

ISSN 2238-9113**ÁREA TEMÁTICA:** (marque uma das opções)

- COMUNICAÇÃO
- CULTURA
- DIREITOS HUMANOS E JUSTIÇA
- EDUCAÇÃO
- MEIO AMBIENTE
- SAÚDE
- TRABALHO
- TECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE UMA PRÁTICA DE ESTUDO DE VIA GLICOLÍTICA PARA APLICAÇÃO NA DISCIPLINA DE BIOQUÍMICA

Marina Zattar Meiga (maarinazm@gmail.com)**Adriano Gonçalves Viana (adrianogviana@gmail.com)****Juliana Inaba (juinaba@hotmail.com)**

RESUMO – É grande a dificuldade que a disciplina de Bioquímica tem de desenvolver práticas que contextualizem os conceitos aprendidos nas aulas teóricas e que favoreçam o desenvolvimento do raciocínio crítico e científico dos alunos da graduação. Desta forma, é necessário tornar as aulas práticas mais didáticas e simples para contextualizar os conceitos trabalhados em teoria. O presente estudo permite a melhor visualização do estudo da via glicolítica e de seus inibidores através da adaptação de protocolos já existentes para aulas práticas. O objetivo principal do trabalho foi adaptar um protocolo para aulas práticas da determinação do consumo de glucose por células de *Sacharomyces cerevisiae* na ausência e na presença de inibidores já conhecidos. Os resultados foram satisfatórios, indicando ser possível a realização da prática com os acadêmicos da disciplina de Bioquímica.

PALAVRAS-CHAVE – Bioquímica. Via Glicolítica. *Sacharomyces cerevisiae*. Glucose.

Introdução

A Bioquímica é uma disciplina de base de diversos cursos das áreas biológica e da saúde. Apesar da grande complexidade, ela é geralmente ministrada nos primeiros anos de graduação, o que acarreta em elevado índice de reprovação entre os acadêmicos, dada a abstração dos conteúdos abordados e baixa correlação com aspectos do dia-a-dia. É grande a dificuldade que a disciplina de Bioquímica tem de desenvolver práticas que contextualizem os abstratos e complexos conceitos aprendidos nas aulas teóricas. O recurso de aulas práticas facilita o aprendizado, além de estimular o desenvolvimento do raciocínio crítico e científico dos alunos da graduação. Desta forma, podemos desenvolver e adaptar roteiros de aulas práticas de forma a aplicar esse recurso como estratégia didática para absorção dos conceitos previamente trabalhados em sala de aula.

Sacharomyces cerevisiae são organismos unicelulares, eucariotos, muito utilizados na produção de álcool, bebidas fermentadas e na panificação. Essas leveduras realizam a metabolização da glucose, através da via glicolítica em anaerobiose, gerando como produtos etanol e dióxido de carbono.

A via glicolítica é a principal via do metabolismo oxidativo de carboidratos que, e para a obtenção de energia (ATP), sendo indispensável para algumas células e tecidos, como hemácias. A capacidade de produzir ATP tanto na ausência quanto na presença de oxigênio também é um aspecto importante dessa via, permitindo que tecidos que necessitam da glucose possam sobreviver a fases anóxicas (HARPER, 2006).

Por meio da glicólise os açúcares com 6 átomos de carbono (hexoses) são convertidos após 10 reações a duas moléculas de piruvato. O piruvato formado pode seguir três rotas bioquímicas distintas, de acordo com as condições de oxigênio: 1) em aerobiose segue a rota de respiração celular, que tem como destino o Ciclo de Krebs e a cadeia transportadora de elétrons; 2) já em anaerobiose segue a fermentação láctica (mamíferos) ou 3) a fermentação alcoólica como é o caso das leveduras utilizadas no seguinte estudo. Embora o saldo energético seja mais favorável na oxidação completa de glucose a CO₂ e H₂O (32 ATPs), as vias fermentativas garantem a produção de 2 ATPs, mesmo na ausência de oxigênio (NELSON e COX,2011).

