

Doseamento de açúcares solúveis de uvas (continuação):

- ✓ Cálculos e análise de resultados

Energia no sangue:

- ✓ Principais funções que requerem energia
- ✓ Glucose como fonte de energia
- ✓ Valores de referência da glucose em várias espécies

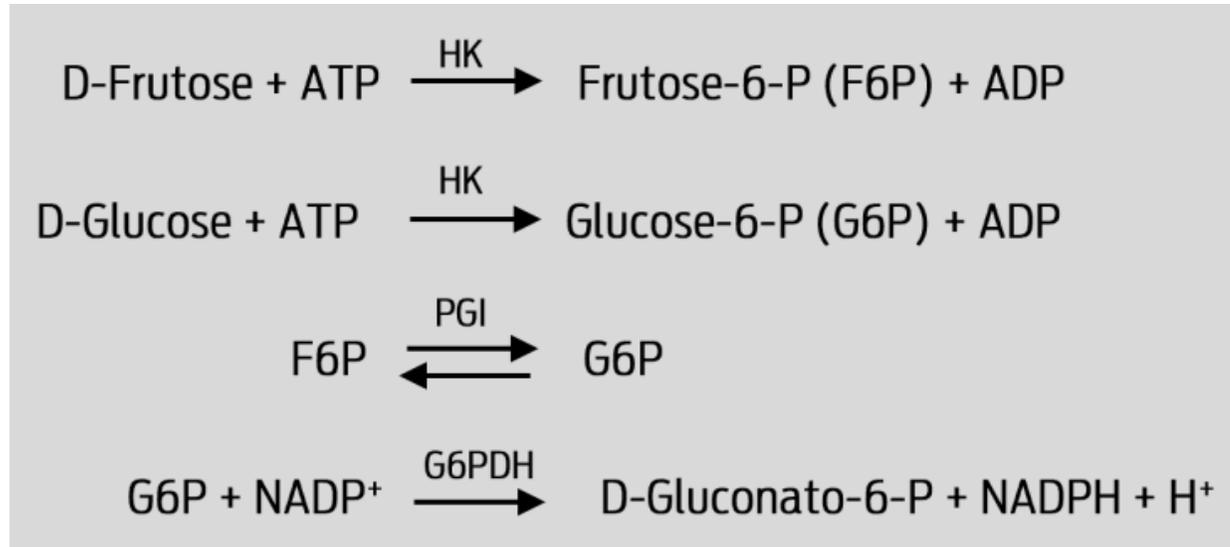
Doseamento de glucose em sangue:

- ✓ Método UV (enzimático)
- ✓ Cálculos

Doseamento de açúcares solúveis de uvas:

- ✓ Método UV, enzimático

## 2. Quantificação de sacarose/ D-glucose/ D-frutose, método UV



### Condições de ensaio UV (Nzytech, AK00201)

- Comprimento de onda (l) de leitura: 340 nm
- Temperatura  $\approx 25^\circ\text{C}$
- Volume de amostra diluída: 0,010 mL
- Diluição da amostra: 1 para 400
- Volume final: 0,242 mL D-glucose; 0,244 mL D-frutose

Doseamento de açúcares solúveis:

- ✓ Brix (revisão)
- ✓ Métodos enzimáticos

## 2. Quantificação de sacarose/ D-glucose/ D-frutose, método UV (cont.)

Tabela 1. Sequência de ensaios a realizar para a quantificação de sacarose, D-glucose e D-frutose, de cada amostra

Procedimento sequencial	Sacarose		Glucose e Frutose	
As soluções e amostras são mantidas a 4°C. Agitar e aquecer cada solução, com as mãos, antes de pipetar.	Branco (célula A1)	Amostra (célula A2)	Branco (célula A3)	Amostra (célula A4)
Solução 6 +7 tampão pH 4,6 + $\beta$ -fructosidase	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L	---	---
Amostra diluída	---	10 $\mu$ L	---	10 $\mu$ L
Água destilada	200 $\mu$ L	190 $\mu$ L	220 $\mu$ L	210 $\mu$ L
Mix Manter a $\approx 25^{\circ}\text{C}$ durante 5 min O tempo pode ser ultrapassado				
Solução 1 tampão pH 7.6	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Solução 2 NADP <sup>+</sup> + ATP	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Mix Manter a $\approx 25^{\circ}\text{C}$ durante 5 min O tempo pode ser ultrapassado Ler a absorvância a 340 nm (A1)				

### Doseamento de açúcares solúveis:

✓ Brix (revisão)

