

ALGUMAS PRÁTICAS DE BIOQUÍMICA NO CURSO DE AGRONOMIA (PARTE III)

Bruno Marcos Nunes Cosmo¹

Tatiani Mayara Galeriani²

Resumo

A Parte III do artigo Algumas práticas de bioquímica no curso de Agronomia, traz os últimos três procedimentos exemplificados para as práticas de bioquímica. Nesta última parte da coleção tem-se uma noção sobre fragilidade osmótica, açucares redutores e ação da amilase salivar. Existem mais diversas práticas que podem ser adotadas no laboratório, mas que não vem ao caso deste trabalho.

Palavras Chave: Amilase, laboratório, redutores.

Abstract

Part III Article Some biochemical practices in the course of Agronomy, brings the past three exemplified procedures for biochemical practices. In the latter part of the collection we have a sense of osmotic fragility, reducing sugars and action of salivary amylase. There are several practices that can be adopted in the laboratory, but that's beside the point of this work.

Keywords: Amylase, laboratory, reducers.

¹ Graduando no curso de Agronomia na Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

² Graduanda no curso de Agronomia na Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

PRÁTICA 08: FRAGILIDADE OSMÓTICA DOS ERITRÓCITOS

Introdução

O potencial osmótico é a capacidade, por exemplo, d'água ir para um ambiente mais concentrado. Se ela recebe um soluto e fica mais concentrada, busca menos ambientes com maior concentração. A osmose (processo de passagem de água) ocorre do meio hipotônico para o hipertônico. Ao se elevar a concentração de soluto o potencial osmótico tende a ficar negativo, assim, a água pura possui maior potencial osmótico do que quando dissolvida (CAMPELO, 2011).

No solo por suas camadas não serem separadas por membranas, o potencial osmótico tem pouco efeito no movimento da água no solo. Seu principal efeito está na absorção de água pelas raízes das plantas. Em solos salinos, o potencial no solo é menor que o das raízes das plantas. Nas plantas o potencial osmótico, refere-se à presença de sais dissolvidos na solução, os quais reduzem o potencial hídrico, diminuindo a disponibilidade de água. Na região de absorção de água na planta (raiz), o potencial osmótico é mais alto que nas folhas, isso promove movimentação de água no xilema, do solo até as folhas. As plantas estão sempre absorvendo e perdendo água (MAIA et al, 2013).

Na prática a seguir, o potencial osmótico será tratado em relação ao sangue. O sangue é composto por diferentes células que ficam imersas em um líquido composto de água e proteínas, uma dessas células são as hemácias (conhecidas como eritrócitos ou glóbulos vermelhos), elas são anucleadas, vivem cerca de 120 dias, e correspondem a cerca 45% do sangue. Dentro delas estão as hemoglobinas que fazem o transporte de oxigênio no corpo. A hemoglobina é proteína que da cor vermelha ao sangue no homem a principal é a hemoglobina A (SANTOS, 2014).

O objetivo desta aula é determinar a resistência mínima, média e máxima das hemácias misturadas à solução salina e observar, o rompimento das mesmas e a liberação de hemoglobinas.

Material e Métodos

Na aula prática de hoje utilizou-se materiais como, as pipetas volumétricas (1 e 2 mL), conta gotas, pipetador, estante, erlenmeyer, água destilada, micropipeta, tubos falcons. Além de solução salina (NaCl 0,9%), sangue de cavalo, centrifuga e espectrofotômetro. Durante o experimento o mesmo foi dividido em duas etapas sequenciais, ou seja, a segunda era dependente da realização da primeira. Foram preparados 8 tubos falcon marcados e 8 tubos de ensaio.

A metodologia iniciou-se com a montagem da etapa I, que era a preparação dos 8 primeiros tubos (tubos falcon). Os tubos foram marcados de 1 a 8, e preparados como mostra na tabela 01.

Tabela 01- Preparo dos tubos falcon.

