

BIOLOGIA CELULAR I
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Procedimentos experimentais e folhas de apoio às aulas práticas

2005/2006

BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

BIOLOGIA CELULAR I

Programação das aulas práticas 2005/2006

28 Set – 30 Out	Início das aulas 4ª feira 28 de Setembro	Material de laboratório. Normas de segurança. Soluções. Concentração de soluções. Problemas. Técnicas de pesagem. Preparação de soluções.
3 – 7 Out	Continuação da mesma aula.	4ª é feriado, 5ª e 6ª não há aulas
10 – 14 Out	Métodos de determinação do pH. Sistemas tampão.	
17 – 21 Out	Microscopia óptica de campo claro. Iluminação de Köhler. Observação de diferentes tipos de células: célula animal, vegetal e procariótica. Microscópio de contraste de fase, campo escuro e fluorescência.	
24 – 28 Out	Medição de células e estruturas observadas ao microscópio óptico.	
31 Out – 4 Nov	Discussão de resultados e dúvidas. (3ª feira, 1 de Outubro, é feriado)	
7 – 11 Nov	Espectro de absorção de um composto em solução. Espectrofotometria.	
14 – 18 Nov	Electroforese de proteínas – ponto isoeléctrico.	
21 – 25 Nov	Extracção de DNA e amplificação de um fragmento de DNA por PCR.	
28 Nov – 2 Dez	Análise de DNA com enzimas de restrição (5ª feira, 1 de Dezembro é feriado) (<i>alunos de 5ª feira distribuem-se pelas outras turmas</i>).	
5 Dez – 9 Dez	Electroforese em gel de agarose. Discussão de resultados (5ª feira, 8 de Dezembro é feriado) (<i>alunos de 5ª feira distribuem-se pelas outras turmas</i>).	
12 - 16 Dez	Apresentações feitas pelos alunos.	

Nº de aulas previstas: 11

Limite de faltas : 4

Exames - época normal: 9 a 28 de Janeiro

- **época de recurso:** 30 de Janeiro - 11 de Fevereiro

Dispensas: só têm direito a dispensa os alunos que obtiveram frequência nas aulas práticas do ano lectivo transacto de 2004-05.

1 - Bibliografia específica para as aulas práticas

Boyer, R. F. 1986. **Modern Experimental Biochemistry**. Addison-Wesley Pub. Comp., Massachussets.

Bradbury, S. 1976. **Optical Microscope in Biology**. Studies in Biology nº 59. Edward Arnold Ed., London.

Choinski, J. S. 1992. **Experimental Cell and Molecular Biology**. 2nd Edition. Wm. C. Brown Publishers, Chicago.

Lacey, A. J. 1989. **Light microscopy in biology. A practical approach**. IRL Press at Oxford University Press.

Salema, R. e Santos, I. 1992. **Microscopia electrónica de transmissão**. Instituto Nacional de Investigação Científica, Lisboa.

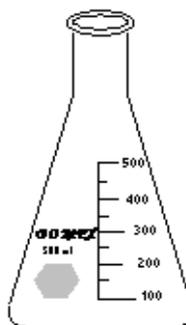
Material de laboratório – 1

Material de laboratório

Ver: <http://newton.dep.anl.gov/york/listing.html>



Gobelé

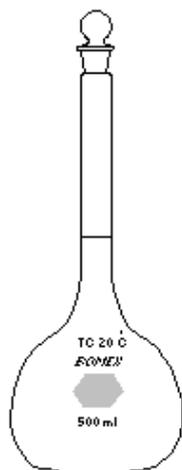


Matrazes ou Erlenmeyers

- utilizados para colocar e armazenar soluções (não são utilizados para medir volumes com rigor, a sua escala é aproximada)



Pipeta



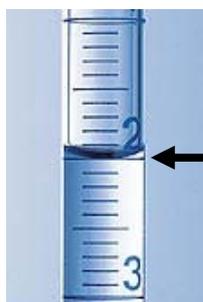
Balões volumétrico



Provetas



- utilizados para medição rigorosa de volumes – preparação de soluções, misturas, etc.



ao medir, alinhar a parte inferior do menisco com o traço da escala correspondente ao volume pretendido

Material de laboratório – 2



Tubos de ensaio



Tubos Falcon



Microtubos (Eppendorfs)



Micropipetas automáticas

- utilizadas para medir volumes pequenos com elevada precisão

Manuseamento das micropipetas :
(<http://www.fhrc.org/education/hutchlab/lessons/use.html>)

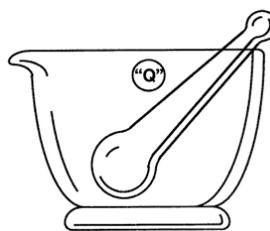


Pontas para as micropipetas



Placa da Petri

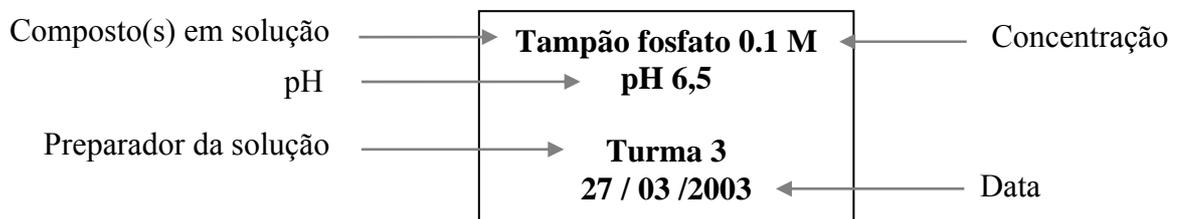
- utilizadas por ex. para cultura de células



Almofarizes

- para homogeneizar material biológico

Todas as soluções devem ser convenientemente etiquetadas/identificadas com a seguinte informação:



MANEJO DE PROPIPETAS

As propipetas são equipadas com um sistema de válvulas facilmente manejáveis com uma só mão. Contudo, podem ser danificadas se não forem correctamente manipuladas. O principal cuidado a ter é **nunca deixar entrar qualquer líquido na propipeta**. Para isso deve-se:

- a. controlar cuidadosamente a válvula **S** ao fazer subir o líquido
- b. nunca usar a válvula **S** a não ser com a extremidade da pipeta mergulhada no líquido

A pipeta deve ser introduzida cuidadosamente não só para não danificar as válvulas da propipeta como para evitar acidentes que possam ocorrer devido a quebra da pipeta.

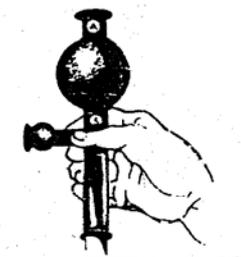
1- Usando o polegar e o indicador, pressionar a válvula **A** e apertar com os outros dedos para criar o vácuo. Libertar a válvula **A** deixando o bolbo comprimido.



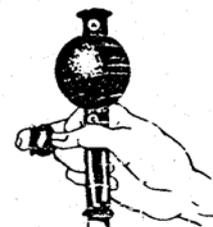
2- Inserir a pipeta no líquido. Pressionar a válvula **S**. O líquido deverá subir até ao nível desejado devido à sucção.



3- Pressionar a válvula **E** para expelir o líquido.



4- Para expelir a última gota, manter a válvula **E** pressionada, tapar o orifício da mesma válvula e apertar o pequeno bolbo.



MANEJO DE MICROPIPETAS

1/ place a disposable tip on the shaft of the pipette. Press on firmly with a slight twisting motion to ensure a positive, airtight seal.

2/ depress the push-button to the first positive stop (Fig.II.1).

3/ while holding the pipette vertically immerse the tip 3 or 4 mm. into the sample liquid.

4/ release the push-button SLOWLY to draw up the sample (Fig.II.2).

5/ wait 1 or 2 seconds, and then withdraw the tip from the sample. Wipe any fluid from the outside of the tip, taking care not to touch the orifice of the tip.

6/ to dispense the sample, place the tip end against the inside wall of the vessel and depress the push-button SLOWLY to the first stop (Fig.II.3). Wait a couple of seconds and then depress the push-button completely to expel any residual liquid (Fig.II.4).

7/ with the push-button fully depressed, carefully withdraw the Pipetman with tip sliding along the wall of the vessel.

8/ release the push-button.

9/ remove the used tip by depressing the tip ejector button. The cardboard packing from the tips can be used as a "dustbin" for used tips.

IV.- PRE-RINSING OF TIP

When pipetting some solutions (especially sera, proteins and organic solvents) a significant "film" may be retained on the inside of the tip, resulting in an error that may be larger than the tolerance specified if the tip is only filled once. Since this film remains relatively constant in successive pipettings with the same tip, excellent precision may be obtained by refilling the tip a second time and using this quantity as the sample. Successive samples from this same tip will exhibit good reproducibility.

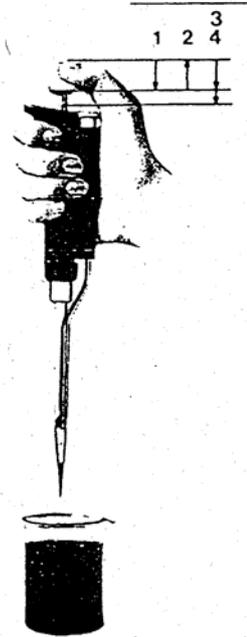
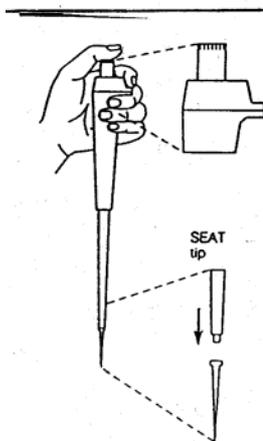


Fig. II

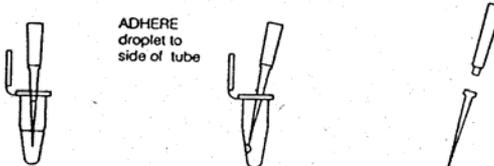


SEAT tip

DRAW sample into tip

ADHERE droplet to side of tube

Use of Digital Micropipet (steps 7 and 8)



Material de laboratório - 5

Manejo da micropipeta (<http://www.fhcr.org/education/hutchlab/lessons/use.htm>)

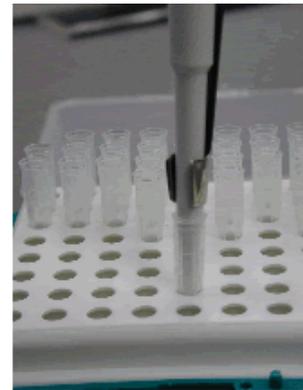
1 – Seleccione a micropipeta correcta para o volume a pipetar



2 – Ajuste para o volume desejado



3 – Ajuste uma ponta à micropipeta sem tocar na ponta



4 – Pressione o êmbolo até ao primeiro STOP



5 – Coloque a extremidade da ponta dentro do líquido



6 – Liberte o êmbolo lentamente



7 – Coloque a ponta próxima do fundo do novo tubo



8 – Pressione o êmbolo até ao segundo e último STOP



9 – Retire a ponta do tubo e **depois** liberte a pressão no êmbolo



Normas de segurança –1

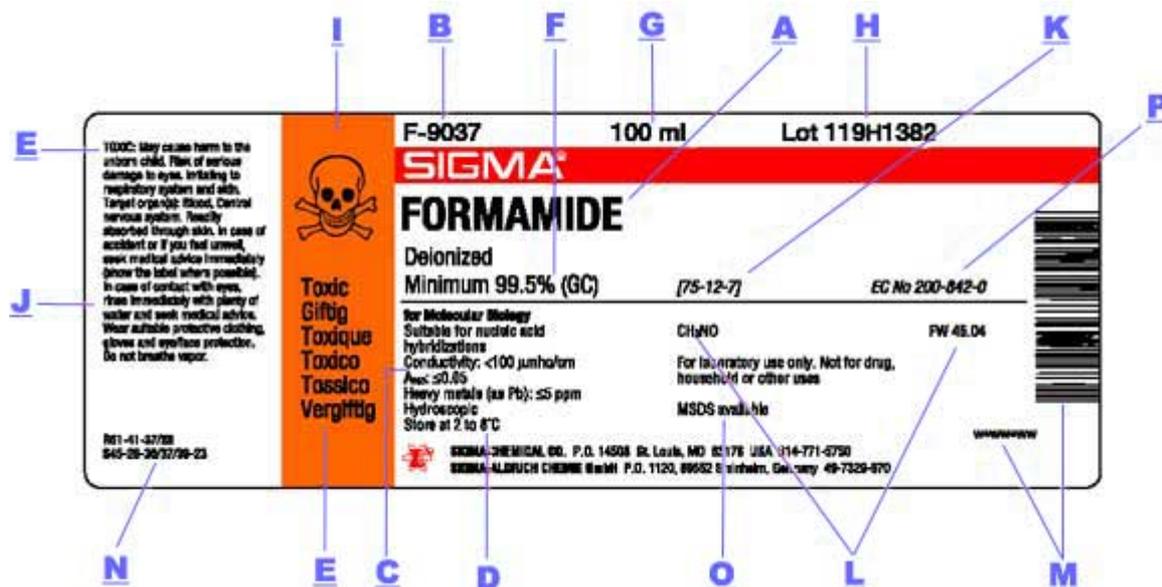
Sigma Product Labels

Sigma product labels are designed to provide complete, up-to-date information on our products ... Information available when and where you need it most.

On our labels, you can find:

- Complete product name and description
- Health and safety hazard information
- Lot-specific analytical data on many types of products
- Pictograms for instant hazard recognition
- Useful data for reference, CAS (Chemical Abstracts Service) number, chemical formula

Key to Sigma Product Labels:



- A** Product Name and Description
- B** Product Number
- C** Further Descriptive Information
- D** Recommendations on Handling and Storage
 - Storage temperatures indicated are for long-term storage of products. Products may be shipped under different conditions to reduce shipping costs, while still ensuring product quality.
- E** Hazard Statement
 - Indication of danger.
- F** Lot Analysis
 - Data on activity, purity, degree of hydration, etc., for this lot.
- G** Package Size
 - Unless the material is described as pre-weighed, the package will normally contain at least the indicated quantity, and usually somewhat more. For some products, the actual quantity at time of packaging is also shown. The user should always measure the amount needed from the container.

Normas de segurança –2

H Lot Number

I Hazard Pictogram

Lets you know at a glance what safety hazards are involved in the use of this product.

J Further Hazard Information

More complete description of actual hazards, handling precautions, and emergency management procedures.

K CAS Number

Chemical Abstract Service number shown wherever available. CAS numbers vary in how specifically they define the material. We make every effort to provide the most specific CAS number which applies. Where a CAS number is provided for a mixture or solution, it is usually the CAS number of the solute or component referred to in the main label name.

L Chemical Formula and Formula Weight

Unless water of hydration is indicated in the formula, the formula weight is for the anhydrous material.

M Bar Code and Eye Readable Equivalent

The bar code and the eye readable equivalent of the bar code are for Sigma internal use and label identification.

N Risk and Safety Numbers

O Material Safety Data Sheet Available

A Material Safety Data Sheet is available for this product.

P EC Number

This product has been identified with an EC number (EINECS or ELINCS). Those products without an EINECS number will carry the warning statement, "Caution-Substance Not Yet Fully Tested."

Pictograms

Pictograms are based on widely accepted standards.



Explosive



Oxidizing



Flammable



Toxic



Harmful or Irritant



Corrosive



Biohazard



Dangerous for the Environment

Hazard Codes

- | | | | |
|-----------|---------------------|-----------|-------------------------------|
| B | Biohazard | N | Dangerous for the environment |
| C | Corrosive | O | Oxidizing |
| E | Explosive | R | Radioactive |
| F+ | Extremely Flammable | T | Toxic |
| F | Highly Flammable | T+ | Very Toxic |
| Xn | Harmful | | |
| Xi | Irritant | | |

Soluções e concentração de uma solução – 1

Soluções

Uma **solução** é uma mistura homogénea de duas ou mais substâncias químicas puras, entendendo-se por homogéneo uma aparência uniforme ao microscópio óptico.

Numa solução considera-se o(s) **soluto(s)** e o **solvente**. O soluto apresenta as suas moléculas dispersas no solvente. Considera-se como solvente a substância que confere o estado físico à solução, a substância que estiver em maior proporção caso o estado físico de soluto e solvente seja o mesmo, ou a substância mais volátil se para além do mesmo estado físico as duas substâncias estiverem na mesma proporção. Se a água estiver presente, esta é sempre considerada como solvente.

Uma solução é caracterizada pela natureza de soluto e solvente - propriedades qualitativas, e pelas proporções relativas de soluto e solvente - propriedades quantitativas ou concentração.