✓ Métodos enzimáticos

## 2. Quantificação de sacarose/ D-glucose/ D-frutose, método UV (cont.)

Suspensão 3 Hexocinase + Glucose-6-P Desidrogenase (G6PDH)	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Mix Manter a ≈25°C durante 10 min Ler a absorvância a 340 nm (A2) Repetir a leitura, se necessário	<b>D-Glucose (resultante da hidrólise da sacarose + existente no sumo) + Hexocinase + ATP → Glucose-6-P + ADP</b> Glucose-6-P + NADP <sup>+</sup> + G6PDH → Gluconato-6-P + NADPH + H <sup>+</sup>		<b>D-Glucose (existente no sumo) + Hexocinase + ATP → Glucose-6-P + ADP</b> Glucose-6-P + NADP <sup>+</sup> + G6PDH → Gluconato-6-P + NADPH + H <sup>+</sup>	
Cálculos	$\Delta\text{Abs branco S (cel. 1)} = A2 - A1$ $\Delta\text{Abs amostra S (cel. 2)} = A2 - A1$ <b><math>\Delta\text{Abs D-Glucose Total} = \Delta\text{Abs amostra sac.} - \Delta\text{Abs branco S}</math></b>		$\Delta\text{Abs branco G (cel. 1)} = A2 - A1$ $\Delta\text{Abs amostra G (cel. 2)} = A2 - A1$ <b><math>\Delta\text{Abs D-Glucose} = \Delta\text{Abs amostra G} - \Delta\text{Abs branco G}</math></b>	
	<b><math>\Delta A \text{ Sacarose} = \Delta\text{Abs D-Glucose Total} - \Delta\text{Abs D-Glucose}</math></b>			
Suspensão 4 Fosfoglucose isomerase (PGI)	---	---	2 µL	2 µL
Mix Manter a ≈25°C durante 10 min Ler a absorvância a 340 nm Repetir a leitura, se necessário			<b>Frutose-6-Fosfato (existente no sumo) + PGI → Glucose-6-P</b> Glucose-6-P + NADP <sup>+</sup> + G6PDH → Gluconato-6-P + NADPH + H <sup>+</sup>	

Doseamento de açúcares solúveis:

- ✓ Brix (revisão)
- ✓ Métodos enzimáticos

## 2. Quantificação de sacarose/ D-glucose/ D-frutose, método UV (cont.)

Cálculos	$\Delta\text{Abs branco F (cel. 1)} = A3 - A2$ $\Delta\text{Abs amostra F (cel. 2)} = A3 - A2$  $\Delta\text{Abs D-Frutose} = \Delta\text{Abs amostra F} - \Delta\text{Abs branco F}$
	$[\text{D-Glucose}] \text{ g/L} = 0,6920 \times \Delta\text{Abs D-Glucose}$  $[\text{D-Sacarose}] \text{ g/L} = 1,315 \times \Delta\text{Abs Sacarose}$  $[\text{D-Frutose}] \text{ g/L} = 0,6978 \times \Delta\text{Abs D-Frutose}$

## 3. Cálculos e discussão dos resultados

Qual o conteúdo de sacarose, D-glucose e D-frutose em 100 mL de uvas.

Acha expectável que o total de açúcares solúveis (sacarose, glucose e frutose) existente nas uvas obtidas de videiras inoculadas e não inoculadas seja significativamente diferente?

E a razão glucose/frutose? Espera que a razão [(glucose + frutose) / sacarose] seja idêntica nas uvas obtidas de videiras inoculadas e não inoculadas?

Justifique as suas respostas

# Metabolismo Energético

## TP

Doseamento de açúcares solúveis:

- ✓ Brix (revisão)
- ✓ Métodos enzimáticos

### Problema

Determine o conteúdo de sacarose, D-glucose D-frutose existente em 100 mL de amostra diluída, com base nos valores de absorvância (340 nm) apresentados abaixo.

	1	2	3	4
A	Suc Blank	Suc Sample	F+G Blank	F+G Sample
B	Suc Blank	Suc Sample	F+G Blank	F+G Sample
C	Suc Blank	Suc Sample	F+G Blank	F+G Sample

Leitura Abs 2

	1	2	3	4
A	0,290	1,192	0,288	1,089
D	0,293	1,189	0,284	1,084
C	0,289	1,180	0,288	1,083

Leitura Abs1

	1	2	3	4
A	0,280	0,282	0,278	0,280
D	0,283	0,283	0,278	0,284
C	0,279	0,280	0,281	0,283

Leitura Abs 3

	1	2	3	4
A	0,290	1,192	0,288	1,789
D	0,293	1,189	0,286	1,774
C	0,289	1,180	0,288	1,783

### Energia no sangue

*Os eritrócitos necessitam de energia para que funções celulares?*

### Energia no sangue

Os eritrócitos necessitam de energia para manter uma série de funções celulares vitais, que incluem:

- (1) manutenção da glicólise;
- (2) manutenção do gradiente eletrolítico entre o plasma e o citoplasma eritrocitário através da atividade de bombas de membrana acionadas por trifosfato de adenosina (ATP);
- (3) síntese de glutatona e outros metabolitos;
- (4) metabolismo da purina e pirimidina;
- (5) manutenção do ferro da hemoglobina no seu estado funcional, reduzido e ferroso;
- (6) proteção das enzimas metabólicas, hemoglobina e proteínas de membrana contra a desnaturação oxidativa;
- (7) preservação da assimetria fosfolipídica da membrana.

