

Aula 15

ÁCIDOS NUCLÉICOS EXPERIMENTAL

META

Apresentar ao aluno os ácidos nucleicos no laboratório..

OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá:
saber identificar um ácido nucleico no laboratório. Saber extrair e caracterizar o DNA.

PRÉ-REQUISITOS

Aula 01 de carboidratos, aula 14 ácidos nucleicos, reações de aldeídos e cetonas. Química orgânica experimental

André Luís Bacelar Silva Barreiros
Marizeth Libório Barreiros

INTRODUÇÃO

Olá aluno, na aula anterior você foi apresentado aos ácidos nucleicos. Você aprendeu sobre as suas estruturas e propriedades, conheceu o que é nucleotídeo, nucleosídeo, DNA e RNA e às suas reações. Nesta aula vamos aprender a trabalhar com eles no laboratório. Aprender a isolar e caracterizar o DNA da cebola.

Vamos começar então? Mãos a obra!

DNA DE CEBOLA

O DNA é uma macromolécula formada por duas cadeias ou fitas de nucleotídeos unidas por ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas. O DNA pode ser extraído das células vegetais pela quebra mecânica da parede celular destas e adição de detergente para remover os lipídios de membrana. A adição do EDTA seqüestra os metais Mg^{2+} e Ca^{2+} presentes, que são cofatores das enzimas DNAses, prevenindo assim a degradação do DNA extraído. Em seguida a adição de álcool (etanol ou isopropanol) leva a precipitação do DNA, pois sua hélice A desnatura para hélice B, precipitando na interface etanol/água e podendo assim ser separado.

No DNA adenina e timina formam duas ligações de hidrogênio entre si, e citosina e guanina formam três ligações de hidrogênio entre si. Essas ligações de hidrogênio são fracas e podem ser rompidas num processo denominado desnaturação. A temperatura é um dos fatores capazes de desnaturar o DNA. Um aumento na temperatura leva a desnaturação do DNA em solução o que diminui a sua viscosidade, já o abaixamento da temperatura leva a renaturação, aumentando novamente a viscosidade da solução (Figura 1).

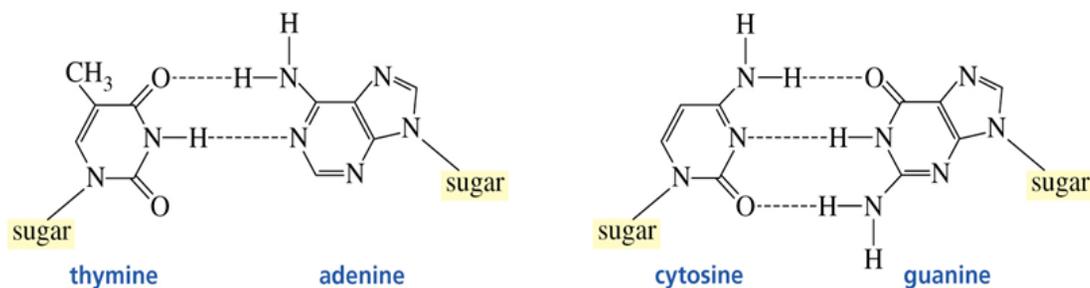


Figura 01 - Ligações de hidrogênio entre Adenina e Timina, e entre Guanina e Citosina.

Fonte: BRUICE, P. Y. *Química Orgânica*. 4ª. Ed., Vol. 2. Pearson Prentice Hall, 2006, cap. 27, pg. 532.

A hidrólise ácida branda dos ácidos nucleicos remove as bases púricas (adenina e guanina), sem afetar as ligações fosfodiéster no esqueleto nucleotídico. As desoxiriboses livres das bases purínicas ficam com seus grupos aldeídicos livres, que sofrem desidratação em meio ácido, originando o aldeído δ -hidroxi-levulínico (Figura 2). Este aldeído reage com a difenilamina por adição nucleofílica às carbonilas gerando um produto de coloração azul, caracterizando assim a presença de DNA (Reagente de Dische) (Figura 3).

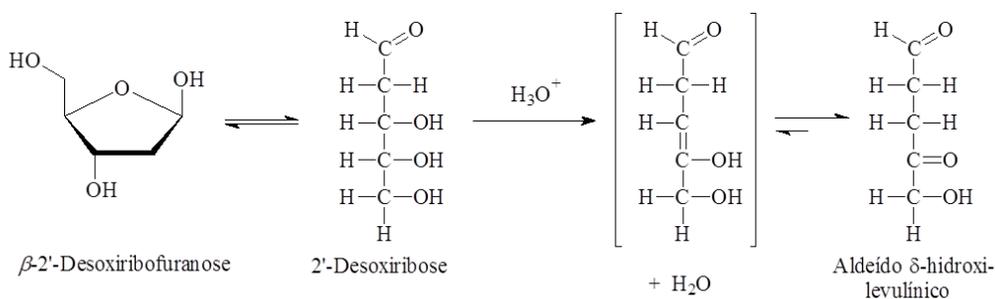


Figura 02 - Formação do aldeído δ -hidroxi-levulínico.
Fonte: Desenhado pelo autor com o programa ChemWindows.

