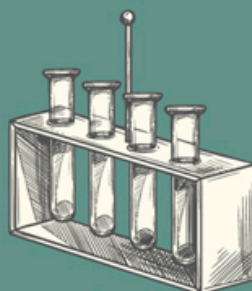


# Práticas em Bioquímica Analítica

Atena  
Editora  
Ano 2022

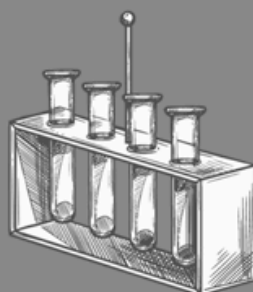
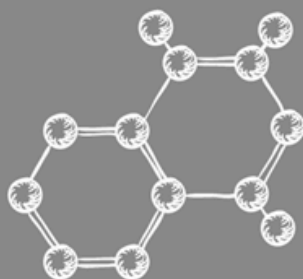
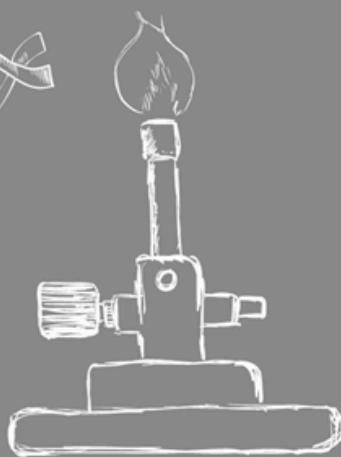


**Paulo Afonso Granjeiro**  
**Adriano Guimarães Parreira**  
**Daniel Bonoto Gonçalves**  
**José Antônio da Silva**

- 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 Cremo

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 Cremo  
**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

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

**Atena Editora**  
 Ponta Grossa – Paraná – Brasil  
 Telefone: +55 (42) 3323-5493  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
[contato@atenaeditora.com.br](mailto: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  
Tháís 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  
Tháís 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  
Tháís 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  
Tháís 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>

<b>CAPÍTULO 14.....</b>	<b>112</b>
<b>CARACTERIZAÇÃO DE CARBOIDRATOS</b>	
Paulo Afonso Granjeiro	
Heloísa Carneiro Colares	
Raquel Valinhas	
Luísa Ferreira da Cruz	
Felipe Ferreira Silva	
Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves	
 <a href="https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141114">https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141114</a>	
<b>CAPÍTULO 15.....</b>	<b>121</b>
<b>EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS</b>	
Daniel Bonoto Gonçalves	
Felipe Ferreira Silva	
Priscila Amaral Diniz	
Heloísa Carneiro Colares	
Klédna Constância Portes Reis	
Wanderson Duarte Penido	
Anderson Fernandes de Melo	
 <a href="https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141115">https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141115</a>	
<b>CAPÍTULO 16.....</b>	<b>129</b>
<b>CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS</b>	
Daniel Bonoto Gonçalves	
Felipe Ferreira Silva	
Priscila Amaral Diniz	
Heloísa Carneiro Colares	
Klédna Constância Portes Reis	
Wanderson Duarte Penido	
Anderson Fernandes de Melo	
 <a href="https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141116">https://doi.org/10.22533/at.ed.09622141116</a>	
<b>RESPOSTAS DAS QUESTÕES.....</b>	<b>137</b>
<b>SOBRE OS ORGANIZADORES .....</b>	<b>147</b>
<b>SOBRE OS AUTORES .....</b>	<b>149</b>

**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.

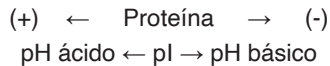
Para a obtenção de uma solução do extrato, faz-se a homogeneização, utilizando várias técnicas, sejam elas suaves, ou moderadas ou ainda vigorosas, dependendo do que se quer extrair. Exemplos de mecanismos utilizados em técnicas de homogeneização: utilização de agitadores mecânicos como liquidificadores; 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  $n^\circ$  de cargas negativas é igual ao  $n^\circ$  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

