

1. No laboratório você precisa realizar o cultivo de vegetais hidropônicos. Para esta finalidade você precisa preparar um meio de cultivo que além dos diversos nutrientes precisa de um rigoroso controle de pH.

Um dos vegetais a serem cultivados cresce apenas em valores de pH entre 5 e 6. Você, como único bioquímico do grupo, precisa fazer 1 L de uma solução tampão 0,1 M a ser usada no cultivo desse vegetal. Infelizmente o pHmetro do laboratório está com defeitos. No armário, as soluções disponíveis são:

- 2 M Ácido acético, $pK_a = 4,5$
- 2 M Ácido fosfórico, $pK_{a1} = 2,13$ $pK_{a2} = 7,21$ $pK_{a3} = 12,32$
- 2 M HCl
- 2 M NaOH
- H₂O destilada

Dado: Equação de Henderson-Hasselbalch

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

- A) Descreva como você procederia para a confecção do tampão indicando as soluções utilizadas e as respectivas quantidades.
- B) De que depende a eficiência de um tampão? Justifique.
- C) Esquematize um gráfico de pH em função de equivalentes de OH⁻, mostrando a(s) curva(s) de tamponamento para o tampão que você confeccionou.
- D) Sua solução poderia ser usada para tamponar o cultivo de outro vegetal cuja faixa de pH ótimo esteja entre 6 e 7? Justifique.

A) Como a planta cresce apenas em pH entre 5 e 6. O ideal seria preparar um tampão dentro desta faixa de pH, por exemplo, um tampão em pH 5,5.

Sabendo que a faixa de tamponamento de um tampão ocorre em $pH = pK_a \pm 1$ e considerando-se os reagentes disponíveis, o ácido escolhido para o preparo do tampão seria o ácido acético ($pK_a = 4,5$). Com ele poderia se preparar um tampão de pH entre 3,5 a 5,5.

Para saber a quantidade de ácido e de sua base conjugada necessária para preparar 1L do tampão 0.1 M de pH 5.5 a utiliza-se a equação de Henderson-Hasselbach:

$$5,5 = 4,5 + \log [A^-]/[HA] \rightarrow 1 = \log [A^-]/[HA] \rightarrow [A^-]/[HA] = 10$$

Se considerarmos [HA] como sendo x, temos que $[A^-] = 10x$.

O tampão a 0.1M de de ácido acético/acetato contem no equilíbrio: $[HA] + [A^-] = 0.1M$

Portanto, $x + 10x = 0.1$ M. Resolvendo a equação temos que $x = [HA] = 0.009$ M e $[A^-] = 0.091$ M no equilíbrio.

Como o $[A^-]$ é obtido neste caso a partir da adição de base forte, a quantidade total de ácido acético necessário para prepara o tampão é 0.1M.

Para obter a base conjugada na concentração desejada mistura-se quantidade equivalentes de base forte. Portanto será necessário adicionar NaOH na concentração final de 0.091 M.

Para saber o volume necessário de cada reagente utiliza-se a equação: $M_i V_i = M_f V_f$

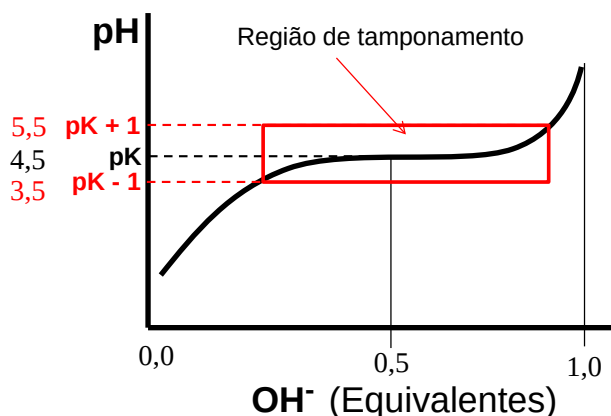
Ácido acético: $2M \times V_i = 0.1M \times 1L \rightarrow V_i = 0.05 L$ (50 mL)

NaOH: $2M \times V_i = 0.091M \times 1L \rightarrow V_i = 0.0455L$ (45,5 mL)

Misturar os reagentes nos volumes indicados e completar o volume para 1L.