A concentração de uma solução consiste na relação entre a quantidade de soluto e solvente presentes na solução e pode exprimir-se em:

Percentagem (p/p, p/v ou v/v)

% (p/p) – gramas de soluto por 100 gramas de solução

% (p/v) – gramas de soluto por 100 mililitros de solução

% (v/v) – mililitros de soluto por 100 mililitros de solução

Molaridade (M)

M – nº de moles de soluto por litro de solução

Molalidade (m)

m – nº de moles de soluto por quilograma de solvente

Partes por milhão (ppm)

ppm – partes de soluto por 1 milhão de partes de solução (mg L^{-1})

$$1 \text{ L} = 10^3 \text{ mL} \text{ (1000 mL)}$$

$$1 \text{ mL} = 10^{-3} \text{ L}$$

$$1 \text{ }\mu\text{L} = 10^{-6} \text{ L}$$

$$1 \text{ nL} = \underline{\quad} \text{ L}$$

$$1 \text{ L} = 10^6 \text{ }\mu\text{L}$$

$$1 \text{ mL} = 10^3 \text{ }\mu\text{L}$$

$$1 \text{ }\mu\text{L} = 10^{-3} \text{ mL}$$

$$1 \text{ nL} = \underline{\quad} \text{ mL}$$

$$1 \text{ L} = 10^9 \text{ nL}$$

$$1 \text{ mL} = 10^6 \text{ nL}$$

$$1 \text{ }\mu\text{L} = 10^3 \text{ nL}$$

$$1 \text{ nL} = \underline{\quad} \text{ }\mu\text{L} \text{ (COMPLETE)}$$

Exemplos de cálculos para a preparação de algumas soluções

1 – Como procederia para preparar 20 mL de H₂ SO₄ 10 % (v/v)?

$$10\% \text{ (v/v)} = 10 \text{ mL H}_2\text{SO}_4 / 100\text{mL de solução}$$

$$\begin{array}{l} 10 \text{ mL H}_2\text{SO}_4 \text{ -----} 100 \text{ mL de solução} \\ \qquad \qquad \qquad \times \\ \text{X mL H}_2\text{SO}_4 \text{ -----} 20 \text{ mL de solução que se quer preparar} \end{array}$$

$$\text{X} \times 100 = 10 \times 20 \quad \text{X} = (10 \times 20) / 100 = \mathbf{2 \text{ mL}}$$

Seria necessário colocar 5 a 10 mL de água destilada numa proveta, pipetar 2 mL de H₂ SO₄ com a ajuda de uma propipeta e perfazer o volume de 20 mL com água destilada.

2 – Como procederia para preparar 500 mL de NaOH 0,1 M (M = 40 g/mol)?

$$0,1 \text{ M} = 0,1 \text{ mol} / 1 \text{ L} (=1\text{dm}^3=1000\text{mL})$$

$$\begin{array}{l} 0,1 \text{ mol} \text{ -----} 1000 \text{ mL de solução} \\ \qquad \qquad \qquad \times \\ \text{X mol} \text{ -----} 500 \text{ mL de solução que se quer preparar} \end{array}$$

$$\text{X} \times 1000 = 0,1 \times 500 \quad \text{X} = (0,1 \times 500) / 1000 = \mathbf{0,05 \text{ mol}}$$

São necessárias 0,05 mol de NaOH para preparar 500 mL de uma solução 0,1 M. Agora é necessário calcular as gramas que será preciso pesar.

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mol} \text{ -----} 40 \text{ g} \\ \qquad \qquad \qquad \times \\ 0,05 \text{ mol} \text{ -----} \text{Y g} \end{array}$$

$$\text{Y} \times 1 = 40 \times 0,05 \quad \text{Y} = (40 \times 0,05) / 1 = \mathbf{2 \text{ g}}$$

Seria necessário pesar 2 gramas de NaOH e dissolver bem num volume de água destilada inferior a 500 mL num gobelé ou matraz. De seguida, esta mistura deveria ser vertida para uma proveta ou balão volumétrico, sendo adicionada água destilada até perfazer o volume de 500 mL.

Soluções e concentração de uma solução – 3

3 – Como procederia para preparar 500 mL de CH_3COOH 0,1 M. ($M = 60,05 \text{ g/mol}$).; 1L = 1,05 kg; pureza = 95% p/p)?

CH_3COOH = ácido acético – é um líquido e, por isso, a maneira de o medir não é pesando mas usando uma pipeta

$$0,1 \text{ M} = 0,1 \text{ mol} / 1 \text{ L} (=1\text{dm}^3=1000\text{mL})$$

$$\begin{array}{l} 0,1 \text{ mol} \text{ -----} 1000 \text{ mL de solução} \\ \text{X mol} \text{ -----} \times \text{-----} 500 \text{ mL de solução que se quer preparar} \end{array}$$

$$\text{X} \times 1000 = 0,1 \times 500 \quad \text{X} = (0,1 \times 500) / 1000 = \mathbf{0,05 \text{ mol}}$$

São necessárias 0,05 mol de CH_3COOH para preparar 500 mL de uma solução 0,1 M. Agora é necessário calcular as gramas correspondentes a esse n° de moles.

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mol} \text{ -----} 60,05 \text{ g} \\ 0,05 \text{ mol} \text{ -----} \times \text{-----} \text{Y g} \end{array}$$

$$\text{Y} \times 1 = 60,05 \times 0,05 \quad \text{Y} = (60,05 \times 0,05) / 1 = \mathbf{3,00 \text{ g}}$$

Como o ácido acético de que dispomos não é totalmente puro, temos de calcular qual a quantidade de produto presente no frasco (CH_3COOH 95%) que possui as gramas de CH_3COOH que nós pretendemos.

Pureza = 95% (p/p) = 95 g CH_3COOH / 100 g de solução (=produto que está no frasco)

$$\begin{array}{l} 95 \text{ g } \text{CH}_3\text{COOH} \text{ -----} 100 \text{ g de produto do frasco} \\ 3,0025 \text{ g } \text{CH}_3\text{COOH} \text{ -----} \times \text{-----} \text{Z g de produto do frasco} \end{array}$$

$$\text{Z} \times 95 = 3,0025 \times 100 \quad \text{Z} = (3,0025 \times 100) / 95 = \mathbf{3,16 \text{ g}}$$

Como o ácido acético é um líquido, temos de calcular qual o volume do ácido acético 95% que corresponde aos 3,16 gramas.

1L = 1,05 kg (significa que a densidade = 1,05)

se 1L = 1,05 kg então 1 mL = 1,05 g

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mL} \text{ -----} 1,05 \text{ g} \\ \text{V mL} \text{ -----} \times \text{-----} 3,16 \text{ g} \end{array}$$

$$\text{V} \times 1,05 = 1 \times 3,16 \quad \text{V} = (1 \times 3,16) / 1,05 = \mathbf{3 \text{ mL}}$$

OU:

$$d = 1,05 = \text{massa (g)} / \text{volume (mL)}$$

$$1,05 = 3,16 \text{ g} / \text{V}$$

$$1,05 \times \text{V} = 3,16 \text{ g}$$

$$\text{V} = 3,16 / 1,05 = \mathbf{3 \text{ mL}}$$

Para preparar 500 mL de CH_3COOH 0,1 M a partir de CH_3COOH 95% seria necessário colocar um pouco de água destilada numa proveta ou balão volumétrico de 500 mL, pipetar 3 mL de CH_3COOH 95% com a ajuda de uma propipeta e perfazer o volume de água destilada com água destilada.

Soluções e concentração de uma solução – 4

4 – Como procederia para preparar 50 mL de EDTA 0,2 M a partir de uma solução 1M?

$$0,2 \text{ M} = 0,2 \text{ mol} / 1 \text{ L} (=1\text{dm}^3=1000\text{mL})$$

$$\begin{array}{l} 0,2 \text{ mol} \text{ -----} 1000 \text{ mL de solução} \\ \text{X mol} \text{ -----} \times \text{-----} 50 \text{ mL de solução que se quer preparar} \end{array}$$

$$\text{X} \times 1000 = 0,2 \times 50 \quad \text{X} = (0,2 \times 50) / 1000 = \mathbf{0,01 \text{ mol}}$$

São necessárias 0,01 mol de EDTA para preparar 50 mL de uma solução 0,2 M. Agora é necessário calcular qual é o volume de uma solução 1 M que contém esse nº de moles.

$$1 \text{ M} = 1 \text{ mol} / 1 \text{ L}$$

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mol} \text{ -----} 1000 \text{ mL} \\ 0,01 \text{ mol} \text{ -----} \times \text{-----} \text{Y mL} \end{array}$$

$$\text{Y} \times 1 = 0,01 \times 1000 \quad \text{Y} = (0,01 \times 1000) / 1 = \mathbf{10 \text{ mL}}$$

OU encarar a situação como uma diluição de uma solução com concentração 1 M para obter 50 mL com concentração 0,2 M.

Para diluições: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$ (C – concentração, V – volume, i – inicial, f – final)

$$\text{Logo: } 1 \text{ M} \times \mathbf{X \text{ mL}} = 0,2 \text{ M} \times 50 \text{ mL} \quad \text{X} = (0,2 \times 50) / 1 = \mathbf{10 \text{ mL}}$$

Para preparar 50 mL de EDTA 0,2 M a partir de uma solução 1M, pipetaria 10 mL de EDTA 1 M para uma proveta ou balão volumétrico com 50 mL e adicionaria água destilada até perfazer o volume de 50 mL.

Soluções e concentração de uma solução – 5

5 - Calcule a molalidade de uma solução de H_2SO_4 20% (p/v) sabendo que a densidade da solução é 1,09 e que $M \text{H}_2\text{SO}_4 = 98 \text{ g/mol}$.

Molalidade = nº de moles de soluto por quilograma de solvente

H_2SO_4 20% (p/v) significa 20 g H_2SO_4 / 100 mL de solução

- será necessário calcular i) a quantas moles correspondem os 20 g de H_2SO_4 e ii) quantos kG de soluto estarão presentes em 100 mL de solução

i)

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mol} \text{ ----- } 98 \text{ g} \\ \quad \quad \quad \times \\ \mathbf{X} \text{ mol} \text{ ----- } 20 \text{ g} \end{array}$$

$$\mathbf{X} \times 98 = 1 \times 20 \quad \mathbf{X} = (1 \times 20) / 98 = \mathbf{0,204 \text{ moles}}$$

ii)

$$d = 1,09 = \text{massa (g)} / \text{volume (mL)}$$

$$1,09 = \mathbf{Y} \text{ g} / 100 \text{ mL} \quad \leftarrow$$

$$1,09 \times \mathbf{Y} = 100$$

$$\mathbf{Y} = 100 / 1,09 = \mathbf{91,743 \text{ g}} \quad \text{ou seja: } 100 \text{ mL de solução} = 91,743 \text{ g de solução}$$

logo: 20 g H_2SO_4 / 100 mL de solução correspondem a 20 g H_2SO_4 / 91,743 g de solução e a quantidade de solvente será de $91,743 - 20 \text{ g} = 71,743 \text{ g}$

então temos 20 g H_2SO_4 (= 0,204 moles) / 71,743 g de solvente e queremos saber as moles para 1 kg de solvente (=1000 g)

$$\begin{array}{l} 0,204 \text{ mol} \text{ ----- } 71,34 \text{ g solvente} \\ \quad \quad \quad \times \\ \mathbf{X} \text{ mol} \text{ ----- } 1000 \text{ g solvente} \end{array}$$

$$\mathbf{X} \times 71,34 = 0,204 \times 1000$$

$$\mathbf{X} = (0,204 \times 1000) / 71,34 = \mathbf{2,86 \text{ mol} / 1 \text{ kg de solvente} = 2,86 \text{ m}}$$

Uma solução de H_2SO_4 20% (p/v) tem uma molalidade de 2,86 molal (m).

Soluções e concentração de uma solução – 6

6 - A 4 mL de água juntou-se 16 mL de H₂ SO₄ 2,5 M. Calcule a molaridade da solução resultante.

Calculamos o nº de moles presentes em 16 mL da solução, esse nº de moles passa a existir num volume de 16 + 4 = 20 mL e calcula-se a molaridade desta nova solução.

$$2,5 \text{ M} = 2,5 \text{ mol} / 1 \text{ L} (=1\text{dm}^3=1000\text{mL})$$

$$\begin{array}{l} 2,5 \text{ mol} \text{ -----} 1000 \text{ mL de solução} \\ \quad \quad \quad \times \\ \text{X mol} \text{ -----} 16 \text{ mL de solução} \end{array}$$

$$\text{X} \times 1000 = 2,5 \times 16 \quad \text{X} = (2,5 \times 16) / 1000 = \mathbf{0,04 \text{ mol}}$$

$$\begin{array}{l} 0,04 \text{ mol} \text{ -----} 20 \text{ mL da nova solução} \\ \quad \quad \quad \times \\ \text{Y mol} \text{ -----} 1000 \text{ mL da nova solução} \end{array}$$

$$\text{Y} \times 20 = 0,04 \times 1000 \quad \text{Y} = (0,04 \times 1000) / 20 = \mathbf{2 \text{ mol} / 1 \text{ L}}$$

OU encaramos a situação como uma diluição de 16 mL de uma solução com concentração 2,5 M para obter 20 mL de uma nova solução de concentração mais diluída e a determinar.

Para diluições: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$ (C – concentração, V – volume, i – inicial, f – final)

$$\text{Logo: } 2,5 \text{ M} \times 16 \text{ mL} = \text{X M} \times 20 \text{ mL} \quad \text{X} = (2,5 \times 16) / 20 = \mathbf{2 \text{ M}}$$

A solução obtida a partir da adição de 4 mL de água a 16 mL de H₂ SO₄ 2,5 M possui uma concentração de 2 molar (M).

Soluções e concentração de uma solução – 7

PROBLEMAS

- 1 - Que massa de hidróxido de sódio é necessária para preparar 500 mL de uma solução 0,3 M? ($M = 40\text{g/mol}$).
- 2 - Uma solução é 0,25 M num certo soluto em que volume de solução existem 3,75 milimoles desse soluto?
- 3 - A massa específica de uma solução de ácido sulfúrico concentrado a 91,33% (p/p) é aproximadamente 1,813g/mL. Calcule a concentração em g/L ($M = 98\text{ g/mol}$).
- 4 - Determine o volume de uma solução de ácido sulfúrico 0,2 M que contém 2,5 g de H_2SO_4 .
- 5- Uma solução de sulfato de sódio é 0,1 M em anião sulfato. Calcule a concentração do catião sódio em g/L. (Na_2SO_4 : $M = 142,04\text{ g/mol}$).
- 6 – Qual o volume a adicionar a 1 mL de cloreto de hidrogénio 2 M para se obter uma solução 0,4 M?
- 7 - **a)** Pretende-se preparar 100 mL de uma solução de NaOH a 40% (p/p) ($d = 1,44$). Qual a quantidade de NaOH que se deve utilizar? **b)** Qual o volume de solução de NaOH a 40% necessário para preparar 1 L de NaOH 0,5 M. **c)** Calcule a concentração de NaOH correspondente à solução preparada na alínea b), expressa em g/mL.
- 8 - Como procederia para preparar 200 mL de uma solução 0,2 M em ião cálcio, se só possuísse no seu laboratório 100 mL de uma solução 0,2 M em sulfato de cálcio (CaSO_4) e 2,5 g de hidróxido de cálcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$].
- 9 - Adicionaram-se 6 gramas de KCl a 80 g de uma solução de KCl a 12% (p/p). Determine a concentração da solução resultante expressa em: **a)** % (p/p) e **b)** molalidade. (KCl : $M = 74,56\text{ g/mol}$).
- 10 - Qual é a molaridade e a molalidade de uma solução de ácido sulfúrico que contém 410,3g de H_2SO_4 por L de solução e cuja densidade é 1,243?
- 11 - Calcule quantos mL de ácido sulfúrico concentrado a 96% (p/p), cuja densidade é 1,84, são necessários para preparar 5 L de uma solução 0,05 M.
- 12 - Que volume de uma solução 1M contém a mesma quantidade de uma dada substância dissolvida que 30 mL de uma solução 0,2 M?
- 13 - A densidade do ácido sulfúrico de uma bateria de automóvel é 1,23. Sabendo que a concentração desta solução é 4 M, calcule a concentração em **a)** molalidade e **b)** % (p/p).
- 14 - Calcule a massa de nitrato de prata (AgNO_3) que é necessário dissolver em 250 g de água para obter uma solução 5×10^{-3} molal (AgNO_3 : $M = 170\text{ g/mol}$).
- 15 - A 50 mL de uma solução aquosa 0,1 M de um determinado composto, adicionou-se 150 mL de água. Supondo não haver contracção de volume, qual a concentração da solução resultante?
- 16 - De uma solução de tampão fosfato a 5% (p/v) foram retirados 2 mL aos quais se adicionaram 5 mL de água. Indique a concentração final do tampão.
- 17 - Calcule a molalidade e a molaridade de uma solução de ácido sulfúrico a 20% (p/v) ($d = 1,09$).

