



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

# *Química Fisiológica - IB 309*

## *Curso Prático*

Professores Idealizadores:

Adriana Rayol Pedrenho  
Sávio Amado da Silva  
Generoso Manoel Chagas  
Humberto Macharetti

# *GENERALIDADES SOBRE O CURSO PRÁTICO DE QUÍMICA FISIOLÓGICA*

## **Objetivos gerais:**

- a) Desenvolver habilidade no manuseio dos equipamentos e reagentes;
- b) Reconhecer a composição de fluidos biológicos através de reações químicas;
- c) Quantificar determinados compostos em fluídos biológicos;
- d) Interpretar resultados experimentais.
- e) Fixar o aprendizado teórico.

## **Considerações importantes:**

- a) Antes das aulas práticas é importante que o aluno esteja de posse do procedimento prático que será elaborado.
- b) É indispensável o uso de jaleco no laboratório. De preferência para que o avental seja de algodão.
- c) Quando necessário, prenda os cabelos.
- d) Não coloque sua bolsa sobre a bancada de prática, existe uma estante para este fim.
- e) Não é permitido fumar no laboratório.
- f) Não procure sentir o odor dos reagentes utilizados nas práticas.
- g) Ao aquecer um tubo de ensaio verifique se não haverá a possibilidade do líquido espirrar na direção de seu rosto ao ferver.
- h) Comunique imediatamente ao professor qualquer acidente. E tenha calma.
- i) Faça silêncio.

## *Caracterização de constituintes da saliva*

### **FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

A saliva é a secreção produzida pelas glândulas salivares, das quais as principais representantes são as parótidas, submaxilares e sublinguais. O ser humano produz em média 1,5 litros de saliva por dia, os ovinos 5 litros, os eqüinos 42 litros e os bovinos 60 litros. Tanto o volume quanto a fluidez da saliva variam em função de estímulos recebidos do sistema nervoso autônomo, sendo o parassimpático (vago) o predominante.

A saliva tem duas funções principais. Ela serve como um “suco digestivo” e como “uma via de excreção”. O seu principal componente como suco digestivo é a amilase salivar (ptialina) responsável pelo desdobramento da amilase. Os principais constituintes químicos da saliva são: água, amilase, mucina, cloreto de sódio e bicarbonato de sódio.

Encontramos ainda na saliva substâncias que estão sendo excretadas e que não possuem qualquer função na digestão tais como o sulfocianeto, o nitrito e a uréia. A uréia excretada na saliva tem importância especificamente na digestão dos ruminantes uma vez que a existência de microorganismos produtores de uréase existentes no rúmen permitem sua reutilização no metabolismo dos compostos nitrogenados.

#### **Objetivos deste tópico**

O objetivo de nossa aula de hoje é identificar a presença de mucina, cloreto, nitrito e sulfocianeto na saliva. Além desse objetivo, nesta aula você deverá também aprender ou aprimorar-se nas seguintes técnicas:

1. Medir volumes de líquidos com o auxílio de pipetas.
2. Misturar corretamente reagentes em tubo de ensaio para obter reações químicas.
3. Observar e relatar os resultados dos ensaios executados comparando-os com respectivos controles.

### **PROCEDIMENTO PRÁTICO**

#### **Testes para a caracterização da mucina**

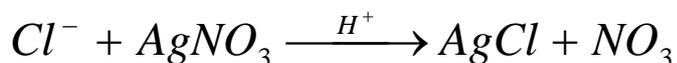
*Fundamento:* A mucina é o maior componente protéico da saliva. Dessa forma, a positividade de testes para proteína indicará a presença de mucina. Para evidenciá-la vamos utilizar duas reações, a reação da ninidrina e a reação xantoproteica. A reação da ninidrina é positiva para aminoácidos e seus compostos e dá como produto uma coloração azul/violeta. A reação xantoproteica é positiva para aminoácidos aromáticos (especialmente tirosina) e dá como produto uma cor amarela que se intensifica por alcalinização.

*Reação da ninidrina* – tomar em um tubo de ensaio 1 mL de saliva previamente filtrada e 1 mL de solução aquosa de ninidrina 0,1%. Aquecer em banho-maria fervente por cerca de 10 minutos. O desenvolvimento de cor azul/violeta indica a positividade da reação.

*Reação xantoproteica* – tomar em tubo de ensaio 1 mL de saliva filtrada, adicionar 1 gota de HNO<sub>3</sub> e três gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. A reação positiva se revela pelo desenvolvimento de cor amarela resultante da nitração dos aminoácidos aromáticos. Resfriar e adicionar NaOH concentrado suficiente para promover alcalinização. A cor se intensifica.

### Caracterização do cloreto

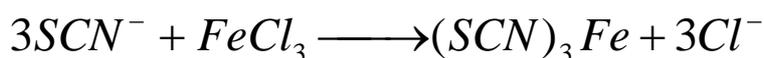
O cloreto pode ser identificado pela reação com o nitrato de prata, em meio ácido, dando cloreto de prata que forma um precipitado branco:



Colocar em tubo de ensaio 1 mL de saliva filtrada. Adicionar 5 gotas de ácido nítrico diluído e 5 gotas da solução de nitrato de prata. A reação positiva se revela pelo desenvolvimento de precipitado branco. Fazer um branco de reação utilizando água no lugar da saliva.

### Caracterização do Sulfocianeto

O sulfocianeto presente na saliva resulta de detoxicação hepática do cianeto derivado da decomposição de cianidrinhas (encontradas naturalmente na mandioca e em outros alimentos) pelo ácido clorídrico do suco gástrico. Sua presença na saliva pode ser evidenciada pela reação com o cloreto férrico que leva à produção do sulfocianeto férrico, produto de cor vermelha.



Como o cloreto férrico é corado em amarelo, nos casos de haver pouco sulfocianeto na saliva, o mais freqüente, só poderemos identificá-lo fazendo a reação do branco com água em lugar da saliva.

Tomar em tubo de ensaio 1 mL de saliva filtrada, 5 gotas de ácido clorídrico e 5 gotas de cloreto férrico 5%. A reação positiva se revela pelo aparecimento de cor vermelha (laranja).

### Caracterização do nitrito

O nitrito encontrado na saliva resulta da detoxicação hepática de nitrato proveniente naturalmente de alimentos como o espinafre ou adicionado como conservante a alimentos de origem animal. Sua presença pode ser identificada por sua reação com o iodeto de potássio que ocorre com liberação de iodo.

Colocar em tubo de ensaio 1 mL de saliva filtrada, duas gotas de ácido sulfúrico diluído (10%) e duas gotas de iodeto de potássio (10%). Desprende-se iodo que pode ser melhor observado pela adição de 1 mL de goma de amido 1% levando ao desenvolvimento de cor azul.

# *Caracterização da atividade amilolítica da saliva*

## **FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

### **Introdução**

O amido é um polissacarídeo constituído por unidades D-glicose, sendo a principal reserva glicídica dos produtos alimentícios de origem vegetal. O amido, sob o ponto de vista químico, não é um produto puro, já que é constituído de 2 componentes moleculares de estruturas químicas semelhantes mas não idênticas: a amilose - cujos resíduos de glicose são unidos por ligações  $\alpha$ -1,4, formando um polímero de cadeia linear - a amilopectina - polímero de estrutura molecular complexa cujas unidades glicosídicas encontram-se unidas por ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6. O amido, em geral, contém em torno de 20% de amilose e 80% de amilopectina.

Os cereais (milho, trigo, cevada, arroz), os tubérculos (batata, mandioca, inhame), alguns frutos (banana) e troncos (palmeira do sagu) são particularmente ricos em amido.

A utilização do amido na alimentação e na indústria depende, em grande parte, das suas propriedades coloidais, pois o comportamento do amido frente à água é extremamente complexo. Na célula vegetal, ele é armazenado em grânulos microscópicos que não são afetados de maneira perceptível pela água fria e são resistentes também ao ataque enzimático. No entanto, se a parede externa da célula for rompida por algum método mecânico (por exemplo, moagem) e tratada com água aquecida, os grânulos ainda intactos absorvem água, incham e iniciam um processo de desintegração, assim a amilose e amilopectina passam para a solução.

A uma temperatura crítica (80-85 °C) o amido liberado sofre uma rápida gelatinização com aumento substancial do volume da suspensão por conta do desenovelamento das cadeias. Esta etapa é conhecida, na indústria, como cozinhamento. A suspensão coloidal formada apresenta-se como um mingau ou goma e, a frio, solidifica dando origem a géis consistentes com propriedades adesivas. O amido gelatinizado é largamente empregado como agente espessante, como adesivo ou como encorpante de tecidos e papéis.

Se o aquecimento for mantido e temperaturas de 100°C ou mais elevadas forem atingidas, o grânulo inchado é totalmente desintegrado e hidratado até formar um sol coloidal. A completa desagregação do amido na água pode ser obtida por aquecimento sob pressão (120-130 °C) por 2 horas. Nestas condições, a estrutura das cadeias, tanto de amilose e quanto de amilopectina é desenovelada, o que a torna mais susceptível à hidrólise.

Ao se diminuir a temperatura de uma dispersão de amido, pode-se, em certas circunstâncias, observar o fenômeno de retrogradação ou regeneração que corresponde à volta para a condição de insolubilidade, com formação de agregados cristalinos, devido à tendência das cadeias de amilose, principalmente, se reassociarem. A retrogradação é um fenômeno parcialmente reversível por aquecimento do material cristalizado. No entanto, repetidos ciclos de retrogradação levam a formação de um material irreversivelmente insolúvel.

A degradação do amido pode ser realizada por via química ou enzimática, sendo o processo conhecido como sacarificação.

### **Ação de ácidos sobre o amido**

A cinética de clivagem das ligações glicosídicas por ácidos depende basicamente da concentração e do tipo de ácido utilizado, assim como da temperatura do processo. A hidrólise ácida do amido é considerada, em linhas gerais, como aleatória porque todas as ligações glicosídicas do amido são igualmente susceptíveis à clivagem, levando à formação

de  $\alpha$ -D-glicose. No entanto, existem informações que, em condições não muito energéticas, as ligações  $\alpha$ -1,6 são 1 a 10 vezes mais resistentes ao rompimento que as ligações  $\alpha$ -1,4 e que as ligações mais internas resistem um pouco mais (cerca de 1,8 vezes) que os terminais redutores da molécula.

A ação de ácidos sobre o amido nos grânulos é extremamente lenta quando comparada ao amido em suspensão, o que explica a necessidade do prévio "cozinhamento" para facilitar a hidrólise. Este procedimento expõe as ligações glicosídicas ao ataque de ácidos, sendo que a velocidade de hidrólise pode ser acelerada pelo aumento da temperatura.

### **Ação de enzimas sobre o amido**

As enzimas são proteínas com atividade catalítica. Elas aceleram reações termodinamicamente favorecidas. Os compostos transformáveis pela ação da enzima recebem o nome de substrato.

As enzimas são específicas em relação à reação que catalisam e algumas exibem também alto grau de especificidade em relação ao substrato embora a maioria delas possa atuar sobre alguns poucos substratos naturais.