B) A eficiência de uma solução em um dado pH depende do pKa do ácido fraco e da concentração do ácido fraco e de sua base conjugada

C)



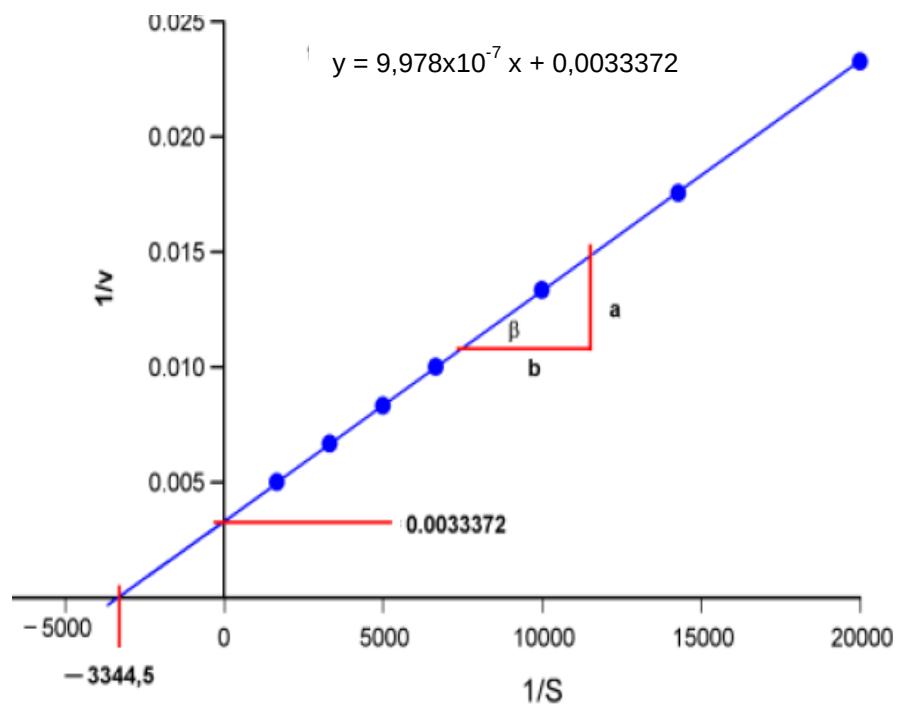
D) Não, pois a faixa de tamponamento do tampão ácido acético está entre 3,5-5,5. Este tampão não possui efeito tamponante acima de 5,5.

2. Hemoglobina e a mioglobina são metalo-proteínas globulares com grupos prostéticos (heme e ferro), capazes de interagir com o oxigênio. A mioglobina é uma proteína de cadeia única (monomérica) enquanto a hemoglobina é multimérica, composta de duas cadeias alfas e duas cadeias betas. No organismo, a mioglobina é encontrada apenas no músculo, enquanto a hemoglobina está presente nos eritrócitos.

a) Defina: 1) proteínas globulares e fibrilares; 2) grupo prostético; 3) metaloproteína.

b) Qual a importância da presença de múltiplas cadeias polipeptídicas na hemoglobina? Por que a diferença estrutural (número de cadeias) entre a mioglobina e a hemoglobina afeta suas funções no organismo?

3. Durante danos consideráveis no fígado, uma enzima (E_{1A}) é liberada na corrente sanguínea. Após exercícios intensos, uma isoenzima do músculo (E_{1B}) é liberada na corrente sanguínea. E_{1A} e E_{1B} podem ser diferenciadas porque possuem valores de K_M diferentes. A enzima presente no músculo tem maior afinidade pelo substrato e apresenta um valor de K_M igual a 2×10^{-5} M. A análise de cinética enzimática obtida a partir de uma amostra de soro de um paciente gerou os resultados apresentados no gráfico abaixo. Os dados estão apresentados em concentração molar (M). A partir destes dados identifique se o paciente está sofrendo de uma doença hepática ou simplesmente tem se exercitado violentamente. Justifique sua resposta.