Tubos (mL)	1	2	3	4	5	6	7	8
NaCl 0,9%	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6
Água destilada	1,6	1,4	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2
Sangue (Cavalo)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

O sangue foi retirado com o auxílio da micropipeta para uma melhor precisão da quantidade e também, para que os alunos tivessem, prática no manuseio de materiais como este. Após a preparação dos tubos os mesmos foram misturados através de inversão (sem agitação) e centrifugados a 2500 rpm por 5 minutos.

Após a centrifugação deve-se observar a coloração do sobrenadante e do precipitado no fundo do tubo, que deve ser anotada e discutida.

Na etapa II do experimento, foram preparados 8 tubos de ensaio todos com 1 mL de água destilada, marcados de 1 a 8. Com o auxílio de uma pipeta era retirado o sobrenadante da etapa I, tomando muito cuidado para não movimentar o tubo falcon, para não ocorrer uma nova mistura do sobrenadante com o precipitado. Então retirou-se 1 mL do sobrenadante de cada tubo falcon e misturou-se este 1mL de sobrenadante com a água destilada do respectivo tubo, conforme as marcações.

Depois de feita a diluição os tubos foram levados para o espectrofotômetro, e tiveram sua absorvância medida (520 nm). Anotou-se e discutiu-se os resultados.

Resultados e discussão

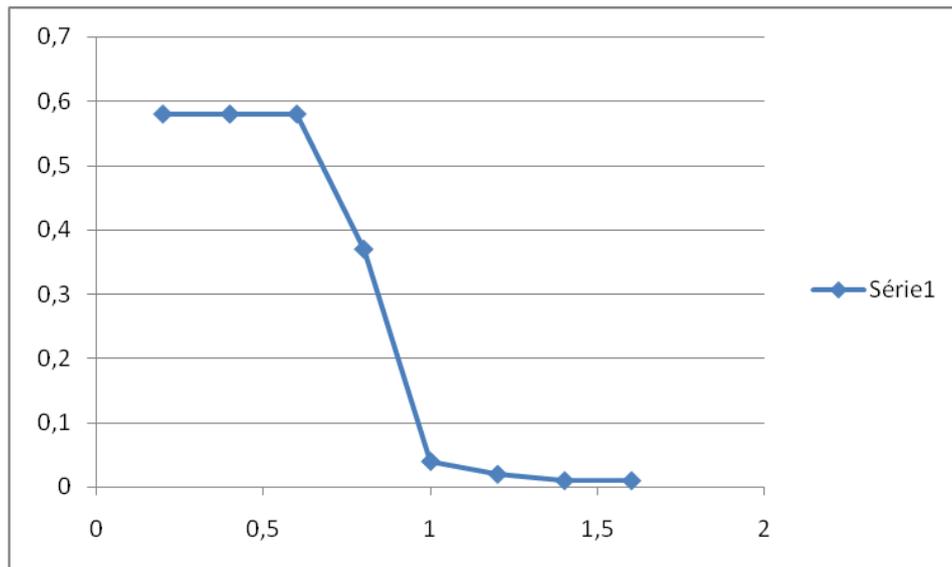
Na etapa I, observou-se a cor do sobrenadante que poderia ser vermelha ou esbranquiçada. Quando as hemácias são rompidas as hemoglobinas são liberadas e assim temos uma coloração vermelha. Quando as hemácias não são rompidas, não há liberação de hemoglobinas e tem-se um tom esbranquiçado. Do tubo 1 até o tubo 4 a cor do sobrenadante ficou vermelha, houve maior rompimento de hemácias e maior liberação de hemoglobina e do tubo 5 até o tubo 8 ficou esbranquiçado, houve um menor rompimento de hemácias e menor liberação de hemoglobina.

Os resultados da etapa II, são mostrados na tabela 02 e no gráfico 01.

Tabela 02. Absorvância das amostras.

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8
Abs (520 nm)	0,58	0,58	0,58	0,37	0,04	0,02	0,01	0,01

Gráfico 01. Curva de calibração e equação da reta.



