 minutos.
7. Decorrido este tempo, observar utilizando luz UV e analisar.

## **IV. Questões**

1. Por que a presença do SDS, EDTA e NaCl nesta prática?
2. Explique o efeito observado pelo aquecimento da solução aquosa do DNA.
3. A quantidade de DNA encontrada na cebola é condizente com a literatura?
4. Quais as impurezas que podem existir e em qual comprimento que absorve no UV o DNA e as impurezas?
5. Por que o uso de luz UV para revelar as amostras de DNA presentes no gel de agarose?