Soluções dos problemas:

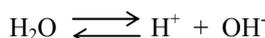
- | | |
|--|---|
| 1 - 6 g. | 9 - a) 18,1% b) 2,967 m. |
| 2 - 15 mL. | 10 - 4,18 M; 5,019 m. |
| 3 - 1655,8 g/L. | 11 - 13,86 mL. |
| 4 - 127,5 mL. | 12 - 6 mL. |
| 5 - 4,6 g/L. | 13 - a) 4,77 m; b) 68,1%. |
| 6 - 4 mL. | 14 - 212 mg. |
| 7 - a) 57,6 g. b) 34,7 mL. c) 0,02 g/mL. | 15 - 0,025 M. |
| 8 - 100 mL de CaSO_4 0,2 M + 1,48 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ | 16 - 1,43%. |
| + H_2O até 200 mL | 17 - 2 292 m· 2 040 M |

pH e soluções tampão - 1

pH

O solvente no interior das células e em todos os fluidos intercelulares é a água. Uma das características principais de qualquer solução aquosa é a concentração dos produtos de dissociação da água - os iões H^+ e OH^- . As características da molécula da água e especificamente a concentração dos seus produtos de dissociação influencia de uma forma determinante as propriedades das moléculas orgânicas e a forma como elas interagem.

Equação da dissociação da água



A 25° C

$$[H^+] \times [OH^-] = 10^{-14} M^2$$

Numa solução aquosa pura

$$[H^+] = [OH^-] = 10^{-7} M$$

Um método convencional de expressar a concentração do ião H^+ é a escala de pH:

$$pH = - \log [H^+] = \log 1 / [H^+]$$

A escala de pH varia de 0 a 14. Numa solução aquosa pura $[H^+] = 10^{-7} M$, logo $pH = - \log 10^{-7} = 7$, a solução diz-se neutra ($[H^+] = [OH^-]$). Valores de pH inferiores a 7 indicam uma solução ácida ($[H^+] > [OH^-]$) e valores de pH superiores a 7 indicam uma solução básica ou alcalina ($[H^+] < [OH^-]$).

Tabela 1 – Escala de pH e exemplos com diferentes valores de pH (adaptado de Loddish et al. 2000).

	Concentração de H^+ (M)	pH	Exemplo
Acidez crescente	10^{-0}	0	
	10^{-1}	1	Fluidos gástricos
	10^{-2}	2	Sumo de limão
	10^{-3}	3	Vinagre
	10^{-4}	4	Solos ácidos
	10^{-5}	5	Lisossomas e Vacúolos
Neutro	10^{-6}	6	Citoplasma de músculo em contracção
	10^{-7}	7	Água pura e citoplasma
Basicidade crescente	10^{-8}	8	Água do mar
	10^{-9}	9	Solos alcalinos
	10^{-10}	10	Lagos alcalinos
	10^{-11}	11	Detergentes com amónia
	10^{-12}	12	Cal (solução saturada)
	10^{-13}	13	
	10^{-14}	14	

Medição do pH de uma solução

Métodos para medição do pH:

1 – Método colorimétrico

Este método utiliza compostos designados **indicadores de pH** – compostos que apresentam uma cor diferente consoante o valor de pH da solução em que se encontram. Um **indicador universal** é uma mistura de indicadores de pH que assumem um leque de cores diferentes consoante o valor de pH. Utiliza-se sob a forma de uma tira de papel, impregnada com a mistura de indicadores, que é acompanhada de uma escala de cor e correspondentes valores de pH.

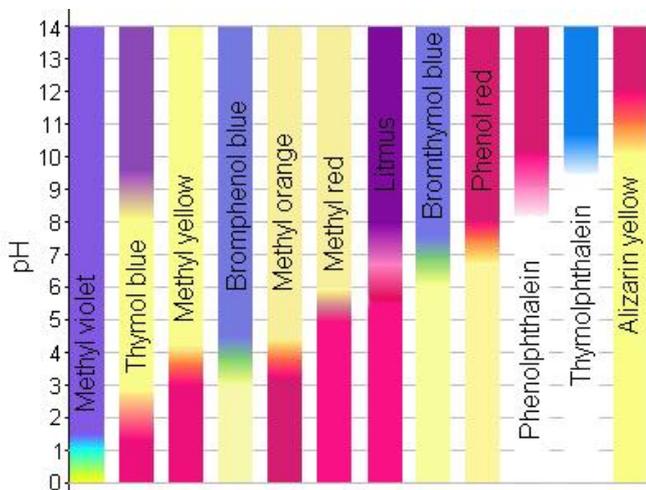


Figura 1 – Cores assumidas por vários indicadores de pH ao longo da escala de pH.

2 – Método electrométrico ou potenciométrico – aparelho de pH

O aparelho de pH é constituído por um voltímetro que mede as diferenças de potencial entre um eléctrodo de referência e um eléctrodo indicador (de vidro) associados numa só peça – eléctrodo combinado. O eléctrodo indicador é sensível à concentração de H^+ da solução na qual se encontra submerso, desenvolvendo-se uma diferença de potencial directamente proporcional à concentração de H^+ . A calibração do aparelho com soluções padrão de pH conhecido permite ao aparelho efectuar a conversão da voltagem medida em valores de pH.

Procedimento experimental

Medir o pH das soluções preparadas anteriormente (pp7) utilizando:

- 1 – o indicador de pH fenolftaleína - colocar 5 mL de cada uma das soluções num tubo de ensaio e adicionar 3 gotas de fenolftaleína
- 2 – um indicador universal de pH – mergulhar a fita de IU na solução
- 3 – o aparelho de pH – mergulhar o eléctrodo e a sonda da temperatura em cerca de 20 mL da solução colocada num pequeno gobelé (proceder previamente à calibração do aparelho).

Resultados:

Soluções	pH		
	Fenolftaleína	Indicador universal	Eléctrodo de pH
NaH ₂ PO ₄ 0,1 M			
Na ₂ HPO ₄ 0,1 M			
NaOH 0,2 M			
CH ₃ COOH 0,1 M			

pH e soluções tampão - 3

Tabela 2 – Indicadores de pH com as suas zonas de viragem e cores respectivas.

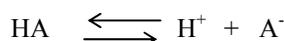
<i>Indicador</i>	<i>Gama de pH</i>	<i>pK_{HIn}</i>	<i>(nm) λ_{max}</i>	<i>Mudança de cor</i>	<i>Peso em gramas</i>	<i>Volume de etanol em ml</i>
Vermelho de O-cresol (zona ácida)	0,2-1,8	—	—	vm-am	0,5	200
Púrpura de m-cresol (zona ácida)	1,0-2,6	—	—	vm-am	0,4	200
Azul de timol (zona ácida)	1,2-2,8	1,75	544	vm-am	0,4	200
2,4 dinitrofenol	2,4-4,0	—	—	incolor am	—	—
Amarelo de dimetil	2,9-4,0	3,31	508	vm-am	0,4	900
Laranja de metil	3,1-4,4	3,40	506	vm-laranja	0,4	200
Vermelho do congo	3,0-5,0	—	—	az-vm	0,2	200
Azul de bromofenol	2,8-4,6	4,05	592	am-az	0,4	200
Verde de bromo-cresol	4,0-5,6	4,68	614	am-az	0,4	200
Vermelho de metil	4,4-6,2	4,95	533	vm-am	0,2	300
Púrpura de bromo-cresol	5,2-6,8	6,3	591	am-púrpura	0,4	200
Vermelho de cloro-fenol	5,4-6,8	6,0	—	am-vm	0,4	200
Azul de bromotimol	6,2-7,6	7,1	617	am-az	0,4	200
p-nitrofenol	5,0-7,0	—	—	incolor -am	—	—
Vermelho de fenol	6,4-8,0	7,9	558	am-vm	0,2	200
Púrpura de m cresol (zona alcalina)	7,6-9,2	—	—	am-az. violeta	0,2	200
Vermelho de cresol (zona alcalina)	7,2-8,8	8,2	572	am-vm	0,2	200
α-naftolftaleína	7,3-8,7	—	—	rosa-vd	—	—
Azul de timol (zona alcalina)	8,0-9,6	8,9	596	am-az	0,4	200
Fenolftaleína	8,0-10,0	9,4	553	incolor -vm	1,0	600
Timolftaleína	9,4-10,6	10,0	598	incolor -az	2,0	1000
Amarelo de alizarina	10,0-12,0	—	—	am-lilás	—	—
Nitramina	11,0-13,0	—	—	incolor lar-acast.	—	—
Amarelo de titânio	12,0-13,0	—	—	am-ve	1,0	500

Nota: As constantes dos indicadores são dadas para meio aquoso

Soluções tampão

Uma **solução tampão** é uma solução que possui uma capacidade superior à água pura para resistir à alteração de pH por adição de ácido ou base. A **capacidade tamponante** da solução resulta da presença de um ácido fraco e da sua base conjugada ou da presença de uma base fraca e do seu ácido conjugado. Todas as células e fluidos extracelulares possuem pares conjugados ácido/base que funcionam como sistemas tampão garantindo a homeostasia do pH.

A capacidade tamponante de um ácido fraco e da sua base conjugada torna-se evidente quando se procede à curva de titulação do ácido (fig. 1). A dissociação de um ácido fraco HA na sua base conjugada A⁻ e em H⁺ vai ocorrendo progressivamente ao longo da titulação:



A constante de equilíbrio K_a para esta reacção é:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+] \times [\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Aplicando a função logaritmo a ambos os lados da equação e arranjando o resultado é possível derivar uma relação muito importante designada equação de Henderson – Hasselbalch:

$$\log K_a = \log \frac{[\text{H}^+] \times [\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

$$\log K_a = \log [\text{H}^+] + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

$$-\log [\text{H}^+] = -\log K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

substituindo $-\log [\text{H}^+]$ por pH e $-\log K_a$ por pK_a temos a equação de Henderson – Hasselbalch

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

O pK_a de um ácido é igual ao valor de pH para o qual $[\text{HA}] = [\text{A}^-]$, ou seja, o pH para o qual o ácido e a sua base conjugada estão presentes em concentrações iguais. No intervalo de pH igual a $pK_a - 1$ a $pK_a + 1$ o par conjugado confere capacidade tamponante à solução como ilustra a curva de titulação.

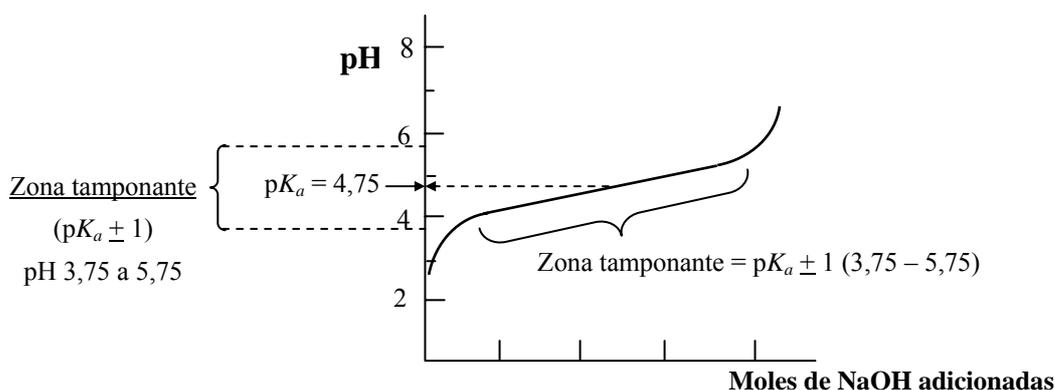


Figura 2 - Curva de titulação do ácido acético – CH₃COOH.

Efeito tamponante e preparação de uma solução tampão

Objectivos: construir a curva de titulação do ácido fraco H_2PO_4^- para observação do efeito tamponante do par conjugado $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$. Preparar uma solução tampão com um pH determinado.

1. Colocar num gobelé 30 mL da solução de NaH_2PO_4 0,1 M e uma barra magnética.
2. Medir o pH da solução colocando o gobelé sobre um agitador. Adicionar NaOH 0,2 M mL a mL e efectuar a leitura de pH após cada adição. Registar os valores de pH na tabela.
3. Construir um gráfico com os valores obtidos.
4. Indicar no gráfico o pK_a , a zona tamponante e onde se verificam as seguintes relações:



5. Utilizando as soluções de NaH_2PO_4 0,1 M e Na_2HPO_4 0,1 M, prepare 20 mL de três soluções tampão fosfato 0,1 M com os seguintes valores de pH: 6, 6,5 e 7,2 (uma por grupo). Recorra à tabela 3 e acerte depois para o pH desejado utilizando a solução adequada.

Tabela 3 - Preparação de tampão fosfato 0,1M.

Na H ₂ PO ₄ 0,1M (mL)	Na ₂ HPO ₄ 0,1M (mL)	pH
9,7	0,3	5,30
9,5	0,5	5,59
9,0	1,0	5,91
8,0	2,0	6,24
7,0	3,0	6,47
6,0	4,0	6,64
5,0	5,0	6,81
4,0	6,0	6,98
3,0	7,0	7,17
2,0	8,0	7,38
1,0	9,0	7,73
0,5	9,5	8,04

pH e soluções tampão – 7

TABLE 1.4 Some Conjugate Acid–Base Pairs of Importance in Biological Systems

<i>Proton Donor (Acid)</i>	\rightleftharpoons	<i>Proton Acceptor (Base)</i>
CH ₃ –CHOH–COOH (lactic acid)	\rightleftharpoons	H ⁺ + CH ₃ –CHOH–COO ⁻ (lactate)
CH ₃ –CO–COOH (pyruvic acid)	\rightleftharpoons	H ⁺ + CH ₃ –CO–COO ⁻ (pyruvate)
HOOC–CH ₂ –CH ₂ –COOH (succinic acid)	\rightleftharpoons	2H ⁺ + ⁻ OOC–CH ₂ –CH ₂ –COO ⁻ (succinate)
⁺ H ₃ NCH ₂ –COOH (glycine)	\rightleftharpoons	H ⁺ + ⁺ H ₃ N–CH ₂ –COO ⁻ (glycinate)
H ₃ PO ₄	\rightleftharpoons	H ⁺ + H ₂ PO ₄ ⁻
H ₂ PO ₄ ⁻	\rightleftharpoons	H ⁺ + HPO ₄ ²⁻
HPO ₄ ²⁻	\rightleftharpoons	H ⁺ + PO ₄ ³⁻
Glucose 6-PO ₃ H ⁻	\rightleftharpoons	H ⁺ + glucose 6-PO ₃ ²⁻
H ₂ CO ₃	\rightleftharpoons	H ⁺ + HCO ₃ ⁻
NH ₄ ⁺	\rightleftharpoons	H ⁺ + NH ₃
H ₂ O	\rightleftharpoons	H ⁺ + OH ⁻