Conforme pode-se notar na tabela 02 e no gráfico, quanto menor a quantidade de NaCl, maior foi a absorbância, (maior liberação de hemoglobina causada pelo rompimentos das hemácias). Isso acontece por que uma pequena dose de sal, mantém o meio menos concentrado do que o interior das hemácias e com isso a água busca o local mais concentrado, ou seja, o interior das hemácias o que promove a lise (rompimento da membrana). Em doses altas de NaCl, a concentração de soluto fora da hemácia é maior e isso promove um murchamento da membrana, nesse caso não ocorre a lise, sem lise não há liberação de hemoglobinas e a absorbância é menor.

Considerações finais

De acordo com o comportamento das hemácias, pode-se observar que diferentes concentrações de sais influenciam de formas diferentes a membrana das células, isso fica claro pela liberação ou não de hemoglobina, que torna a solução vermelha. Pequenas concentrações favorecem a lise, grandes concentrações não favorecem isso ficou evidenciado pelo gráfico.

Referências bibliográficas

CAMPELO, T. M. **Potencial osmótico da Água**. BIO.lógica. 2011. Disponível em <<http://espacobiolog.blogspot.com.br/2011/11/potencial-osmotico-da-agua.html>> Acessado em 26 de Outubro de 2014.

SANTOS, V. **Hemácias**. Brasilescola. 2014. Disponível em <<http://www.brasilescola.com/biologia/hemacias.htm>> Acessado em 26 de Outubro de 2014.

MAIA, F. E.; ALVARES, H. V. G.; SANTOS, A. E. C.; MELO, H. F.; SOUZA, E. R. **POTENCIAL OSMÓTICO COMO FERRAMENTA ALTERNATIVA NA AVALIAÇÃO DE SALINIDADE EM SOLO NO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO**. UFRPE. Recife, 2013. 3p. Disponível em <<http://www.eventosufrpe.com.br/2013/cd/resumos/R1147-1.pdf>> Acessado em 26 de Outubro de 2014.

PRÁTICA 09: DOSAGEM DE AÇÚCAR REDUTOR NO SANGUE

Introdução

A glicose e outros açúcares (frutose, lactose e maltose), capazes de reduzir o íon cúprico são chamados de açúcares redutores. Açúcares redutores são carboidratos doadores de elétrons por possuírem grupos cetonas e aldeídos livres ou potencialmente livres, capazes de reduzir agentes oxidantes, se oxidam em meio alcalino. A sacarose não é um açúcar redutor, mas depois de sofrer uma hidrólise, tornam-se um (NELSON; COX, 2011).

A glicose é a principal combustível para o cérebro. Com a evolução, os animais desenvolveram mecanismos hormonais complexos para garantir que a concentração de glicose no sangue permanece alta o suficiente para satisfazer as necessidades cerebrais (NELSON; COX, 2011).

Os açúcares são produzidos pelas plantas verdes a partir do dióxido de carbono e da água, à custa da energia solar captada pela clorofila. Enquanto que as plantas constroem os açúcares, os animais, pelo contrário, efetuam a sua degradação para obter energia (PINTO, 2004).

Como nessa prática será usado sangue de cão, deve-se saber os valores para hiperglicemia e hipoglicemia, nestes animais. Considera-se hiperglicemia em cães quando a concentração sanguínea de glicose é superior a 130 mg/dl. E hipoglicemia quando a concentração é inferior a 60mg/dl (SERÔDIO et al, 2008).

O objetivo desta aula é determinar a concentração de açúcares redutores em material biológico, mais especificamente em sangue canino.

Material e Métodos

Na aula prática de hoje utilizou-se materiais como, as pipetas volumétricas (1, 2, 5 e 10mL), conta gotas, pipetador, estante, erlenmeyer, água destilada, tubos de ensaio, tubo falcon, micropipeta, aquecedor, bolas de vidro (bolas de gude), centrifuga e espectrofotômetro. Solução de hidróxido de bário 0,3 mol/L, sangue de cachorro, sulfato de zinco a 5%, o reativo de Somogyi, reativo de Nelson, Solução padrão de glucose (glucose a 100mg%) diluído 1:10 mL. Na aula o experimento foi dividido em duas etapas.

