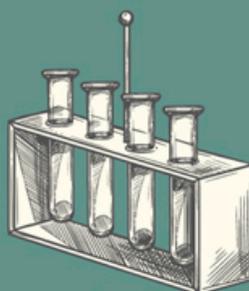
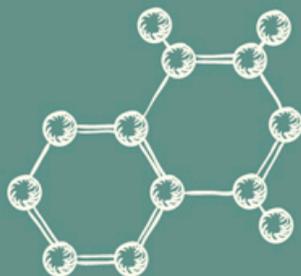
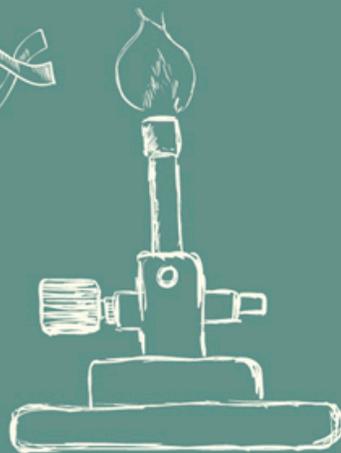


# Práticas em Bioquímica Analítica

Atena  
Editora  
Ano 2022

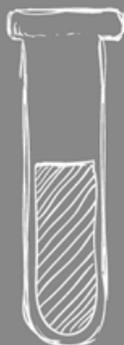
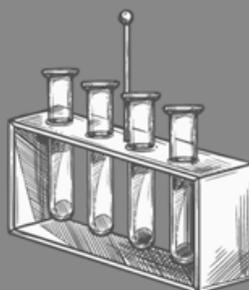
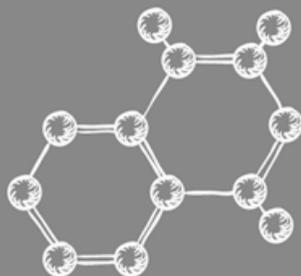
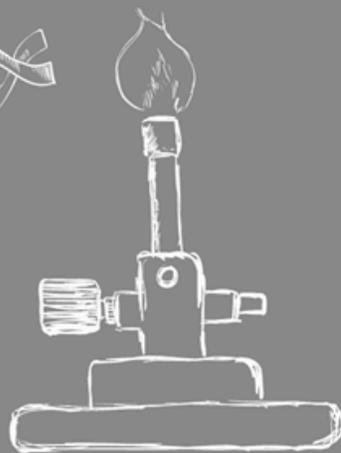


**Paulo Afonso Granjeiro**  
**Adriano Guimarães Parreira**  
**Daniel Bonoto Gonçalves**  
**José Antônio da Silva**

- 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>

# 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).

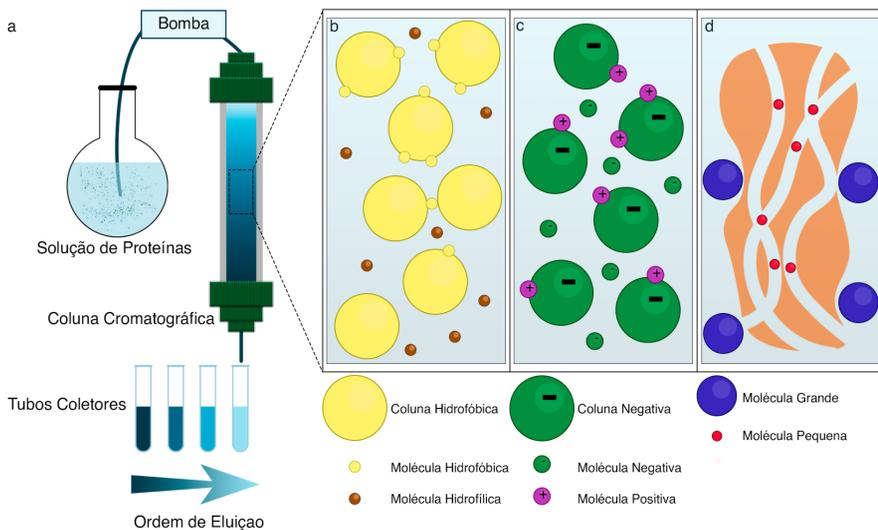


Figura 7. Cromatografia de Gel Filtração.

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 1 M,
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.