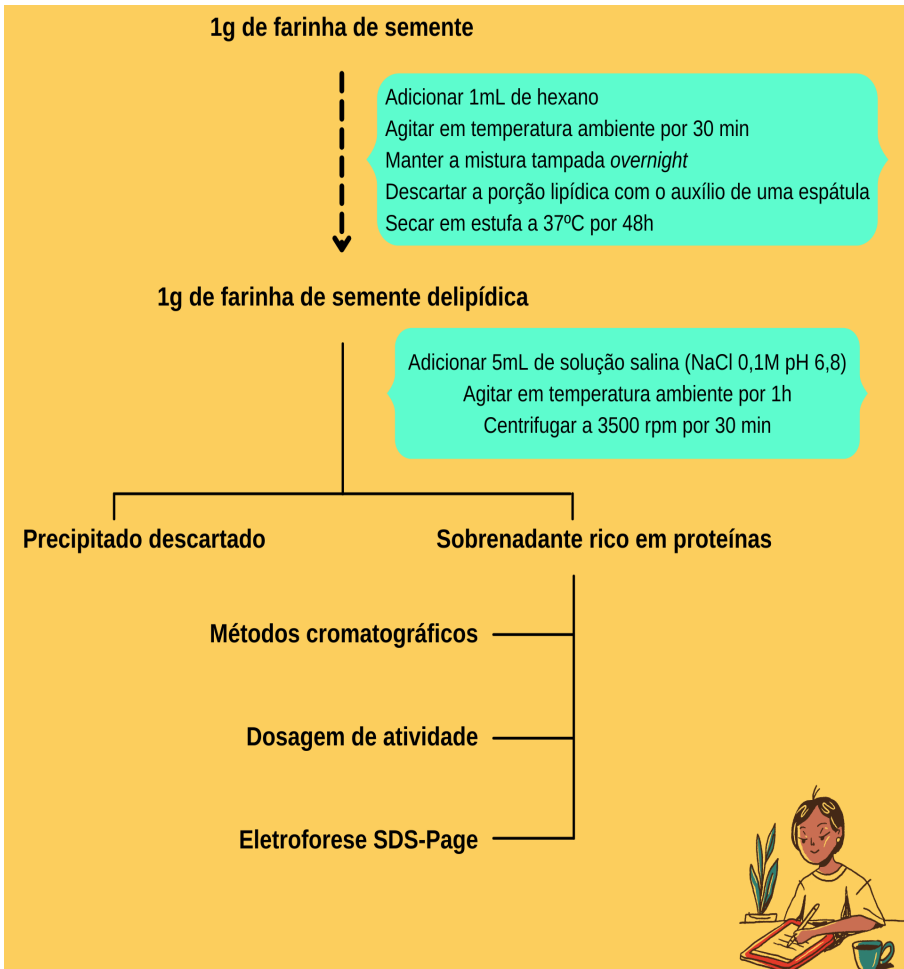
## 4 . SOLUÇÕES

- Solução Salina 0,15 M
- 9,00gr de cloreto de sódio (NaCl)
- H<sub>2</sub>O 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

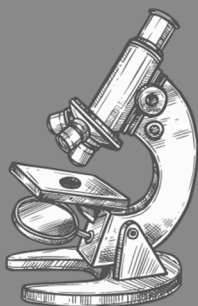
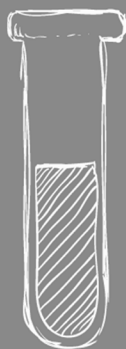
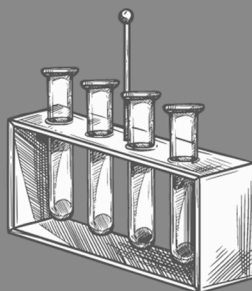
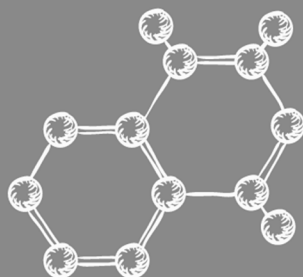
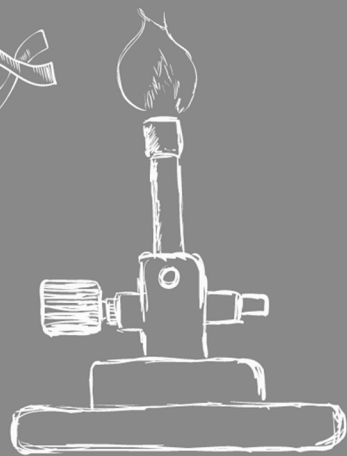
SILVA, J. A.; MACEDO, M. L.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. Biochemical characterization and N-terminal sequences of two new trypsin inhibitors from *Copaifera langsdorffii* seeds. Journal of Protein Chemistry, v. 20, n.1, p.1-7, 2001.

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.

# Práticas em Bioquímica Analítica

Atena  
Editora  
Ano 2022



[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br) 

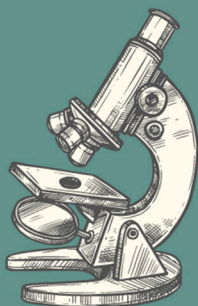
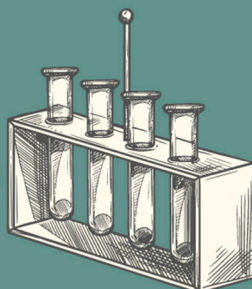
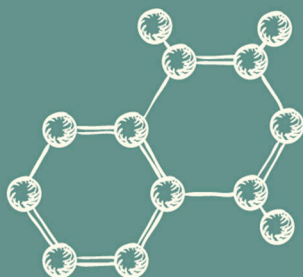
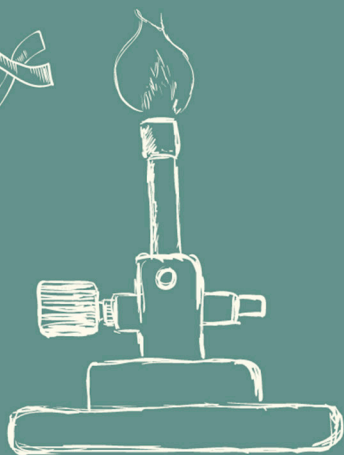
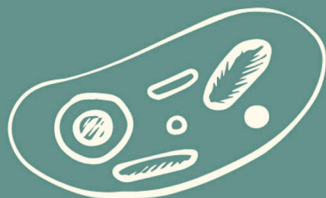
[contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br) 

@atenaeditora 

[www.facebook.com/atenaeditora.com.br](https://www.facebook.com/atenaeditora.com.br) 

# Práticas em Bioquímica Analítica

Atena  
Editora  
Ano 2022



[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br) 

[contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br) 

@atenaeditora 

[www.facebook.com/atenaeditora.com.br](https://www.facebook.com/atenaeditora.com.br) 