Sabe-se que as enzimas diminuem a energia de ativação de uma reação e desta forma permitem um aumento na velocidade da reação. Tal aumento pode ser explicado em termos dos eventos químicos que ocorrem quando da interação da enzima (E) com o substrato (S).

A complementariedade entre E e S envolve interações hidrofóbicas e eletrostáticas como também em muitos casos interações covalentes que se formam transitoriamente.

As fortes forças atrativas que se estabelecem entre a estrutura tridimensional do centro ativo (ou centro catalítico) da enzima e o substrato permitem a aproximação entre os reagentes numa orientação apropriada, o que propicia um aumento na concentração efetiva dos reagentes. Todos estes fatores contribuem para o aumento observado na velocidade, para as altas especificidades e eficiência na liberação de produtos das enzimas.

Existem várias enzimas capazes de catalisar a hidrólise de amido (entre elas as  $\alpha$ -amilases,  $\beta$ -amilases, amiloglicosidases, amido fosforilase, isoamilase) que são amplamente difundidas na natureza e se diferenciam não só pela composição em aminoácidos, como também pelo modo de ação, pH ótimo, temperatura ótima e outros. Estes parâmetros também podem variar para cada enzima segundo sua origem (animal, vegetal ou microbiana).

As  $\alpha$ -amilases são encontradas virtualmente em todas as células vivas. A ptialina (amilase salivar) e amilopsina (amilase pancreática) são  $\alpha$ -amilases que atuam no processo digestivo. Elas podem ser obtidas com facilidade de duas fontes naturais: a saliva que contém exclusivamente amilase salivar e a urina que contém resíduos das duas amilases. Normalmente a atividade amilolítica urinária é muito baixa. Quando ocorrem processos inflamatórios que determinam destruição acelerada de células nas glândulas salivares (parotidite = cachumba) ou pancreáticas (pancreatite) ocorre a liberação de grande quantidade de amilase no plasma sanguíneo com conseqüente elevação da atividade amilolítica urinária.

As  $\alpha$ -amilases são endoenzimas, visto que atuam dentro da cadeia amilácea de forma aleatória, rompendo ligações  $\alpha$ -1,4. Em uma suspensão de amido gelatinizada, a adição de  $\alpha$ -amilase leva a uma queda rápida da viscosidade, evidenciando a fragmentação da cadeia polimérica.

Cerca de 20% dos fragmentos hidrolíticos encontrados nos primeiros estágios de hidrólise são constituídos de oligossacarídeos de baixo PM (maltose, maltotriose, maltotetrose) formados pela quebra simultânea de várias ligações glicosídicas. Os 80% restantes são constituídos de oligossacarídeos de PM variável, denominados genericamente como dextrinas. O produto final da hidrólise completa da amilose pelas  $\alpha$ -

amilases são maltose e a  $\alpha$ -D-glicose. Por outro lado, como estas enzimas não atuam nos pontos de ramificação (ligações  $\alpha$ -1,6) os produtos finais de hidrólise da amilopectina são maltose, glicose e dextrinas ramificadas de baixo PM.

A caracterização da atividade amilolítica pode ser obtida pela evidenciação de seus produtos de hidrólise, as dextrinas. Observemos a seguinte sequência:

AMILOSE	→	ERITRODEXTRINAS	→	ACRODEXTRINAS	→	MALTOSE
+ I <sub>2</sub>		+ I <sub>2</sub>		+ I <sub>2</sub>		+ I <sub>2</sub>
azul		vermelho		incolor		

A sequência descreve os produtos obtidos da reação da amilose com as amilases e as cores que os mesmos dão em presença do iodo. Dessa forma, se tomarmos uma solução de goma de amilo (amilose) e a ela adicionarmos iodo obteremos um produto azul. Se permitirmos que a goma de amilo seja hidrolisada parcialmente pela amilase obteremos a formação da eritrodextrina que, pela adição de iodo, fornece a cor vermelha. Com hidrólise em maior grau obteremos acrodextrinas e maltose que não reagem com o iodo.

### São objetivos das práticas relacionadas a este tópico:

1. Descrever com suas próprias palavras a sequência de transformações operadas pela amilase na molécula da amilose.
2. Caracterizar a presença de produtos da atuação da amilase sobre a amilose pela observação das cores produzidas pela adição de iodo ao meio onde a enzima age.
3. Explicar detalhadamente a função de cada um dos reagentes utilizados no método cinético de determinação da atividade da amilase.
4. Executar uma reação enzimática com tempo pré-fixado fazendo uso do cronômetro para controlá-lo.
5. Executar uma reação enzimática de acordo com a concentração da enzima.
- 5 Interpretar a variedade de cores obtidas nos diversos tubos nos quais se faz o teste de atividade amilolítica pelo método cinético.
- 6 Interpretar a variedade de resultados quando submete-se a enzima a tratamento por fervura ou com HCl.

## PROCEDIMENTO PRÁTICO – Determinação da atividade da amilase salivar de acordo com o tempo de reação.

### 1. Material :

- . amido - solução de amido 0,1% ( 0,1g/100ml) em solução de NaCl 0,9% (salina fisiológica)
- . Enzima alfa-amilase de saliva
- . solução de NaCl 0,9%
- . solução de Lugol (I<sub>2</sub> + I)
- . solução de TCA 5%

### 2. Objetivo:

Testar a atividade amilolítica da saliva humana diluída com solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) em diferentes tempos. A reação será paralisada pela adição de ácido tricloroacético (TCA) a 5% e o resultado observado após a adição de lugol.

### 3. Procedimento:

Tempo zero – O testemunha de um método cinético é denominado tempo zero. Nele não ocorre a atuação da enzima no respectivo substrato. No teste de hoje vamos fazer o tempo zero adicionando o ácido tricloroacético à saliva (enzima) antes de essa ter entrado em contato com a amilose (substrato). Isso significa que a amilase terá sido desnaturada antes de entrar em contato com o substrato.

Numere os tubos de 0 a 5. Esses números serão apenas referências e não representam tempos. Siga o quadro abaixo para adição dos reagentes.

Material	Zero	Um	Dois	Três	Quatro	Cinco
Saliva Filtrada	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Solução Fisiológica	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9
TCA 5%	1,0	--	--	--	--	--
Goma de amido 0,1%	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
<b>NESTE INTERVALO MARCAR O TEMPO DE REAÇÃO</b>						
TCA 5%	--	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Lugol (gotas)	2	2	2	2	2	2

Para estipular o tempo, inicie com 30 segundos e provavelmente haverá a necessidade de encurtar esse tempo. Observe e anote os resultados.

## **PROCEDIMENTO PRÁTICO – Determinação da atividade da amilase salivar de acordo com a concentração enzimática.**

### **1. Material :**

- . amido - solução de amido 0,1% ( 0,1g/100ml) em solução de NaCl 0,9% (salina fisiológica)
- . Enzima alfa-amilase de saliva
- . solução de NaCl 0,9%
- . solução de Lugol (I<sub>2</sub> + I)
- . solução de HCl 0,1M

### **2. Objetivo:**

Acompanhar a hidrólise do amido utilizando um catalisador biológico (enzima).

### **3. Procedimento:**

- . Preparar solução da enzima coletando saliva em um tubo de ensaio e depois diluir 1:100 com solução de NaCl 0,9%. (Pegar 0,1ml e completar o volume para 10ml com solução salina)
  - . Prepare uma bateria de 10 tubos e coloque em cada um deles 1ml de solução NaCl 0,9%.
  - . Coloque 1ml de solução de saliva diluída no primeiro tubo, misture bem e retire 1ml da mistura feita neste tubo e transfira para o segundo tubo, procedendo da mesma forma. Repita a operação nos tubos restantes da série. Retire 1ml da mistura do último tubo e despreze.
  - . Adicione a cada um dos tubos, 2ml da solução de amido 0,1%. Misture.
  - . Coloque a bateria de tubos num banho Maria a 37°C por 30 minutos e resfrie para interromper o processo enzimático.
  - . Revelar o resultado adicionando a cada tubo 1 a 2 gotas da solução de Lugol e misture.
  - . Fazer também um branco de reação com água destilada substituindo a enzima.
- O teste é considerado positivo para o amido quando apresenta cor azul intensa.

### **Observar:**

- a) em que tubos aparece a cor azul.
- b) qual(is) as cores que aparecem nos outros tubos.
- c) anotar os resultados e explicar o que ocorreu ao se fazer o ensaio com diferentes diluições da enzima

*\* Repetir o ensaio acima com as variantes abaixo:*

- 1) Ferver por 15 minutos a mistura de saliva antes de realizar o ensaio.
- 2) Usar como líquido diluidor no teste uma solução de HCl 0,1M.

*\* Anotar os resultados*

## *Caracterização dos constituintes da bile*

### FUNDAMENTOS TEÓRICOS

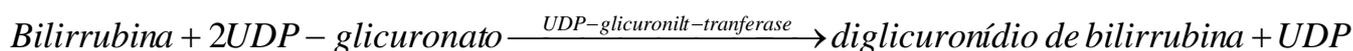
A bile é uma secreção isotônica, viscosa, de cor amarelo-ouro, produzida pelo fígado. Ela é essencial à digestão e absorção de lipídeos. No ser humano o seu volume varia de 500 a 1000 mL a cada 24 horas. No cão são excretados cerca de 20 mL por dia por Kg de peso corporal. Na ovelha o volume é de 30 mL/Kg x dia e no coelho 150 mL/Kg x dia.

A bile também serve como via de excreção para substâncias que, por serem pouco solúveis em água, não podem ser excretadas pelos rins. Neste caso se encontram os ácidos graxos, o colesterol e seus ésteres, sais de cálcio e pigmentos biliares. Encontramos ainda na bile formas de excreção de algumas enzimas tais como a fosfatase alcalina. A elevação da atividade da fosfatase alcalina no soro é indicativa da ocorrência de obstrução biliar.

Os sais biliares, em sua maioria derivados do ácido glicólico (peptídeo resultante da conjugação do ácido cólico com a glicina) são os principais agentes detergentes da bile, responsáveis pela hidrossolubilização dos lipídeos alimentares a nível de duodeno. O ácido glicólico sofre desconjugação resultante da fermentação bacteriana no íleo e o ácido cólico, liberado neste processo, é reabsorvido e retorna ao fígado para ser reutilizado. Este processo é denominado “circulação êntero-hepática dos sais biliares”.

Os pigmentos biliares, cujo representante principal é a bilirrubina, se originam do catabolismo de hemeproteínas. Sua principal fonte é a hemoglobina liberada quando da lise de eritrócitos velhos nas células do sistema retículo endotelial. Os principais órgãos nos quais encontramos estas células são o baço e a medula óssea eritropoiética. No fígado encontramos as células de Kupfer que também participam deste sistema.