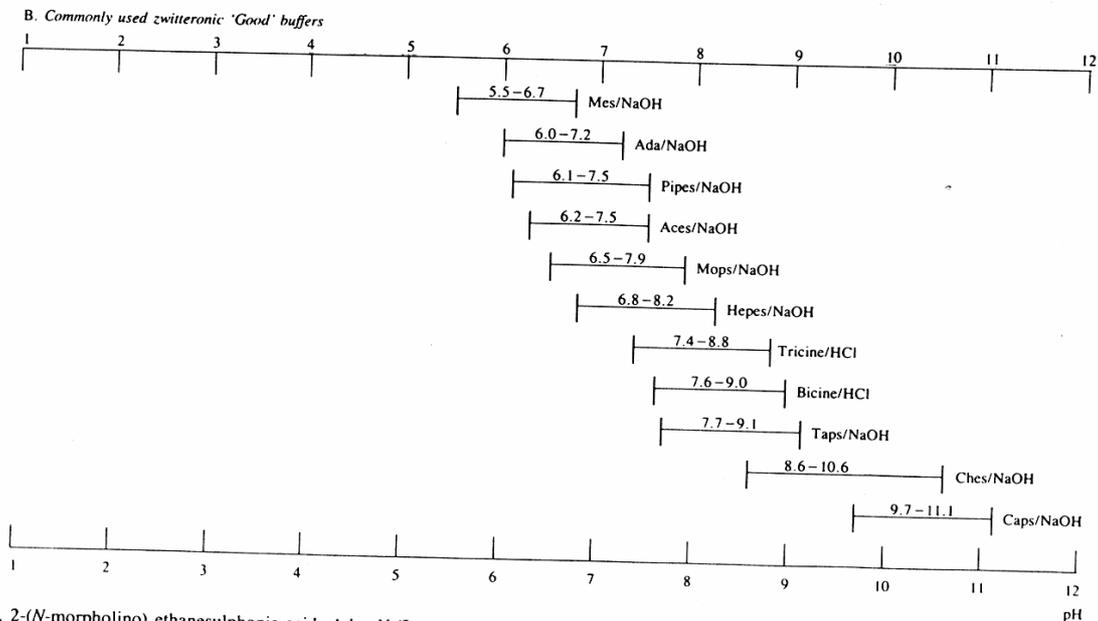
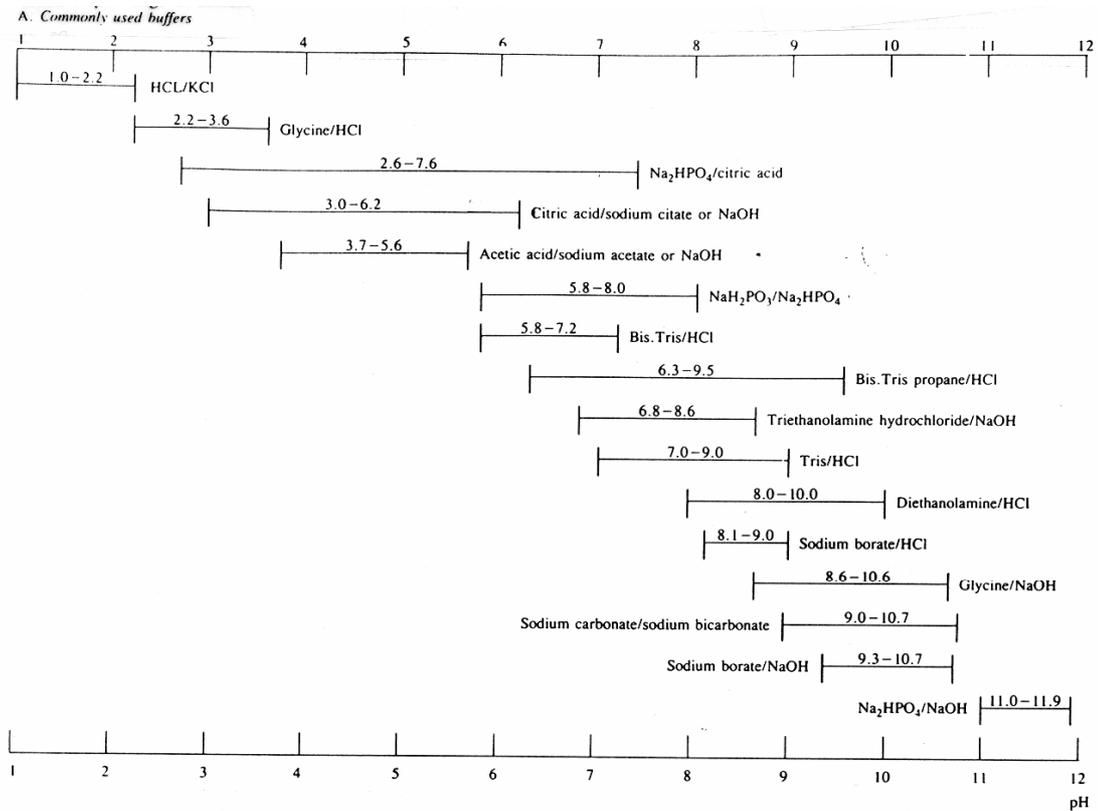
TABLE 1.5 Apparent Dissociation Constant and pK' of Some Compounds of Importance in Biochemistry

<i>Compound</i>		<i>K' eq (M)</i>	<i>pK'</i>
Acetic acid	(CH ₃ –COOH)	1.74 × 10 ⁻⁵	4.76
Alanine	(CH ₃ –CH–COOH)	4.57 × 10 ⁻³	2.34 (COOH)
	 NH ₃ ⁺	2.04 × 10 ⁻¹⁰	9.69 (NH ₃ ⁺)
Citric acid	(HOOC–CH ₂ –COH–CH ₂ –COOH)	8.12 × 10 ⁻⁴	3.09
	 COOH	1.77 × 10 ⁻⁵	3.74
		3.89 × 10 ⁻⁶	5.41
Glutamic acid	(HOOC–CH ₂ –CH ₂ –CH–COOH)	6.45 × 10 ⁻³	2.19 (COOH)
	 NH ₃ ⁺	5.62 × 10 ⁻⁵	4.25 (COOH)
		2.14 × 10 ⁻¹⁰	9.67 (NH ₃ ⁺)
Glycine	(CH ₂ –COOH)	4.57 × 10 ⁻⁵	2.34 (COOH)
	 NH ₃ ⁺	2.51 × 10 ⁻¹⁰	9.60 (NH ₃ ⁺)
Lactic acid	(CH ₃ –CHOH–COOH)	1.38 × 10 ⁻⁴	3.86
Pyruvic acid	(CH ₃ –CO–COOH)	3.16 × 10 ⁻³	2.50
Succinic acid	(HOOC–CH ₂ –CH ₂ –COOH)	6.46 × 10 ⁻⁵	4.19
		3.31 × 10 ⁻⁶	5.48
Glucose 6-PO ₃ H ⁻		7.76 × 10 ⁻⁷	6.11
H ₃ PO ₄		1 × 10 ⁻²	2.0
H ₂ PO ₄ ⁻		2.0 × 10 ⁻⁷	6.7
HPO ₄ ²⁻		3.4 × 10 ⁻¹³	12.5
H ₂ CO ₃		1.70 × 10 ⁻⁴	3.77
NH ₄ ⁺		5.62 × 10 ⁻¹⁰	9.25
H ₂ O		1 × 10 ⁻¹⁴	14.0

Devlin, T. M. (1997). Textbook of biochemistry with clinical correlations. 4th edition. Wiley-Liss. New York. USA.

pH e soluções tampão – 8

Alguns sistemas tampão e respectivas zonas tamponantes



Mes, 2-(*N*-morpholino) ethanesulphonic acid; Ada, *N*-(2-acetamido) iminodiacetic acid; Pipes, Piperazine-*NN'*-bis-2-ethanesulphonic acid; Aces, *N*-(2-acetamido)-2-aminoethanesulphonic acid; Mops, 3-(*N*-morpholino) propanesulphonic acid; Hepes, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulphonic acid; Tricine, *N*-Tris (hydroxymethyl) methylglycine; Bicine, *NN*-bis (2-hydroxyethyl) glycine; Taps, *N*-Tris (hydroxymethyl) methyl-3-aminopropanesulphonic acid; Ches, 2-(cyclohexylamino) ethanesulphonic acid; Caps, 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulphonic acid.

Harris e Angal (1989). Protein purification methods - a practical approach. IRL Press. Oxford. UK.

Useful pH Ranges of Selected Biological Buffers (25° C, 0.1 M)

	pH	6	7	8	9	10	11	Useful pH Range	pKa (at 20)	pKa (at 25)	pKa (at 37)
MES		5.5-6.7						5.5-6.7	6.16	6.10	5.97
BIS-TRIS		5.8-7.2						5.8-7.2	-	6.50	6.36
ADA		6.0-7.2						6.0-7.2	6.65	6.59	6.46
ACES		6.1-7.5						6.1-7.5	6.88	6.78	6.54
PIPES		6.1-7.5						6.1-7.5	6.80	6.76	6.66
MOPSO		6.2-7.6						6.2-7.6	-	6.90	6.75
BIS-TRIS PROPANE		6.3-9.5						6.3-9.5	-	6.8,9.0	-
BES		6.4-7.8						6.4-7.8	7.17	7.09	6.90
MOPS		6.5-7.9						6.5-7.9	7.28	7.20	7.02
TES		6.8-8.2						6.8-8.2	7.50	7.40	7.16
HEPES		6.8-8.2						6.8-8.2	7.55	7.48	7.31
DIPSO		7.0-8.2						7.0-8.2	-	7.60	7.35
MOBS		6.9-8.3						6.9-8.3	-	7.60	-
TAPSO		7.0-8.2						7.0-8.2	-	7.60	7.39
TRIZMA		7.0-9.0						7.0-9.0	8.20	8.06	7.72
HEPPSO		7.1-8.5						7.1-8.5	-	7.80	6.66
POPSO		7.2-8.5						7.2-8.5	-	7.80	7.63
TEA		7.3-8.3						7.3-8.3	-	7.80	-
EPPS		7.3-8.7						7.3-8.7	-	8.00	-
TRICINE		7.4-8.8						7.4-8.8	8.16	8.05	7.80
GLYCYLGLYCINE		7.5-8.9						7.5-8.9	-	8.20	-
BICINE		7.6-9.0						7.6-9.0	8.35	8.26	8.04
HEPBS		7.6-9.0						7.6-9.0	-	8.30	-
TAPS		7.7-9.1						7.7-9.1	8.49	8.40	8.18
AMPD		7.8-9.7						7.8-9.7	-	8.80	-
TABS		8.2-9.6						8.2-9.6	-	8.90	-
AMPSO		8.3-9.7						8.3-9.7	-	9.00	9.10
CHES		8.6-10.0						8.6-10.0	9.55	9.49	9.36
CAPSO		8.9-10.3						8.9-10.3	-	9.60	9.43
AMP		9.0-10.5						9.0-10.5	-	9.70	-
CAPS		9.7-11.1						9.7-11.1	10.56	10.40	10.02
CABS		10.0-11.4						10.0-11.4	-	10.70	-

Microscopia óptica - 1

Microscópio óptico de campo claro

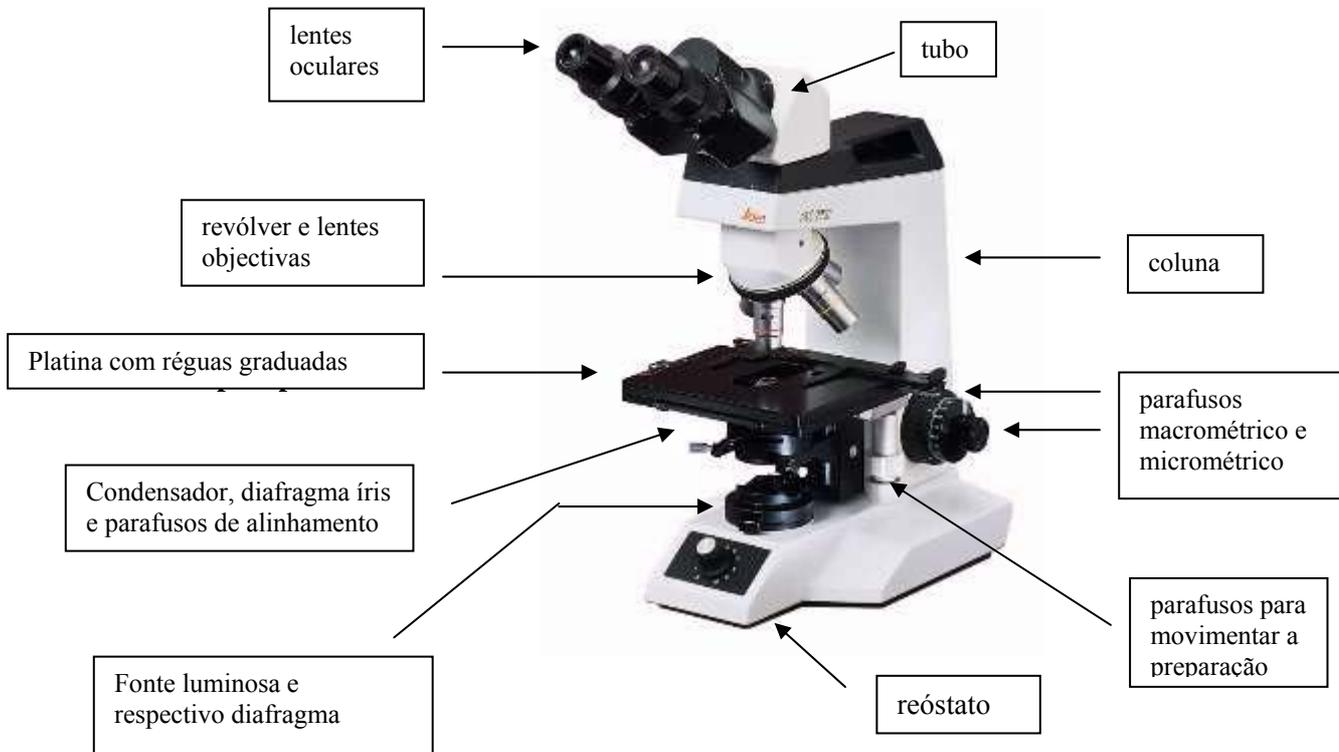


Figura 4 – Microscópio de campo claro utilizado nas aulas práticas.

Ampliação total do microscópio = ampliação da objectiva x ampliação da ocular

A qualidade final da imagem ampliada vai depender da **resolução** do microscópio, ou seja, da sua capacidade para distinguir pontos muito próximos. O **poder resolvente** de um microscópio depende das características do seu sistema de lentes. A menor distância entre dois pontos do objecto que permite que eles apareçam individualizados na imagem ampliada é designada por **limite de resolução**. O limite de resolução (d) é quantificado pela equação de Abbe:

$$d = k \frac{\lambda}{AN}$$

- λ comprimento de onda da luz incidente
- AN abertura numérica da objectiva ($AN = n \text{ sen } \alpha$)
- n índice de refração do meio entre o objecto e a objectiva
- $\text{sen } \alpha$ seno do semi ângulo de abertura da objectiva
- k = 0,61

Microscopia óptica-2

Algumas instruções para o manuseamento do microscópio

Focagem - ajuste da desigualdade de visão entre os dois olhos

Observe a preparação só com o olho esquerdo e foque com o parafuso micrométrico um ponto de referência localizado próximo do centro do campo de observação. Seguidamente observe só com o olho direito e foque o mesmo ponto na ocular direita. Assim obterá uma imagem focada para ambos os olhos.

Iluminação

Antes de iniciar a observação de uma preparação deverá sempre proceder à correcta iluminação do microscópio (ver iluminação de Köhler).

Mudança de objectiva:

Quando iniciar a observação de uma preparação deve começar sempre pela objectiva de menor ampliação e focar de seguida a imagem. Pode depois passar para objectivas de ampliação progressivamente maior procedendo à focagem para cada ampliação. Se necessitar usar a objectiva de imersão lembre-se que no final do trabalho terá sempre que limpar a objectiva e a preparação com um papel macio embebido em etanol.

Iluminação de Köhler

O sistema de iluminação do microscópio óptico a utilizar incluiu: fonte de iluminação, condensador e diafragma da fonte de iluminação; o condensador e o diafragma de íris do microscópio. Um microscópio iluminado pelo método de Köhler tem um campo de iluminação uniforme e apresenta a máxima resolução para o sistema de ampliação.

1. Colocar uma preparação na platina do microscópio
2. Ligar a luz e deslocar a preparação até observar o objecto com a objectiva de menor ampliação.
3. Focar o objecto utilizando os parafusos macrométrico e micrométrico.
4. Abrir completamente o diafragma do condensador e o diafragma da fonte de iluminação.
5. Olhar através da ocular e fechar devagar o diafragma da fonte de iluminação até o campo de observação ficar reduzido a cerca de metade.
6. Focar a margem do diafragma ajustando a posição do condensador.
7. Abrir novamente o diafragma da fonte de iluminação até todo o campo estar iluminado.

Observação de imagens de microscopia - 1

Observação de diferentes tipos de células ao microscópio óptico

- a) Observe cada tipo de material biológico ao microscópio óptico utilizando diferentes ampliações e proceda à medição das células utilizando o micrómetro.
- b) Faça um esquema legendado das células incluindo todos os detalhes que é possível observar e incluindo as dimensões calculadas.

Observação de células da **epiderme da cebola** no microscópio óptico de **campo claro** e de **contraste de fase**:

1. Colocar uma gota de água numa lâmina de vidro.
2. Destacar um pequeno pedaço da epiderme da cebola e colocar sobre a gota de água.
3. Cobrir com uma lamela e observar no microscópio óptico de campo claro.
4. Observar a mesma preparação no microscópio de contraste de fase e registar as diferenças relativamente ao tipo de informação que este dois tipos de microscópios podem fornecer .

