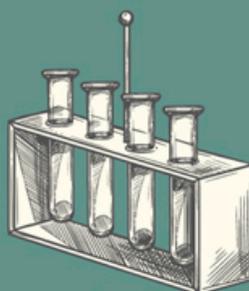
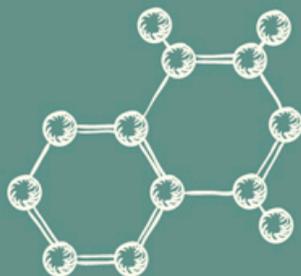
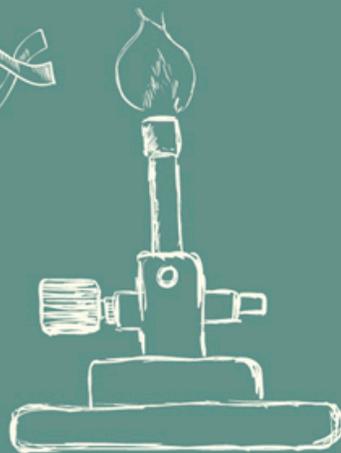


Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022

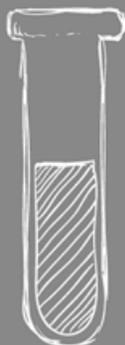
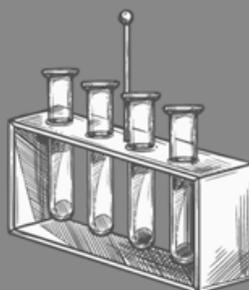
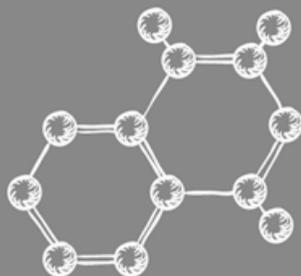
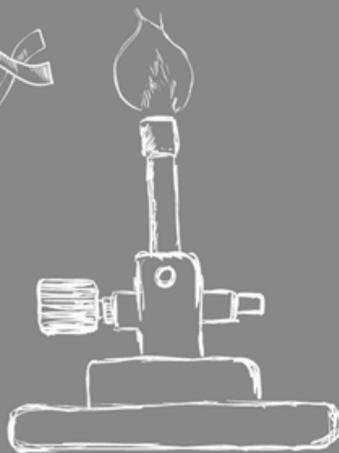


Paulo Afonso Granjeiro
Adriano Guimarães Parreira
Daniel Bonoto Gonçalves
José Antônio da Silva

- 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	<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: https://doi.org/10.22533/at.ed.096221411</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>
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

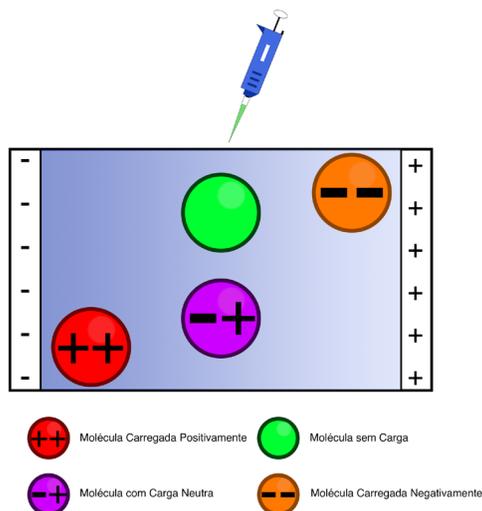
Luísa Ferreira da Cruz

Thaís Paula Rodrigues Gonçalves

Priscila Amaral Diniz

Anna Kelly Moura Silva

Klédna Constância Portes Reis



1. INTRODUÇÃO

Conceitos básicos

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

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

Fonte: do próprio autor, 2022.

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

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

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

Separação por carga

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

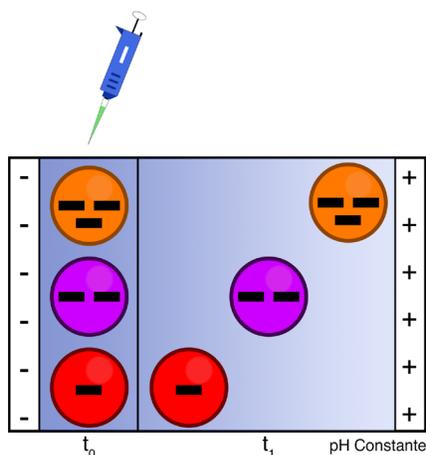


Figura 9 – Eletroforese de proteínas de separação por carga.