O catabolismo da hemoglobina no sistema retículo endotelial termina com a produção da bilirrubina. Esta, por ser pouco solúvel em água, é carregada na corrente sanguínea ligada à albumina. Chegando ao hepatócito, esta bilirrubina (conhecida como bilirrubina de reação indireta) se desliga da albumina e é conjugada com duas moléculas de ácido glicurônico para formar a bilirrubina diglicuronídeo (bilirrubina de reação direta) que excretada pela bile e eliminada nas fezes:



A conjugação da bilirrubina com compostos orgânicos polares, como ácido glicurônico, é outro fato que garante sua excreção com a bile e eliminação com as fezes. Isto quer dizer que se a bilirrubina fosse excretada em sua forma não conjugada seria reabsorvida pelos epitélios das vias biliares e do intestino delgado.

Quando ocorre obstrução biliar alguns canalículos arrebentam por causa da hipertensão e a bilirrubina se espalha pelos tecidos provocando a icterícia.

#### **Objetivos da aula:**

1. Esquematizar o processo de biossíntese dos sais biliares a partir do colesterol.
2. Esquematizar o processo de biossíntese dos pigmentos biliares a partir da hemoglobina.
3. Executar as técnicas reativas de Pettenkoffer e Gmelin e explicar o fundamento de cada uma.
4. Explicar a propriedade tensioativa dos sais biliares.

## **PROCEDIMENTO PRÁTICO – Caracterização de constituintes da Bile**

Na aula de hoje vamos fazer algumas reações que nos permitem evidenciar a presença de esteróides (colesterol e ácidos biliares) e de pigmentos biliares (bilirrubina). Faremos ainda testes que nos permitirão demonstrar a propriedade tensioativa da bile.

### **Identificação de esteróides – Reação de Pettenkofer**

Tomar em um tubo de ensaio 1 mL de água destilada, 10 gotas de bile e 5 gotas de uma solução de furfural. Misturar bem, batendo o tubo várias vezes contra a palma da mão.

Verter pela parede do tubo 1 mL de ácido sulfúrico concentrado sem agitar. O ácido sulfúrico por ser mais pesado vai para o fundo do tubo. Depois de alguns minutos forma-se na interface um anel de cor vermelha.

### **Identificação de pigmentos biliares – Reação de Gmelin**

Tomar em um tubo de ensaio 1 mL de bile não diluída e adicionar sem misturar 1 mL de ácido nitroso-nítrico. Nesta técnica deve-se tomar o ácido na pipeta e introduzir a mesma no tubo com bile mantendo o bocal obturado com o dedo até que o bico toque o fundo do tubo. A partir daí libera-se o bocal da pipeta suavemente e ergue-se a mesma deixando o ácido nitroso-nítrico fluir lentamente.

A reação positiva é indicada pela formação de um anel de cor verde na interface. A cor verde depende da formação da biliverdina, resultante da oxidação da bilirrubina. Aparecem ainda anéis de outras cores porque o processo de oxidação é suficientemente violento para levar à formação de outros produtos.

### ***Demonstração da propriedade tensioativa – Chuva de enxofre***

Tomar três frascos com água destilada. Ao segundo deles adicionar 5 gotas de detergente comercial e ao terceiro 5 gotas de bile não diluída. Misturar fazendo movimentos circulares com o frasco na mesa. Adicionar à superfície de cada frasco enxofre em pó e observar o que acontece com o mesmo.

# Fundamentos de Colorimetria e Espectrofotometria

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

As soluções biológicas possuem vários componentes além do solvente água. O plasma sanguíneo possui mais de mil substâncias entre íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ; pequenas moléculas como glicose, uréia, creatinina, colesterol, polissacarídeos, lipídeos complexos, polipeptídeos, proteínas simples e conjugadas, hormônios, vitaminas, pigmentos, etc.

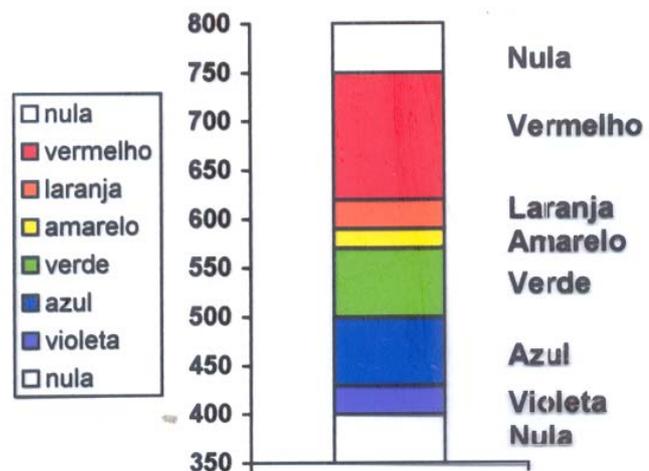
Estudar a composição qualitativa e quantitativa desses sistemas é indispensável para as ciências ligadas à biologia. Os métodos biofísicos de estudo permitem separar, identificar e quantificar estes componentes. Dentre estes métodos, encontramos a análise por espectrofotometria.

A espectrofotometria consiste em usar o espectro radiante para estudar as soluções biológicas. No procedimento básico, um feixe de energia atravessa a solução, e sua absorção oferece informações sobre a **qualidade** e **quantidade** dos componentes presentes.

Para as análises espectrofotométricas, a faixa do espectro de radiação mais utilizada vai do ultravioleta ( $\lambda = 200 \text{ nm}$ ) até o infravermelho ( $\lambda = 1000 \text{ nm}$ ).

A faixa do visível vai de 400 a 750 nm, onde os seres humanos experimentam uma gama de sensações visuais denominada cores (veja Figura abaixo). Abaixo de 400 e acima de 750 nm, os seres humanos não sentem nenhuma sensação. Portanto, **cor é uma sensação psicofísica que associamos a um comprimento de onda predominante**. Na figura 1 temos uma classificação prática das cores, onde são cores puras, e suas combinações podem dar o branco (cores que se anulam) ou matiz (mistura de cores). Acredita-se que o olho humano seja capaz de perceber mais de 180 a 200 matizes. O preto é ausência de todas as cores.

Figura 1 – Espectro visível. No UV, nenhuma sensação. No visível, há correspondência entre o comprimento de onda e a cor (mais rigorosamente, entre a frequência e a cor). No IV, novamente nenhuma sensação. Os picos para o máximo de cor são: vermelho, 680; laranja, 615; amarelo, 580; verde, 535; azul, 465; violeta, 415.



Além do visível, outros comprimentos de onda da energia radiante podem ser absorvidas por moléculas do meio, provocando modificações:

Região $\lambda$	$\lambda$	Efeito sobre a molécula (no meio)
Raio x	0,1-100 nm	Elétrons de níveis excitados para níveis energéticos mais altos.
UV	100-400 nm	Elétrons de níveis excitados para níveis energéticos mais altos.
Visível	400-800 nm	Elétrons de níveis excitados para níveis energéticos mais altos.
IV	800 nm-50 $\mu$	Vibração molecular.
Microonda	50-300 $\mu$	Rotação molecular.

OBS: nm (Nanômetro) =  $10^{-9}$  m e  $\mu$  (Microm) ou  $\mu\text{m}$  (Micrômetro) =  $10^{-6}$  m.

Uma distinção importante é entre **cor** e **pigmento**. Chama-se cor ao espectro de energia radiante, e pigmento a qualquer matéria que dá a sensação de cor. Um feixe de luz azul é cor, uma mancha de tinta azul é pigmento. As cores somadas se anulam, dando o branco. Os pigmentos somados dão o preto. Na prática esses dois termos são agrupados como cor, mas há uma diferença: em é energia e o outro é matéria.

A luz usada em espectrofotometria é chamada luz monocromática, pois é referente a um único comprimento de onda que é obtido através de um espectrofotômetro:

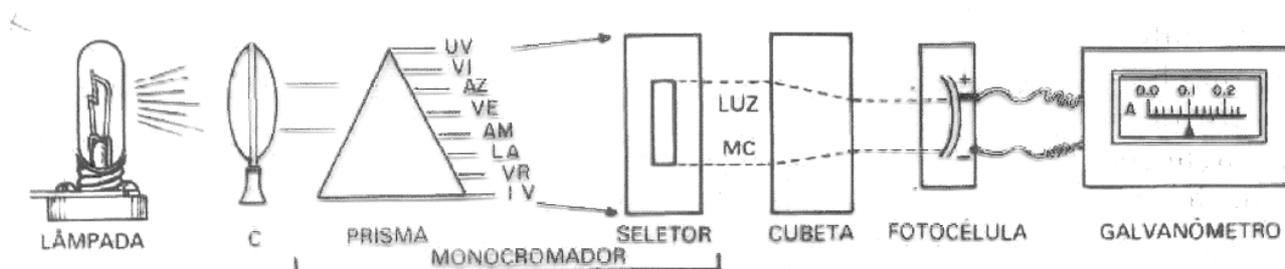


Figura 2 - Esquema do Espectrofotômetro: A fonte de luz tem seu feixe focalizado pelo colimador (C) sobre um prisma de quartzo. A luz é decomposta em ultravioleta (UV), violeta (VI), azul (AZ), verde (VE), amarelo (AM), laranja (LA), vermelho (VR) e infravermelho (IV). Uma fenda seletora escolhe uma fina porção desse espectro como luz monocromática (luz MC). A luz MC passa através da cubeta que contém a solução, e parte é absorvida, parte transmitida. Uma fotocélula acoplada a um galvanômetro mede a luz transmitida. A diferença é a luz absorvida. O galvanômetro tem uma escala especial de 0,0 a 2,00, que indica leituras lineares (aritmeticamente proporcionais à absorção da luz). As fontes de luz para ultravioleta são geralmente lâmpadas de Hidrogênio, ou de Deutério. Para o visível e infravermelho, lâmpadas de tungstênio e irradiadores de cerâmica são usados. A decomposição da luz é feita, além de primas, por grades de difração. Um método simples de obter luz MC é usar filtros, que são pedaços de vidro colorido especiais, que deixam passar a luz da sua cor. A luz MC dos filtros é de qualidade inferior à dos primas e grades.

Existem duas razões para a utilização da luz monocromática:

1 – Razão qualitativa: O único modo de saber quais as cores (comprimentos de onda) que são absorvidos, é passar luz MC de vários comprimentos de onda, uma de cada vez, através da solução teste (ver Figura 3). Na Figura abaixo está demonstrado que para se medir a solução teste usada deve-se usar a luz verde, pois foi a mais absorvida (90%) pela amostra, e assim, proporcionará grande sensibilidade à medida. A luz violeta e amarela são adequadas porque são pouco absorvidas.