A metodologia iniciou-se com a montagem da etapa I (Desproteíntização e reação de coloração), que era à preparação de 1 tubo falcon, neste foi adicionado 3,5 mL de água destilada e 0,1 mL de sangue (retirado com micropipeta para melhor precisão) e misturado até a completa hemólise. Depois foi adicionado 0,2 mL de solução de hidróxido de bário a 0,3 mol/L, a solução foi misturada e deixada de repouso por 5 minutos. Após esse tempo, ainda foi adicionado 0,2 mL de sulfato de zinco a 5%, misturado e centrifugado a 2500 rpm, por 10 minutos.

Após a centrifugação, foram preparados dois tubos de ensaio: A e B, (amostra e branco/ testemunha, respectivamente). No tubo A foi adicionado 1 mL de sobrenadante da solução do tubo falcon e no tubo B foi adicionado 1 mL de água destilada. Em ambos os tubos foi adicionado 1 mL de reativo de Somogyi, misturar e colocar em banho-maria fervente por 10 minutos, os tubos são tampados com uma bola de vidro para evitar a evaporação. Em seguida, após retirar os tubos do banho-maria deixo-os esfriar e em seguida foi adicionado em ambos os tubos 1 mL do reativo Nelson e misturar, completar o volume para 10 mL com água destilada e misturar (usou-se 3 mL em cada tubo, então adiciona-se 7 mL de água destilada).

Depois os tubos foram levados ao espectrofotômetro, e este foi calibrado com o tubo B, em seguida se determinou a absorvância do tubo A (520nm). Depois comparar os dados com a curva de calibração que será feita a seguir e calcular a concentração de glucose no sangue.

Na etapa II (curva de calibração), foram marcados 6 tubos de ensaios, e preparados como mostra na tabela 01.

Tabela 01- Preparo dos tubos falcon.

Tubos	1	2	3	4	5	6
Padrão de glucose diluído 1:10 (mL)	-----	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Água destilada (mL)	1,0	0,8	0,6	0,4	0,8	--
Reativo de Somogyi	1	1	1	1	1	1

Depois de adicionados os reagentes conforme a tabela 01, os tubos foram misturados e levados a banho-maria fervente por 10 minutos. Após o banho-maria, os tubos esfriaram e foi adicionado em todos os tubos 1 mL de reativo de Nelson, e completado o volume para 10 mL com água destilada. Depois fazer a leitura da absorbância dos conteúdos contra o tubo branco, a 520 nm. Em seguida com o gráfico da curva de calibração determinar a concentração de glucose no sangue.

Resultados e discussão

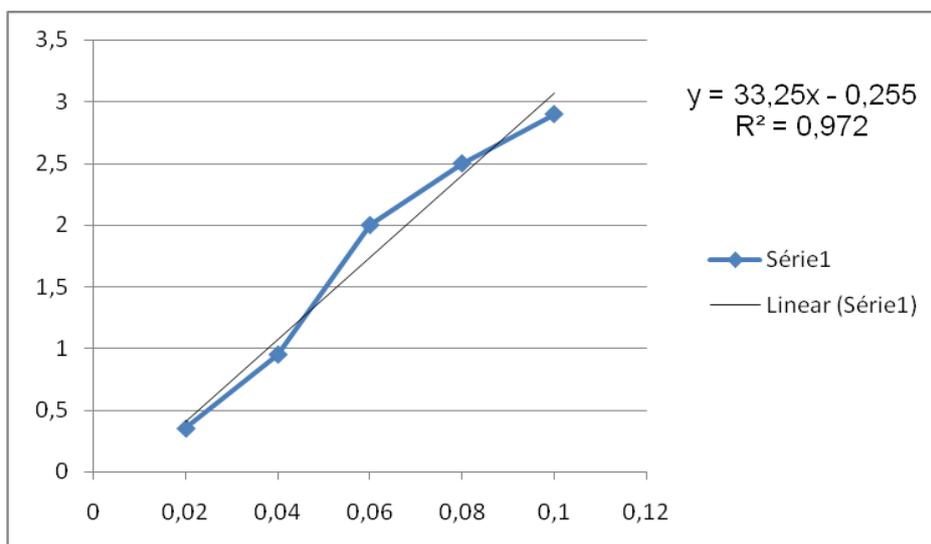
Na etapa I, observou-se a cor do sobrenadante após a centrifugação, a hemoglobina, o ferro entre outros elementos, enfim tudo que não fosse glucose ficou precipitado no fundo do tubo (com isso as substâncias que dão cor vermelha ao sangue), por isso o sobrenadante ficou transparente. O resultado da primeira etapa foi uma absorbância de 0,005 nm. Valor que será usado para calcular a concentração de glucose no sangue com o auxílio da curva de calibração.