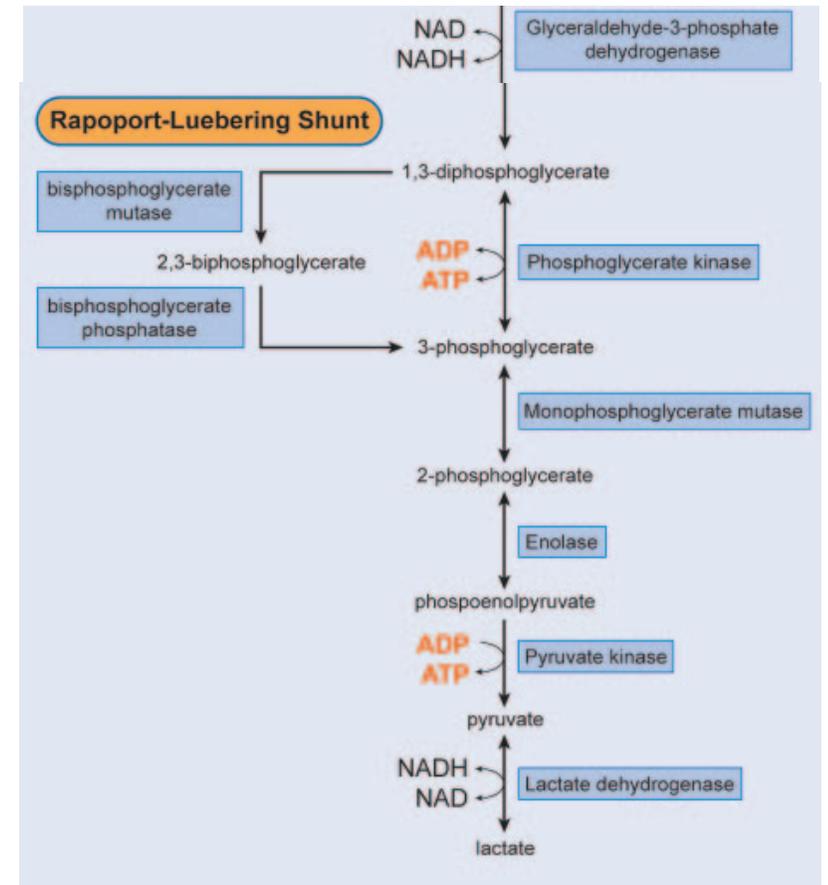
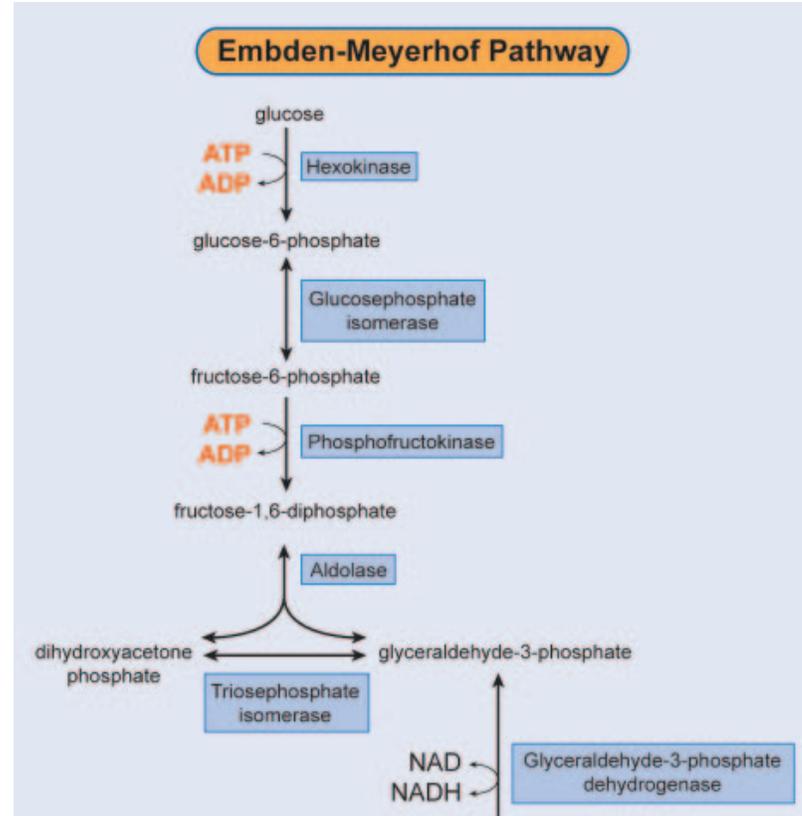
# Metabolismo Energético

## TP 6

### Energia do sangue

Na ausência de núcleo e mitocôndrias, como se forma energia nos eritrócitos?