Os roteiros de aulas práticas disponíveis para estudos da via glicolítica empregam hemácias como células de consumo, porém, por tratar-se de material biológico de origem animal, seu uso envolve uma série de cuidados e riscos que devem ser considerados para a sua utilização, como manutenção de animais em biotério, testes para evitar o uso de amostras contaminadas, entre outros. Por causa disso, há a necessidade de aprovação e controle do uso de material biológico por comitês de ética em pesquisa, o que dificulta seu uso nas práticas de graduação. Desta forma, é de grande importância a busca de novas práticas que permitam o estudo da via glicolítica de forma segura e viável para as aulas práticas de Bioquímica.

Objetivos

O trabalho foi realizado com o intuito de facilitar e contextualizar o entendimento dos alunos sobre a via glicolítica e seus inibidores. Para isso, práticas desta via descritas foram selecionadas e adaptadas para serem executadas no contexto de aulas práticas de Bioquímica da UEPG. O experimento adaptado permitirá a visualização do consumo de glucose, *in vitro*, pelas células de *S. cerevisiae*, medindo a redução da concentração deste

analito em função do tempo de incubação e, também o efeito dos inibidores fluoreto de sódio e citrato de sódio na via e sua consequentemente diminuição do consumo de glucose pela célula.

Também é importante ressaltar a utilização do método espectrofotométrico e consequente elaboração da curva padrão, já que são práticas muito realizadas em diversas disciplinas e convém o entendimento dos alunos sobre tal atividade.

Referencial teórico-metodológico

Para o desenvolvimento de um protocolo adaptado para estudo da via glicolítica, foram realizados levantamentos bibliográficos das metodologias aplicadas em aulas práticas de graduação. Entre as metodologias descritas no livro: Bioquímica: aulas práticas (UFPR), empregava-se hemácias como células consumidoras de glucose. Dada a necessidade de aprovação em comitê de ética em pesquisa e caracterização de material de origem biológica para uso em laboratório essa metodologia não estava sendo aplicada nas aulas práticas da disciplina. Desta forma, a via central de metabolismo energético celular não estava sendo trabalhada nas aulas práticas.

Dado que leveduras se utilizam dessa via para formação de etanol, esse trabalho teve como proposta avaliar a substituição de hemácias por leveduras para estudos da via glicolítica. As leveduras são facilmente obtidas, sendo comercializadas como fermento biológico, de baixo custo e sem problemas de contaminação.

Para realização da prática foi preparada uma solução com 7,5 g de células de *S. cerevisiae* em 50 mL de tampão fosfato pH 7,4. Em seguida, foram preparados 4 tubos de ensaio, com as seguintes condições:

- 1- 1,5 mL de solução de *S. cerevisiae* + 3,5 mL de tampão fosfato pH 7,4;
- 2- 1,5 mL de solução de *S. cerevisiae* + 0,5 mL de solução de glucose 10% + 3,0 mL de tampão fosfato pH 7,4;
- 3- 1,5 mL de solução de *S. cerevisiae* + 0,5 mL de solução de glucose 10% + 0,5 mL de solução de fluoreto de sódio 1% + 2,5 mL de tampão fosfato pH 7,4;
- 4- 1,5 mL de solução de *S. cerevisiae* + 0,5 mL de solução de glucose 10% + 0,5 mL de solução de citrato de sódio 1% + 2,5 mL de tampão fosfato pH 7,4.

Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C, e retiradas alíquotas de 0,6 mL das amostras nos tempos de 0, 5, 10, 20 e 40 minutos. As amostras foram transferidas para tubos contendo 5,4 mL de ácido tricloroacético (TCA). Posteriormente, os

tubos foram centrifugados por 5 minutos a 3.000 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos, por decantação, para tubos limpos e utilizados para a dosagem de glucose pelo método de Somogyi-Nelson.

