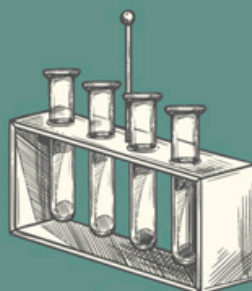
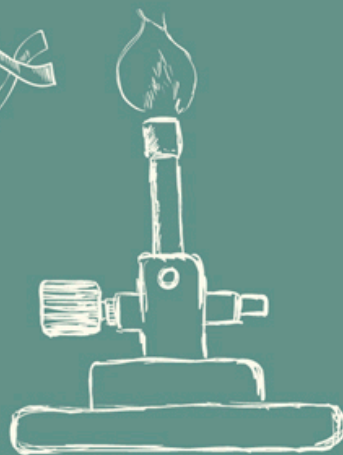


Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022

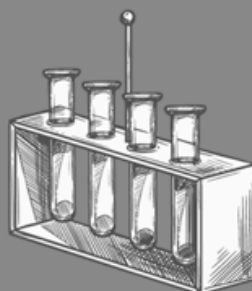
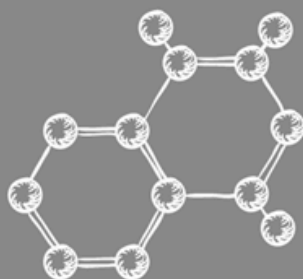


Paulo Afonso Granjeiro
Adriano Guimarães Parreira
Daniel Bonoto Gonçalves
José Antônio da Silva

- organizadores -

Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022



Paulo Afonso Granjeiro
Adriano Guimarães Parreira
Daniel Bonoto Gonçalves
José Antônio da Silva

- organizadores -

Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Bruno Oliveira

Camila Alves de Cremona

Luiza Alves Batista

Natália Sandrini de Azevedo

Edição de arte da capa

Vinícius Souza Tarabal

2022 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2022 Os autores

Copyright da edição © 2022 Atena

Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano

Profª Drª Amanda Vasconcelos Guimarães – Universidade Federal de Lavras

Profª Drª Andrezza Miguel da Silva – Universidade do Estado de Mato Grosso

Prof. Dr. Arinaldo Pereira da Silva – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Profª Drª Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados

Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia

Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Edevaldo de Castro Monteiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Jael Soares Batista – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Jayme Augusto Peres – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Renato Jaqueto Goes – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Práticas em bioquímica analítica

Diagramação: Camila Alves de Cremona
Correção: Flávia Roberta Barão
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadores: Paulo Afonso Granjeiro
 Adriano Guimarães Parreira
 Daniel Bonoto Gonçalves
 José Antônio da Silva

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)	
P912	Práticas em bioquímica analítica / Organizadores Paulo Afonso Granjeiro, Adriano Guimarães Parreira, Daniel Bonoto Gonçalves, et al. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022. Outro organizador José Antônio da Silva Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-65-258-0709-6 DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.096221411 1. Bioquímica. I. Granjeiro, Paulo Afonso (Organizador). II. Parreira, Adriano Guimarães (Organizador). III. Gonçalves, Daniel Bonoto (Organizador). IV. Título. CDD 572
Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166	

Atena Editora
 Ponta Grossa – Paraná – Brasil
 Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

PREFÁCIO

Medida pelos mais variados parâmetros, é incontestável a expansão das informações científicas produzidas nas últimas décadas. Em particular, a Bioquímica atravessa um período de aumento exponencial de conhecimentos.

Muitos desses conhecimentos têm sido aplicados, com uma velocidade e uma eficiência sem precedentes, na melhoria das condições de vida e bem-estar dos seres humanos. A saúde pública, a produção de alimentos, as matrizes energéticas, o cuidado com o meio ambiente e inúmeros outros setores da vida social têm sido beneficiados pelo contínuo fluxo das informações originadas nos laboratórios de pesquisa.

Para os profissionais envolvidos no ensino de Bioquímica, o crescimento vertiginoso dessa área agravou um crônico paradoxo curricular: o aumento do volume de informações e a manutenção do tempo destinado ao seu ensino.

Uma consequência perceptível desse conflito é a redução das atividades práticas de muitas disciplinas, em franca contradição com o fato de ser a Bioquímica uma ciência experimental. As atividades práticas de laboratório precisam, por isso, ser criteriosamente escolhidas para cumprir seu papel educativo.

A seleção dos experimentos de Bioquímica passa agora a ter um suporte valioso: três docentes da Universidade Federal de São João del Rei e um docente da Universidade Estadual de Minas Gerais, auxiliados por seus estudantes, reuniram, em um *e-book*, **Práticas em Bioquímica Analítica**, um conjunto de experimentos testados, aplicados rotineiramente e minuciosamente descritos.

Cada experimento ou módulo é iniciado com uma introdução teórica, seguida dos objetivos que devem ser alcançados pelos alunos e, naturalmente, pelos materiais e métodos a serem utilizados e o protocolo detalhado da atividade a ser realizada. Quando pertinente, é introduzida uma seção intitulada Curiosidades, com informações contextualizadas sobre o assunto em estudo. Para um aprofundamento no assunto, cada experimento é seguido de uma lista de referências bibliográficas. Estão contempladas as unidades programáticas principais do estudo de Bioquímica, precedidas por um excelente capítulo versando sobre segurança e boas práticas de laboratório.

Naturalmente, a totalidade de experimentos apresentados não poderia ser aplicada nas disciplinas comuns de diferentes habilitações – eles foram padronizados para o curso de Bacharelado em Bioquímica. Entretanto, trata-se de um rico repertório de atividades que poderão ser usadas de forma independente ou servir como modelo para adaptações e ajustes às condições de cada instituição e aos objetivos de cada docente.

Os docentes e alunos de Bioquímica ficam agradecidos à equipe autora das **Práticas em Bioquímica Analítica**!

Bayardo Baptista Torres

Professor Sênior - Departamento de Bioquímica. Laboratório de Ensino de
Bioquímica. Universidade de São Paulo - USP

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..... 1

BIOSSEGURANÇA

Daniel Bonoto Gonçalves
Adriano Guimarães Parreira
Anderson Fernandes de Melo
Wanderson Duarte Penido
Anna Kelly Moura Silva
Nayara Lizandra Leal Cardoso
Raquel Valinhas e Valinhas
Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214111>

CAPÍTULO 2..... 13

PREPARO DE SOLUÇÕES

Daniel Bonoto Gonçalves
Nayara Lizandra Leal Cardoso
Adriano Guimarães Parreira
Vinícius Souza Tarabal
Wanderson Duarte Penido
Júlia Antunes Tavares Ribeiro

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214112>

CAPÍTULO 3..... 18

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SEMENTES

Jose Antonio da Silva
Maria Auxiliadora de Oliveira
Nayara Lizandra Leal Cardoso
Klédna Constância Portes Reis
Anna Kelly Moura Silva
Júlia Antunes Tavares Ribeiro

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214113>

CAPÍTULO 4..... 25

PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SEMENTES

José Antonio da Silva
Maria Auxiliadora de Oliveira
Nayara Lizandra Leal Cardoso
Diego Fernandes Livio
Raquel Valinhas e Valinhas

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214114>

CAPÍTULO 5.....32

DOSAGEM DE PROTEÍNAS – MÉTODO BRADFORD

José Antonio da Silva
Maria Auxiliadora de Oliveira
Nayara Lizandra Leal Cardoso
Diego Fernandes Livio
Raquel Valinhas e Valinhas

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214115>

CAPÍTULO 6.....37

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

José Antonio da Silva
Thaís Paula Rodrigues Gonçalves
Priscila Amaral Diniz
Anderson Fernandes de Melo
Diego Fernandes Livio
Anna Kelly Moura Silva

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214116>

CAPÍTULO 7.....45

DOSAGEM DE INIBIDORES DE PROTEASES

José Antonio da Silva
Luísa Ferreira da Cruz
Júlia Antunes Tavares Ribeiro
Diego Fernandes Livio
Thaís Paula Rodrigues Gonçalves
Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214117>

CAPÍTULO 8.....55

ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO

José Antonio da Silva
Júlia Antunes Tavares Ribeiro
Thaís Paula Rodrigues Gonçalves
Vinícius Souza Tarabal
Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves Gonçalves
Anderson Fernandes de Melo

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214118>

CAPÍTULO 9.....63

ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL

José Antonio da Silva
Luísa Ferreira da Cruz
Thaís Paula Rodrigues Gonçalves

Priscila Amaral Diniz
Anna Kelly Moura Silva
Klédna Constância Portes Reis

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.0962214119>

CAPÍTULO 10..... 73

GRAU DE PURIFICAÇÃO E RENDIMENTO DE PROTEÍNAS

José Antonio da Silva
Paulo Afonso Granjeiro

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141110>

CAPÍTULO 11..... 79

PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

Paulo Afonso Granjeiro
Diego Fernandes Livio
Maria Auxiliadora de Oliveira
Adriano Guimarães Parreira
Vinícius Souza Tarabal
Tuânia Natacha Lopes Silva

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141111>

CAPÍTULO 12..... 91

CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDIOS

Paulo Afonso Granjeiro
Diego Fernandes Livio
Maria Auxiliadora de Oliveira
Adriano Guimarães Parreira
Vinícius Souza Tarabal
Tuânia Natacha Lopes Silva

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141112>

CAPÍTULO 13..... 103

PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS

Paulo Afonso Granjeiro
Raquel Valinhas
Heloísa Carneiro Colares
Tuânia Natacha Lopes Silva
Luísa Ferreira da Cruz
Felipe Ferreira Silva
Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141113>

CAPÍTULO 14..... 112

CARACTERIZAÇÃO DE CARBOIDRATOS

Paulo Afonso Granjeiro
Heloísa Carneiro Colares
Raquel Valinhas
Luísa Ferreira da Cruz
Felipe Ferreira Silva
Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141114>

CAPÍTULO 15..... 121

EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Daniel Bonoto Gonçalves
Felipe Ferreira Silva
Priscila Amaral Diniz
Heloísa Carneiro Colares
Klédna Constância Portes Reis
Wanderson Duarte Penido
Anderson Fernandes de Melo

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141115>

CAPÍTULO 16..... 129

CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Daniel Bonoto Gonçalves
Felipe Ferreira Silva
Priscila Amaral Diniz
Heloísa Carneiro Colares
Klédna Constância Portes Reis
Wanderson Duarte Penido
Anderson Fernandes de Melo

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141116>

RESPOSTAS DAS QUESTÕES..... 137

SOBRE OS ORGANIZADORES 147

SOBRE OS AUTORES 149

CAPÍTULO 1

BIOSSEGURANÇA

Daniel Bonoto Gonçalves

Adriano Guimarães Parreira

Anderson Fernandes de Melo

Wanderson Duarte Penido

Anna Kelly Moura Silva

Nayara Lizandra Leal Cardoso

Raquel Valinhas e Valinhas

Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves

1. INTRODUÇÃO

O termo Biossegurança é complexo, interdisciplinar e pode variar de acordo com o contexto no qual está inserido. De maneira geral, a Biossegurança, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é o conjunto de medidas destinadas a prevenir, minimizar ou eliminar riscos inerentes às atividades de laboratórios, seja ele de pesquisa, ensino, desenvolvimento tecnológico ou prestação de serviços, que possam comprometer a saúde dos profissionais e meio ambiente (ANVISA, 2013). Isso significa dizer que a biossegurança está intimamente ligada às ações tomadas no ambiente laboratorial, que irão garantir a

segurança e integridade física tanto pessoal, quanto ambiental, e a qualidade dos resultados.

O Brasil possui duas vertentes de biossegurança. A biossegurança legal trata de assuntos ligados a Organismos Geneticamente Modificados e células tronco, e a Biossegurança praticada, que será abordada aqui, abrange os riscos químicos, físicos, biológicos, radioativos, ergonômicos e de acidentes que podem ocorrer em ambientes laboratoriais (SANGIONI *et al.*, 2013).

Ambientes laboratoriais universitários que são utilizados para aulas práticas e também para pesquisa, apresentam agentes de risco, sendo dessa forma necessário aos usuários agirem baseados nos princípios da biossegurança. Estes riscos são avaliados em função dos tipos de agentes e atividades a serem realizadas, e, mediante essa avaliação pode ser classificado em 4 níveis: NB-1; NB-2; NB-3 e NB-4. Os níveis de biossegurança são utilizados para definir, de forma crescente, os graus de contenção e complexidade de proteção que o ambiente deve ter. É utilizado a combinação das práticas e técnicas laboratoriais com os elementos de contenção, que são as barreiras primárias, também conhecidas como EPIs e EPCs, e barreiras secundárias que estão relacionadas à estrutura física em si (ANVISA, 2013).

As atividades realizadas em laboratório

requerem do usuário uma série de cuidados, justificada pelo risco à saúde, em função do possível manuseio de material biológico contaminado, bem como a utilização de vidrarias, equipamentos e produtos químicos (KUMAR, 2015). Na prática, as normas e procedimentos visam facilitar a compreensão e aplicação de metodologias mais seguras, baseadas no trabalho rotineiro do laboratório, que pode ser considerada sinônimo de uma boa técnica. Vale ressaltar que não há cabine de segurança biológica, nem qualquer outro equipamento e procedimento que por si só seja capaz de garantir a segurança, a não ser que seus usuários apliquem técnicas seguras baseadas na informação e compreensão da biossegurança (ANVISA, 2005).

Equipamentos de Proteção Individual e Coletivo

Com o início da Revolução Industrial, a saúde e a segurança do trabalhador tinham pouca relevância. Com o aumento da produção, houve um aumento de lesões e mortes dos trabalhadores, surgindo a necessidade do desenvolvimento de soluções de proteção ao trabalhador (SEIDEL, 2012).

Os acidentes são evitados com a aplicação de medidas específicas de segurança, selecionadas de forma a estabelecer maior eficácia na prática. As prioridades são: eliminação do risco; neutralização do risco e sinalização do risco (SANTOS, 2017). As medidas de proteção existentes em um laboratório são classificadas como barreiras primárias e secundárias. Dentre as barreiras primárias estão os equipamentos de proteção individual (EPIs) e os equipamentos de proteção coletiva (EPCs), que podem reduzir ou eliminar a exposição individual a agentes potencialmente perigosos (REIS; GALINDO, 2020). As barreiras secundárias constituem-se de medidas específicas para infraestrutura predial e instalações do laboratório (MIGUEL *et al.*, 2017).

A fim de proteger a integridade física do trabalhador é necessário a utilização dos EPIs que podem ser dispositivos ou produtos, de uso individual, a serem utilizados pelo empregado, sendo destinados à proteção de riscos suscetíveis de ameaçar a segurança e a saúde no trabalho. O seu fornecimento ao trabalhador é uma obrigação da empresa, deve ser fornecido gratuitamente e estar à disposição em número suficiente nos postos de trabalho, devendo ainda apresentar o Certificado de Aprovação (C.A.), fornecido pelo fabricante ou importador (DE CASTRO; ANDRADE, 2012; SEIDEL, 2012; BRASIL, 2021). Exemplos de EPIs estão demonstrados na figura 1.

Os EPIs somente devem ser providenciados quando as medidas de ordem coletiva e/ou administrativas não forem suficientes para eliminar ou minimizar os riscos aos quais os trabalhadores estão expostos. Quando definido por seu uso, devem ser atendidas todas as exigências estabelecidas na Norma Regulamentadora NR-06, onde é determinada a natureza da proteção a ser adotada conforme as seguintes necessidades: proteção da cabeça; proteção dos olhos e face; proteção auditiva; proteção respiratória; proteção do

tronco; proteção dos membros superiores; proteção dos membros inferiores; proteção do corpo inteiro; proteção contra quedas com diferença de nível (FILHO; GREGÓRIO; PORCIUNCULA, 2017).

As medidas de proteção coletiva devem ser priorizadas conforme determina a legislação de Segurança e Medicina do Trabalho. Os EPCs são aqueles que possibilitam a proteção do trabalhador e do meio ambiente em uma determinada área, como por exemplo: sistema de exaustão (elimina gases, vapores ou poeiras contaminantes); autoclaves (equipamento responsável por fazer esterilização de objetos resistentes a altas temperaturas e vapor intenso); cabines de segurança biológica (equipamentos com sistema de filtração de ar que protegem o trabalhador durante a manipulação de materiais biológicos); chuveiro de emergência e lava-olhos (para acidentes com produtos químicos ou com material biológico que pode ser acionado para minimização de danos no corpo ou olhos); extintores de incêndio (em caso de incêndios), entre outros (SANTOS, 2017; MIGUEL *et al.*, 2017; REIS; GALINDO, 2020). Exemplos de EPCs estão demonstrados na figura 2.

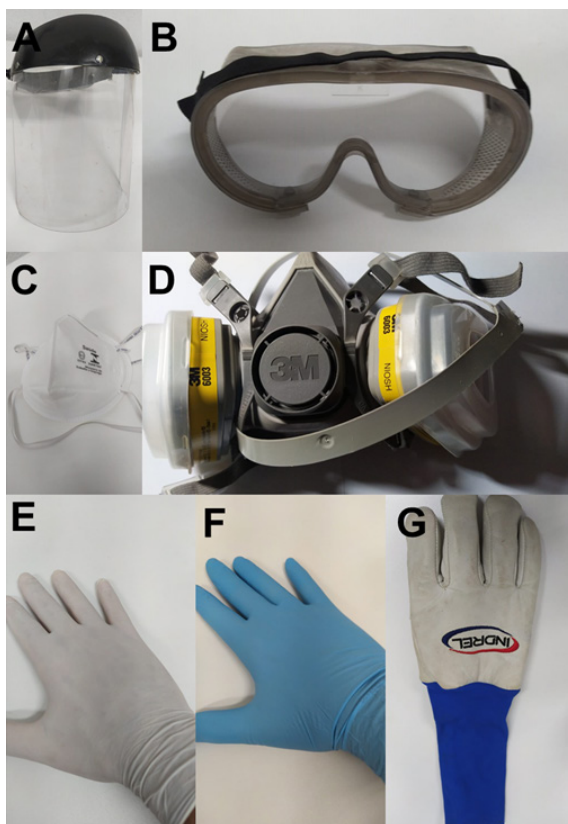


Figura 1 - Equipamentos de Proteção Individual. A: Protetor facial; B: Óculos de proteção; C:

Máscara Pff2; D: Respirador semifacial; E: Luva de procedimento; F: Luva nitrílica e G: Luva criogênica.

Fonte: do próprio autor (2022).



Figura 2 – Equipamentos de Proteção Coletiva. A: Chuveiro Lava olhos, B: Extintor de incêndio. C: Cabine de segurança biológica.

Fonte: do próprio autor (2022).

Boas Práticas e Segurança em Laboratório

Conforme definido pelo Inmetro Norma nº NIT-DICLA-035-10/2019, o termo *boas práticas em laboratório* é um conjunto de pequenas normas (regras) e orientações relacionadas à conduta de trabalho no ambiente laboratorial. As orientações para a atividade de reconhecimento de conformidade das Boas Práticas de Laboratório (BPL) são um sistema de qualidade que abrange o processo organizacional e as condições de estudos relacionados à saúde, segurança e ao meio ambiente, que são planejados, desenvolvidos, monitorados, registrados, arquivados e relatados. Com base no exposto, pode-se perceber que os princípios básicos de BPL são destinados a orientar e garantir segurança às pessoas que os executam e ao ambiente em que são realizados, de maneira a garantir a qualidade,

reprodutividade e integridade dos dados gerados. O Quadro 1 apresenta os princípios da BPL para laboratórios de pesquisa e de aulas práticas.

- Conhecer e aplicar os princípios de BPL;
- O manipulador deverá seguir as normas e regras estabelecidas pelo laboratório;
- A unidade operacional deve ter dimensão adequada aos trabalhos que nela se pretende realizar e ter temperatura ambiente controlada, tendo em vista as características dos ensaios realizados e equipamentos nela existentes.
- A circulação de pessoas deve ser controlada, reduzida ao menor fluxo possível a fim de evitar contaminação e acidentes.
- Verificação das instalações elétricas antes da sua utilização, para que estas sejam mantidas em perfeitas condições e não prejudique a saúde do analista;
- Consultar sempre os POP's evitando assim, cometer erros em procedimentos analíticos, comprometendo a confiabilidade dos resultados;
- Assinar e datar todos os registros e relatórios para indicar sua responsabilidade pelos dados e uso de equipamentos;
- Comunicar prontamente ao técnico/professor da unidade operacional quaisquer desvios verificados através das análises;
- Comunicar ao técnico/professor da unidade operacional quaisquer alterações relevantes do estado de saúde que eventualmente possam ocorrer;
- Usar roupas que não sejam de tecido sintético, jalecos devem ser de mangas compridas, longos (até o joelho), com punhos justos, com abertura frontal, providos de botões de pressão ou velcro e sem bolsos na parte superior;
- Retirar qualquer adorno/adereço, tais como relógios, alianças e brincos, antes de iniciar os trabalhos;
- Usar EPI's apropriados às operações que apresentam riscos potenciais;
- Evitar uso de lentes de contato, quando estiver trabalhando em laboratórios, pois essas podem provocar irritação nos olhos quando em contato com vapores corrosivos;
- Higienizar e esterilizar as mãos antes de iniciar os trabalhos em laboratórios e após deixar a unidade operacional;
- Manter o laboratório sempre limpo e organizado. Gavetas e portas de armários abertas, além de serem risco potencial de acidentes, permitem que poeira e outras sujidades entrem em contato com vidrarias, utensílios e reagentes, podendo contaminá-los.
- Todo usuário deve conhecer a exata localização da caixa de primeiros socorros e do extintor de incêndios e bem como a maneira correta de utilizá-los;
- Em caso de contato de produto químico com os olhos, boca ou pele deve-se lavar a área afetada imediatamente com água e em seguida o indivíduo deve comunicar imediatamente ao técnico/professor da unidade operacional, mesmo que não haja danos pessoais ou materiais;
- Jamais pipetar qualquer substância, nem mesmo amostra com a boca. O uso de pipetadores é indispensável;
- Os equipamentos em funcionamento devem ficar sob vigilância constante. Nunca deixar o laboratório se algum equipamento estiver em operação;
- Seguir todas as normas de segurança estabelecidas para a unidade operacional, reduzindo assim o risco de acidentes que poderiam causar danos às pessoas e ao meio ambiente.

Quadro 1 - Princípios das Boas Práticas de Laboratório para laboratórios de pesquisa e de aulas práticas.

Fonte: Fiocruz (2013); Inmetro (2019).

O usuário deve entrar no laboratório sempre ciente dos procedimentos que realizará (estudar os procedimentos das aulas com antecedência seguindo o que lhe foi orientado), tomando muito cuidado ao manusear os equipamentos e materiais do laboratório. Existindo qualquer dúvida, não se deve prosseguir. Deve-se pedir ajuda, recorrer aos técnicos e profissionais mais experientes e ao supervisor imediato. É dever de todos prezar pelo uso adequado e correta conservação dos equipamentos e instalações.

Nenhum trabalho é tão importante e urgente que não possa ser planejado e executado com segurança. O risco de acidente é maior quando nos acostumamos a conviver com o perigo e achamos que ele faz parte da nossa atividade. Planejar bem o seu experimento, o seu dia de trabalho e a sua técnica a ser executada minimiza os erros, evita o retrabalho, implementa qualidade e promove assertividade nas suas técnicas. A prática em laboratório, seja em nível profissional, seja em nível de aprendizado, exige que regras de segurança e boas práticas sejam rigorosamente seguidas. Os acidentes, tomando as devidas precauções, podem ser evitados, ou ter suas consequências minimizadas.

Gerenciamento de resíduos

As práticas executadas nos laboratórios de pesquisa e ensino geram constantemente diferentes resíduos, sendo que esses apresentam muitas vezes caráter de alta toxicidade e patogenicidade, devendo ser ao final das atividades segregados adequadamente. Esses resíduos, quando manejados de forma inadequada, podem resultar em acidentes com riscos à saúde e ao meio ambiente.

O gerenciamento de resíduos é regulamentado pela resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA e pela ANVISA, a qual assumiu a competência legal de regulamentar os procedimentos internos dos serviços de saúde. De acordo com a Legislação Ambiental os efluentes devem ser descartados conforme parâmetros estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005 e Resolução CONAMA nº 430/2011, e os resíduos sólidos devem obedecer ao estabelecido na norma ABNT NBR 10.004/2004 (Comissão de ensino Técnico do CRQ-IV, 2012).

A Resolução – RDC nº 222, de 28 de março de 2018 da ANVISA regulamenta as Boas Práticas de Gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde (GRSS), a qual é constituída de procedimentos de gestão. Estes procedimentos são planejados e implementados a partir de bases científicas, técnicas, normativas e legais, com o objetivo de minimizar a produção de resíduos e proporcionar um encaminhamento seguro, de forma eficiente, visando à proteção dos trabalhadores, e à preservação da saúde, dos recursos naturais e do meio ambiente. A tabela 1 ilustra a classificação de resíduos de acordo com a RDC 222/2018.

Grupo	Característica
A	Resíduos Biológicos
B	Resíduos Químicos
C	Resíduos Radioativos
D	Resíduos Comuns
E	Resíduos perfurantes, cortantes e abrasivos

Tabela 1 - Classificação de resíduos.

Fonte: Adaptado de ANVISA (2005).

A classificação dos resíduos permite conhecer e identificar os resíduos gerados em decorrência das atividades desenvolvidas nos diversos ambientes laboratoriais, e fornecer subsídios para a implementação e elaboração de um gerenciamento correto. Os resíduos laboratoriais devem ser corretamente separados, e posteriormente recolhidos por uma empresa credenciada, para tratamento adequado. Os resíduos devem passar pelas seguintes etapas de acordo com a RDC 222/2018:

I – Segregação - consiste na separação dos resíduos no momento e local de sua geração, de acordo com as características físicas, químicas, biológicas, o seu estado físico e os riscos envolvidos.

II – Acondicionamento - consiste no ato de embalar os resíduos segregados, em sacos ou recipientes que evitem vazamentos e resistam às ações de punctura e ruptura.

III - Identificação e Rotulagem - consiste no conjunto de medidas que permitem o reconhecimento dos resíduos contidos nos sacos e recipientes, fornecendo informações ao correto manejo dos mesmos (Quadro 2).

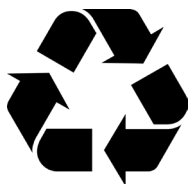
IV – Transporte - consiste no traslado dos resíduos dos pontos de geração até local destinado ao armazenamento temporário ou armazenamento externo com a finalidade de apresentação para a coleta;

V - Armazenamento temporário - consiste na guarda temporária dos recipientes contendo os resíduos já acondicionados, em local próximo aos pontos de geração;

VI – Tratamento - consiste na aplicação de método, técnica ou processo que modifique as características dos riscos inerentes aos resíduos, reduzindo ou eliminando o risco de contaminação, de acidentes ocupacionais ou de danos ao meio ambiente.

Com relação ao acondicionamento e identificação, conforme a Resolução RDC 222/2018 da ANVISA, os resíduos devem ser separados, identificados e quando necessário submetidos a tratamentos requeridos para o posterior descarte. Esses resíduos podem ser

classificados ainda, conforme o Quadro 2.

Resíduos do Grupo A – Biológicos: Todo recipiente para descarte de resíduo biológico deve estar identificado. A substituição do saco de lixo deve ocorrer sempre que o resíduo atingir 2/3 de sua capacidade. Necessidade de tratamento prévio através de esterilização por calor úmido.	Símbolo internacional de risco biológico  Fonte: google imagem
Resíduos do Grupo B – Químicos: Para evitar acidentes, deve ser respeitada a compatibilidade química dos resíduos, os quais devem ser separados por grupos, líquidos inorgânicos, líquidos orgânicos halogenados, líquidos orgânicos não-halogenados, sólidos e metais pesados. Tratamento prévio específicos como neutralização e/ou inativação.	Símbolo de risco de acordo com a NBR 7500 da ABNT  Fonte: google imagem
Resíduos do Grupo C – Resíduos Radioativos: Os resíduos radioativos são quaisquer materiais resultantes de atividades que contenham radionuclídeos. A segregação dos rejeitos radioativos deve ocorrer no momento de sua geração.	Símbolo internacional de radiação ionizante  Fonte: google imagem
Resíduos do Grupo D – Resíduos Comuns: São os resíduos que não apresentam risco biológico, químico ou radiológico à saúde ou ao meio ambiente, podendo ser equiparados aos resíduos domiciliares.	Símbolo de reciclagem  Fonte: google imagem
Resíduos do Grupo E – Resíduos Perfurocortantes: Os resíduos perfurocortantes devem ser descartados separadamente no laboratório, imediatamente após sua geração, em recipientes de paredes rígidas, resistentes à ruptura e vazamento, com tampa, devidamente identificados pela inscrição "PERFUROCORTANTE" e acrescidos dos riscos adicionais químicos e/ou radiológicos.	Símbolo de resíduos perfurocortantes  RESÍDUO PERFUROCORTANTE Fonte: google imagem

Quadro 2 - Classificação dos resíduos e simbologia.

Fonte: Adaptado de ANVISA (2005).

Finalmente, o Programa 5 Rs pode ser utilizado na análise dos resíduos produzidos em laboratórios, como um despertar para a minimização da geração, como mostrado no quadro 3 (UFFC, 2015).

REPENSAR	RECUSAR	REDUZIR	REUTILIZAR	RECICLAR
Refletir sobre a necessidade e os padrões de consumo, bem como a forma de descarte adotado.	Evitar consumo desnecessário e produtos que gerem impactos ambientais significativos.	Evitar desperdícios, consumir menos, preferir produtos com menor potencial de geração de resíduos e maior durabilidade.	Evitar jogar na lixeira o que não é lixo. Reaproveitar tudo o que for possível. Ser criativo na utilização dos produtos	Transformar materiais usados em matérias-primas para outros produtos por meio de processos industriais ou artesanais

Quadro 3 - Descrição dos Princípios dos 5R's.

Fonte: UFFS, 2015.

2 . QUESTÕES

1. Descreva os requisitos de segurança e contenção para cada nível de biossegurança (NB-1 ao NB-4).
2. O que são boas práticas de laboratório e qual órgão é responsável pela determinação dessas boas práticas de laboratório?
3. As práticas executadas nos laboratórios de pesquisa e ensino geram constantemente diferentes resíduos, sendo o laboratório responsável pelo correto gerenciamento de todos os resíduos produzidos. Quais são as etapas de manejo de Resíduos de acordo com RDC 222/2018?
4. Quem é responsável pela indicação do equipamento de proteção correto para cada tipo de trabalho?

3 . CURIOSIDADES

Recentemente, rumores relacionados à biossegurança estiveram em cena no imaginário popular e em teorias da conspiração, todos eles relacionados a este questionamento: teria o vírus SARS-CoV-2, causador da COVID-19, sido gerado em um laboratório de Wuhan, na China, e dele escapado proposital ou acidentalmente?

As comparações iniciais, buscando elucidar a origem do vírus revelaram que o SARS-CoV-2 é aproximadamente 79% semelhante ao SARS-CoV no nível de nucleotídeos. Claro,

os padrões de similaridade variam muito entre os genes, e o SARS-CoV e o SARS-CoV-2 exibem apenas ~ 72% de similaridade de sequência de nucleotídeos na proteína spike (S), a glicoproteína de superfície chave que interage com os receptores da célula hospedeira (Lu *et al.*, 2020). A análise genômica comparativa foi muito auxiliada pela disponibilidade de um vírus relacionado de um morcego *Rhinolophus affinis* (i.e., horseshoe) amostrado na província de Yunnan, China, em 2013 (ZHOU *et al.*, 2020). Este vírus, denominado RaTG13, é ~96% semelhante ao SARS-CoV-2 no nível da sequência de nucleotídeos. Apesar desta semelhança de sequência, SARS-CoV-2 e RaTG13 diferem em uma série de características genômicas principais, provavelmente a mais importante das quais é que SARS-CoV-2 contém uma inserção de sítio de clivagem polibásica (furina) (resíduos PRRA) na junção das subunidades S1 e S2 da proteína S (COUTARD *et al.*, 2020).

O domínio de ligação ao receptor (RBD) na proteína *spike* é a parte mais variável do genoma do coronavírus. Seis aminoácidos RBD mostraram ser críticos para a ligação aos receptores ACE2 e para determinar a gama de hospedeiros de vírus semelhantes ao SARS-CoV. Com base em estudos estruturais e experimentos bioquímicos, o SARS-CoV-2 parece ter um RBD que se liga com alta afinidade à ACE2 de humanos, furões, gatos e outras espécies com alta homologia de receptor. Embora as análises acima sugiram que o SARS-CoV-2 pode se ligar a ACE2 humano com alta afinidade, as análises computacionais preveem que a interação não é ideal e que a sequência RBD é diferente daquelas mostradas no SARS-CoV como sendo ideal para ligação ao receptor. Assim, a ligação de alta afinidade da proteína spike SARS-CoV-2 ao ACE2 humano é muito provavelmente o resultado da seleção natural em um ACE2 humano ou semelhante ao humano que permitiu o surgimento de outra solução de ótima ligação. Esta é uma forte evidência de que o SARS-CoV-2 não é produto de manipulação intencional (ANDERSEN *et al.*, 2020). É importante ressaltar que uma (s) inserção (ões) independente (s) dos aminoácidos PAA no local de clivagem S1 / S2 foi observada recentemente em um vírus (RmYN02) amostrado em meados de 2019 de outro morcego *Rhinolophus* na província de Yunnan, indicando que esses eventos de inserção refletem uma parte natural da evolução contínua do coronavírus (ZHOU *et al.*, 2020).

É improvável que o SARS-CoV-2 tenha surgido por meio da manipulação laboratorial de um coronavírus semelhante ao SARS-CoV. Como observado acima, o RBD de SARS-CoV-2 é otimizado para ligação a ACE2 humano com uma solução eficiente diferente das previamente previstas. Além disso, se a manipulação genética tivesse sido realizada, um dos vários sistemas de genética reversa disponíveis para betacoronavírus provavelmente teria sido usado. No entanto, os dados genéticos mostram de forma irrefutável que o SARS-CoV-2 não é derivado de qualquer backbone de vírus usado anteriormente. Em vez disso, são propostos dois cenários que podem explicar de forma plausível a origem do SARS-CoV-2: (i) seleção natural em um animal hospedeiro antes da transferência zoonótica; e

(ii) seleção natural em humanos após transferência zoonótica. Também foi discutido se a seleção durante a passagem poderia ter dado origem ao SARS-CoV-2 (ANDERSEN *et al.*, 2020). Embora os morcegos sejam provavelmente os hospedeiros reservatórios para este vírus, sua separação ecológica geral dos humanos torna provável que outras espécies de mamíferos atuem como hospedeiros “intermediários” ou “amplificadores”, dentro dos quais o SARS-CoV-2 foi capaz de adquirir algumas ou todas as mutações necessárias para uma transmissão humana eficiente (ZHANG; HOLMES, 2020).

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, K. G.; RAMBAUT, A.; LIPKIN, W. I.; HOLMES, E. C.; GARRY, R. F. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, v. 26, p. 450–452, 2020.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Biossegurança. *Revista Saúde Pública*, v. 39, n. 6, p. 989-991, 2005.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o controle de infecção relacionado à assistência à saúde. Módulo 1: Biossegurança e manutenção de equipamentos em laboratório de microbiologia clínica. Brasília: Anvisa, 2013.

BRASIL. 2021. Norma Regulamentadora NR 6. Disponível em: <https://www.gov.br/trabalho/pt-br/inspecao/seguranca-e-saude-no-trabalho/ctpp-nrs/norma-regulamentadora-no-6-nr-6>. Acesso em: 26 de junho de 2021.

COUTARD, B.; VALLE, C.; DE LAMBALLERIE, X.; CANARD, B.; SEIDAH, N.G.; DECROLY, E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.*, v. 176, p. 104742, 2020.

DE CASTRO, P. G.; ANDRADE, C. A. Biossegurança: Responsabilidade no Cuidado Individual e no Cuidado Coletivo. *Cadernos da Escola de Saúde - UNIBRASIL*. v. 6, n. 1994, p. 218–231, 2012.

INMETRO. Princípios das boas práticas de laboratório – bpl. Norma nº nit-dicla-035. Rev. Nº 04. Aprovada em out/2019.

COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA DA FIOCRUZ PE, 2013. Manual De Biossegurança CPqAM/FIOCRUZ PE. Recife, 2013.

FILHO, A. S. G. DE O.; GREGÓRIO, A. P.; PORCIUNCULA, E. D. G. Procedimento Operacional Padrão. EBSEH - Hospitais Universitários Federais, p. 1-21, 2017.

FIOCRUZ. Comissão interna de biossegurança da fiocruz PE, 2013. Manual de Biossegurança CPqAM/FIOCRUZ, PE. Recife, 2013.

KUMAR, S. Biosafety and Biosecurity issues in biotechnology research. *Biosafety*, v. 4, n. 1, 2015.

LU, R.; ZHAO, X.; LI, J.; NIU, P.; YANG, B.; WU, H.; WANG, W.; SONG, H.; HUANG, B.; ZHU, N. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, v. 395, p. 565-574, 2020.

MIGUEL, F. H.; ZARDETTI, R. M.; CARMO, S.S.; LIMA, V. S.; MIÇO, N. P.; NETO, O. A. A.; FRODER. J. G. Princípios de biossegurança aplicados aos laboratórios de nível 4 com manipulação do vírus ebola. *Revista Conexão Eletrônica*. v. 14, p. 29–46, 2017.

REIS, C. R. S.; GALINDO, E. F. Biossegurança em foco. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz & Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz-PE. p. 1–201, 2020.

SANGIONI, L. A.; PEREIRA, D. I. B.; VOGEL, F. S. F.; BOTTON, S. A. Princípios de biossegurança aplicados aos laboratórios de ensino universitário de microbiologia e parasitologia. *Ciência Rural*, v. 43, n. 1, p. 91-99, 2013.

SANTOS, Z. 2017. Portal SESMT - Nr-6 equipamentos de proteção individual (EPI) e coletiva (EPC). Disponível em: <<https://www.sesmt.com.br/Artigo/nr-6-equipamentos-de-protecao-individual-epi-e-coletiva-epc>>. Acesso em: 20 maio. 2021.

SEIDEL, L. R. Equipamentos de proteção individual e coletivo. *Indaial: UNIASSELVI*. p. 1-192, 2012.

UFFS. Universidade Federal de Fronteira do Sul. Plano de gerenciamento de resíduos dos laboratórios da UFFS Campus Chapecó, 2015, 25p.

ZHANG, Y. Z.; HOLMES, E. C. A Genomic perspective on the origin and emergence of SARS-CoV-2. *Cell*, v. 181, p. 223-227, 2020.

ZHOU, P.; YANG, X.L.; WANG, X.G.; HU, B.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; SI, H.R.; ZHU, Y.; LI, B.; HUANG, C.L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, v. 579, p. 270-273, 2020.

CAPÍTULO 2

PREPARO DE SOLUÇÕES

Daniel Bonoto Gonçalves

Nayara Lizandra Leal Cardoso

Adriano Guimarães Parreira

Vinícius Souza Tarabal

Wanderson Duarte Penido

Júlia Antunes Tavares Ribeiro

1. INTRODUÇÃO

Solução é uma mistura homogênea de uma ou mais substâncias. Geralmente o componente em maior quantidade é o solvente, aquele em menor quantidade é o soluto. A concentração de uma solução indica a quantidade de soluto dissolvido em um volume particular de solução e, neste sentido, o comportamento da solução depende da natureza do soluto e da sua concentração. A concentração em quantidade de matéria de uma solução (C) é utilizada para designar uma certa quantidade de matéria do soluto dissolvida em certa quantidade de matéria de solvente. Os maiores e melhores exemplos de soluções são as águas do mar (isenta de partículas), o ar (livre de fuligem e outros poluentes) e os fluidos biológicos como o plasma sanguíneo.

As soluções tampões podem ser preparadas por adição de base forte, como NaOH 0,5M, para uma quantidade calculada de ácido fraco de acordo com a equação de Handerson-Hasselbalch ou por misturas de quantidades calculadas de ácido fraco e de base forte. A escolha do ácido fraco para funcionar como tampão levará em consideração o valor do pKa e da concentração (WILSON; WALKER, 2010).

Uma fórmula geral pode ser utilizada para preparo de soluções, conforme fórmula 1. Deve-se resolver a fórmula a partir de duas regras de três para inicialmente acertar a concentração e após, acertar o volume necessário para a solução desejada. O dado obtido da primeira regra de três é usado para a segunda regra de três.

Mr (massa molecular relativa) --- 1 M
(mol/L) ----- 1000 mL. (Fórmula 1)

1ª Regra de três – acertar a concentração.

Mr ----- 1 M

X ----- Concentração que se deseja preparar (Y)

2ª Regra de três – acertar o volume.

Y (obtido da 1ª regra de três -----) 1 000 mL

Z ----- massa necessário

O valor em Z será a massa necessária para se pesar e preparar a solução, de acordo com a concentração e o volume proposto.

OBS: Atenção para as ordens de grandeza das concentrações e volumes. Todos devem estar ajustados na fórmula.

As vidrarias e equipamentos comumente usadas no preparo de solução estão demonstras na figura 3.

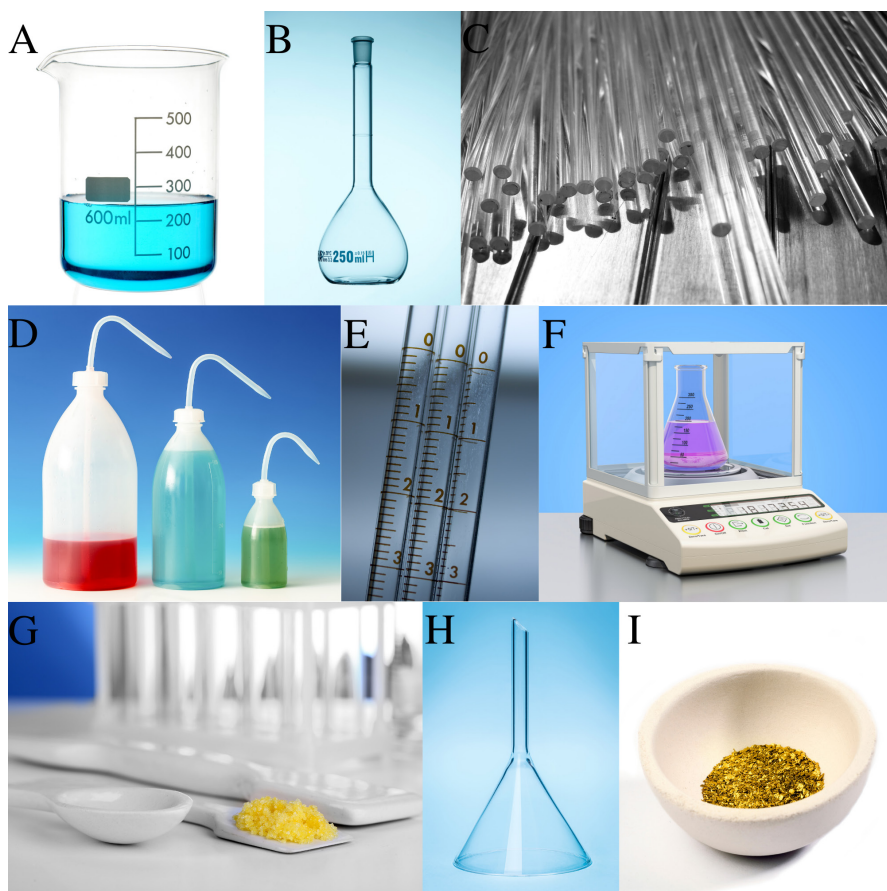


Figura 3 – Equipamentos e vidrarias para preparo de soluções. A: Becker de vidro graduado; B: Balão volumétrico de fundo chato; C: Bastão de vidro; D: Pisseta; E: Pipeta graduada; F: Balança semianalítica; G: Espátula para pesagem; H: Funil de Vidro e I: Cadinho de porcelana.

