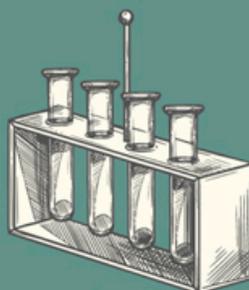
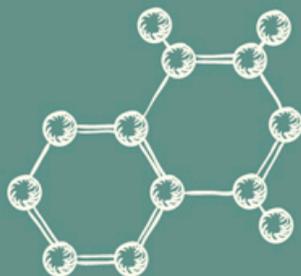
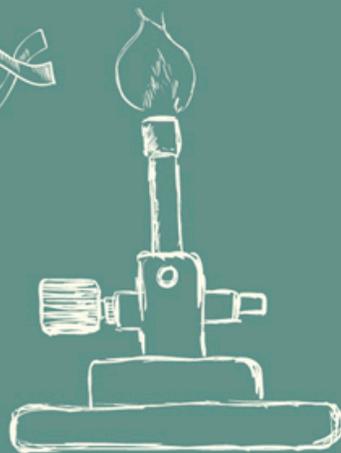


Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022

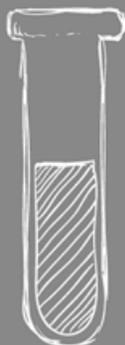
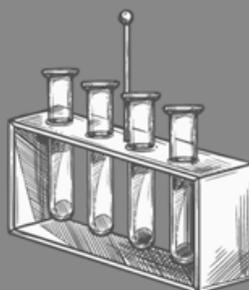
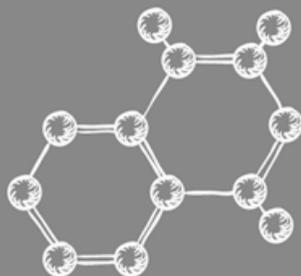
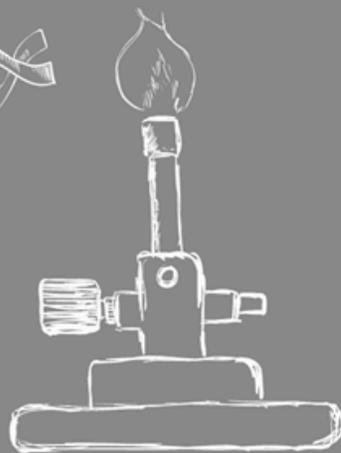


Paulo Afonso Granjeiro
Adriano Guimarães Parreira
Daniel Bonoto Gonçalves
José Antônio da Silva

- organizadores -

Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022



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

- organizadores -

Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Bruno Oliveira

Camila Alves de Cremo

Luiza Alves Batista

Natália Sandrini de Azevedo

Edição de arte da capa

Vinícius Souza Tarabal

2022 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2022 Os autores

Copyright da edição © 2022 Atena

Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano

Profª Drª Amanda Vasconcelos Guimarães – Universidade Federal de Lavras

Profª Drª Andrezza Miguel da Silva – Universidade do Estado de Mato Grosso

Prof. Dr. Arinaldo Pereira da Silva – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Profª Drª Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados

Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia

Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Edevaldo de Castro Monteiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Jael Soares Batista – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Jayme Augusto Peres – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Renato Jaqueto Goes – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Práticas em bioquímica analítica

Diagramação: Camila Alves de Cremo
Correção: Flávia Roberta Barão
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadores: Paulo Afonso Granjeiro
 Adriano Guimarães Parreira
 Daniel Bonoto Gonçalves
 José Antônio da Silva

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

Paulo Afonso Granjeiro

Diego Fernandes Livio

Maria Auxiliadora de Oliveira

Adriano Guimarães Parreira

Vinícius Souza Tarabal

Tuânia Natacha Lopes Silva

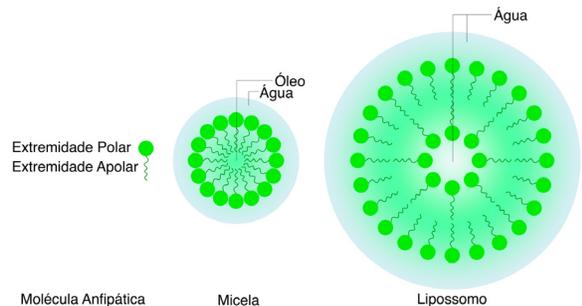


Figura 14 - Esquema da estrutura anfipática dos surfactantes.

Fonte: do próprio autor, 2022.

1. INTRODUÇÃO

De modo geral, os surfactantes são moléculas com estrutura anfipática, apresentando uma porção hidrofóbica (Extremidade apolar) e outra hidrofílica (Extremidade polar) com propriedades tensoativas capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial de líquidos e formar micelas (Fig. 14) (GHOSH; RAY; PRAMANIK, 2020; PIRES et al., 2020).