$$-1/K_M = -3344,5$$

$$K_M = 2,98 \times 10^{-4} \text{ M}$$

Ou

$$y = 9,978 \times 10^{-7} x + 0,0033372$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$\frac{K_M}{V_{\max}} = 9,978 \times 10^{-7}$$

$$\frac{1}{V_{\max}} = 0,0033372$$

$$\frac{1}{0,003337} = V_{\max}$$

$$V_{\max} = 299 \text{ M/tempo}$$

$$\frac{K_M}{299 \text{ M/tempo}} = 9,978 \times 10^{-7}$$

$$K_M = 9,978 \times 10^{-7} \times 299$$

$$K_M = 2,98 \times 10^{-4} \text{ M}$$

O valor de K_M para a enzima presente no plasma foi de $2,98 \times 10^{-4} \text{ M}$. Portanto, a isoenzima presente no plasma, é a E_{1A} , de fígado, caracterizando um dano hepático do indivíduo.

4. Uma hipótese central na pesquisa de membranas é que os lipídeos da membrana devem ser fluídos (em oposição a "congelados") a fim de que a membrana possa desempenhar suas funções. O apoio para esta hipótese é fornecido pela observação de que a composição de ácido graxo das membranas pode ser alterada pelas condições nas quais a bactéria cresce. Por exemplo, se a bactéria está crescendo em temperatura menor que a normal, as quantidades observadas de ácidos graxos insaturados (relativas ao conteúdo de ácido graxo saturado) estão acima do normal. Contrariamente, se a bactéria está crescendo em temperatura acima da normal, as quantidades observadas de ácidos graxos insaturados nos lipídeos da membrana (relativas aos ácidos graxos saturados) estão abaixo do normal.

(a) Sugira razões para o fato de que o conteúdo lipídico na membrana bacteriana deve ser fluido para que a membrana opere apropriadamente.

(b) Explique como a alteração observada nos níveis dos ácidos graxos insaturados relativa aos níveis dos ácidos graxos saturados, em diferentes temperaturas de crescimento, apoia a hipótese da fluidez da membrana.

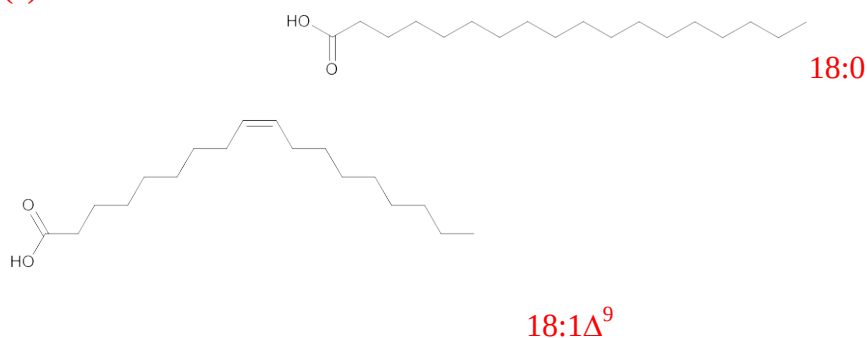
C) Desenhe a estrutura de um ácido graxo saturado com 18 carbonos (C18:0, ácido esteárico) e outro com 18 carbonos e uma insaturação (C18:1 Δ^9 , ácido oleico). Por que a presença da insaturação faz com que a membrana seja mais fluida?

(a) A membrana biológica é considerada uma barreira impermeável à maioria dos íons e moléculas hidrossolúveis, sendo que sua permeabilidade a uma determinada molécula depende da existência de transportadores (proteínas) específicos. Assim, a membrana necessita ser fluida para que ocorra o "folding"(dobramento) correto das

proteínas de membrana. Além disso, a fluidez de membrana é importante para a movimentação dos fosfolípidos de membrana, característica importante para a permeabilidade seletiva de algumas pequenas moléculas, sinalização celular e também para divisão celular.

