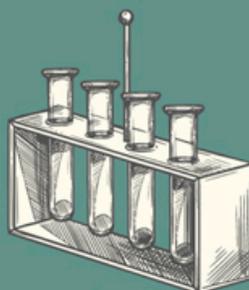
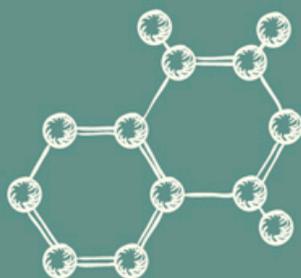
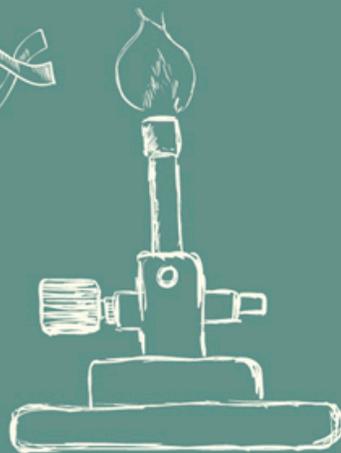


Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022

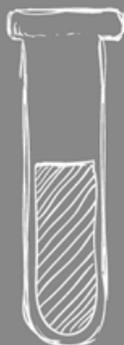
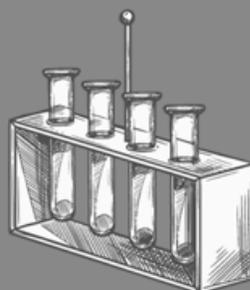
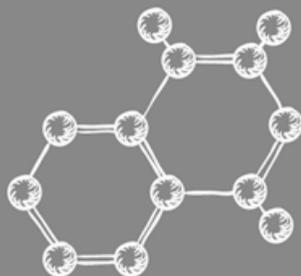
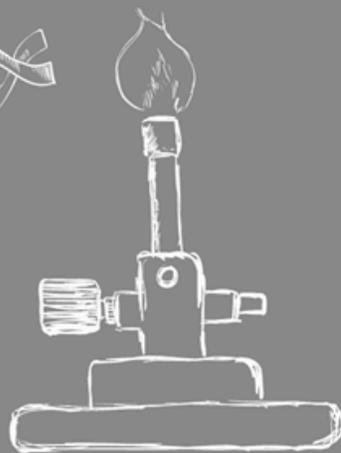


Paulo Afonso Granjeiro
Adriano Guimarães Parreira
Daniel Bonoto Gonçalves
José Antônio da Silva

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

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

José Antonio da Silva

Júlia Antunes Tavares Ribeiro

Thaís Paula Rodrigues Gonçalves

Vinícius Souza Tarabal

**Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves
Gonçalves**

Anderson Fernandes de Melo

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

Funções das Lectinas na Natureza

Interação entre leguminosas e fungos na fixação simbiótica de nitrogênio



Mecanismo de defesa de plantas contra insetos, herbívoros e fitopatógenos

Proteínas de reserva e endereçamentos de proteínas



Regulação hormonal do ácido indolil acético (AIA)

Reconhecimento e resposta celular entre células adjacentes



Esquema 2 – Funções das lectinas na natureza.

Fonte: do próprio autor, 2022.

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

Estímulo mitogênico	<ul style="list-style-type: none"> - Divisão celular e proliferação de linfócitos (T-cells dependente) - Aumento na síntese de DNA e produção de IgG - Germinação de pólen e crescimento do tubo polínico - Proliferação celular de células vegetais/animais em cultura.
Mecanismo de Defesa	<ul style="list-style-type: none"> - Inibição do crescimento de fungos (hifas) - Inibição da germinação de esporos.
Toxicidade	<ul style="list-style-type: none"> - Síntese de proteínas. - Destruição de microvilosidades - Absorção de nutrientes

Quadro 10 - Aspectos Importantes das lectinas.

Fonte: do próprio autor, 2022.

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

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

Lectinas e fatores antinutricionais

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

Cuidados no ensaio de hemaglutinação

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

ATENÇÃO!!