Na etapa II, os resultados são mostrados na tabela 02 e no gráfico 01.

Tabela 02. Absorbância para curva de Calibração.

Tubos	1	2	3	4	5	6
Abs (520 nm)	0	0,35	0,95	2	2,5	2,9

Gráfico 01. Curva de Calibração e equação da reta.



A partir da equação da reta obtida com o gráfico se calculou a concentração de glucose no sangue deste animal. O resultado foi uma concentração de 0,0078 mg/mL ou 0,78 mg/ 100mL de glucose no sangue. Para comparar com os valores enunciados por Pinto (2004), esse resultado foi transformado em mg/ dL e se obteve um valor de 0,00078 mg/ dL. E em comparação ao que foi enunciado pelo autor, esse animal se encontra em um estado de hipoglicemia muito avançado, pois a concentração de glucose que ele apresenta esta muito abaixo do que se espera.

Muitos fatores pode tem ajudado a influenciar este resultado, como as condições em que o animal se encontrava, como estava sua alimentação (ou a falta desta). Também poderiam haver fatores referentes a coleta da amostra de sangue, a sua diluição em soluções antes do experimento, alguma alteração sofrida pela amostra ou mesmo algum erro durante a execução do mesmo. Enfim seria necessário uma investigação mais a fundo para saber o real motivo do resultado, mas para Pinto (2004), como já foi dito esse animal estaria muito hiperglicêmico.

Considerações finais

Como foi demonstrado na prática desta semana, a partir de valores conhecidos no caso da concentração de glucose, é possível criar curvas de calibração e por meio destas descobrir valores desconhecidos. Como pode se observar os valores de concentração de glucose nesse animal está muito abaixo do que se espera até para hipoglicemia, talvez alguma alteração na amostra, ou mesmo as condições físicas do animal (doenças, alimentação, entre outros), podem ter influenciado neste resultado.

Referências bibliográficas

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª ed. Porto Alegre. Artmed, 2011. 1274p.

SERÔDIO, A. T.; CARVALHO, C. B.; MACHADO, J. A. **Glicemia em cães (Canis familiaris) com glucômetro digital portátil e teste laboratorial convencional**. JBCA – Jornal Brasileiro de Ciência Animal, Vol. 1, Nº 1, 2008. 25-34 p. Disponível em <http://www.jbca.com.br/v1n1/artigo3/3_glicemia.pdf> Acessado em 05 de Novembro de 2014.

PINTO, P. **Identificação de Açúcares**. Escola Secundária do Padre António Martins Oliveira de Lagoa, 2004. 8 p. Disponível em <http://pedropinto.com/files/secondary/tlq/tlqII_relatorio8.pdf> Acessado em 05 de Novembro de 2014.

PRÁTICA 10: HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO AMIDO - CURVA DE TEMPO PARA A ATIVIDADE DA AMILASE SALIVAR

Introdução

A digestão do amido é iniciada na boca, pela saliva que contém uma amilase. Amilases são enzimas catalisadoras da hidrólise do amido, atuando na digestão do mesmo. Na natureza estão distribuídas: α -amilase da saliva e do suco pancreático, β -amilase do malte, γ -amilase de fungos, etc. São classificadas como: Endo-enzimas (α -amilases) e exo-enzimas (β e γ -amilases). A α -amilase salivar e pancreática catalisa a hidrólise da ligação glicosídica α (1-4) da amilose, amilopectina e do glicogênio (PETKOWICZ, 2007).