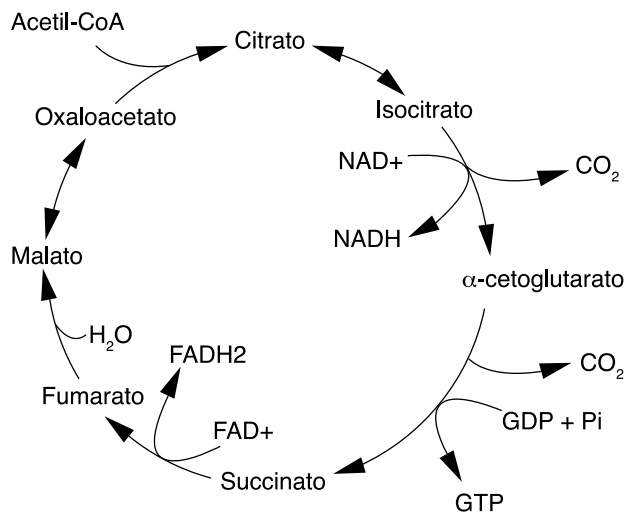
(b) Os ácidos graxos saturados possuem ponto de fusão maior que os ácidos graxos insaturados, isso se dá por causa das interações intermoleculares (Van der Waals) entre as cadeias de ácidos graxos saturados que favorecem a formação de uma estrutura mais rígida. Já nos ácidos graxos insaturados, as duplas ligações na conformação cis fazem com que a cadeia do ácido graxo adquira uma conformação dobrada (não linear). Esta característica faz com que as interações moleculares entre as cadeias de hidrocarbonetos de ácidos graxos insaturadas seja menor, diminuindo o ponto de fusão e aumentando a fluidez da membrana. O aumento dos níveis de ácidos graxos insaturados em temperatura mais baixas demonstra que o metabolismo celular é regulado de modo a manter uma fluidez de membrana “ideal” para às atividades biológicas da bactéria. Do mesmo modo em altas temperaturas ocorre um aumento nos níveis de ácidos graxos saturados a fim de garantir o grau de fluidez adequado.

(c)

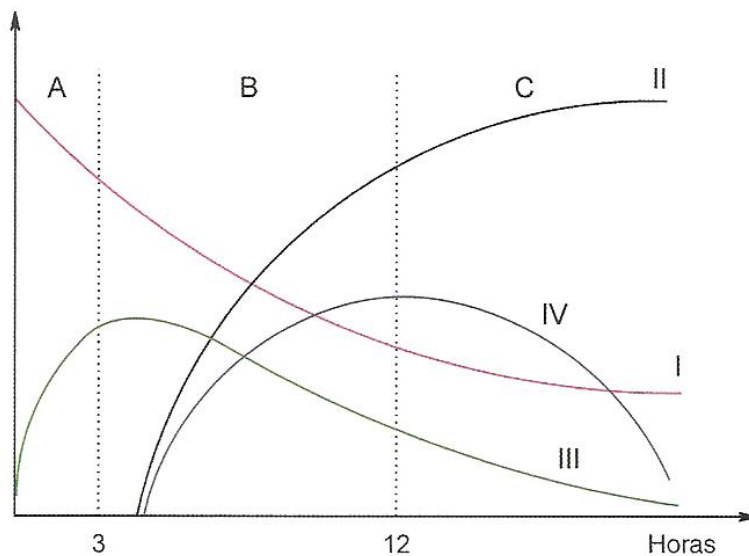


A insaturação na conformação cis faz com que a cadeia sofra um “dobramento” diminuindo assim as interações moleculares entre cadeias de hidrocarbonetos.

5. Uma suspensão de mitocôndrias foi dialisada e incubada em tampão isosmótico com 100 mmols de acetil-CoA, 2 mmols de oxaloacetato, 5 mmols de NAD^+ , 30 mmols de GDP, 20 mmols de P_i e excesso de dinitrofenol. Supondo que a mitocôndria é permeável a todos esses compostos, quais compostos estarão presentes ao final da reação e em quais quantidades? E o que aconteceria se o dinitrofenol fosse omitido neste mesmo experimento? Justifique sua resposta. As reações componentes do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos estão representadas abaixo.



6. Observe as curvas indicadas no gráfico abaixo. Os parâmetros referem-se ao período subsequente a uma refeição (tempo zero). Os valores das ordenadas são diferentes para cada curva. Analise as afirmativas abaixo, indique se são verdadeiras ou falsas e JUSTIFIQUE suas respostas. Serão consideradas apenas as afirmativas devidamente justificadas.