Fonte: do próprio autor (2022).

2 . OBJETIVOS

Preparar soluções a partir de reagentes sólidos e líquidos.

Reconhecer as vidrarias volumétricas utilizadas no preparo de soluções.

Realizar cálculos envolvendo concentração de soluções.

3 . MATERIAIS

- Béqueres de 100 mL
- Balões volumétricos de 100 mL e 50 mL
- Bastões de vidro
- Frasco lavador (ou pisseta)
- Funil de vidro
- Balança analítica
- Espátulas
- Cadinhos para pesagem
- Pipetas automáticas ou pipetas volumétricas

4 . REAGENTES

- Cloreto de sódio PA,
- Fosfato de potássio monobásico PA,
- Fosfato de sódio bibásico PA
- Ácido Clorídrico PA

5 . PROCEDIMENTOS

Cada grupo deverá preparar as soluções listadas abaixo, demonstrando os cálculos necessários e o procedimento operacional padrão (POP).

Parte I – Cálculo do preparo de soluções.

- a. Preparar 50 mL de solução salina, NaCl 0,001%
- b. Preparar 100 mL de Tampão Fosfato pH 5,8
- c. Preparar 50 mL de solução HCL 1 mM

Parte II – Procedimento para o preparo de cada solução.

A. Preparo da solução de NaCl 0,001%

1. Calcular a massa necessária de NaCl para preparar uma solução de 50 mL de NaCl 0,001%. Atentar-se para a pureza durante o cálculo;
2. Utilizar uma espátula e um cadinho de pesagem para transferir a massa pesada;
3. Transferir o NaCl pesado para um béquer de 100 mL, contendo aproximadamente 25 mL de H₂O destilada e dissolver com auxílio de um bastão de vidro;
4. Transferir com cuidado a solução para o balão volumétrico de 50 mL;
5. Adicionar o solvente até que o volume da solução atinja a marca indicativa no gargalo do balão (menisco);
6. Preparada a solução, homogeneizar invertendo-se o balão volumétrico (bem tampado) várias vezes.

B. Preparo da solução tampão fosfato pH 5,8

1. Calcular a partir da equação de Handerson-Hasselbalch, as quantidades necessárias de fosfato de potássio monobásico e de fosfato de sódio dibásico para produzir 100 mL de tampão fosfato na concentração de 0,05 mol/L, pH 5,8. Atentar-se para a pureza durante o cálculo;
2. Solução A: Preparar 50 mL de solução aquosa de fosfato de potássio monobásico à 0,1 mol/L (13,8 g/L, monohidratado, P.M.: 138,0);
3. Solução B: Preparar 5 mL de solução aquosa de fosfato de sódio bibásico à 0,1 mol/L (26,8 g/L, heptahidratado, P.M. 268,0);
4. Misturar em um balão volumétrico de 100 mL, os volumes de 46,0 mL da solução A e 4 mL B calculados com base nas tabelas de preparo de tampões, completar o volume. O pH deverá estar em 5,8.

6 . PREPARO DA SOLUÇÃO DE HCL 1 MM

1. Calcular a quantidade de ácido clorídrico necessária para o preparo de 50 mL de uma solução 1 mM, considerando-se que a solução estoque de HCl (1 L = 1,19 kg; 37,0 % p/p). Atentar-se para a pureza durante o cálculo.
2. Adicionar uma pequena quantidade de água destilada no balão volumétrico, transporte para a capela de exaustão e adicione o volume de ácido clorídrico calculada;
3. Completar o volume com água destilada até a marca de aferição;

4. Transferir a solução que preparada para um recipiente adequado;
5. Rotular o recipiente no qual a solução que você preparou ficará armazenada.

7. QUESTÕES

1. Em laboratório, um estudante misturou 40 mL de uma solução de HCl 0,8 mol/L com 74 mL de uma solução 0,2 mol/L de hidróxido de sódio em um balão volumétrico. Em seguida, completou o volume do balão volumétrico com água destilada. Qual é a concentração molar do sal na solução resultante aproximadamente?
2. No preparo de uma solução aquosa, foi usado 0,4 g de cloreto de sódio como soluto. Sabendo que a concentração da solução resultante é de 0,05 mol/L, determine o volume final
3. Qual a característica principal das soluções tampão e qual sua função?
4. Quais fatores devem ser levados em consideração para escolha dos componentes da solução tampão?

8. CURIOSIDADES

Você sabia que é possível cultivar plantas e hortaliças sem a necessidade de terra, agrotóxicos, luz solar e regar regularmente? A startup mineira Horta Mágica® com sua ideia disruptiva e revolucionária tem conquistado o coração dos moradores de grandes centros urbanos com sua tecnologia. Por meio de um dispositivo eletroeletrônico, com tecnologia avançada de nanoirrigação e aerocultura que economiza até 99% da água, capaz de cultivar até 80 plantas em um espaço de 50 cm e controlar suas funções via smartphone, esse sonho futurístico é possível. O único trabalho é escolher qual espécie de semente “plantar” (STARTUP RANKING, 2021). A tecnologia hoje patenteada, foi desenvolvida em parceria com a EJEQ, a Empresa Júnior de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná que desenvolveu as soluções tampão e a adaptação dos reguladores de pH necessários, e com Semear Consultoria Júnior que testou e validou o sistema de hidroponia (EJEQ, 2019).

REFERÊNCIAS

EJEQ. Empresa Júnior de Engenharia Química, c2019. Cases de sucesso: Projeto Horta Mágica. Disponível em: <<https://www.ejeq.com.br/cases-de-sucesso/horta-magica/>>. Acesso em: 20 de jul. de 2021.

STARTUP RANKING. Startup Ranking. Horta Mágica. Disponível em: <<https://www.startupranking.com/horta-magica-r->>. Acesso em 20 de jul. de 2021.

WILSON, K.; WALKER, J. Principles and Techniques of Practical Biochemistry and Molecular Biology. 7ª Edição. 802p. Cambridge University Press, Cambridge/Grã Bretanha, 2010.

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SEMENTES

Jose Antonio da Silva

Maria Auxiliadora de Oliveira

Nayara Lizandra Leal Cardoso

Klédna Constância Portes Reis

Anna Kelly Moura Silva

Júlia Antunes Tavares Ribeiro

1. INTRODUÇÃO

Proteínas estão relacionadas com inúmeros processos que ocorrem nas células dos seres vivos, com uma amplitude de funções diversificadas. São as macromoléculas biológicas de maior abundância na natureza, ocorrendo em todas as partes das células e em todas as células, podendo ser milhares em uma única célula (NELSON; COX, 2015).

Para a sua completa purificação precisam ser extraídas do local onde se encontram, que podem ser sementes, cascas, raízes, folhas, flores e frutos. São encontradas ancoradas em membranas celulares ou dispersas no interior de organelas ou no citoplasma. As sementes de leguminosas apresentam grandes quantidades de proteínas de reserva, como inibidores de protease e lectinas, que vem sendo purificadas,

caracterizadas e analisados os seus potenciais biotecnológicos na saúde humana e no meio ambiente (SILVA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2001). São etapas necessárias para a extração da proteína de interesse: trituração e obtenção da farinha, agitação em solvente apropriado e centrifugação.

Trituração

O primeiro processo de qualquer purificação é a disruptura do tecido para liberar as proteínas que estão dentro, o qual dependerá do tipo de célula, mas também do tipo de tampão usado na extração da proteína de interesse. Normalmente os tampões de extração estão no intervalo de 0,1-0,2 M e pH 7-8, por serem compatíveis com o que ambiente que se encontra no interior da célula. Tris e tampão fosfato são os mais usados. Porém, outros componentes podem ser utilizados, como agentes antioxidantes, inibidores enzimáticos (inibir proteases), substratos enzimáticos e cofatores (estabilizar enzimas), EDTA (remoção de cátions bivalentes), polivinilpirrolidona (minimizar atividade de fenol oxidases) e Azida Sódica (antibacteriano para estoques de longos períodos).

Alguns materiais biológicos apresentam em sua constituição uma solução proteica limpa ou próximo disto, que pode ser aplicada diretamente em uma coluna cromatográfica após centrifugação e filtração. Em muitos

casos, entretanto, as proteínas e enzimas estudadas atualmente são isoladas de fluidos extracelulares. Alguns exemplos desses materiais são: leite, urina, soro sanguíneo.

Escolha da proteína de interesse e Obtenção do extrato bruto

A escolha da proteína que se tem interesse em purificar é fundamental para o planejamento das etapas de extração e posteriormente purificação. A partir desse conhecimento é possível utilizar técnicas para monitorá-las e identificá-las, para tomadas de decisões importantes durante a purificação.

O processo de extração de uma determinada proteína, a qual se deseja purificar, envolve um compromisso com a sua estabilidade e pureza. As condições ótimas necessárias a este processo devem ser respeitadas e mantidas e a fim de obter-se sucesso ao final de todo o procedimento de purificação, sendo analisadas as variações de parâmetros relacionados ao tempo de extração, temperatura e outras condições de operação (WILSON; WALKER, 2010).

Outros problemas que devem ser evitados durante o processo são, em geral, a desnaturação, proteólises e contaminação por microrganismos. Então, durante a extração, podemos evitar estes problemas pela redução do tempo na preparação e também na redução de temperatura, porém, a utilização de temperaturas baixas nem sempre são necessárias e algumas vezes, torna-se inconveniente.

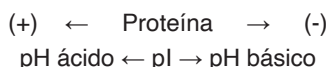
Para a obtenção de uma solução do extrato, faz-se a homogeneização, utilizando várias técnicas, sejam elas suaves, ou moderadas ou ainda vigorosas, dependendo do que se quer extrair. Exemplos de mecanismos utilizados em técnicas de homogeneização: utilização de agitadores mecânicos como liquidificadores; homogeneização realizada manualmente através de macerações em Graal; homogeneizadores com ultrassom; desintegrador celular Manto-Gaulin.

O extrato é submetido, após a homogeneização celular, à centrifugação do material insolúvel, onde, após este processo, teremos uma fase líquida e um resíduo. Concomitantemente, devem ser realizados testes quantitativos e qualitativos com as alíquotas de cada etapa, isto é, desde a obtenção do extrato inicial após homogeneização até a etapa final da extração; a fim de determinar qual a amostra que melhor apresenta a proteína desejada.

Solubilidade

É uma característica definida numa solução de concentração salina e pH fixo e é determinada para proteínas puras. O fenômeno da solubilidade de uma proteína deve ser visualizado como a capacidade de um número substancial de grupos polares localizados na superfície da mesma se solvatar na água através de pontes de hidrogênio (SILVA *et al.*, 2015a).

- A solubilidade das proteínas é influenciada pelo pH - a solubilidade é mínima no ponto isoelétrico e se eleva com o aumento da basicidade ou acidez.
- Explicação: No pI - o nº de cargas negativas é igual ao nº de cargas positivas - as forças eletrostáticas repulsivas entre as moléculas proteicas vizinhas são mínimas e elas tendem a coalescer.
- Em pH acima ou abaixo do pI , temos a predominância de uma carga efetiva de mesmo sinal (cátions ou ânions). Em consequência irão se repelir umas às outras evitando de se agregarem, isto é, ficam mais solúveis.



Finalmente, uma classificação útil para o pesquisador ou técnico que trabalha com proteína é a baseada na solubilidade; propriedade esta que, como as demais, é consequência da composição química e da estrutura de cada proteína. Esta classificação, segundo as concepções americana e inglesa do início do século, é aplicada apenas às proteínas simples, não existindo, porém, justificativa para excluir da lista algumas proteínas complexas que também poderiam enquadrar-se aqui.

Centrifugação

A análise bioquímica de estruturas subcelulares, complexos supramoleculares e isolados de macromoléculas é de central importância para a nossa compreensão dos fenômenos biológicos das células. Um importante pré-requisito para entender as propriedades fisiológicas e bioquímicas das organelas e biomoléculas é a preservação das funções biológicas e propriedades durante a separação dos componentes celulares.

Uma técnica chave para a separação e análise de vários elementos do homogenato celular é representado pela centrifugação. Desde os anos 20 do século passado quando a ultracentrifugação analítica de Svedberg e o refinamento da técnica de centrifugação preparativa de Albert Claude nos anos 1940 posicionaram a tecnologia de centrifugação no centro da pesquisa biológica e biomédica por muitas décadas (WILSON; WALKER, 2010).

Diálise: Removendo os Sais

Diálise é uma forma de filtração molecular. Das soluções de proteínas podem ser retiradas substâncias de baixa massa molecular relativa presente na mesma, pelo processo de diálise. Moléculas grandes, como as proteínas, ficam retidas dentro de um saco de material com poros ultramicroscópicos, como o papel celofane. A força osmótica oposta é responsável pelo processo (WILSON; WALKER, 2010).

É um processo de separação de acordo com o tamanho das moléculas através do uso de membranas semipermeáveis, que contém poros menores que o tamanho das

macromoléculas. Pelos poros podem passar solventes, sais e pequenas moléculas. Celofane (acetato de celulose) é o material mais utilizado como membranas. Comercialmente encontramos membranas de diálise com diferentes tamanhos de poros para uma separação seletiva (WILSON; WALKER, 2010).

A diálise remove uma variedade de produtos introduzidos durante o faturamento do extrato, mas deve-se tomando cuidado para que não haja uma possível degradação proteolítica durante o processo; além da perda do material que pode ser causada pelo não adequado volume contido no saco, pois há um aumento do volume dentro do mesmo permitindo assim o equilíbrio das duas soluções. Deve-se deixar um espaço livre dentro do saco para que ocorra a expansão do volume da solução em se tratando de nela possuir alta concentração de sal.

Largamente utilizada para mudança de solvente no qual as proteínas estão dissolvidas. A solução de proteínas é colocada dentro da membrana de diálise e as extremidades fechadas, em seguida colocada sob agitação em um grande volume do novo solvente.

2 . OBJETIVOS

Extrair proteínas de sementes de *Amaranthus caldatus* ou de outras sementes de leguminosas.

3 . MATERIAIS

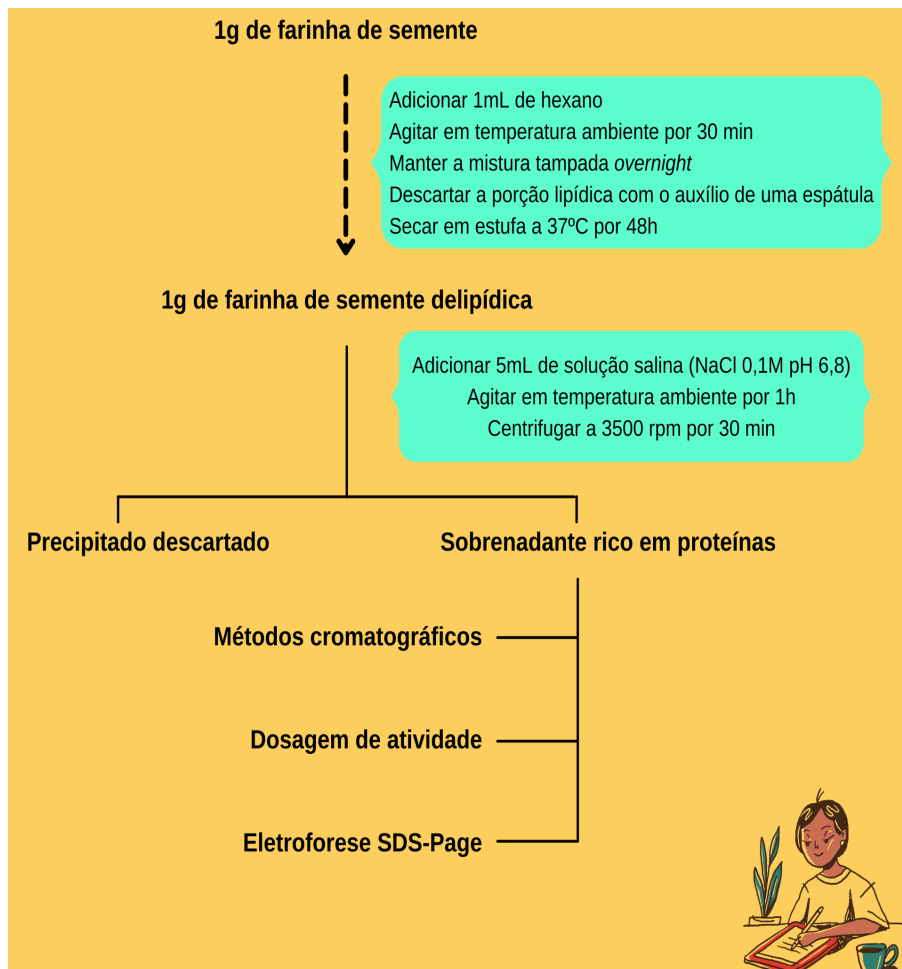
- Pipetas automáticas
- Agitador magnético
- Barra magnética
- Becker de 25 ou 50 mL

4 . SOLUÇÕES

- Solução Salina 0,15 M
- 9,00gr de cloreto de sódio (NaCl)
- H₂O pqs 1000 mL

5 . PROCEDIMENTOS

O fluxograma de extração e purificação está demonstrado no esquema 1.



Esquema 1 – Fluxograma de extração e purificação.

Fonte: do próprio autor, 2022.

A. Obtenção da farinha da semente vegetal

1. Fragmentar as sementes com o uso de um alicate, e separar as cascas das amêndoas manualmente.
2. Transferir uma quantidade de sementes vegetais para um liquidificador.
3. Triturar as sementes até que se forme um pó fino, típico de uma farinha.
4. Armazenar em um frasco devidamente rotulado.

B. Delipidação

1. Misturar a farinha em béquer, sob agitação magnética, com hexano (1:1) durante 30 minutos e tampado.

2. Manter a mistura em repouso overnight tampada. Em seguida, descartar a fração lipídica que fica na porção superior com o uso de espátula.
3. Submeter o material restante à secagem em estufa com temperatura controlada de 37°C, por aproximadamente 48 horas.

C. Extração de Proteínas de Semente

1. Pesar 30 g de farinha de semente.
2. Transferir para um Becker e adicionar 150 mL de tampão salina (NaCl 0,15 M pH 6,8)
3. Agitar em agitador magnético, com auxílio de uma barra magnética por 1 hora.
4. Verter todo conteúdo do béquer em tubos Falcon de forma a manter um equilíbrio entre eles.
5. Centrifugar por 30 minutos, 3500 rpm a 20°C e recolher o sobrenadante rico em proteínas vegetais.

D. Diálise

1. Após recolher o sobrenadante da centrifugação, transferir todo conteúdo para um saco de diálise.
2. Prender as extremidades com grampos para diálise, a fim de evitar o vazamento do material.
3. Encher um béquer de 2.000 mL com água destilada e acrescentar o saco de diálise dentro do mesmo.
4. Colocar para agitar em velocidade lenta, somente para a movimentação da água.
5. Trocar a água do reservatório (béquer) de uma em uma hora até completar 24 horas.
6. Após esse tempo, retirar a amostra do saco de diálise abrindo uma das extremidades e vertendo todo o conteúdo em um béquer.
7. Identificar e reservar para posterior liofilização.

6 . QUESTÕES

1. Como ocorre o processo de diálise?
2. Quais fatores devem ser evitados durante o processo de extração de proteínas e como podem ser evitados?
3. O homogenato da semente de amarantos, que é denso e opaco que é submetido centrifugação. O que se consegue com esse procedimento?
4. Qual o propósito de manter a farinha de sementes de Amarantos em solução

salina?

7. CURIOSIDADES

Você sabia que através de técnicas de extração de proteínas é possível obter bioplásticos e biomateriais? É isto que uma Startup de Criciúma do estado de Santa Catarina aposta em seus trabalhos. A “*GreenB Biological Solutions*” desenvolve tecnologia e processos sustentáveis que visam à substituição de matérias primas de origem fóssil, adequadas às legislações ambientais e exigências do mercado. Um pedido de Patente verde - “Processo de extração etanólica de prolaminas de resíduos dos grãos de cereais em meio etanólico/aquoso ácido ou básico” (BR102020009163-8) - descrevendo uma nova técnica para extração de zeína (proteína do milho) já foi registrado junto ao INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial). Diferentemente das técnicas já utilizadas que não conseguem extrair nem a metade da proteína do milho, a inovação tecnológica garante a sua extração próximo a 100% por meio da alteração da acidez e alcalinidade do etanol no processo. Atualmente, é utilizado amido de milho ou de mandioca como matéria prima para a produção dos bioplásticos, e pectina e quitosana na produção de biofilmes para revestimento de alimentos. Contudo, a zeína apresenta vantagens quanto à resistência à umidade em relação às matérias primas atuais (IQSC, 2021).

REFERÊNCIAS

IQSC. Instituto De Química De São Carlos. Disponível em <<https://www5.iqsc.usp.br/2021/metodo-inovador-para-extrair-proteina-do-milho-deve-inserir-mais-bioplásticos-no-mercado>>. Acesso em 08 de junho de 2021.

NELSON, D; COX, M. Princípios de Bioquímica de Lehninger, Porto Alegre: Artmed, Porto Alegre, 6ª Edição, 1302p., Savier, 2015.

SILVA, J. A.; DAMICO, D. C. S; BALDASSO, P. A; MATTIOLI, M. A; WINCK, F. V; FRACETO, L. F; NOVELLO, J. C; MARANGONI, S. Isolation and biochemical characterization of galactoside binding lectin *Bauhinia variegata* candida (BvCL) Seeds. The Protein Journal, v. 26, n. 3, p. 193-201, 2007

SILVA, J. A.; MACEDO, M. L.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. Biochemical characterization and N-terminal sequences of two new trypsin inhibitors from *Copaifera langsdorffii* seeds. Journal of Protein Chemistry, v. 20, n.1, p.1-7, 2001.

SILVA, J. A; POMPEU, D. G; COSTA, O. F; GONÇALVES, D. B; SPEHAR, C. R; MARANGONI, S.; GRANJEIRO, P.A. The importance of heat against antinutritional factors from *Chenopodium quinoa* seeds. Food Science Technology, v. 35, n. 1, p. 74- 82, 2015a.

WILSON, K.; WALKER, J. Principles and Techniques of Practical Biochemistry and Molecular Biology. 7ª Edição, 802 p. Cambridge University press, Cambridge - Grã Bretanha, 2010.

PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SEMENTES

José Antonio da Silva

Maria Auxiliadora de Oliveira

Nayara Lizandra Leal Cardoso

Diego Fernandes Livio

Raquel Valinhas e Valinhas

AGENTE	TIPO	PROPRIEDADE
Sulfato de amônio	Sal	Fácil solubilidade, estabilidade
Sulfato de sódio	Sal	Fácil solubilidade, estabilidade
Etanol	Solvente	Inflamável, risco de desnaturação
Acetona	Solvente	Inflamável, risco de desnaturação
Polietileno glicol, PEG	Polímero	Não-inflamável, não-explosivo

Quadro 4 - Agentes de precipitação.

Fonte: do próprio autor (2022).

1. INTRODUÇÃO

Precipitação

A precipitação de uma proteína de um extrato pode ser realizada pela adição de sais, solventes ou polímeros orgânicos ou ainda, pela variação do pH ou da temperatura da solução. Os agentes de precipitação, mais comumente utilizados estão relacionados no quadro 4 (SCOPES; 2010; WILSON; WALKER, 2010).

Precipitação Salina

A propriedade particular como agente de precipitação é que eles aumentam o efeito hidrofóbico na solução e promovem a agregação de proteínas pela associação de superfícies hidrofóbicas.

Ânions: PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_3^- , I^- , SCN^-

Cátions: NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Guanidina $\text{C}(\text{NH}_2)_3^+$

Precipitação Isoelétrica

As proteínas apresentam diferentes pontos isoelétricos devido a seu conteúdo de aminoácidos que possuem diferentes grupos R ionizáveis, podendo ser separadas umas das outras por precipitação isoelétrica. O pH em que a proteína tem sua solubilidade mínima é o seu pH isoelétrico, definido como pH em que a molécula não apresenta carga elétrica efetiva e é incapaz de se deslocar em um campo elétrico (SILVA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2001).

Nesse pH a proteína tem suas cargas intra e intermolecularmente, formando assim enormes complexos eletrostáticos, excluindo a água do microambiente e eliminando gradativamente pontes de H dos grupos polares que vão sendo neutralizados, temos diminuídas as forças repulsivas e as proteínas tendem a se agregarem. Ajusta-se o pH da mistura de

proteínas próximo do ponto isoelétrico da proteína a ser precipitada (SILVA *et al.*, 2015a).

Na prática, essa técnica é combinada com *salting-out* para que a proteína seja purificada perto de seu ponto isoelétrico. A precipitação é acelerada pelo *salting-out* pois no pH isoelétrico da proteína ela está menos solúvel.

Os chamados sais aniônicos são os agentes mais eficientes. Eles aumentam o efeito hidrofóbico na solução e promovem a agregação de proteínas pela associação de superfícies hidrofóbicas. Os sais catiônicos diminuem o efeito hidrofóbico e desta maneira, ajudam a preservar as proteínas em solução (PESSOA; KILIKIAN, 2005; WILSON; WALKER, 2010)..

Ajuste de pH: tem sido usado como um passo simples e comum para precipitar proteínas. As proteínas possuem solubilidade baixíssima em seu ponto isoelétrico; este procedimento, às vezes, é usado em fracionamento de soro e também na purificação de insulina. Além do pH, outro parâmetro que influencia na precipitação de proteínas em soluções salinas é a temperatura (SCOPES, 2010).

Precipitação por Solventes Orgânicos

- Solventes orgânicos miscíveis em água (acetona, etanol) são bons precipitantes de proteínas pois diminuem a força de solvatação da solução aquosa (possuem constante dielétrica inferior que da água) - dessa forma diminuem a solubilidade das proteínas - favorecem sua agregação.
- Isto é, as moléculas de água fazem ligações de hidrogênio com o grupo carbonílico do solvente orgânico; isto é, retira água de solvatação diminuindo a solubilidade das proteínas. Pode-se associar *salting-out* com solvente orgânico para aumentar a eficiência na precipitação.
- Dimetil sulfoxido (DMSO) ou *N,N*-dimetilformamida (DMF) são bons solventes de proteínas pois possuem constante dielétrica relativamente alta. Promove a precipitação da proteína adequando o decréscimo de água na solução, sendo a água substituída pelo solvente.
- São largamente utilizados como agentes de precipitação, especialmente no fracionamento de proteínas do soro. Durante o processo, utilizando tal agente, são controladas cinco variáveis: concentração do solvente orgânico, concentração de proteína, pH, força iônica e temperatura.

Liofilização

A liofilização pode ser definida como processo de secagem de uma substância congelada na qual a maior parte de água é removida diretamente por sublimação, sem passar pelo estado líquido. O material é mantido congelado do início ao fim do processo, mantendo os constituintes originais e a forma estrutural inicial. O produto liofilizado tem aparência porosa, podendo ser reconstituído imediatamente à forma original, pela adição

de água. O tempo de vida útil é elevado se comparado a um produto não liofilizado. Como a quantidade de água do material é reduzida, diminui-se a possibilidade de ocorrerem reações de oxidação ou ação enzimática (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

O primeiro produto a ser liofilizado foi o vírus da raiva, em 1911. Durante a Segunda Guerra Mundial a liofilização atingiu o processo industrial devido à elevada necessidade por plasma sanguíneo. Além disso, a tecnologia também avançou com o desenvolvimento dos projetos espaciais, quando se liofilizou alimentos para astronautas da NASA. Muitos produtos atualmente são liofilizados, incluindo desde antibióticos, anticoagulantes, enzimas, hormônios até frações de sangue. Na indústria farmacêutica, a utilização mais direta está relacionada à produção de injetáveis. Em biotecnologia, o uso de microrganismos e proteínas recombinantes e nanopartículas tornaram a liofilização um processo comum. Costuma-se também liofilizar bactérias e vírus para a manutenção de sua viabilidade e uso após longos períodos de armazenamento (PESSOA; KILIKIAN, 2005). Na figura 4 podemos observar o sistema de liofilização.

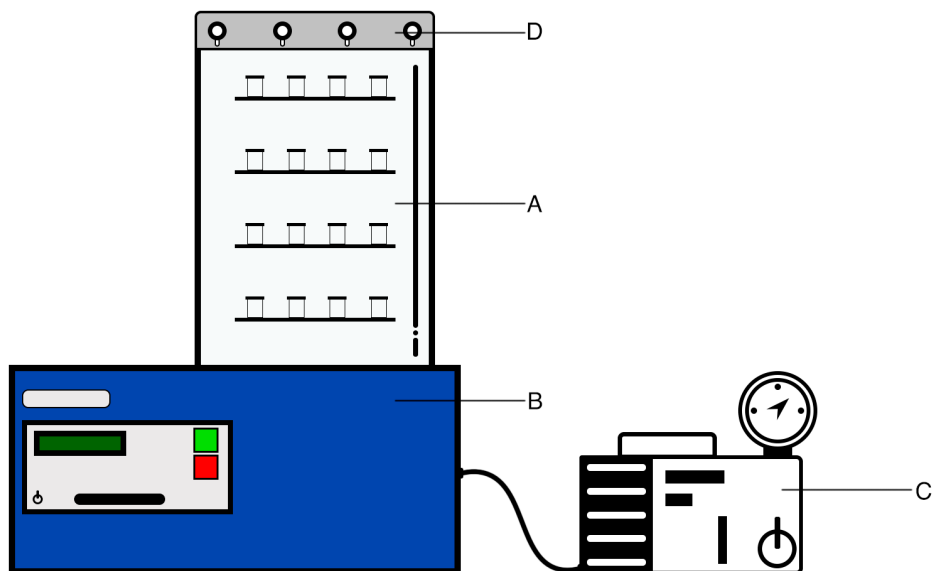


Figura 4 - Sistema de liofilização. (A) uma câmara de secagem, onde é colocado o material, e que deve ser resistente ao vácuo; (B) um condensador; (C) bomba de vácuo; e (D) sistema de vácuo para fechamento dos frascos.

Fonte: do próprio autor (2022).

2 . OBJETIVOS

Precipitar proteínas de sementes de *Amaranthus caldatus*.

3 . MATERIAIS

- a) Pipetas automáticas,
- b) Agitador magnético,
- c) Barra magnética,
- d) Becker de 25 ou 50 mL,

4 . SOLUÇÕES

- a) Solução Salina 0,15 M
- b) Sulfato de amônia

5 . PROCEDIMENTOS

A. Precipitação Sulfato de Amônio

De acordo com a tabela 2 é possível saber a quantidade de sulfato amônio necessário para a precipitação. Nesse experimento a precipitação será de 0-60%.

A seguir as etapas do experimento:

1. Medir o volume de sobrenadante e precipitar com sulfato de amônio na proporção 1L/242 g;
2. Adicionar lentamente o sulfato de amônio e deixar 30min sob agitação;
3. Deixar overnight em refrigeração;
4. Centrifugar e reservar o sobrenadante para a etapa seguinte;
5. Ressuspender em pouco volume de água.

B. Diálise

1. Após recolher o sobrenadante da centrifugação, transferir todo conteúdo para um saco de diálise;
2. Prender as extremidades com grampos para diálise, a fim de se evitar o vazamento do material;
3. Encher um bquer de 2.000 mL com água destilada e acrescentar o saco de diálise dentro do mesmo;

4. Colocar para agitar em velocidade lenta, somente para movimentação da água;
5. Trocar a água do reservatório (béquer) de uma em uma hora até completar 24h;
6. Após esse tempo, retirar a amostra do saco de diálise abrindo uma das extremidades e vertendo todo o conteúdo em um béquer;
7. Identificar e reservar para posterior liofilização.

C. Liofilização

1. Verter todo o conteúdo dialisado em Erlenmeyer, dividindo o volume de 30 mL por Erlenmeyer;
2. Vedar os Erlenmeyer com plástico filme, fazer pequenos furos neste plástico e identificar os Erlenmeyer;
3. Congelar o extrato em nitrogênio líquido até que eles fiquem “queimando”;
4. Levar para liofilização, seguindo o POP (Procedimento Operacional Padrão) para utilização do equipamento que deve estar anexado ao lado do próprio equipamento;
5. Aguardar 48h e retira o material;
6. Guardá-los devidamente identificados.

6 . QUESTÕES

1. Explique o efeito salting out e como ele interfere na solubilidade de proteínas?
2. Sobre o método de purificação de proteínas por precipitação isoeletrica, quais características das proteínas permitem que este processo seja realizado?
3. Porque solventes orgânicos polares (miscíveis em água) são mais indicados para o processo de precipitação de proteínas?
4. Explique o processo de Liofilização.

7 . CURIOSIDADES

Os avanços em biotecnologia representam potencial para a indústria de alimentos no desenvolvimento de novos produtos e processos. Esse desenvolvimento incluiria a purificação de biomoléculas, tais como enzimas e proteínas, a partir de meios complexos como os de fermentação ou de efluentes industriais.

Assim, torna-se necessário o conhecimento das técnicas empregadas no processo de purificação de biomoléculas, sobretudo as técnicas cromatográficas. No entanto, deve-se considerar que ainda existem restrições técnicas e econômicas na aplicação de algumas dessas técnicas, principalmente em escala preparativa. Tais restrições não têm impedido que muitos laboratórios utilizem a cromatografia para a produção de substâncias com

atividade biológica, de custo elevado no mercado, o que justificaria o emprego das técnicas cromatográficas na produção de alguns miligramas de substâncias com atividade biológica. Para que a purificação de biomoléculas de baixo valor comercial, em grande escala, possa ser economicamente viável novos desenvolvimentos na engenharia de processo e nas técnicas de separação devem ser realizados.

Starting percent saturation	Final percent saturation to be obtained																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Amount of ammonium sulphate to add (grams) per liter of solution at 20 °C																	
0	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723
10	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	596	647
20	0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25		0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	386	429	475	522	571
30			0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35				0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40					0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45						0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419
50							0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55								0	33	66	101	138	175	215	256	298	343
60									0	33	67	103	140	179	219	261	305
65										0	34	69	105	143	183	224	267
70											0	34	70	107	146	186	228
75												0	35	72	110	149	190
80													0	36	73	112	152
85														0	37	75	114
90															0	37	76
95																0	38

Tabela 2 - Tabela para ensaio de precipitação por sulfato de amônio.

Fonte: Adaptado de Scopes (2010).

REFERÊNCIAS

PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B., Purificação de Produtos Biotecnológicos. 1ª Edição, Editora Manole, Barueri-SP. 2005.

SCOPES, R. K. Protein Purification: principles and practices. Editora Springer Nature. 3a Edição. 2010.

SILVA, J. A.; DAMICO, D. C. S.; BALDASSO, P. A.; MATTIOLI, M. A.; WINCK, F. V.; FRACETO, L. F.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. Isolation and biochemical characterization of galactoside binding lectin *Bauhinia variegata* candida (Bvcl) Seeds. The Protein Journal, v. 26, n. 3, p. 193-201, 2007

SILVA, J. A.; MACEDO, M. L.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. Biochemical characterization and N-terminal sequences of two new trypsin inhibitors from *Copaifera langsdorffii* seeds. Journal of Protein Chemistry, v. 20, n.1, p.1-7, 2001.

SILVA, J. A.; POMPEU, D. G; COSTA, O. F.; GONÇALVES, D. B; SPEHAR, C. R; MARANGONI, S.; GRANJEIRO, P.A. The importance of heat against antinutritional factors from *Chenopodium quinoa* seeds. Food Science Technology, v. 35, n. 1, p. 74- 82, 2015a.

WILSON, K.; WALKER, J. Principles and Techniques of Practical Biochemistry and Molecular Biology. 7ª Edição, 802 p. Cambridge University press, Cambridge - Grã Bretanha, 2010.

José Antonio da Silva

Maria Auxiliadora de Oliveira

Nayara Lizandra Leal Cardoso

Diego Fernandes Livio

Raquel Valinhas e Valinhas

1. INTRODUÇÃO

Existem vários métodos de quantificação de proteínas. A escolha do método adequado depende de vários fatores como natureza da proteína, presença de interferentes, rapidez, sensibilidade e eficiência do método. Métodos como Biureto, Bradford, ácido bicinconínico e Kjeldahl são bastante utilizados nos laboratórios que empregam a análise de proteínas para diversos fins. Nesta aula prática vamos utilizar o método de Bradford para quantificar proteínas.

No Método de Bradford, um composto conhecido como *Coomassie Brilliant Blue* G-250 liga-se a proteínas em meio ácido. Estudos sugerem que a forma aniônica deste composto forma complexos com as proteínas. Neste caso, ocorrem interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals. Tal complexo possui uma coloração azul. A intensidade desta coloração dependerá

da concentração de proteínas da amostra e será mais intensa se a concentração for alta. Este complexo formado absorve em 595 nm e pode ser lido em um espectrofotômetro (Figura 5). O procedimento consiste em realizar a leitura de diferentes concentrações conhecidas de albumina do soro bovino (BSA) usada como padrão para elaboração de curva padrão a partir da equação da reta e cálculo da quantidade de proteína presente. A comparação dos resultados com valores de concentrações conhecidas da curva padrão permite a determinação da concentração da proteína nas amostras em estudo (ZAIA *et al.*, 1998).

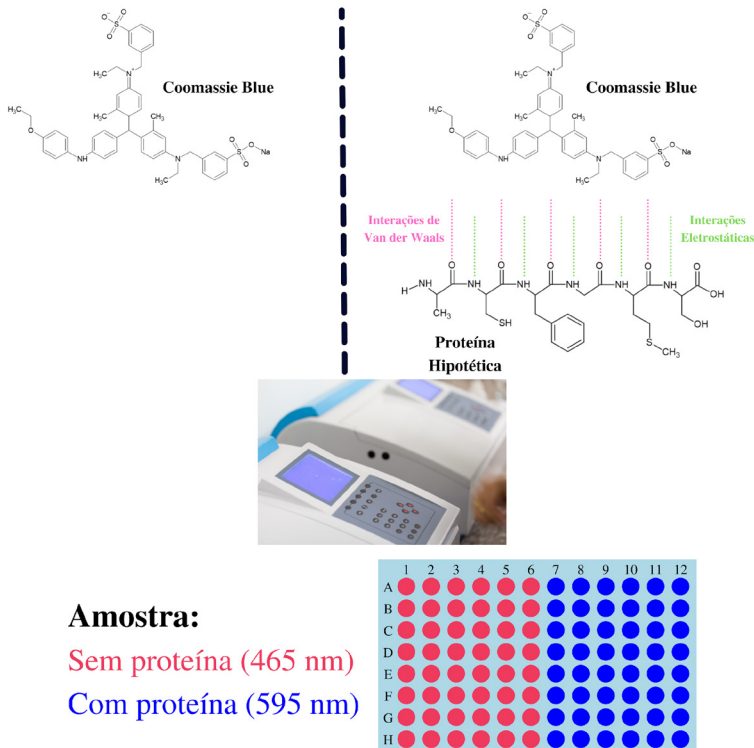


Figura 5 - Esquema geral do método de Bradford para dosagem de proteína com o uso do corante *Coomassie Blue*.

Fonte: do próprio autor, 2022.

2 . OBJETIVO

Quantificar a proteína total do padrão de BSA e da amostra extraída das sementes de *Amaranthus caldatus* (pode ser qualquer outra semente de leguminosa) pelo método de Bradford.

3 . MATERIAIS

- Tubos de ensaio previamente lavados com álcool
- Estantes para tubo ensaio
- Espectrofotômetro
- Pipetas de vidro 5 mL
- Pipetas automáticas
- Beckers (25, 50 e 1000 mL)

5 . SOLUÇÕES

- a. Etanol 95%
- b. Reagente de Bradford
- c. Solução de albumina do soro bovino (BSA)
- d. Solução de extrato bruto das sementes de *Amaranthus caldatus* a 1 mg/mL

6 . PROCEDIMENTOS

A. Preparo do Bradford

1. Dissolver 100 mg de *Coomassie brilhante blue* em 50 mL de etanol 95%;
2. Adicionar 100 mL de H_3PO_4 85% e completar o volume da solução para 1 litro final;
3. Deixar overnight com agitação constante em agitador magnético **SEM** ligar o aquecimento;
4. Filtrar a solução duas vezes em filtro de papel, para a obtenção final do reagente de Bradford;
5. Armazenar em frasco âmbar envolto em papel alumínio.

Dessa forma, as concentrações finais serão: 0,01% de *Coomassie*, 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol. (Ácido fosfórico deve ser adicionado ao *Coomassie* dissolvido em etanol e nunca o contrário).

B. Determinação da proteína

1. Pipetar nos tubos de ensaio o BSA, água, Bradford e amostras de acordo com o quadro 5, para a construção da curva de calibração e dosagem da proteína das amostras da semente;
2. Homogeneizar em vórtex;
3. Deixar os tubos descansarem por 5 minutos em temperatura ambiente e no escuro;
4. Fazer a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm;
5. Caso a solução esteja muito concentrada, será necessário fazer as diluições apropriadas para leitura;
6. Construir a curva de calibração a partir da leitura da curva padrão (Achar média das triplicatas e subtrair do tubo 1- controle), lançando nas abscissas as concentrações de BSA e os valores de absorbância nas ordenadas;
7. Utilizar a equação da reta ($Abs = a \times [BSA]$) para calcular a quantidade de proteína

(lembre-se de considerar as diluições quando calcular a concentração da amostra);

8. Calcular a concentração de proteína em EB e nos picos da coluna de exclusão usando a **Equação da Reta** e os dados do programa (lembre-se de considerar as diluições quando calcular a concentração da amostra) ou faça os cálculos;

9. Acertar a concentração de acordo com a amostra e o BSA:

- Amostra: 1 mg/mL e BSA: 2 mg/mL.
- A concentração que der **MULTIPLICAR** por 2.