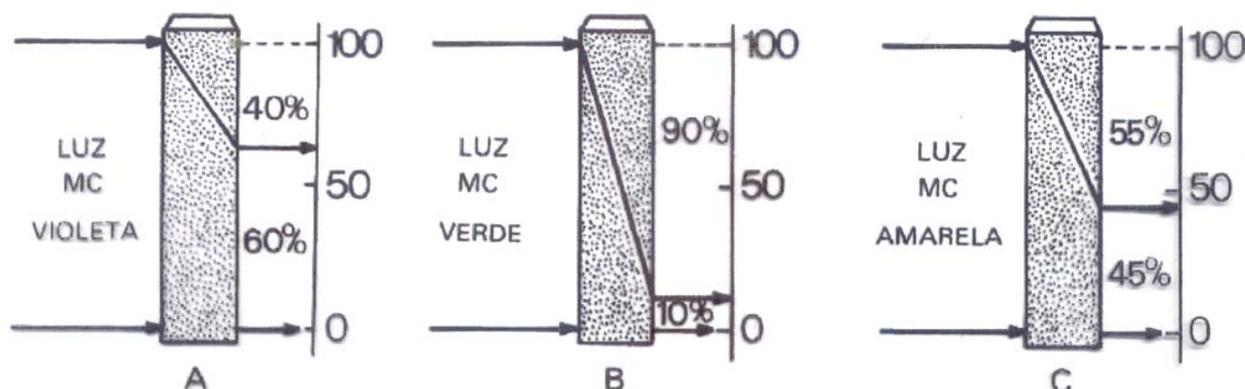


Figura 3 – Absorção diferencial de luz monocromática.

É possível obter comprimentos de onda que sejam **específicos** para certas substâncias através da construção de uma curva de absorção espectral (Figura 4); onde a substância em questão (aquela que se quer determinar) é colocada na cubeta, e os comprimentos de onda do UV até o IV vão sendo passados, e a absorção de cada faixa é medida. Faz-se um gráfico comprimento de onda x absorção.

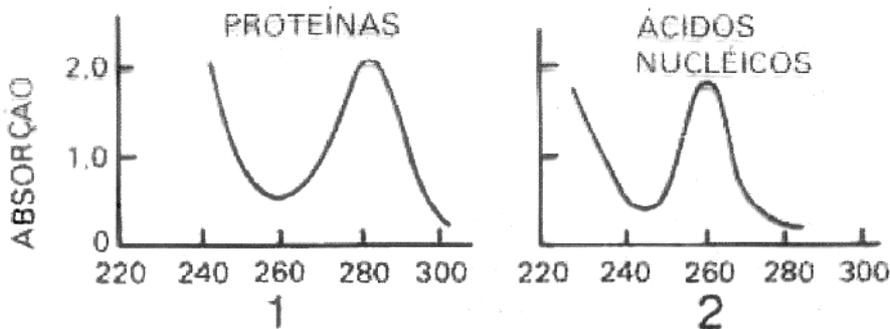
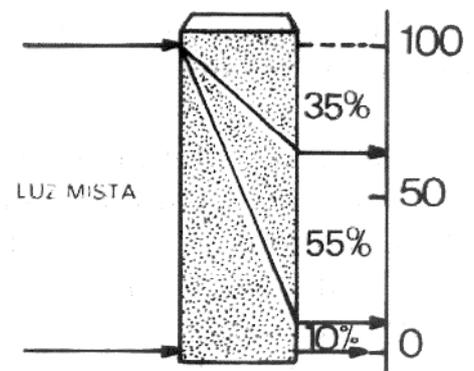


Figura 4 – Curvas de absorção espectral para proteínas e para ácidos nucleicos, notar que o pico de absorção máxima é característico para cada substância: proteínas = 280 nm e ácidos nucleicos = 260 nm.

2 – Razão quantitativa: Quando se está medindo a luz absorvida, a passagem de energia **não** absorvida irá prejudicar a leitura, dando um resultado alto e falso. Assim, é fundamental usar-se luz MC que seja a maior parte absorvida, para determinar a presença de uma substância em solução (ver Figura 5).

Figura 5 – Absorção da luz NÃO monocromática. Foi usada a solução teste equivalente àquela da figura 3. A luz não absorvida (luz espúria) é 55% transmitida.



### A lei de Lambert & Beer

É possível, por simples comparação visual, determinar a concentração aproximada de uma solução colorida comparando-a com soluções do mesmo soluto que tenham concentrações conhecidas. Quando dispomos de aparelhos capazes de medir a intensidade da luz transmitida pelas soluções (fotocolorímetros ou espectrofotômetros) podemos determinar a concentração da solução desconhecida pela aplicação da lei de Lambert & Beer que correlaciona a intensidade da luz transmitida com a concentração do soluto corado.

Lei de Lambert – Quando a concentração da substância é constante, a absorção depende do comprimento do trajeto óptico.

Lei de Beer – Quando o trajeto óptico é constante, a absorção depende da concentração.

Combinando as duas leis, Absorção é proporcional ao trajeto óptico e à concentração.

$$I = I_0 \times e^{-k.c.l}$$

I = Intensidade da luz emergente

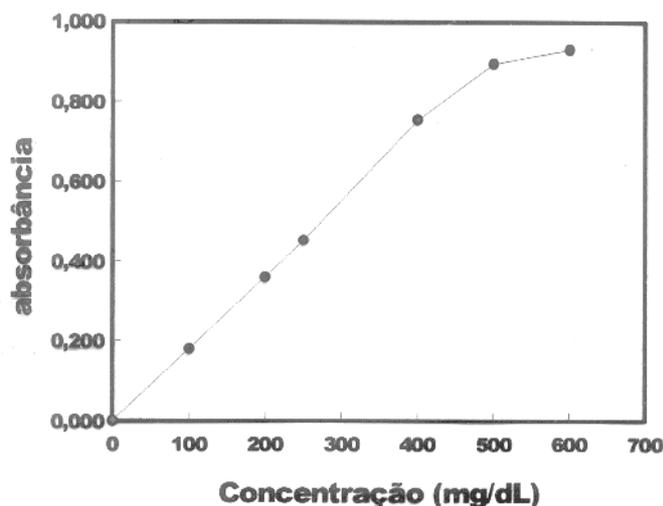
I<sub>0</sub> = Intensidade da luz incidente

e = Base do sistema de logaritmos neperianos (2,718228)

k = absorptividade (constante característica do soluto)

O termo  $e^{-k.c.l}$  representa o fator de proporcionalidade entre I e  $I_0$ . Como o segundo membro da equação possui apenas um fator podemos concluir que os valores absolutos das intensidades não são importantes e sim a relação entre eles. Em termos práticos, podemos concluir que o fato de iluminarmos uma solução com luz de uma intensidade maior ou menor não afeta o resultado da medida de sua concentração.

O expoente de e está afetado de sinal negativo, o que significa que, quanto maior for a concentração do soluto, ou a espessura da solução atravessada pela luz, tanto menor será o valor da intensidade da luz emergente para uma determinada intensidade incidente.



Como a variável independente que desejamos medir (no caso, a concentração) se encontra no expoente, a curva que reflete a relação entre ela e a intensidade apresenta o formato exponencial e não uma reta (ver Figura 6).

Figura 6 – Curva de calibração ou curva padrão: Obtida com a leitura da absorção de padrões de várias concentrações.

### Modificações na lei de Lamber & Beer

Considerando que o objetivo da espectrofotometria é a determinação de concentrações desconhecidas de soluções de um mesmo soluto, uma tarefa repetitiva, torna-se necessário dispor de um método que permita fazer os cálculos com pequeno esforço.

Chamamos de **interpolação** a operação matemática que permite, a partir de uma curva e do valor de uma das coordenadas de um ponto, obter a outra coordenada pela determinação do ponto onde a coordenada conhecida intercepta a curva.

Algumas operações podem ser feitas com o objetivo de simplificar o trabalho. Vejamos:

1. Já que os valores absolutos das intensidades não são importantes podemos tomar a relação entre elas que expressamos na escala percentual. A função assim definida é denominada **Transmitância** e expresso pela letra T.

$$\frac{T}{100} = \frac{I}{I_0}$$

2. O uso do expoente de base e é complicado. A melhor solução é utilizar a base 10. Esta operação se constitui numa mudança da base do sistema de logaritmos que pode ser obtida multiplicando-se o expoente por 0,4342.

$$e^{-k.c.l} = 10^{-0,4342.k.c.l}$$

O produto  $0,4342.k$  é um produto de duas constantes e pode ser representado por uma só letra. Escolhemos a letra **a** (inicial de absorptividade) para representar a medida tomada em escala decimal. A equação de Lambert & Beer pode, portanto, ser reescrita, na forma:

$$\frac{T}{100} = 10^{-a.c.l}$$

O fato de a correlação entre concentração e transmitância ser expressa por uma exponencial determina que a interpolação seja uma operação complicada porque envolve o uso de logaritmos diretamente à expressão como segue:

$$\log\left(\frac{T}{100}\right) = \log(10^{-a.c.l})$$

$$\log T - 2 = -a.c.l$$

$$2 - \log T = a.c.l$$

A nova função, gerada na transformação:  $2 - \log T$  recebe o nome de Absorvância e costuma ser representada pela letra  $A$  ou por  $Abs$ . Dessa forma a equação pode ser reescrita como:

$$A = a.c.l$$

O que demonstra que a Absorvância de uma solução é proporcional (relação linear) à concentração do soluto corado.

### Traçado da curva padrão – os ensaios da colorimetria

A correlação entre a concentração de um soluto e a sua absorvância é expressa em gráfico por uma curva padrão (ver figura 6). Traçamos a curva padrão tomando vários ensaios cujas concentrações são conhecidas com precisão (denominados ensaio padrão) e um ensaio no qual não existe a substância a ser dosada (ensaio em branco). O ensaio em branco, testemunha do método colorimétrico, serve para que possamos descontar, na medida da intensidade da luz emergente, a quantidade de luz que absorvida por outras substâncias que não sejam o soluto cuja concentração desejamos medir: o vidro do frasco no qual vamos colocar a solução (cubeta), o solvente, os restos de reagentes necessários para o desenvolvimento da cor. Na gíria laboratorial dizemos que o ensaio em branco serve pra “zerar” o espectrofotômetro porque quando o colocamos no aparelho de medida, ajustamos os controles para que o ponteiro indique zero da escala de absorvância ou 100% de transmitância.

A curva é obtida pela ligação dos pontos por meio de uma reta. É importante observarmos que a reta traçada não vai passar obrigatoriamente sobre os pontos representativos dos ensaios padrão mas deve representar a tendência média dos mesmos.

De posse da curva padrão e da medida de absorvância de um ensaio de concentração desconhecida podemos, por interpolação na reta determinar a concentração do desconhecido. Uma alternativa é o cálculo analítico, sem o auxílio do gráfico. Ele é obtido pela comparação das relações:

$$A_p = a.C_p.l$$

$$A_d = a.C_d.l$$

Onde  $A_p$  e  $A_d$  representam, respectivamente as absorvâncias do padrão e do desconhecido. A combinação das duas equações permite chegar à relação que será usada mais freqüentemente:

$$\frac{A_p}{C_p} = \frac{A_d}{C_d}$$

### Objetivos:

1. Conceituar colorimetria e espectrofotometria.
2. Distinguir um fotolorímetro de um espectrofotômetro.
3. Dar o enunciado da lei de Lambert-Beer.
4. Discutir os requisitos básicos para a execução das técnicas colorimétricas.
5. Conceituar: Ensaio em branco, ensaio padrão e ensaio desconhecido.
6. Tendo conhecimento dos passos seguidos na execução de um ensaio colorimétrico e da concentração do padrão, calcular a concentração do ensaio desconhecido.