Estas propriedades físico-químicas tornam os surfactantes adequados para diferentes setores industriais como o de cosméticos e higiene pessoal, produtos de limpeza, agroquímica, petrolíferas, tintas, adesivos, entre outros, agindo como agentes emulsionantes, espumantes, detergentes, lubrificantes e solubilizantes (MOUAFU; MBAWALA; NDJOUENKEU, 2018; TRIPATHI et al., 2019; VARJANI; UPASANI, 2019; ANESTOPOULOS *et al.*, 2020; RODRIGUEZ-LOPEZ *et al.*, 2020; OHADI et al., 2020) (Tabela 4). No entanto, esses compostos comerciais normalmente são de origem quimicamente sintética de fontes petroquímicas e apresentam alta toxicidade e propriedades não biodegradáveis, sendo, portanto, considerados agressivos ao meio ambiente (MARTINS, *et al.*, 2018; MOUAFU; MBAWALA; NDJOUENKEU,

2018; TRIPATHI *et al.*, 2019; JIMOH; LIN, 2019; ADU *et al.*, 2020; ANESTOPOULOS *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020).

A crescente preocupação ambiental entre os consumidores, combinando com novas legislações de controle do meio ambiente levaram à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (BARROS *et al.*, 2007; DRAKONTIS; AMIN, 2020).

Os biossurfactantes, surfactantes naturais, são metabólitos secundários de microrganismos que atuam na modulação de seu crescimento, tais como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (LIMA *et al.* 2018; MAHANTI; KUMAR; PATRA, 2018). Possuem propriedades tensoativas, emulsificantes e até antimicrobianas, que auxiliam no desenvolvimento do microrganismo produtor e no trânsito de compostos hidrofóbicos insolúveis em água (NITSCHKE *et al.*, 2002; BUENO, 2008; TWIGG *et al.*, 2021).

Os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, pois são facilmente degradados por microrganismos, são ecologicamente corretos, sendo biodegradáveis e de baixa toxicidade, podem ser produzidos com substratos de baixo custo, são moléculas estáveis frente à variação de pH, temperatura e força iônica, apresentam baixa CMC, sendo um poderoso agente tensoativo, maior habilidade para complexar metais pesados, melhor capacidade espumante, além da aplicação terapêutica (MAKKAR, 2003; NITSCHKE, 2004; TABATABAEE, 2005; SEKHON, 2012 KUMAR; NGUEAGNI, 2021).

As vantagens dos biossurfactantes em relação aos surfactantes sintéticos mostram que estes podem ser facilmente substituídos em diversos setores industriais (JAHAN *et al.*, 2020; PŁAZA; ACHAL, 2020). O tamanho do mercado de biossurfactantes foi avaliado em US\$ 3,99 bilhões em 2016 e está projetado para atingir US\$ 5,52 bilhões até 2022, com um CAGR de 5,6% durante o período de previsão. A Europa ainda é o principal mercado consumidor de biossurfactantes, representando mais de 50% do consumo global (MARKETSANDMARKETS, 2021).

Porém, apesar de promissores, a produção dos biossurfactantes não pode ser comparada aos surfactantes sintéticos no sentido econômico, pois o custo de obtenção desses tensoativos naturais é elevado (RANE *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2020). Substratos utilizados nos meios de cultura para a produção são de alto custo, além do processo de purificação, gerando baixo rendimento. Portanto, a aplicação dos biossurfactantes em larga escala depende de processos produtivos economicamente viáveis (GUDIÑA *et al.*, 2015).

A quantidade e qualidade dos biossurfactantes produzidos pelas diversas espécies de microrganismos são influenciadas pelo próprio microrganismo utilizado, pelas fontes de carbono, concentrações de nitrogênio, fósforo, manganês e ferro no meio, as possíveis limitações nutricionais envolvidas no crescimento microbiano, além de fatores abióticos, como pH, temperatura, agitação e aeração (MUKHERJEE *et al.*, 2006; AMÉZCUA-VEGA

et al., 2007; CAPPELLETTI; ZANNONI, 2020). Nitschke e Pastore (2002) demonstraram as principais funções e aplicações dos biossurfactantes, conforme a tabela 3.

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano Desemulsificantes	Tratamento de resíduos oleosos Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

Tabela 3 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes.

Fonte: Nitschke & Pastore (2002).

2 . OBJETIVOS

- a) Preparar os meios de crescimento microbiano e para a produção de biossurfactante;
- b) Realizar o pré-inóculo e inóculo bacteriano e cultivar o microrganismo nos meios de cultura com o intuito de produzir o biossurfactante;
- c) Extrair e purificar o biossurfactante através de precipitação ácida e extração orgânica.