10. Acertar de acordo com a quantidade de amostra usada no teste:

- Volume de referência: 0,1 mL. Volume usado de amostra: 0,2 mL.
- A concentração que der **DIVIDIR** por 2.

Tubo	*BSA (mL)	Água (mL)	Bradford (mL)	**Abs _{595nm}
1, 1', 1" Branco	-	0,5	5	
2, 2', 2"	0,020	0,480	5	
3, 3', 3"	0,040	0,460	5	
4, 4', 4"	0,060	0,440	5	
5, 5', 5"	0,080	0,420	5	
6, 6', 6"	0,100	0,400	5	
	AMOSTRA	Água (mL)	Bradford (mL)	Abs_{595nm}
7, 7', 7"	0,100	0,400	5	
8, 8', 8"	0,100	0,400	5	

*BSA: Albumina soro bovino, ** Abs: Absorbância

Quadro 5 - Montagem da curva padrão de Albumina e determinação da proteína da amostra.

Fonte: do próprio autor, 2022.

7. QUESTÕES

1. Um extrato de proteínas foi obtido a partir de sementes de Pata-de-vaca. Para se quantificar a quantidade de proteínas neste extrato, foi utilizado o reagente de Bradford. Junto com suas amostras, uma curva-padrão foi gerada medindo-se a Absorbância em 595 nm. Com base no enunciado responda:

- a) Qual a função do Branco?
- b) Qual a unidade de concentração de proteína que será obtida?
- c) Qual a finalidade do uso da BSA para a técnica de Bradford?
- d) Descreva as interações bioquímicas entre o corante *Coomassie brilhante blue* e a proteína.

8 . CURIOSIDADES

As proteínas estão presentes em várias concentrações em amostras de diferentes origens e a determinação de sua concentração é de particular interesse para a saúde humana e indústria de alimentos. Porém, o uso de métodos analíticos como espectrofotometria ou cromatografia líquida de alta eficiência para a sua detecção pode ser caro ou trabalhoso. Eles não permitem um fácil monitoramento contínuo porque são caros e lentos. Assim, os biossensores vem sendo desenvolvidos como um dos principais dispositivos com essa finalidade (LECA-BOUVIER; BLUM, 2005).

Biossensor é um dispositivo que transforma a informação química, variando da concentração de uma amostra específica componente para análise de composição total, em um sinal analiticamente útil. Na primeira geração ocorreu a abordagem mais simples, o biocatalisador é aprisionado entre ou ligado a membranas e este arranjo é fixado na superfície do transdutor. Na segunda geração ocorre a fixação imediata adsorbtiva ou covalente do componente biologicamente ativo para a superfície do transdutor permitir a eliminação da membrana semipermeável. O de terceira geração demonstra a ligação direta do biocatalisador a um dispositivo eletrônico de transdutores e amplifica o sinal, por exemplo, a porta de um campo transistor de efeito, é a base para mais uma miniaturização de biossensores (MESHRAM *et al.*, 2018).

Foi nessa linha que pesquisadores do Instituto de Física da USP de São Carlos desenvolveram um biossensor para o diagnóstico da dengue. O biossensor tem a propriedade de identificação elétrica da proteína NS1, presente na corrente sanguínea do indivíduo nos primeiros dias após a infecção como produto da secreção do vírus (ANDRADE, 2017).

REFERÊNCIAS

ANDRADE, R. O. Biossensores na Medicina. Revista FAPESP. Edição 258, 2017. Disponível em <https://revistapesquisa.fapesp.br/biossensores-na-medicina/>. Acesso em 22 de jan. de 2022.

LECA-BOUVIER B.; BLUM L. J. Biosensors for protein detection: a review. Analytical Letters, v. 38, p. 1491–1517, 2005

MESHRAM B. D.; AGRAWAL, A. K.; ADIL S.; RANVIR S.; SANDE K. K. Biosensor and its application in food and dairy industry: a review. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, v. 7, n. 2, p. 3305-3324, 2018.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. Química Nova, v. 21, n. 6, p.787-793, 1998.

CAPÍTULO 6

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

José Antonio da Silva

Thaís Paula Rodrigues Gonçalves

Priscila Amaral Diniz

Anderson Fernandes de Melo

Diego Fernandes Livio

Anna Kelly Moura Silva

1. INTRODUÇÃO

A cromatografia é uma técnica de separação especialmente adequada para ilustrar os conceitos de interações intermoleculares, polaridade e propriedades de funções orgânicas, com uma abordagem ilustrativa e interessante. De acordo com a IUPAC (1993), a cromatografia é uma técnica de separação física pela qual os componentes de uma mistura, contendo duas ou mais substâncias ou íons, são separados em fases, sendo uma móvel e outra estacionária, seguindo um fluxo e uma direção definidas (BRAITHWAITE; SMITH, 1999).

Existem diversos tipos de métodos cromatográficos responsáveis por mais de 70% das análises em Química Analítica (WILSON; WALKER, 2010). Estes os métodos são aplicáveis à separação, identificação e dosagem de misturas de aminoácidos, peptídeos,

proteínas, nucleotídeos, ácidos nucleicos, lipídeos e carboidratos (SILVA, *et al.*, 2015a; PESOTI *et al.*, 2015, POMPEU *et al.*, 2016).

Normalmente, combinam-se métodos cromatográficos, para uma completa purificação de uma proteína vinda de um extrato biológico. O termo cromatografia refere-se a um grupo de técnicas de separação que são caracterizadas por uma distribuição das moléculas a serem separadas entre duas fases, uma estacionária e outra móvel. É um processo de separação de componentes de misturas moleculares através de duas fases imiscíveis, uma delas deslocando-se em relação à outra, que permanece estacionária.

As técnicas cromatográficas são bastante utilizadas no desenvolvimento de processos de purificação de diferentes moléculas com destaque para as proteínas (NEVES, *et al.* 2018). Estando a mistura de proteínas livres das moléculas pequenas, retiradas pela diálise, as proteínas podem ser separadas com base nas diferenças relacionadas ao tamanho molecular, carga elétrica, especificidade, ponto isoelétrico e hidrofobicidade, de acordo com o quadro 6.

Propriedade da proteína	Cromatografia utilizada
Tamanho molecular	Exclusão molecular ou filtração em gel
Cargas elétricas	Troca iônica
Especificidade de ligação	Afinidade
Ponto isoelétrico	Cromatofocalização
Hidrofobicidade	Interação hidrofóbica e de fase reversa

Quadro 6 – Métodos de separação das proteínas de acordo com as suas propriedades.

Fonte: do próprio autor, 2022.

Cromatografia por exclusão molecular

Na cromatografia por exclusão molecular, após uma solução de mistura de proteínas ser aplicada no topo da coluna, ocorrerá a migração dessas proteínas de acordo com a sua massa molecular relativa, sendo as de maior massa saem primeiro e as de menor saem por último, devido à interação que sofreram com a fase estacionária (geralmente formada de resinas porosas), conforme demonstrado na figura 7 (NELSON; COX, 2015).

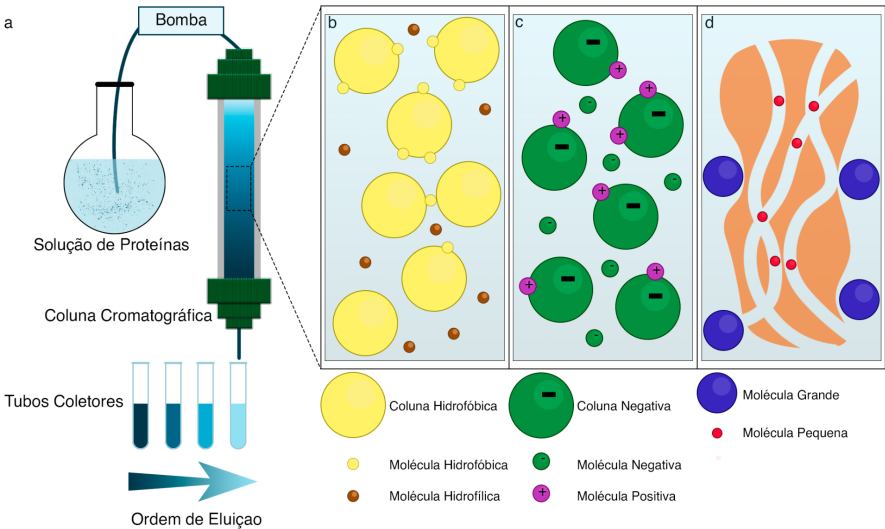


Figura 7. Cromatografia de Gel Filtração.

Fonte: NELSON & COX (2015).

Cromatografia por troca iônica

Na cromatografia por troca iônica, a fase estacionária é ativada com grupos carregados positiva (resinas aniônicas – trocador de ânions) ou negativamente (resinas

catiônicas – trocador de cátions). A afinidade de cada proteína pelos grupos carregados é afetada pelo pH (que determina o estado de ionização da molécula) e pela concentração de íons salinos livres da solução envolvente. A separação se dá pela mudança de gradiente salino ou alterando o pH do meio (CIOLA, 2006; NELSON; COX, 2015).

Cromatografia por afinidade

Na cromatografia de afinidade, as moléculas de interesse são purificadas através de interações bio-específicas. Assim, as proteínas de interesse prendem-se ao ligante imobilizado a um polímero, enquanto as demais proteínas passarão direto pela coluna juntamente com o tampão de equilíbrio (NELSON; COX, 2015; KASTNER, 1999).

A separação cromatográfica se efetua através da migração diferencial dos componentes da mistura no sistema bifásico. Substâncias diferentes migram com velocidades diferentes de acordo com sua afinidade para cada uma das fases, e esta afinidade baseia-se no conhecimento das solubilidades relativas e no comportamento ácido básico das diferentes substâncias.

Cromatografia de hidrofobicidade

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou também conhecida com a sigla HPLC (High Performance Liquid Chromatography) é uma técnica analítica usada para separar e quantificar componentes numa mistura líquida. A utilização de suportes com partículas diminutas é a responsável pela alta eficiência desse método de cromatografia. A fase móvel (líquida) movimenta-se continuamente através da coluna contendo a fase estacionária (sólido). O soluto interage com as fases estacionária e móvel por adsorção, partição, exclusão molecular, troca iônica. As separações em CLAE são feitas por adsorção (separação sólido-líquido), partição (separação líquido-líquido) ou ambos. O detector mais utilizado para separações por CLAE é o detector de ultravioleta (MARSHAK, 1996; WILSON; WALKER, 2010).

2 . OBJETIVOS

Compreender os métodos de cromatografia utilizados para purificação de proteínas.

3 . MATERIAIS

- a. Extrato proteico das sementes
- b. Coluna montada com gel de afinidade (tamanho mL)
- c. Observar a matriz de sua coluna
- d. Espectrofotômetro e cubeta

- e. Tubos de ensaio e pipetas
- f. Cromatógrafo de baixa pressão (FPLC)

4 . SOLUÇÕES

- Ambic 0.2 M

5 . PROCEDIMENTO

A. Preparo da Amostra

1. Dissolver o Extrato Bruto de sementes de Amaranthos liofilizado em AMBIC 1 M na proporção de 0,5 g de extrato bruto em 2,5 mL AMBIC 1M,
2. Deixar agitando por 30 minutos
3. Transferir o conteúdo para microtubos e centrifugar o material a 20°C, 3500 rpm por 10 minutos;
4. Recolher apenas o sobrenadante e reservar o material para ser aplicado na coluna cromatográfica.

B. Aplicação em sistemas de purificação automático

B1. Cromatografia por exclusão molecular (FPLC)

1. Calibrar o aparelho FPLC com um fluxo de 0,5 mL/min;
2. Desconectar a mangueira da parte superior da coluna cromatográfica e retirar o tampão com auxílio de uma pipeta Pasteur;
3. Aplicar a amostra centrifugada com cuidado pela parede da coluna;
4. Esperar esta amostra descer pela resina, completar com tampão e conectar a mangueira novamente;
5. Aguardar visualmente a amostra descer pela resina e ligar a UV;
6. Ligar o coletor de acordo com o POP do equipamento;
7. Coletar as amostras de acordo com os picos apresentados;
8. Separar os picos em “pool” e identificar qual dos picos há atividade de proteína de interesse;
9. Dialisar separadamente cada “pool” de proteínas contra água por 24 h;
10. Liofilizar essas amostras, guardando-as identificadas;
11. Proceder para a etapa seguinte somente com o liofilizado do “pool” que apresenta

atividade da proteína de interesse.

B2. Cromatografia de troca-iônica (FPLC)

POP 1 - Calibrar o fluxo da coluna

OBS: A coluna deve estar em STOP (não pode estar correndo) para calibrar o fluxo.

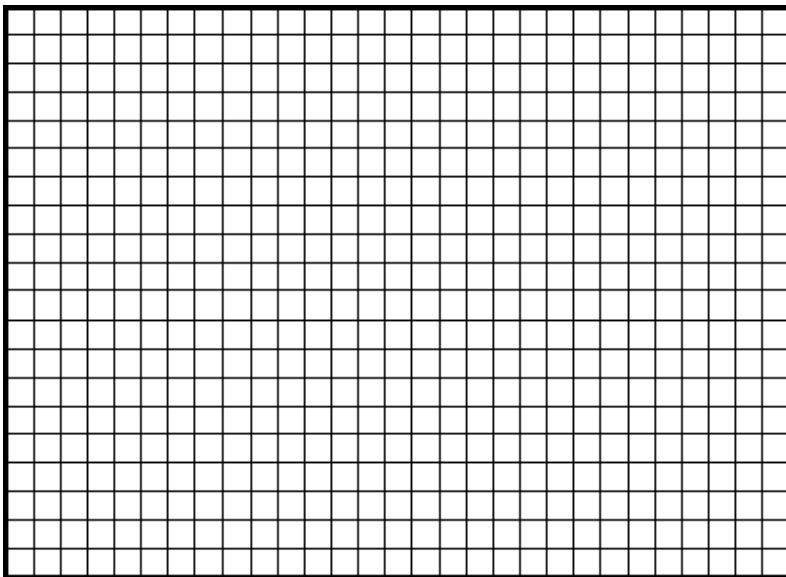
1. Apertar **FLOW** e colocar o valor do fluxo desejado (Ex: 0,5 mL/min);
2. Apertar **CALIBRANTE**, valor referente ao diâmetro da tubulação: 1,6;
3. Apertar as setas que indiquem **SET FLOW - FLOW RET** e novamente colocar o valor do fluxo (mL/min);
4. Apertar **OK**;
5. Apertar a seta referente a **TIME** e coloque o tempo desejado para calibração (Ex: 5 min) em seguida **OK** e **START**;
6. Realizar a conferência do fluxo pelo menos três vezes, com auxílio de uma proveta e cronômetro, observando no tempo desejado o volume recolhido na proveta.

POP 2 - Ligar o coletor

1. Apertar a tecla **COLETOR** no visor;
2. Apertar a seta referente a **FIX SIZE**;
3. Apertar **TIME**, para determinar o tempo de coleta para cada tubo;
4. Indicar o tempo necessário (Exemplo: 11 min)
5. Apertar **OK**
6. Apertar **START** e ao mesmo tempo em **RECORDE** no programa do computador.

POP 3 - Modo automático

-  Aperte **OK**, quando no visor estiver; **MANUAL RUN**
-  Com as setas vá até **SET FLOW RATE**, e clique em **OK**
-  Escolha o fluxo desejado. (Ex: 2,0 mL/min) e clique em **OK**
-  Vá até **SET FRACTION SIZE** e aperte **OK**
-  Escolha o volume a ser coletado por tubo. (Ex: 4,0 mL) e clique em **OK**
-  Vá até **START RUN**, e aperte **OK**
-  O programa pedirá para você verificar se o coletor está na posição correta. Verifique e clique em **OK**.
-  ANOTAÇÕES:



6 . QUESTÕES

1. Qual a importância de lavar a coluna cromatográfica e como isso é feito?
2. Em relação à cromatografia de troca iônica quais são as características da molécula alvo que se deseja purificar ou então dos contaminantes que se deseja eliminar para a escolha do tipo de resina/coluna trocadoras de ânions ou de cátions?
3. Quais as estratégias utilizadas para adequar a carga elétrica da proteína a ser purificada à resina?
4. Quais estratégias são utilizadas para provocar a eluição da proteína alvo adsorvida na resina?
5. Em relação à cromatografia de Exclusão Molecular (CEM), qual a principal característica a ser observada nas moléculas a serem separadas?

7 . CURIOSIDADES

A Cromatografia recebe o nome de uma técnica utilizada pela primeira vez no final do século 19, para separação de pigmentos em uma mistura complexa. Se uma folha de papel ou pano entrar em contato com um recipiente cheio de água ou álcool no qual o pigmento complexo esteja dissolvido, a ação capilar carregará a mistura pelo papel ou pano, mas os componentes do pigmento não irão todos na mesma velocidade. As moléculas maiores da mistura viajarão mais devagar enquanto as menores avançam, fazendo com que a fase estacionária desenvolva faixas discretas de cor correspondentes a cada componente da mistura. Isso dá à técnica o nome de “cromatografia” ou “cor de escrita”.

Da Arte à Ciência

A cromatografia foi inicialmente usada por artistas, teóricos da cor e artesãos na esperança de aperfeiçoar tinturas industriais para têxteis. Com o tempo, também gerou um ramo único da química e, com ele, as técnicas usadas hoje para entender e purificar misturas. Em laboratórios modernos, o aspecto da cor não é mais relevante, mas os mesmos princípios se aplicam. Ao dissolver uma mistura de interesse em uma fase móvel e transportá-la através de uma fase estacionária, os componentes da mistura podem ser separados uns dos outros com base em suas diferentes velocidades de deslocamento (ThermoFisher, 2019).

Depósito de Patente no Brasil

Um grupo de pesquisa da Faculdade de Ciências Aplicadas e Faculdade de Engenharia de Alimentos (Unicamp), inventou um sistema bidimensional para a extração, purificação e análise de compostos bioativos. Esse sistema combina a técnica de líquidos pressurizados e análise por cromatografia para extração e verificação desses compostos. O sistema utiliza um gradiente de solvente, associado e acoplado a técnicas de extração em uma purificação bidimensional. A primeira dimensão do sistema, corresponde à extração com líquidos pressurizados. Já a segunda, realiza a análise por cromatografia utilizando um método ultrarrápido. O sistema desenvolvido é capaz de realizar processos de extração, purificação e análise de forma independente ou acoplada. Adicionalmente, os compostos são coletados em frações bem caracterizadas quimicamente e em quantidades suficientes para realizar estudos de bioatividade. Esta tecnologia foi desenvolvida em parceria com a FAPESP e possui patente depositada (CÓDIGO:1546_BIDIMENSIONAL) (INOVA, 2020).

REFERÊNCIAS

BRAITHWAITE, A.; SMITH, J. F. CHROMATOGRAPHIC METHODS. 5ª ed. Springer Netherlands. Berlin. 580p., 1999.

CIOLA, R. Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho. 1ª ed., Edgard Blucher. São Paulo, 192p. 2006.

INOVA. Identificação de compostos bioativos a partir de sistema de análise bidimensional. Disponível em: https://patentes.inova.unicamp.br/item/1546_bidimensional/. Acesso em: 19/08/2021.

KASTNER, MICHAEL, Protein liquid chromatography. 1ª ed., Elsevier, Amsterdã, 933p., 1999.

MARSHAK, D.R. Techniques in Protein Chemistry, 1ª ed., v.7. Academic Press, Amsterdã, 533p., 1996.

NELSON, D.; COX, M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6ª ed., Artmed, Porto Alegre, Savier, 1312p., 2015.

NEVES, I. C. O.; BATISTA, G. A.; RODRIGUES, A. A.; VALENTIM, T. T.; FONSECA, J. M. F.; VERÍSSIMO, L. A. A. "Captura cromatográfica das proteínas da mucilagem de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata miller*) utilizando criogéis monolíticos de afinidade". Anais do XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, São Paulo, v. 1, n. 5, p. 2793-2796, 2018.

PESOTI, A.; OLIVEIRA, B.; POMPEU, D.G.; MARONGONI, S.; GONÇALVES, D. B.; SILVA, J. A.; GRANJEIRO, P. A. Extraction, purification and characterization of inhibitor of trypsin from *Chenopodium quinoa* seeds. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 35, n. 4, p. 588-597, 2015.

POMPEU D. G.; POMPEU L. G.; TONELLI, F. C.P.; SANTOS, D. M.; SILVA, J. A.; GRANJEIRO, P. A. Extraction, Purification, partial Characterization and Antimicrobial Activity of a Protease Inhibitor from *Albizia niopoides* seeds. International Journal of Advanced Scientific Research and Management, v. 1, p. 27-34, 2016.

SILVA, J. A.; POMPEU, D. G.; COSTA, O. F.; GONÇALVES, D. B.; SPEHAR, C. R.; MARANGONI, S.; GRANJEIRO, P. A. The importance of heat against antinutritional factors from *Chenopodium quinoa* seeds. Food Science Technology, v. 35, n. 1, p. 74-82, 2015a.

THERMOFISHER SCIENTIFIC. O que é cromatografia e como funciona. Disponível em:<https://www.thermofisher.com/blog/ask-a-scientist/what-is-chromatography/>. Acesso em 25/08/2021.

WILSON, K.; WALKER, J. Principles and Techniques of Practical Biochemistry and Molecular Biology. 7ª ed. Cambridge University press, Cambridge-Grã Bretanha, 2010.

José Antonio da Silva

Luísa Ferreira da Cruz

Júlia Antunes Tavares Ribeiro

Diego Fernandes Livio

Thaís Paula Rodrigues Gonçalves

Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves

Classes de proteases	Exemplos	Exemplos de inibidores específicos
Serino-proteases	Tripsina; Quimiotripsina; Elastase; Calicreína pancreática; Subtilisina.	Aprotinina; Benzamidina; Leupeptina; TPCK ^a ; TLCK ^b ; SBTI ^c ; PMSF.
Cisteíno-proteases	Papaína; Actinidina; Cathepsina.	E-64.
Aspártico-proteases	Pepsina; HIV1-protease.	Pepstatina
Metaloproteases	Colagenases (Carboxipeptidase A, Termolisina)	Amastatina; EDTA; 1-10 fenatrolina.

1. INTRODUÇÃO

Proteases são enzimas proteolíticas que atuam na hidrólise de proteínas (quebra de ligação covalente com participação de uma molécula de água), podendo ser de origem vegetal, animal e microbiana. As proteases são classificadas como um subgrupo das hidrolases e sua nomenclatura é feita segundo o tipo de reação catalisada, a natureza química do sítio catalítico e de acordo com sua estrutura. Dessa maneira, subdividem-se em exopeptidases e endopeptidases, dependendo de seu sítio de ação. As principais classes são: serina proteases; cisteína proteases; aspártico proteases; treonina protease e metaloprotease representadas no quadro 6 (SILVA-LÓPEZ, 2010).

*** ^aTLCK- N-tosil-lisil clorometil cetona; ^b

TPCK, N-tosil-fenilalanil clorometil cetona;

^c SBTI, Inibidor de tripsina da soja. Fonte:

Adaptado de Barret (1994) e Neurath (1986).

Quadro 7 - Tipos de Proteases.

A família de protease mais bem caracterizada e mais fisiologicamente versátil é a das serino proteases, elas podem ser divididas em dois tipos as serino proteases de mamíferos (quimiotripsina, tripsina, elastase) e a serino protease bacteriana (subtilisina). Diferem na sequência de aminoácidos e na estrutura tridimensional, embora tenham um sítio ativo e um mecanismo enzimático em comum. No que se refere a cisteíno proteases, pode-se incluir várias cathepsinas de mamíferos, as proteases ativadas pelo cálcio citosólico (calpaínas), a papaína e a actinidina de plantas, sendo as papaínas as mais estudadas dessa família.

Já as proteases aspárticas incluem a penicilopepsina bacteriana, pepsina de mamíferos, renina, quimosina e certas proteases fúngicas. E por fim, as metaloproteases também se diferenciam em dois tipos: as carboxipeptidases pancreáticas de mamíferos e a termolisina bacteriana, que diferem uma da outra na estrutura química, embora ambas tenham zinco em seu sítio ativo (TREMACOLDI, 2009).

As enzimas proteolíticas produzidas por microrganismos podem atuar na hidrólise de proteínas da membrana e da parede celular de plantas hospedeiras, facilitando a penetração e a infecção. Por outro lado, é comum e amplamente distribuída a ocorrência de inibidores para essas proteases no reino vegetal, representando um mecanismo de defesa. Em seres humanos, as proteases representam uma classe de enzimas com importantes papéis em processos biológicos, como por exemplo a digestão, coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecido (MURI, 2014).

Proteínas de reserva de plantas

Diversas proteínas atuam como reserva proteica em plantas. As proteínas de reserva podem ser subdivididas em proteína de reserva de sementes e proteínas de reserva vegetativa, a depender do tecido e estrutura onde estas são encontradas. As proteínas de sementes ainda podem ser classificadas em albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas de acordo com a solubilidade das proteínas e tipo de extração. As proteínas de armazenamento são as principais fontes de nitrogênio para o crescimento após a germinação da semente (SHEWRY *et al.*, 1995).

Adicionalmente, outras proteínas atuam como reserva proteica especialmente em tubérculos, podem representar até 60% do total de proteínas solúveis nos tecidos de reserva. Proteínas como as globulinas 11S, globulinas 7S, albumina 2S, inibidores de proteinase, heveínas, lectinas, vicilinas 7S desenvolvem importante papel no metabolismo de plantas, como por exemplo, a participação no sistema de defesa da planta contra insetos, fungos e bactérias. Sendo assim, estes tipos de proteínas (inibidores de protease e lectinas) possuem papel de destaque devido às diversas possibilidades de utilização na modulação de processos biológicos para a cura de enfermidades (BALZOTTI *et al.*, 2008).

Os inibidores de protease (IPs) são amplamente distribuídos no reino vegetal. As famílias de plantas Leguminosae, Solanaceae e as gramíneas são conhecidas por serem ricas nestes inibidores. Nestas plantas, estão concentrados em órgãos reprodutivos e de estocagem, assim como em tecidos vegetativos. Sua expressão acontece continuamente durante a vida vegetal, podendo ser acentuada em resposta ao ataque de predadores (SILVA, *et al.*, 2015, OLIVEIRA *et al.*, 2013). Valdes-Rodriguez e colaboradores purificaram e caracterizaram um inibidor de tripsina proveniente de *Amaranthus hypochondriacus* (VALDES-RODRIGUEZ *et al.*, 1993).

Os inibidores de protease podem ser classificados de acordo com o tipo de enzima

que inibem, sendo conhecidos como inibidores de cisteíno, serino, aspártico ou metalo-proteases. São ainda classificados em tipos quando se considera a homologia da estrutura primária, posição dos sítios ativos, localização e número de pontes dissulfeto. Os tipos de inibidores de protease de maior destaque em leguminosas são Kunitz e Bowman-Birk (DANTZGER *et al.*, 2015). Podem ainda ser encontradas as famílias *potato tipos I e II*, *Barley*, *Squash*, *Kazal* e aproximadamente 15 outros tipos (FANG *et al.*, 2012; SILVA, *et al.*, 2015).

É possível verificar a importância dessas moléculas para o sistema imune. Majchrzak-Gorecka e colaboradores (2016) mostraram em seu trabalho a importância de proteínas catiônicas, inibidoras de protease, na regulação do sistema imune inato e adquirido, e como um componente no processo de regeneração tecidual. Estas moléculas inibidoras de serinoprotease são também descritas como antimicrobianas. É ainda possível utilizar-se IPs para se evitar reações alérgicas e proteger o organismo de inflamações excessivas e desreguladas, além de afetar a proliferação celular e a apoptose.

Quanto à proliferação celular foi investigada por Joanitti e colaboradores (2009) a ação dos inibidores de protease vegetais Bowman-Birk, provenientes de sementes de *Vigna unguiculata* capazes de inibir a proliferação e a viabilidade de células de câncer de mama da linhagem MCF-7; este estudo vem à reforçar a aplicação fisiológica dos IPs.

As lectinas são proteínas não-imunes que interagem e reconhecem carboidratos de vários tipos, isolados ou complexados, de forma específica, sendo por isso largamente estudado pela glicobiologia. Estas moléculas se diferenciam do grupo das imunoglobulinas por não precisarem de estímulo antigênico para serem sintetizadas (POMPEU, 2015). Além disso, as lectinas possuem menor afinidade de ligação com os carboidratos (DUVERGER *et al.*, 2003). Arena-del Ángel e colaboradores descobriram em 2015 a capacidade de uma lectina obtida de *Amaranthus leucocarpus* de ativar linfócitos CD4+ (ARENA-DEL ANGEL, *et al.*, 2015).

De acordo com Van-Damme, (2014), a interação entre lectinas e carboidratos ocorre em um sítio formado por cinco ou seis aminoácidos e ligam-se às hidroxilas dos carboidratos. A especificidade da ligação envolve as ligações de hidrogênio fortalecida por interações hidrofóbicas entre anéis piranosídicos dos carboidratos e anéis aromáticos dos resíduos de aminoácidos da região.

Já foram identificadas 12 famílias de lectinas vegetais de acordo com a estrutura terciária e relações evolutivas. São elas: aglutinina relacionada com quitinase, *Amaranthin*, heveína, aglutinina *Agaricus bisporus*, aglutinina *Galanthus nivalis*, *Cyanovirin*, aglutinina *Euonymus europaeus*, aglutinina *Galanthus nivalis*, jacalina, proteínas com domínios de lectina leguminosa, motivo lisina, nictaba e família B-ricina (VAN-DAMME *et al.*, 2007).

As lectinas possuem importantes funções biológicas, dentre as quais é possível

citar interação e reconhecimento de carboidratos por aquelas presentes em hepatócitos dos hormônios luteinizante e tireotropina, o que permite a internalização dos mesmos e regulação de suas atividades, processos infecciosos como a infecção do vírus influenza e dos vírus do herpes simples HSV 1 e HSV 2 pela interação com carboidratos de superfície das células hospedeiras, o reconhecimento por aquelas presentes na membrana do complexo de Golgi de proteínas marcadas com o oligossacarídeo manose-6-fosfato o que facilita seu transporte para lisossomos (VAN-DAMME, 2014; NELSON & COX, 2015).

O gênero *Amaranthus* compreende aproximadamente 80 espécies vegetais. Algumas dessas espécies já foram descritas como ervas daninhas devido à sua capacidade de diminuir a qualidade e o número de grãos de outros vegetais quando plantados próximos a ele. Além disso, foram identificados metabólitos secundários provenientes deste gênero com poder alelopático capazes de reduzir o vigor de outras plantas daninhas e de matar bovinos leiteiros. Apesar destes efeitos, devido ao alto teor de proteínas, amido e nitrogênio em seus grãos, o interesse sobre este gênero como fonte de alimentação para humanos tem sido crescente (EL-GHAMERY, *et al.*, 2017). Sendo assim, é de fundamental importância o estudo e caracterização de lectinas e inibidores de protease provenientes do gênero *Amaranthus*. Ideias iniciais destes processos serão fornecidas a seguir.

2 . OBJETIVOS

Identificar amostras de extratos vegetais que contenham inibidores de tripsina e construir a curva de inibição.

3 . MATERIAIS

- a. Pipetas automáticas
- b. Pipeta de 1 mL e 5 mL
- c. Provetas de 25 ou 50 mL
- d. Becker de 25 ou 50 mL

4 . SOLUÇÕES

- a. Tampão Tris-HCl 0,1M pH 8
- b. HCl 10^{-3} M
- c. BAPNA (Cloridrato de *N*- α -Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida) – SUBSTRATO estoque (438 mg de BAPNA em 10 mL de DMSO)
- d. Tripsina Bovina – ENZIMA estoque (5 mg/mL da enzima e diluir em 1 mM de

HCl)

- e. Ácido Acético 30%
- f. Diluição das amostras eluídas do FPLC e liofilizadas na seguinte proporção: 1 mg em 1 mL de água.
- g. A diluição prévia do substrato e da enzima estoque (1/100) está demonstrada na figura 6.

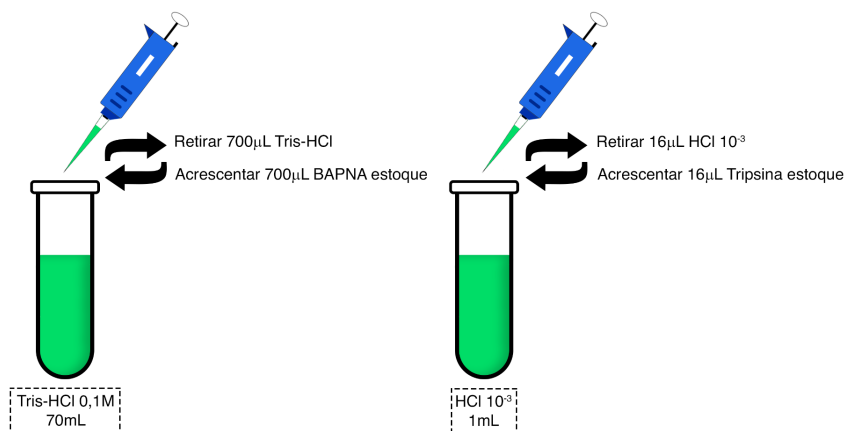


Figura 6 - Esquema geral para diluição do substrato e da enzima estoque.

Fonte: do próprio autor, 2022.

5 . PROCEDIMENTO

Em enzimologia o planejamento experimental é fundamental. Desta forma o uso de quadros com os reagentes e os volumes necessários para a pipetagem se faz necessário.

A. Ensaio de inibição qualitativo

No quadro 8 estão demonstrados os reagentes e os volumes necessários para se realizar o ensaio qualitativo.

Tubos	Tampão Tris-HCl (μL)	H ₂ O (μL)	Enzima (μL)	Amostra (μL)	BAPNA* (mL)	Ácido Acético 30% (μL)	Abs 405 nm**
100%, 100%'	250	200	50	-----	1	500	
B, B'	250	250	-----	-----	1	500	
1	250	150	50	50	1	500	
2	250	150	50	50	1	500	
3	250	150	50	50	1	500	

* BAPNA: *N*-α-Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida **Abs: absorbância.

Quadro 8 – Protocolo para pipetagem em ensaio de inibição qualitativo.

Fonte: do próprio autor (2022).

- Colocar em sequência todos os componentes da tabela acima até o AMOSTRA. Pipetar 50 μL das amostras obtidas através cromatografia de gel filtração;
- Incubar os tubos em banho-maria 37°C por 2 minutos e acrescentar o BAPNA nos tubos dentro do banho-maria;
- Aguardar 20 minutos de reação e após esse tempo parar a reação utilizando-se ácido acético 30%;
- ar a leitura dos tubos em espectrofotômetro a 405 nm;
- A concentração de tripsina foi calculada de acordo com a equação 1 (*Trypsin assay worthington Biochemistry*). Uma unidade de inibição de 1 μg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio, e calculada como descrito na equação 2.

$$\text{Tripsina} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = A_{280\text{nm}} \times 0,70 \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{UI} = \frac{(A_{405\text{nm}1} - A_{405\text{nm}2})}{(A_{405\text{nm}1} - A_{405\text{nm}0})} \times 2 \mu\text{g}. \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo, A_{405 nm1} o controle positivo (apenas tripsina), A_{405nm2} a amostra e A_{405nm0} o branco (apenas tampão de ensaio e substrato)

B. Ensaio de inibição Quantitativo

No quadro 9 estão demonstrados os reagentes e os volumes necessários para se realizar o ensaio qualitativo.

Tubos	Tris-HCl (μ L)	H ₂ O (μ L)	Enzima (μ L)	Inibidor (μ L)	BAPNA* (mL)	Ácido Acético 30% (μ L)	**Abs ₄₀₅ nm
100%, 100%', 100%"	250	200	50	-----	1	500	
B, B', B''	250	250	-----	-----	1	500	
1, 1', 1''	250	180	50	20	1	500	
1B	250	230	-	20	1	500	
2, 2', 2''	250	160	50	40	1	500	
2B	250	210	-	40	1	500	
3, 3', 3''	250	120	50	80	1	500	
3B	250	170	-	80	1	500	
4, 4', 4''	250	80	50	120	1	500	
4B	250	130	-	120	1	500	
5, 5', 5''	250	40	50	160	1	500	
5B	250	90	-	160	1	500	
6, 6', 6''	250	-----	50	200		500	
6B	250	50	-	200	1	500	

* BAPNA: *N*- α -Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida **Abs: absorbância.

Quadro 9 – Protocolo para pipetagem em ensaio de inibição quantitativo.

Fonte: do próprio autor (2022).

São necessárias as seguintes etapas:

1. Diluir as amostras do inibidor em água ultrapura, agitar e centrifugar, que será utilizado para o experimento somente o sobrenadante.
2. Colocar em sequência todos os componentes da tabela 3 até o INIBIDOR.
3. Incubar os tubos em banho-maria 37°C por 2 minutos.
4. Acrescentar o BAPNA nos tubos num intervalo de tempo de 15 em 15 segundos, com os tubos dentro do banho-maria.
5. Aguardar 20 minutos de reação.
6. Após esse tempo parar a reação utilizando-se ácido acético 30% no mesmo intervalo de tempo que foi colocado o substrato
7. Realizar a leitura dos tubos em espectrofotômetro a 405 nm, zerando o aparelho com o tudo branco. Anotar os valores e construir a curva de inibição com os valores obtidos (OBS: descontar o valor do tubo BRANCO de todas as amostras inclusive do tubo 100%).

OBS: Realizar os testes em triplicata. As amostras extraídas da planta deverão ser diluídas em água ultrapura ou deionizada, agitadas e centrifugadas (3.000 rpm por 10 min), reservando o sobrenadante para os testes.

6 . QUESTÕES

- 1 - O que é uma protease?
- 2 - Qual a função dos inibidores de proteases para as plantas?
- 3 - Qual a importância dos inibidores de proteases nos sistemas biológicos?
- 4 - Os inibidores de proteinases poderiam ter função inseticida? Explique
- 5 - Quais as classificações dos inibidores de protease?

7 . CURIOSIDADES

Inibidores de proteases representam os medicamentos antivirais mais bem-sucedidos atuando em enzimas virais. Um alvo potencial para ação contra os coronavírus seria uma protease (Mpro), a qual é necessária para o processo de replicação viral e que seria inibida pela combinação lopinavir/ritonavir (LPV/r), inibidores de protease usados no tratamento de HIV. Entretanto, um estudo recente não mostrou benefício com esses medicamentos em pacientes com Covid-19. Outro antirretroviral, o atazanavir (ATV), também parece mostrar atividade contra a protease do SARS-CoV-2 em experimentos *in silico* e evidências de outros estudos apontam para sua capacidade de alcançar os pulmões. Baseados nesses achados prévios, ATV, com e sem a combinação com ritonavir, foi estudado como possível agente antiviral para o novo coronavírus.

Embora seja um estudo *in vitro*, os resultados mostram que ATV pode ser outra medicação com potencial para o combate contra a Covid-19 e que o mesmo poderia ter melhor performance do que a combinação LPV/r, já que os dados mostram uma potência pelo menos 10 vezes maior com o primeiro antirretroviral (Fintelman-Rodrigues, et al., 2020).

REFERÊNCIAS

- ARENAS-DEL ÁNGEL, M.; LEGORRETA-HERRERA, M.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; GARFIAS, Y.; CHÁVEZ, R.; ZENTENO, E.; LASCURAIN, R. *Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes a moesin-like O-glycoprotein and costimulates murine CD3-activated CD4(+) T cells. *Immunity, Inflammation and Disease*, v.3, n.3, p. 182-95, 2015.
- BALZOTTI, M. R. B.; THORNTON, J. N.; MAUGHAN, P. J.; MCCLELLAN, D. A.; STEVENS, M. R.; JELLEN, E. N.; FAIRBANKS, D. J.; COLEMAN, C. E.; Expression and evolutionary relationships of the *Chenopodium quinoa* 11S seed storage protein gene. *International Journal of Plant Sciences*, v. 169, n.2, p. 281-29, 2008.
- CULERRIER, R.; BARRE, A.; HIRABAYASHI, J.; PEUMANS, W. J. Phylogenetic and specificity studies of two-domain GNA-related lectins: generation of multispecificity through domain duplication and divergent evolution. *Biochemical Journal*, v. 404, p. 51-56, 2007.

DANTZGER, M.; VASCONCELOS, I. M.; SCORSATO, V.; APARICIO, R.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Bowman-Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, biochemical properties and insecticidal potential. *Phytochemistry*, v.118, p. 224-235, 2015.

DUVERGER, E.; FRISON, N.; ROCHE, A.C.; MONSIGNY, M. Carbohydrate-lectin interactions assessed by surface plasmon resonance. *Biochimie*, v. 85 n.1-2, p.167–179, 2003.

EL-GHAMERY, A. A.; SADEK, A. M.; BAR, O. H. A. E. Comparative anatomical studies on some species of the genus *Amaranthus* (Family: Amaranthaceae) for the development of an identification guide. *Annals of Agricultural Science*, v. 62, n. 1, p. 1-9, 2017.

FANG, E. F.; BAH, C. S. F.; WONG, J. H.; PAN, W. P.; CHAN, Y. S.; YE, X. J.; NG, T. B.; A potencial human hepatocellular carcinoma inhibitor from *Bauhinia purpurea* L. seeds: from purification to mechanism exploration. *Genotoxicity and carcinogenicity*. v. 86, n. 2, p. 293-304. 2012.

FINTELMAN-RODRIGUES, N.; SACRAMENTO, C. Q.; LIMA, C. R.; DA SILVA, F. S.; FERREIRA, A. C.; MATTOS, M.; FREITAS, C. S.; SOARES, V. C.; DIAS, S. S. G.; TEMEROZO, J. R.; MIRANDA, M.; MATOS, A. R.; BOZZA, F. A.; CARELS, N.; ALVES, C. R.; SIQUEIRA, M. M.; BOZZA, P. T.; SOUZA, T. M. L. Atazanavir inhibits SARS-CoV-2 replication and pro-inflammatory cytokine production. *BioRxiv*, p. 1-28, 2020.