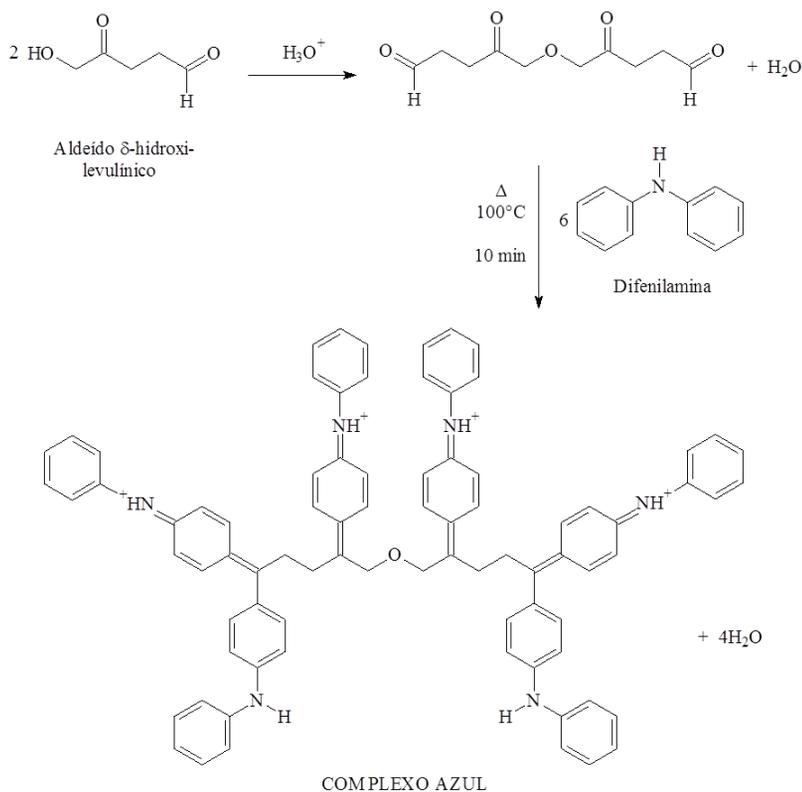


Figura 03 - Reação de Dische de caracterização da presença do DNA.
Fonte: Desenhado pelo autor com o programa ChemWindows.



ATIVIDADES

Extração do DNA da cebola

Materiais:

- Ralador
- Balança semi-analítica
- Béquer 250 mL
- Bastão de vidro
- Proveta 100 mL
- Pipeta graduada 10 mL
- Tubo de ensaio
- Bancada para tubos de ensaio
- Funil
- Algodão ou gaze

Reagentes:

- 1 Cebola média
- EDTA 25 mmol/L em pH 8
- Dodecilsulfato de sódio 1% na solução de EDTA
- Etanol gelado

Procedimento

Descasque uma cebola média e rale num ralador comum, sem deixar pedaços grandes. Pese 50,0g de cebola ralada e adicione 100 mL da solução de lise. Misture bem e deixe em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. Filtre a suspensão em um funil com algodão, recolhendo o filtrado em uma proveta. Anote o volume recuperado. Transfira 4,0 mL do filtrado para um tubo de ensaio e adicione 8,0 mL de etanol 95% gelado, sem misturar as soluções. Observe a formação de um precipitado branco entre as fases, este é o DNA.

Solução de lise: 0,1% de detergente dodecilsulfato de sódio (SDS) em solução 25 mmol/L de EDTA pH 8,0.

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

Ao ser ralada a parede celular da cebola, feita de celulose, é rompida mecanicamente. O detergente rompe a membrana celular lipídica expondo na solução o material do interior da célula, incluindo o DNA. O uso do EDTA seqüestra os íons Mg^{2+} e Ca^{2+} impedindo a ação das enzimas DNAses que quebrariam a cadeia do DNA. Nesse ponto o DNA encontra-se na sua forma mais comum de hélice A que é solúvel em água. Ao adicionarmos o etanol gelado tomando cuidado para não misturar as fases, o DNA na interface desnatura para hélice B, tornando-se insolúvel em água. Desta forma nós o vemos flutuando na fase alcoólica.



ATIVIDADES

Caracterização da presença do DNA - Reagente de Dische

Materiais:

- 2 Tubos de ensaio
- Bastão de vidro
- Pipeta graduada 10,0 mL
- Bancada para tubos de ensaio
- Béquer 500 mL
- Chapa de aquecimento
- Pegador para tubo de ensaio

Reagentes:

- DNA extraído no experimento anterior
- Difenilamina
- Ácido acético glacial
- Ácido sulfúrico concentrado
- Água destilada

Procedimento

Com a ajuda de um bastão de vidro ou uma alça recolher o DNA e transferir para outro tubo de ensaio. Adicionar 0,5 mL de água destilada para dissolver o DNA e 1,5 mL do Reagente de Dische. Em outro tubo colocar apenas 0,5 mL de água e 1,5 mL do reativo de difenilamina (branco). Aquecer os dois tubos em banho-maria fervente por 10 min. Comparar os resultados.