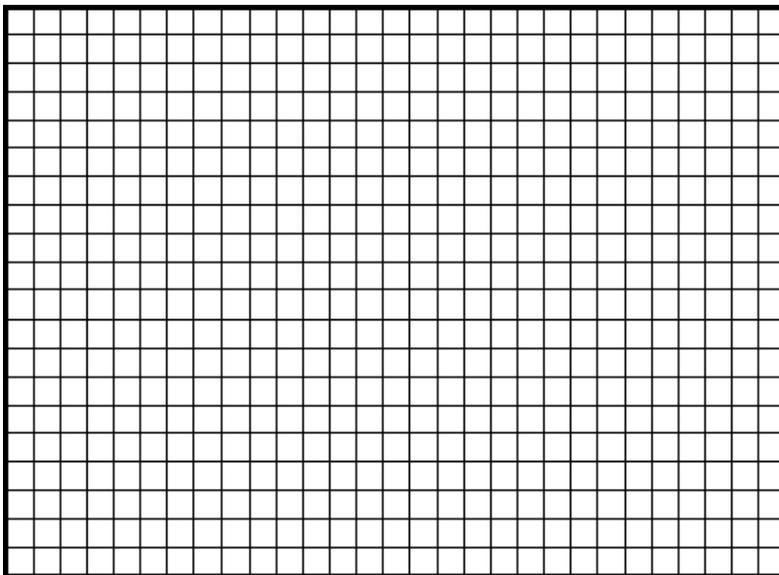
1. Apertar **FLOW** e colocar o valor do fluxo desejado (Ex: 0,5 mL/min);
2. Apertar **CALIBRANTE**, valor referente ao diâmetro da tubulação: 1,6;
3. Apertar as setas que indiquem **SET FLOW - FLOW RET** e novamente colocar o valor do fluxo (mL/min);
4. Apertar **OK**;
5. Apertar a seta referente a **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 RUM**
-  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 SINZE** e aperte **OK**
-  Escolha o volume a ser coletado por tubo. (Ex: 4,0 mL) e clique em **OK**
-  Vá até **START RUM**, 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/](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.

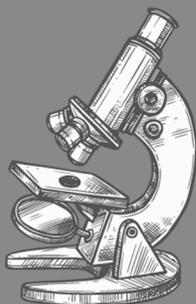
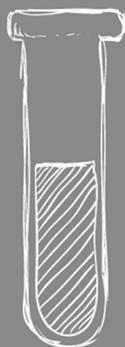
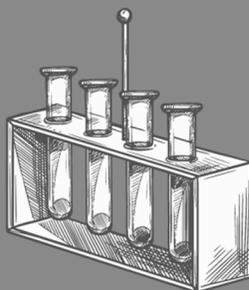
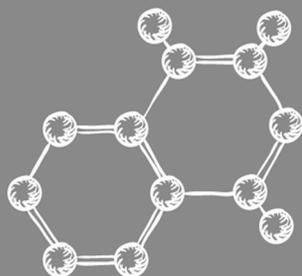
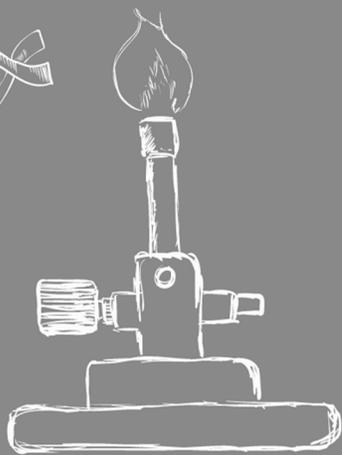
SILVA, J. A; POMPEU, D. G; COSTA, O. F; GONÇALVES, D. B; SPEHAR, C. R; MARANGONI, S; GRANJEIRO, P. A. The importance of heat against antinutritional factors from *Chenopodium quinoa* seeds. *Food Science Technology*, v. 35, n. 1, p. 74-82, 2015a.

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.

# Práticas em Bioquímica Analítica

Atena  
Editora  
Ano 2022



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

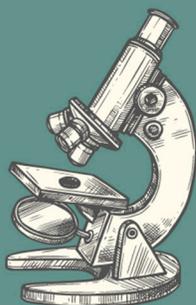
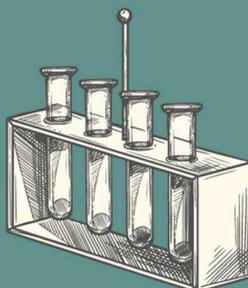
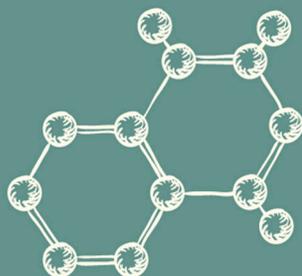
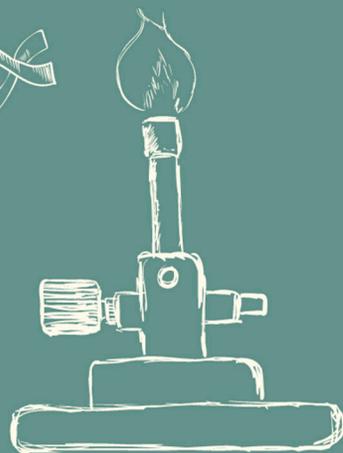
[contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br) 

@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) 