JOANITTI G. A.; AZEVEDO, R. B.; FREITAS, S. M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. *Cancer Letters*, v.1, n. 293, p. 73-81, 2010.

MAJCHRZAK-GORECKA, M.; MAJEWSKI, P.; GRYGIER, B.; MURZYN, K.; CICHY, J. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), a multifunctional protein in the host defense response. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. v. 28, 79-93, 2016.

MURI, E. M. F. Viral proteases: important targets of peptidomimetic compounds. *Química Nova*, v.37, n.2, 2014.

NELSON, D.; COX, M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, Porto Alegre: Artmed, Porto Alegre, 6^a Edição, Savier, 2015.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. (Eds.). *Proteolytic enzymes - a practical approach*. Oxford: JRL Press, 1990. 259 p.

OLIVEIRA, C. F. R.; SOUZA, T. P.; PARRA, J. R. P.; MARANGONI, S.; SILVA-FILHO, M. C.; MACEDO, M. L. R. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 165, n. 1, p. 19-25, 2013.

POMPEU, D. G.; MATTIOLI, M. A.; RIBEIRO, R. I. M. A.; GONÇALVES, B.; MAGALHAES, J. T.; MARANGONI, S.; SILVA, J. A.; GRANJEIRO, P. A. Purification, partial characterization and antimicrobial activity of Lectin from *Chenopodium quinoa* seeds. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 35, n. 4, p. 696-703, 2015.

SHEWRY, P.R.; NAPIER, J.A.; TATHAM, A.S.; Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant Cell*, v. 7, n. 7, p. 945-956. 1995.

SILVA, J.A.; POMPEU, D. G.; SMOLKA, M. B.; GOZZO, F. C.; COMAR, M. JR.; EBERLIN, M. N.; GRANJEIRO, P. A.; MARANGONI, S. Primary structure of a trypsin inhibitor (*Copaifera langsdorffii* Trypsin Inhibitor-1) obtained from *C. langsdorffii* Seeds. Journal of Biomolecular Techniques, v. 26, n. 3, p. 90-102, 2015.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de Leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. Química Nova, v. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010.

TREMACOLDI, C. R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2009. 44p.

VALDES-RODRIGUEZ, S.; SEGURA-NIETO, M.; CHAGOLLA-LOPEZ, A.; VERVER, Y.; VARGAS-CORTINA, A.; MARTINEZ-GALLARDO, N.; BLANCO-LABRA, A. Purification, characterization, and complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds. Plant Physiology, v.103, n. 4, p. 1407-1412, 1993.

VAN DAMME, E. J. History of plant lectin research. Methods in molecular biology, n. 1200, p. 3-13. 2014.

VAN-DAMME, E. J. M.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; SMITH, D. F.; ONGENAERT, M.; WINTER, H. C.; ROUGE, P.; GOLDSTEIN, I. J.; MO, H.; KOMINAMI, J.; CULERRIER, R.; BARRE, A.; HIRABAYASHI, J.; PEUMANS, W. J. Phylogenetic and specificity studies of two-domain GNA-related lectins: generation of multispecificity through domain duplication and divergent evolution. Biochem., v. 404, p. 51–61, 2007.

José Antonio da Silva

Júlia Antunes Tavares Ribeiro

Thaís Paula Rodrigues Gonçalves

Vinícius Souza Tarabal

**Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves
Gonçalves**

Anderson Fernandes de Melo

1. INTRODUÇÃO

O ensaio de hemaglutinação ocorre por meio do reconhecimento de carboidratos na superfície da célula por uma lectina ativa. A identificação destas cadeias de açúcar ocasiona a aglutinação dos eritrócitos que por sua vez formam uma rede reticulada em suspensão. Com esse método é possível obter informações sobre a especificidade de uma lectina e dados semiquantitativos de ligação de açúcares, de forma simples e fácil (SANO; OGAWA, 2014).

As lectinas, ou como também são chamadas, as aglutininas, foram descritas pela primeira vez por Stillmark em 1988 durante seu doutorado. Na sua tese ele relatou a existência de uma hemaglutinina no extrato de mamona e deu esse nome pela característica

de hemaglutinação (STILLMARK, 1988). No esquema 2 estão demonstradas as principais funções das lectinas na natureza.

Os aspectos mais importantes como ocorrência, ensaio de detecção, especificidade, ligação, purificação, interação com células, aglutinação celular, estímulo mitogênico, mecanismo de defesa e toxicidade estão demonstrados no quadro 7.

As lectinas são principalmente constituídas por proteínas de ligação a carboidratos ou glicoproteínas de origem não imune que se ligam às células ou as precipitam. Geralmente as lectinas são classificadas em quatro grupos, com base em sua afinidade para se ligar a Glicose/manose, Galactose e N-acetil-D-galactosamina, L-fucose e Ácidos siálicos (GOLDSTEIN *et al.*, 1980; KUMAR *et al.*, 2012).

Funções das Lectinas na Natureza

Interação entre leguminosas e fungos na fixação simbiótica de nitrogênio



Mecanismo de defesa de plantas contra insetos, herbívoros e fitopatógenos

Proteínas de reserva e endereçamentos de proteínas



Regulação hormonal do ácido indolil acético (AIA)

Reconhecimento e resposta celular entre células adjacentes



Esquema 2 – Funções das lectinas na natureza.

Fonte: do próprio autor, 2022.

Ocorrência	- Vírus, Bactérias, Algas, Fungos, Invertebrados, Vertebrados, Plantas
Ensaio de Detecção	- Aglutinação de eritrócitos modificados - Atividade mitogênica em linfócitos
Especificidade	- Inibição por açúcares: Variação no C2 e C3 dos açúcares (piranose)
Ligação	- Pontes de Hidrogênio e interações não polares - Constante de afinidade: 10^6 - 10^7 indica ligações multivalentes
Purificação	- Cromatografia de afinidade
Composição	- Asp, Ser, Tre (até 30% do total de AA)/sem Cis (Lentilha, Jack bean) - Com até 20% Cis (batata) - Carboidratos (até 50%) - glicoproteínas - ConA: não é glicosilada
Interações com células	- Especificidade a carboidratos - Células cancerígenas ou transformadas se ligam preferencialmente - Carboidratos de glicoproteínas e glicolipídios das membranas
Aglutinação celular	- Quantidade de sítios ligantes - Estrutura química dos receptores - Fluidez das membranas. - Quantidades de cargas elétricas - Estado metabólico das células

Estímulo mitogênico	- Divisão celular e proliferação de linfócitos (T-cells dependente) - Aumento na síntese de DNA e produção de IgG - Germinação de pólen e crescimento do tubo polínico - Proliferação celular de células vegetais/animais em cultura.
Mecanismo de Defesa	- Inibição do crescimento de fungos (hifas) - Inibição da germinação de esporos.
Toxidade	- Síntese de proteínas. - Destruição de microvilosidades - Absorção de nutrientes

Quadro 10 - Aspectos Importantes das lectinas.

Fonte: do próprio autor, 2022.

O papel biológico das lectinas está relacionado ao transporte de açúcar ou armazenamento de carboidratos, assim como estar associadas à ligação de rizóbios simbióticos para formar nódulos radiculares. Devido ao seu papel na adesão e aglutinação, as lectinas têm sido consideradas importantes na interação simbiótica e patogênica entre alguns microrganismos e hospedeiros. As lectinas microbianas podem desempenhar um papel importante na adesão às superfícies colonizadas pelos microrganismos. Por exemplo, as lectinas do tomate se ligam às células da mucosa e resistem à desnaturação por ácidos e enzimas proteolíticas (KILPATRICK *et al.*, 1984; KUMAR *et al.*, 2012)

Estudos de revisão têm demonstrado a aplicação em saúde humana das lectinas, como a indução da imunogenicidade, atividade antitumoral e antimicrobiana. Além do mais, o uso de lectinas contra o HIV vem sendo considerado um *hot spot* (área quente) de pesquisa sobre a doença (HE *et al.*, 2018).

Lectinas e fatores antinutricionais

Apesar de sua importância no reino vegetal (CASTRO *et al.*, 2018) e as inúmeras aplicações biotecnológicas as lectinas são consideradas como fatores antinutricionais quando consumidas de forma crua. Estudos de digestibilidade vêm sendo realizados utilizando técnicas de eletroforese e simulações do sistema gástrico (enzima pepsina) e intestinal (tripsina e quimiotripsina), com e sem aquecimento de extratos de sementes de *Chenopodium quinoa*, conhecida como quinua (SILVA *et al.*, 2015), folhas de *Pereskia aculeata* Miller, conhecida como ora-pro-nóbis (POMPEU *et al.*, 2014), sementes de pequi (GONÇALVES; GRANJEIRO; SILVA, 2017). Estes estudos evidenciaram a importância do cozimento para a desnaturação das lectinas que foram previamente identificadas em extratos.

Cuidados no ensaio de hemaglutinação

Os procedimentos visam determinar a atividade hemaglutinante das lectinas (EB e os picos da coluna de afinidade) frente aos diferentes eritrócitos (POMPEU *et al.*, 2015).

ATENÇÃO!!

Cuidados para manuseio do sangue:

- Todo material biológico deve ser mantido resfriado (4°C), para preservação das atividades enzimáticas e diminuição do metabolismo celular.
- Usar luvas cirúrgicas para manipulação.
- Evitar manuseio por várias pessoas.

2 . OBJETIVOS

Dosar a atividade hemaglutinante em amostras extraídas das sementes de *Amaranthus caldatus* ou de outras sementes de leguminosas.

3 . MATERIAIS

- a. Placas de microtitulação
- b. Pipetas automáticas
- c. Pipeta de 1 mL
- d. Provetas de 25 ou 50 mL
- e. Becker de 25 ou 50 mL
- f. Solução salina isotônica
- g. Hemácias de humanos (A, B, O)
- h. Soluções de açúcares (100 mM) e glicoproteínas (1 mg/mL)

4 . SOLUÇÕES

A. Solução PBS

- a. 0,8 g de cloreto de sódio (NaCl 0,8 %)
- b. 0,2 g de cloreto de potássio (KCl 0,2 %)
- c. 2,2 g de fosfato de sódio hidratado (Na_2HPO_4 0,17 %) ou 1,15g do Anidro
- d. 0,02 g de fosfato de potássio (KH_2PO_4 0,02%)
- e. H_2O pqs 1000 mL

B. Solução de CTBS

- a. 1,21 g Tris
- b. 4,23 g NaCl
- c. 0,367 g de cloreto de cálcio (CaCl_2 5 mM)
- d. Ajustar pH para 7,5 com HCl 50%
- e. H_2O pqs 500 mL

C. Solução Alsever

- a. 2,05 g de glicose
- b. 0,80 g de citrato de sódio
- c. 0,42 g de cloreto de sódio
- d. H_2O pqs 100 mL

D. Solução de Tripsina 1%

- a. 0,001 g de enzima tripsina
- b. PBS pqs 1.0 mL

E. Solução Salina 0,15 M

- a. 9,000 g de cloreto de sódio (NaCl)
- b. H_2O pqs 1000 mL

5 . PROCEDIMENTOS

A. Lavagem dos Eritrócitos

1. Coletar 5 mL de sangue e adicionar 5 vezes o volume de solução salina, ou solução Alsever para evitar a coagulação do sangue;
2. Centrifugar por 10 minutos a 3.000 rpm (1.400 g por 5 minutos) a solução acima separando o plasma do precipitado de eritrócitos;
3. Retirar o plasma e lavar repetidamente por 4 vezes (1800 g por 5 min) o precipitado de eritrócito com solução salina 0,15 M em uma proporção de 1/3 (v/v), (5 mL de eritrócito para 15 mL de solução salina);
4. A suspensão de eritrócitos lavada pode ser armazenada, em solução salina, para uso posterior por até 4 dias em geladeira.

B. Tripsinização dos Eritrócitos

1. Adicionar a 1 mL de eritrócitos lavados em solução salina, um volume de 24 mL de PBS e 1 mL de solução de Tripsina 1%. Deixar a mistura acima incubada por 1 hora a 37°C;
2. Parar a reação da mistura acima, adicionando solução salina gelada;
3. Centrifugar a mistura por 10 minutos a 1.800 g por 5 minutos, de forma obter somente o precipitado de eritrócitos;
4. Lavar repetidamente por 4 vezes (1800 g por 5 min) o precipitado de eritrócito com solução salina 0,15 M em uma proporção de 1/3 (v/v), (5 mL de eritrócito para 15 mL de solução salina), de forma retirar o excesso de tripsina e de PBS.

C. Ensaio para Determinar a Atividade Hemaglutinante

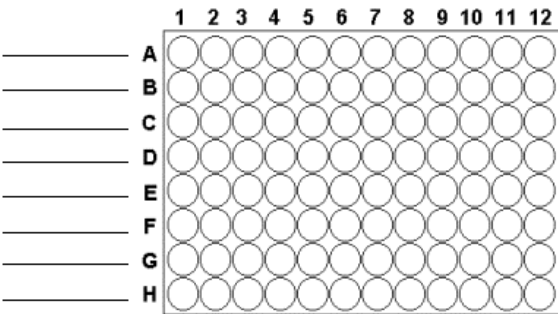
1. Adicionar 50 µL de CTBS nos poços que serão utilizados de uma placa de microtitulação;
2. Adicionar 50 µL da amostra nos primeiros poços da coluna 01;
3. Diluir serialmente a amostra com agitação e transferência de 50 µL para o poço seguinte até a penúltima coluna (11), descartando 50 µL. Considerar como controle os últimos poços que não apresentam amostra;
4. Adicionar a todos os poços 50 µL de CTBS;
5. Adicionar aos poços 50 µL de suspensão de eritrócitos (eritrócitos intactos e tripsinizados devem ser diluídos a uma concentração de 2%, ou seja, 100 µL = 0,1 mL de eritrócitos para 4,9 mL de CTBS);
6. Incubar a placa durante 2 horas à temperatura de 37°C.

D. Em relação ao experimento:

1. Determinar a concentração mínima de lectina que ocasione hemaglutinação.
2. A lectina apresenta especificidade para algum tipo eritrócito.

ANOTAÇÕES:

Tipo Sanguíneo	CMAH (µg/mL)



6 . QUESTÕES

1. O que é ensaio de hemaglutinação? E qual seu principal objetivo?
2. Quais os possíveis interferentes nesse tipo de ensaio?
3. Quais os tipos de aglutinação e suas diferenças?

7 . CURIOSIDADES

Segundo a plataforma de busca de patentes “Lens.org” realizada até maio de 2021, havia 1.206 registros de patentes contendo o termo “hemagglutination” no seu título, resumo ou reivindicações em âmbito global. Essas patentes podem conter métodos de ensaios de hemaglutinação, equipamentos, soluções, reagentes ou novas formas de amostragem e análise a serem utilizadas nesse tipo de ensaio. Das 1.206 patentes apenas 311 estão ativas, 313 estão pendentes e 263 estão expiradas. A empresa de produtos químicos e cosméticos KAO Corporation, com sede em Tóquio – Japão, é a pioneira na solicitação de patentes contendo o termo “hemagglutination”, tendo posse de 13 pedidos de patentes ativos e 15 pendentes.

No Instituto Nacional de Propriedade Industrial, o INPI, foram encontrados apenas 4 registros de patentes com o termo “hemaglutinação” no resumo, sendo um depósito de origem brasileira e os demais depositantes norte americano, chinês e cubano. A invenção brasileira trata de um Método e kit para detecção de anticorpos em líquidos biológicos, dirigidos contra antígenos presente no esquistossoma ou em representantes do seu ciclo evolutivo, sob o código INPI de PI 9800133-7 A2 (MACHADO, 1998).

REFERÊNCIAS

CASTRO, A.H.F.; TAVARES, H.S.; PEREIRA, S.R.F.; GRANJEIRO, P.A.; DA SILVA, J.A.; GALDINO, A.S. Production and characterization of lectin from *Bauhinia holophylla* (Fabaceae:Cercideae) calli. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 1, p. 1-10, 2018.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? *Nature*, v. 285, p. 66, 1980.

GONÇALVES, D.B.; GRANJEIRO, P.A.; SILVA, J.A. Anti-nutritional factors and digestibility of protein in *Cayocar brasiliense* seeds. *Food Science and Technology*. v. 37, n. 4, p. 632-639, 2017.

HE, S.; SIMPSON, B. K.; SUN, H.; NGADI, M. O.; MA, Y.; HUANG T. Phaseolus vulgaris lectins: A systematic review of characteristics and health implications. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition* v. 58, n 1, p. 70–83, 2018.

KUMAR, K. K.; CHANDRA, K. L. P.; SUMANTHI, J.; REDDY, G. S.; SHEKAR, P. C.; REDDY, B. V. R. Biological role of lectins: A review. *J. Orof. Sci.*, v. 4, p. 20-25, 2012.

KILPATRICK, D. C.; GRAHAM, C.; URBANIAK, S. J.; JEFFREE, C. E.; ALLEN, A. K. A comparison of tomato (*Lycopersicon esculentum*) lectin with its deglycosylated derivative. *Biochem J.*, v. 220, p. 843-847, 1984.

MACHADO, J. A. N. Método e kit para detecção de anticorpos em líquidos biológicos, dirigidos contra antígenos presente no esquistossoma ou em representantes do seu ciclo evolutivo. Número INPI PI9800133-7A2. Data de depósito 12/02/1998.

POMPEU D.G.; CARVALHO A.S.; COSTA O.F.; GALDINO A.S.; GONÇALVES D.B.; SILVA J.A.; GRANJEIRO P.A. Fatores antinutricionais e digestibilidade - *in vitro* - de folhas de *Pereskia aculeata* Miller. *BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports*, v. 3, p. 1, 2014.

POMPEU, D. G.; MATTIOLI, M. A.; RIBEIRO, R. I. M. A.; GONÇALVES, B.; MAGALHAES, J. T.; MARANGONI, S.; SILVA, J. A.; GRANJEIRO, P. A. Purification, partial characterization and antimicrobial activity of Lectin from *Chenopodium quinoa* seeds. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 35, n. 4, p. 696-703, 2015.

SANO K.; OGAWA H. Hemagglutination (Inhibition) Assay. In: Hirabayashi J. (eds) *Lectins. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, v. 1200. Humana Press, New York, NY. 2014

SILVA J.A.; POMPEU D.G. COSTA O.F. GONÇALVES; SPEHAR C.R. MARANGONI S. GRANJEIRO P.A. The importance of heat against antinutritional factors from *Chenopodium quinoa* seeds. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 35, p. 74-82, 2015.

STILLMARK, P. H. Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus comm. L.* und einigen anderen Euphorbiaceen. Kaiserliche Universität zu Dorpat, Tartu, Estonia. 1888.

José Antonio da Silva

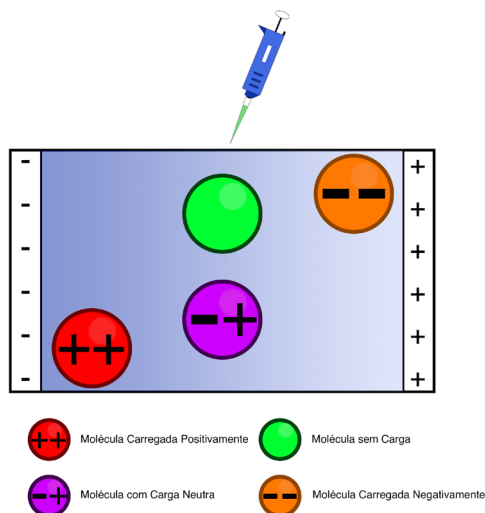
Luísa Ferreira da Cruz

Thaís Paula Rodrigues Gonçalves

Priscila Amaral Diniz

Anna Kelly Moura Silva

Klédna Constância Portes Reis



1. INTRODUÇÃO

Conceitos básicos

Eletroforese é o processo de movimentar moléculas carregadas em solução através da aplicação de um campo elétrico. A eletroforese tem sido utilizada para separação analítica e preparativa de proteínas e ácidos nucleicos em função das moléculas serem dotadas de diferentes cargas, formas e tamanho e migrarem de forma diferente (Fig. 8) (WILSON; WALKER, 2010).

Figura 8 - Movimento das moléculas de acordo com a carga elétrica global em um campo elétrico. **A:** molécula com cargas negativas migra em direção ao polo positivo; **B:** molécula sem carga não apresenta migração; **C:** molécula com número igual de cargas positivas e negativas também não apresenta migração; **D:** molécula com cargas positivas migra em direção ao polo negativo.

Fonte: do próprio autor, 2022.

Técnicas de eletroforese são úteis em várias áreas de pesquisa e aplicação como bioquímica, química de proteínas, farmacologia, medicina forense, investigações clínicas, veterinária, tecnologia de alimentos, genética e biologia molecular. No que se refere à análise de proteínas, os principais objetivos com o uso da eletroforese são caracterização qualitativa de uma mistura; controle de pureza; determinação

de tamanho, carga e quantidade; identificação da proteína e purificação.

A separação é feita em solução aquosa, mas uma matriz é necessária porque a corrente elétrica que passa pela solução gera calor, que causa difusão e mistura convectiva das frações na ausência de um meio de estabilização (Protein electrophoresis, Hoefer). Vários tipos de matrizes podem ser utilizados, mas a matriz composta de gel de poliacrilamida é a que oferece as melhores propriedades para separações eletroforéticas de proteínas com alta resolução. Existem inúmeras variações metodológicas de separações eletroforéticas de proteínas. Elas se baseiam, principalmente, em diferenças de carga, pI e tamanho das proteínas.

Separação por carga

É possível separar proteínas com velocidades de migração diferentes (proteínas com diferentes cargas se locomovem com velocidades diferentes num campo elétrico), o que é geralmente feito em pH fixo. Por exemplo, se a separação for feita em pH alto, como no exemplo a seguir, a maioria das proteínas estarão negativas (isto oferece a vantagem prática de todas migrarem na mesma direção). Porém, estarão com diferenças de carga líquida negativa e, assim, migrarão com velocidades diferentes em um campo elétrico (Figura 9).

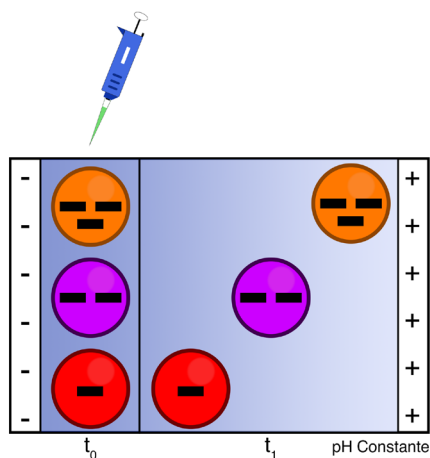


Figura 9 – Eletroforese de proteínas de separação por carga.

Fonte: do próprio autor, 2022.

Separação por pI

Se a separação for feita em gradiente de pH , é possível separar proteínas com

diferentes pontos isoelétricos (pIs). Nesta forma de eletroforese, chamada de focalização isoelétrica, as proteínas migrarão até atingirem o valor de pH onde a sua carga total é zero (pI) e aí não apresentarem mais mobilidade eletroforética (Figura 10).

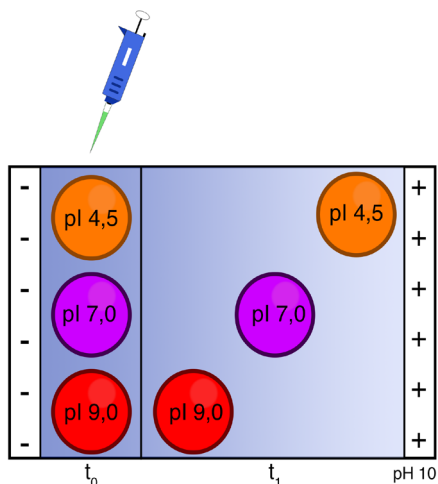


Figura 10 – Eletroforese de proteínas de separação por ponto isoelétrico.

Fonte: do próprio autor, 2022.

Separação por tamanho

Neste caso, a matriz funciona como uma “peneira”, permitindo a passagem de proteínas menores mais rapidamente do que as maiores. Utilizando o detergente SDS (sódio dodecil sulfato) é possível fazer com que a carga específica de cada proteína não influencie na separação. O detergente se liga às proteínas formando uma capa negativa que mascara as cargas intrínsecas (Figura 11).

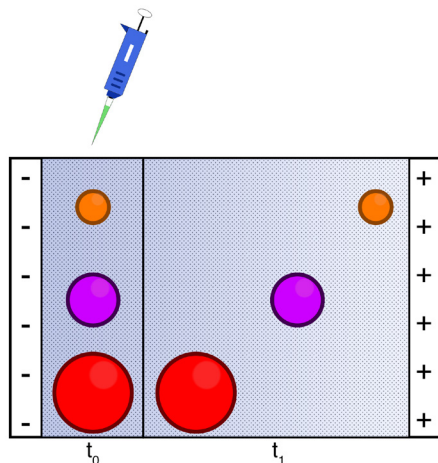


Figura 11 - Eletroforese de proteínas de separação por tamanho.

Fonte: do próprio autor, 2022.

Eletroforese em condições desnaturantes

Um método eletroforético comumente utilizado para determinação da pureza e do peso molecular de proteínas faz uso do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS), com estrutura química, conforme demonstrada na figura 12. O SDS liga-se à maioria das proteínas, provavelmente por interações hidrofóbicas em quantidades grosseiramente proporcionais ao peso molecular de cada proteína e, em geral, na proporção de uma molécula de SDS para cada dois resíduos de aminoácidos. O SDS ligado adiciona uma grande carga negativa à molécula de proteína, tornando insignificantes as cargas intrínsecas dela.

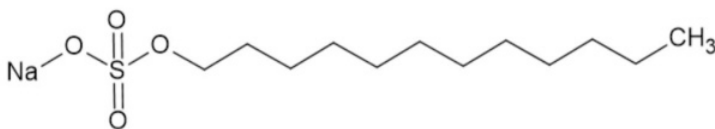


Figura 12 – Estrutura química do dodecil sulfato de sódio (SDS).

Fonte: do próprio autor, 2022.

A conformação nativa das proteínas é alterada quando o SDS se liga a elas e a maioria adquire, então uma mesma forma geométrica, isto as torna muito semelhantes entre si e, por esta razão, passam a ter uma mesma relação entre a carga elétrica e a massa.

Aplicação do uso de eletroforese

Recentemente estudos de digestibilidade de proteínas simulando a digestão no estômago e no intestino *in vitro* vêm utilizando eletroforese para demonstrar o comportamento de fatores antinutricionais na presença das enzimas digestivas como pepsina, tripsina e quimotripsina. São técnicas de baixo custo e efetivas para auxiliar a compreensão dos fatores antinutricionais e alertar a população sobre a importância de cozinhar os alimentos para ingestão. Exemplos dessa aplicação são a identificação de fatores antinutricionais, como inibidores de protease e lectinas, em folhas de *Pereskia aculeata*, conhecida como ora-pro-nóbis é um ingrediente comum na culinária mineira (POMPEU *et al.*, 2014), assim como presente também em sementes de quinoa, planta andina de grande interesse nutricional (SILVA *et al.*, 2015).

Componentes de um sistema de eletroforese

Na figura 13 estão apresentados, basicamente, os componentes necessários para o funcionamento de um sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida.

2 . OBJETIVOS

Realizar eletroforese em gel de poliacrilamida com detergente SDS (SDS-PAGE) com marcadores de massa molecular relativa e amostras de proteínas extraídas de sementes.

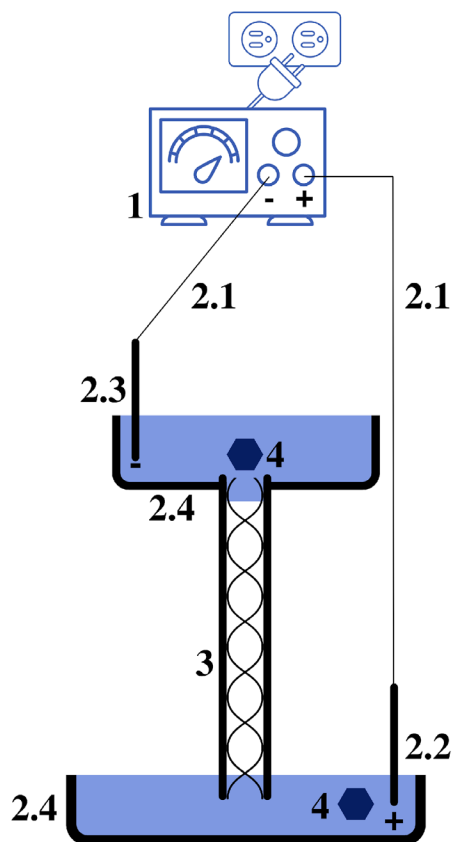


Figura 13 - Esquema geral do sistema de eletroforese. 1. Fonte de energia que fornece voltagem e corrente. 2. Aparelho de eletroforese, constituído por 2.1. Cabos de ligação da fonte ao aparelho de eletroforese, 2.2. Eletrodo positivo (anodo), 2.3. Eletrodo negativo (catodo), 2.4. Reservatório para tampões, 3. Matriz de separação (no caso, gel de poliacrilamida), 4. Tampões.

Fonte: do próprio autor (2022).

3 . MATERIAIS

- a. Pipetas automáticas
- b. 3 Becker de 25 ou 50 mL
- c. Cuba de eletroforese
- d. Placas de vidro
- e. Espaçadores e Pentes

4 . SOLUÇÕES

a. Solução de Bis-Acrilamida

- a. 30,0g de acrilamida
- b. 0,8g de bis-acrilamida
- c. H₂O pqs 100 mL

b. Tampão Tris-HCl 1,0 M pH 8,8 (*Running Gel*)

- a. 60,55g de Tris
- b. H₂O pqs 500 mL

c. Tampão Tris-HCl 1,0 M pH 6,8 (*Stacking Gel*)

- a. 60,55g de Tris
- b. H₂O pqs 500,0 mL

d. Tampão Amostra (*Sample Buffer*)

- a. 0.400 mL de Tris-HCl 1.0 M pH 6,8
- b. 0,500 mL de glicerol
- c. 0,125 mL de azul de bromofenol
- d. H₂O pqs 3,100 mL
- e. SDS 20%

e. Tampão de Corrida 10 X Tris-HCl 0,025M (*Running Buffer*)

- a. 15,2g de Tris
- b. 72,2g de glicina
- c. 5g de SDS
- d. H₂O pqs 500 mL

f. Corante (*Stain*)

- a. 400 mL de metanol PA
- b. 100 mL de ácido acético PA
- c. 1,25g (1250 mg) de coomassie blue R-250
- d. H₂O pqs 500 mL

g. Descorante (*Destain*)

- a. 500 mL de metanol PA

b. 100 de ácido acético PA

c. H₂O pqs 400 mL

h. PSA 10% (Persulfato de Amônio)

a. 10g PSA-----100 mL H₂O

b. 0,1g PSA -----1 mL H₂O

c. Preparar no dia, e conservar com papel alumínio

i. SDS 20%

a. 20,00 g SDS dodecil sulfato de sódio

b. H₂O pqs 100 mL

5 . PROCEDIMENTOS

1. As amostras (5 µL de uma solução com aproximadamente 50 µg de proteína) deverão ser dissolvidas em 15 µL de tampão amostra contendo 2% de SDS. No caso das amostras reduzidas, será empregado ditiotreitol (100 mg/mL) no mesmo tampão e em seguida as amostras serão aplicadas em volume máximo de 40 µL.

2. Após a corrida, o gel será retirado das placas e colocado em uma solução contendo *coomassie blue* R-250 0,25% em metanol, ácido acético e água (40:10:50, v/v), para coloração das proteínas. Para remoção do excesso de corante e visualização das bandas de proteínas, será efetuada a descoloração do gel por lavagem na mistura de metanol, ácido acético e água (40:10:50, v/v).

3. No quadro 10 estão demonstrados os reagentes necessários para o preparo do gel de corrida, enquanto no quadro 11 estão demonstrados os reagentes necessários para o preparo do gel de empacotamento.

Porcentagem do Gel	Bis-Acrilamida (mL)	Tris-HCl 1 M pH 8.8 (mL)	H ₂ O (mL)	SDS 20% (mL)	Temed (mL)	PSA 10% (mL)
12,5%	6,25	5,6	3,175	0,075	0,010	0,050
15%	7,5	5,6	1,85	0,075	0,010	50
17%	8,5	5,6	0,95	0,075	0,010	50
7,5 0%	3,75	5,6	5,675	0,075	0,010	50

Quadro 11 - Gel de corrida (*Running Gel*).

Fonte: do próprio autor, 2022.

Porcentagem do Gel	Bis-Acrilamida (mL)	Tris-HCl 1 M pH 6.8 (mL)	H ₂ O (mL)	SDS 20% (mL)	Temed (mL)	PSA 10% (mL)
5%	0,85	0,625	3,5	0,025	0,005	0,025
3%	0,50	0,625	4,45	0,025 L	0,005	0,025

Quadro 12 - Gel de aplicação ou empacotamento (*Stacking Gel*).

Fonte: do próprio autor, 2022.

OBS.: Usar amperagem constante: 60 volts no gel da Aplicação e 100 volts no gel de corrida.

ANOTAÇÕES

Corrida Nº: _____

Data : __/__/__

PAGE: _____

Condições:

Início: V () A ()

Final: V () A ()

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

01 _____
02 _____
03 _____
04 _____
05 _____
06 _____
07 _____
08 _____
09 _____
10 _____

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

01 _____
02 _____
03 _____
04 _____
05 _____
06 _____
07 _____
08 _____
09 _____
10 _____

6 . QUESTÕES

1. Qual é o princípio da técnica de eletroforese?
2. Quando se utiliza o gel de agarose e o gel de poliacrilamida?
3. Qual a importância do SDS na eletroforese?
4. Qual a importância do tampão na extração das proteínas?
5. Como interpretar o resultado da técnica de eletroforese?

7 . CURIOSIDADES

Um exemplo de aplicação da eletroforese é o exame de apoio para diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias. Na eletroforese de hemoglobina pode-se realizar a separação e medição de hemoglobinas normais e algumas anormais. Esta análise objetiva identificar os diferentes tipos de hemoglobina que podem ser encontrados no sangue.

As hemoglobinopatias são alterações hereditárias que afetam a hemoglobina. Estas alterações podem ser estruturais (anemia falciforme) ou por deficiência de síntese (Talassemias). O tipo de hemoglobina é identificado por meio da eletroforese em pH alcalino (em torno de 8,0 – 9,0), que é uma técnica baseada na taxa de migração da molécula quando submetida a uma corrente elétrica, havendo a visualização de bandas de acordo

com o tamanho e peso da molécula. O resultado é então comparado a um padrão normal, saudável, verificando a presença de hemoglobinas anormais (FRÖMMEL, 2018).

De acordo com o padrão de bandas apresentado, é possível identificar o tipo de hemoglobina do paciente. A hemoglobina A1 (HbA1) apresenta maior peso molecular, não sendo notada tanta migração, enquanto a HbA2 é mais leve, ficando mais ao fundo do gel. O diagnóstico diferencial das talassemias também pode ser feito por meio da eletroforese de hemoglobina associada ao HPLC, em que são verificadas as concentrações de cadeias alfa, beta, delta e gama, verificando a ausência ou presença parcial dessas cadeias de globinas e, de acordo com o resultado, determinar o tipo de talassemia (KASVI, 2018).

REFERÊNCIAS

FRÖMMEL, C. Newborn Screening for Sickle Cell Disease and Other Hemoglobinopathies: A Short Review on Classical Laboratory Methods-Isoelectric Focusing, HPLC, and Capillary Electrophoresis. *International Society of Neonatal Screening*, v. 4, n. 4, p. 39-45, 2018.

KASVI. Eletroforese de Hemoglobina no diagnóstico de Hemoglobinopatias. Disponível em: <https://kasvi.com.br/eletroforese-hemoglobina-hemoglobinopatias/>. Acesso em: 17/08/2021.

POMPEU, D. G.; CARVALHO, A. S.; COSTA, O. F.; GALDINO, A. S.; GONCALVES, D. B.; SILVA, J. A.; GRANJEIRO, P. A. Fatores antinutricionais e digestibilidade *in vitro* de folhas de *Pereskia aculeata* Miller. *BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports*, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2014.

SILVA, J. A.; POMPEU, D. G.; COSTA, O. F.; GONÇALVES, D. B.; SPEHAR, C. R.; MARANGONI, S.; GRANJEIRO, P. A. The importance of heat against antinutritional factors from *Chenopodium quinoa* seeds. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 35, n. 1, p. 74-82, 2015.

WILSON, K.; WALKER, J. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry and Molecular Biology*. 7ª ed. Cambridge University press, Cambridge - Grã-bretanha, 2010.

GRAU DE PURIFICAÇÃO E RENDIMENTO DE PROTEÍNAS

1 . INTRODUÇÃO

José Antonio da Silva
Paulo Afonso Granjeiro

Como se avalia se o processo de purificação de uma proteína foi eficiente?

Para determinar o sucesso de um esquema de purificação de proteína, monitoramos cada etapa do procedimento determinando a atividade específica da mistura proteica e submetendo-a a uma análise por SDS-PAGE. Considere os resultados para a purificação de uma proteína fictícia, resumidos no quadro 13 (VOET; VOET, 2010).

Etapa	Proteína Total (mg)	Atividade Total (unidades)	Atividade Específica (unidade mg ⁻¹)	Rendimento (%)	Grau de Purificação
Homogeneização	295	5.300	18	100	1
Fracionamento salino	183	5.215	29	99	1,6
Cromatografia de filtração em gel	55	3.281	59	62	3,3
Cromatografia de troca iônica	45	3.021	67	57	3,7
Cromatografia de Afinidade	6,6	1.708	259	32	14,5

Quadro 13 – Quantificação de um protocolo de purificação de uma proteína fictícia.

Fonte: do próprio autor (2022).

Em cada etapa os seguintes parâmetros são medidos:

- **Proteína Total:** A quantidade de proteína presente em uma fração é obtida determinando-se a concentração de uma parte de cada fração, multiplicando pelo volume total da fração.
- **Atividade Total:** A atividade enzimática da fração é obtida medindo-se a atividade da proteína no volume da fração utilizada no ensaio, multiplicada pelo volume total da fração.
- **Atividade Específica:** este parâmetro é obtido dividindo-se a atividade enzimática total pela a quantidade total de proteínas presente em cada etapa de purificação. Esse índice aumenta após a purificação.
- **Grau de Purificação:** Estes parâmetros e a medida do aumento de pureza é obtido através da divisão das atividades específicas, calculada após cada etapa de purificação, pelas atividades específica do extrato inicial. Ou seja, indica quanto (rendimento em %) da proteína de interesse ativa presente no material de partida foi recuperada ao final da purificação. Um grau de perda é inerente do processo de purificação.

Também podem ocorrer perdas por desnaturação das proteínas devido às diferentes condições (pH, sais etc.) a que são submetidas nas diferentes etapas de purificação. Espera-se recuperar o máximo possível da proteína de interesse.

2 . OBJETIVOS

Determinar o rendimento e o grau de purificação do inibidor de proteínas extraídas de sementes.

3 . MATERIAIS

- a. Tubos de ensaio previamente lavados com álcool;
- b. Estantes para tubo ensaio
- c. Espectrofotômetro
- d. Pipetas de vidro de 1mL e 5 mL
- e. Pipetas automáticas
- f. Provetas de 25 ou 50 mL
- g. Beckers (25 e 50 mL)

4 . SOLUÇÕES

- a. Etanol 95%

- b. Reagente de Bradford;
- c. Solução de albumina do soro bovino (BSA);
- d. Tampão Tris-HCl 0,1M pH 8 e HCl 10-3 M;
- e. BAPNA (Cloridrato de N- α -Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida) – SUBSTRATO estoque (438 mg de BAPNA em 10 mL de DMSO);
- f. Tripsina Bovina – ENZIMA estoque (5 mg/mL da enzima e diluir em 1 mM de HCl)
- g. Ácido Acético 30%;
- h. Amostra da extração salina (EB). Anotar o volume final e guardar 0,5 mL para as dosagens a adiante;
- i. Amostra do FPLC das colunas de gel filtração (PII) e de troca iônica (DI). Anotar o volume final e guardar 0,5 mL para as dosagens a adiante.

5 . PROCEDIMENTO

A. Ensaio para Determinar a Proteína Total

De acordo com o Quadro 14 pipetar os volumes de acordo com os reagentes.

Tubos	Concentração $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	BSA (mL)*	Água (mL)	Bradford (mL)	**Abs 595nm
1,1',1''	Branco	-	0,5	4,5	
2,2',2''	10 μg / 5000 μL =2 $\mu\text{g}/1000 \mu\text{L}$	0,010 mL= 10 μg	0,490	4,5	
3,3',3''	20 μg / 5000 μL =4 $\mu\text{g}/1000 \mu\text{L}$	0,020 mL= 20 μg	0,480	4,5	
4,4',4''	40 μg / 5000 μL = 8 μg /1000 μL	0,040 mL= 40 μg	0,460	4,5	
5,5',5''	60 μg /5000 μL =12 μg /1000 μL	0,060 mL= 60 μg	0,440	4,5	
6,6',6''	80 μg /5000 μL =16 μg /1000 μL	0,080 mL= 80 μg	0,420	4,5	
7,7',7''	100 μg / 5000 μL =20 μg /1000 μL	0,100 mL= 100 μg	0,400	4,5	
		AMOSTRA	Água (mL)	Bradford (mL)	Abs 595nm
7,7',7''	EB 1/5	0,100	0,400	4,5	
8,8',8''	PII	0,100	0,400	4,5	
9,9',9''	DI	0,100	0,400	4,5	

*BSA: albumina soro bovino ** Abs: absorbência. Fonte: do próprio autor (2022).

Quadro 14 – Quadro para determinar proteína total.

1. Pipetar nos tubos os reagentes de acordo com a tabela acima. Após ensaio, agitar os tubos em vórtex, após 5 minutos em temperatura ambiente (escuro), e fazer a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 595nm.

2. Achar média das triplicatas, subtrair do tubo 1 (controle) e grafar no programa (absorbância em Y e concentração de BSA em X).
3. Calcular a concentração de proteína em EB e nos picos da coluna usando a **Equação da Reta** e os dados do programa.
4. Caso a solução esteja muita concentrada, será necessário fazer as diluições apropriadas para leitura. Lembre-se de considerar as diluições quando calcular a concentração da amostra.

B. Ensaio para Determinar a Atividade de Inibição

De acordo com o Quadro 15 pipetar os volumes de acordo com os reagentes.

