

DISCIPLINA: Bioquímica Geral
CÓDIGO: NUP127
UNIDADE: NUPEM/CCS
Nº DE CRÉDITOS: 3.0
CARGA HORÁRIA: 60h (Teórica: 45h Prática: 15h)
PRÉ-REQUISITOS: Não há

EMENTA: Células: biomoléculas e estruturas supramoleculares. Estruturas e propriedades físicas, químicas e físico-químicas de aminoácidos e proteínas. Enzimas: determinações de parâmetros cinéticos, inibição enzimática. Estrutura, ocorrência e funções de nucleotídeos, ácidos nucleicos, glicídios e lipídios. Introdução à engenharia genética.

OBJETIVOS: Conhecer as propriedades das moléculas e as transformações químicas de ocorrência biológica. Identificar aminoácidos, fracionar aminoácidos e proteínas e qualificar espectrofotometricamente proteínas e glicídios redutores.

PROGRAMA:

Estrutura e funções dos aminoácidos – estrutura geral dos aminoácidos, isômeros d e l, os aminoácidos que ocorrem naturalmente na estrutura das proteínas, modificações que ocorrem nos aminoácidos após a incorporação na proteína; outras funções dos aminoácidos: neurotransmissores, precursores para a biossíntese de pigmentos; abreviatura dos aminoácidos: código de 1 e de 3 letras.

Propriedades físico-químicas dos aminoácidos – características e classificação dos grupamentos laterais dos aminoácidos: polar, apolar, ácido e básico; propriedade ácido-base dos aminoácidos, equação de Henderson-Hasselbalch, curva de titulação de um aminoácido monoamino e monocarboxílico, curva de titulação de um aminoácido

monoamino dicarboxílico, curva de titulação de um aminoácido diamino monocarboxílico; pK e pI.

Métodos de fracionamento de aminoácidos – cromatografia de camada fina, cromatografia em papel, cromatografia de troca iônica, eletroforese em papel de aminoácidos, HPLC (cromatografia líquida de alta performance) – cromatografia de fase reversa. Detecção de aminoácidos: reação de ninhidrina, reação com fenil isotiocianato. Absorção no ultravioleta de aminoácidos e peptídeos.

Estrutura de proteínas – ligação peptídica: geometria e propriedades; estrutura primária de proteínas; estrutura secundária: alfa-hélice, folha beta pregueada, seqüência aleatória; estrutura terciária de proteínas, interações que estabilizam a estrutura terciária: interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, pontes de enxofre; estrutura quaternária, glicoproteínas.

Métodos de fracionamento de proteínas – “salting in” e “salting out”, cromatografia de gel filtração, cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade, eletroforese em gel de poliacrilamida: nativo e com SDS, isoeletrofocalização, eletroforese bidimensional, ultracentrifugação em gradiente de densidade.

Seqüenciamento de proteínas – determinação do aminoácido N e C-terminal, clivagem das pontes de sulfeto, separação, purificação e caracterização das cadeias peptídicas, determinação da composição de aminoácidos de uma cadeia peptídica, reações específicas de clivagem de um peptídeo, separação e purificação de fragmentos peptídicos, seqüenciamento de peptídeos, ordenação dos fragmentos peptídicos, localização das pontes de enxofre.

Visualização tridimensional de aminoácidos e proteínas – visualização das estruturas de aminoácidos e proteínas usando o programa Rasmol.

Estrutura e propriedades dos carboidratos – classificação dos monossacarídeos, configuração e conformação de carboidratos, derivados de carboidratos; polissacarídeos: análise de carboidratos, dissacarídeos, polissacarídeos estruturais: celulose e quitina; polissacarídeos de reserva: amido e glicogênio.

Propriedades gerais da catálise enzimática – Natureza, centro ativo e especificidade, dependência da estrutura terciária para a formação do centro ativo, modificações do centro ativo que provocam mudanças de especificidade – o caso das serina proteases, nomenclatura de enzimas.

Cinética enzimática – Progresso da reação, velocidade inicial, fatores que influenciam a velocidade inicial: concentração do substrato, (cinética de Michaelis e Menten, K_m e V_m), temperatura, concentração de enzima, ativadores e inibidores; inibições simples: competitivas, não competitivas, determinação dos parâmetros cinéticos; importância do controle enzimático: noções elementares.

Estrutura do DNA - Blocos construtores do DNA; bases nitrogenadas, propriedades das bases nitrogenadas, nucleosídeos, nucleotídeos, nomenclatura dos nucleotídeos e nucleosídeos, ligação fosfodiéster, modelo de Watson e Crick (DNA B); evidências experimentais que levaram a elaboração do modelo de Watson e Crick; DNA A, DNA Z, DNA triplex e DNA quadruplex; características físico-químicas do DNA - T_m .