Cuidados para manuseio do sangue:

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

2 . OBJETIVOS

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

3 . MATERIAIS

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

4 . SOLUÇÕES

A. Solução PBS

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

B. Solução de CTBS

- 1,21 g Tris
- 4,23 g NaCl
- 0,367 g de cloreto de cálcio (CaCl_2 5 mM)
- Acertar pH para 7,5 com HCl 50%
- H_2O pqs 500 mL

C. Solução Alsever

- 2,05 g de glicose
- 0,80 g de citrato de sódio
- 0,42 g de cloreto de sódio
- H_2O pqs 100 mL

D. Solução de Tripsina 1%

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

E. Solução Salina 0,15 M

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

5 . PROCEDIMENTOS

A. Lavagem dos Eritrócitos

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

B. Tripsinização dos Eritrócitos

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

C. Ensaio para Determinar a Atividade Hemaglutinante

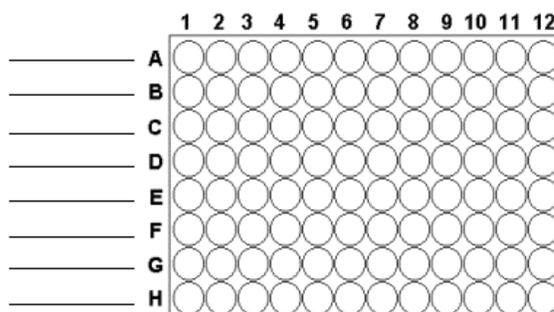
1. Adicionar 50 µL de CTBS nos poços que serão utilizados de uma placa de microtitulação;
2. Adicionar 50 µL da amostra nos primeiros poços da coluna 01;
3. Diluir serialmente a amostra com agitação e transferência de 50 µL para o poço seguinte até a penúltima coluna (11), descartando 50 µL. Considerar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

D. Em relação ao experimento:

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

ANOTAÇÕES:

Tipo Sanguíneo	CMAH (µg/mL)



6 . QUESTÕES

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

7 . CURIOSIDADES

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

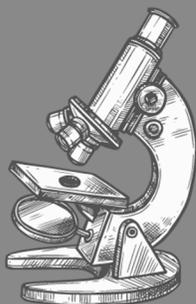
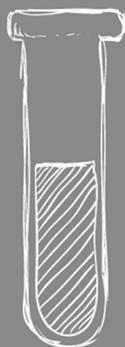
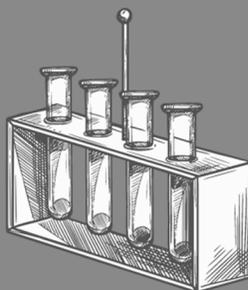
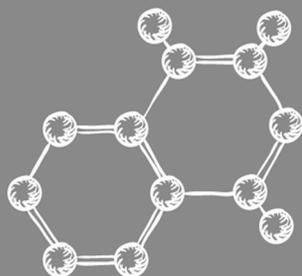
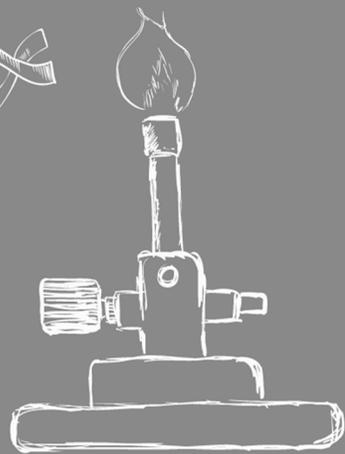
SANO K.; OGAWA H. Hemagglutination (Inhibition) Assay. In: Hirabayashi J. (eds) *Lectins. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, v. 1200. Humana Press, New York, NY. 2014

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

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

Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022



www.atenaeditora.com.br 

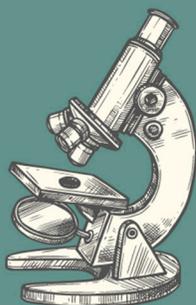
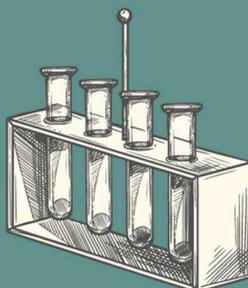
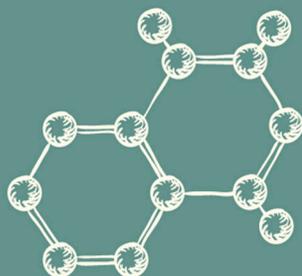
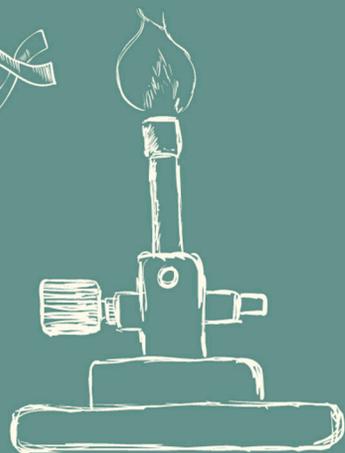
contato@atenaeditora.com.br 

@atenaeditora 

www.facebook.com/atenaeditora.com.br 

Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022



www.atenaeditora.com.br 

contato@atenaeditora.com.br 

@atenaeditora 

www.facebook.com/atenaeditora.com.br 