Tubos	Tampão Tris-HCl (μL)	H ₂ O (μL)	Enzima (μL)	Amostra (μL)	BAPNA* (mL)	Ácido Acético 30% (μL)	Abs 405 nm**
100%, 100%	250	200	50	-----	1	500	
B, B'	250	250	-----	-----	1	500	
EB	250	150	50	50	1	500	
PII	250	150	50	50	1	500	
DI	250	150	50	50	1	500	

* BAPNA: N-α-Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida **Abs: absorbância.

Quadro 15 – Quadro para determinar atividade de inibição.

Fonte: do próprio autor (2022).

1. Colocar em sequência todos os componentes da tabela acima até o AMOSTRA. Pipetar 50 μL das amostras obtidas através cromatografia de gel filtração;
2. Incubar os tubos em banho-maria 37°C por 2 minutos e acrescentar o BAPNA nos tubos dentro do banho-maria;
3. Aguardar 20 minutos de reação e após esse tempo parar a reação utilizando-se ácido acético 30%;
4. Realizar a leitura dos tubos em espectrofotômetro a 405 nm;
5. A concentração de tripsina foi calculada de acordo com a equação 3 (*Trypsin assay worthington Biochemistry*). Uma unidade de inibição de 1 μg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio, e calculada Realizcomo descrito na equação 4.

$$\text{Tripsina} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = A_{280\text{nm}} \times 0,70 \quad (\text{Equação 3})$$

$$\text{UI} = \frac{(A_{405\text{nm}1} - A_{405\text{nm}2})}{(A_{405\text{nm}1} - A_{405\text{nm}0})} \times 2 \mu\text{g}. \quad (\text{Equação 4})$$

C. Preencher a tabela abaixo usando os dados dos ensaios:

ETAPA	VOLUME (mL)	PROTEÍNA (mg/mL)	ATIVIDADE (UI)	A.E. (UI/mg)	RENDIMENTO (%)	PURIFICAÇÃO (Veze
Extrato Bruto	102	295	5.300	18	100	1
Gel Filtração G-50	12					
DEAE-Sepharose	10					

Quadro 16 – Quadro com a purificação e rendimento.

Fonte: do próprio autor (2022).

6 . QUESTÕES

01. Umabioquímica conseguiu purificar uma proteína através da marcha de purificação a seguir. 1º passo: cromatografia de filtração em gel. 2º passo: cromatografia de troca aniônica. Após cada passo os tubos que continham a atividade de inibidor de tripsina foram reunidos.

- a) O que significa atividade específica?
- b) O que significa o cálculo do rendimento e grau de purificação para a proteína?

7 . CURIOSIDADES

Processo de purificação de imunoglobulina G (IgG) com alto desempenho e rendimento. A imunoglobulina G (IGG) é uma proteína sanguínea com papel importante na resposta imune humana e animal em reconhecer agentes estranhos ao organismos. A IgG pode ser obtida a partir do plasma ou soro sanguíneo humano ou animal ou pode ser produzida através da tecnologia de hibridomas e da tecnologia do DNA recombinante. É reconhecida como uma produto chave dentre os hemoderivados decorrente da crescente demanda em aplicações terapêuticas. Além dessa importante aplicação, a IgG é muito utilizada em kits de diagnósticos e como ligante em cromatologia de imunoafinidade para purificação de proteínas e antígenos. Para todas as aplicações é de suma importância que se tenha um grau de pureza elevado. Desenvolvido na Unicamp um inédito processo de purificação da IgG a partir de soluções brutas de soro ou de plasma sanguíneo humano ou animal, resultando em alto grau de pureza. Durante o processo é utilizado adsorventes de baixo custo para minimizar o número de etapas e eliminar problemas da técnica de cromatografia de afinidade tais como perda da capacidade do adsorvente com o tempo de utilização, toxicidade em caso de desprendimento do ligante da matriz cromatográfica,

perda da atividade biológica da IgG devido a eluição realizada em valores de baixo pH e estocagem do adsorvente com menor possibilidade de contaminação bacteriana. Elimina-se também com este processo a combinação de técnicas de precipitação de etanol e cromatografia de troca-iônica, utilizando para isso, adsorventes com ligantes não biológicos imobilizados.

REFERÊNCIAS

POMPEU, D. G.; MATTIOLI, M. A.; RIBEIRO, R. I. M. A.; GONÇALVES, B.; MAGALHAES, J. T.; MARANGONI, S.; SILVA, J. A.; GRANJEIRO, P. A. Purification, partial characterization and antimicrobial activity of Lectin from *Chenopodium quinoa* seeds. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 35, n. 4, p. 696-703, 2015.

VOET, D. & VOET J. G. Bioquímica. 4a Edição, Editora Artmed, Porto Alegre-RS, 2011.

Paulo Afonso Granjeiro

Diego Fernandes Livio

Maria Auxiliadora de Oliveira

Adriano Guimarães Parreira

Vinícius Souza Tarabal

Tuânia Natacha Lopes Silva

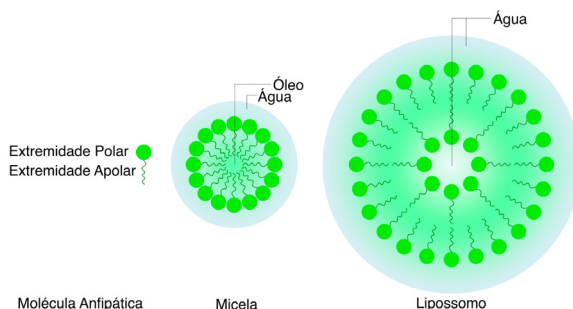


Figura 14 - Esquema da estrutura anfipática dos surfactantes.

Fonte: do próprio autor, 2022.

1. INTRODUÇÃO

De modo geral, os surfactantes são moléculas com estrutura anfipática, apresentando uma porção hidrofóbica (Extremidade apolar) e outra hidrofílica (Extremidade polar) com propriedades tensoativas capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial de líquidos e formar micelas (Fig. 14) (GHOSH; RAY; PRAMANIK, 2020; PIRES et al., 2020).

Estas propriedades físico-químicas tornam os surfactantes adequados para diferentes setores industriais como o de cosméticos e higiene pessoal, produtos de limpeza, agroquímica, petrolíferas, tintas, adesivos, entre outros, agindo como agentes emulsionantes, espumantes, detergentes, lubrificantes e solubilizantes (MOUAFO; MBAWALA; NDJOUENKEU, 2018; TRIPATHI et al., 2019; VARJANI; UPASANI, 2019; ANESTOPOULOS *et al.*, 2020; RODRIGUEZ-LOPEZ *et al.*, 2020; OHADI et al., 2020) (Tabela 4). No entanto, esses compostos comerciais normalmente são de origem quimicamente sintética de fontes petroquímicas e apresentam alta toxicidade e propriedades não biodegradáveis, sendo, portanto, considerados agressivos ao meio ambiente (MARTINS, *et al.*, 2018; MOUAFO; MBAWALA; NDJOUENKEU,

2018; TRIPATHI *et al.*, 2019; JIMOH; LIN, 2019; ADU *et al.*, 2020; ANESTOPOULOS *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020).

A crescente preocupação ambiental entre os consumidores, combinando com novas legislações de controle do meio ambiente levaram à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (BARROS *et al.*, 2007; DRAKONTIS; AMIN, 2020).

Os biossurfactantes, surfactantes naturais, são metabólitos secundários de microrganismos que atuam na modulação de seu crescimento, tais como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (LIMA *et al.* 2018; MAHANTI; KUMAR; PATRA, 2018). Possuem propriedades tensoativas, emulsificantes e até antimicrobianas, que auxiliam no desenvolvimento do microrganismo produtor e no trânsito de compostos hidrofóbicos insolúveis em água (NITSCHKE *et al.*, 2002; BUENO, 2008; TWIGG *et al.*, 2021).

Os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, pois são facilmente degradados por microrganismos, são ecologicamente corretos, sendo biodegradáveis e de baixa toxicidade, podem ser produzidos com substratos de baixo custo, são moléculas estáveis frente à variação de pH, temperatura e força iônica, apresentam baixa CMC, sendo um poderoso agente tensoativo, maior habilidade para complexar metais pesados, melhor capacidade espumante, além da aplicação terapêutica (MAKKAR, 2003; NITSCHKE, 2004; TABATABAEE, 2005; SEKHON, 2012 KUMAR; NGUEAGNI, 2021).

As vantagens dos biossurfactantes em relação aos surfactantes sintéticos mostram que estes podem ser facilmente substituídos em diversos setores industriais (JAHAN *et al.*, 2020; PŁAZA; ACHAL, 2020). O tamanho do mercado de biossurfactantes foi avaliado em US\$ 3,99 bilhões em 2016 e está projetado para atingir US\$ 5,52 bilhões até 2022, com um CAGR de 5,6% durante o período de previsão. A Europa ainda é o principal mercado consumidor de biossurfactantes, representando mais de 50% do consumo global (MARKETSANDMARKETS, 2021).

Porém, apesar de promissores, a produção dos biossurfactantes não pode ser comparada aos surfactantes sintéticos no sentido econômico, pois o custo de obtenção desses tensoativos naturais é elevado (RANE *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2020). Substratos utilizados nos meios de cultura para a produção são de alto custo, além do processo de purificação, gerando baixo rendimento. Portanto, a aplicação dos biossurfactantes em larga escala depende de processos produtivos economicamente viáveis (GUDIÑA *et al.*, 2015).

A quantidade e qualidade dos biossurfactantes produzidos pelas diversas espécies de microrganismos são influenciadas pelo próprio microrganismo utilizado, pelas fontes de carbono, concentrações de nitrogênio, fósforo, manganês e ferro no meio, as possíveis limitações nutricionais envolvidas no crescimento microbiano, além de fatores abióticos, como pH, temperatura, agitação e aeração (MUKHERJEE *et al.*, 2006; AMÉZCUA-VEGA

et al., 2007; CAPPELLETTI; ZANNONI, 2020). Nitschke e Pastore (2002) demonstraram as principais funções e aplicações dos biossurfactantes, conforme a tabela 3.

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano Desemulsificantes	Tratamento de resíduos oleosos Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

Tabela 3 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes.

Fonte: Nitschke & Pastore (2002).

2 . OBJETIVOS

- a) Preparar os meios de crescimento microbiano e para a produção de biossurfactante;
- b) Realizar o pré-inóculo e inóculo bacteriano e cultivar o microrganismo nos meios de cultura com o intuito de produzir o biossurfactante;
- c) Extrair e purificar o biossurfactante através de precipitação ácida e extração orgânica.

3 . MATERIAIS

- a. Erlenmeyers;
- b. Estufa bacteriológica;
- c. Autoclave;
- d. Shaker;
- e. Capela de fluxo laminar;

- f. Centrífuga;
- g. Rota-evaporador;
- h. Liofilizador;
- i. Funil de separação;
- j. pHmetro;
- k. Espectrofotômetro;
- l. Microtubos;
- m. Tubo de centrífuga;
- n. Balão de fundo redondo;
- o. Balança semianalítica e analítica
- p. Alça descartável;
- q. Agitador magnético.

4 . SOLUÇÕES

- a. Solução HCl 6M;
- b. Meio de cultura caldo nutriente;
- c. Meio de cultura para produção do biossurfactante;
- d. Solvente orgânico (Diclorometano);
- e. Água deionizada estéril.

5 . PROCEDIMENTOS

Parte I: Produção do biossurfactante

A. Preparação dos meios de cultivo

A1. Caldo nutriente - Crescimento do pré-inóculo

O meio de cultivo caldo nutriente deverá ser preparado com os ingredientes mencionados na tabela 4.

Componentes	Concentração (g/L)
Extrato de Bife	1,0
Extrato de Levedura	2,0
Peptona	5,0
Cloreto de Sódio	5,0

Tabela 4 - Composição do Meio Caldo Nutriente.

Fonte. Meio comercial.

1. Pesar todos os constituintes com o auxílio de uma balança semianalítica, de acordo com a concentração descrita na tabela 5;
2. Adicionar todos os constituintes pesados em um Erlenmeyer conjuntamente e acrescentar a água deionizada de acordo com a concentração desejada;
3. Homogeneizar o Erlenmeyer com o auxílio de um agitador magnético;
4. Vedar o Erlenmeyer com papel alumínio e kraft, com o auxílio de gomas elásticas;
5. Autoclavar a 121°C por 20 minutos;
6. Armazenar a 4°C ou, caso deseje utilizar o meio produzido, deixá-lo a temperatura similar à de cultivo antes da inoculação.

A2. Meio de cultivo - Crescimento do microrganismo

O meio de cultivo para produção do biossurfactante deverá ser preparado com os ingredientes apresentados na tabela 5.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	70
KH_2PO_4	0,33
Na_2HPO_4	1
NaNO_3	1
Extrato de Levedura	1
Micronutrientes	(Adicionar 1 mL/L)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,01
CaCl_2	0,01

Tabela 5 - Composição do meio para produção do biossurfactante.

Fonte: Adaptado de Wang e colaboradores (2014).

1. Pesar todos os constituintes com o auxílio de uma balança semianalítica, de acordo com a concentração descrita na tabela 3;
2. Adicionar os constituintes pesados em 3 Erlenmeyers separadamente: 1) Glicose. 2) KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaNO_3 . 3) Micronutrientes. Obs: O volume dos Erlenmeyers deve proporcionar 50% de volume livre - coluna de ar.
3. Acrescentar a água deionizada de acordo com a concentração desejada;
4. Homogeneizar os Erlenmeyers com o auxílio de um agitador magnético;
5. Vedar os Erlenmeyers com papel alumínio e kraft, com o auxílio de gomas elásticas;
6. Autoclavar a 121°C por 20 minutos;
7. Após autoclavar, armazenar a 4°C ou, caso deseje utilizar o meio de cultivo, deve-se deixar os constituintes a temperatura similar à de cultivo e misturá-los, na capela de fluxo laminar, em um único Erlenmeyer, sendo que a solução de micronutrientes deve ser adicionada apenas na concentração de 1 mL/L de solução final.

B. Realização do Pré-inóculo

Para a realização do pré-inóculo foi utilizada uma cepa bacteriológica previamente estocada em uma placa de ágar-nutriente devidamente vedada e armazenada à temperatura de 4°C.

Etapas do preparo do Pré-Inóculo na capela de fluxo laminar:

1. Realizar a paramentação com jaleco de mangas compridas e luvas.
2. Limpar toda a superfície da capela com álcool 70%;
3. Ligar a luz UV durante 15 min para esterilização;
4. Desligar UV;
5. Passar álcool nas mãos;
6. Pegar a placa com uma mão e abri-la usando os dedos indicador e polegar;
7. Raspar a alça nas colônias (uma alçada – uma porção de biomassa celular);
8. Tampar a placa e colocá-la na base da capela;
9. Pegar o frasco contendo o meio de cultivo com a mão livre e posicioná-lo próximo da chama;
10. Destampar o frasco com a mão livre;
11. Flambar o frasco;
12. Mergulhar a alça no frasco e dispensar o microrganismo no meio líquido;
13. Flambar o frasco e vedar com papel alumínio e kraft, com o auxílio de gomas elásticas.;

14. Limpar toda superfície com álcool 70%;
15. Ligar a luz UV durante 15 min para esterilização;
16. Desligar a luz UV e a capela;
17. Colocar o frasco no shaker a 200 rpm por 12h a temperatura de 37 °C.

C. Realização do inóculo - Adaptado de Carvalho (2016)

1. Realizar a paramentação com jaleco de mangas compridas e luvas.
2. Limpar toda a superfície da capela com álcool 70%;
3. Ligar a luz UV durante 15 min para esterilização;
4. Desligar UV;
5. Passar álcool nas mãos;
6. Dentro da estufa bacteriológica, verter as culturas do pré-inóculo em tubos estéreis e vedá-los;
7. Centrifugar a uma rotação de 3500 rpm por 30 min;
8. Dentro da estufa bacteriológica, ressuspender o precipitado em solução salina estéril (0,85%) com um volume mínimo necessário. Repetir o procedimento por 2 vezes;
9. Após as lavagens, ressuspender em solução salina estéril (0,85%);
10. Realizar a diluição seriada de 10, 100 e 100 vezes em alíquotas de 1 mL para se obter o fator de diluição;
11. Calcular o volume necessário de inóculo para se obter 1×10^6 UFC/mL seguindo a fórmula apresentada a seguir:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

No qual, C1: Absorbância lida no espectrofotômetro (600 nm) x fator de diluição

V1: Volume desejado

C2: 0,1 (padronizado para se ter 1×10^6 UFC/mL)

V2: volume final do frasco de cultivo

Ex.: Para diluir 10 vezes deve se adicionar 100 µL de amostra + 900 µL de solução salina.

12. Dentro da capela de fluxo laminar, abrir os frascos de cultivo e inocular o volume de inóculo encontrado, com o auxílio de uma pipeta;
13. Vedar devidamente os frascos;
14. Colocar o frasco no shaker a 180 rpm por 80h a temperatura de 35 °C;
15. Desligar a chama;
16. Limpar toda superfície com álcool 70%;
17. Ligar a luz UV durante 15 min para esterilização;
- 18.. Desligar a luz UV e a capela.

PARTE II: Extração do biossurfactante

A. Precipitação ácida - Adaptado de Carvalho (2016)

1. Centrifugar as células cultivadas a uma rotação de 3500 rpm por 30 min.
2. Ressuspender o precipitado em água deionizada com um volume mínimo necessário. Repetir o procedimento por 2 vezes.
3. Após as lavagens, ressuspender em água deionizada com um volume mínimo necessário.
4. Adicionar ácido clorídrico (6M) até ajustar o pH final para 2,0.
5. Manter em refrigeração a 4°C *overnight* (16 horas).
6. Centrifugar por 15 min a uma rotação de 5000 rpm.
7. Ressuspender o precipitado em água deionizada com um volume mínimo necessário. Repetir o procedimento por 2 vezes para retirada do excesso de ácido clorídrico (HCl).
8. Adicionar NaOH (6M) até ajustar o pH final para 7.

B. Extração Orgânica - Adaptado de Carvalho (2016)

1. Em uma capela de exaustão, adicionar a solução contendo o biossurfactante em um funil de separação e acrescentar diclorometano na proporção de (1:1 v/v). Obs.: Podem ser utilizados outros solventes orgânicos como o clorofórmio, por exemplo;
2. Tampar o funil e agitá-lo lentamente por inversão;
3. Esperar a formação de 2 fases;
4. Abrir a válvula do funil e retirar a fase orgânica (interagida com o solvente);
5. Repetir os procedimentos 2, 3 e 4, mais três vezes;
6. Evaporar a fração orgânica através do rota-evaporador a vácuo a uma temperatura de 50-60°C;

7. Liofilizar o precipitado contendo o biossurfactante.

6 . QUESTÕES

1. Qual a importância de realizar o pré-inóculo?
2. Qual a importância de se realizar o processo de lavagem das células do pré-inóculo?
3. Qual a importância de se trabalhar em um ambiente estéril?
4. Qual a importância das etapas de purificação e quais principais propriedades devem ser levadas em consideração para obtenção de uma biomolécula?
5. Qual a importância dos micronutrientes na produção de biossurfactantes?

7 . CURIOSIDADES

Biossurfactantes: uma possível solução ambiental.

As práticas cotidianas de higiene e limpeza promovem o descarte de detergentes e sabões para nos esgotos sanitários que, geralmente, não são tratados, e acabam poluindo os rios, gerando desastres ambientais. Os principais responsáveis pela formação dessa espuma tóxica são os tensoativos sintéticos, como o lauril sulfato de sódio, um agente surfactante amplamente utilizado pela indústria de higiene e limpeza e de fabricação de produtos cosméticos. No fim de 2020, pescadores que vivem às margens do rio Guandu no Rio de Janeiro relataram a formação de espuma no rio e a mortalidade de peixes, fato também relatado pela estação de tratamento de água da região, ETA Guandu, que paralisou a produção de água tratada, afetando o abastecimento de 9 milhões de habitantes (REGUEIRA, 2020).

De modo a solucionar este problema, medidas emergenciais estão sendo tomadas para limpar os rios e tentar conter os efeitos deste tipo de poluição que já se mostra como o maior problema ambiental do Estado do Rio de Janeiro.

Neste contexto, os biossurfactantes, frutos da “tecnologia verde”, podem ser a solução alternativa para este problema por serem atóxicos e biodegradáveis, além de possuírem uma diversidade estrutural vasta que implica em uma grande variedade de propriedades biológicas e físico-químicas atribuindo a eles características equivalentes ou até superiores aos seus equivalentes sintéticos (DRAKONTIS; AMIN, 2020). Tal tendência é corroborada pelo fato de serem economicamente os compostos biotecnológicos de maior interesse no século XXI, relativamente considerados cruciais para melhoria, crescimento, avanço e sustentabilidade ambiental na área (JIMOH; LIN, 2019; SINGH; PATIL; RALE, 2019).

REFERÊNCIAS

- ADU, S. A.; NAUGHTON, P. J.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial Biosurfactants in Cosmetic and Personal Skincare Pharmaceutical Formulations. *Pharmaceutics*, v.12, n. 11, p.1099, 2020.
- AMÉZCUA-VEGA, C.; POGGI-VARALDO, H. M.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RÍOS-LEAL, E.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. *Bioresour Technol*, v. 98, n.1, p. 237-40, 2007.
- ANESTOPOULOS, I.; KIOUSI, D. E.; KLAVARIS, A.; MAJO, M.; SERPICO, A.; SUAREZ, A.; SANCHEZ, G.; SALEK, K.; CHASAPI, S. A.; ZOMPRA, A. A.; GALANIS, A.; SPYROULIAS, G. A.; GOMBAU, L.; EUSTON, S.R.; PAPPAS, A.; PANAYIOTIDIS, M. I. Marine-Derived surface active agents: health-promoting properties and blue biotechnology-based applications. *Biomolecules*, v.10, n. 6, p.885 - 912, 2020
- BARROS, F.F.C.; QUADROS, C. P.; JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, v.30, n. 2, p. 409–414, 2007. biosurfactants-market-report. Acesso em 19 de janeiro de 2021.
- BUENO, S. M. Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual Paulista. São Paulo. 2008.
- CAPPELLETTI, M.; ZANNONI, D. Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds. 2020.
- CARVALHO, F. S. Produção e efeito da surfactina sobre os biomateriais de látex siliconizado e titânio. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de São Del-Rei. Divinópolis. 2016.
- DRAKONTIS, C. E.; AMIN, S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 48, p. 77–90, 2020.
- GHOSH, S.; RAY, A.; PRAMANIK, N. Self-assembly of surfactants: An overview on general aspects of amphiphiles. *Biophysical Chemistry*, v. 265, p. 106429, 2020.
- GUDIÑA, E. J.; FERNANDES, E.C.; RODRIGUES, A. I.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES L. R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Frontiers Microbiology*, v. 6, n.59, p.1-7, 2015.
- JAHAN, R.; BODRATTI, A. M.; TSIANOU, M.; ALEXANDRIDIS, P. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 275, n. 102061, 2020.
- JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 184, 2019.
- KUMAR, P. S.; NGUEAGNI, P. T. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process. *Journal of Hazardous Materials*, v. 407, p. 124827, 2021.

LIMA, W.; PARREIRA, A. G.; NASCIMENTO, L. A.; LEONEL, C. A.; ANDRADE, J. T.; PALUMBO, J. M.; SOARES, A. C.; GRANJEIRO, P.; FERREIRA, J. M. Absence of antibacterial, anti-candida, and anti-dengue activities of a surfactin isolated from *Bacillus subtilis*. Journal of Pharmaceutical Negative Results, v. 9, n., 1, p. 27-32, 2018.

LIU, K.; SUN, T.; CAO, M.; WANG, J.; LU, J. R.; XU, H. Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. Current Opinion in Colloid & Interface Science, v. 45, p. 57–67, 2020.

MAHANTI, P.; KUMAR, S.; PATRA, J. K. Biosurfactants: An agent to keep environment clean. Microbial Biotechnology, v. 1, p. 413–428, 2018.

MAKKAR, R.S.; ROCKNE, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 22, n. 10, p. 2280–2292. 2003.

MARKETASNDMARKETS. Disponível em <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactant-market-163644922.html>. Acesso em 21 de jan. de 2021.

MARTINS, P. C.; BASTOS, C. G.; GRANJEIRO, P. A.; MARTINS, V. G. New lipopeptide produced by *Corynebacterium aquaticum* from a low-cost substrate. Bioprocess and biosystems engineering, v. 41, n. 8, p. 1177-1183, 2018.

MOUAFO, T. H.; MBAWALA, A.; NDJOUENKEU, R. Effect of different carbon sources on biosurfactants production by three strains of *Lactobacillus* spp. BioMed Research International, v. 2018, n. 5034783, 2018.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. Trends Biotechnology, v. 24, p. 509-515, 2006.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. Brazilian Journal of Microbiology, v. 35, n. 1-2, pp. 81-85, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. Química Nova, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

OHADI, M.; SHAHRVAN, A.; DEGHANNOUDEH, N.; ESLAMINEJAD, T.; BANAT, I.; DEGHANNOUDEH, G. Potential use of microbial surfactant in microemulsion drug delivery system: a systematic review. Drug Design, Development and Therapy, v.14, p. 541–550, 2020.

PIRES, M. E. E. et al. Recent Patents on Impact of Lipopeptide on the biofilm formation onto titanium and stainless steel surfaces. Recent patents on biotechnology, v. 14, n. 1, p. 49-62, 2020.

PLAZA, G.; ACHAL, V. Biosurfactants: eco-friendly and innovative biocides against biocorrosion. Int. J. Mol. Sci., v. 21, p. 1-11, 2020.

RANE, A. N. et al. Agro-industrial wastes for production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* ANR 88 and its application in synthesis of silver and gold nanoparticles. Frontiers in Microbiology, v. 8, p. 1–12, 2017.

REGUEIRA, C. G1 Rio de Janeiro. Disponível em <https://g1.globo.com/rj/rio-de-janeiro/noticia/2020/09/19/espuma-branca-surge-no-rio-guandu-e-preocupa-pescadores-em-nova-iguacu.gh.html>. Acesso em 21 de janeiro de 2021.

RODRÍGUEZ-LOPEZ, L.; LÓPEZ-PRIETO, A.; LÓPEZ-ÁLVAREZ, M.; PEÑEZ-DAVILA, S.; SERRA, J.; GONZÁLEZ, P.; CRUZ, J.; MOLDES, A. Characterization and cytotoxic effect of biosurfactants obtained from different sources. *ACS Omega*, v.,5, n. 48, p. 31381–31390, 2020.

SEKHON, K.K.; KHANNA, S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production and potential correlation with esterase activity. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, v. 3, n. 7, p. 1-10, 2012.

SHI, J. et al. Improving iturin A production of *Bacillus amyloliquefaciens* by genome shuffling and its inhibition against *Saccharomyces cerevisiae* in orange juice. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 2018.

SINGH, P.; PATIL, Y.; RALE, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*, v. 126, n. 1, p. 2–13, 2019.

TABATABAEE, A.; MAHNAZ, A. M. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering* 2, n. 1, p. 6–12, 2005.

TRIPATHI, L.; TWIGG, M.; ZOMPRA, A.; SAŁEK, K.; IRORERE, V.; GUTIERREZ, T.; SPYROULIAS, G. A. MARCHANT, R. BANAT, I. Biosynthesis of rhamnolipid by a *Marinobacter* species expands the paradigm of biosurfactant synthesis to a new genus of the marine microflora. *Microbial Cell Factories*, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2019.

TWIGG, M.; BACCILE, N.; BANAT, I.; DÉZIEL, E.; MARCHANT, R.; ROELANTS, S.; BOGAERT, I. Microbial biosurfactant research: time to improve the rigour in the reporting of synthesis, functional characterization and process development. *Microbial Biotechnology*. v.14, n. 1, p. 147–170, 2021.

VARJANI, S.; UPASANI, V. N. Evaluation of rhamnolipid production by a halotolerant novel strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource Technology*, v. 288, n. 121577, 2019.

WANG, C.; CAO, Y.; WANG, Y.; SUN, L.; SONG, H. Enhancing surfactin production by using systematic CRISPRi repression to screen amino acid biosynthesis genes in *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, v.18, n. 1, p. 1–13. 2019.

CAPÍTULO 12

CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDIOS

Paulo Afonso Granjeiro

Diego Fernandes Livio

Maria Auxiliadora de Oliveira

Adriano Guimarães Parreira

Vinícius Souza Tarabal

Tuânia Natacha Lopes Silva

1. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são metabólitos secundários encontrados na natureza na forma de moléculas complexas como: glicolípídeos, fosfolípídeos e lipopeptídeos, complexos de proteínas, polissacarídeos e ácidos graxos (Figura 15) (MARTINS, *et al.*, 2018; SAJID *et al.*, 2020; FARIQ, A.; YASMI, 2020; JAHAN *et al.*, 2020; KUMAR; NGUEAGNI, 2021; TWIGG *et al.*, 2021). Estas biomoléculas podem apresentar diferentes funções no desenvolvimento celular, inclusive atividade antimicrobiana (LIMA *et al.*, 2018). O tipo de biossurfactante gerado depende de cada cepa e de uma série de condições de crescimento celular, altamente influenciadas pelos constituintes do meio de cultivo, pH, temperatura, agitação e aeração (FADHILE ALMANSOORY *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2020) (Tabela 6).

As forças de interação entre as moléculas de mesmo estado físico são denominadas de interfaciais, e de diferentes estados físico de superficiais (SONI, 2019). Na interface líquido/ar as moléculas de superfície não estão completamente envolvidas por outras moléculas vizinhas, então elas são mais coesas com aquelas encontradas na interface entre o líquido e o ar, de modo que cada molécula de superfície é atraída pelas moléculas internas em direção ao centro do líquido. Portanto, a superfície externa do líquido permanece sob tensão, comportando-se como uma película fina elástica (Figura 16a). A tensão superficial depende de diversas variáveis, incluindo a composição do líquido, a temperatura e o ambiente circundante. Por exemplo, a tensão superficial geralmente diminui com o aumento da temperatura. O termo tensão superficial é geralmente aplicado quando há uma única superfície de líquido, por exemplo, na interface líquido-ar ou líquido-sólido. No caso de dois líquidos imiscíveis onde existe uma interface entre os dois líquidos, este efeito é frequentemente denominado tensão interfacial (SONI, 2019) (Fig. 16b).

TIPO DE BIOSURFACTANTE	MICROORGANISMOS
Glicolipídeos - ramnolipídeos - soforolipídeos - trehalolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas - peptídeo-lipídeo - viscosina - serrawetina - surfactina - subtilisina - gramicidina - polimixina	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos - ácidos graxos - lipídeos neutros - fosfolipídeos	<i>Corynebacterium lepus</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos - emulsan - biodispersan - liposan - carboidrato-lipídeo-proteína - manana-lipídeo-proteína	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados - vesículas - células	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Várias bactérias

Tabela 6 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.

Fonte: NITSCHKE, 2002.

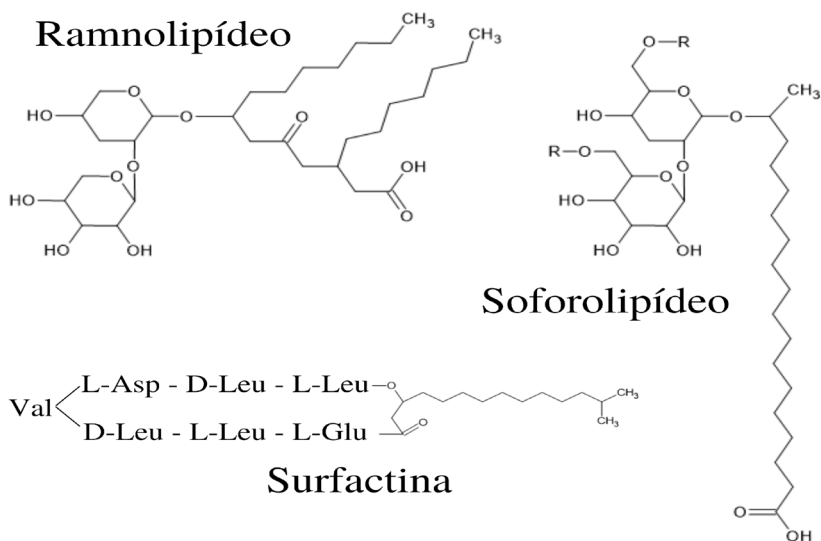


Figura 15 - Estruturas químicas de alguns biossurfactantes.

Fonte: do próprio autor, 2022.

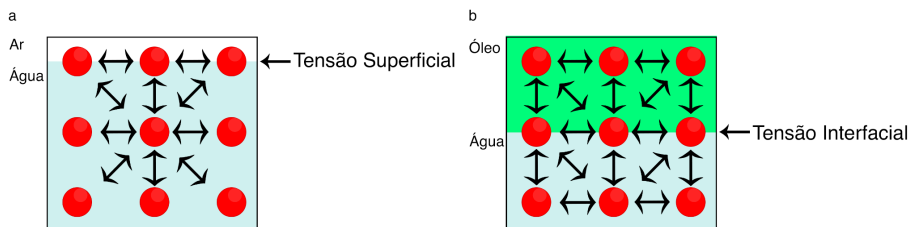


Figura 16 - Esquema das forças coesivas entre as moléculas, caracterizando a tensão superficial (A) e a tensão interfacial (B).

Fonte: do próprio autor, 2022.

A capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial é uma função chave das moléculas anfifílicas (MARTINS *et al.*, 2018). Este é um requisito para a formação de emulsões cineticamente estabilizadas, por exemplo. Moléculas anfifílicas, incluindo biossurfactantes, adsorvem em interfaces (ar / líquido, líquido / líquido, sólido / líquido) devido à sua natureza hidrofóbica-hidrofílica dupla. Como as moléculas de surfactante substituem as moléculas de água ou óleo ao longo da interface, elas reduzem efetivamente as forças intermoleculares entre as moléculas de solvente, reduzindo assim a tensão superficial ou interfacial (JAHAN *et al.*, 2020). Um bom surfactante permite baixar a tensão superficial da água de 72 para 35 mN/m e a tensão interfacial entre a água e n-hexadecano de 40 para 1 mN/m (PACHECO, 2008).

A tensão superficial é, portanto, a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos. Com o aumento da concentração de surfactantes no meio, a tensão superficial diminui até atingir a estabilidade. A partir dessa concentração há a formação de micelas esféricas, sendo assim, este ponto denominado de concentração micelar crítica (CMC), corresponde à mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo (Fig. 17) (PIRES *et al.*, 2020; KUMAR; NGUEAGNI, 2021). A CMC é um dos índices mais utilizados para a avaliação da atividade surfactante.

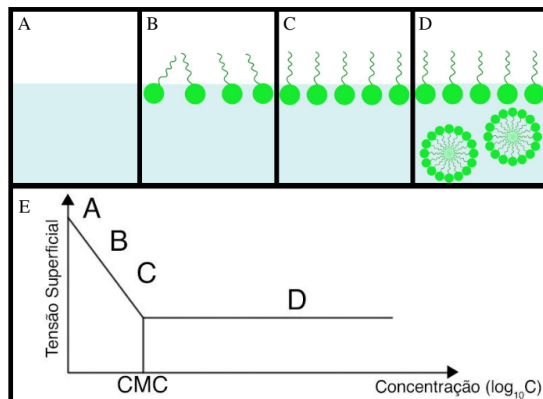


Figura 17 - Esquema da curva de Concentração Micelar Crítica (CMC) com as respectivas organizações das moléculas de biossurfactante na superfície da água.

Fonte: do próprio autor, 2022.

A etapa de purificação de biossurfactantes representa custos consideráveis em sua etapa de produção podendo acarretar um custo adicional de até 60% a 80% ao bioprocessamento, limitando sua aplicação industrial (NOAH *et al.*, 2002; SHALIGRAM; SINGHAL, 2010; INVALLY *et al.*, 2019; CAPPELLETTI; ZANNONI, 2020). Esse isolamento pode ser feito por precipitação através da acidificação do sobrenadante (bastante utilizada para o isolamento da surfactina) (HOROWITZ *et al.*, 1990); da adição de sais à solução de biossurfactante, como sulfato de amônio (isolamento de Alcanol de *Acinetobacter radioresistens*) (NAVON-VENEZIA *et al.*, 1995) e adição de solventes miscíveis em água, tais como etanol, acetona e clorofórmio (PARASZKIEWICZ *et al.*, 2002).

2 . OBJETIVOS

- Realizar a caracterização do biossurfactante quanto ao colapso da gota, tensão superficial e atividade emulsificante;
- Classificar o biossurfactante caracterizado.

3 . MATERIAIS

- Biossurfactante liofilizado;
- Tampas de microplacas de 96 poços;
- Tensiômetro de bancada Kruss;
- Vórtex;
- Balança semianalítica e analítica.

4 . SOLUÇÕES

- a. Soluções com o biossurfactante em diferentes concentrações;
- b. Óleo de motor 10 W-40;
- c. Óleo diesel;
- d. Gasolina;
- e. Óleo de milho;
- f. Óleo de canola;
- g. Óleo de soja;
- h. Solução de Fenol 5 %;
- i. Ácido Sulfúrico;
- j. Reagente de Bradford;
- k. Solução de BSA.

5 . PROCEDIMENTOS

A. Avaliação da Tensão superficial

1. Pesar 20 mg de biossurfactante liofilizado;
2. Diluir o biossurfactante em 20 mL de água deionizada para se ter a concentração de 1 mg/mL (padrão de análise do equipamento que utiliza um frasco ocupando metade de seu volume com 20 mL);
3. Verificar o posicionamento do equipamento na bancada de acordo com o leitor de equilíbrio. O medidor encontra-se na base do tensiômetro, no canto esquerdo, de tal forma que a gota presente nesse orifício esteja centralizada. Caso esta não estiver, posicioná-la com ajuda dos parafusos presentes na base do tensiômetro;
4. Transferir a amostra 20 mg/20 mL do biossurfactante para o frasco apropriado ao equipamento e posicioná-lo no centro da mesa;
5. Posicionar o anel de platina cuidadosamente em seu suporte;
6. Centralizar a mesa e o frasco com o anel de platina utilizando as roscas laterais do equipamento para ajuste, presente na parte lateral da haste do tensiômetro;
7. Posicionar o medidor de tensão superficial na marca zero;
8. No equipamento há uma placa contendo o nível indicativo da posição correta que o anel deve estar para iniciar a leitura. Assim, deve-se abaixar o suporte com o anel até que este mergulhe e atinja a metade da altura da amostra, respeitando o nível indicado. Ao observar, à altura dos olhos, que o suporte se encontra centralizado na

marcação presente na placa branca, conclui-se que está devidamente posicionado;

9. Para realizar a leitura deve-se girar o medidor de tensão vagarosamente até que o anel de platina solte do líquido, rompendo a tensão superficial. O valor demarcado pelo medidor é o valor da tensão superficial em mN/m (mili Newton por metro).

OBS: Para cada análise o anel de platina deve ser flambado, e o frasco devidamente lavado e seco, evitando interferências. Para a confirmação da tensão superficial é recomendável que esta seja realizada em triplicata, sendo o solvente o padrão.

B. Teste do colapso da gota - Adaptado de Bodour e Miller-Maier (1998)

1. Untar os poços das tampas de microplacas contendo 96 poços rasos com 2 μL de óleo de motor 10W-40 e deixar secar por 24 h;

2. Preparar 500 μL de cada uma das soluções abaixo a partir da solução estoque de 4 mg/mL, utilizando a água deionizada como padrão. Caso deseje uma melhor visualização das gotas, recomenda-se a adição de corante azul de metila (1 μL /500 μL):

- Solução A: água destilada
- Solução B: Solução de biosurfactante de 1 mg/mL
- Solução C: Solução de biosurfactante 2x diluída
- Solução D: Solução de biosurfactante 10x diluída
- Solução E: Solução de biosurfactante 100x diluída
- Solução F: Solução de biosurfactante 1000x diluída

3. Elaborar o desenho experimental indicando as posições das soluções em cada um dos poços da placa, em triplicata;

4. Transferir 10 μL de cada uma das soluções de biosurfactante para cada um dos poços, em triplicata.

5. Aguardar 1 min e avaliar o espalhamento das gotas em comparação com o controle (água com ou sem corante). O resultado será considerado positivo quando o diâmetro da gota contendo o biosurfactante for maior que o de uma gota contendo apenas água deionizada (YOUSSEF *et al.*, 2004).

6. Identificar no esquema abaixo, marcando com um X, os resultados positivos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

C. Determinação do índice de emulsificação (IE₂₄) – Adaptado de Cooper e Goldenberg (1987)

1. Preparar uma solução de biossurfactante e água deionizada a uma concentração de 1 mg/mL. Deve-se considerar que serão necessários 1 mL de solução para cada óleo avaliado;
2. Adicionar 1 mL de cada um dos compostos a serem avaliados em seus respectivos tubos de ensaio com tampa rosqueável. Os compostos utilizados foram os seguintes hidrocarbonetos: óleo de motor, óleo de canola, óleo de milho, tolueno e éter de petróleo;
3. Adicionar 1 mL de solução de biossurfactante em cada um dos tubos contendo os compostos, obtendo a concentração de 1:1;
4. Homogeneizar os tubos com o auxílio de um agitador vórtex na velocidade máxima por 1 minuto;
5. Deixar os tubos em repouso à temperatura de 25°C por um período de 24 horas;
6. Medir a altura da camada emulsificada (CE) e a altura total (AT) da mistura;
7. O índice de emulsificação será obtido através da equação 5.

$$IE (24h) = \left(\frac{AE}{AT} \right) * 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

IE (24): Índice de Emulsificação de 24 horas;

AE: altura da camada de emulsão;

AT: altura total da mistura.

A convenção adotada para qualificar a atividade emulsificante está apresentada na tabela 7.

ATIVIDADE EMULSIFICANTE	ALTURA DA EMULSÃO (TIPO ÁGUA EM ÓLEO)
Alta	≥ 2 cm
Moderada	De 1 a 1,9 cm
Baixa	< 1 cm

Tabela 7 - Convenção para qualificar a atividade emulsificante.

Fonte: Adaptado de Matsuura (2004).

D. Identificação do biossurfactante

D₁. Ensaio colorimétrico para determinação de carboidratos – Fenol Sulfúrico

1. Numerar os tubos de ensaio
2. Em um tubo de ensaio (Teste 1) adicionar 500 μ L da amostra (glicose 0,01 mg/mL) + 500 μ L de solução de Fenol 5 % + 2500 μ L de ácido sulfúrico;
3. Em um tubo de ensaio (Teste 2) adicionar 500 μ L da amostra (biossurfactante 1 mg/mL) + 500 μ L de solução de Fenol 5 % + 2500 μ L de ácido sulfúrico
4. Em um tubo de ensaio (Branco) adicionar 500 μ L de água destilada + 500 μ L solução de Fenol 5 % + 2500 μ L de ácido sulfúrico;
5. Deixar esfriar até temperatura ambiente;
6. Fazer a leitura em espectrofotômetro a 490 nm.

