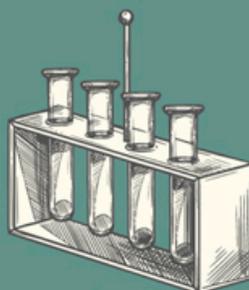
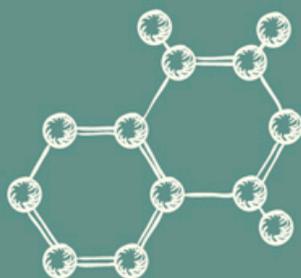
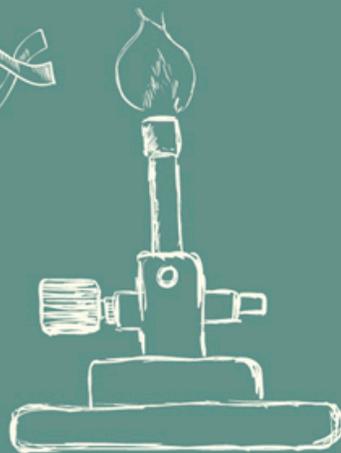


# Práticas em Bioquímica Analítica

Atena  
Editora  
Ano 2022

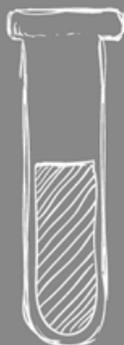
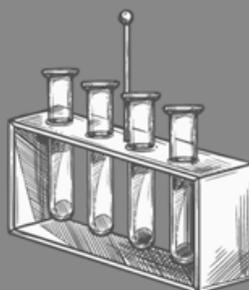
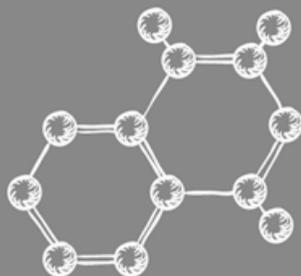
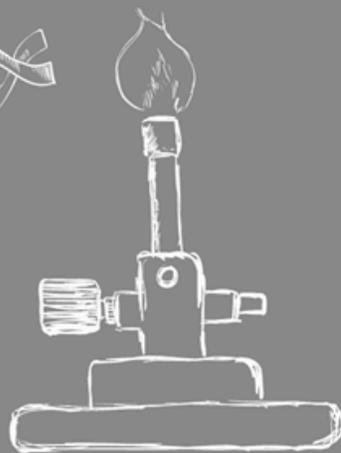


**Paulo Afonso Granjeiro**  
**Adriano Guimarães Parreira**  
**Daniel Bonoto Gonçalves**  
**José Antônio da Silva**

- 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  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> 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  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará  
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> 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  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> 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

**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](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>

**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 <sup>a</sup> ; TLCK <sup>b</sup> ; SBTI <sup>c</sup> ; PMSF.
Cisteíno-proteases	Papaína; Actinidina; Catepsina.	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).

\*\*\* <sup>a</sup>TLCK- N-tosil-lisil clorometil cetona; <sup>b</sup> TPCK, N-tosil-fenilalanil clorometil cetona; <sup>c</sup> 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 catepsinas 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*- $\alpha$ -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.

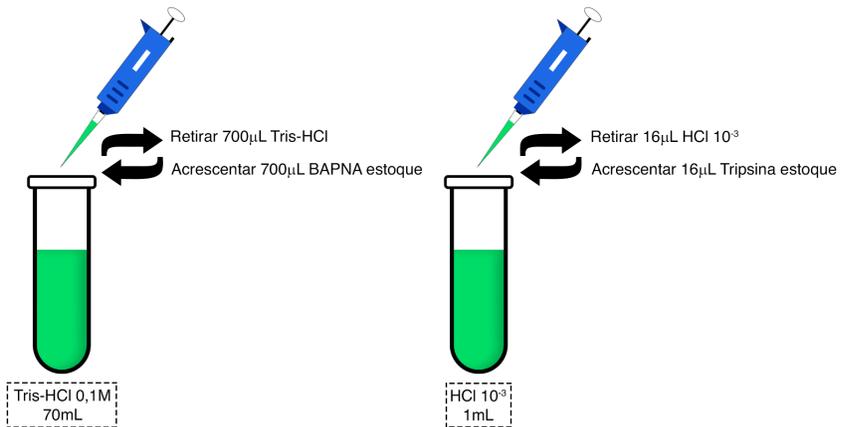


Figura 6 - Esquema geral para diluição do substrato e da enzima estoque.