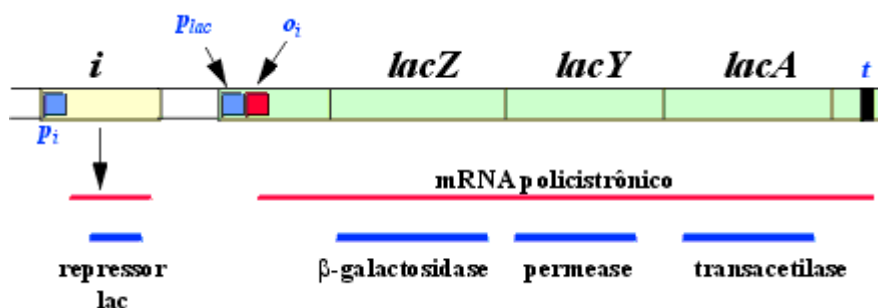


- A curva I representa a concentração de insulina plasmática
- A curva I representa a intensidade da gliconeogênese
- A curva II representa a atividade da glicólise no tecido adiposo
- A curva III representa a utilização de glicose exógena
- A curva III representa a intensidade da síntese de proteínas
- A curva IV representa a degradação do glicogênio hepático
- A síntese de adenosina monofosfato cíclico (AMP cíclico) é maior em C do que em B
- A razão glicólise/gliconeogênese é maior em B que em A
- A atividade máxima do Ciclo de Krebs ocorre em C

- a) FALSA. A Insulina é liberada de forma intermitente (em picos), por isso a curva I não é uma representação da concentração de insulina;
- b) FALSA. A gliconeogênese aumentará no decorrer do tempo em jejum, será gradualmente mais alta em B e C, por isso a curva I não pode ser uma representação da intensidade da gliconeogênese;
- c) FALSA. A glicólise no tecido adiposo ocorrerá de forma mais intensa quando houver disponibilidade de carboidrato para a síntese de lipídeos, ou seja, no período pós prandial, por isso a curva II não é representativa da glicólise no tecido adiposo;
- d) VERDADEIRA. A elevação da curva III logo após a refeição seguida de um declínio representa a utilização de glicose exógena (vinda da alimentação);
- e) VERDADEIRA. A disponibilidade de aminoácidos fornecidos pela refeição leva a um aumento da síntese de proteínas, a fim de repor o catabolismo gerado no jejum. Com o passar do tempo a síntese de proteínas torna-se menos favorecida;
- f) FALSA. A degradação do glicogênio hepático terá um pico em tempos mais curtos que 12h de jejum;
- g) VERDADEIRA. A adenosina monofosfato cíclico (AMP cíclico) é um segundo mensageiro sinalizado pelo glucagon e adrenalina e estará em maior concentração em períodos mais prolongado de jejum;
- h) FALSA. A razão glicólise/gliconeogênese será maior quando houver maior disponibilidade de carboidratos à célula, que será no momento pós-refeição, portanto, será menor em B que em A;
- i) FALSA. Em situação de repouso, a atividade máxima e completa do Ciclo de Krebs ocorrerá após a refeição, quando houver maior disponibilidade de substratos vindo da alimentação. Estes substratos fornecerão os elétrons destinados à cadeia respiratória e fosforilação oxidativa.

7. Abaixo você encontra uma representação esquemática do operon Lac de *E. coli*. Com esse operon como exemplo:

- a) defina promotor, operador e repressor
- b) explique como a expressão dos genes *lacZ*, *lacY* e *lacA* é controlada em resposta a disponibilidade de carboidratos no meio.
- c) a constante de dissociação para o complexo repressor:operador é de aproximadamente 0,1 pM. Explique por que essa constante tão baixa é importante no funcionamento adequado do operon.



a)-promotor é uma sequência de DNA que se encontra à montante da sequência codificadora de um gene, na qual a RNA polimerase se liga para dar início à transcrição da região codificadora.

-operador é uma sequência de DNA encontrada em genomas bacterianos organizados em "operons", ou conjuntos gênicos com regulação transcricional coordenada. Essa região é geralmente localizada imediatamente após a sequência do promotor, e nela se ligam proteínas repressoras, que quando ligadas ao operador regulam a transcrição das regiões codificadoras pelo bloqueio da progressão da RNA polimerase.