D₂. Quantificação de peptídeos – Método de Bradford

1. Preparar o reagente de Bradford descrito na seção de Dosagem de Proteínas;
2. Elaborar a curva padrão de BSA;
3. Pipetar nos tubos os reagentes de acordo com o quadro 17.

Tubo	*BSA (mL)	Água (mL)	Bradford (mL)	**Abs _{595nm}
1 - Branco	-	0,500	0,50	
2	0,010	0,490	0,50	
2'	0,010	0,490	0,50	
3	0,020	0,480	0,50	
3'	0,020	0,480	0,50	
4	0,030	0,470	0,50	
4'	0,030	0,470	0,50	
5	0,040	0,460	0,50	
5	0,040	0,460	0,50	
6	0,050	0,450	0,50	
6'	0,050	0,450	0,50	

7	0,060	0,440	0,50	
7'	0,060	0,440	0,50	
8	0,100	0,400	0,50	
8	0,100	0,400	0,50	
'9	0,200	0,300	0,50	
9	0,200	0,300	0,50	
	Amostra	Água (mL)	Bradford (mL)	Abs_{595nm}
7	0,05	0,450	0,50	
7'	0,05	0,450	0,50	

*BSA: Albumina soro bovino, **Abs: absorvância.

Quadro 17 – Reagentes para dosagem de peptídeos pelo método de Bradford.

Fonte: do próprio autor (2022).

4. Agitar os tubos em vórtex por 30 segundos e aguardar 5 min a temperatura ambiente, no escuro;
5. Analisar as amostras no espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm;
6. Ajustar as concentrações: 1 mg/mL para amostra e 0,2 mg/mL para o BSA;
7. Elaborar um gráfico com os resultados obtidos.

6 . QUESTÕES

1. Qual a importância de se determinar a Concentração Micelar Crítica (CMC)?
2. Explique como os tensoativos são capazes de diminuir a tensão superficial e interfacial entre diferentes fases.
3. Quais são as principais vantagens e desvantagens dos biossurfactantes em relação aos surfactantes sintéticos?

7 . CURIOSIDADES

Os biossurfactantes já foram descritos em diversos estudos que apontam sua ampla capacidade em aplicações biotecnológicas. No contexto ambiental essas biomoléculas apresentam grande vantagem aos sintéticos, devido a sua biotecnologia sustentável. A poluição por óleo gera uma grande preocupação todos os anos afetando seriamente o ecossistema nos contextos econômico e sustentável (CHEBBI et al., 2018). A poluição das águas por óleos pode gerar também prejuízos à saúde humana. Sendo assim, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos eficazes e ecologicamente corretos de recuperação e biorremediação destes hidrocarbonetos (PHAM et al., 2019; SHARMA et

al., 2019). Os biossurfactantes devido à sua natureza anfipática possuem a capacidade de promover a emulsificação de óleos, facilitando assim sua disponibilidade para a recuperação dos ambientes. O uso de biossurfactantes na biorremediação de óleo em ambientes aquáticos é uma estratégia com crescente interesse industrial, o que faz dessas biomoléculas um produto de alto valor agregado (FEMINA et al., 2021).

REFERÊNCIAS

BODOUR, A.A.; MILLER-MAIER, R.M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal Microbiology Methods*, v. 32, n. 3, p. 273–280, 1998.

CAPPELLETTI M, PRESENTATO A, PIACENZA E, FIRRINCIELI A, TURNER RJ, ZANNONI D. Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104 n.20, p. 8567-8594, 2020.

CHEBBI, A.; HENTATI, D.; CHEFFI, M.; BOUABDALLAH, R.; CHOURA, C.; SAYADI, S.; CHAMKHA, M. Promising abilities of mercapto-degrading *Staphylococcus capitis* strain SH6 in both crude oil and waste motor oil as sole carbon and energy sources: its biosurfactant production and preliminary characterization. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 93, p. 1401–1412, 2018.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

FADHILE-ALMANSOORY, A. et al. Biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading bacteria (HDB) *Serratia marcescens*: Optimization using central composite design (CCD). *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 47, p. 272–280, 2017.

FARIQ, A.; YASMIN, A. Production, characterization and bioactivities of biosurfactants from newly isolated strictly halophilic bacteria. *Process Biochemistry*, v. 98, p. 1–10, 2020.

FEMINA, C. C.; KUMAR, P. S.; NGUEAGNI, P. T. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process. *Journal of Hazardous Material*, p. 407, 2021.

HOROWITZ, S.; GILBERT, J.N.; GRIFFIN, M. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 6, p. 243-248. 1990.

INVALLY, K.; SANCHETI, A.; JU, L. K. A new approach for downstream purification of rhamnolipid biosurfactants. *Food and Bioproducts Processing*, v. 114, p. 122–131, 2019.

JAHAN, R.; BODRATTI, A. M.; TSIANOU, M.; ALEXANDRIDIS, P. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 275, n. 102061, 2020.

KUMAR, C. F. C.; P. S.; NGUEAGNI, P. T. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: types, production, properties and its application in the bioremediation process. *Journal of Hazardous Materials*, v. 407, p. 124827, 2021.

LIMA, W.; PARREIRA, A. G.; NASCIMENTO, L. A.; LEONEL, C. A.; ANDRADE, J. T.; PALUMBO, J. M.; SOARES, A. C.; GRANJEIRO, P.; FERREIRA, J. M. Absence of antibacterial, anti-candida, and anti-dengue activities of a surfactin isolated from *Bacillus subtilis*. Journal of Pharmaceutical Negative Results, v. 9, n. 1, p. 27-32, 2018

LIU, K.; SUN, T.; CAO, M.; WANG, J.; LU, J. R.; XU, H. Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. Current Opinion in Colloid & Interface Science, v. 45, p. 57–67, 2020.

MARTINS, P. C.; BASTOS, C. G.; GRANJEIRO, P. A.; MARTINS, V. G. New lipopeptide produced by *Corynebacterium aquaticum* from a low-cost substrate. Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 41, n. 8, p. 1177-1183, 2018.

MATSUURA, A.B.J. Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação. Tese de Doutorado. Ciências de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo. 2004.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. Environmental Pollution, v. 133, p.183-198, 2004.

NAVON-VENEZIA, S.; ZOSIM, Z.; GOTTLIEB, A.; LEGMANN, R.; CARMELI, S.; RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 61, n. 9, p. 3240-3244, 1995.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. Química Nova, v. 25, n. 5, p. 772–776. 2002.

NOAH, K.S., FOX, S.L., BRUHN, D.F.; THOMPSON, D. N.; BALA, A. G. Development of continuous surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in an airlift reactor. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 98, p. 803–813, 2002.

PACHECO, G.J. Produção de biossurfactantes por *Rhodococcus erythropolis* e sua aplicação na remoção de óleo de sedimentos arenosos. Dissertação de Mestrado. Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008.

PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; DLUNGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata* growth and product characterization. Journal Biotechnology, v. 92, p. 287-294. 2002.

PHAM, T. V.; NGUYEN, T. T.; NGUYEN, D. T.; THUAN, T. V.; BUI, P.O.T.; VIET, V. N. D.; BACH, L. G. The preparation and characterization of expanded graphite via microwave irradiation and conventional heating for the purification of oil contaminated water. J. Nanosci. Nanotechnol., v. 19, p.1122–1125, 2019.

PIRES, M. E. E.; PARREIRA, A. G.; SILVA, T. N. L.; COLARES, H. C.; DA SILVA, J. A.; DE MAGALHÃES, J. T.; GALDINO, A. S.; GONÇALVES, D. B.; GRANJEIRO, J. M.; GRANJEIRO, P. A. Recent Patents on Impact of Lipopeptide on the Biofilm formation onto titanium and stainless-steel surfaces. Recent patents on biotechnology, v. 14, n. 1, p. 49-62, 2020.

SAJID, M.; AHMAD, K. M. S.; SINGH, C. S.; SAFAR A. A. Biosurfactants: Potential applications as immunomodulator drugs. Immunology Letters, v. 223. p. 71-77, 2020.

SHALIGRAM, N. S.; SINGHAL, R. S. Surfactin – A Review on Biosynthesis, Fermentation. Purification and Applications. v. 48, n. 2, p. 119–134, 2010.

SHARMA, S.; VERMA, R.; PANDEY, L. M. Crude oil degradation and biosurfactant production abilities of isolated *Agrobacterium fabrum* SLAJ731. Biocatal. Agric. Biotechnol., v. 21, p. 101322, 2019.

SONI, M. A simple laboratory experiment to measure the surface tension of a liquid in contact with air. v. 8, n. 2, p. 2197–2202, 2019.

TWIGG, M.; BACCILE, N.; BANAT, I.; DÉZIEL, E.; MARCHANT, R.; ROELANTS, S.; BOGAERT, I. Microbial biosurfactant research: time to improve the rigour in the reporting of synthesis, functional characterization and process development. Microbial Biotechnology. v.14, n. 1, p. 147–170, 2021.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MCINERNEY, M.J; Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. Journal Microbiology Methods, v.56, n.3, p. 339-47. 2004.

Paulo Afonso Granjeiro

Raquel Valinhas e Valinhas

Heloísa Carneiro Colares

Tuânia Natacha Lopes Silva

Luísa Ferreira da Cruz

Felipe Ferreira Silva

Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves

1. INTRODUÇÃO

Definição de carboidratos

Os carboidratos são um grupo diverso de substâncias com uma gama de propriedades químicas, físicas e fisiológicas. São principalmente substratos para o metabolismo energético, podem afetar a saciedade, a glicose e os níveis de insulina no sangue. Por meio da fermentação são capazes de influenciar a função colônica, o hábito intestinal, trânsito, células epiteliais, metabolismo e equilíbrio da flora comensal. Podem também ser imunomoduladores e influenciar a absorção de cálcio. Estas propriedades têm implicações para a nossa saúde geral. Contribuem particularmente para o controle do peso corporal, diabetes e

envelhecimento, doenças cardiovasculares, densidade mineral óssea, câncer de intestino grosso, constipação e resistência à infecção intestinal (CUMMINGS; STEPHEN, 2007).

Classificação

Os carboidratos podem ser classificados de acordo com o tamanho molecular, grau de polimerização (DP), o tipo de ligação e o carácter de monômeros individuais, de acordo com a classificação primária dos carboidratos na dieta, tal como proposto na Consulta de Peritos em Nutrição Humana da Organização Mundial da Alimentação e Agricultura (FAO)/Organização Mundial da Saúde (OMS), convocada em Roma em 1997 (FAO, 1998) (Quadro 18).

Classe	Subgrupo	Principais componentes
Açúcares (1-2)	Monossacarídeos	Glicose, frutose, galactose
	Dissacarídeos	Sacarose, maltose, lactose, trealose
	Polióis (açúcares álcoois)	Sorbitol, xilitol, manitol, lactitol
Oligossacarídeos (3-9)	Malto-oligossacarídeos	Maltodextrinas
	Não-alfa glicanos oligossacarídeos	Rafinose, inulina
Polissacarídeos (≥ 10)	Reserva	Amilose, amilopectina
	Não reserva	Celulose, hemicelulose, pectina, beta glicanos, mucilagens

Quadro 18 – Classificação dos carboidratos.

Fonte: Adaptado de FAO (1998).

Estrutura química

Estruturalmente, carboidratos ou hidratos de carbono são moléculas compostas principalmente por carbono, hidrogênio e oxigênio. A nível molecular, os carboidratos mais simples se tratam de hidrocarbonetos modificados através da adição de um grupo carbonila (aldeído ou cetona) e várias hidroxilas, onde as diferentes combinações destes grupos funcionais permitem a criação da estrutura básica dos carboidratos, os monossacarídeos. Existem milhares de carboidratos diferentes, porém todos eles são constituídos por uma ou mais unidades de monossacarídeos (KHOWALA *et al.*, 2008; HALL; MERTENS, 2017).

Monossacarídeos possuem sempre uma proporção de 1:2:1, um carbono para dois hidrogênios para um oxigênio, gerando uma fórmula molecular de $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Estas estruturas sempre possuem três ou mais carbonos e sua nomenclatura é dada pelo número de carbonos (triose, tetrose, pentose, hexose e assim por diante) e pelo grupo carbonila presente na cadeia carbônica (aldose ou cetose). Por exemplo, a fórmula molecular de dois monossacarídeos muito conhecidos, glicose e frutose, é $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, ambos monossacarídeos possuem a mesma fórmula molecular, mas os átomos que compõem as estruturas são arranjados de formas diferentes. A glicose é uma “aldohexose”, *aldo* por conter o grupo aldeído em sua estrutura e *hex* por ter seis carbonos, já a frutose é uma “cetohexose” *ceto* por conter o grupo cetona em sua estrutura e *hex* também por ter seis carbonos, como mostra a figura 18 (LEHNINGER *et al.*, 2000; NAVARRO *et al.* 2019).

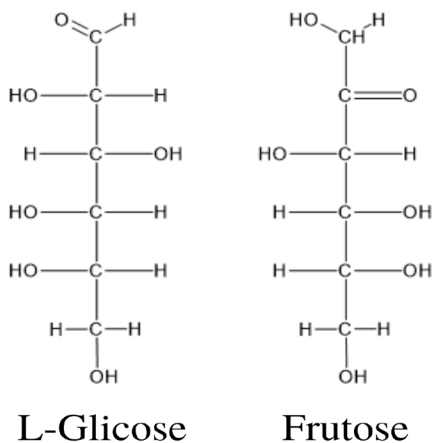


Figura 18 - Estrutura química das moléculas de glicose e frutose.

Fonte: do próprio autor (2022).

Além disso, monossacarídeos possuem outra classificação dependendo da posição das hidroxilas no carbono quiral mais distante do grupo carbonila (aldeído ou cetona), a

posição das hidroxilas neste carbono indica se o monossacarídeo é um monossacarídeo **D**, capaz de desviar a luz para a direita, ou **L**, capaz de desviar a luz para a esquerda. Esta classificação permite diferenciar enantiômeros de uma mesma molécula, conforme exemplos na figura 19 (LICHTENTHALER, 2003; NAVARRO *et al.*, 2019).

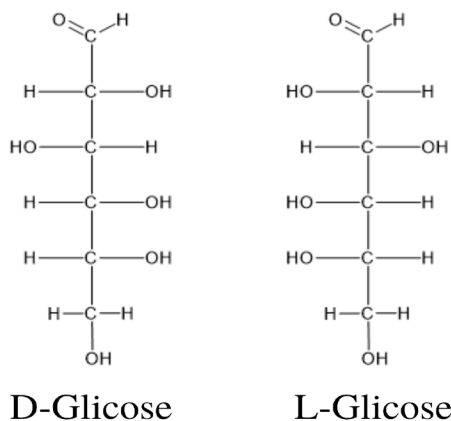
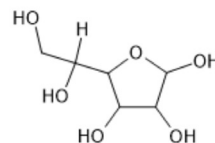
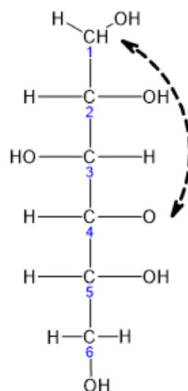
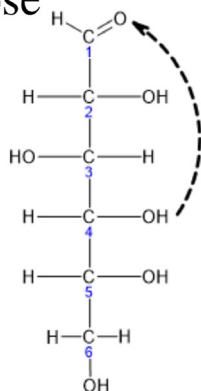


Figura 19 – Estrutura química da D-glicose e L-glicose.

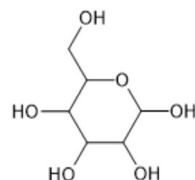
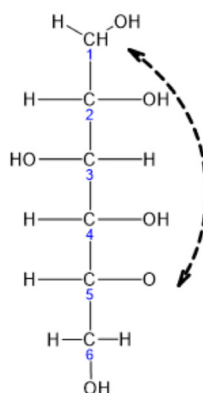
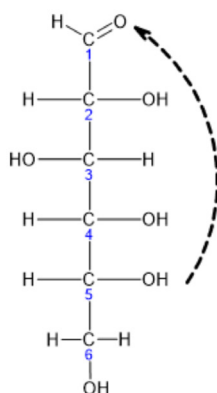
Fonte: do próprio autor (2022).

Carboidratos em solução não tendem a permanecer lineares como ilustrado na figura anterior. Por questões de estabilidade estes monossacarídeos tendem a formar anéis quando presentes em uma solução. A formação do anel ocorre através da ligação do carbono anomérico (carbono da carbonila ou carbono 1) com uma das hidroxilas da estrutura. Ainda utilizando a glicose por exemplo, essa ligação pode ocorrer entre o carbono 1 e o carbono 5, gerando um anel de 6 componentes (1 oxigênio e 5 carbonos) conhecido como pirano, ou também entre o carbono 1 e o carbono 4, gerando um anel de 5 componentes (1 oxigênio e 4 carbonos) conhecido como furano, como demonstrado na figura 15 (KHOWALA *et al.*, 2008; RODWELL *et al.*, 2015).

Glicose



Glicofuranose



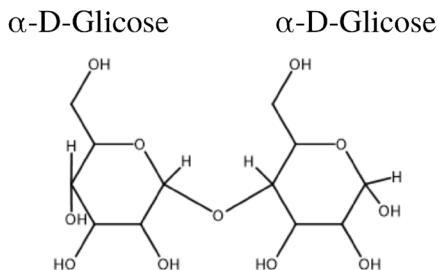
Glicopirranose

Figura 15 – Estrutura química da glicofuranose e Glicopirranose.

Fonte: do próprio autor (2022).

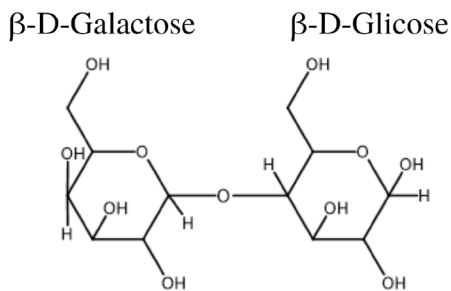
Para formar carboidratos mais complexos, há ligação de um monossacarídeo a outro, através da ligação glicosídica, uma reação de condensação que, através da remoção de água gera estruturas chamadas de dissacarídeos (união de dois apenas monossacarídeos), oligossacarídeos (união de dois a dez monossacarídeos) e polissacarídeos (união de mais de dez monossacarídeos). Alguns exemplos de oligossacarídeos mais comuns são a sacarose (glicose + frutose), a lactose (galactose + glicose) e a maltose (glicose + glicose). Como polissacarídeos é possível destacar macromoléculas de reserva energética ou de função estrutural como o amido e a celulose, ambos polímeros de glicose que se diferenciam a partir do tipo de ligação (α 1-4 no caso do amido e β 1-4 para a celulose). Na figura 21 está demonstrado um exemplo das ligações glicosídicas para formação de maltose (ligação do tipo α 1-4) e (lactose ligação do tipo β 1-4) (KHOWALA et al., 2008; NELSON; COX et al., 2014).

Maltose



Ligação α -glicosídica

Lactose



Ligação β -glicosídica

Figura 21 – Ligações glicosídicas em dissacarídeos.

Fonte: do próprio autor (2022).

Métodos de purificação

A purificação de carboidratos segue sendo um desafio. Entre as biomoléculas sua heterogeneidade estrutural, com diferenças baseadas nas orientações espaciais dos átomos e não em diferenças nos grupos funcionais, e suas propriedades dos materiais os tornam difíceis de alcançar a forma pura. Essas mudanças impossibilitam o desenvolvimento de métodos analíticos de alto rendimento para análise de carboidratos e consequentemente seu isolamento (NAGY, PENG, POHL, 2017).

Os métodos tradicionais utilizados para extração de carboidratos são fundamentados em membranas (ultrafiltração, nanofiltração, diafiltração etc.) ou técnicas cromatográficas (cromatografia de exclusão de tamanho, íon cromatografia de troca, etc.). Contudo, esses métodos não são seletivos para carboidratos e outros compostos podem ser extraídos. Além disso, são métodos demorados e os rendimentos e / ou pureza são baixos (MORENO *et al.*, 2014).

Atualmente novas técnicas de extração e purificação vêm surgindo com o intuito de aumentar o rendimento e / ou pureza e torná-las mais rápidas. Técnicas como as à base de

solvente aprimoradas e ecologicamente corretas, a chamada técnica verde. Essa consiste em utilizar solventes verdes, como líquidos iônicos e solventes eutéticos profundos. Além de, técnicas avançadas, como extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, extração com líquido pressurizado, extração com fluido supercrítico e extração assistida por enzima. Ademais a mistura de diferentes técnicas também vem sendo estudadas (MENA-GARCÍA *et al.*, 2019).

2 . OBJETIVOS

- a) Produzir e extrair o exopolissacarídeo através de técnicas especializadas a partir de microrganismos utilizando 2 meios de cultura diferentes.
- b) Produzir etanol a partir de microrganismos.

3 . MATERIAIS

- a. Erlenmeyer (250 mL)
- b. Beckers (50 mL e 100 mL)
- c. Tubos de Ensaio
- d. Alça de inoculação
- e. Centrífuga de tubo Falcon
- f. Espectrofotômetro
- g. Pipetas (1000 mL)
- h. Ponteiras (1000 mL)

4 . SOLUÇÕES

- a. Ácido sulfúrico concentrado
- b. Ácido tricloroacético (TCA) 80%
- c. Etanol absoluto gelado (4°C)
- d. Fenol 5%
- e. Leite em pó desnatado
- f. Goma acácia
- g. Sulfato de amônio
- h. Soro de leite
- i. Meio MRS

5 . PROCEDIMENTOS

Parte 1. Produção de polissacarídeos a partir de Bactérias Lácticas

1. Dividir em 2 grupos: 1 e 2;
2. Fazer estria das bactérias lácticas em tubos inclinados com MRS;
3. Incubar a 37°C por 24 horas;
4. Preparar 100 mL dos seguintes meios:
 - a) Grupo 1: Soro de leite suplementado com 4,5% de goma acácia e 0,4% de sulfato de amônio.
 - b) Grupo 2: Leite em pó desnatado (10% (p/v)) suplementado com 4,5% de goma acácia e 0,4% de sulfato de amônio.

Obs: preparar cada suplemento separadamente do meio de cultivo

5. Esterilizar os meios de cultivo e os suplementos em autoclave a 20 minutos, 121°C, 1 atm;
6. Adicionar ao meio estéril os suplementos estéreis (Na capela de fluxo);
7. Transferir uma alçada da bactéria para o meio de cultivo (100 mL);
8. Incubar a 37°C, 24h, 180 rpm;
9. Armazenar o material para a aula seguinte (capítulo 12).

Parte 2. Produção de polissacarídeos a partir de Leveduras

A. Inóculo do ensaio fermentativo para produção de etanol

1. Misturar em 100 mL de meio sintético fermentativo, o inóculo de 1% (m/v) de fermento biológico desidratado (levedura comercial – *Saccharomyces cerevisiae*);
2. Imediatamente após inóculo, encaixar o fermentômetro em cada frasco;
3. Pesar o sistema fermentativo em balança semianalítica.

B. Processo fermentativo

1. Pesar o sistema fermentativo a cada 30 minutos, conforme o Quadro 19.

O processo fermentativo será realizado em anaerobiose. A evolução (desprendimento) do CO₂ produzido durante a fermentação será acompanhada através do uso de um dispositivo denominado fermentômetro (PIMENTA *et al.*, 2016) acoplado ao frasco (reator) de fermentação. Esse dispositivo possibilita acompanhar o processo fermentativo por meio de sucessivas pesagens do conjunto, em intervalos de tempo regulares, sendo a perda de peso obtida, decorrente do desprendimento de CO₂.

Data	Hora	Peso (g)		Diferença	
		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
xx/xx/xxx	14:30	381,4	411,2	0,00	0,00
xx/xx/xxx	15:00	378,9	408,5	2,5	2,7
xx/xx/xxx	15:30	376,5	402,0	4,9	9,2
xx/xx/xxx	16:00	372,0	398,0	9,4	13,2

Quadro 19 - Exemplo de anotações de CO₂.

Fonte: do próprio autor (2022).

6. QUESTÕES

1. Por que a extração de carboidratos ainda é um desafio?
2. Qual a função do soro de leite e do leite em pó?
3. Qual é a função da suplementação dos meios e por que deve ser feita com os componentes citados (goma acácia e sulfato de amônio)?
4. Por que é necessário esterilizar todo o material e manter o ambiente estéril durante o cultivo?
5. Qual a importância de se controlar a temperatura de crescimento dos microrganismos?

7. CURIOSIDADES

A vacinação tem sido um dos mecanismos mais importante para o controle e prevenção de doenças infecciosas. Contudo, para algumas Doenças Tropicais Negligenciadas, não existem vacinas ou fármacos eficientes capazes de prevenir ou tratar essas doenças. Provocada pelo parasito protozoário tripanosomatídeo *Trypanosoma cruzi*, a doença de Chagas está entre os principais problemas de saúde na América Latina. Estudos vêm sendo desenvolvidos para criar vacinas contra essas doenças. Um estudo do ano de 2018 foi capaz de avaliar a eficácia de vacinas baseadas em carboidratos como α Gal e rhamnose, presentes na superfície de formas tripomastigotas do *T. cruzi*, acoplados ao bacteriófago modificado Q β “vírus like particle”, em animais deficientes em α 1,3-galactosyltransferase (α GalT-KO) que mimetizam o hospedeiro humano na produção de anticorpos anti- α Gal. Com resultados promissores o estudo é um importante passo para o tratamento mais eficiente da doença de Chagas (AZEVEDO, 2018).

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, M. A. Potencial de vacinas de carboidratos α Gal e raminose, acoplados a partículas virais-like (Q β - α Gal/Rham) na doença de Chagas. Universidade Federal de Minas Gerais. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, 2018.

CUMMINGS, J. H.; STEPHEN, A. M. Carbohydrate terminology and classification. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 61, n. 1, p. S5-S18, 2007.

FAO. 1998. Rome Declaration on World Food Security and World Food Summit Plan of Action. Disponível em: available at www.fao.org/docrep/003/w3613e/w3613e00.html. Acesso em: 19/08/2021.

GUO, R., CAO, N.; WU, Y. WU, J. Optimized extraction and molecular characterization of polysaccharides from *Sophora alopecuroides* L. seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 82, p.231–242, 2016.

HALL, M.B.; MERTENS, D.R. A 100-year review: Carbohydrates—Characterization, digestion, and utilization. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 12, p. 10078-10093. 2017.

IEA, 2020. International Energy Agency. Disponível em: <https://afdc.energy.gov/data/>. Acesso em: 21/09/2021.

KHOWALA, S.; VERMA, D.; BANIK, S. P. Carbohydrates. *Biomolecules (Introduction, Structure and Functions)*. Edition: 6th Publisher: National Science Digital Library, p.1-93, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Artmed. 6a ed. New York, 2014.

LICHTENTHALER, F. W. Carbohydrates. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2003.

MENA-GARCÍA, A.; Ruiz-Matute, A. I.; Soria, A. C.; Sanz, M. L. Green techniques for extraction of bioactive carbohydrates. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 119, n. 115612, 2019.

MORENO, F. J.; CARRERO-CARRALERO, O. C.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, O.; SANZ, M. L. Fractionation of food bioactive oligosaccharides. *Food Oligosaccharides*. v.15, p.255-283, 2014.

NAGY, G.; PENG, T.; POHL, N. L. B. Recent liquid chromatographic approaches and developments for the separation and purification of carbohydrates. *Analytical Methods*, v. 9, n. 24, p. 3579-3593. 2017.

NAVARRO, D. M. D. L.; ABELILLA, J. J.; STEIN, H. H. Structures and characteristics of carbohydrates in diets fed to pigs: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 10, n. 1, p. 1-17. 2019.

PIMENTA, J. L.; SANTOS, R. S.; MUNAYER, A. A. G.; PANTOJA, L. A.; SANTOS, A. S. Sacarificação e fermentação simultânea de tortas de algodão e girassol na produção de etanol de 2ª geração utilizando extrato holocelulolítico bruto produzido por *Aspergillus tubingensis* AN1257. In: 5º Congresso Internacional de Tecnologias para o meio ambiente, 2016.

RODWELL, V. W.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; WEIL, P. A.; BENDER, D. A. *Harper's illustrated biochemistry* (30th ed.). New York, N.Y.: McGraw-Hill Education LLC, 2015.

Paulo Afonso Granjeiro

Heloísa Carneiro Colares

Raquel Valinhas

Luísa Ferreira da Cruz

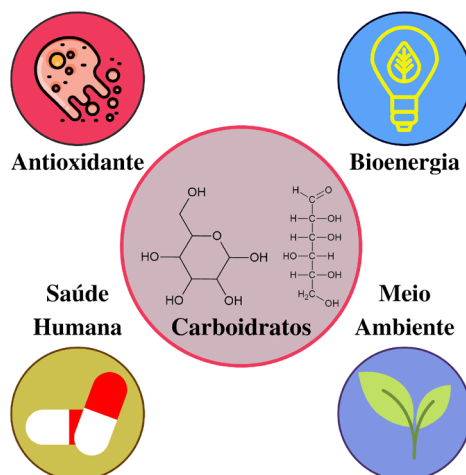
Felipe Ferreira Silva

Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, vários estudos relacionados aos polissacarídeos têm atraído a atenção de químicos e imunobiologistas devido às suas propriedades bioativas, incluindo anticâncer, anti-inflamatório antioxidativo, antitumor e antienvhecimento, conferindo resistência à fadiga física, além de outras propriedades medicinais. A partir de uma variedade de cogumelos, um grande número de polissacarídeos foi isolado, estruturalmente caracterizados e avaliados em termos de funções biológicas e efeitos (GIAVASIS, 2014). Além disso, uma grande quantidade de evidências tem implicado que quantidade excessiva de radicais livres de oxigênio, gerados como subprodutos no processo de metabolismo celular, são considerados importantes agentes causadores de câncer, envelhecimento,

doenças cardiovasculares e aterosclerose (FINKEL; HOLBROOK, 2000). Os carboidratos apresentam inúmeras aplicações, as principais estão demonstradas no esquema 3.



Esquema 3 – Principais aplicações dos carboidratos.

Fonte: do próprio autor (2022).

Atividade antioxidante

Antioxidantes têm sido amplamente utilizados como aditivos alimentares para proteger contra a degradação oxidativa por radicais livres, e ajudar a prevenir espécies reativas de oxigênio prejudiciais no corpo humano (YAN *et al.*, 2011). Assim, o desenvolvimento e utilização de mais antioxidantes eficazes naturais são desejados.

O estudo realizado por Zhang e colaboradores (2016) teve por objetivo contribuir para a efetiva exploração e utilização do composto residual de cogumelo (SMC) produzido pela espécie *Ganoderma lucidum* (SMC-G). Foi extraído um polissacarídeo solúvel em água (GPS) e depois purificadas duas frações (GPS-1 e GPS-2). As condições ótimas para a extração do GPS foram otimizadas pelo delineamento fatorial do composto central (CCD), e o rendimento de GPS atingiu 3,84% com uma proporção de água para material de 34,5, um tempo de precipitação de 19,82 h e pH de 7,88. A análise característica mostrou que o GPS-1 e o GPS-2 eram heteropolissacarídeos e possuíam estruturas glicosídicas (-OH, C-H, C-O e C-O-C). Tanto o GPS quanto as suas frações mostraram atividades antioxidantes potenciais através da remoção de radicais hidroxilo e 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), e aumentando o poder redutor *in vitro*; e melhorando as atividades de CAT e baixando os conteúdos LPO e MDA *in vivo*, respectivamente. Os resultados forneceram uma referência para a exploração do SMC-G que seria significativa para o desenvolvimento sustentável da indústria e da agricultura, a proteção do ambiente e a plena utilização dos recursos.

Bioenergia

O bioetanol tem atraído cada vez mais atenção como estratégia para redução de gases de efeito estufa (GEE) e para a segurança energética global. Atualmente, a produção comercial de etanol depende principalmente da fermentação de sacarose e glicose. O Brasil e os Estados Unidos juntos representaram cerca de 84% da produção mundial de etanol, usando cana-de-açúcar e milho como matéria-prima, respectivamente (EIA, 2020). A crescente produção deste combustível no Brasil e mundo é, entre outros fatores, devido à alta demanda de mercado. Só no Brasil, no ano de 2019, o consumo total de etanol foi de 32,8 bilhões de litros, apresentando um aumento de 11,1% em relação ao ano de 2018 (UDOP, 2020).

Nos últimos anos, muitos cientistas e organizações forneceram algum debate sobre a indústria de etanol à base de milho ou de cana-de-açúcar, com relação a preocupações de segurança alimentar (DALBIANCO *et al.*, 2020), degradação ambiental e outras questões (ZHAO *et al.*, 2020). Para superar essas limitações, muitos cientistas estão se concentrando no desenvolvimento de processos que utilizem matérias-primas novas ou mais baratas para substituir o milho ou a cana-de-açúcar pela produção de bioenergia no futuro (DILÁSCIO *et al.*, 2020). O substrato mais atraente é a biomassa lenhosa, a partir da qual o bioetanol ou outros produtos de valor agregado podem ser produzidos via bioconversão (BARBOSA *et al.*, 2020; TOOR *et al.*, 2020; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2018). Nas últimas décadas, algumas culturas energéticas, como a erva-gramínea (ALEXANDER *et al.*, 2020), aquáticas *Eichhornia crassipes* (TEIXEIRA *et al.*, 2019) e resíduos agrícolas ou florestais, atraíram cada vez mais atenção para a bioenergia (CARRILLO-NIEVES *et al.*, 2020). Embora a biomassa lignocelulósica seja uma fonte abundante e renovável para a produção de bioetanol, o processo em escala comercial ainda é limitado devido aos

gargalos existentes no pré-tratamento, hidrólise enzimática, microrganismos robustos, etc. Os desafios enfrentados pela sociedade devido à dependência dos recursos baseados no petróleo estão relacionados com a diminuição das reservas de combustíveis fósseis. Como alternativa à substituição de recursos fósseis limitados há, atualmente, um grande interesse em desenvolver estratégias para a utilização de matérias-primas renováveis. A biomassa vegetal é geralmente vista como uma das fontes sustentáveis, uma vez que é renovável, abundante e amplamente distribuída na natureza. A conversão efetiva da biomassa em biocombustíveis, produtos químicos e biomateriais tem recebido atenção crescente (KOGUT *et al.*, 2021; DILÁSCIO *et al.*, 2020; REZANIA *et al.*, 2020).

Saúde Humana

Fungos, microalgas e bactérias podem sintetizar uma grande variedade de Exopolissacarídeos (EPSs), que são polímeros de carboidratos de cadeia longa. Particularmente, bactérias lácticas os sintetizam extracelularmente a partir de sacarose por glucano-sacarases ou intracelularmente por glicosiltransferases de precursores de nucleotídeos de açúcar para formar unidades de repetição, que são então montadas e exportadas para o espaço extracelular e tipicamente presentes em produtos lácteos fermentados (AYYASH *et al.*, 2020). Digno de nota, o EPS-DB compreende apenas polissacarídeos extracelulares compostos de unidades repetitivas (incluindo aquelas com modificações pós-polimerização. Além das propriedades texturais em produtos lácteos fermentados, as EPSs podem conferir efeitos benéficos à saúde em humanos, incluindo efeito antitumoral, imunomodulação, propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias (HASHEMINYA; DEGHANNYA, 2020), redução dos níveis de colesterol e controle de pressão sanguínea. Além de recentemente ter sido aplicado para obtenção de matrizes tridimensionais para o cultivo de tecidos humanos (ALCIDES; OLIVEIRA; BAGAGLI, 2020). Foi estabelecido que as propriedades intrínsecas dos EPSs (por exemplo, composição, ramificação, carga, massa molar) são cruciais para a interação de proteínas (ORTEGA *et al.*, 2020; BIRCH *et al.*, 2017) e suas complexações com células bacterianas são de grande importância em (i) propriedades reológicas de produtos lácteos fermentados; (ii) interações pró e pré-bióticas; e (iii) formação de biofilme (KIELAK *et al.*, 2017). Essas associações intermacromoleculares são altamente específicas e impulsionadas por ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e iônicas (AYYASH *et al.*, 2020; ORTEGA *et al.*, 2020). Isso enfatiza a importância do conhecimento estrutural do EPS para a adequada descrição e compreensão das propriedades de tais complexos.

Meio ambiente

Os EPEs apresentam inúmeras aplicações ambientais, tais como formação e estabilização de biofilmes, principalmente devido às suas propriedades interessantes e tecnofuncionais (ORTEGA *et al.*, 2020). No estudo realizado por Kielak e colaboradores

(2017), os EPS acidobacterianos das cepas WH15 e 5B5 pertencentes a *Granulicella sp.* foram caracterizados como heteropolissacarídeos contendo manose, glicose, galactose e xilose como principais componentes monossacarídeos. Além disso, os EPSs apresentaram melhores propriedades bioemulsificantes em relação a xantana. A alta estabilidade das duas EPS em relação à exposição à temperatura e ao tempo demonstra claramente o seu potencial para aplicações em condições ambientais extremas.

2 . OBJETIVOS

- a) Quantificar o Exopolissacarídeo extraído a partir de microrganismos.
- b) Quantificar o etanol produzido pelos microrganismos
- c) Determinar a estequiometria do processo de produção de etanol conduzido

3 . MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- a. Erlenmeyer (250 mL)
- b. Beckers (25, 50 mL e 100 mL)
- c. Levedura comercial
- d. Fermentômetro
- e. Balão de fundo redondo (500 mL)
- f. Tubos de Ensaio
- g. Tubos Eppendorf e Falcon
- h. Tubo cônico de 50 mL
- i. Centrífuga para tubo Eppendorf e Falcon
- j. Espectrofotômetro
- k. Pipetas (1000mL)
- l. Ponteiras (1000mL)
- m. Balança semianalítica
- n. Manta aquecedora
- o. Termômetro
- p. Coluna de destilação fracionada
- q. Condensador
- r. Alcoômetro
- s. Banho-maria
- t. Vortex

4 . SOLUÇÕES

- a. Solução de glicose

5 . PROCEDIMENTOS

Parte 1. Determinação de açúcares (Exopolissacarídeo)

1. Centrifugar o mosto a 5000 g por 10 minutos;
2. Adicionar em um microtubo de 2 mL, 100 μ L de amostra centrifugada, em triplicata;
3. Adicionar ao tubo com as amostras, 200 μ L do reagente DNS;
4. Fazer a curva padrão do DNS, conforme Quadro 15.
5. Incubar em banho-maria a 100°C, por 5 minutos, as amostras e a curva padrão;
6. Adicionar 1,5 mL de água;
7. Homogeneizar em vórtex;
8. Fazer a leitura em espectrofotômetro a 540 nm;
9. Construir a curva de calibração a partir da leitura da curva padrão, lançando nas abscissas as concentrações de glicose e os valores de absorbância nas ordenadas.
10. Utilizar a equação da reta ($Abs = a \times [glicose]$) para calcular a quantidade de Açúcares Redutores (exopolissacarídeo).

Amostra	[Glicose] g/L	Glicose 0,5 g/L (μ L)	Água (μ L)
1	0,0	0	100
2	0,1	20	80
3	0,2	40	60
4	0,3	60	40
5	0,4	80	20
6	0,5	100	0

Quadro 20 - Quantidades de água e D-glicose para curva de calibração do DNS.

Fonte: do próprio autor, 2022.

Parte 2. Produção de etanol

A. Destilação

1. Montar o sistema de destilação composto por: manta aquecedora, balão de fundo redondo de 500 mL, termômetro, coluna de destilação fracionada, condensador e frasco receptor.
2. Transferir o mosto fermentado, com volume previamente determinado, para o balão.
3. Manter a temperatura da manta ajustada em 90°C para possibilitar a destilação da mistura azeotrópica (etanol-água).
4. Medir, após a destilação, o volume recuperado de solução alcoólica.
5. Determinar o teor alcóolico.
6. Calcular o rendimento do processo de destilação (Quadro 15).
7. Determinar o rendimento alcoólico do processo global (Quadro 15).

B. Determinação do etanol produzido

1. Utilizar os valores obtidos de CO_2 para estimar o etanol produzido através do cálculo baseado na estequiometria do processo fermentativo, onde para cada mol de glicose consumido são produzidos dois mols de etanol e dois mols de CO_2 (Quadro 16).
2. Quantificar novamente, ao final do processo fermentativo, a concentração de açúcares
3. Determinar o teor alcóolico através da leitura do alcoômetro.

$\text{CO}_{2\text{Desprendido}}$	$381,4 - 378,9 = 2,5$
$\text{CO}_2 \text{ (g/L)}$	$(1000 \times \text{CO}_{2\text{desprendido}}) \div \text{Vol. Total mosto } (1000 \times 2,5) \div 200 = 12,5 \text{ g/L}$
Etanol teórico (g/L)	$(\text{CO}_2 \text{ g/L} \times 0,511) \div 0,489 \text{ } (12,5 \times 0,511) \div 0,489 = 13,06 \text{ g/L}$
Etanol % (v/v)	$13,06 \div 10 = 1,31 \text{ } 1,31 \div 0,789 = 1,66$

Quadro 21 - Cálculo de etanol equivalente.

Fonte: do próprio autor (2022).

6 . QUESTÕES

1. Qual a importância de o processo ser realizado na ausência de oxigênio?
2. Por que é importante pesar todo o sistema fermentativo em intervalo de tempo?

3. Qual a relação da quantidade de glicose consumida com o rendimento da reação?
4. Qual a função do reagente DNS?
5. Qual aplicação prática da produção de carboidratos por leveduras?

7. CURIOSIDADES

Que as guloseimas, balas, pudim, milkshake, sorvete, geleias, são deliciosas ninguém pode negar e apresentam textura macia, cremosa e leve. A indústria de alimentos possui um grande arsenal de aditivos que são usados para melhorar a sensação na boca, textura, sabor e a vida útil dos produtos, muitos desses aditivos são de origem bacteriana, sendo os mais utilizados os exopolissacarídeos. Os exopolissacarídeos são semelhantes às geleias. A indústria os chama de geleias bacterianas. São eles que dão a textura nessas guloseimas, incrível não é mesmo!

REFERÊNCIAS

ALCIDES, M.; OLIVEIRA, L. A.; BAGAGLI, M. P. Estudo da produção exopolissacarídeo solúvel de Kefir de água. *Revista Brasileira de Iniciação Científica*, v. 7, n. 4, p. 87-106, 2020.