Observação de células da **epiderme da cebola** no microscópio óptico de **fluorescência**:

1. Colocar uma gota de DAPI (5 µg / ml em tampão acetato 0,1 M pH 5,0) numa lâmina de vidro protegida com papel de alumínio para evitar exposição à luz.
2. Destacar um pequeno pedaço de epiderme da cebola e colocá-lo sobre a gota de DAPI.
3. Cobrir com lamela e de novo com papel de alumínio. Esperar 5 minutos.
4. Observar no microscópio de fluorescência.

Observação de células da planta aquática **Elodea** no microscópio óptico de campo claro e de fluorescência:

1. Colocar uma gota de água numa lâmina de vidro.
2. Destacar uma folha de *Elodea* e colocá-la sobre a gota de água.
3. Cobrir com uma lamela e observar no microscópio óptico de campo claro.
4. Observar os movimentos de ciclose do citoplasma que ocorrem nestas células, principalmente nas que se localizam junto à nervura. Aquecer a lâmina ligeiramente caso estes movimentos não sejam imediatamente evidentes.
5. Repetir a observação no microscópio óptico de fluorescência e registar o tipo de informação que este tipo de microscopia fornece relativamente ao microscópio óptico de campo claro.

Observação das **bactérias presentes nos iogurtes** comerciais:

1. Com um palito coloque um pequeno pedaço de iogurte comercial numa gota de água previamente colocada numa lâmina de vidro.
2. Mantendo a lâmina bem assente sobre a mesa, homogenize o material com outra lâmina, junte o material numa das extremidades da lâmina de baixo e faça um esfregaço fazendo deslizar a lâmina que tem na mão rapidamente sobre a lâmina de baixo, de forma a espalhar o iogurte numa camada muito fina.
3. Secar à chama de uma lamparina.
4. Colocar uma gota de azul de metileno sobre o esfregaço seco, cobrindo bem toda a lâmina e deixar actuar. Lavar o excesso de corante com água destilada.
5. Observar as bactérias do iogurte com a objectiva de imersão.

Observação de células da cianobactéria **Anabaena**:

1. Retirar uma gota do fundo do tubo da cultura e colocar sobre uma lâmina.
2. Cobrir com uma lamela e observar no microscópio óptico de campo claro.

Observação de imagens de microscopia – 2

Material biológico	Ampliação	Esquema	Medições
<i>Allium cepa</i>			
<i>Elodea</i>			
Fígado			

Observação de imagens de microscopia -3

Material biológico	Ampliação	Esquema	Medições
Cortiça			
Bactérias do iogurte			
<i>Anabaena</i> sp.			
<i>Bacillus subtilis</i>			

Observação de imagens de microscopia - 4

Observação de imagens de Microscopia Electrónica de Transmissão

Identifique as estruturas que é possível observar em cada imagem:

Célula procariótica:

Célula animal:

Célula vegetal:

ESPECTROFOTOMETRIA

A espectrofotometria estuda as interações entre a energia radiante e a matéria, incidindo tanto nos aspectos qualitativos como nos quantitativos. Ou seja, a espectrofotometria permite tirar conclusões sobre a natureza e composição de uma amostra desconhecida e permite, por outro lado, determinar a concentração de uma substância conhecida.

Todas as substâncias absorvem energia radiante, isto é, radiações electromagnéticas, desde as ondas de rádio até às radiações gama (Fig. 6), numa certa extensão. Mesmo materiais que são considerados transparentes para a vista têm espectro de absorção no ultravioleta ou no infravermelho - por exemplo o vidro e a água respectivamente.

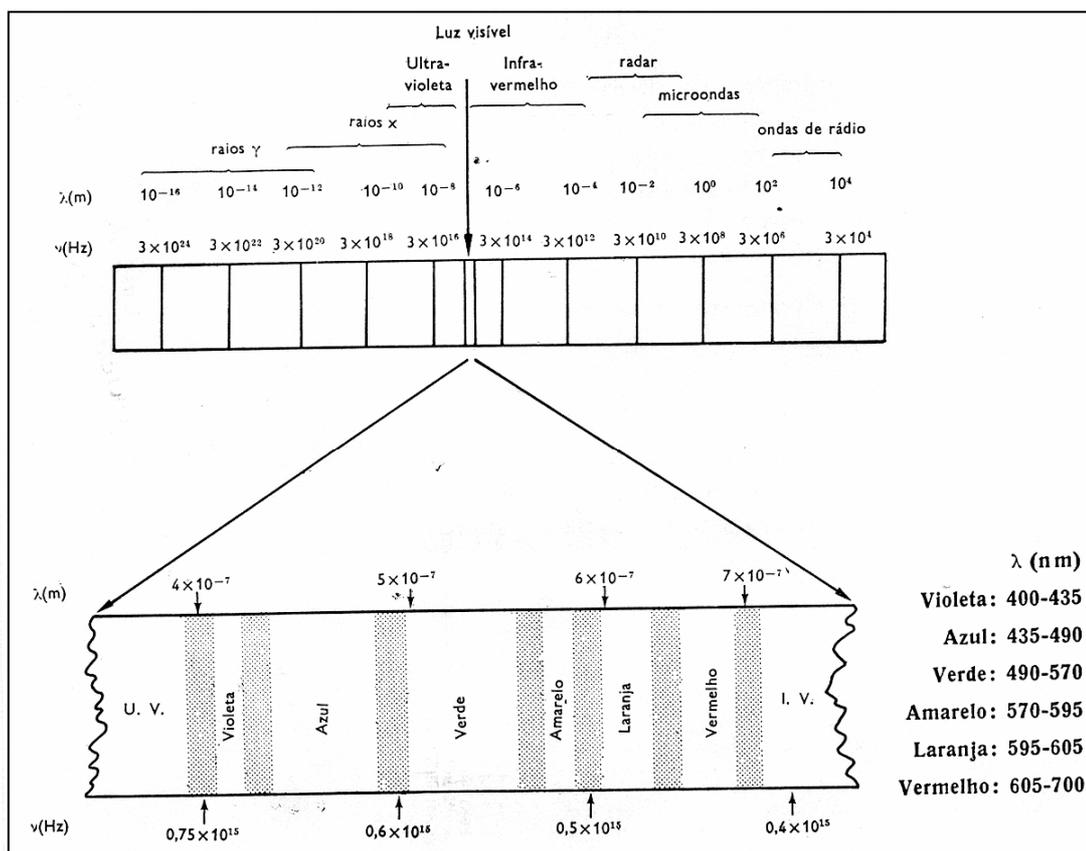


Figura 6 – O espectro electromagnético.

A absorção de energia por uma molécula apenas pode ocorrer quando a energia do fóton incidente é igual à diferença de energia entre dois níveis electrónicos, promovendo assim a transição de um electrão de um nível de energia baixo para um mais elevado. Antes que um outro fóton possa ser absorvido, o estado excitado deve perder esta energia e reverter ao estado de energia inicial.

Espectrofotometria – 2

Um **espectrofotómetro** é um aparelho concebido para medir a quantidade de energia radiante absorvida por moléculas em solução.

Os componentes básicos de um espectrofotómetro são (Fig. 7):

- i) uma fonte de luz policromática, normalmente de tungsténio, para comprimentos de onda entre 350-900 nm, ou de deutério para a região dos UV (200-400 nm).
- ii) um prisma que decompõe a luz e um filtro óptico que permite seleccionar os comprimentos de onda desejados.
- iii) um compartimento para alojar a amostra.
- iv) um detector, normalmente um tubo fotoeléctrico ou um díodo de silicone, que mede a intensidade de luz transmitida pela amostra.

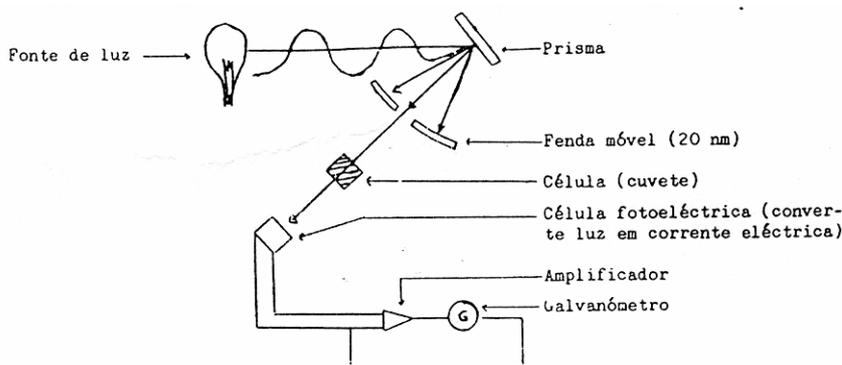
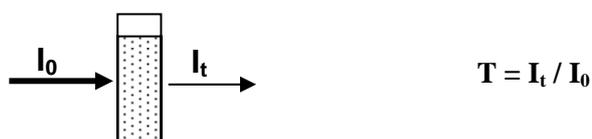


Figura 7 – Esquema do trajecto de luz num espectrofotómetro.

A razão entre a intensidade de luz transmitida depois de atravessar uma solução colocada no aparelho - I_t - e a intensidade de luz na ausência de amostra - I_0 chama-se **transmitância (T)**:



Ao \log_{10} da razão inversa de **T** chama-se **absorvância - A**:

$$A = \log_{10} (I_0 / I_t) = -\log_{10} T$$

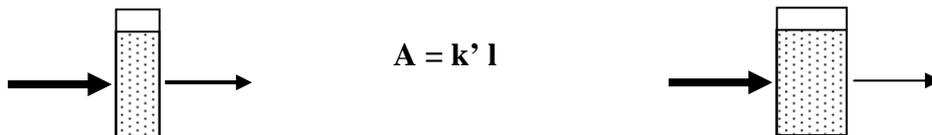
A transmitância pode ter um valor entre 0 e 1 e é frequentemente multiplicada por 100 sendo assim indicada como uma percentagem . A absorvância traduz a quantidade de luz absorvida pela substância em solução.

Espectrofotometria - 3

Leis da Absorção

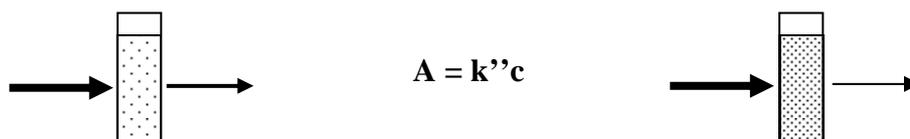
Lei de Lambert

Para uma **concentração baixa** de soluto e para qualquer comprimento de onda de luz considerado, a absorvância da solução é directamente proporcional à espessura do compartimento que contém a solução – trajecto óptico da luz na amostra = l (expresso em cm).



Lei de Beer

Para uma **concentração baixa** de soluto e para qualquer comprimento de onda de luz considerado, a absorvância da solução é directamente proporcional à concentração do soluto = c .



Lei de Lambert - Beer

Combinando as duas leis, a equação fundamental para a absorção da luz passa a ser:

$$A = k l c$$

Em que a constante de proporcionalidade k constitui o chamado **coeficiente de extinção** e é por isso representada por E :

$$A = E l c$$

A – absorvância - não tem unidades pois é uma razão entre valores diferentes do mesmo parâmetro (intensidade luminosa).

l – trajecto óptico da luz - é representado em cm, corresponde à largura da cuvete utilizada para a medição de absorvância que é sempre igual a 1cm .

E – coeficiente de extinção - as suas unidades terão que ser o recíproco da concentração e o recíproco do comprimento:

- se a concentração for expressa em $g L^{-1}$, E vem expresso em $L g^{-1} cm^{-1}$.

- se a concentração for expressa em molaridade ($mol L^{-1}$) o coeficiente de extinção é representado por ϵ e designa-se **coeficiente de extinção molar**. ϵ virá expresso em $L mol^{-1} cm^{-1}$.

Espectrofotometria – 4

O **coeficiente de extinção** é uma constante característica de cada espécie química dissolvida num determinado solvente e depende do comprimento de onda da radiação incidente e da temperatura. O coeficiente de extinção mais vulgarmente utilizado é o **coeficiente de extinção molar** - ϵ . Neste caso a lei de Lambert-Beer corresponde a :

$$A = \epsilon l c$$

Olhando para esta expressão pode verificar-se que o coeficiente de extinção molar de uma substância, para um determinado λ , corresponde à absorvância de uma solução com a concentração 1M: $l = 1\text{cm}$, $c = 1\text{M}$ então $A = \epsilon \times 1 \times 1$ ou seja $A = \epsilon$

O **coeficiente de extinção molar** pode ser consultado em tabelas para inúmeras substâncias e assim, a partir da absorvância de soluções de concentração desconhecida, pode-se determinar facilmente a respectiva concentração utilizando a lei de Lambert-Beer.

Em determinadas situações não é conveniente a expressão da concentração em molaridade e não é possível recorrer a um ϵ pre determinado:

- para moléculas poliméricas de tamanho variável ou de peso molecular indefinido - caso de cadeias de DNA ou de polissacarídeos
- quando se deseja determinar a concentração, não de uma espécie química, mas de uma classe de compostos (por exemplo todos os lípidos presentes numa amostra)
- quando se pretende medir uma concentração indirectamente através de uma reacção colorimétrica

Nestes casos, a constante de proporcionalidade **k** tem que ser determinada para cada situação. É necessário construir a recta que representa a lei de Lambert-Beer a partir dos valores de absorvância obtidos para soluções preparadas no laboratório com concentrações conhecidas da substância em estudo. Esta recta é designada **recta padrão** e a sua equação corresponde à lei de Lambert Beer para essa situação. O declive da recta corresponde obviamente à constante de proporcionalidade **k**.

Para construir uma recta padrão são, portanto, necessárias soluções com concentrações conhecidas - normalmente designadas **soluções padrão**, e é necessário obter os respectivos valores de absorvância. Estes valores são colocados num gráfico no qual o eixo das abcissas representa a concentração - *variável independente* - e o eixo das ordenadas a absorvância - *variável dependente*. Desenha-se então a melhor recta que traduz a nuvem de pontos tomando como ponto fixo a origem das coordenadas (fig. 8). Alternativamente pode determinar-se a equação da melhor recta representada pelo conjunto de pontos através dum método estatístico de regressão linear.

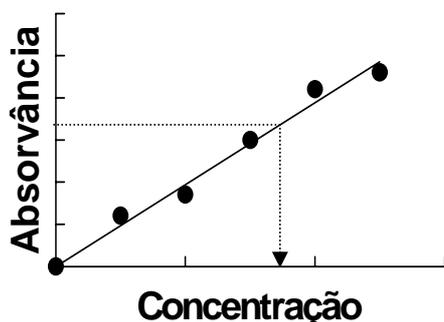


Figura 8 – Recta padrão para o doseamento de uma substância de concentração desconhecida. Após ler o valor de absorvância da solução de concentração desconhecida, pode ler-se na recta a concentração respectiva.

Aplicações da espectrofotometria

As aplicações da espectrofotometria podem ser divididas em duas categorias:

a) medição da absorvância a um determinado comprimento de onda.

Exemplo: utilização do coeficiente de extinção molar ou construção de uma recta padrão para a determinação da concentração de um determinado composto em solução.

b) medição da variação da absorvância num intervalo de comprimentos de onda.

Exemplo: obtenção de um espectro de absorção para identificação de biomoléculas.

O espectro de absorção de um composto é obtido medindo a absorvância a vários comprimentos de onda e registando a absorvância em função do comprimento de onda (ver Fig. 5).