### Energia no sangue



**Figure 1.** Conversão anaeróbia de glicose pela via de Embden-Meyerhof para geração e armazenamento de ATP em eritrócitos, e o *bypass* glicolítico exclusivo para a produção de 2,3-bifosfoglicerato (2,3-DPG), o *shunt* Rapoport-Luebering. Esse *shunt* contorna a etapa da fosfoglicerato cinase (PGK) e é responsável pela síntese e regulação dos níveis de 2,3-DPG que diminuem a afinidade da hemoglobina para o oxigênio. Além disso, o 2,3-DPG constitui um tampão de energia.

### Energia do sangue

Valores de referência de glucose no sangue em várias espécies

### Energia no sangue



Valores por 100 g de parte edível

Cod	Nome do alimento	Energia [kcal]	Energia [kJ]	Lípidos [g]	Hidr. de C [g]	Açúcares [g]	Oligossacárid [g]	Amido [g]	Proteínas [g]
1223	Sangue de porco, cru	72	304	0,4	0,4	0,1	0	0	16,6

<https://portfir-insa.min-saude.pt/>

Atualizado em 05-05-2023

Tabela 9: Níveis de glicose (mg/dL) em algumas espécies de aves.

<b>Avestruz</b>	<b>Falcão</b>	<b>Pombo</b>	<b>Papagaio cinza</b>	<b>Cacatua</b>	<b>Arara</b>	<b>Galinha</b>
187,2-246,6	297-396	232,2-369	205,2-289	230,4-316,8	216-322,2	130-270

Em seres humanos os valores de referência em glucose no sangue são 70 a 110 mg/dL

## 2. Quantificação de D-glucose do sangue de galinha , método UV (cont.)

- Sabendo os limites de detecção do método e os valores de referência da amostra, calcule uma diluição adequada para proceder ao doseamento da D-glucose.
- Proceda à diluição, utilizando uma pipeta automática e um balão volumétrico adequados para perfazer o volume final pretendido.
- Agite por inversão.
- Recolha  $\approx 1$  mL para um microtubo Eppendorf.
- Numa microplaca proceda aos ensaios para a quantificação da D-glucose de uma dada amostra de sangue diluída, em triplicado.
- Efectue os cálculos
- Analise e discuta os resultados obtidos

## 2. Quantificação de D-glucose do sangue de galinha , método UV



## 2. Quantificação de D-glucose do sangue de galinha , método UV

Tabela 1. Sequência de ensaios a realizar para a quantificação de sacarose, D-glucose e D-frutose, de cada amostra

Procedimento sequencial		Glucose e Frutose	
As soluções e amostras são mantidas a 4°C. Agitar e aquecer cada solução, com as mãos, antes de pipetar.		Branco (célula A3)	Amostra (célula A4)
		---	---
Amostra diluída		---	10 µL
Água destilada		220 µL	210 µL
Solução 1 tampão pH 7.6		10 µL	10 µL
Solução 2 NADP <sup>+</sup> + ATP		10 µL	10 µL
<b>Mix</b> Manter a ≈25°C durante 5 min O tempo pode ser ultrapassado Ler a absorvância a 340 nm (A1)			

### 2. Quantificação de D-glucose do sangue de galinha , método UV (cont.)

Suspensão 3 Hexocinase + Glucose-6-P Desidrogenase (G6PDH)	2 µL	2 µL
Mix Manter a ≈25°C durante 10 min Ler a absorvância a 340 nm (A2) Repetir a leitura, se necessário	D-Glucose (existente no sumo) + Hexocinase + ATP → Glucose-6-P + ADP Glucose-6-P + NADP <sup>+</sup> + G6PDH → Gluconato-6-P + NADPH + H <sup>+</sup>	
Cálculos	$\Delta\text{Abs branco G (cel. 1)} = A2 - A1$ $\Delta\text{Abs amostra G (cel. 2)} = A2 - A1$ $\Delta\text{Abs D-Glucose} = \Delta\text{Abs amostra G} - \Delta\text{Abs branco G}$	

Bom trabalho 😊

### Bibliografía



#### D-Glucose HK, UV method

Catalogue number: AK00031, 110 tests (manual) / 1100 tests (microplate)

BLOOD, 15 DECEMBER 2005 • VOLUME 106, NUMBER 13

#### Review article

#### The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis

Richard van Wijk and Wouter W. van Solinge