ALEXANDER, L.; HATCHER, C.; MAZAREI, M.; HAYNES, E. Development and field assessment of transgenic hybrid switchgrass for improved biofuel traits. *Euphytica*, v. 216, n. 25, 2020.

AYYASH, M.; JDAYIL, B. A.; ITSARANUWAT, P.; GALIWANGO, E.; ROSA, C. T.; ABDULLAH, H.; ESPOSITO, G.; HUNASHAL, Y.; OBAID, R. S.; HAMED, F. Characterization, bioactivities, and rheological properties of exopolysaccharide produced by novel probiotic *Lactobacillus plantarum* C70 isolated from camel milk. *International Journal of Biological Macromolecules*, n. 144, p. 938-946, 2020.

BARBOSA, S. L.; FREITAS, M. S.; SANTOS, W. T. P.; NELSON, D. L.; MARQUES, M. B. F.; KLEIN, S. I.; CLOSOSKI, G. C.; CAIRES, F. J.; NASSAR, E. J.; ZANATTA, L. D.; AGBLEVOR, S. A.; AFONSO, C. A. M.; BARONI, A. C. M. Preparation of activated charcoal from *Acrocomia aculeata* for purification of pretreated crude glycerol. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2020.

BIRCH, J.; CALSTEREN, M. V.; PÉREZ, S.; SVENSSON, B. The exopolysaccharide properties and structures database: EPS-DB. Application to bacterial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, n. 205, p. 565–570, 2019.

CARRILLO-NIEVES, D.; SILDARRIAGA-HERNANDEZ, S.; GUTIÉRREZ-SOTO, G.; ROSTRO-ALANIS, M.; HERNÁNDEZ-LUNA, C.; ALVAREZ, A. J.; IQBAL, H. M. N.; PARRA-SALDÍVAR, R. Biotransformation of agro-industrial waste to produce lignocellulolytic enzymes and bioethanol with a zero waste. *Biomass conversion and Biorefinery*, 2020.

CHATTOPADHYAY, P.; BANERJEE, G.; SEN, S. K. Cleaner production of vanillin through biotransformation of ferulic acid esters from agroresidue by *Streptomyces sannanensis*. *Journal of Cleaner Production*, n. 182, p. 272-279, 2018.

- DALBIANCO, A. B.; SEABRA JÚNIOR, S.; SANTI, A.; TRENTA, D. A.; DIPPLE, F. L.; VENDRUSCULO, M. C.; VENDRUSCULO, M. V. A crise dos alimentos e o preço dos produtos agrícolas. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 11, 2020.
- DILÁSCIO, M. B.; BARBOSA, C. M.; JARDIM, A. T. P. S.; DILÁSCIO, B. B.; SIQUEIRA, P. H. L.; DINIZ, D. M. Monitoramento tecnológico das patentes de etanol de segunda geração. *Revista GEINTEC*, v. 10, n. 3, p. 5553-5566, 2020.
- FINKEL T.; HOLBROOK N. J. Oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, v. 408, n. 6809, 239–247, 2000.
- GIAVASIS, I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 26, 162–173, 2014.
- HASHEMINYA, S. M.; DEHGHANNYA, J. Novel ultrasound-assisted extraction of kefirian biomaterial, a prebiotic exopolysaccharide, and investigation of its physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties. *Materials Chemistry and Physics*, v. 243, n. E0934A, 2020.
- IEA, 2020. International Energy Agency. Disponível em: <https://afdc.energy.gov/data/>. Acesso em: 24/09/2021.
- KIELAK, A. M.; CASTELLANE, T. C. L.; CAMPANHARO, J. C.; COLNAGO, L. A.; COSTA, O. Y. A.; SILVA, M.L.C.; VAN, VEEN, J. A.; LEMOS, E. G. M.; KURAMAE, E. E. Characterization of novel *Acidobacteria* exopolysaccharides with potential industrial and ecological applications. *Scientific Reports*, v. 7, n. 41193, p. 01-11, 2017.
- KOGUT, M. S.; KOGUT, T.; MARKIEWICZ, R.; SŁOWIK, A. Use of machine learning methods for predicting amount of bioethanol obtained from lignocellulosic biomass with the use of Ionic liquids for pretreatment. *Technologies for Biofuels and Energy*, v. 14, n. 1, p. 243, 2021.
- ORTEGA, M. A. L.; HERNÁNDEZ, A. I. R.; RUÍZ, R. S. C.; CÓRDOVA, J.; CUELLAR, M. R. L.; HERNÁNDEZ, N. C.; GARCÍA, Y. G. Physicochemical characterization and emulsifying properties of a novel exopolysaccharide produced by haloarchaeon *Haloferax mucosum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 142, p. 152-162, 2020.
- REZANIA, S.; ORYANI, B.; CHO, J.; TALAIEKHOZANI, A.; SABBAGH, F.; HASEMI, B.; RUPANI, P.F.; MOHAMMADI, A.A. Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. *Energy*, v. 199, n. 117457, 2020.
- TEIXEIRA, D. A.; SANTOS, A. S.; PANTOJA, L. A.; BRITO, P. L.; COSTA, A. S. V. Produção de etanol de segunda geração a partir de Aguapé: Uma revisão. *Revista Virtual de Química*, v. 11, n. 1, 2019.
- TOOR, M.; KUMAR, S. S.; MALYAN, S. K.; BISHNOI, N. R.; MATHIMANI, T.; RAJENDRAM, K.; PUGAZHENDHI, A. An overview on bioethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Chemosphere*, v. 242, n. 125080, 2020.
- UDOP, 2020. Etanol registra recorde histórico de consumo no Brasil. Disponível em: www.udop.com.br. Acesso em: 24/09/2021.
- Yan, Y. L.; Yu, C. H.; Chen, J.; Li, X. X.; Wang, W.; Li, S. Q. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, p. 217–224, 2011.

ZHANG, J.; MENG, G.; ZHAI, G.; YANG, Y.; ZHAO, H.; JIA, L. Extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides of spent mushroom compost of *Ganoderma lucidum*. International Journal of Biological Macromolecules, v. 82, p. 432–439, 2016.

ZHAO, Y.; DAMGAARD, A.; LIU, S.; CHANG, H.; CHRISTENSEN, T. H. Bioethanol from corn stover – Integrated environmental impacts of alternative biotechnologies. Resources, Conservation and Recycling, v. 155, n. 1, p.104652, 2020.

CAPÍTULO 15

EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Daniel Bonoto Gonçalves

Felipe Ferreira Silva

Priscila Amaral Diniz

Heloísa Carneiro Colares

Klédna Constância Portes Reis

Wanderson Duarte Penido

Anderson Fernandes de Melo

1. INTRODUÇÃO

Para serem considerados vivos, os organismos precisam ser capazes de realizar algumas funções básicas e possuir algumas características específicas, como: sensibilidade ou resposta ao meio ambiente, capacidade de reprodução e adaptação, crescimento e desenvolvimento, homeostase, obtenção e processamento de energia e principalmente ser capaz de evoluir. Para realizar tais funções diferentes grupos de macromoléculas são necessárias. Além de proteínas, carboidratos e lipídeos outro grupo importante de macromoléculas é essencial por guardar toda a informação contida em uma célula e ser responsável por codificar todos os processos celulares, estes grupos de macromoléculas são

denominados “ácidos nucleicos” (MINCHIN; LODGE, 2019).

Ácidos nucleicos são macromoléculas formadas por um conjunto de nucleotídeos e estes nucleotídeos são formados por três componentes: um açúcar de 5 carbonos (pentose), um grupo fosfato e uma base nitrogenada (adenina, citosina, timina, guanina e uracila) (Figura 22). Existem dois tipos de ácidos nucleicos: o ácido desoxirribonucleico, conhecido como DNA, e o ácido ribonucleico, ou RNA (Figura 23). A diferença estrutural entre os componentes dos dois ácidos nucleicos é a pentose, no qual no RNA a pentose é uma ribose, no DNA a pentose é uma desoxirribose (MULLEGAMA *et al.*, 2019).

Em meados de 1953, através dos resultados da pesquisadora Rosalind Franklin, os pesquisadores James Watson e Francis Crick determinaram a estrutura química do DNA. Eles observaram que o DNA é composto por uma fita dupla unida através de ligações de hidrogênio estabelecidas entre as bases nitrogenadas justapostas. Este processo ficou conhecido como pareamento de bases. Esse tipo de ligação é extremamente específico, ou seja, uma base nitrogenada sempre parecia apenas a outra base específica, sempre sendo uma purina (adenina e guanina) pareada com uma pirimidina (citosina, timina e uracila). A Adenina parecia com a Timina (ou Uracila no

caso do RNA) e a Guanina pareia com a Citosina. Através deste tipo de ligação também é possível concluir que a segunda fita do DNA é sempre complementar à primeira fita. (FRANKLIN; GOSLING, 1995).

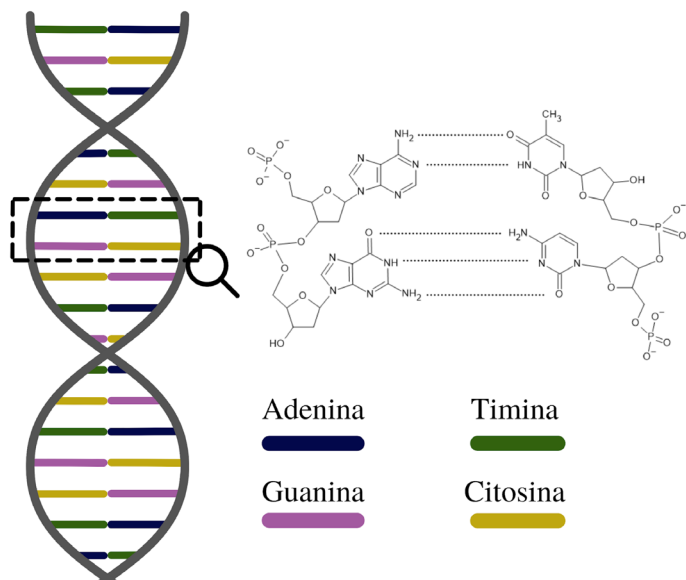


Figura 22 – Estrutura química do DNA.

Fonte: do próprio autor (2022).

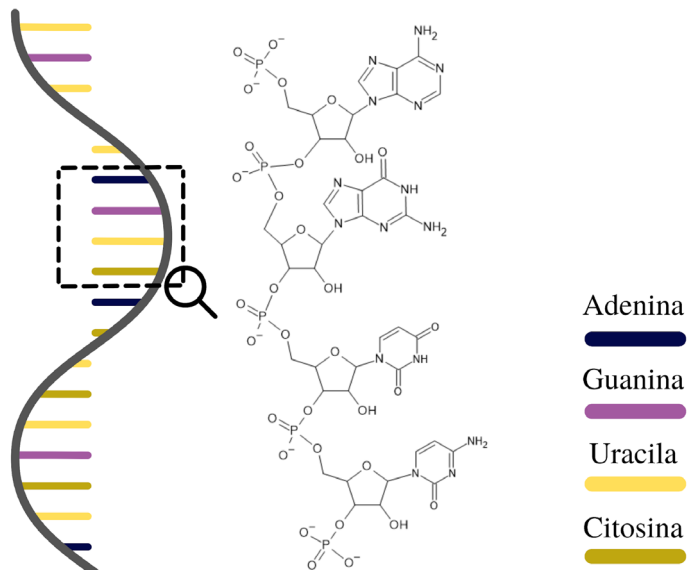


Figura 23 – Estrutura química do RNA.

Fonte: do próprio autor (2022).

O DNA é uma molécula extremamente importante para os seres vivos. Ele armazena e transmite as informações genéticas e funciona como molde para a síntese da molécula de RNA (transcrição), que posteriormente será utilizada como molde para a síntese de proteínas (tradução) (MONTEIRO, 2017; PAUL et al., 2020). Biotecnologicamente, o DNA possui aplicações em diversas áreas como: indústria farmacêutica, na produção de bioprodutos através da expressão heteróloga como a insulina, o hormônio do crescimento (GH) e diversas outras proteínas. Na medicina através da produção de vacinas, diagnóstico de doenças e principalmente na terapia gênica, onde o DNA de determinadas células é modificado para produção de determinadas proteínas que antes estavam ausentes em pacientes. Na agricultura através de modificações genéticas de plantas e de patógenos que infectam plantas. Enfim, com os avanços tecnológicos alcançados nos últimos anos, o manuseamento do DNA tem sido cada vez mais de extrema importância para o melhoramento das condições de vida de todos os organismos vivos (RAJAKARUNA; TAYLOR-ROBINSON, 2016).

Diferentemente do DNA, que é responsável pelo armazenamento de informação genética e em arranjo de dupla hélice, o RNA consiste em uma estrutura de fita simples, com uma ampla gama de funções diversas. RNAs mensageiros (mRNAs) e transportadores (tRNAs) estão envolvidos na transcrição e/ou tradução da informação genética, culminando na síntese de proteínas. No entanto, existem ainda RNAs de função catalítica (ribozimas), como por exemplo o rRNA 23S de ribossomos procariotos, com papel estrutural, os rRNA que juntamente com proteínas constituem os ribossomos, com função de regulação de expressão gênica, como é o caso dos miRNAs. RNAs que atuam para promover variabilidade na geração de isoformas proteicas através de processamento alternativo de mRNA (snRNAs de spliceossomos), dentre outras funções. A importância do RNA é tão grande que se acredita que a vida baseada nesta molécula tenha precedido a vida codificada por DNA (ROBERTSON; JOYCE, 2012).

Para fins de pesquisa e aplicações biotecnológicas pode-se utilizar RNA em técnicas como Northern Blot, interferência por RNA, RNA Seq e microarranjo, para o estudo da expressão gênica, e ainda para síntese de cDNA e futura clonagem e expressão, principalmente de produtos de genes de eucariotos, resolvendo-se o problema de sequências demasiadamente longas pela presença de íntrons (WATSON *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

Extrair os ácidos nucleicos (DNA/RNA) presentes na banana e em fermento biológico.

3 . MATERIAIS

A. Extração de ácidos nucleicos de banana

- a. 1 banana
- b. saco plástico ou cadinho para macerar a banana
- c. 3 Béqueres (200 mL)
- d. 100 mL de água destilada
- e. 25 mL de detergente
- f. 1 colher de sopa de NaCl (sal de cozinha)
- g. Filtro de papel (normalmente usado para coar café) ou gaze
- h. 1 tubo de ensaio
- i. 15 mL de etanol ou isopropanol gelado (4°C)
- j. Bastão de vidro
- k. Microtubos

B. EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE FERMENTO BIOLÓGICO

- a. Fermento biológico de pão seco
- b. Água ultra pura
- c. Solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1)
- d. NaCl 5 M
- e. Isopropanol gelado
- f. Álcool etílico 70% v/v gelado
- g. Microtubos

4 . SOLUÇÕES

- a. Solução de NaCl 5 M

292,5 g de cloreto de sódio (NaCl)

H₂O q.s.p. 1000 mL

- b. Solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1)

Para um volume final de 50mL de solução misture 2 mL de álcool isoamílico a 48 mL de clorofórmio. **Observação:** estes reagentes devem ser manuseados em capela.

5 . PROCEDIMENTOS

A. Extração de ácidos nucleicos de banana

O protocolo de extração de ácidos nucleicos de banana foi modificado a partir de SAYRES (2016) e a partir do protocolo recomendado pela revista Nova Science Now (disponível em pbs.org).

1. Descascar a banana e colocar em saco plástico ou cadinho para maceração;
2. Macerar a banana até que o conteúdo fique pastoso (caso necessário adicionar uma pequena quantidade de água);
3. Preparar em um béquer de 200 mL uma solução com 100 mL de água destilada, 25 mL de detergente e uma colher de sopa de NaCl. Misturar bem até que o detergente e o NaCl estejam diluídos na solução. Esta etapa deve ser feita com bastante cuidado para que não sejam geradas bolhas;
4. Após homogeneizar a solução, adicionar a este béquer, cuidadosamente, o macerado de banana;
5. Misturar, com a ajuda do bastão de vidro, durante 15 minutos para homogeneizar a amostra. Esta etapa deve ser feita com bastante cuidado para que não sejam geradas bolhas;
6. Em outro béquer, posicionar o filtro de papel/gaze e começar a filtrar a amostra. Para isso, é importante verter vagarosamente a amostra e deixar filtrando durante 10 minutos;
7. Após o tempo de filtragem, remova o filtro/gaze e misture cuidadosamente o conteúdo filtrado;
8. Transferir uma porção da amostra filtrada para um tubo de ensaio (aproximadamente 2 a 3 dedos no fundo do tubo de ensaio);
9. Inclinar o tubo de ensaio, e com a ajuda de uma pipeta, adicionar cuidadosamente pela parede do tubo o etanol ou isopropanol gelado (aproximadamente $\frac{1}{4}$ da quantidade da amostra). Será possível observar a formação de duas fases (amostra e álcool) e entre estas duas fases será possível observar a formação de pequenos “fiapos” de cor branca, estes fiapos são moléculas de ácidos nucleicos. **Observação:** É necessário que o álcool esteja gelado e seja adicionado cuidadosamente na parede do tubo.
10. Deixar a amostra parada durante 4 minutos;
11. Com a ajuda de um bastão de vidro ou madeira remover cuidadosamente os ácidos nucleicos da solução. **Dica:** rotacione o bastão para “pescar” o conteúdo;
12. Após remover os ácidos nucleicos deixar secar por alguns minutos ao ar livre para a evaporação do etanol e suspender a solução em 500 μ L de água ultrapura em um microtubo. Caso tenha grandes quantidades de ácidos nucleicos, dividir o

conteúdo em dois tubos.

13. A amostra reidratada poderá ser analisada através de eletroforese em gel de agarose ou espectrofotometria.

B. Extração de ácidos nucleicos de fermento biológico

O protocolo de extração de ácidos nucleicos de fermento biológico foi modificado a partir de BERBERT *et al.* (2018).

1. Pesar 200 mg de fermento biológico em microtubo de 1,5 mL, adicionar 500 μ L de água ultrapura ou deionizada e homogeneizar o conteúdo em vórtex;
2. Adicionar 500 μ L da solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), 200 μ L de NaCl 5 M e homogeneizar novamente o conteúdo em vórtex;
3. Centrifugar o conteúdo a 10.000 g por 10 minutos;
4. Após a centrifugação será possível observar que o conteúdo no tubo está disposto em quatro fases distintas: fração polar (ácidos nucleicos), interfase fina (proteínas), fração apolar (lipídeos) e *pellet* (resíduos celulares maiores). Retirar, com auxílio de uma pipeta automática, apenas o sobrenadante, ou seja, a primeira fase em que se encontra o DNA e adicionar o conteúdo em outro microtubo de 1,5 mL.

Observação: é necessário que esta etapa seja feita com bastante cuidado e é muito importante que a ponta da pipeta não encoste na interfase, onde se encontram as proteínas;

5. Separar o microtubo com a primeira fase (onde se encontram os ácidos nucleicos) e repetir a etapa de extração com o microtubo que contém o *pellet* para aumentar o rendimento da extração. Adicionar 500 μ L da solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e 200 μ L de NaCl 5 M ao microtubo com o *pellet* (precipitado) e homogeneizar no vórtex novamente. Centrifugar a 10.000 g por 10 minutos e coletar novamente apenas a primeira fase, colocando no mesmo microtubo separado no passo anterior, onde se encontra o DNA;
6. Descartar o tubo com o *pellet*, que contém apenas restos celulares e proteínas;
7. No microtubo com os ácidos nucleicos, adicionar 500 μ L de isopropanol gelado, homogeneizar CUIDADOSAMENTE com auxílio de uma pipeta automática e incubar a -20 °C por pelo menos 60 minutos;
8. Após os 60 minutos de incubação, centrifugar o material a 10.000 g por 15 minutos;
9. Descartar, com bastante cuidado, o sobrenadante. O descarte pode ser feito através da inversão do tubo;
10. Adicionar 500 μ L de álcool 70% (v/v) gelado, homogeneizar com auxílio de uma pipeta e centrifugar novamente por 10 minutos;
11. Descartar, com bastante cuidado, o sobrenadante e deixar o tubo aberto para que ocorra toda a evaporação do álcool;
12. Ressuspende o conteúdo em 50 μ L de água ultrapura;

13. A amostra de DNA reidratada poderá ser analisada através de eletroforese em gel de agarose ou espectrofotometria.

6 . QUESTÕES

1. Qual o principal objetivo da maceração para o procedimento?
2. Qual o papel do detergente no experimento?
3. Por que o sal de cozinha é utilizado na extração de ácidos nucleicos?
4. Qual a importância do álcool para a extração de ácidos nucleicos?
5. Cite 3 exemplos de aplicação do DNA que acabou de ser extraído.

7 . CURIOSIDADES

Todos nós sabemos da importância das vacinas na prevenção de doenças. Existem diversos tipos de vacinas, uma das classes mais modernas são as constituídas de DNA. Vacinas de DNA (ou vacinas gênicas) são baseadas na informação genética do patógeno, chamado de alvo. Estas vacinas são compostas por um pequeno fragmento de DNA, responsável por codificar uma ou mais proteínas do organismo patogênico, capazes de gerar resposta imune utilizando a maquinaria do próprio hospedeiro. Tais proteínas recebem o nome de antígenos, que são incapazes de causar o quadro clínico no paciente, mas suficientemente capazes de gerar resposta imune dos mesmos. Os antígenos irão estimular a produção de anticorpos, células citotóxicas e células de memória no hospedeiro. Assim, quando o indivíduo entrar em contato com esse patógeno será capaz de apresentar uma resposta imune e não desenvolverá a doença. Existem diversas pesquisas de vacinas de DNA contra a COVID-19. Além disso, como as vacinas de DNA ativam a resposta imunológica celular e são muito específicas, elas também apresentam grande potencial de aplicação em diversas áreas, como nas terapias contra vários tipos de câncer, por exemplo (LEE *et al*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2021).

REFERÊNCIAS

BERBERT, L.C.; SUCCAR, J. B.; FLORES, V. R.; DIREITO, I. C. N. Protocolo para extração de DNA para utilização em aulas práticas no ensino superior. *Acta Scientiae et Technicae*, v.6, n. 1, 2018.

FRANKLIN, R. E.; GOSLING, R. G. Molecular structure of nucleic acids. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 758, p.16-17, 1995.

LEE, J.; KUMAR, S. A.; JHAN, Y. Y.; BISHOP, C. J. "Engineering DNA vaccines against infectious diseases." *Acta biomaterialia*, v. 80, p.31-47, 2018.

MINCHIN, S.; LODGE, J. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. Essays in Biochemistry, v. 63, n.4, p. 433–456, 2019.

MONTEIRO, S. G. As Aplicações Biotecnológicas. Revista de Investigação Biomédica, v. 9, n. 1, 2017.

MULLEGAMA, S. V.; ALBERTI, M. O.; AU, C.; LI, Y.; TOY, T.; TOMASIAN, V.; XIAN, R.R. Nucleic Acid Extraction from Human Biological Samples. Methods in Molecular Biology, v. 1897, p.359-383, 2019.

NOVA SCIENCE NOW. Extracting DNA from Bananas” activity, 2007. Disponível em: <https://www.pbs.org/wgbh/nova/education/activities/pdf/3214_01_nsn_01.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2021.

PAUL, R.; OSTERMANN, E.; WEI, Q. Advances in point-of-care nucleic acid extraction technologies for rapid diagnosis of human and plant diseases. Biosensors and Bioelectronics, v. 169, p.112592, 2020.

RAJAKARUNA, S. S.; TAYLOR-ROBINSON, A. W. Application of recombinant DNA technology (genetically modified organisms) to the advancement of agriculture, medicine, bioremediation and biotechnology industries. Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering, v. 1, n. 3, p. 78-80, 2016.

ROBERTSON, M. P.; JOYCE, G. F. The origins of the RNA world. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 4, n.5, 2012.

SAYRES, M. W. Seeing DNA. ASU - Ask A Biologist, 2016. Disponível em: <<https://askabiologist.asu.edu/activities/banana-dna>>. Acesso em: 14 jan. 2021.

SILVEIRA, M. M.; MOREIRA, G.; MENDONÇA, M. DNA vaccines against COVID-19: Perspectives and challenges. Life sciences, v. 267, p. 118919, 2021.

WATSON, J. D.; MYERS, R. M.; CAUDY, A. A.; WITKOWSKI, J. A. DNA Recombinante –Genes e Genomas, 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed. 2009.

Daniel Bonoto Gonçalves

Felipe Ferreira Silva

Priscila Amaral Diniz

Heloísa Carneiro Colares

Klédna Constância Portes Reis

Wanderson Duarte Penido

Anderson Fernandes de Melo

1. INTRODUÇÃO

As células vivas são capazes de preservar e de transferir a informação genética para as novas gerações por meio da complementaridade estrutural das moléculas de ácidos nucleicos: o DNA e o RNA. O DNA apresenta-se arranjado em dupla hélice, com as fitas das sequências complementares ligadas entre si por pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas. O RNA consiste em uma estrutura de fita simples. Com base nas características estruturais dos ácidos nucleicos, algumas técnicas moleculares são utilizadas na manipulação do DNA dos organismos, como a hibridização, a clivagem, amplificação (utilizando a técnica de PCR) e a eletroforese (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Os princípios da técnica de eletroforese foram demonstrados no capítulo 8. No caso de eletroforese de DNA para algumas particularidades é necessário atenção. Os meios suportes podem ser: papel filtro, membrana de celulose, gel de poliacrilamida, gel de agarose (REGITANO *et al.*, 2009). O gel de poliacrilamida, é usado como matriz para pequenas moléculas de DNA (até poucas centenas de nucleotídeos) e o gel de agarose é geralmente usado para fragmentos maiores de DNA (NELSON; COX, 2014). A porosidade nos géis determina o poder de separação (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Para observar ácidos nucleicos em gel de agarose deve-se corá-los e submetê-los à luz ultravioleta. O corante mais comum é o brometo de etídeo, que se intercala entre as bases do DNA (REGITANO *et al.*, 2009). A figura 24 demonstra a estrutura química do brometo de etídeo e o local de interação com o ácido nucleico.

A espectrofotometria é um procedimento analítico utilizado para determinar as concentrações de amostras químicas mediante a absorção de luz. Quando uma solução é iluminada por luz branca, apresenta uma cor que é resultante da absorção relativa dos vários comprimentos de onda que a compõem. Esta absorção, em cada comprimento de onda, depende da natureza da substância, de sua concentração e da espessura da mesma que é

atravessada pela luz (PORTELA *et al.*, 2016).

Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda de 260 nm e as proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm. A relação A260/280 fornece um parâmetro de avaliação de qualidade das preparações de ácidos nucleicos, sendo valores inferiores a 1,8 resultantes de contaminação com proteína. A concentração de ácidos ribonucleicos nas amostras também deve ser avaliada por espectrofotometria, sendo o grau de pureza estimado pela razão entre as absorbâncias medidas a 260 nm e a 280 nm. Para uma amostra de RNA pura tem-se que: $OD_{260}/OD_{280} = 1,8$ a 2,0, sendo que uma densidade óptica igual à 1,0 corresponde a 40 μg de RNA por mL (REGITANO *et al.*, 2009).

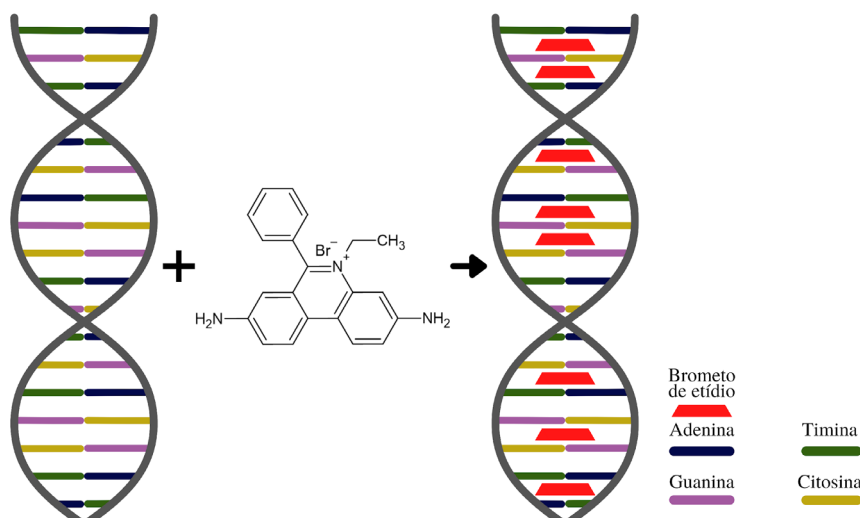


Figura 24 – Identificação de ácido nucleico por brometo de etídio.

Fonte: do próprio autor (2022).

2 . OBJETIVOS

Quantificar e analisar o DNA total extraído na aula prática do capítulo 13.

3 . MATERIAIS

a. Quantificação de ácidos nucleicos:

- Cubeta para espectrofotômetro capacidade 2 mL
- Lenços de papel ultrafinos para limpeza da cubeta
- Micropipeta automática 10 μL
- Micropipeta automática 1000 μL (1 mL)

- e. Microtubos
- f. Ponteiras descartáveis para micropipetas

b. Visualização em gel de agarose:

- a. Balança
- b. Bandejas e pentes para eletroforese
- c. Cuba horizontal para eletroforese/Fonte
- d. Erlenmeyer
- e. Espátula
- f. Micropipeta automática 10 μ L
- g. Micropipeta automática 20 μ L
- h. Micro-ondas
- i. Ponteiras descartáveis para micropipetas
- j. Provetas

4 . SOLUÇÕES

- a. Água ultrapura
- b. Solução de agarose 0,8%
 - 1. Agarose 0,8 g
 - 2. TEB 1 X 100 mL
- c. Solução de tampão de eletroforese (TEB) 10 X (estoque)
 - 1. Tris base 107,8 g
 - 2. EDTA 7,44 g
 - 3. Na₂EDTA.2H₂O 55,0 g
 - 4. Ácido bórico anidro até pH igual a 8,3

5 . PROCEDIMENTOS

A. Quantificação das amostras em espectrofotômetro

Os ácidos nucleicos DNA e RNA possuem capacidade de absorção de luz nos comprimentos de onda (λ) de 260 e 230 nm, respectivamente, já as proteínas, moléculas que podem estar contidas na extração de ácidos nucleicos como contaminantes, absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm. Esta propriedade nos permite quantificar o DNA

extraído e além disso determinar o grau de pureza da extração através da densidade óptica (DO).

1. Primeiro, precisamos diluir as amostras. Em um microtubo, aliquotar 10 μL (diluição 1:50) do DNA extraído e misturar com 490 μL de água ultrapura;
2. Realizar a primeira leitura apenas com uma amostra de 500 μL de água ultrapura (branco);
3. Realizar a leitura da amostra. Se o valor da DO for maior que 1, a amostra está muito concentrada e precisa ser diluída mais vezes;
4. Após a obtenção do valor da DO da amostra é possível obter a concentração de DNA. A convenção utilizada para estimar a concentração de DNA é: 1
 $\text{DO}_{260} = 50 \mu\text{g}$ de DNA de dupla hélice
5. Assim a concentração de DNA da amostra pode ser obtida através do seguinte cálculo:

$$[\text{DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L})] = \text{leitura da DO}_{260} \times 0,05 \mu\text{g} \times \text{Fator de diluição.}$$

Para medir o grau de pureza da amostra basta realizar a leitura a 260 nm e a 280nm e observar a relação $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$. Se o valor da relação for maior que 1,8 é possível afirmar que o DNA está “puro”, um valor inferior a 1,8 indica que a amostra está contaminada com proteínas.

B. Análise de DNA total extraído através de gel de agarose (adaptado Sambrook & Russel, 2001)

1. Antes de iniciar a atividade paramentar-se adequadamente;
2. Ligar e equilibrar a balança. Com auxílio da barca, copo ou papel manteiga pesar a agarose;
3. Com auxílio de uma proveta, colocar 100 mL de TBE 1X em um Erlenmeyer, adicionar a agarose pesada e homogeneizar;

Obs.: O volume a ser preparado e a concentração de agarose vai depender do volume do gel de agarose desejado e o tipo de DNA a ser analisado. Para análise de DNA total, sugere-se uma concentração de 0,8% de agarose.

4. Aquecer a mistura em banho-maria fervente ou micro-ondas até que a agarose se dissolva. Deixar esfriar por 3 min.
5. Com auxílio de uma micropipeta adicione 5 μL da solução de brometo de etídio no gel e agite evitando fazer bolhas;

Obs.: A quantidade de solução de brometo de etídio deve ser ajustada de acordo o volume de solução de agarose para uma concentração final de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

6. Enquanto a solução de agarose está esfriando, escolher um pente apropriado para formar as cavidades (poços) de amostra no gel. Posicionar o pente 0,5-1,0 mm

acima do fundo da bandeja de modo que um poço completo seja formado quando a solução de agarose for adicionada;

7. Despejar a solução de agarose ainda quente na bandeja e posicionar o pente para formação dos poços, evitando a formação de bolhas;

8. Deixar o gel endurecer completamente (30-45 min em temperatura ambiente) e, em seguida, despejar uma pequena quantidade de tampão de eletroforese na parte superior do gel, removendo-o com cuidado. Transferir o gel para cuba horizontal de eletroforese ou estocar em geladeira imerso em tampão TBE 1X;

9. Adicionar tampão TEB 1X na cuba de eletroforese até cobrir o gel de agarose;

10. Misturar as amostras de DNA com 0,2 volume do tampão de carregamento (*loading buffer*) 6X.

11. Aplicar o padrão de peso no primeiro poço do lado esquerdo do gel;

Dica: Aplique o padrão de peso em ambos os lados caso haja várias amostras. Comece aplicando o padrão no segundo poço antes da borda do gel (pular o primeiro poço).

12. Aplicar lentamente a mistura de amostra nos poços do gel submerso usando uma micropipeta descartável, uma micropipeta automática ou uma pipeta Pasteur. Trocar as ponteiros a cada amostra aplicada;

13. Conectar os fios da cuba horizontal de eletroforese à fonte de eletricidade, ajustando a voltagem de acordo com o tamanho da cuba e concentração do gel de agarose;

14. Após observar a chegada do corante ao final do gel, retirar e visualizar utilizando aparato com luz ultravioleta.

Obs.: Evitar uso prolongado da luz ultravioleta, diminuindo a emissão de gás ozônio e degradação do DNA em gel de agarose. Usar protetor facial para evitar irritação dos olhos.

6 . QUESTÕES

1. Quais são as principais formas de avaliar e quantificar o DNA resultante do processo de extração?

2. Quando realizamos uma eletroforese em gel de agarose com o DNA total extraído e ao verificarmos o resultado aparecem várias bandas no gel, o que significa? Explique os principais motivos para este resultado.

3. Há várias conformações de DNA que se movem diferentemente em um gel de agarose, por exemplo. Faça um desenho esquematizando a relação entre a mobilidade de uma molécula de DNA e sua conformação. Para isso, vale lembrar que as conformações estão submetidas à mesma corrente e tampão.

4. Quais são as finalidades de se quantificar o DNA extraído?

7. CURIOSIDADES

O brometo de etídio é utilizado para visualização de ácidos nucleicos em luz ultravioleta é um potente agente cancerígeno. O brometo de etídio é um agente intercalante usado frequentemente como marcador de ácidos nucleicos em laboratórios de biologia molecular para processos como a eletroforese em gel de agarose. Quando se expõe esta substância à luz ultravioleta, emite uma luz vermelho-alaranjada, que se intensifica umas 20 vezes depois de haver unido a uma cadeia de DNA. Este efeito é devido ao aumento da hidrofobia do meio e não à rigidificação do anel benzênico. Como o brometo de etídio se intercala no DNA, esta substância tem um poderoso efeito mutagênico e, possivelmente pode ser cancerígeno ou teratogênico.

O brometo de etídio tem referência CAS 1239-45-8, e fórmula molecular $C_{21}H_{20}BrN_3$. Como a maioria dos compostos fluorescentes, é uma substância aromática. A maior parte da molécula é uma estrutura tricíclica com grupos amino-benzênicos em cada lado de uma molécula pirimidínica (seis átomos, contendo nitrogênio e um anel aromático). Esta estrutura dibenzopiridínica é conhecida com o nome de fenantridina (FISPQ, 2015).

Após estas práticas vimos a importância da quantificação e caracterização de ácidos nucleicos. Você sabia que vários fatores influenciam a migração do DNA em gel de eletroforese? Pois é! Listamos abaixo os principais fatores que são responsáveis pela forma de migração de ácidos nucleicos em gel de agarose, confira!

A mobilidade eletroforética do DNA através do gel de agarose é influenciada por vários fatores:

a) Tamanho e conformação do DNA: é o fator crítico. Uma molécula de DNA migra na matriz de agarose com mobilidade inversamente proporcional ao $\log_{10}$ de sua massa molecular, que, por sua vez, é função do tamanho e da forma da molécula. Assim, o tamanho do fragmento do DNA em pares de base, ou seja, sua sequência linear, é o fator que, em princípio, deveria influenciar a migração no gel. Entretanto, nem sempre o DNA encontra-se linear e descondensado e tais fatores podem alterar a migração do fragmento no gel, pois interferem na passagem da molécula de DNA pelos poros. As moléculas de DNA circular podem assumir formas como: relaxada (com um corte) ou superenovelada. Estas formas não migram de acordo com o tamanho do DNA durante a eletroforese, podendo atravessar a malha do gel em velocidades superiores ou inferiores ao padrão. No entanto, quando estas moléculas circulares são linearizadas, ou seja, são clivadas em um ponto e assumem uma forma linear, então a corrida na eletroforese obedece ao tamanho da molécula. Sob algumas condições, a forma circular super enovelada migra mais rapidamente que a forma linear; e sob outras condições acontece o inverso. Outro exemplo é o DNA genômico, pois sua estrutura condensada e complexa não permite que os fragmentos migrem de acordo com o tamanho em pares de base e sim, fiquem presos nos poros do gel devido à sua estrutura densa e irregular que não permite que os fragmentos atravessem. Assim, a mobilidade das formas do DNA no gel não

depende somente do tamanho da molécula, mas da densidade, torção do DNA e de outros fatores.

b) Concentração de agarose: A concentração da agarose desempenha papel importante na separação eletroforética, pois determina a porosidade do gel, que por sua vez, influencia diretamente na capacidade de migração das moléculas de DNA. Portanto, o tamanho dos poros desta matriz é inversamente proporcional à concentração de agarose utilizada e diretamente proporcional ao tamanho dos fragmentos de DNA que se deseja separar.

c) Presença do brometo de etídeo no gel: O fato desse agente se intercalar entre os pares de bases provoca mudanças na conformação e na flexibilidade da molécula de DNA. Na ausência de brometo as moléculas circulares super enoveladas migram mais rápido do que as moléculas lineares de mesma massa molecular. Já as moléculas circulares relaxadas migram mais lentamente do que as outras duas isoformas topológicas. Altas concentrações de brometo acarretam a formação de superenovelamento positivo e consequente aumento da mobilidade das moléculas. Além disso, a corrida da forma linear é reduzida em cerca de 15% quando comparada à migração da mesma molécula na ausência do agente intercalante.

d) Voltagem e tipo de tampão de eletroforese aplicada: A corrente elétrica, a composição e a força iônica do tampão influenciam na migração do DNA. Em uma faixa de baixa voltagem, a taxa de migração de fragmentos de DNA linear é proporcional à voltagem aplicada. Entretanto, o aumento de voltagem faz com que a linearidade seja perdida. Desta forma, os grandes fragmentos de DNA migram mais rápido do que os pequenos havendo formação de “rastros” que refletem a má resolução dos fragmentos. Em baixa força iônica, a migração é lenta e em alta força iônica há uma supercondutividade elétrica que gera calor e pode derreter o gel dentro da cuba além de desnaturar o DNA. Os tampões mais utilizados em eletroforese de DNA são o TAE (Tris-acetato-EDTA) e o TBE (Tris-borato-EDTA), ambos compostos pelo elemento tamponante, o Tris ou (hidroximetil) aminometano. Ressalta-se que o Acetato (ácido acético) ou Borato (ácido bórico) são utilizados para ajustar o valor de pH da solução e atuam como eletrólitos para a manutenção da corrente. Enquanto o EDTA (ácido etileno diamino tetracético) presente em ambos os tampões serve como um agente quelante que sequestra íons de magnésio entre outros. Isto é particularmente interessante para proteger o DNA via inibição de nucleases que dependem da presença de magnésio para degradar o DNA. O tampão TBE é preferido para a separação de moléculas pequenas de DNA, menores do que 1 kb, e para longas corridas devido à sua maior capacidade tamponante. No caso do DNA ser posteriormente recuperado do gel e utilizado, por exemplo, em um experimento de clonagem, prefere-se o uso de TAE, pois o Borato presente no TBE é um potente inibidor de várias enzimas (CORREIA & POSSIK, 2015)

REFERÊNCIAS

CORRÊA, Elisete Marcia; POSSIK, Patrícia Abrão. A análise de DNA por eletroforese. 2005. Disponível em: <http://www.cienfianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biologia_molecular/testesgeneticos.pdf>. Acesso em: abr. 2021.

FISPQ - Brometo de Etídio.» (PDF). “Merck S/A”. 03 de dezembro de 2015. Disponível em: <<https://www.farmacia.ufmg.br/wp-content/uploads/2019/04/FISPQ-Brometo-de-etideo.pdf>>. Acesso em: abr. 2021.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. Artmed. 6a ed. New York, 2014.

OLIVEIRA, E.; TRENTIN, T.; CAMARGO, F.; PINTO, Y. D.; Martins, D. Eletroforese: Conceitos e aplicações. Enciclopédia Biosfera, v. 11, n. 22, p. 1637–1648, 2015.

OLIVEIRA, M. C. de S.; REGITANO, L. C. de A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCINIO, E. do; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMOTEO, W. H. B.; BELICUAS, S. N. J. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. Embrapa Pecuária Sudeste. p. 43, 2007.

PORTELA, B. Y. M.; MARQUES, E.; SILVA, J.; MENDONÇA, R.; ALENCAR, M.; COSTA, D. ESPECTROFOTOMETRIA, ESSENCIAL PARA ANÁLISES CLÍNICAS. Unicatólica. v. 1, n. 88, 2016.

REGITANO, L. C. A.; TAMBASCO-TALHARI; D.; SANTOS, I. K. F.; GABRIEL, J. E.; ALVARES, L. E.; RIBEIRO, L. A.; COUTINHO, L. L. MARTINEZ, M. L. Técnicas de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal. Embrapa. p. 99, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 3ª ed. New York, 2001.