O método de Somogyi-Nelson, se baseia na propriedade que alguns açúcares apresentam em reduzir o íon cúprico em íon cuproso e também na reação de molibdatos, sob certas condições, com arseniados, silicatos, entre outros, para formar complexos heteropolares que, após redução controlada, fornece um composto azul de molibdênio que poderá ser mensurado espectrofotometricamente. Os açúcares redutores da amostra em questão, aquecidos em meio alcalino, transformam-se em enedióis que reduzem o íon cúprico presente no reativo de Somogyi, a íon cuproso. O óxido cuproso (Cu_2O), assim formado, reduz o composto arsênio-molibídico para óxido de molibdênio de coloração azul cuja intensidade de cor é proporcional a quantidade de açúcares redutores existentes na amostra (NELSON, 1944).

Para a realização do método foram preparados tubos com 1 mL da amostra de cada tempo de incubação e adicionado 1 mL do reativo de Somogyi com posterior incubação a 100 °C por 10 minutos. Após resfriamento, foi adicionado 1 mL do reativo de Nelson e 7 mL de água destilada. Também foi preparado um tubo branco com água destilada no lugar da amostra, para calibração do aparelho. Realizou-se então a leitura da absorbância em 540 nm em espectrofotômetro Kasuaki. Os testes foram realizados em triplicata.

Para a determinação da concentração de glucose presente nos tubos, os dados foram substituídos em curva padrão de glucose, construída variando a concentração de 0-0,20 mg/mL deste analito, pelo método de Somogyi-Nelson.

Resultados

A partir da construção da curva padrão foi obtida a equação da reta que descreve a relação absorbância e concentração de glucose, que foi então utilizada para o cálculo da concentração de glucose presente nas diferentes condições testadas.

Grafico 1 – Curva padrão de glucose pelo Método Somogyi-Nelson

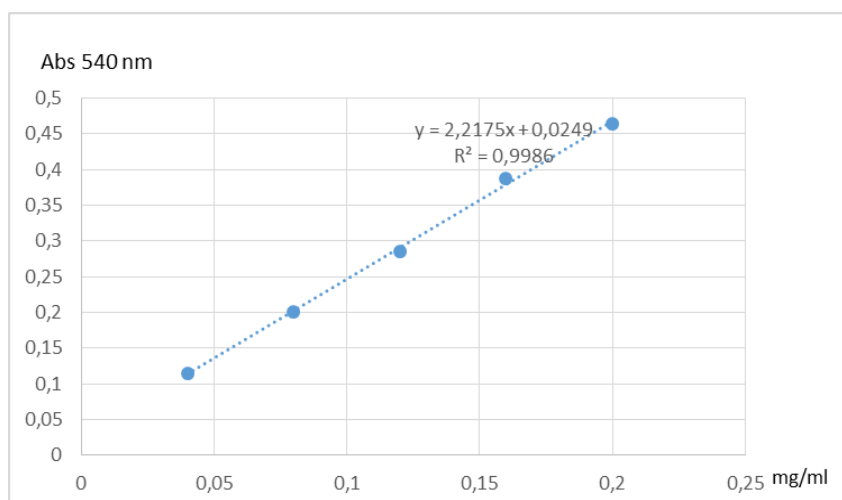
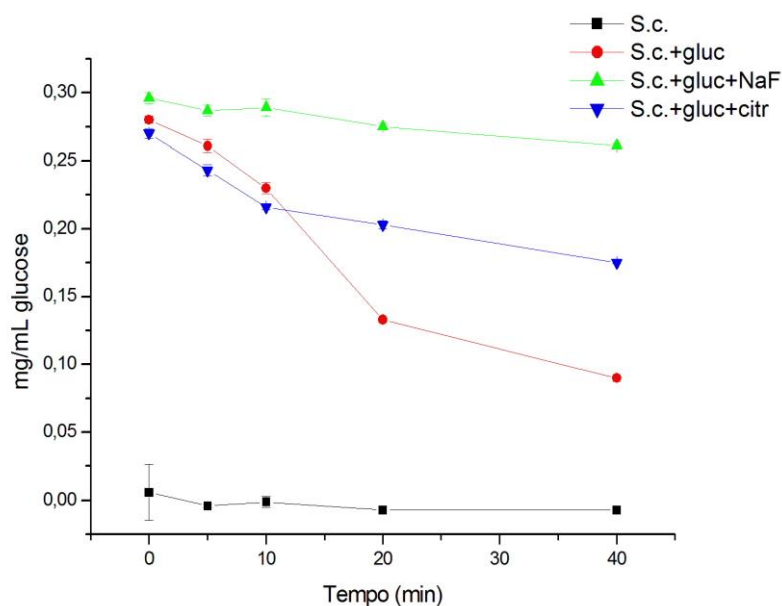