Os inibidores de α -amilase (IAs), junto a outros inibidores formam os fatores antinutricionais. Os IAs estão presentes em animais, plantas e microorganismos, sua natureza vai de carboidratos á proteínas. Estudos com animais mostram que um inibidor de α -amilase do feijão é capaz de reduzir a glicemia vinda da digestão de amido. Certos autores afirmam que os inibidores tem origem de proteínas de reserva que com a evolução se especializaram em funções inibidoras (IGUTI, 1993).

A Faseolamina é uma proteína extraída do feijão que atua como inibidor da α -amilase. Têm efeitos comprovados na inibição da absorção do amido na digestão do alimento, o que diminui a participação dos carboidratos nas calorias absorvidas no corpo, atua na digestão do amido deixando de adicionar calorias (ARYELA, 2011).

O objetivo desta aula é traçar uma curva de tempo para a reação de hidrólise do amido pela amilase salivar, e quantificar o substrato, utilizando uma solução de iodo/ iodeto de potássio.

Material e Métodos

Na aula prática de hoje utilizou-se materiais como, as pipetas volumétricas (1, 2, 5 e 10 mL), conta gotas, pipetador, estante, erlenmeyer, água destilada, tubos de ensaio e fotocolorímetro. Saliva, tampão imidazol 0,05 mol/L pH 7,2, solução de amido 1%, saliva diluída em imidazol 0,05 mol/L pH 7,2 (1:50) e lugol (cora o amido). A turma foi dividida em 3 equipes, uma formada pelas meninas e as outras duas pelos meninos, só que nesse caso eles foram redivididos conforme o que comeram no almoço. As meninas ficaram em um grupo independente do que haviam comido, já nas equipes masculinas uma delas era de quem tinha comido carne, arroz e feijão, e na outra equipe ficou quem comeu carne e arroz, mas não feijão. Foram 9 meninas na primeira equipe, 9 meninos na segunda e 4 meninos na última.

A metodologia iniciou-se com cada equipe coletando a saliva dos integrantes em um béquer. Depois, de coletada essa saliva foi transferida, cerca de 0,1 mL (evitando pegar a parte com espuma), para um tubo de ensaio contendo 4,9 mL de tampão imidazol 0,05 mol/L pH 7,2 e misturara ao mesmo. Após esse etapa, cada equipe fez uma bateria de 5 tubos de ensaio, marcados de 1 a 5. Neles foram adicionados os seguintes reagentes, conforme tabela 01.

Tabela 01 – Preparo dos tubos.

Tubos	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
Reagentes (mL)					
Água destilada	1,0	----	-----	-----	-----
Solução de amido 1%	-----	1,0	1,0	1,0	1,0
Saliva Diluída em tampão imidazol 0,05 mol/L pH 7,2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Após a preparação dos tubos, os tubos 3, 4 e 5 foram levados para o aquecedor a 37°C, por 5 minutos, 10 minutos e 15 minutos, respectivamente. Depois desse tempo, já com todos os tubos na bancada, foram adicionadas 3 gotas de lugol e 5 mL de água destilada em cada tubo.

Depois disso, ajustou-se o espectrofotômetro a 630 nm (filtro vermelho) com o tubo 1 (branco), fez-se as leituras das absorvância dos demais tubos. Depois disso todas as equipes informaram seus resultados e os mesmos foram discutidos.