## PROCEDIMENTO PRÁTICO

### Determinação do espectro de absorção de corantes e construção de curva padrão

#### Material

- Solução de azul de bromofenol 0,01 mg/ml
- Solução de metilorange 0,01 mg/ml
- Espectrofotômetro

#### Objetivos

- Determinar o espectro de absorção de soluções de azul de bromofenol (ABF) e de metilorange (MO).
- Caracterizar o comprimento de onda onde ocorre absorção máxima.
- Determinar o espectro de absorção de uma mistura de ABF e MO.
- Construir uma curva padrão para cada um dos corantes nos  $\lambda$  determinados.

#### Procedimento

##### A) Determinação do Espectro de Absorção:

1. Com a solução de ABF varrer o espectro determinando as absorvâncias nos comprimentos de onda relacionados abaixo. Repetir a operação utilizando uma solução de ABF diluída duas vezes. Utilizar água como Branco, calibrando o aparelho em cada  $\lambda$ .

$\lambda$ (nm)	520	535	550	580	610	640
Abs <sub>ABF</sub>						
Abs <sub>ABF/2</sub>						

2. Com a solução de MOF varrer o espectro determinando as absorvâncias nos comprimentos de onda relacionados abaixo. Repetir a operação utilizando uma solução de MO diluída duas vezes. Utilizar água como Branco, calibrando o aparelho em cada  $\lambda$ .

$\lambda$ (nm)	415	445	460	490	520	535
Abs <sub>MO</sub>						
Abs <sub>MO/2</sub>						

3. Misturar os volumes iguais das soluções de ABF e MO e determinar as absorvâncias nos comprimentos de onda abaixo:

$\lambda$ (nm)	415	445	460	490	520	535	550	580	610	640
Abs <sub>ABF+MO</sub>										

4. Lançar em gráfico as leituras de absorvância x comprimento de onda e selecionar o  $\lambda$  adequado para construção de cada curva padrão.

#### B) Construção da Curva Padrão

1. Seguir o protocolo adiante utilizando soluções de ABF ou MO, conforme o caso.
2. Ler as absorvâncias de cada tubo no  $\lambda$  anteriormente selecionado para cada corante, utilizando o tubo B como branco da reação.
3. Preparar um tubo desconhecido com quantidades arbitrárias de corante e água e efetuar a leitura no mesmo comprimento de onda usado.
4. Lançar em gráfico absorvância x concentração de corante e analisar os resultados.

TUBO	ABF (ml)	H <sub>2</sub> O (ml)	Abs	Concentração
B	--	5,0		
1	1,0	4,0		
2	2,0	3,0		
3	3,0	2,0		
4	4,0	1,0		
5	5,0	--		

TUBO	MO (ml)	H <sub>2</sub> O (ml)	Abs	Concentração
B	--	5,0		
1	1,0	4,0		
2	2,0	3,0		
3	3,0	2,0		
4	4,0	1,0		
5	5,0	--		

## *Curva padrão de proteínas do soro*

### FUNDAMENTOS TEÓRICOS

As proteínas do soro podem ser dosadas colorimetricamente pela reação do biureto. Nesta reação tratamos a proteína com sulfato cúprico em meio alcalino obtendo como resultado um produto de cor violeta cuja intensidade se correlaciona com a concentração protéica. Essa reação foi denominada “reação do biureto” porque ela foi originalmente utilizada para identificar o biureto (dímero da uréia).

O método de biureto é um método para dosar proteínas tão simples e exato como qualquer outro usado corretamente. Tem uma precisão de aproximadamente  $\pm 4\%$ .

Qualquer composto que tenha na sua estrutura molecular pares de grupos amida ligados por nitrogênio ou carbono, dará uma reação de biureto positiva. O nome da reação deriva do mais simples destes compostos, o biureto:



Quando o biureto é tratado com uma solução alcalina de tartarato de potássio e cobre, forma-se um complexo de cor violeta no qual os íons  $\text{Cu}^{2+}$  estão envolvidos por moléculas de biureto. Como as moléculas das proteínas contêm essas ligações, elas reagem com  $\text{Cu}^{2+}$  para dar cor violeta. A quantidade desta cor é diretamente proporcional à concentração das proteínas.

Quando as amostras são turvas ou muito coradas, como acontece nos soros ictéricos, deve-se incluir um branco de soro para compensar a turvação ou a cor amarela.

Os métodos para dosagem das proteínas devem ser executados em soro e não em plasma, uma vez que o fibrinogênio existente no plasma, uma vez que o fibrinogênio é uma proteína e constitui uma interferência quando se dosam as proteínas do soro. O soro hemolisado dá resultados pouco exatos e por isso não deve ser usado.

Pode-se empregar o método do biureto para determinar a concentração das proteínas na maior parte dos líquidos biológicos, mas não é diretamente aplicável à urina nem ao líquido cefalorraquidiano. Embora geralmente se encontrem nesses líquidos os mesmos tipos de proteínas que existem no soro, a concentração total de proteínas é muito mais baixa, tornando difícil uma análise exata. Este fato é particularmente importante no caso do LCR em que a quantidade de líquido disponível para o exame é habitualmente muito pequena. A dosagem de proteínas na urina é ainda mais difícil, devido à presença de grandes quantidades de substâncias interferentes, especialmente íons inorgânicos, que precipitam quando se junta uma base.

Por estas razões, os métodos usados de rotina para a determinação de proteínas totais no LCR e na urina são um pouco diferentes dos que se utilizam para soro, embora haja algumas coincidências. Os métodos turbidimétrico e de Folin são largamente utilizados para determinar as proteínas no LCR, enquanto que para a urina usam os métodos turbidimétrico e de fixação a corantes.

A confecção da curva padrão exige que inicialmente a concentração de proteínas no soro seja ajustada para a faixa de sensibilidade do método. Sabemos que a concentração total de proteínas no soro de mamíferos está em torno de 10g/dL, o que excede muito a sensibilidade do método. Por esse motivo, o primeiro tempo do trabalho se constitui em

uma diluição do soro de 1:10 na qual ajustamos a concentração de proteínas para a faixa adequada.

No segundo tempo fazemos diluições variadas a partir do soro previamente diluído 1/10 para obter 4 padrões e confeccionarmos um ensaio em branco. As leituras no espectrofotômetro são feitas em 550 nm.

## PROCEDIMENTO PRÁTICO

1. Diluição inicial do soro padrão (1:10) – tomar em tubo de ensaio 0,4 mL de soro (a concentração de proteínas será fornecida na aula) mais 3,6 mL de solução salina fisiológica. Misturar bem.
2. Diluição do soro desconhecido (1:20) – tomar em tubo de ensaio 0,1 mL do soro desconhecido e 1,9 mL de solução salina fisiológica. Misturar bem.
3. Confeção da curva padrão – partindo do soro padrão diluído, obtido na operação anterior, proceder conforme a tabela abaixo:

Tubo	Salina (mL)	Soro padrão diluído (mL)	Soro desconhecido diluído (mL)	Concentração (g%)	Reativo do Biureto (mL)
B	1,0	--	--		4,0
P1	0,8	0,2	--		4,0
P2	0,6	0,4	--		4,0
P3	0,4	0,6	--		4,0
P4	--	1,0	--		4,0
D	--	--	1,0		4,0

4. Confeção do ensaio desconhecido – tomar em tubo de ensaio 1,0 mL do soro desconhecido e 4,0 mL de reativo do biureto, conforme indicado na tabela acima.
5. Confeção do gráfico – Com base na concentração do soro padrão distribuído na aula, calcule a concentração de cada um dos padrões de trabalho. Após 10 minutos, leia as absorvâncias do desconhecido e de cada um dos padrões em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 550 nm e complete a tabela acima. Utilizando papel milimetrado trace a curva padrão.
6. Determine a concentração do ensaio desconhecido.

## *Dosagem de proteínas totais e frações no soro*

### FUNDAMENTOS TEÓRICOS

As proteínas do soro podem ser dosadas na sua totalidade ou em frações. O critério mais usado para fracionar as proteínas é sua solubilidade em meio aquoso. Segundo este critério, chamamos de **albuminas** as proteínas que dissolvem bem em uma ampla faixa de salinidade, desde a água destilada até concentrações salinas elevadas, e de **globulinas** as proteínas que dissolvem em uma faixa mais restrita de salinidades sendo insolúveis em água destilada e precipitando em concentrações salinas baixas.

Chamamos de salting-out o método usado para fracionar as proteínas do soro, o qual consiste na adição ao mesmo de uma quantidade de sal suficiente para insolubilizar as globulinas enquanto as albuminas permanecem em solução. Os sais mais usados para este fim são o sulfato de amônio, o sulfato de sódio ou o cloreto de sódio.

As frações protéicas obtidas por este método são dosadas pela reação do biureto, conforme já foi visto na aula anterior.

### PROCEDIMENTO PRÁTICO

#### A) Fracionamento salino

1. Num tubo de centrífuga contendo 7,5 mL da solução de sulfato/sulfito adicionar lentamente e misturando, 0,5 mL de soro. Fechar o tubo e homogeneizar por inversão de 3 a 4 vezes. Ocorre precipitação das globulinas, o que torna a mistura com um aspecto leitoso.
2. Retirar deste tubo 2 mL da mistura dos quais 1 mL deve ser transferido para um tubo de ensaio marcado com a letra T (proteínas totais). O 1 mL restante deve ser desprezado.
3. Adicionar ao mesmo tubo de centrífuga 3 mL de éter etílico, homogeneizar por inversão suave 40 vezes, durante 20 segundos e, finalmente centrifugar a 2.500 rpm durante 10 minutos.
4. Ao final da centrifugação observa-se uma fase aquosa inferior límpida que contém as albuminas em solução. Na sua superfície existe uma “pastilha” branca contendo as globulinas precipitadas e, acima dela, o restante do éter que não evaporou.
5. Inclinar o tubo para deslocar a “pastilha” e introduzir pela borda do mesmo uma pipeta fina (1 mL) com bocal obturado pelo dedo até que sua ponta atinja a parte inferior do mesmo. Abrir o bocal e aspirar 1 mL da fase inferior que será transferida para o tubo marcado com a letra A (albumina).

#### B) Preparação do padrão de proteínas

Em outro tubo de ensaio, colocar 1,9 mL de solução salina fisiológica e 0,1 mL de soro padrão. Homogeneizar várias vezes por inversão. Tomar deste tubo 1 mL e transferir para o tubo marcado com a letra P (padrão).

#### C) Reação corada

Tubo	Salina (mL)	Soro padrão diluído (mL)	Soro diluído (mL)	Fracionamento (mL)	Reativo do Biureto (mL)
B	1,0	--	--	--	4,0
Padrão	--	1,0	--	--	4,0
Total	--	--	1,0	--	4,0
Albumina	--	--	--	1,0	4,0

Misturar por inversão, aguardar 10 minutos para desenvolvimento da cor e ler as absorvâncias em espectrofotômetro a 550 nm.