Gráfico 2 – Consumo de glucose por *S. cerevisiae*



Legenda: Quadrado: Tubo 1- *S. cerevisiae* (S.c.); Círculo: Tubo 2- S.c., glucose 1%(v/v), triângulo: Tubo 3- S.c., glucose 1% e NaF 0,1%(v/v); triângulo invertido: Tubo 4- S.c., glucose 1%(v/v) e citrato de sódio 0,1% (v/v).

A figura 2 mostra que no tubo 1 não é detectada a presença de glucose, conforme o esperado. Quando o *S. cerevisiae* foi incubado na presença de glucose (tubo 2) houve diminuição de sua concentração com o passar do tempo, uma vez que as células de *S. cerevisiae* metabolizam a esse carboidrato pela via glicolítica, gerando etanol e dióxido de carbono.

Quando as células foram incubadas na presença do inibidor da via glicolítica fluoreto de sódio (tubo 3), as concentrações de glucose não reduziram significativamente em função do tempo em comparação com o tubo 2, sem o inibidor. Tal resultado pode ser explicado pela inibição da enzima da via glicolítica enolase, que é responsável pela conversão de 2-fosfoglicerato em fosfenolpiruvato, penúltima reação da glicólise. Desta forma, o consumo de glucose por essa via fica bloqueado.

Quando foi adicionado ao tubo 4 o citrato de sódio, inibidor do Ciclo de Krebs, ainda foi observado o consumo de glucose em função do tempo pelas células. Isso ocorre porque a fermentação é um dos 3 destinos do piruvato e não envolve o ciclo de Krebs nesta etapa. Desta forma, este inibidor não afeta o processo em si.

Considerações Finais

Com a execução desse experimento foi possível realizar a adaptação de um protocolo para aula prática de bioquímica básica. Desta forma, objetiva-se para melhorar a didática e o entendimento dos alunos sobre a via glicolítica, favorecendo a correlação com o conteúdo teóricas. Também foi abordado o conhecimento sobre o uso da espectrofotometria. A proposta do roteiro é que a prática seja realizada em duas aulas uma para construção da curva e padrão e a seguinte para a obtenção dos resultados. Desta forma, pretende-se contribuir para a assimilação dos conceitos envolvidos no metabolismo oxidativo de carboidratos.

APOIO: PROEX, UEPG e Fundação Araucária.

Referências

GUEDES, Levy dos Santos. **Manual de aulas práticas**. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2007.

HARPER, Robert K. Murray. **Bioquímica ilustrada**. 26ª edição. São Paulo, Atheneu, 2006.

LEHNINGER, A.; NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 5a Ed. SP/SP, Editora Sarvier, 2011.

NASCIMENTO, A. J. et al. **Bioquímica – aulas práticas**. 6ª. Ed. Editora UFPR, 2002.

NELSON, N. **A fotometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose**. *J.Biol.Chem.* , v. 153, p. 375-80, 1944.