Replicação do DNA - Replicação do DNA em procariontes: origem de replicação, início da replicação, alongamento e término; proteínas que participam da replicação do DNA; DNA girase, DNA helicase, primase, proteínas SSB, DNA polimerase I, DNA polimerase III, DNA ligase, fragmentos de Okasaki, atividade corretora das DNA polimerases, síntese semidescontínua do DNA, mecanismo de ação da DNA ligase, experimentos que comprovam a replicação semiconservativa.

Mutação e mecanismos de reparo – Mutações naturais e mutações induzidas, tautomerização das bases nitrogenadas e mutagênese, agentes químicos e físicos causadores de mutações: luz ultravioleta, agentes alquilantes, agentes desaminantes, agentes hidroxilantes, análogos de bases nitrogenadas. Mecanismos de reparo do DNA: reparo dos dímeros de pirimidina no claro, reparo dos dímeros de pirimidina no escuro, reparo dos dímeros de pirimidina por recombinação; dna glicosilase, mecanismos de reparo pós-replicativo – o sistema dependente de MutS. Sistema SOS. Determinação de atividade mutagênica – o sistema de Ames.

Transcrição - Estrutura do RNA, diferenças entre DNA e RNA, tipos de RNA: rRNA, tRNA e mRNA, RNA polimerase, sítio promotor, fator sigma, início, alongamento e término da transcrição, diferenças entre a síntese do RNA e do DNA, RNA polimerase de eucariontes e procariontes.

Controle da transcrição - Conceito de operon, operon lac, repressão catabólica, interação proteína-DNA, operon araBAD, operon trp, atenuação, inibidores da transcrição. O mRNA de eucariontes - modificações pós-transcricionais: adição de cap, processamento, poliadenilação.

Tecnologia do DNA Recombinante - Vetores de clonagem - plasmídeos, fagos e YACs; marcadores de seleção, origem de replicação, sítios múltiplos de clonagem. Enzimas de restrição: sistemas de restrição e modificação, extremidades cegas e pontas coesivas; DNA ligase; estratégia de clonagem - clonagem por complementação, clonagem com uso de sonda de DNA e com o uso de anticorpos; seqüenciamento do DNA, PCR (reação em cadeia da polimerase), aplicação da biologia molecular na biotecnologia, RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição).

Programa Prático

Reação de ninhidrina e reações específicas de aminoácidos – uso da ninhidrina para determinação qualitativa de aminoácidos; reações específicas para determinação qualitativa de prolina, arginina, histidina, tirosina e triptofano; fundamentos e condições de reação – aplicação.

Cromatografia em papel de aminoácidos – fundamentos físicos da cromatografia em papel; análise das fases envolvidas, escolha do solvente, solubilidade relativa dos componentes da amostra entre as duas fases, determinação de Rf; mecanismos da cromatografia em papel: cromatografia mono e bidimensional: adequação do uso, vantagens de cada tipo – fundamento químico da revelação para aminoácidos com ninhidrina.

Eletroforese em papel de aminoácidos – escolha do pH de tampões, condições adequadas para o fracionamento, ponto isoelétrico, polarização de aminoácidos.

Varredura do espectro e curva padrão - escolha do comprimento de onda ideal para dosagem fotométrica, considerações sobre espectrofotometria, lei de Lambert-Beer: dedução matemática, relação absorvância e concentração; varredura de espectro com diferentes concentrações de dois corantes e com a mistura dos dois, análise.

Dosagem e curva padrão de proteínas pelo método de biureto e de glicídios redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico – fundamentos químicos da reação de proteínas com o reativo de biureto e da reação de glicídios redutores com o ácido 3,5-dinitrosalicílico; obtenção da curva padrão: condições da reação; aplicação prática da curva padrão.

Propriedades gerais de proteínas e curva de solubilidade de proteínas em função do pH – coagulação de proteínas: papel do calor; precipitação de proteínas por metais pesados, reagentes alcaloidais e sais („salting out”) – interpretações; determinação da solubilidade de proteínas em diferentes pHs; traçado da curva, determinação do ponto isoelétrico.

Cinética enzimática: influência do tempo e da temperatura – mecanismo de ação enzimática: produtos da reação; influência do tempo: curva de progresso; traçado e análise da curva, conceito de velocidade inicial; influência da temperatura: traçado e análise da curva.

Cinética enzimática: influência da concentração de enzima e do substrato – influência da concentração de substrato: constante de Michaelis – determinação prática, relação K_m x afinidade enzima-substrato.

BIBLIOGRAFIA BÁSICA:

Bioquímica - L. Stryer - Guanabara Koogan - 4a edição
Princípios de Bioquímica - A.L. Lehninger - Saraiva - 3a edição
Biochemistry - D.Voet & J.G. Voet - John Willey & Sons - 2nd edition
Textbook of Biochemistry with clinical correlations - T.M. Devlin - John Willey & Sons - 4th edition.