D) Efetuar os cálculos

#### VALORES NORMAIS

Animal	Sexo	Albumina g/dL	Globulina g/dL	Rel A/G
Bovino	M	3,20	3,87	0,83
	F	3,44	4,19	0,82
Ovino	F	2,96	2,95	1,00
Caprino	M/F	3,95	2,63	1,50
Suíno		3,4	4,00	0,85
Eqüino		2,6	4,12	0,63
Cão		3,36	1,90	1,70
Homem		3,32	2,90	1,20

## *Dosagem de glicose no soro*

### FUNDAMENTOS TEÓRICOS

A glicose, como qualquer ose, é um açúcar redutor à quente, podendo ser dosada por sua capacidade de reduzir o íon cúprico a cuproso. O fato de a glicose ser redutora à quente faz com que sua dosagem só possa ser feita com o aquecimento do meio. Como o sangue é rico em proteínas, que desnaturam pelo calor turvando o meio, a dosagem de glicose nesse meio deve ser precedida de uma desproteinização que afaste as proteínas impedindo a ocorrência da turvação que impede a dosagem colorimétrica.

Por outro lado, como já vimos na aula anterior, o íon cuproso se transforma em óxido que, em decorrência de sua baixa solubilidade, precipita. Uma vez que não podemos fazer colorimetria com substâncias precipitadas, necessitamos de uma reação química complementar que promova a dissolução do óxido cuproso. No método de Nelson fazemos a reação do óxido cuproso formado com o ácido molíbdico formando o óxido azul de molibdênio que será dosado colorimetricamente.

### PROCEDIMENTO PRÁTICO

#### Fase 1 – Desproteinização

Tomar em tubo de centrífuga 1,5 mL de água destilada e 0,1 mL de sangue. Lavar a pipeta três vezes com a mistura. Adicionar 0,2 mL da solução de hidróxido de bário e aguardar até que a mistura assuma a coloração acastanhada.

Adicionar 0,2 mL de sulfato de zinco, agitar bem e aguardar 5 minutos para que se complete a reação. Centrifugar por 15 minutos a 3.000 rpm e separar o sobrenadante.

Nessa operação ocorre uma diluição na proporção 1:20.

#### Fase 2 – Reação corada (em tubo de Folin)

Na primeira etapa fazemos a reação do desproteinizado com o reativo cúprico, a quente. Na segunda etapa redissolvemos o óxido cuproso formado pela reação com o reativo arseno-molíbdico.

Tubo	Água destilada (mL)	Sol. padrão de glicose (mL)	Desproteinizado (mL)	Reativo cúprico (mL)
B	1,0	--	--	1,0
Padrão	--	1,0	--	1,0
Desconhecido	--	--	1,0	1,0

Misturar por inversão, e aquecer em banho-maria fervente por 20 minutos.

Resfriar em água corrente (torneira).

Adicionar em todos os tubos 1,0 mL do Reativo arseno-molíbdico.

Misturar bem até parar de fazer espuma.

Completar com água até a marca de 12,5 mL.

Ler as absorvâncias em espectrofotômetro a 500 nm.

Efetuar os cálculos

Concentração padrão de glicose = 0,05 mg/mL

$$\text{Concentração desconhecida} = 0,05 \times 100 \times 20 \times \frac{\text{ABS desconhecido}}{\text{ABS padrão}} \text{ mg / dl}$$

OBS: A concentração do padrão é multiplicada por 100 para converter de mg/mL para mg/dL e por 20 para corrigir a diluição introduzida no ato de desproteinização.

Animal	VALORES NORMAIS DE GLICEMIA DE JEJUM (mg/dL)
Humanos	60 a 100
Bovídeos Adultos	35 a 55
Caprinos	45 a 60
Ovinos	35 a 60
Suínos	65 a 95
Caninos	55 a 90
Gatos	60 a 100
Galinhas	190 a 300

## *Eletrforese de proteínas do soro*

### FUNDAMENTOS TEÓRICOS

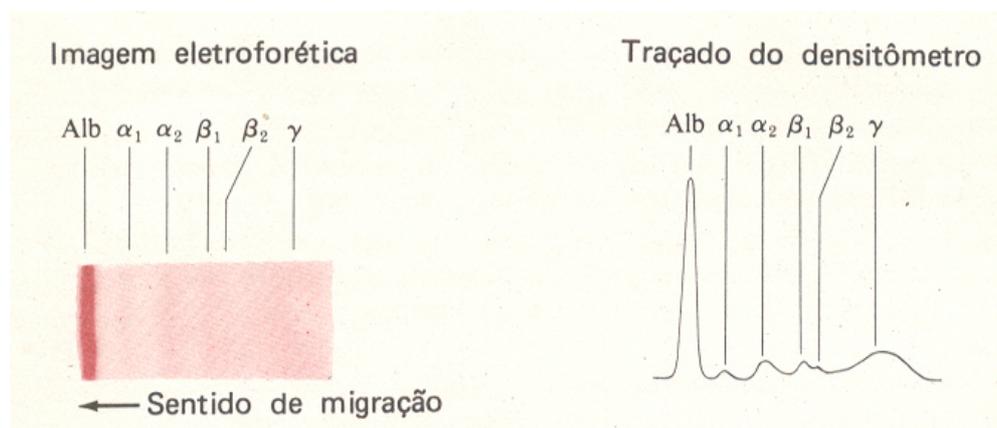
Podemos obter o fracionamento das proteínas do soro aproveitando-nos da diferença de suas cargas elétricas superficiais. A carga elétrica de uma molécula protéica varia em função da diferença entre o pH do meio no qual ela se encontra e o seu ponto isoelétrico (por definição, ponto isoelétrico de uma proteína é o pH no qual a proteína apresenta cargas positivas e negativas em mesmo número sendo, portanto, a soma de todas as cargas igual a zero).

Se temos uma proteína em pH igual ao ponto isoelétrico a sua carga elétrica é nula. Para baixarmos o pH adicionaremos um ácido que carrega prótons ( $H^+$ ), isso fará com que a proteína assumirá carga positiva. Por outro lado, quando elevamos o pH adicionamos uma base que capta prótons fazendo com que a proteína perca prótons e assumirá carga negativa. Em suma, qualquer proteína apresenta carga positiva em pH abaixo do ponto isoelétrico, nula no ponto isoelétrico e negativa acima dele. As proteínas do soro apresentam pontos isoelétricos distribuídos em uma faixa de pH entre 5,0 e 8,0, o que significa que em pH acima de 8,0 todas elas apresentarão cargas negativas e abaixo de pH 4,0 todas elas assumirão carga positiva.

As grandezas das cargas diferem em função da diferença entre o ponto isoelétrico e o pH do meio onde a proteína se encontra. Essa relação não é linear, mas podemos descrevê-la declarando que quanto maior for esta diferença tanto maior será a carga.

Quando submetemos uma partícula carregada à ação de um campo elétrico a mesma fica animada de um movimento que a dirige para o pólo de sinal oposto ao da sua carga e cuja velocidade depende da grandeza desta carga. No caso específico das proteínas do soro submetidas à eletrforese em pH 9,0, todas elas migrarão para o pólo positivo com velocidades tanto maior quanto mais baixo for o seu respectivo ponto isoelétrico.

Na eletrforese das proteínas do soro submetemos uma amostra deste soro a um campo elétrico de grandeza pré-estabelecida em pH próximo de 9,0. As proteínas migram para o pólo positivo com velocidades diferentes distribuindo-se em grupos. O grupo de ponto isoelétrico mais baixo (5,0) migra com maior velocidade e se identifica com o que, na "salting-out" identificamos pelo nome de albumina. As demais proteínas (cujos pontos isoelétricos se distribuem entre 6,0 e 8,0) se separam em número variável de grupos (geralmente 3) e coincidem com aquelas que no "salting-out" identificamos pelo nome de globulinas. Dentro deste grupo, elas são identificadas pelas letras do alfabeto grego (alfa, beta, gama) (ver Figura abaixo).



Eletrforese das proteínas do soro normal.

Cada uma das proteínas participantes de um mesmo grupo compartilha origem e funções biológicas. As albuminas são produzidas no fígado e tem como funções suprir os

tecidos com material nitrogenado, carrear no plasma sanguíneo substâncias que são pouco solúveis em água e fazer a manutenção da pressão osmótica do plasma sanguíneo. As globulinas dos grupos alfa e beta também são produzidas no fígado e funcionam como carreadoras de lipídeos (lipoproteínas), glicídeos, metais, hormônios, proteínas, etc. As globulinas do grupo gama são sintetizadas no sistema imunológico (linfócitos) e funcionam como anticorpos.

## **PROCEDIMENTO PRÁTICO**

### **1. O sistema da eletroforese**

Para fazermos uma eletroforese necessitamos essencialmente de uma fonte de corrente contínua, uma cuba, um sistema de cabos para interconectar as duas unidades, uma solução tampão de pH e concentração convenientes e um suporte sólido onde aplicaremos a amostra. Adicionalmente, necessitaremos de um corante para podermos ver o resultado da separação.

A fonte de corrente contínua é essencial porque necessitamos manter durante todo o tempo da corrida uma corrente cujo sentido seja constante e cuja intensidade seja estável. A corrente que nos é fornecida pela companhia de iluminação pública é alternada, muda de sentido 60 vezes por segundo, além de variar muito de intensidade. A fonte de eletroforese é, basicamente um retificador de corrente alternada, semelhante ao encontrado nos carregadores de baterias de automóveis, complementado por um circuito eletrônico que assegura a estabilidade da intensidade e do potencial da corrente contínua fornecida.

### **2. Suporte**

O suporte para a corrida é um meio sólido e poroso no qual embebemos o tampão escolhido. Vários suportes são usados na dependência dos objetivos da corrida: papel de filtro, acetato de celulose, goma de amilo, bloco de amilo, gel de poliácridamida, etc. Na presente prática estaremos trabalhando com o acetato de celulose.

### **3. Tampão**

O tampão escolhido para a presente corrida é constituído por uma mistura de TRIS – 60,5 g/L, Ácido bórico – 4,6 g/L e EDTA 6,0 g/L, pH 9,0. Depois de pronto deve ser diluído ao meio com água destilada. Este tampão é adequado para o fracionamento de proteínas do soro em suporte de acetato de celulose.

### **4. Condições da corrida**

A corrida deve ser feita durante 60 minutos com a intensidade de 125 volts.

### **3. Coloração e lavagem**

A coloração é feita com o corante Poncaeu S, dissolvido em TCA (ácido tricloroacético) a 3% na concentração final de 0,2 %. A função do ácido tricloroacético é fixar as proteínas ao suporte (acetato de celulose) promovendo sua desnaturação. A lavagem, feita com o objetivo de remover o excesso de corante do suporte, é realizada com ácido acético 5%.

O perfil eletrofotérico - Chamamos de perfil eletroforético o gráfico que expressa o resultado de uma corrida eletroforética. Ele descreve as proporções com que cada um dos grupos de proteínas participa no total. Cada soro tem o seu perfil eletroforético normal e perfis característicos de diversos tipos de enfermidades. O perfil eletroforético é um recurso útil no diagnóstico de doenças como o mieloma que alteram a proporção entre os diversos tipos de proteínas do soro.