RESPOSTAS DAS QUESTÕES

CAPÍTULO 1

1. Nível de biossegurança 1 (NB-1): necessário em atividades que envolvam os agentes biológicos da classe de risco 1. Representa um nível básico de contenção, que se fundamenta na aplicação das boas práticas laboratoriais (BPLs), na utilização de EPIs e EPCs e na adequação das instalações. Em geral, as atividades são realizadas sobre as bancadas. Nível de biossegurança 2 (NB-2): exigido para as atividades que envolvam os agentes de risco moderado (agentes biológicos da classe de risco 2). O acesso ao laboratório deve ser restrito aos profissionais da área (professores, técnicos) e aos acadêmicos que estejam desenvolvendo atividades de ensino, pesquisa e extensão, mediante autorização do responsável técnico. As instalações devem possuir autoclave para descontaminação, cabine de segurança biológica classe I ou II e centrífuga com caçapa protegida. Nível de biossegurança 3 (NB-3): aplicável aos locais em que forem desenvolvidas atividades com os agentes biológicos da classe de risco 3. É necessário treinamento específico e utilização de barreiras de proteção individual e cabine de segurança biológica classe II ou III, com filtro HEPA. Nível de biossegurança 4 (NB-4): exigido às atividades que manipulem os agentes biológicos da classe de risco 4, como agentes infecciosos que possuem alto risco de infecção. Assim como no NB-3, o acesso deve ser restrito e com sistema de segurança rigoroso, por exigir maior complexidade e nível de biocontenção.

2. De acordo com a ANVISA, as Boas Práticas de Laboratório (BPL) são um agrupamento de ações definidas e específicas. Essas ações passam pela análise do local, dos potenciais riscos e do nível de toxicidade dos produtos utilizados.

3. De acordo com a RDC 222/2018 os resíduos devem ser classificados em cinco grupos (A,B,C,D e E), posteriormente, segregados, identificados e acondicionados em sacos plásticos ou recipientes identificados e compatíveis com o tipo de resíduo, se necessário submetidos a um tratamento prévio. Submetidos à coleta e transporte interno da área geradora até o Abrigo Externo de Resíduo. Posteriormente, coleta e Transporte Externo da instituição ao local de destino de acordo com o tipo de resíduo, se necessário tratamento externo como incineração, micro-ondas ou autoclavação e disposição final.

4. O Serviço Especializados em Engenharia de Segurança e em Medicina do Trabalho (SESMT) e onde não houver, deve ser contratado um profissional Engenheiro de Segurança do Trabalho especificamente para identificar os riscos, além de quantificar e analisar a exposição dos trabalhadores e especificar as proteções necessárias.

CAPÍTULO 2

1. Inicialmente vamos identificar as informações que estão na questão.

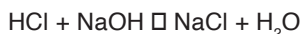
Volume do ácido = 40 mL ou 0,040 L

Molaridade do ácido = 0,8 mol/L

Volume da base = 74 mL ou 0,074 L

Molaridade da base = 0,2 mol/L

Etapa 1: Montar a equação da reação referente à mistura:



Etapa 2: Verificar a proporção entre os participantes da reação:

Analisando a equação balanceada do processo acima, temos que a proporção entre os participantes é de 1:1:1:1, ou seja, a quantidade em mol da base é igual à quantidade em mol do ácido.

$$n_b = n_a$$

Etapa 3: Utilizar os dados fornecidos na equação abaixo, que foi obtida a partir da análise da proporção estequiométrica da equação da reação, para verificar se há excesso de ácido ou base na reação e determinar o número de mol do sal:

$$\text{ácido} = \text{base}$$

$$M_a \times V_a = M_b \times V_b$$

$$0,8 \times 0,04 = 0,2 \times 0,074$$

$$0,032 \text{ mol de ácido} = 0,0148 \text{ mol de base}$$

Como podemos verificar, a quantidade em mol de ácido é maior que a da base. Como a proporção é 1:1, deveria ser igual. Como a base apresenta o menor valor em mol, esse é o valor limitante em mol para todos os participantes. Assim, a quantidade em mol do sal formado é de 0,0148 mol.

Etapa 4: Determinar a concentração em mol/L do sal a partir da fórmula da molaridade. Basta dividir o número de mol do sal pelo volume da solução (soma do volume do ácido com o volume da base):

$$M_{\text{sal}} = n_{\text{sal}} / V_{\text{total}}$$

$$V_{\text{total}} = 0,04 \text{ L} + 0,074 \text{ L} = 0,114 \text{ L}$$

$$M_{\text{sal}} = 0,0148 \text{ mol da base} / 0,114 \text{ L}$$

$$M_{\text{sal}} = 0,130 \text{ mol/L, aproximadamente}$$

2. Inicialmente vamos identificar as informações que estão na questão.

$$m_1 = 0,4 \text{ g}$$

$$MM(\text{NaCl}) = 23 + 35,5 = 58,5 \text{ g/mol}$$

$$V(\text{L}) = ? \text{ (é o que se deseja descobrir)}$$

$$M = 0,05 \text{ mol/L}$$

* Aplicando os valores relacionados na fórmula, temos:

$$M = \frac{m}{V}$$

$$MM \times V$$

$$V = \frac{m}{M}$$

$$MM \times M$$

$$V = \frac{0,4g}{MM}$$

$$(58,5 \text{ g/mol}) \times (0,05 \text{ mol/L})$$

$$V = 0,14 \text{ L.}$$

3. Sua característica fundamental é a chamada capacidade tamponante. E sua função é evitar que o pH ou o pOH do meio sofra variações quando forem adicionados ácidos fortes ou bases fortes.
4. A escolha do ácido ou da base fraca para funcionar como tampão deverá levar em consideração o valor do pKa e da concentração.

CAPÍTULO 3

1. A diálise é uma forma de filtração molecular. A mistura de proteína e moléculas pequenas (como sais) é colocada dentro de um saco de material semipermeável com poros ultramicroscópicos (como o celofane). Quando o saco de diálise é imerso em tampão as moléculas proteicas ficam retidas, enquanto que moléculas pequenas ou íons atravessam a membrana de diálise
2. Deve ser evitada a desnaturação, proteólises e contaminação por microrganismos. Podemos evitar estes problemas pela redução do tempo na preparação e também na redução de temperatura, porém, a utilização de temperaturas baixas nem sempre é necessária e algumas vezes, torna-se inconveniente.
3. A centrifugação diferencial em velocidades crescentes permite separar (fracionar) componentes celulares com densidades distintas. Quanto maior a densidade mais rapidamente sedimentam em uma dada velocidade.
4. A solução salina tem pH 6,2 mantém o pH próximo ao pH fisiológico, de forma a evitar a desnaturação das proteínas de interesse e a manutenção da sua atividade inibitória.

CAPÍTULO 4

1. O efeito "salting out" é a precipitação de proteína em solução por altas concentrações de sais. Na adição de sais, a precipitação ocorre pela diminuição da solubilidade ocasionada pela dissolução do sal. A água apresenta um grande poder de solvatação, e passa a interagir com os íons provenientes da dissociação

do sal, deixando a estrutura proteica. Como consequência, ocorre uma maior interação proteína-proteína, diminuição da solubilidade em meio aquoso e, consequentemente, precipitação da proteína.

2. Devido sua composição por aminoácidos distintos e diferentes grupos R, as proteínas apresentam diferentes pontos isoelétricos. O ponto isoelétrico de uma proteína corresponde ao pH onde a proteína tem solubilidade mínima. Neste pH as proteínas formam complexos eletrostáticos eliminando a água por meio da eliminação de grupos H neutralizando essas forças polares. Assim as proteínas tendem a se agregarem sendo possível sua separação por precipitação.

3. Pois esses solventes podem agir diminuindo a força de solvatação. da solução aquosa, assim as moléculas de água são retiradas pois fazem ligações com os grupos carbonila do solvente fazendo com que haja uma baixa solubilidade das proteínas favorecendo que as mesmas formem agregados.

4. A liofilização no processo de extração de proteínas pode ser definida como processo de secagem de uma substância congelada na qual a maior parte de água é removida diretamente por sublimação, sem passar pelo estado líquido. O material é mantido congelado do início ao fim do processo, mantendo os constituintes originais e a forma estrutural inicial. O produto liofilizado tem aparência porosa, podendo ser reconstituído imediatamente à forma original, pela adição de água. O tempo de vida útil é elevado se comparado a um produto não liofilizado. Como a quantidade de água do material é reduzida, diminui-se a possibilidade de ocorrerem reações de oxidação ou ação enzimática.

CAPÍTULO 5

1. a) O branco analítico é utilizado para demonstrar que outras espécies podem influenciar na amostra ou interferir de modo proporcional, bem como os traços de analito que são encontrados nos reagentes usados para preparar a análise. Em suma, o branco mede a resposta instrumental de um determinado processo analítico para impurezas ou determinadas substâncias que podem interferir nos reagentes. O branco também é bastante utilizado na espectrofotometria para que se elimine as interferências indesejáveis no procedimento. A solução de branco será responsável por zerar o aparelho.

b) A concentração será obtida em $\mu\text{g/mL}$.

c) A albumina do soro bovino, além de ser um reagente de baixo custo, é um material já caracterizado, cuja solução de concentração é exatamente conhecida, que é indispensável para a realização de análises volumétricas. É essa solução que será usada para a comparação das concentrações de proteína entre o BSA e o objeto de estudo.

d) O método Bradford é um método colorimétrico de determinação da concentração de proteínas. Ele se baseia nas interações que ocorrem entre o corante Coomassie

brilhante azul BG-250 com macromoléculas de proteína, principalmente com os resíduos de arginina que possuem uma cadeia lateral carregada positivamente. Essas interações ocorrem em meio ácido e podem ser do tipo eletrostáticas, hidrofóbicas e forças de Van der Waals. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica (ionização do corante) que absorve fortemente em 595 nm. O produto formado da ligação corante-proteína apresenta uma cor azulada e a intensidade desta coloração dependerá da concentração de proteínas da amostra e será mais intensa se a concentração for alta.

CAPÍTULO 6

1. A lavagem da coluna é feita com o mesmo tampão de equilíbrio para que as proteínas que absorveram de forma inespecífica sejam eluídas.
2. Carga elétrica contrária e tamanho: A carga da proteína é um fator importante, pois quanto mais cargas contrárias maior é a interação proteína/resina. Cada grupo carregado negativamente ou positivamente presente na molécula de proteína interagirá com um grupo de carga contrária da resina, ou seja, se a resina tem carga positiva e a molécula de proteína tem um grupo de carga negativa, esse aminoácido de carga lateral negativa formará uma ligação eletrostática com o grupo positivo da resina. Caso tenha duas proteínas com o mesmo ponto isoelétrico, sendo uma proteína pequena e a outra com alta massa molar, a proteína que terá a maior facilidade de se ligar à resina é a com menor massa, pois ela consegue permear melhor os poros da resina.
3. O pH do tampão de eluição contendo a proteína alvo pode ser alterado para adequar a proteína à resina. Se a resina tem carga positiva, então a proteína a ser adsorvida deverá ter carga negativa e o pH do tampão tem que ser tal que a proteína esteja com carga negativa, ou seja, um pH mais ácido.
4. Com a variação do pH para que a proteína passe a ter uma carga de mesmo sinal da resina ou adicionando sal para haver competição entre os íons tanto pela resina como pela proteína.
5. As moléculas então irão ser separadas unicamente pela diferença de tamanho. As moléculas maiores serão eluídas antes das moléculas menores. O que significa que as moléculas menores ficarão retidas por tempo maior na coluna, o que não tem a ver com interação da molécula com a resina e sim porque serão capazes de entrar nos poros, percorrendo um caminho maior do que as moléculas maiores, que têm disponíveis um número reduzido de poros para entrar.

CAPÍTULO 7

1. Proteases são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos.

2. Os inibidores de proteases aumentam a resistência da planta a parasitos, insetos, larvas, microrganismos, pragas e patógenos em geral
3. Possuem papel de destaque devido às diversas possibilidades de utilização na modulação de processos biológicos para a cura de enfermidades. Já foi possível verificar a importância dessas moléculas para o sistema imune, para os processos de regeneração tecidual, propriedades antimicrobianas e antialérgicas.
4. Sim, os inibidores de proteinases atuam nas plantas ajudando na defesa contra patógenos. Se isolados poderiam ser utilizados com função inseticida.
5. Os inibidores de protease podem ser classificados de acordo com o tipo de enzima que inibem, sendo conhecidos como inibidores de cisteína, serino, aspártico ou metalo-proteases. São ainda classificados em tipos quando se considera a homologia da estrutura primária, posição dos sítios ativos, localização e número de pontes dissulfeto. Os tipos de inibidores de protease de maior destaque em leguminosas são Kunitz e Bowman-Birk.

CAPÍTULO 8

1. É um teste que utiliza glóbulos vermelhos e anticorpos (imunoglobulinas M e G) para verificar a presença de um antígeno no sangue. Seu principal objetivo é identificar patógenos como fungos, bactérias e vírus.
2. Os anticorpos inibidores da hemaglutinação podem causar resultados falsos negativos, pois no soro humano existem inibidores inespecíficos da hemaglutinação e as técnicas utilizadas para sua remoção nem sempre atuam de modo eficiente.
3. Aglutinação indireta ou passiva: emprega a adsorção de anticorpos ou antígenos solúveis proteicos ou polissacarídeos na superfície de micropartículas inertes (suportes) que não interferem na interação antígeno-anticorpo, como plásticos, gelatina, carvão e hemácias formolizadas de aves e carneiros. Aglutinação direta: o antígeno faz parte naturalmente da célula, e haverá aglutinação dessas células promovida por anticorpos contra esses antígenos. São exemplos usuais desses testes a identificação de antígenos eritrocitários na tipagem sanguínea utilizando anticorpos específicos.

CAPÍTULO 9

1. Eletroforese é o processo de movimentar moléculas carregadas em solução através da aplicação de um campo elétrico em função das moléculas serem dotadas de diferentes cargas, formas e tamanho e migrarem de forma diferente.
2. A eletroforese em gel de poliácridamida é utilizada quando o objetivo é separar uma amostra de proteínas para identificar e quantificar proteínas. A eletroforese em gel de agarose é mais comumente usada na separação de moléculas de DNA

e, portanto, é frequentemente usada durante técnicas de manipulação de DNA ou estudos envolvendo a identificação de indivíduos com base em sua sequência de DNA

3. No SDS-PAGE, o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) é usado para desnaturar as proteínas e normalizar sua proporção massa / carga e assim, apenas o peso molecular afeta a velocidade de migração e, portanto, as amostras são separadas de acordo com isso

4. A solução tampão reduz mudanças de pH, no campo elétrico e previne o aquecimento causado pela passagem da corrente elétrica

5. Quando o gel é colocado sob luz UV ou LED, é possível visualizar o padrão de bandas: quanto maior a molécula, menor é a sua migração, ficando mais próxima do poço, enquanto quanto mais leve for a molécula, maior é o potencial migratório.

CAPÍTULO 10

1.a. A Atividade específica é um parâmetro obtido dividindo-se a atividade enzimática total pela a quantidade total de proteínas presente em cada etapa de purificação. Esse índice aumenta após a purificação.

1.b. Estes parâmetros e a medida do aumento de pureza é obtido através da divisão das atividades específicas, calculada após cada etapa de purificação, pela atividades específicas do extrato inicial. Ou seja, indica quanto (em %) da proteína de interesse ativa presente no material de partida foi recuperada ao final da purificação. Um grau de perda é inerente ao processo de purificação.

CAPÍTULO 11

1. Ao realizar o pré-inóculo, é possível inocular o número ideal de células e prever a fase de crescimento celular que a cultura estará ao longo do processo de produção da biomolécula de interesse. No caso de biossurfactantes, o ideal é que a cultura se estenda na fase estacionária que é a responsável pela produção desses metabólitos secundários.

2. Remover sinais extracelulares, como por exemplo, os de apoptose; remover o meio de cultivo antigo consumido; concentrar as células.

3. Evitar a contaminação por microrganismos oportunos, além de prevenir a contaminação cruzada (células visualmente similares, mas pertencentes a outra cepa).

4. As etapas de purificação garantem um produto final de maior pureza. Propriedades como tamanho molecular, concentração, solubilidade, densidade, polaridade, volatilidade e subprodutos gerados devem ser levados em consideração na escolha correta de um ou mais métodos de purificação.

5. Uma forma muito empregada para otimização da produção de biossurfactantes é a limitação de nutrientes. Os micronutrientes como ferro, zinco, cobalto, cobre, manganês são capazes de aumentar em várias vezes a produção de biossurfactantes.

CAPÍTULO 12

1. De posse do valor da CMC é possível saber a quantidade máxima do tensoativo necessária para se obter o menor valor de tensão superficial. Desta forma, não são utilizados excessos da molécula, o que é interessante do ponto de vista comercial e de performance.

2. Moléculas anfífilas, incluindo biossurfactantes, adsorvem em interfaces (ar / líquido, líquido / líquido, sólido / líquido) devido à sua natureza hidrofóbica-hidrofílica dupla. Como as moléculas de surfactante substituem as moléculas de água ou óleo ao longo da interface, elas reduzem efetivamente as forças intermoleculares entre as moléculas de solvente, reduzindo assim a tensão superficial ou interfacial. Em termos termodinâmicos, os surfactantes adsorvidos reduzem a energia livre de superfície por unidade de área necessária para criar uma nova superfície (uma quantidade intimamente relacionada à tensão superficial e interfacial) (JAHAN, R. *et al.*, 2020)

3. As vantagens são maior atividade superficial e interfacial, baixa toxicidade, biodegradabilidade, e utilização de substratos alternativos na produção por via fermentativa. Desvantagens são alto custo de produção, baixa produção, produção de espuma durante o processo e várias etapas de purificação.

CAPÍTULO 13

1. Os métodos tradicionais utilizados para extração de carboidratos não são seletivos para carboidratos podendo assim outros compostos serem extraídos. Ademais, são métodos demorados e os rendimentos e / ou pureza são baixos.

2. O soro de leite e o leite em pó são fontes de carbonos de extrema importância para o crescimento do microrganismo e produção de carboidratos

3. A suplementação dos meios possui função em disponibilizar nutrientes adicionais para o crescimento do microrganismo e produção de carboidratos.

4. A esterilização do meio e de todo o material é de extrema importância para manter o cultivo livre de possíveis contaminações por outros microrganismos que não o de interesse.

5. A temperatura de crescimento é um dos fundamentais fatores que influenciam no crescimento dos microrganismos sendo capaz de estimular seu crescimento, inibi-lo ou inclusive matá-los.

CAPÍTULO 14

1. Para que o microrganismo realize a fermentação e não a respiração.
2. Através do fermentômetro é importante acompanhar o processo fermentativo por meio de sucessivas pesagens do conjunto, em intervalos de tempo regulares, já que a perda de peso obtida é decorrente do desprendimento de CO_2 .
3. Para cada mol de glicose consumido são produzidos dois mols de etanol e dois mols de CO_2 .
4. O chamado DNS é o composto empregado no método e que utiliza ácido dinitro- salicílico, sal de Rochelle, (solução de târtaro de sódio de potássio) que serve para prevenir o reagente da ação do oxigênio dissolvido.
5. Atualmente, a produção comercial de etanol depende principalmente da fermentação de sacarose e glicose.

CAPÍTULO 15

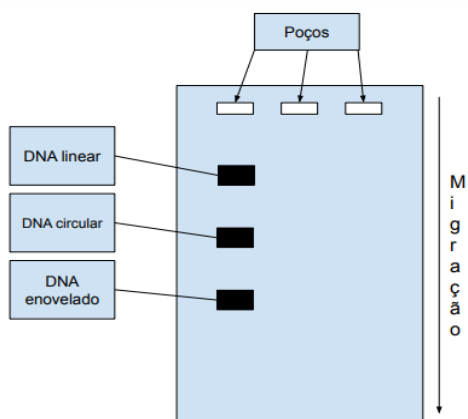
1. O principal objetivo da maceração é quebrar as barreiras físicas que envolvem as células (parede celular e/ou membrana plasmática).
2. O detergente é utilizado para desestruturar as moléculas de natureza lipídica das membranas biológicas. Assim, todo o conteúdo celular (organelas, proteínas, ácidos nucleicos, etc) é liberado e fica disperso em solução.
3. O sal é responsável por neutralizar as cargas negativas que a molécula de DNA possui, além de levar à precipitação do detergente e dos outros componentes celulares como carboidratos e proteínas, mantendo apenas DNA e o próprio sal solúveis na solução. Assim, através do processo de centrifugação, é possível separar o DNA dos outros componentes.
4. Por ser menos polar que a água, o álcool gelado é responsável por desidratar a molécula de DNA, forçando a precipitação destas moléculas e facilitando sua posterior extração.
5. Identificação de suspeitos envolvidos em um crime; Identificação parental e Estudos genéticos, como busca por doenças hereditárias, por exemplo.

CAPÍTULO 16

1. A integridade do DNA pode ser avaliada através de um gel de poliacrilamida ou agarose, aplicado junto com um padrão de peso molecular, podem ser analisados através de espectrofotometria também.
2. Significa que o DNA está degradado. Isto pode ocorrer pela contaminação das DNases, por quebra mecânica durante a extração com clorofórmio ou por

contaminação com RNA.

3.



4. Determinar a concentração, integridade e pureza do DNA extraído.

SOBRE OS ORGANIZADORES



PAULO AFONSO GRANJEIRO - Professor Associado III do Campus Centro Oeste da Universidade Federal de São João del-Rei, em Divinópolis-MG. Possui graduação em Farmácia pela UNESP de Araraquara-SP (1996), Mestrado e Doutorado em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica pela UNICAMP (1998 e 2001). Realizou

Estágio Sênior (Pós-doutorado/CAPES) no Instituto de Tecnologia de Massachusetts (Visiting Scientist - MIT/EUA). Pesquisador e inventor nas áreas de Bioquímica, Microbiologia e Biotecnologia. Professor de Bioquímica e Empreendedorismo na graduação e pós-graduação. Colaborador nos Programas de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Biotecnologia e PROFNIT/UFSJ. Experiência em programas de pré-aceleração de startup BioStartup Lab, FIEMG Lab, InovAtiva Brasil, FIEMG LAB Acelera Mestrado e Doutorado, Startup Show, Hospital Startup (Hospital São Francisco -Belo Horizonte/MG), Programa de Desenvolvimento em Tecnologia em Saúde da PBH/Biominas Brasil, ESCALESE (INCT/Midas UFMG) e Open Labs (SENAI/CETIQT). Professor membro do programa Vivência Universitária em Empreendedorismo e Inovação (VUEI) do governo do Estado de Minas Gerais de 2021. Bolsista de Extensão CNPq – Orientador de Agentes Locais de Inovação do SEBRAE 2020/2021 e 2021/2022. Tutor da Empresa Júnior BetaTch (2020 e 2021). Coordenador da Liga Acadêmica de Empreendedorismo e Inovação do Campus Centro Oeste da UFSJ. Coordenador do Núcleo de Empreendedorismo e Inovação Tecnológica (NETEC) e da Incubadora de Desenvolvimento Tecnológico e Setores Tradicionais do Campo das Vertentes (INDETEC) da UFSJ. Comendador do Mérito Farmacêutico do Conselho Regional de Farmácia do Estado de Minas Gerais. Titular da Academia de Ciências Farmacêuticas do Brasil/Academia Nacional de Farmácia.



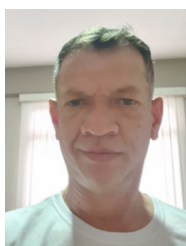
ADRIANO GUIMARAES PARREIRA - Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas, Mestre e Doutor em Microbiologia pela UFV e Pós-doutor em Biologia Celular pela UFMG. Atualmente, é docente da UEMG – Unidade Divinópolis MG e Técnico da UFSJ - Campus CCO. Orienta estudantes de iniciação científica em projetos inovadores na área de Microbiologia e Meio Ambiente como também estudantes bolsistas de extensão em projetos na área de Imunologia. Diretor do Instituto Ambiental do GEEC (IAAC), membro do CODEMA –Divinópolis MG, CBH-Pará, Conselho

Municipal de Saúde de Divinópolis MG, CEPES UEMG, Comissão SISGEN UFSJ, Comissão de Valorização da Pós-Graduação UFSJ, CEPCCO e CONEP-UFSJ. Foi membro do conselho gestor do NIT-UEMG (2018-2019) e Coordenador da UEMG no programa MOVAP (2020-2021).



DANIEL BONOTO GONÇALVES - Bacharel em Bioquímica e Mestre em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa e doutor em Microbiologia pela Universidade Federal de Minas Gerais. Tem experiência na área de Biotecnologia de Microrganismos, Bioprocessos, Microbiologia Industrial, Otimização de Bioprocessos, Bioenergia e Produção de Enzimas de Interesse Industrial. É Professor Adjunto do Departamento de Engenharia de Biosistemas - DEPEB do Campus Dom Bosco da Universidade Federal de São João del-Rei. Tem

fomentado o ecossistema de inovação tecnológica a partir do estabelecimento de parcerias com empresas, de desenvolvimento de tecnologias que geraram patentes depositadas e concedida e da fundação de startups em processos de aceleração. Coordenou Comissão Institucional responsável pelo Doutorado Acadêmico para Inovação. Foi conselheiro do Conselho Deliberativo do Núcleo de Empreendedorismo e Inovação Tecnológica NETEC/UFSJ. Foi professor do Programa Startup Universitário e atualmente é professor do Programa VUEI, ambos da Secretaria de Estado de Desenvolvimento Econômico, Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SEDECTES) do Governo de Minas. Foi professor do Programa Empreenda! Em Ação. Foi membro da Comissão de Biossegurança CCO/UFSJ. Foi tutor do Programa de Educação Tutorial - PET Bioquímica e da Empresa Júnior de Bioquímica e Farmácia da UFSJ. Orienta nos Programas de Pós-Graduação em Biotecnologia, Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular e PROFNIT - Propriedade Intelectual e Transferência de Tecnologia para a Inovação.

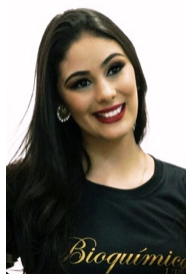


JOSÉ ANTONIO DA SILVA - Professor na Universidade Federal de São Del Rei. Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e Mestrado e Doutorado em Biologia Funcional e Molecular pela Universidade Estadual de Campinas. Tem ampla experiência na área de Bioquímica, com ênfase em proteínas, atuando principalmente nos seguintes temas: purificação e caracterização de proteínas e suas atividades biológicas. Tem atuado na área de Bioquímica (Estrutural e Metabólica), Práticas de Bioquímica e Bioquímica Analítica.

SOBRE OS AUTORES



ANDERSON FERNANDES DE MELO - Doutorando em Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal de São João Del Rei – CCO atuando na transformação de fungos filamentosos para produção de inibidores de proteases tendo como alvo a COVID-19 através da ferramenta CRISPR-Cas9. Projeto financiado pelo CNPq. Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal de São João Del Rei – CCO (2016) com ênfase nos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) em ratos alimentados com dieta do tipo cafeteria, onde parte do projeto foi desenvolvido na Unicamp. Especialista em educação pela Universidade Federal de Minas Gerais (2012). Biólogo pela Universidade de Itaúna (2006). Experiência no metabolismo de lipídios, qPCR, e na docência, atuando como professor em diversos cursos na área da saúde.



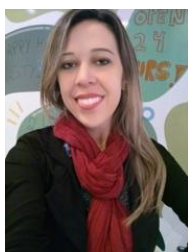
ANNA KELLY MOURA SILVA - Doutoranda em Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal de São João Del Rei, UFSJ - Doutorado Acadêmico para Inovação (DAI). Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal de São João Del Rei, UFSJ (2019). Possui graduação em Bioquímica pela Universidade Federal de São João Del Rei (2016). Tem experiência na área de Bioquímica/Biotecnologia, Química Analítica, Microbiologia Aplicada, Microbiologia Industrial e Fermentação. Atuando no desenvolvimento de processos, planejamento, análise para otimização, controle de qualidade e validação de métodos analíticos.



DIEGO FERNANDES LIVIO - Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) na otimização do bioprocesso de produção de biossurfactantes e avaliação de sua aplicabilidade na indústria de cosméticos. Mestre em Bioengenharia celular e tecidual pela UFSJ/EMBRAPA no desenvolvimento de marcadores moleculares. Possui graduação em Engenharia de Bioprocessos pela UFSJ (2010 – 2015) em parceria com a Universidade de Debrecen - Hungria (2014) e em Ciência e Tecnologia pela UFSJ. Técnico em Eletromecânica pelo Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG). Estagiário nas empresas: Allbiom – Soluções em Bioprocessos Eireli – EPP (2015), Departamento de Engenharia Bioquímica da Universidade de Debrecen, na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ) (2012) e AQS Tecnologia Ltda (eletromecânica). Iniciação Científica (PIBIC/FAPEMIG) com o projeto: Estudo da via do óxido nítrico no protozoário T.cruzi. Bolsista (BIC) do projeto extensionista “Sala da Ciência: um espaço real com interface virtual”. Ex-Diretor de Projetos da ONG Engenheiros Sem Fronteiras - Núcleo Ouro Branco.



FELIPE FERREIRA SILVA - Doutorando em Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal de São João del Rei, onde atua no desenvolvimento de sistemas de expressão heteróloga em fungos filamentosos para produção de proteínas com interesse biotecnológico através do sistema CRISPR/Cas9, bem como na utilização de ferramentas de bioinformática para caracterização e predição funcional de proteínas hipotéticas. Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de São João Del Rei (2020). Bacharel em Bioquímica pela Universidade Federal de São João Del Rei (2018). Foi bolsista do Programa de Educação Tutorial (PET Bioquímica), onde desenvolveu atividades de ensino, pesquisa e extensão. Estagiou na EMBRAPA, no Laboratório de Genética e Biotecnologia, unidade Agroenergia - DF, onde atuou na área de Biotecnologia Vegetal e Biologia Molecular, com ênfase em melhoramento genético de plantas.



HELOÍSA CARNEIRO COLARES - Doutora em Bioquímica e Biologia molecular pela Universidade Federal de São João Del Rei, onde desenvolveu o projeto intitulado, Otimização da produção de biomassa por isolados de bactérias do ácido láctico em soro de leite e potenciais aplicações industriais, no laboratório de Processos Biotecnológicos e Purificação de Macromoléculas. Mestre pelo programa multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, onde desenvolveu o projeto Identificação molecular do *Trypanosoma cruzi* em alimentos contaminados artificialmente, no laboratório de genética molecular da UFSJ- CCO. Formada em bioquímica pela Universidade Federal de São João Del- Rei. Foi bolsista do programa Startup Universitário. Cofundadora da Startup ProbioFull, com experiência em empreendedorismo e inovação. Participou de dois programas de aceleração, Catalisa ICT do Sebrae e do FIEMG Lab Acelera Mestrado e doutorado, onde ganhou prêmio de startup destaque.



JÚLIA ANTUNES TAVARES RIBEIRO - Mestre e Doutoranda em Biotecnologia (2020) pela Universidade Federal de São João del-Rei, em Divinópolis-MG. Atua na área de isolamento de moléculas e bioprocessos aplicados ao meio ambiente, com ênfase em biorremediação de efluentes industriais e produção de bioetanol. Possui graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária (2015) pela Faculdade Pitágoras de Divinópolis-MG.

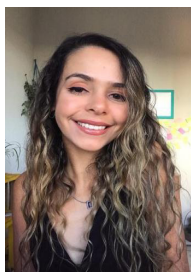


KLÉDNA CONSTANCIA - Pós-doutoranda com ênfase em produção de bioetanol a partir de biomassa vegetal pela Universidade Federal de São Joao del-Rei em Divinopolis/MG. Pós-doutora com ênfase em vacina contra Circovirose suína pela Universidade Federal de Viçosa em Viçosa/ MG (2016). Doutora e mestre pela Universidade Federal de Viçosa em Viçosa/MG (2006/2002), no departamento de Microbiologia Agrícola com projetos de ênfase em Genética de Microrganismos. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Vale do Rio Doce (1998).

Atuou como pesquisadora na empresa Microvet - Microbiologia Veterinária Especial, nos seguintes temas: Doenças suínas de impacto econômico e produção de vacinas autógenas, bioprocessos utilizando bactérias e leveduras, além de diagnósticos por meio de biologia molecular (PCR e RT-PCR) (2006 - 2015). Implantação das normas de biossegurança NB-2 para OGM e seus derivados padronizando protocolos de manipulação e treinamentos, membro da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) (2010 a 2015) e membro da Comissão Interna de Prevenção de Acidentes (CIPA) (2013 a 2015).



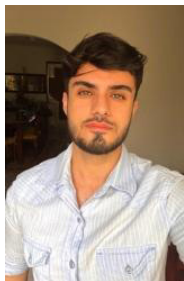
LUIZA FERREIRA DA CRUZ - Doutoranda em Biotecnologia com ênfase em Microbiologia no Campus Centro Oeste Dona Lindu da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) em Divinópolis - MG. Atua em projetos de análise pré-clínicas da utilização de probióticos. Mestre em Ciências Farmacêuticas com ênfase em Farmacologia/Toxicologia Genética pela UFSJ (2018). Especialista (Pós Graduação Lato Sensu) em Farmacologia Aplicada a Prática Clínica pela Faculdade Unyleya (2017). Graduada em Farmácia pela UFSJ (2016).



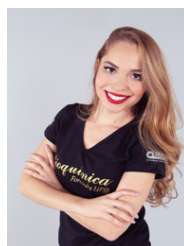
MARIA AUXILIADORA DE OLIVEIRA - Mestranda em Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal de São João del-Rei, em Divinópolis-MG. Atua na área de biossurfactantes com ênfase em sua aplicação ambiental. Possui graduação em Ciências Biológicas pelo Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais – Campus Barbacena (2015-2018).



NAYARA LIZANDRA LEAL CARDOSO - Doutoranda em Biotecnologia pela Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) Divinópolis-MG com projeto de Desenvolvimento de um processo de biorremediação para efluentes da indústria láctea (Bolsista CAPES). Possui Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados pela Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Brasil. Título: Comparação entre testes eco testes e FT-Nir para detecção de resíduos de antimicrobiano veterinário de carência zero em leite genuíno. Especialização em Controle de Qualidade pelo Instituto Federal de Minas Gerais - Campus Bambuí, IFMG-BAMBUÍ, Brasil. Título: Appcc como requisito para garantia da segurança alimentar. Graduação em Tecnologia em Alimentos pelo Instituto Federal de Minas Gerais - Campus Bambuí, IFMG- BAMBUÍ, Brasil.



PABLO FELIPE RODRIGUES GONÇALVES - Mestrando em Biotecnologia, com ênfase em Biotecnologia aplicada a Microbiologia no Campus Centro Oeste Dona Lindu da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) em Divinópolis - MG. Atua no projeto intitulado otimização da produção de biomassa por isolado de bactéria do ácido láctico em soro de leite e seu uso como probiótico em sorbet de frutas. Graduado em Bioquímica pela UFSJ-CCO (2018) onde foi Co-fundador da Startup Sôbet, sendo um dos desenvolvedores de tecnologia e patente. Participou de dois programas de aceleração de startups, Catalisa ICT do Sebrae, Health Business Summit e do MOVAP/Divinópolis, onde ganhou prêmios de startup destaque.



PRISCILA AMARAL DINIZ - Bacharel em Bioquímica pela Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ-CCO). Foi integrante do programa de educação tutorial (PET Bioquímica) da mesma instituição aonde desenvolvia atividades de ensino, pesquisa e extensão. Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) de iniciação científica pelo laboratório de Modelagem Molecular/UFSJ em projetos na área de Bioquímica/Biologia computacional. Mestranda no Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São João Del Rei com ênfase em Biotecnologia. Tem experiência em Biologia Molecular, Bioinformática, Microbiologia Aplicada e Biotecnologia.



RAQUEL VALINHAS E VALINHAS - Doutoranda em Biotecnologia com ênfase em produção de bioetanol, pela Universidade Federal de São João del-Rei, em Divinópolis-MG. Mestre pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri em Diamantina-MG (2016) em Biocombustíveis, com ênfase em Microbiologia para produção de bioetanol, onde recebeu a Menção Honrosa a dissertação de Mestrado, Prêmio Manuel Hernández de Teses e Dissertações da PPG Biocombustíveis. Possui graduação em Ciências Biológicas nas modalidades Licenciatura plena (2008) e bacharelado (2009) pelo Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM) e especialização em Gestão e Educação Ambiental (2010) pela mesma instituição.

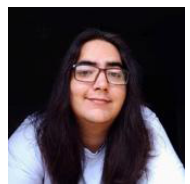


THAÍS PAULA RODRIGUES GONÇALVES - Bióloga pela Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG). Técnica em Farmácia pelo Centro Educacional Conceição Ferreira Nunes (CECON). Mestre em Ciências Farmacêuticas na Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ-CCO). Atualmente doutoranda em Biotecnologia na Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ-CCO). Linhas de Pesquisa: I-Produtos naturais/ pesquisa e desenvolvimento, formas farmacêuticas, sistemas de liberação e bioensaios; II- Microbiologia Aplicada: pesquisa de compostos fitoquímicos com atividade antimicrobiana e

sinérgica; III-Ensaios pré-clínicos; IV- Farmacognosia, Botânica e Fitoquímica; V-Pesquisa de compostos naturais com atividade herbicida, larvicida, antioxidante e toxicidade de extratos vegetais.



TUÂNIA NATACHA LOPES SILVA - Doutoranda em Bioquímica e Biologia molecular com ênfase em Microbiologia no Campus Centro Oeste Dona Lindu da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) em Divinópolis - MG. Atua no projeto intitulado Estudo bioquímico da produção de biomassa por isolados de bactérias do ácido láctico e sua aplicação na indústria de cosméticos. Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular (2019) onde desenvolveu a Purificação e caracterização de biossurfactantes produzidos por bactérias do ácido láctico em soro de leite. Graduada em Bioquímica pela UFSJ-CCO (2016). Co-fundadora da Startup ProbioFull. Participou de dois programas de aceleração, Catalisa ICT do Sebrae e do FIEMG Lab Acelera Mestrado e doutorado, onde ganhou prêmio de startup destaque.



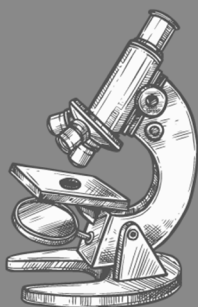
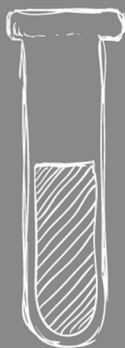
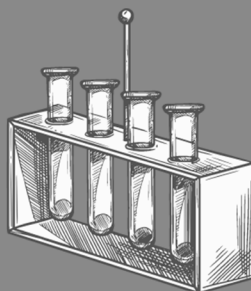
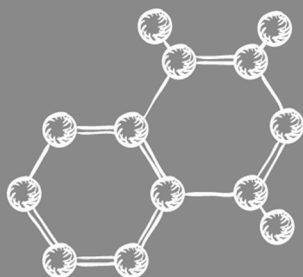
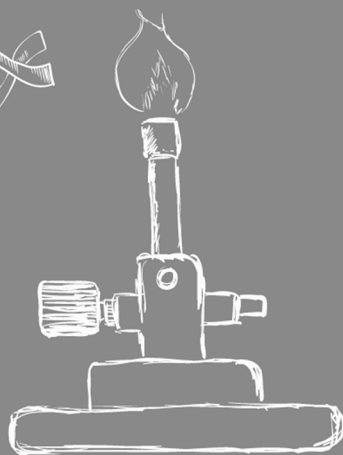
VINÍCIUS SOUZA TARABAL - Doutorando em Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ). Mestre em Biotecnologia (UFSJ) e Bacharel em Bioquímica (UFSJ). Atua no desenvolvimento de revestimentos auto-desinfetantes com aplicação em saúde humana e animal. Experiência em programas de pré-aceleração de startup: MOVAP/Divinópolis, Programa de desenvolvimento tecnológico em saúde da Prefeitura de Belo Horizonte/Fundação Biominas, Escalase (INCT/Midas UFMG), Catalisa do SEBRAE e *Health Business Summit*, ganhando prêmios de destaque.



WANDERSON DUARTE PENIDO - Mestrando em Biotecnologia com ênfase em Microbiologia e Ictiologia no Campus Centro Oeste Dona Lindu da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) em Divinópolis - MG. Atua em projetos envolvendo o uso de probióticos e biossurfactantes em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Graduado em Ciências Biológicas pela Faculdade de Pará de Minas (FAPAM) (2009). Experiência em programas de pré-aceleração de startups: MOVAP/Divinópolis, Catalisa do SEBRAE e *Health Business Summit*, ganhando prêmios de destaque.

Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022



www.atenaeditora.com.br 

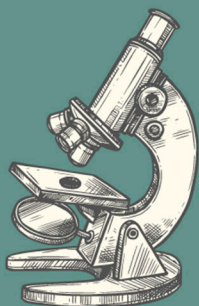
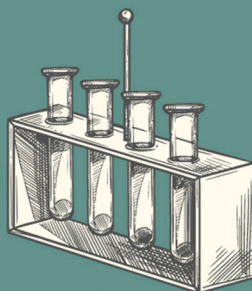
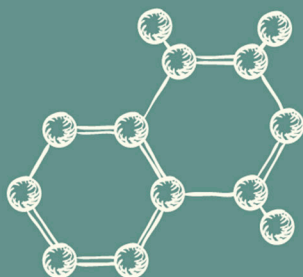
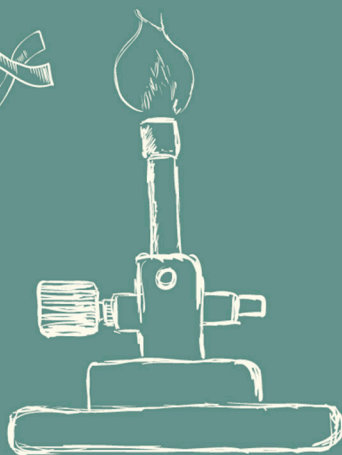
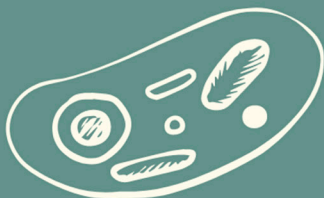
contato@atenaeditora.com.br 

[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 

www.facebook.com/atenaeditora.com.br 

Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022



www.atenaeditora.com.br 

contato@atenaeditora.com.br 

[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 

www.facebook.com/atenaeditora.com.br 