Reagente de Dische: dissolver 1,0g de difenilamina em 100 mL de ácido acético glacial e adicionar 2,75 mL de ácido sulfúrico concentrado.

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

O meio ácido hidrolisa as ligações N-glicosídicas, liberando as bases do DNA. A 2'-desoxirribose livre encontra-se em equilíbrio entre a forma de hemiacetal e a forma aldeídica. O meio ácido leva a protonação e perda de uma molécula de água. Por não ter hidroxila no carbono 2, não ocorre a perda de três moléculas de água como ocorreria com a ribose, que formaria o furfural. Neste caso forma-se o enol que tautomeriza para o aldeído δ -hidroxi-levulínico. O aldeído sofre desidratação intermolecular levando à formação do éter. O éter por sua vez sofre adição nucleofílica à carbonila dos aldeídos pela difenilamina, dando um produto azul.



ATIVIDADES

Desnaturação do DNA por temperatura

Materiais:

- Béquer 500 mL
- Proveta 100 mL
- Bastão de vidro
- Béquer de 100 mL
- Pipeta graduada 10,0 mL
- 2 Tubos de ensaio
- Pipeta graduada 1,0 mL
- Chapa de aquecimento
- Pêra

Reagentes:

- Filtrado do experimento 1
- Etanol gelado
- Água destilada
- Gêlo

Procedimento

Transfira o restante do filtrado para um béquer e adicione o dobro de etanol gelado em volume sem misturar as soluções. Com um bastão de vidro ou alça retirar todo o DNA e transferir para um béquer de 100 mL. Adicionar 10 mL de água destilada para dissolver e dividir a solução em dois tubos de ensaio. Pipetar com uma pipeta graduada de 1,0 mL e medir o tempo de escoamento de 1,0 mL. Aquecer o tubo por 10 min em banho-maria fervente, pipetar novamente 1,0 mL e medir o tempo de escoamento. Resfriar o tubo em gêlo por 15 min e medir novamente o tempo de escoamento.

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

A solução de DNA tem uma viscosidade maior que a água pura, demorando mais tempo para escoar. Ao ser aquecido o DNA rompe as suas ligações de hidrogênio, desnaturando, o que diminui a viscosidade da solução, escoando em menor tempo. Ao resfriar o DNA volta a formar suas ligações de hidrogênio, renaturando e recuperando sua viscosidade.

CONCLUSÃO

Como vimos, é possível extrair e identificar a presença do DNA em solução devido à característica única de seu açúcar, a 2'-desoxiribose, que por não possuir hidroxila no carbono 2 não sofre reação de Molish, e sim dá uma reação específica. Também vimos que a presença do DNA altera a viscosidade da solução, e que este pode ser desnaturado pelo aumento da temperatura.



RESUMO

Nesta aula aprendemos a isolar o DNA de células vegetais e caracterizar pelo reagente de Dische, assim como estudamos a desnaturação do DNA por aumento de temperatura.



AUTO-AVALIAÇÃO

- 1- O que é DNA?
- 2- Desenhe uma pequena seqüência de três nucleotídeos numa cadeia de DNA.
- 3- Mostre como as bases A e T se unem por ligações de hidrogênio.
- 4- Mostre como as bases C e G se unem por ligação de hidrogênio.
- 5- Proponha um mecanismo para a desidratação da 2'-desoxiribose em meio ácido formando o aldeído δ -hidroxi-levulínico:
- 6- Proponha o mecanismo para a desidratação intermolecular em meio ácido de duas moléculas de aldeído δ -hidroxi-levulínico formando uma ligação éter:
- 7- Proponha o mecanismo da adição nucleofílica da difenilamina à carbonila de um aldeído:
- 8- Por que o aumento da temperatura desnatura o DNA?
- 9- Qual a função do detergente na extração do DNA?
- 10- Qual a função do EDTA na extração do DNA?
- 11- Por que o DNA é solúvel em água e insolúvel em álcool?

REFERÊNCIAS

- BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. 4ª. Ed. Pearson Prentice e Hall, São Paulo – SP, 2006. Vol. 2.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, 4ª. Edição, Editora Sarvier, 2006, capítulo 7.
- MASTROENI, M. F., GERN, R. M. M. **Bioquímica: Práticas Adaptadas**. Atheneu, São Paulo – SP, 2008.
- PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., ENGEL, R. G. **Química Orgânica Experimental: Técnicas de escala pequena**. 2ª. Ed., Bookman, Porto Alegre - RS, 2009.
- PETKOWICZ et. al. **Bioquímica: Aulas Práticas**. 7ª. Ed. Editora UFPR, Curitiba – PR, 2007.
- dos SANTOS, P. C., BOCK, P. M. **Manual Prático de Bioquímica**. Ed. Universitária Metodista IPA, Porto Alegre – RS, 2008.
- VOGUEL, A.I. **Química Orgânica: Análise Orgânica Qualitativa**, Ed. Ao Livro Técnico S.A., Vol. 1, 2 e 3, 1971.