## *Pesquisa de constituintes anormais da urina*

### **FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

Denominamos "constituintes anormais da urina" uma série de substâncias que não aparecem na urina de animais sadios e cujo aparecimento ocasional permite identificar situações de caráter patológico. Os principais constituintes anormais que ocorrem na urina são os seguintes: Albumina, glicose, sangue (hemoglobina ou hemácias integras), corpos cetônicos e bile (sais ou pigmentos biliares).

Três são os mecanismos que permitem explicar o aparecimento de constituintes anormais na urina:

1º) Saturação (sobrecarga) dos mecanismos de reabsorção tubular - muitas substâncias de interesse fisiológico, tais como a glicose, os aminoácidos e os corpos cetônicos, são filtradas sem qualquer impedimento no glomérulo e enquanto sua concentração no filtrado se mantém dentro dos limites aceitáveis, são totalmente reabsorvidas nos túbulos de sorte que não aparecem na urina. Quando sua concentração no plasma, e no filtrado, ultrapassa o "limiar de excreção renal" (Tm), o excesso que não pode ser reabsorvido nos túbulos, é eliminado na urina.

2º) Presença de substâncias anormais no plasma - Algumas substâncias que só aparecem eventualmente no plasma não possuem mecanismos tubulares para reabsorção seletiva. Nesse caso podemos citar a hemoglobina e os sais biliares livres. Quando uma patologia específica determina o aparecimento de grande quantidade dessas substâncias no plasma, elas são filtradas e aparecem na urina por não sofrerem qualquer tipo de reabsorção tubular.

3º) Ocorrência de lesão renal - Algumas substâncias não aparecem na urina porque normalmente não são filtradas no rim. Esse é o caso de todas as proteínas plasmáticas. Quando ocorre uma lesão a nível de glomérulo ou de túbulos renais o aumento da permeabilidade permite que tais substâncias, ou mesmo células, passem para o fluido tubular e apareçam na urina.

### **PROCEDIMENTO PRÁTICO**

#### 1 - Identificação da albumina

Fundamento - A albumina é facilmente coagulável pelo calor provocando turvação no meio líquido em que se encontra. Como, além da albumina, outras substâncias que também turvam pelo calor podem ser encontradas na urina, temos a necessidade de proceder ao diagnóstico diferencial pela adição de ácido acético glacial ao meio onde ocorreu a turvação.

Técnica - Tomar em tubo de ensaio urina suficiente para enchê-lo até aproximadamente 80% de sua altura. Levá-lo ao bico de Bunsen e aquecer a parte superior da massa líquida até a fervura. Ocorrendo turvação adicionar algumas gotas de ácido acético glacial.

Resultados

1 - Ausência de turvação - teste negativo.

2 - Ocorre turvação que persiste após adição do ácido acético glacial - albumina.

- 3 -Ocorre turvação que desaparece à adição do ácido acético glacial -fosfato.  
4 -Ocorre turvação que desaparece com formação de espuma após a adição de ácido acético glacial -carbonato.

## 2 - Identificação da glicose

Fundamento - A glicose é um açúcar redutor. Se aquecermos um meio onde exista a glicose na presença de um sal cúprico ocorrerá a redução do íon cúprico a cuproso que precipitará na forma de óxido de cor amarela. O teste é feito com o reagente de Benedict qualitativo que é uma solução de sulfato cúprico em meio alcalino.

Técnica - Colocar em tubo de ensaio 5 mL do reagente de Benedict qualitativo e 8 gotas de urina. Misturar e levar a banho-maria fervente durante o tempo que for necessário para a urina entrar em ebulição.

Resultados

- 1 -O líquido permanece azul -negativo
- 2 -Coloração esverdeada -traços
- 3 -Verde sujo -0,50 a 0,75 g %
- 4 -Amarelo ou marrom -1 g %
- 5 -Vermelho ou tijolo -2 g % ou mais.

## 3 - Identificação dos corpos cetônicos

Fundamento - Os corpos cetônicos são formados a partir do metabolismo dos lipídeos sendo os principais o ácido acetilacético, o ácido betahidroxibutírico (formas circulantes) e a acetona (forma de excreção). No caso específico da cetose dos ruminantes também pode ocorrer o álcool isopropílico.

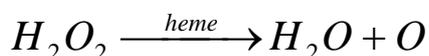
Essas substâncias se formam normalmente em nosso metabolismo e representam formas de circulação de reservas lipídicas no plasma sanguíneo da mesma forma que a glicose é uma forma de circulação de reservas glicídicas. Normalmente a sua concentração é tão baixa que todos os corpos cetônicos filtrados são reabsorvidos nos túbulos renais. Quando, em decorrência de um distúrbio metabólico, ocorre sobrecarga o excesso é eliminado na urina.

Os corpos cetônicos presentes na urina (especialmente a acetona) podem ser reconhecidos por uma reação de complexação com o nitroprussiato de sódio que produz cor violeta intensa. No caso presente, estamos usando o reagente de Lange que é uma solução de nitroprussiato de sódio em ácido acético glacial.

Técnica -Tomar em tubo de ensaio 1 mL de urina e 5 gotas do reagente de Lange. Misturar bem. Deixar correr pela borda do tubo 1 a 1,5 mL de hidróxido de amônio concentrado. Na interface aparece um anel de cor violeta.

## 4. Identificação do sangue

Fundamento - A evidenciação da presença de sangue (hemoglobina ou hemácias íntegras) se faz pelo aproveitamento da propriedade catalásica do grupamento heme que o habilita a decompor a água oxigenada fornecendo água e oxigênio nascente:



O oxigênio nascente formado na reação acima é utilizado para oxidar uma substância incolor a um produto colorido. No caso presente estamos utilizando a benzidina que, quando oxidada assume a cor azul.

Técnica - Tomar em tubo de ensaio 1 mL do reativo da benzidina, 5 gotas de urina e 2 gotas de água oxigenada. Se o teste for positivo haverá o desenvolvimento de coloração azul intensa que, com o passar do tempo muda para cor de vinho.

#### 5 - Identificação dos pigmentos biliares (Reação de Gmelin)

Fundamento - O principal dos pigmentos biliares é a bilirrubina diglicuronídeo que normalmente é excretada na bile. Quando ocorre lesão hepática este pigmento reflui para o sangue e é excretado na urina onde pode ser facilmente reconhecido pelo produto esverdeado de sua oxidação pelo ácido nitroso-nitrico (biliverdina).

Técnica - Tomar em tubo de ensaio 1 mL de urina. Em pipeta de 2 ml tomar 1 ml de ácido nitroso/nítrico. Introduzir a pipeta no tubo e deixar escoar o ácido pela parede do tubo. Se o teste for positivo aparecerá um anel verde na interface.

#### 6 - Identificação dos sais biliares (Teste de Hay)

Fundamento - O teste de Hay (teste da "chuva de enxofre") se baseia na propriedade tensioativa dos sais biliares, isto é na capacidade apresentada pelos sais biliares de baixar a tensão superficial da água permitindo a penetração de partículas que, de outra forma, ficariam retidas na superfície.

Técnica - Deitar na superfície de um cálice com urina uma fina camada de enxofre em pó e observar o comportamento das partículas. Caso não haja sais biliares as partículas permanecerão flutuando na superfície. No caso contrário elas submergirão.

## *pH e capacidade de tamponamento da urina*

### **FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

As medidas de pH são um dos procedimentos mais importantes e mais freqüentes na prática em bioquímica. O pH afeta a estrutura e a atividade das macromoléculas biológicas, como, por exemplo, a atividade catalítica das enzimas.

Quase todos os processos biológicos são dependentes do pH; uma pequena variação do pH do meio produz uma grande variação na velocidade da maioria dos processos biológicos que se desenvolvem neste mesmo meio. Isto é verdade não apenas para muitas reações nas quais o íon  $H^+$  é participante direto, mas também para aquelas nas quais não há um papel aparente desses íons. As enzimas que catalisam as reações celulares e muitas das moléculas sobre as quais elas agem, possuem grupos ionizáveis de pKa característicos. Os grupos aminoprotonados ( $-NH_3^+$ ) e os grupos carboxila dos aminoácidos e os grupos fosfato dos nucleotídeos, por exemplo, funcionam como ácidos fracos; o seu estado iônico depende do pH da solução na qual estão dissolvidos. Como notamos acima, as interações iônicas estão entre as forças que estabilizam a molécula de uma proteína e permitem que uma enzima reconheça e ligue-se ao seu substrato.

As células e os organismos mantêm um pH citosólico constante e específico, geralmente próximo de pH 7,0, o que mantém as biomoléculas em seu estado iônico ótimo. Em organismos multicelulares o pH dos fluídos extracelulares é também estreitamente regulado. A constância do pH é conseguida primariamente através da existência de tampões biológicos: estes são misturas de ácidos fracos e sua base conjugada, que possuem a capacidade de resistir às variações do seu pH quando às mesmas são adicionadas quantidades relativamente pequenas de ácido ou base.

Os principais produtos do catabolismo são:  $CO_2$ , água, uréia, sais minerais ácidos e ácidos orgânicos. O  $CO_2$  é um gás parcialmente ácido pois reage com a água formando o ácido carbônico e, em virtude de poder ser eliminado pelos pulmões, é denominado ácido volátil. Em contraposição, os demais ácidos do organismo são chamados ácidos fixos. Os sais minerais ácidos se originam de radicais protéicos que contêm enxofre ou fósforo, ou de lipídeos que possuem radicais fosfato, podendo formar ácidos como o fosfórico e o sulfúrico. Estes, por serem ácidos fortes, devem encontrar-se no organismo na forma de sais ácidos ou neutros, como por exemplo fosfato ou sulfato de sódio. Os ácidos orgânicos são em geral fracos, como o ácido láctico e o beta-hidroxibutírico, derivados do metabolismo de carboidratos e gorduras.

Vemos pois que, devido à maioria dos produtos catabólicos serem ácidos, o indivíduo necessita de mecanismos que evitem primordialmente a queda do pH do sangue. O rim, favorecendo a excreção de radicais ácidos, exerce um papel relevante na manutenção do equilíbrio ácido-base do organismo, juntamente com os tampões do meio intra- e extracelular e a eliminação de  $CO_2$  pelos pulmões. Devido à capacidade que o rim apresenta de eliminar ácidos fixos, a urina de um indivíduo normal pode apresentar um pH bem menor que o de seu sangue, podendo chegar até um valor extremo de aproximadamente 4,5. A acidificação urinária ocorre essencialmente através de: secreção de hidrogênio e reabsorção de bicarbonato; eliminação de ácidos livres ou sais ácidos; e excreção de sais de amônio. Entretanto, em certas condições, pode ocorrer no organismo um excesso de bases fixas, como por exemplo em caso de vômitos, com grande perda de ácido clorídrico, ou após a ingestão excessiva de substâncias alcalinas, como bicarbonato de sódio. Nestas situações, o rim excreta urina alcalina, com pH próximo de 8,5, eliminando assim o excesso de base.