Fonte: do próprio autor, 2022.

Separação por pI

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

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

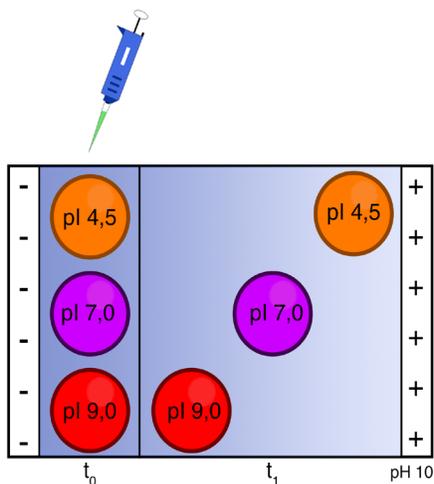


Figura 10 – Eletroforese de proteínas de separação por ponto isoelétrico.

Fonte: do próprio autor, 2022.

Separação por tamanho

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

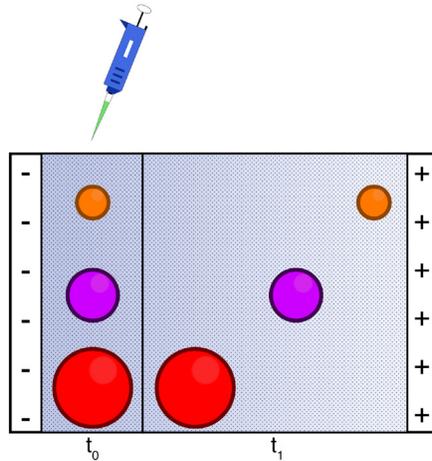


Figura 11 - Eletroforese de proteínas de separação por tamanho.

Fonte: do próprio autor, 2022.

Eletroforese em condições desnaturantes

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

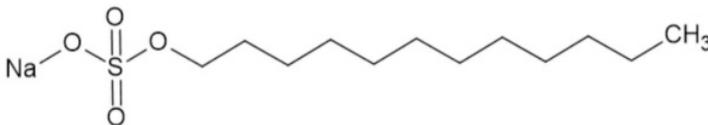


Figura 12 – Estrutura química do dodecil sulfato de sódio (SDS).

Fonte: do próprio autor, 2022.

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

Aplicação do uso de eletroforese

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

Componentes de um sistema de eletroforese

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

2. OBJETIVOS

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

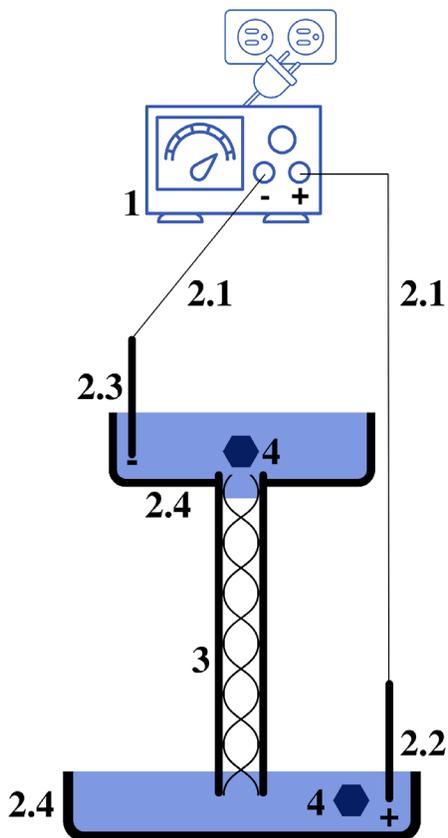


Figura 13 - Esquema geral do sistema de eletroforese. 1. Fonte de energia que fornece voltagem e corrente. 2. Aparelho de eletroforese, constituído por 2.1. Cabos de ligação da fonte ao aparelho de eletroforese, 2.2. Eletrodo positivo (anodo), 2.3. Eletrodo negativo (catodo), 2.4. Reservatório para tampões,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

Fonte: do próprio autor (2022).