- repressor: é uma proteína com alta afinidade por sequências específicas de DNA da região operadora, às quais o repressor se liga e impede a transcrição das sequências codificadoras na ausência de lactose

b) o operon lac funciona, basicamente, para impedir que as enzimas utilizadas para a metabolização de lactose sejam sintetizadas na ausência deste substrato, ou na presença de altas concentrações de glicose, o substrato energético preferencial. Isto representa uma importante "economia energética" para a célula, uma vez que proteínas só serão sintetizadas quando suas atividades catalíticas forem necessárias ao metabolismo da célula. Na ausência de lactose, o repressor *i* está ligado à sequência operadora, e a transcrição dos genes estruturais (*lacZ*, *lacY* e *lacA*) é inibida; quando a concentração intracelular de lactose aumenta, lactose se liga ao repressor causando uma mudança conformacional na proteína, que se desliga da região operadora. Em resposta a isso, a transcrição dos genes estruturais é ativada e as proteínas responsáveis pelo metabolismo de lactose são sintetizadas.

Alem disso, o operon lac também é reprimido na presença de altas concentrações de glicose, mesmo em presença de lactose. Nessa condição, a concentração intracelular de cAMP está bastante diminuída (uma vez que o balanço energético está deslocado no sentido de fosforilação), fazendo com que a ativação da transcrição dos genes do operon Lac via proteína CAP (*catabolite activator protein*), que depende da ligação de cAMP, esteja inibida.

c) a constante de dissociação do complexo repressor:operador deve ser baixa para garantir a alta especificidade da ligação. Dessa forma, o repressor é capaz de se ligar eficientemente à região operadora, mesmo com um grande excesso de outras regiões de ligação (todo o resto do genoma bacteriano). Alem disso, essa alta afinidade garante que o repressor não irá se dissociar da região operadora na ausência do seu ligante canônico, neste caso a lactose. Em conjunto, esses dois fatores garante a especificidade das respostas do repressor.

8. Estudos sobre o mecanismo de replicação do DNA avançaram muito com o uso de mutantes bacterianos deletados de uma ou mais enzimas que se acreditava estarem envolvidas no processo de replicação. No laboratório A

gerou-se um mutante de DNA ligase sensível a temperatura, permissivo a 25°C e não-permissivo a 37°C. Bactérias mutantes foram crescidas a 25°C e 37°C em presença de ^3H -timidina por 2 hr (tempo de duplicação de *E. coli* é de cerca de 20 min), e após a incubação o DNA foi isolado das duas condições, separado em um gel de agarose e exposto a um filme radiográfico. Que padrão de radioatividade você esperaria encontrar em cada uma das condições? Justifique sua resposta.

Uma vez que a DNA ligase é ativa em bactérias crescidas a 25°C, nessa condição encontraríamos o genoma bacteriano intacto e uniformemente marcado radioativamente, uma vez que ^3H -timidina foi incorporada nas duas fitas nascentes durante a replicação, e todos os fragmentos de Okazaki resultantes da replicação da fita *lagging* foram ligados no cromossomo bacteriano intacto. Desta forma, em um gel de agarose deveríamos observar apenas um tamanho de fragmento, correspondente ao tamanho do cromossomo bacteriano intacto.

Por outro lado, em células crescidas a 37°C, a DNA ligase está inativa. Desta forma, a fita *leading* é replicada quase que normalmente, enquanto que a replicação da fita *lagging* resulta em muitos fragmentos de baixo peso molecular (cerca de 1 kb em *E. coli*) uma vez que os fragmentos de Okazaki não são ligados após a remoção dos iniciadores de RNA. Desta forma, em um gel de agarose, obteríamos uma banda próxima ao tamanho do cromossomo bacteriano intacto, resultado da replicação da fita *leading*, e muitos fragmentos menores resultantes dos fragmentos de Okazaki não-ligados. É importante ressaltar que as bactérias morreriam se mantidas na temperatura não permissiva por muito tempo, devido à sua incapacidade de replicar seu DNA corretamente.