As medidas de pH do sangue e da urina são comumente empregadas no diagnóstico de doenças. O pH do plasma sanguíneo de pessoas com diabetes severa, por exemplo, é frequentemente menor que o valor normal de 7,4; esta condição é chamada de acidose. Em

outros estados patológicos o pH do sangue é maior do que o normal, e esta condição é conhecida como alcalose.

O pH de uma solução aquosa pode ser medido aproximadamente usando-se vários corantes indicadores, como por exemplo o litmus, a fenolftaleína e o vermelho de fenol, dentre outros, os quais sofrem transformações coloridas sempre que um próton dissocia-se da molécula dos mesmos. Abaixo temos uma tabela com o  $pK'$  e zona de pH e de cores de alguns indicadores:

NOME	$pK'$		Faixa de pH e Cores	
Amarelo de metila	3,3	vermelho	2,9 - 4,0	amarelo
Metilorange	3,5	vermelho	3,1 - 4,4	amarelo
Azul de bromofenol	4,0	amarelo	3,1 - 4,7	azul
Vermelho de metila	5,0	vermelho	4,2 - 6,3	amarelo
Azul de bromotimol	7,1	amarelo	6,1 - 7,7	azul
Vermelho de fenol	7,8	amarelo	7,0 - 8,6	vermelho
Fenolftaleína	9,7	incolor	8,2 - 10,0	vermelho

Outra forma de medir aproximadamente o pH de uma solução aquosa é através do uso de fitas indicadoras de pH, as quais após serem mergulhas na solução, são comparadas à uma escala de cores.

Determinações precisas do pH em laboratórios químicos ou clínicos são feitas com um eletrodo de vidro, o qual é sensível seletivamente à concentração de  $H^+$  e insensível àquelas de outros cátions como  $Na^+$  ou  $K^+$ . Num aparelho medidor de pH o sinal elétrico emitido por este eletrodo é ampliado e comparado com o sinal gerado no mesmo eletrodo por uma solução com pH conhecido com precisão.

## PROCEDIMENTO PRÁTICO

- 1) Colher quantidade suficiente de urina.
- 2) Em um becher, colocar 20 ml de urina.
- 3) Utilizar a fita indicadora universal de pH: Mergulhar rapidamente a fita na urina e comparar com a escala de cores. Anotar o valor de pH encontrado.
- 4) Em outro becher, colocar 20 ml de água destilada, e num terceiro, o mesmo volume de uma solução tampão com pH fisiológico.
- 5) Adicionar nos bechers 2 a 3 gotas do corante indicador fenolftaleína.
- 6) Adicionar a cada um dos bechers, 0,1 ml de NaOH 1N. Verificar a cor que cada solução apresentou após este passo.

Que conclusões podem ser tiradas destes resultados?

## *Digestão do Leite*

### FUNDAMENTOS TEÓRICOS

A caseína é uma fosfoproteína na qual o fosfato está esterificado à hidroxila e um resíduo de serina. Por sua riqueza em aminoácidos essenciais, possui elevado valor biológico. É a proteína do crescimento animal.

Apresenta-se sob três formas diferentes:  $\alpha$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\gamma$ -caseína como pesos moleculares que variam de 75.000 a 100.000. No seu conjunto as caseínas constituem 80% da proteína do leite. Deste total, 60% são de  $\alpha$ -caseína, 17% de  $\beta$ -caseína e 2,4% de  $\gamma$ -caseína.

A caseína pode ser precipitada pela adição de ácido acético até pH 4,7 que seu pl. Essa precipitação é facilmente obtida com leite desnatado. Além disso a caseína do leite também pode ser precipitada por ação do labfermento ou renina.

A coagulação por auto acidificação tem como conseqüência da fermentação da lactose por bactérias do gênero *Lactobacillus*, cujo produto final é o ácido láctico. Ao atingir o ponto isoelétrico da caseína por acidificação do meio como conseqüência do ácido láctico formado, ocorre a precipitação da mesma formando o coágulo, fenômeno que é utilizado para produzir leites fermentados do tipo do iogurte ou quefir.

Na mucosa gástrica dos animais jovens existe uma enzima proteolítica, o labfermento ou renina, que age sobre a caseína dependendo do  $\text{Ca}^{2+}$ .

As micelas de caseína são mantidas no leite pela ação estabilizante da k-caseína. Esta é quebrada por hidrólise pela renina, ativada pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , liberando um glicomacropéptido de 52 a 58 resíduos de aminoácidos, o que faz com que perca sua ação estabilizante e permita que a caseína ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) se coagule na forma de paracaseinato de cálcio que é insolúvel.

A coagulação da caseína do leite pelo labfermento é a base da indústria do queijo, se bem que atualmente proteases de origem bacteriana estão sendo já utilizadas para propósitos semelhantes.

### PROCEDIMENTO PRÁTICO I – Precipitação da caseína ao ponto isoelétrico

1. Medir 100 mL de leite e diluir com 200 mL com água destilada; homogeneizar e determinar o pH com o auxílio de pHmêtro ou fita indicadora de pH.
2. Adicionar solução de HCl 1 N gota a gota, sob agitação constante, até observar a formação de grumos de caseína e novamente medir o pH (deve equivaler ao ponto isoelétrico, 4,7).
3. Verificar o efeito da adição de maior volume de ácido, anotando o pH obtido (deve ocorrer a completa dissolução da caseína).
4. Juntar solução de NaOH 1 N gota a gota, de modo a passar novamente pelo pl e até completa dissolução dos grumos de caseína, anotando igualmente o pH.
5. Organizar um gráfico relacionando em ordenada os valores de pH (anotar apenas acidez, pl e alcalinidade) e em abscissa a solubilidade.

## *Pesquisa de substâncias estranhas no leite*

### FUNDAMENTOS TEÓRICOS

O leite obtido em circunstâncias naturais é uma emulsão de cor branca, ligeiramente amarelada, odor suave e gosto adocicado.

É um produto secretado pelas glândulas mamárias e constitui alimento indispensável aos mamíferos nos primeiros meses de vida, enquanto não podem digerir e assimilar outras substâncias necessárias à sua sobrevivência.

O leite para o consumo deve ser, em natureza, um produto normal e integral, obtido em ordenha higiênica, produzido por vacas sãs submetidas a regime higiênico apropriado.

As impurezas do leite podem ser classificadas em impurezas propriamente ditas e falsificações ou fraudes.

As impurezas propriamente ditas derivam da falta de atenção e higiene, descuidos, etc., na ordenha manual, e falsificações ou fraudes. Hoje em dia, no entanto, tais impurezas são quase totalmente eliminadas devido à ordenha mecânica, que faz com que o leite seja extraído em perfeitas condições assépticas. Como impurezas propriamente ditas podem-se citar: pêlos e parasitas (carrapatos do animal; fragmentos insolúveis, como madeira, alimento, estrume, etc. São, em geral, macroscópicas, e assim é fácil percebê-las. Sua separação pode ser feita por simples filtração em tecido branco, de malhas mais ou menos compactas. As impurezas desse tipo permanecem no tecido, isto é, são retidas por ele, sendo a sua identificação rápida. Esta filtração é mais conhecida como "coar o leite". Após tal operação o leite se torna, quase sempre, apto para o consumo, depois de convenientemente esterilizado.

Quanto à falsificação, podemos dizer que tem duas finalidades principais:

1º) Para conservar o leite, quando se empregam os chamados conservadores, que são facilmente identificados por processos químicos;

2º) Para aumentar o volume do leite ou sua densidade, como no caso da adição de amido.

### PROCEDIMENTO PRÁTICO

#### Identificação de:

1. **Nitratos** – Em um tubo de ensaio, colocar 2 mL de leite, 2 mL de ácido sulfúrico (D=1,825) e algumas gotas de formol a 10%.

Reação: Positiva – anéis azuis

Negativa – cor inalterável

2. **Amido** – Colocar em um tubo de ensaio 10 mL de leite. Aquecer. Em seguida juntar 6 gotas do reativo de lugol.

Reação: Positiva – flocos azuis

Negativa – leve cor amarela uniforme (iodo)

3. **Urina** – Pipetar 5 mL de leite e colocar num tubo de ensaio; juntar em seguida 5 mL de ácido clorídrico, 5 mL de etanol e 0,5 mL de ácido nítrico.

Reação: Positiva – coloração róseo-violácea

4. **Gelatina** – Colocar num frasco de Erlenmeyer 5 mL de leite e 5 mL de solução de nitrato de mercúrio a 5%. Agitar. Adicionar 10 mL de água destilada. Agitar. Deixar

em repouso por 5 minutos. Filtrar. Adicionar 10 mL de solução saturada de ácido pícrico.

*Reação:* Positiva – aparecimento de turvação ou um precipitado amarelo.

5. **Sacarose** – Num tubo de ensaio colocar 15 mL de leite, 1 mL do reativo de Seliwanoff. Aquecer em banho-maria durante 5 minutos.

*Reação:* Positiva – coloração avermelhada.

6. **Sangue** – Tomar 0,9 mL de leite; diluí-los em 10 mL de água destilada e adicionar 1 mL do reativo de Kastle-Meyer e 2 a 5 gotas de água oxigenada.

*Reação:* Positiva – cor rósea ou vermelho-forte (aparecendo rapidamente ou no fim de 1 minuto)

7. **Pus** – Para esta pesquisa é preferível empregar a prova de Behmer. Tomar 0,1 mL de leite e colocá-lo num tubo de ensaio com igual quantidade de amoníaco. Depois de 1 minuto juntar uma gota de solução de fucsina de Ziehl a 50%, e, após alguns segundos, adicionar, muito lentamente, 10 mL de água corrente.

*Reação:* Positiva – formação de filamentos, grumos ou mesmo um véu avermelhado, que não é desfeito por leve agitação.

Negativa – líquido transparente e rosado.

8. **Formol (conservante)** – Transferir para um tubo de ensaio 5 mL de leite, adicional 2 mL de ácido sulfúrico (1:1) e 1 mL de tricloreto de ferro a 2%. Aquecer até a ebulição com bico de bunsen.

*Reação:* Positiva – cor roxa

Negativa – cor amarela

## *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Annino, J. S. e Giese, R. W. (1978) Química Clínica – Princípios e Métodos – 4ª Edição. Editora Monole, SP.

Burtis, C. A. e Ashwood, E. R. (1998) Tietz Fundamentos de Química Clínica – 4ª Edição, Editora Guanabara Koogan, RJ.

Nepomuceno, M. F. (1998) Bioquímica Experimental – Roteiros Práticos – Editora UNIMEP.

Santos Neto, A. L.C.; Vasconcellos, A.M H.; Valle, A. B. F.; Oliveira, M. L. C.; Panek, A. D.; Ferreira Pinto, G.; Operti, M.S.; Chaloub, R.M. e Carvalho, V. L. A. C. (1988) Manual de cursos práticos em bioquímica (5ª Edição) Departamento de Bioquímica – IQ – UFRJ.

Villela, G.G.; Bacila, M. e Tastaldi (1973) Técnicas e Experimentos de Bioquímica – Editora Guanabara Koogan, RJ.