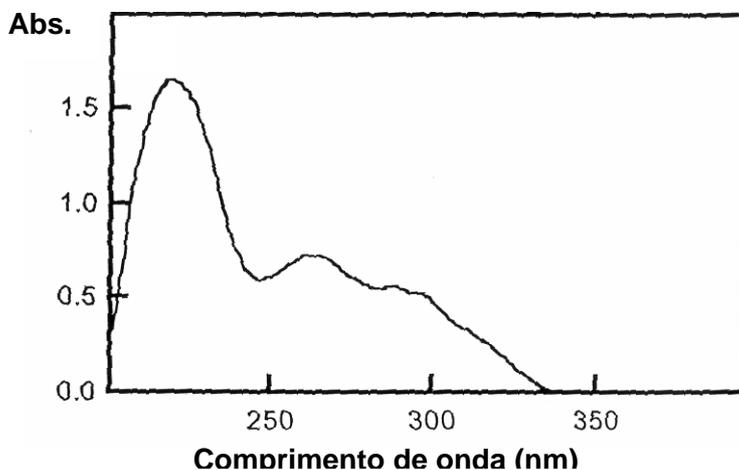


Figura 9 - Espectro de absorção do alcalóide anidrovinblastina

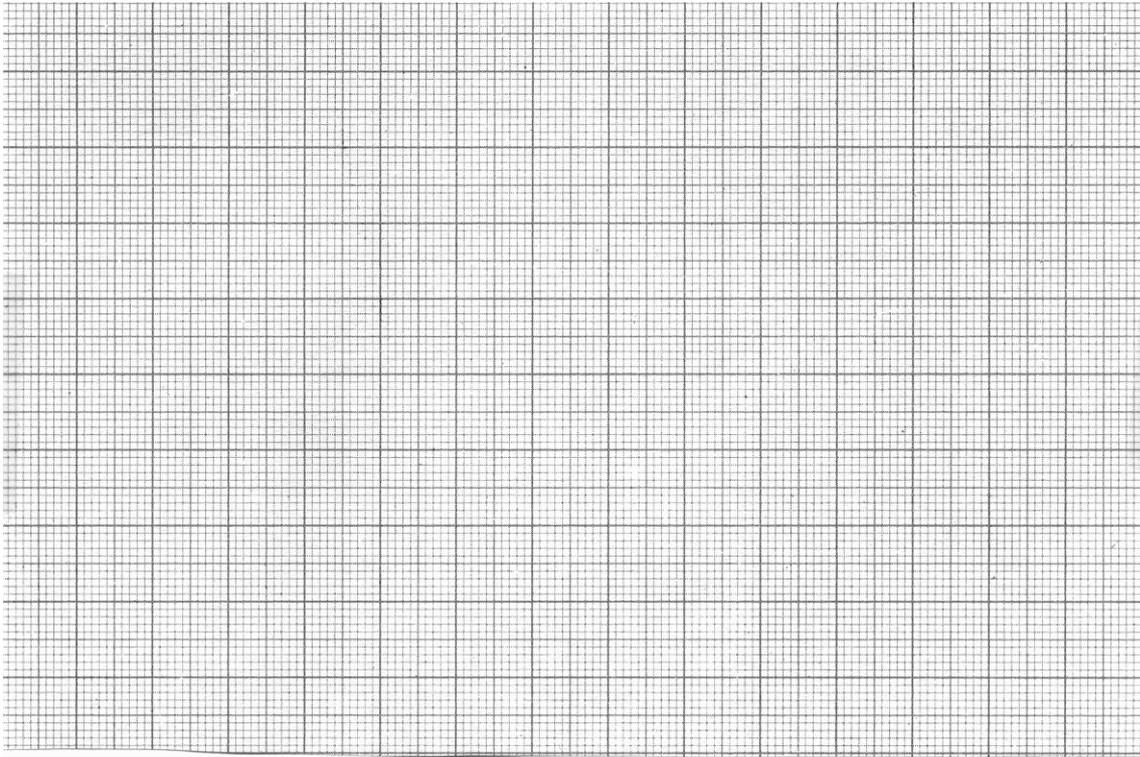


Figura 10

Espectrofotometria - 7**B. Curvas-padrão e a relação entre absorvância e concentração**

- 1 - Prepare uma série de diluições a partir da solução de azul de metileno a 0,005 mg/mL, como esquematizado na tabela I.
- 2 - Regule o espectrofotômetro para o comprimento de onda de máxima absorção do azul de metileno.
- 3 - Registe a absorvância para cada um dos 6 tubos.
- 4 - Calcule a concentração de azul de metileno em cada tubo em mg/mL.
- 5 - Exprima graficamente a **Abs.** em função da concentração (*lembre-se que a variável independente é sempre colocada em abcissas e a variável dependente em ordenadas*). Trace a recta que melhor representa o conjunto de pontos, fazendo-a passar pelo ponto zero/zero.
- 6 - Registe a absorvância de uma solução com concentração desconhecida de azul de metileno.
- 7 - Calcule a concentração de azul de metileno da solução desconhecida, recorrendo ao gráfico anteriormente construído.

Tabela 6 – Preparação de seis tubos com diferentes diluições de azul de metileno.

Tubo	Azul metileno 5 µg/mL (mL)	Sol. conc. descon. (mL)	Água (mL)
1	0	---	4
2	1	---	3
3	2	---	2
4	3	---	1
5	4	---	0
6	---	3	0

Calcule a concentração de azul de metileno nos tubos 1 a 6 e preencha a tabela 7 com esses valores.

Espectrofotometria - 8

Tabela 7 – Valores de concentração das diferentes diluições de azul de metileno representadas na tabela 6 e respectivos valores de absorvância lidos ao espectrofotómetro.

Tubo	Concentração (mg/mL)	Abs ($\lambda =$ nm)
1	0,000	
2		
3		
4		
5	0,005	
6		

C. Determinação de coeficientes de extinção do azul de metileno

- 1 - Determine o coeficiente de extinção a partir do gráfico $A = f(c)$, determinando o declive da recta ($E_{\text{mg/mL}} = y_2 - y_1 / x_2 - x_1$).
- 2 - Calcule a concentração expressa em molaridade para cada uma das diluições efectuadas anteriormente - tubos 1 a 5. (Azul de metileno - 319, 86 g/mole).
- 3 - Coloque no eixo das abcissas do gráfico $A = f(c)$ os valores da concentração expressos em molaridade.
- 4 - Determine o coeficiente de extinção molar a partir do gráfico $A = f(c)$, determinando o declive da recta ($\epsilon = y_2 - y_1 / x_2 - x_1$). Em alternativa, calcule a equação da recta $A = f(c)$ por regressão linear (pp 44-47).

Cálculos:

Espectrofotometria – 9

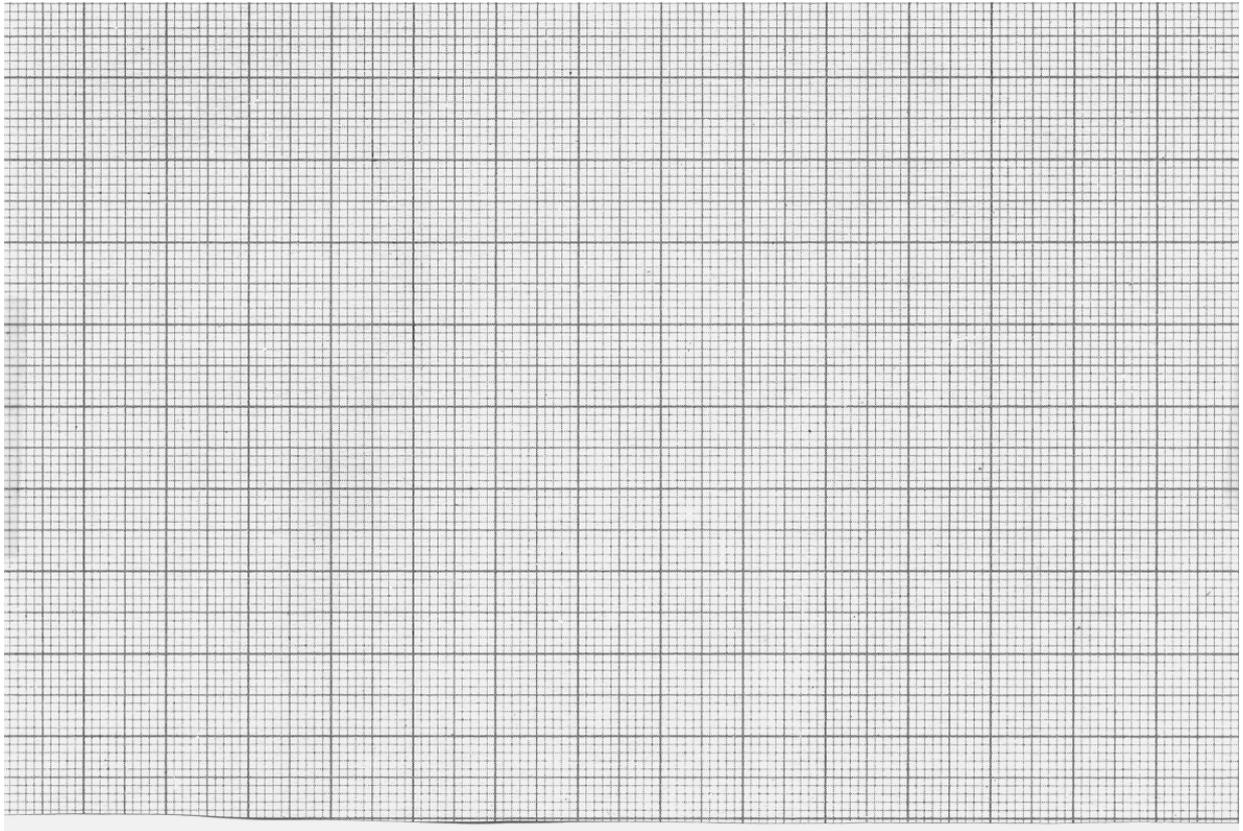


Figura 11

Regressão linear - 2

Após a determinação da melhor recta que passa por um conjunto de pontos experimentais pelo método dos mínimos quadrados, é importante saber-se em que medida estes pontos têm ou não alguma probabilidade de seguirem uma relação linear.

Tal estudo pode fazer-se através da determinação do coeficiente de correlação (r):

$$r = \frac{m\sigma_x}{\sigma_y}$$

σ - desvio padrão dos valores experimentais (x,y) em torno dos seus valores médios. Para o seu cálculo podemos utilizar a expressão que nos fornece o valor da variância (σ^2) destes mesmos dados:

$$\sigma^2_x = \frac{\sum x_i^2}{n} - \bar{x}^2$$

e

$$\sigma^2_y = \frac{\sum y_i^2}{n} - \bar{y}^2$$

n – número de pontos experimentais, incluindo o ponto (0,0)

\bar{x} - valor médio dos valores de x (incluir também o ponto (0,0))

\bar{y} - valor médio dos valores de y (incluir também o ponto (0,0))

O coeficiente de correlação pode tomar valores entre +1 e -1. Quando $|r| = 1$ isso exprime a existência de uma função linear entre as duas variáveis em causa; quando $|r| = 0$ isto significa que as duas variáveis são independentes.

Uma vez determinado o valor de r , para saber se os pontos experimentais têm uma probabilidade superior ou inferior a 95% de estarem em linha recta, deve comparar-se o valor de r determinado experimentalmente pela expressão acima com o valor teórico tabelado para a probabilidade de 95% e para um número de graus de liberdade $N = n-1$. Se o valor experimental for superior ao valor teórico tabelado, pode afirmar-se que os pontos têm uma probabilidade maior que 95% de seguirem uma relação linear. Caso o valor de r experimental for inferior ao valor teórico tabelado, os pontos experimentais terão uma probabilidade inferior a 95% de seguirem tal relação (Tabela 8). O valor 95% representa um limite de confiança que determinamos ser suficiente para cada caso experimental – figura 13.

Regressão linear – 3

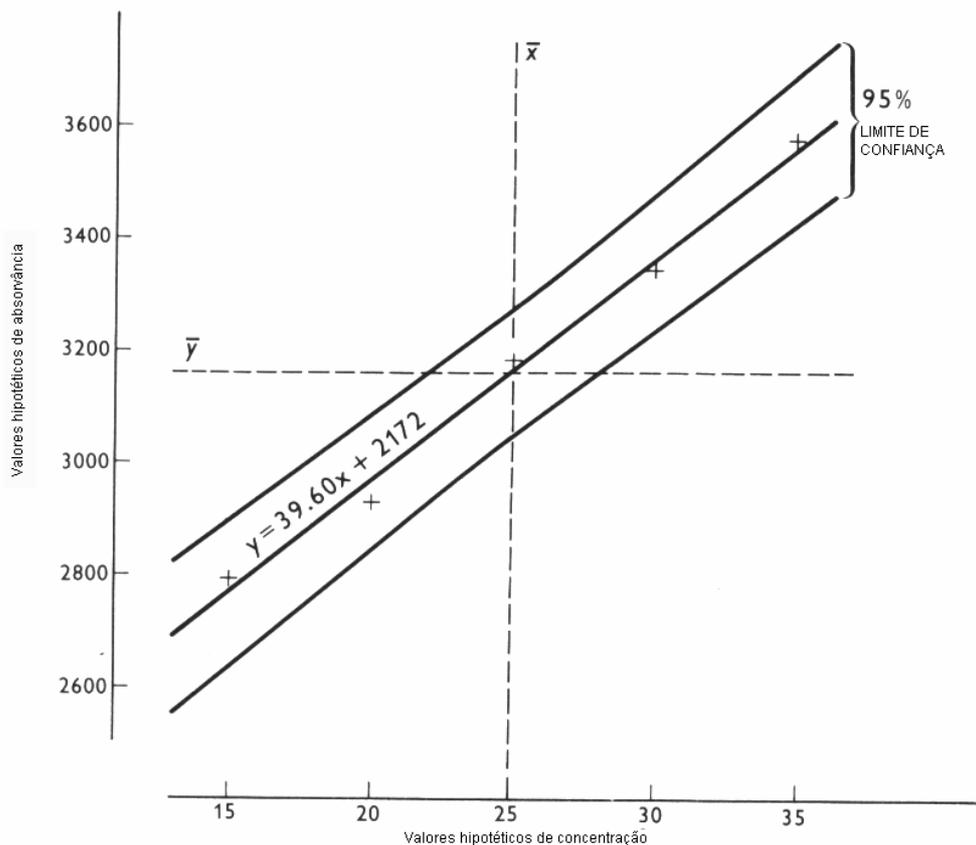


Figura 13 – Recta obtida por regressão linear a partir de um conjunto de pontos experimentais e que traduz a relação de proporcionalidade directa entre absorvância e concentração. A figura mostra ainda a representação gráfica de um limite de confiança de 95%.

Tabela 8 – Coeficientes de correlação teóricos entre duas variáveis, expressos em módulo, para 95 % de probabilidade e um dado nº de graus de liberdade.

N	Módulo do coeficiente de correlação	N	Módulo do coeficiente de correlação
1	0,997	16	0,468
2	0,950	17	0,456
3	0,878	18	0,444
4	0,811	19	0,433
5	0,754	20	0,423
6	0,707	21	0,413
7	0,666	22	0,404
8	0,632	23	0,396
9	0,602	24	0,388
10	0,576	25	0,381
11	0,553	26	0,374
12	0,532	27	0,367
13	0,514	28	0,361
14	0,497	29	0,355
15	0,482	30	0,349

Regressão linear - 4

Para facilitar os cálculos dos diferentes parâmetros deve-se começar por calcular cada uma das variáveis intervenientes nas diferentes fórmulas:

Tabela 9 – Valores de concentração e absorvância, e expressões parciais, a utilizar para efectuar regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

Valores experimentais		Parâmetros necessários ao cálculo de <i>m</i> , <i>b</i> , e coeficiente de correlação
x (Conc.)	y (Absrv.)	$\bar{x} =$
0	0	$\bar{x}^2 =$
		$\bar{y} =$
		$\bar{y}^2 =$
		$\sum y_i =$
		$\sum x_i =$
		$\sum x_i \sum y_i =$
		$(\sum x_i)^2 =$
		$\sum x_i^2 =$
		$\sum (x_i y_i) =$

Cálculo de:

a) $m =$

b) $b =$

c) Equação da recta:

d) $|r| =$

e) Valor teórico de r , com limite de confiança de 95% =

f) Comparação entre r experimental e r teórico:

Conclusão:

Electroforese e ponto isoeléctrico de proteínas

Ponto isoeléctrico de uma proteína (pI) – valor de pH para o qual a carga global da proteína é neutra e que, conseqüentemente, não permite que proteína se mova num campo eléctrico.

Objectivo: Separar electroforéticamente proteínas de acordo com a sua carga. Determinar o pI ou intervalo em que se situa o pI das proteínas em estudo – citocromo c, mioglobina e albumina sérica.