3 . MATERIAIS

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

4 . SOLUÇÕES

a. Solução de Bis-Acrilamida

- 30,0g de acrilamida
- 0,8g de bis-acrilamida
- H₂O pqs 100 mL

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

- 60,55g de Tris
- H₂O pqs 500 mL

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

- 60,55g de Tris
- H₂O pqs 500,0 mL

d. Tampão Amostra (*Sample Buffer*)

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

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

- 15,2g de Tris
- 72,2g de glicina
- 5g de SDS
- H₂O pqs 500 mL

f. Corante (Stain)

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

g. Descorante (Destain)

- 500 mL de metanol PA

b. 100 de ácido acético PA

c. H₂O pqs 400 mL

h. PSA 10% (Persulfato de Amônio)

a. 10g PSA-----100 mL H₂O

b. 0,1g PSA -----1 mL H₂O

c. Preparar no dia, e conservar com papel alumínio

i. SDS 20%

a. 20,00 g SDS dodecil sulfato de sódio

b. H₂O pqs 100 mL

5 . PROCEDIMENTOS

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

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

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

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

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

Fonte: do próprio autor, 2022.

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

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

Fonte: do próprio autor, 2022.

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

ANOTAÇÕES

Corrida Nº: _____
 Data : / / _____
PAGE: _____
 Condições:
 Início: V () A ()
 Final: V () A ()

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10

6. QUESTÕES

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

7. CURIOSIDADES

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

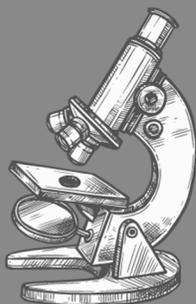
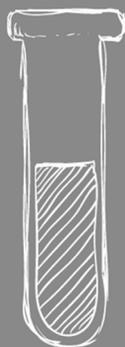
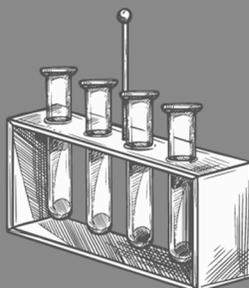
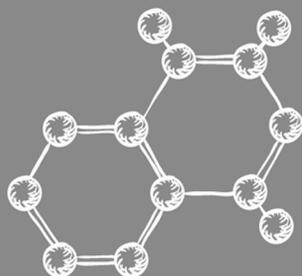
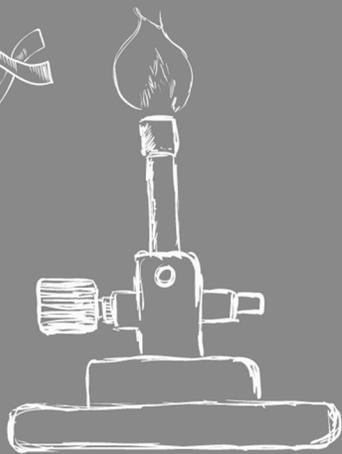
POMPEU, D. G.; CARVALHO, A. S.; COSTA, O. F.; GALDINO, A. S.; GONCALVES, D. B.; SILVA, J. A.; GRANJEIRO, P. A. Fatores antinutricionais e digestibilidade *in vitro* de folhas de *Pereskia aculeata* Miller. *BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports*, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2014.

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

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

Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022



www.atenaeditora.com.br 

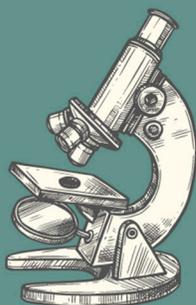
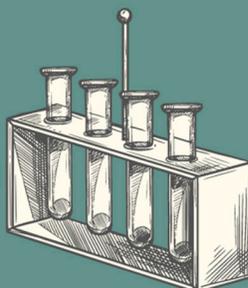
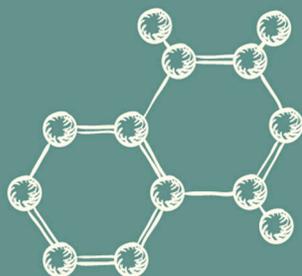
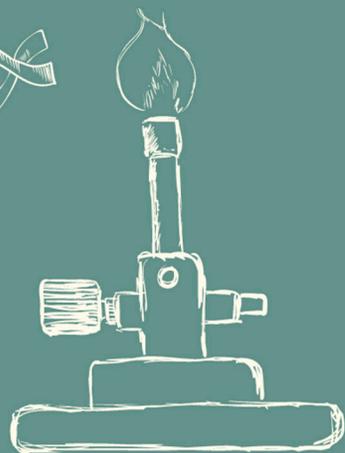
contato@atenaeditora.com.br 

@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 