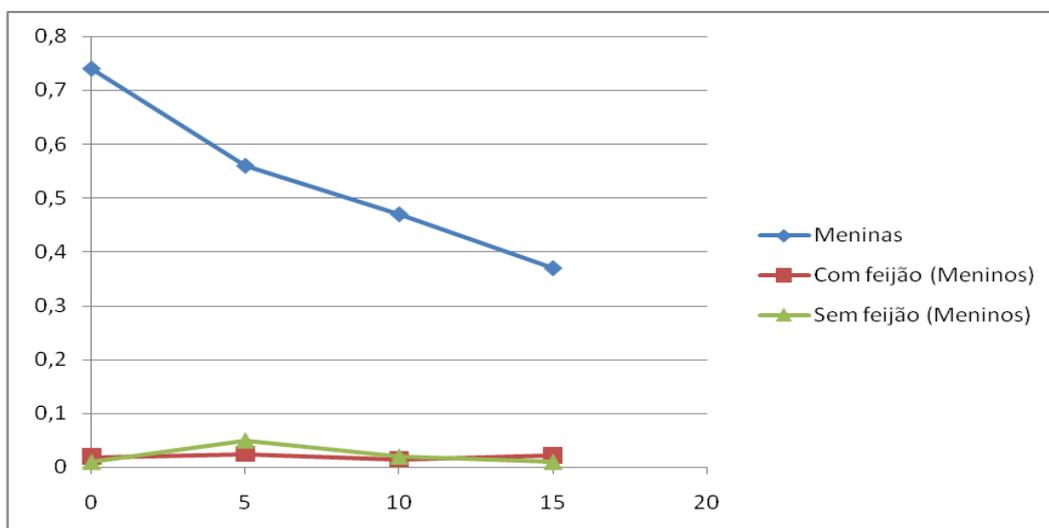
Resultados e discussão

Os resultados das absorvâncias de cada equipe são mostrados na tabela 02. Em seguida o gráfico faz uma comparação melhor entre os resultados de cada equipe, em relação ao tempo.

Tabela 02: Resultados de absorvância (em nm) das 3 equipes.

Tubos	Equipe 1 (Meninas)	Equipe 2 (Com feijão)	Equipe 3 (Sem feijão)
1	0,0	0,0	0,0
2	0,74	0,020	0,01
3	0,56	0,025	0,05
4	0,47	0,015	0,02
5	0,37	0,022	0,01

Gráfico 01: Medidas de Absorvância em relação ao tempo.



Nota-se analisando a tabela e o gráfico que os valores de absorvância para os dois grupos de meninos se mantém próximos, no grupo que consome feijão as 4 medidas se mantiveram próximas, como dito na introdução o feijão tem uma enzima chamada faseolamina que inibi a ação da α -amilase, no grupo que não consome feijão elas variaram um pouco mais, e vemos que a inibição é menor por que em algumas medidas quase não há mais amido, o que significa muita ação da amilase, mas ambas ficaram muito baixas em relação ao grupo das meninas.

O grupo das meninas teve maior absorvância consequentemente teve maior coloração de lugol, isso ocorre por que como dito antes o lugol cora o amido, com esses valores vemos que á mais amido no grupo das meninas e consequentemente se á mais amido a amilase é mais inibida do que no grupo dos meninos. Quanto maior a absorvância menor a atividade da amilase, essa comparação nos leva ao fato que os homens produzem mais amilase (muito provável pelo fato de comerem mais), e/ ou ainda que eles tem menor ação inibidora da mesma na saliva.

Em relação à variação do tempo, quanto mais tempo se passa da refeição mais ocorreu atividade da amilase e menor é a absorvância e consequentemente menos amido. Aquecer os tubos acelera o processo, permitindo comparar as absorvâncias em diferentes períodos de tempo.

Considerações finais

Como foi demonstrado na prática temos muitos aspectos que afetam a ação das amilases, entre eles temos a alimentação, por exemplo, o feijão produz uma enzima inibidora da amilase, o tempo, quanto mais distante da ultima refeição maior foi ação da amilase em degradar o amido, e como pode ser visto na aula o sexo também tem efeito sobre a amilase, os homens tem uma maior ação da amilase e/ ou menor inibição da mesma do que as mulheres.

Referências bibliográficas

PETKOWICZ, C. L. O. et al. **Bioquímica: aulas práticas**. Departamento de Bioquímica. 7ª ed. Curitiba. UFPR, 2007. 188 p.

IGUTI, A. M. **Caracterização e Síntese dos Inibidores de α -Amilase do feijão (*Phaseolus vulgaris*)**. Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 1993. 99 p. Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-10042013-132934/publico/AntoniaMlguti_Tese.pdf> Acesso em 15 de Novembro de 2014.

ARYELA. **Faseolamina - Inibidor de Absorção de Calorias**. Remédios para Emagrecer. 2011. Disponível em <<http://www.emagrecerdicas.com.br/remedios/faseolamina/>> Acesso em 15 de Novembro de 2014.