Montagem do gel e electroforese

*Cada um dos grupos prepara um gel com um tampão diferente, a pH diferente: **Grupo 1** – tampão Acetato (pH=4,0); **Grupo 2** - tampão Tris (pH=7,2); **Grupo 3** – tampão Tris-Glicina (pH=9,2)*

- 1- Fechar as extremidades do suporte do gel e inserir o pente, **no centro do tabuleiro**, para definir os poços.
- 2- Preparar 25 mL de agarose 1,2% (p/v) em tampão acetato (pH=4,0) **ou** tampão Tris (pH=7,2) **ou** Tampão Tris-Glicina (pH=9.2) num matraz de 200 mL. Dissolver a agarose em banho de água a ferver ou no micro-ondas e arrefecer para cerca de 50°C (**Cuidado:** a agarose muito quente deforma o suporte do gel).
- 3- Verter a agarose no suporte do gel e esperar que solidifique (~20 min.).
- 4- Retirar os suportes laterais e o pente.
- 5- Encher a tina com o **tampão correspondente ao gel**, até cobrir bem a superfície do gel.
- 6- Preparar as amostras de proteína como descrito no final do protocolo. Carregar **15 µL** de cada amostra pela seguinte ordem, da esquerda para a direita, tendo o ânodo (polo positivo) em cima: citocromo c, mioglobina, albumina sérica.
- 7- Fechar a câmara de electroforese e ligar os cabos a uma fonte de alimentação eléctrica, de modo a que o cátodo da câmara fique ligado ao cátodo da fonte (preto-preto), assim como os ânodos (vermelho-vermelho).
- 8- Ligar a fonte de alimentação, regular a voltagem para 60 V e deixar correr cerca de 30 minutos.
- 9- Medir a distância percorrida por cada uma das proteínas a partir do poço na direcção do cátodo ou do ânodo. Registrar os resultados na tabela 1 e esquematizar na figura 1 as posições finais de cada uma das proteínas em cada gel.
- 10- Registrar a carga de cada proteína para cada pH na tabela 2.
- 11- Estimar o pI, ou o intervalo em que se situa o pI, de cada uma das proteínas em estudo com base nos resultados obtidos. Comparar os pIs estimados com os valores da Tabela 3.

Ponto isoelétrico - 2

Resultados:

Tabela 1 -

Proteína	Distância percorrida pH 4,0		Distância percorrida pH 7,2		Distância percorrida pH 9,2	
	cátodo	ânodo	cátodo	ânodo	cátodo	ânodo
Citocromo <i>c</i>						
Mioglobina						
Albumina sérica						

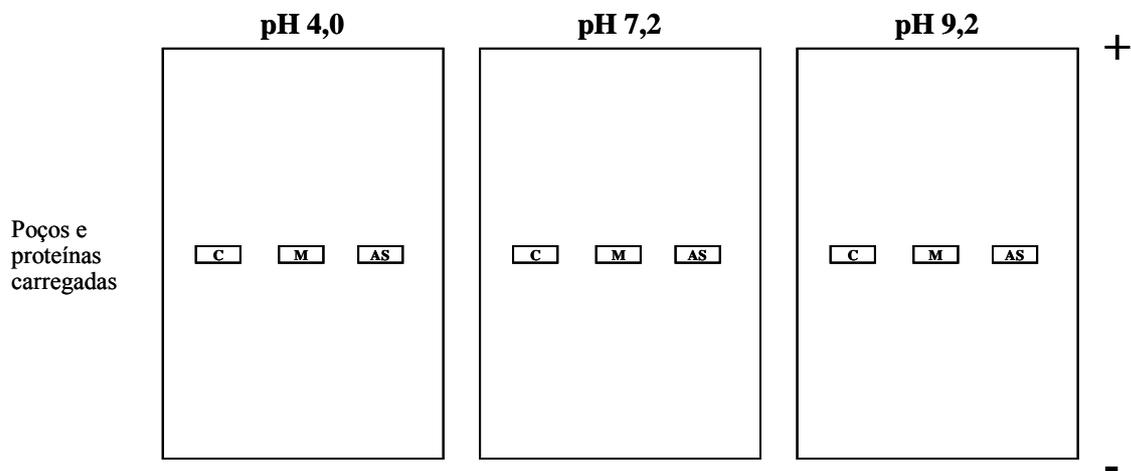


Figura 1 -

Tabela 2 -

Proteína	Carga		
	pH 4,0	pH 7,2	pH 9,2
Citocromo <i>c</i>			
Mioglobina			
Albumina sérica			

pI ou intervalo em que se situa o pI:

citocromo *c* _____ mioglobina _____ albumina sérica _____

Ponto isoelétrico - 3**Soluções tampão:**

Tampão Acetato pH 4,0: adicionar 25,6 ml de ácido acético glacial a cerca de 500 mL de água destilada, adicionar 13,6 g de acetato de sódio (anidro), ajustar o pH para 4,0 e acertar o volume final para 1 Litro.

Tampão Tris 50 mM pH 7,2: misturar 250 mL de Tris 0,2 M com 221 mL de HCl 0,2 M, ajustar o pH para 7,2 e acertar o volume final para 1 Litro.

Tampão Tris-Glicina pH 9,2: disso 140 g de Tris e 15 gramas de glicina em cerca de 500 mL de água destilada, ajustar o pH para 9,2 e acertar o volume final para 1 Litro.

Soluções de proteínas:

Citocromo c: preparar uma solução com concentração de 5 mg/mL em água destilada. Para carregar no gel, misturar previamente, num tubo Eppendorf, 45 µL da solução de proteína com 5 µL de glicerol.

Mioglobina: preparar uma solução com concentração de 5 mg/mL em água destilada. Para carregar no gel, misturar previamente, num tubo Eppendorf, 45 µL da solução de proteína com 5 µL de glicerol.

Albumina sérica: preparar uma solução com concentração de 7 mg/mL em água destilada. Para carregar no gel, misturar previamente, num tubo Eppendorf, 35 µL da solução de proteína com 5 µL de glicerol e com 10 µL de uma solução saturada de azul de bromofenol.

Características das proteínas em estudo:

Citocromo c – Está presente em tecidos animais e vegetais e faz parte da cadeia transportadora de electrões das mitocôndrias. O citocromo c consiste numa única cadeia polipéptidica enrolada em volta de um grupo heme. O Fe presente neste grupo heme é o responsável pela cor laranja/acastanhada da proteína. *In vivo*, a proteína é básica devido à presença de uma grande quantidade de resíduos de lisina.

Mioglobina – A mioglobina é a responsável pelo armazenamento de oxigénio nas células musculares. Tem uma cor vermelha/acastanhada devido à presença de um grupo heme cujo Fe tem a capacidade de ligar oxigénio.

Albumina sérica – É a proteína predominante no plasma sanguíneo, ligando-se e transportando um grande número de pequenas moléculas no sangue. Não tem cor, mas pode ser corada com azul de bromofenol. É uma proteína relativamente acídica.

Tabela 3 -Pontos isoelétricos de algumas proteínas

Proteína	pI
Pepsina	~1,0
Albumina do ovo	4,6
Albumina sérica	4,9
Urease	5,0
β-lactoglobulina	5,2
Hemoglobina	6,8
Mioglobina	7,0
Quimotripsina	9,5
Citocromo c	10,7
Lisozima	11,0

Adaptado de Nelson & Cox (2000)

Reacção em cadeia da polimerase

A reacção em cadeia da polimerase (PCR do inglês *polymerase chain reaction*) permite uma amplificação de biliões de vezes de uma porção específica de DNA a partir de um genoma inteiro, permitindo como que “purificar” essa sequência de DNA do resto do genoma. Para poder efectuar esta reacção é necessário, no mínimo, conhecer uma pequena parte da sequência nas extremidades do fragmento a amplificar. Sintetizam-se por métodos químicos dois oligonucleotídeos complementares dessas extremidades (iniciadores ou “primers”) que são utilizados para iniciar a duplicação do DNA do genoma depois de este ser desnaturado em cadeias simples através de aquecimento. A duplicação é catalisada *in vitro* por uma DNA polimerase resistente ao calor e purificada a partir da bactéria *Thermus aquaticus* (Taq polimerase). Ciclos consecutivos de 1) aquecimento do DNA para separação das 2 cadeias (desnaturação), 2) descida da temperatura para permitir o emparelhamento do iniciadores (emparelhamento), e 3) subida da temperatura para um valor intermédio óptimo para a Taq polimerase catalisar a duplicação do DNA entre os dois iniciadores, vão permitir a amplificação geométrica da sequência alvo definida pelos 2 iniciadores.

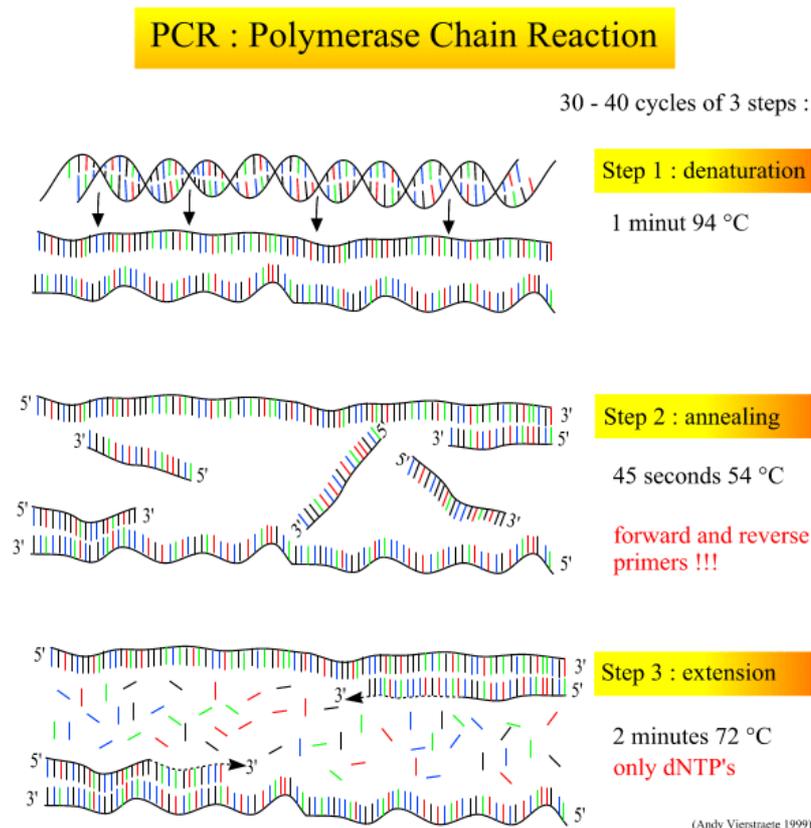


Figura 14 - Esquema representado um ciclo de PCR.

Purificação de DNA de folha de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

Objectivo: Purificar DNA da planta *C. roseus* para utilizar como molde para uma reacção em cadeia da polimerase (PCR do inglês *polymerase chain reaction*) com o objectivo de pesquisar a presença de intrões no gene de uma peroxidase vegetal (Crprx1) envolvida na biossíntese de alcalóides anticancerígenos das folhas de *C. roseus*. O método utilizado é uma adaptação do método publicado no seguinte artigo: Edwards K, Johnstone C, Thompson C 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19: 1347

- 1 – Destacar um disco foliar com o interior da tampa de um tubo de microcentrífuga esterilizado .
- 2 – Macerar o material vegetal no interior do tubo com uma barra de vidro pontiaguda esterilizada.
- 3 – Adicionar imediatamente 400 µL de *tampão de extracção* e misturar com o vortex durante 5 seg.
- 4 – Centrifugar os extractos a 13000 rpm durante 1 min.
- 5 – Transferir 300 µL do sobrenadante para um tubo de microcentrífuga novo.
- 6 – Adicionar 300 µL de isopropanol e deixar à temperatura ambiente durante 2 min.
- 7 – Centrifugar os extractos a 13000 rpm durante 1 min.
- 8 – Remover o sobrenadante e secar o sedimento de DNA ao ar.
- 9 – Ressuspender o sedimento seco em 100 µL de água esterilizada ou TE.

Quantificação do DNA

- 1 - Diluir as amostras 1/500 em água.
- 2 - Medir a absorvância a 260nm num espectrofotómetro de ultravioletas. Usar água como branco.

$$E_{260\text{nm}}\text{DNA} = 0,02 \mu\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ mL}$$

Tampão de Extracção

200 mM Tris-HCl pH 7,5
250 mM de NaCl
25 mM EDTA
0,5% SDS

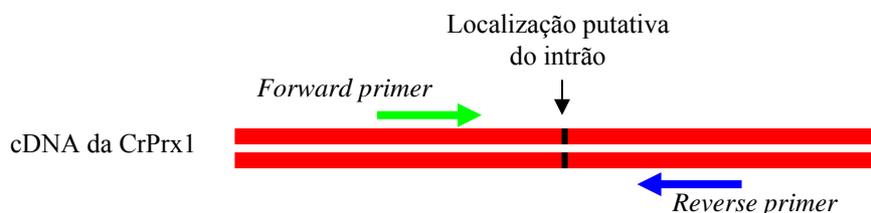
TE

10 mM Tris-HCl pH 7,4
1 mM EDTA

DNA - 3

Amplificação de uma região específica do gene da peroxidase 1 de *Catharanthus roseus*

Objectivo: Amplificar uma zona do gene da peroxidase 1 de *C. roseus* (CrPrx1) onde o alinhamento deste gene com o gene homólogo de Arabidopsis sugere que existe um intrão.



Procedimento experimental

Atenção: usar soluções e material esterilizado, luvas, e trabalhar com os tubos em gelo.

1 - Pipetar para um tubo Eppendorf as seguintes soluções:

- 2 µL de DNA (0.1-10 ng)
- 2 µL de *Primer 1*
- 2 µL de *Primer 2*
- 14 µL de **Mistura de reacção ***

Total = 20 µL

– após pipetar todos os componentes **agitar** de forma a homogeneizar bem a mistura

2 - Colocar os tubos no termociclador e seleccionar o programa:

- 35-40 ciclos: {
- 94°C 0,5 min - **desnaturação**
 - 55°C 0,5 min - **emparelhamento**
 - 72°C 1 min - **extensão**
- Extensão final: 72°C 7 min, 4°C ∞

3 - Observe os resultados correndo o(s) produto(s) de reacção em gel de agarose (pág. 54 e 55).

*** Mistura de reacção:**

Soluções	1 reacção	___ reacções (complete)
Tampão PCR 10x	2.0 µl	
dNTPs 10 mM	0.4 µl	
H ₂ O	11.5 µl	
Taq polimerase	0.1 µl	

– após pipetar todos os componentes agitar de forma a homogeneizar bem a mistura

Análise de DNA por meio de enzimas de restrição

Nesta experiência, o DNA de bacteriófago Lambda (48502 pares de bases - **bp** - de comprimento) é cortado com enzimas de restrição e os fragmentos resultantes são separados por electroforese em gel de agarose. Duas amostras de DNA de Lambda são incubadas a 37°C, cada uma delas com uma das seguintes endonucleases de restrição: *EcoRI* ou *HindIII*. Uma terceira amostra, que constitui o controlo negativo, é incubada sem endonuclease.

As amostras de DNA são carregadas em poços de um gel de agarose e submetidas a electroforese. Um campo eléctrico é aplicado através do gel conduzindo a uma migração dos diferentes fragmentos do DNA da amostra em direcção ao polo positivo. As moléculas de DNA mais pequenas migram mais rapidamente do que as de maiores dimensões, e assim os fragmentos de diferentes tamanhos ficam separados em bandas diferentes durante a electroforese. Para um determinado DNA, o número e o padrão das bandas produzidas por cada enzima de restrição são característicos e constituem um “DNA fingerprint”. Os padrões de restrição tornam-se visíveis por coloração com um composto que se liga à molécula de DNA.

Procedimento experimental:

Procedimento A: Reacções de restrição

Notas: As DNAses são abundantes, nomeadamente nas mãos. Usar só material esterilizado e não tocar com as mãos nas pontas das pipetas e nas tampas e interior dos tubos “Eppendorf”.

Ao pipetar olhar sempre para a ponta da pipeta para verificar se entrou líquido. Pegar no tubo “Eppendorf” com a mão e colocar o líquido no fundo deste.

É necessário ter o máximo de cuidado com as enzimas de restrição para não desnaturarem: devem ser retiradas do frigorífico para um recipiente com gelo só no momento da utilização.

1 - Preparar três tubos “Eppendorf” (1,5 mL) de acordo com a seguinte tabela:

Tubo	DNA*	Tampão 10x	<i>HindIII</i>	<i>EcoRI</i>	H ₂ O
“H”	1 µL	1 µL	1 µL	---	7 µL
“E”	1 µL	1 µL	---	1 µL	7 µL
Controlo	1 µL	1 µL	---	---	8 µL

* 1 µg

2 - Misturar os reagentes batendo suavemente na extremidade do tubo. Se necessário, centrifugar para evitar que fique líquido nas paredes.

3 - Incubar todos os tubos de reacção por um período mínimo de 30 minutos a 37°C.