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 <sub>2</sub> 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<sub>405 nm1</sub> o controle positivo (apenas tripsina), A<sub>405nm2</sub> a amostra e A<sub>405nm0</sub> 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 (µL)	H <sub>2</sub> O (µL)	Enzima (µL)	Inibidor (µL)	BAPNA* (mL)	Ácido Acético 30% (µL)	**Abs <sub>405</sub> nm
<b>100%, 100', 100''</b>	250	200	50	-----	1	500	
<b>B, B', B''</b>	250	250	-----	-----	1	500	
<b>1, 1', 1''</b>	250	180	50	20	1	500	
<b>1B</b>	250	230	-	20	1	500	
<b>2, 2', 2''</b>	250	160	50	40	1	500	
<b>2B</b>	250	210	-	40	1	500	
<b>3, 3', 3''</b>	250	120	50	80	1	500	
<b>3B</b>	250	170	-	80	1	500	
<b>4, 4', 4''</b>	250	80	50	120	1	500	
<b>4B</b>	250	130	-	120	1	500	
<b>5, 5', 5''</b>	250	40	50	160	1	500	
<b>5B</b>	250	90	-	160	1	500	
<b>6, 6', 6''</b>	250	-----	50	200		500	
<b>6B</b>	250	50	-	200	1	500	

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

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<sup>a</sup> 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.

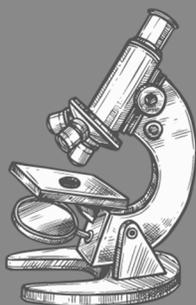
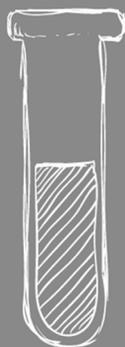
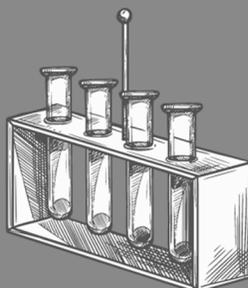
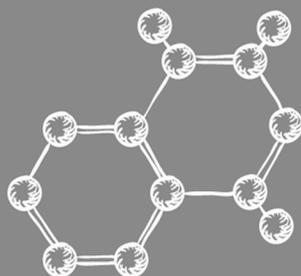
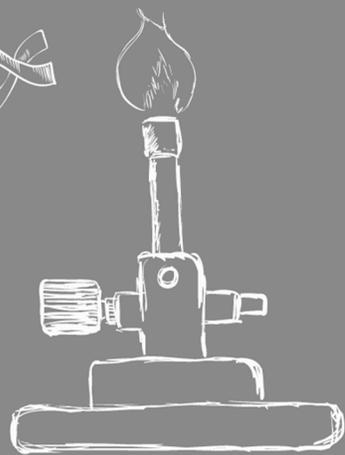
VALDES-RODRIGUEZ, S.; SEGURA-NIETO, M.; CHAGOLLA-LOPEZ, A.; VERVER, Y.; VARGAS-CORTINA, A.; MARTINEZ-GALLARDO, N.; BLANCO-LABRA, A. Purification, characterization, and complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds. Plant Physiology, v.103, n. 4,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

# Práticas em Bioquímica Analítica

Atena  
Editora  
Ano 2022



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

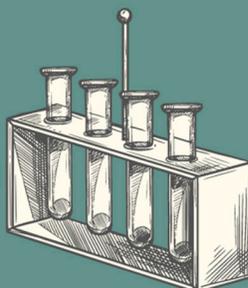
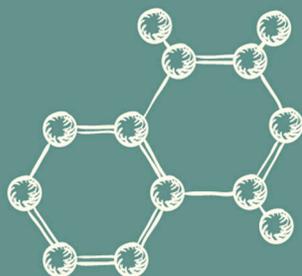
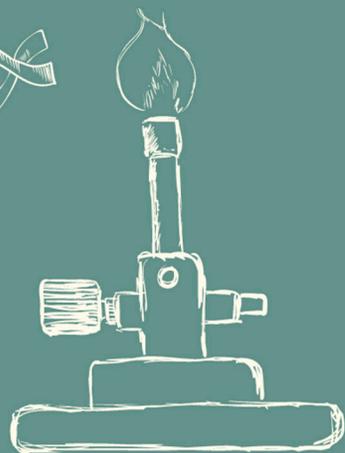
[contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br) 

@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) 