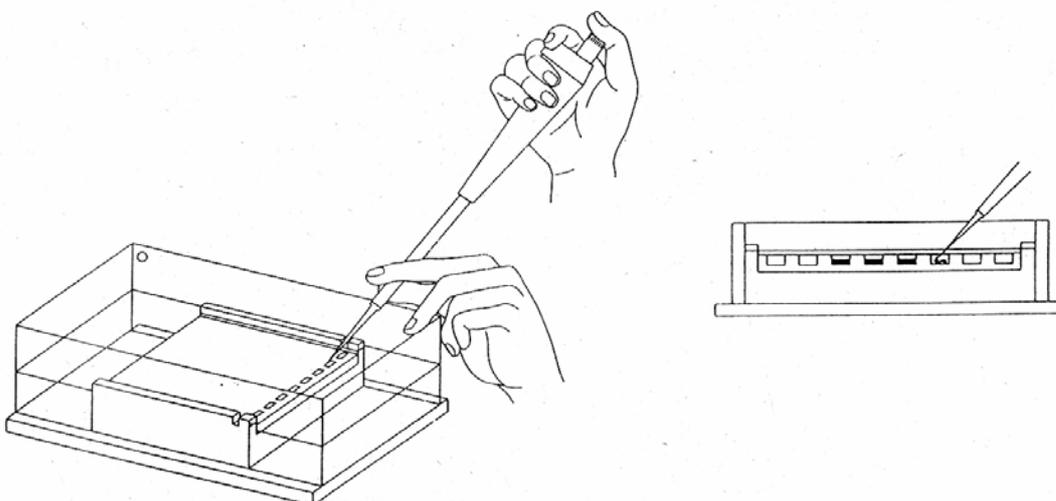
DNA - 5

Procedimento B: Montagem do gel.

- 1 - Fechar as extremidades do suporte do gel e inserir o pente para definir os poços.
- 2 - Preparar 50 mL agarose 1,2 % em tampão TAE (40 mM TRIS-Acetato, 2 mM EDTA, pH=8,3) num matraz de 200 mL; dissolver a agarose em forno micro-ondas ou em banho de água a ferver; depois de arrefecer para cerca de 50°C, adicionar 3 µL de uma solução de brometo de etídio 10 mg/mL em água (concentração final de 1 mg/mL). **Atenção:** o brometo de etídio é mutagénico – usar luvas (ver recomendações anexas).
- 3 - Verter a agarose no suporte do gel e deixar solidificar. **Cuidado,** a agarose muito quente deforma o suporte do gel.
- 4 - Abrir as extremidades do suporte do gel, retirar o pente. **Atenção:** poços do lado do cátodo.
- 5 - Encher a tina com tampão TAE até cobrir a superfície do gel. Verificar se os poços estão preenchidos com tampão.

Procedimento C: Carregar o gel

- 1 - Adicionar 1 µL do tampão da amostra (50% glicerol, 0,1% de azul de bromofenol, EDTA 100 mM) a cada tubo de reacção. Deixar ficar a ponta usada para pipetar o corante no tubo de reacção.
- 2 - Pipetar o conteúdo total de cada tubo de reacção para um poço do gel, usando a respectiva ponta.
 - estabilizar a pipeta sobre o poço com ambas as mãos
 - expelir o ar da ponta antes de carregar o gel
 - mergulhar a ponta da pipeta um pouco abaixo da superfície do líquido (não é necessário introduzir a ponta dentro do poço), posicioná-la na direcção do poço e expelir a amostra muito lentamente. Cuidado para não furar o gel com a ponta da pipeta.



Procedimento D: Electroforese

- 1 - Fechar a câmara de electroforese e ligar os cabos eléctricos a uma fonte de alimentação eléctrica de modo a que o cátodo da câmara fique ligado ao cátodo da fonte (preto – preto), assim como o ânodo (vermelho – vermelho). Verificar se os poços com DNA estão do lado do cátodo (polo negativo).
- 2 - Ligar a fonte de alimentação e regular a voltagem para 70 V. Verificar a formação de pequenas bolhas gasosas nos eléctrodos da câmara. Passados alguns instantes de corrida, deve ver-se o corante azul deslocar-se no gel em direcção ao polo positivo. O azul de bromofenol desloca-se à mesma velocidade de um fragmento de DNA de aproximadamente 300 bp.
- 3 - Deixar de correr a electroforese até o azul de bromofenol se encontrar próximo do fim do gel.
- 4 - Desligar a fonte de alimentação, desligar os cabos de ligação e remover a tampa da câmara de electroforese.
- 5 - Cuidadosamente, e usando luvas, retirar o gel com o respectivo suporte da câmara de electroforese.
- 6 - Examinar o gel com iluminação UV e registar o padrão de bandas em fotografia ou desenhando numa folha de acetato sobreposta ao gel. Neste caso, não esquecer de marcar a posição dos poços.
Atenção: *proteger os olhos da radiação UV por meio de óculos adequados.*

DNA - 7

Resultados e Discussão

- 1 - Os fragmentos lineares de DNA migram a velocidades inversamente proporcionais ao \log_{10} das suas massas moleculares. Para simplificar, substitui-se a massa molecular dos fragmentos pelo seu tamanho em pares de bases(bp).
- 2 - Na tabela seguinte estão os tamanhos de fragmentos de DNA de Lambda originados por digestão com *HindIII*:

<i>HindIII</i>		<i>EcoRI</i>		
Distância (mm)	bp real	Distância (mm)	bp calculado	bp real
	23130			
	9416			
	6682			
	4361			
	2322			
	2027			
	*564			
	*125			

* estas bandas podem não ser visíveis

- 3 - Medir a distância, em mm, desde o bordo frontal do poço a cada uma das bandas e registrar na tabela.
- 4 - Fazer corresponder a distância a cada banda ao tamanho do respectivo fragmento.
- 5 - Usando papel semi-logarítmico, marcar a distância migrada no eixo dos *xx* e o logaritmo de kbp no eixo dos *yy*, para cada fragmento de *HindIII*. Unir os pontos.
- 6 - Usar a curva obtida para obter o tamanho, em kbp dos fragmentos obtidos coma *EcoRI*, a partir das distâncias migradas.
- 7 - Registrar o valor obtido na tabela, na coluna correspondente a “bp calculado”. Comparar com os valores reais conhecidos.

DNA - 8

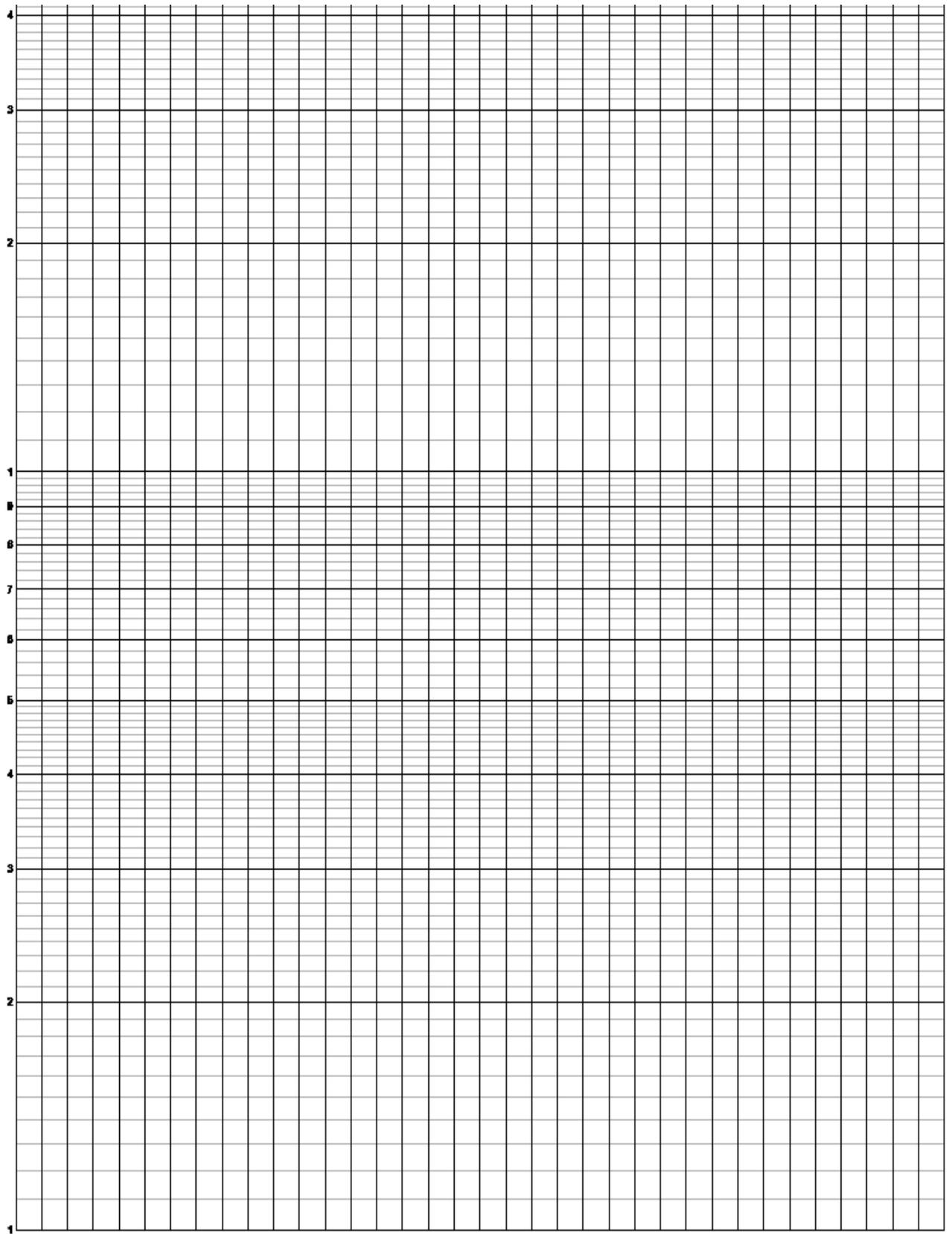


Figura 20 - _____

DNA - 9

TABLE I
Some Restriction Enzymes and Their Cleaving Sequences

Microorganism	Enzyme Abbreviation	Sequence 5'→3' 3'→5'
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	<i>Bam</i> HI	G↓GATCC CCTAG↑G
<i>Brevibacterium albidum</i>	<i>Bal</i> I	TGG↓CCA ACC↑GGT
<i>Escherichia coli</i> RY13	<i>Eco</i> RI	G↓AATTC CTTAA↑G
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>Hae</i> II	Pu GCGC↓Py Py↑CGCG Pu
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>Hae</i> III	G↓GCC CC↑GG
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	<i>Hha</i> I	GCG↓C C↑GCG
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	<i>Hin</i> DI	GT Py↓Pu AC CA Pu↑Py TG
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	<i>Hin</i> DIII	A↓AGCTT TTCGA↑A
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Hpa</i> I	GTT↓AAC CAA↑TTG
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Hpa</i> II	C↓CGG GGC↑C
<i>Providencia stuartii</i> 164	<i>Pst</i> I	CTGCA↓G G↑ACGTC
<i>Streptomyces albus</i> G	<i>Sal</i> I	G↓TCGAC CAGCT↑G
<i>Xanthomonas oryzae</i>	<i>Xor</i> II	CGATC↓G G↑CTAGC

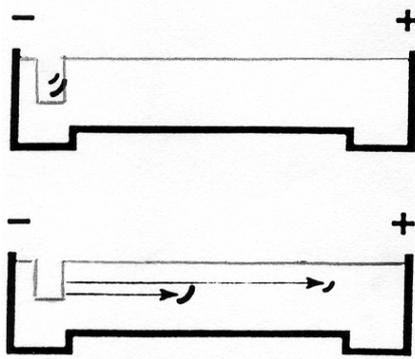
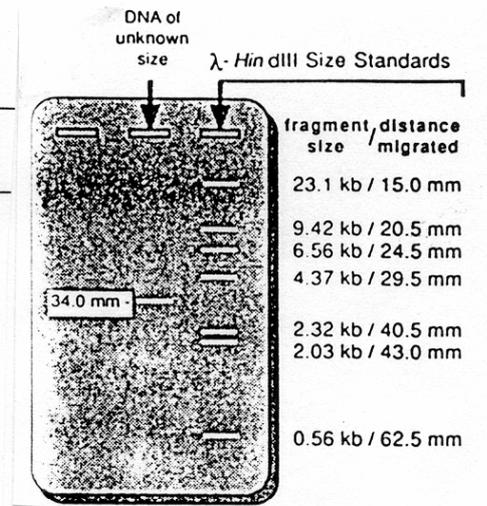


FIGURE 3. Relative migration of large and small DNA fragments during gel electrophoresis.

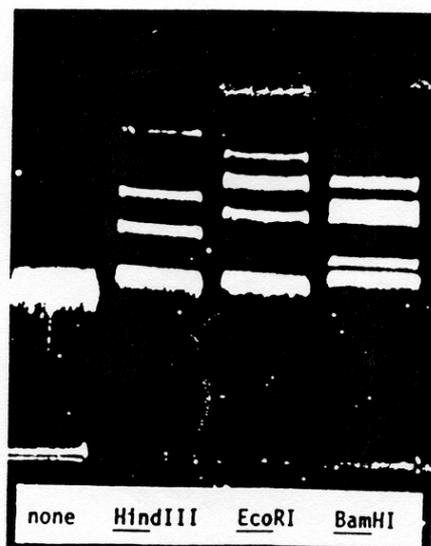


FIGURE 4. Restriction digest of DNA from bacteriophage lambda using three different enzymes.

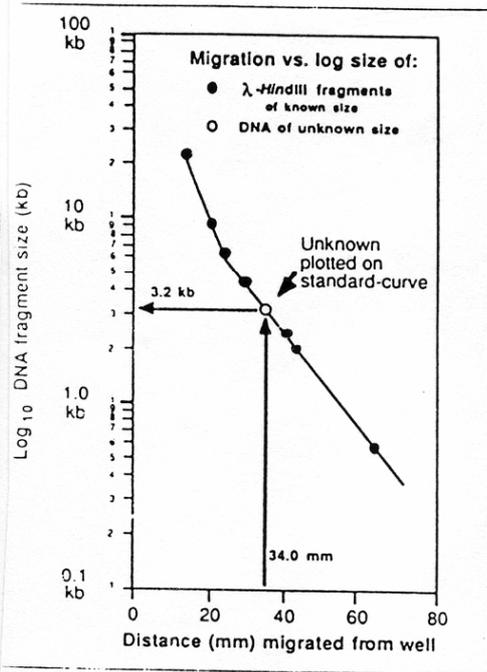
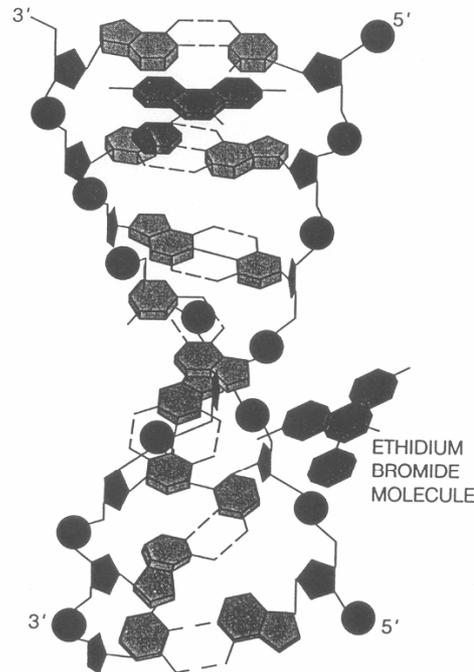


FIGURE 6.4. Plot of log₁₀ DNA fragment size (kb) vs. distance migrated during agarose gel electrophoresis (data from figure 6.3). Shown is a standard curve for *Hind*III fragments and the determination of the size of an unknown fragment.

DNA - 10



Intercalation of Ethidium Bromide into DNA Helix

CAUTION

Handling and Decontamination of Ethidium Bromide

1. Always wear disposable gloves when working with ethidium bromide solutions or stained gels.
2. Limit the use of ethidium bromide to a restricted sink area.
3. Following gel staining, use a funnel to decant as much as possible of the ethidium bromide solution into a storage container for reuse or decontamination and disposal.
4. Disable stained gels and used staining solution, according to accepted laboratory procedure. The method given below is adapted from Quillardet and Hofnung (1988).
 - a. If necessary, add water to reduce the concentration of ethidium bromide to less than 0.5 mg/ml.
 - b. Add 1 volume of 0.05 M KMnO_4 , and *mix carefully*.
 - c. Add 1 volume of 0.25 N HCl, and *mix carefully*.
 - d. Let the solution stand at room temperature for several hours.
 - e. Add 1 volume of 0.25 N NaOH, and *mix carefully*.
 - f. Discard the disabled solution down a sink drain. Drain disabled gels, and discard them in the regular trash.

Caution: KMnO_4 is an irritant, and it is explosive. Solutions containing KMnO_4 should be handled in a chemical hood.

5. *One previous method of treating ethidium bromide with bleach solution was deemed inadequate and has been abandoned.*

Bibliografia: DNA Restriction Analysis Kit - Instructor's Manual (1990). Carolina Biological Supply Company, USA.