3 . MATERIAIS

- a. Erlenmeyers;
- b. Estufa bacteriológica;
- c. Autoclave;
- d. Shaker;
- e. Capela de fluxo laminar;

- f. Centrífuga;
- g. Rota-evaporador;
- h. Liofilizador;
- i. Funil de separação;
- j. pHmetro;
- k. Espectrofotômetro;
- l. Microtubos;
- m. Tubo de centrífuga;
- n. Balão de fundo redondo;
- o. Balança semianalítica e analítica
- p. Alça descartável;
- q. Agitador magnético.

4 . SOLUÇÕES

- a. Solução HCl 6M;
- b. Meio de cultura caldo nutriente;
- c. Meio de cultura para produção do biossurfactante;
- d. Solvente orgânico (Diclorometano);
- e. Água deionizada estéril.

5 . PROCEDIMENTOS

Parte I: Produção do biossurfactante

A. Preparação dos meios de cultivo

A1. Caldo nutriente - Crescimento do pré-inóculo

O meio de cultivo caldo nutriente deverá ser preparado com os ingredientes mencionados na tabela 4.

Componentes	Concentração (g/L)
Extrato de Bife	1,0
Extrato de Levedura	2,0
Peptona	5,0
Cloreto de Sódio	5,0

Tabela 4 - Composição do Meio Caldo Nutriente.

Fonte. Meio comercial.

1. Pesar todos os constituintes com o auxílio de uma balança semianalítica, de acordo com a concentração descrita na tabela 5;
2. Adicionar todos os constituintes pesados em um Erlenmeyer conjuntamente e acrescentar a água deionizada de acordo com a concentração desejada;
3. Homogeneizar o Erlenmeyer com o auxílio de um agitador magnético;
4. Vedar o Erlenmeyer com papel alumínio e kraft, com o auxílio de gomas elásticas;
5. Autoclavar a 121°C por 20 minutos;
6. Armazenar a 4°C ou, caso deseje utilizar o meio produzido, deixá-lo a temperatura similar à de cultivo antes da inoculação.

A2. Meio de cultivo - Crescimento do microrganismo

O meio de cultivo para produção do biossurfactante deverá ser preparado com os ingredientes apresentados na tabela 5.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	70
KH_2PO_4	0,33
Na_2HPO_4	1
NaNO_3	1
Extrato de Levedura	1
Micronutrientes	(Adicionar 1 mL/L)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,01
CaCl_2	0,01

Tabela 5 - Composição do meio para produção do biossurfactante.

Fonte: Adaptado de Wang e colaboradores (2014).

1. Pesar todos os constituintes com o auxílio de uma balança semianalítica, de acordo com a concentração descrita na tabela 3;
2. Adicionar os constituintes pesados em 3 Erlenmeyers separadamente: 1) Glicose. 2) KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaNO_3 . 3) Micronutrientes. Obs: O volume dos Erlenmeyers deve proporcionar 50% de volume livre - coluna de ar.
3. Acrescentar a água deionizada de acordo com a concentração desejada;
4. Homogeneizar os Erlenmeyers com o auxílio de um agitador magnético;
5. Vedar os Erlenmeyers com papel alumínio e kraft, com o auxílio de gomas elásticas;
6. Autoclavar a 121°C por 20 minutos;
7. Após autoclavar, armazenar a 4°C ou, caso deseje utilizar o meio de cultivo, deve-se deixar os constituintes a temperatura similar à de cultivo e misturá-los, na capela de fluxo laminar, em um único Erlenmeyer, sendo que a solução de micronutrientes deve ser adicionada apenas na concentração de 1 mL/L de solução final.

B. Realização do Pré-inóculo

Para a realização do pré-inóculo foi utilizada uma cepa bacteriológica previamente estocada em uma placa de ágar-nutriente devidamente vedada e armazenada à temperatura de 4°C .

Etapas do preparo do Pré-Inóculo na capela de fluxo laminar:

1. Realizar a paramentação com jaleco de mangas compridas e luvas.
2. Limpar toda a superfície da capela com álcool 70%;
3. Ligar a luz UV durante 15 min para esterilização;
4. Desligar UV;
5. Passar álcool nas mãos;
6. Pegar a placa com uma mão e abri-la usando os dedos indicador e polegar;
7. Raspar a alça nas colônias (uma alçada – uma porção de biomassa celular);
8. Tampar a placa e colocá-la na base da capela;
9. Pegar o frasco contendo o meio de cultivo com a mão livre e posicioná-lo próximo da chama;
10. Destampar o frasco com a mão livre;
11. Flambar o frasco;
12. Mergulhar a alça no frasco e dispensar o microrganismo no meio líquido;
13. Flambar o frasco e vedar com papel alumínio e kraft, com o auxílio de gomas elásticas.;

14. Limpar toda superfície com álcool 70%;
15. Ligar a luz UV durante 15 min para esterilização;
16. Desligar a luz UV e a capela;
17. Colocar o frasco no shaker a 200 rpm por 12h a temperatura de 37 °C.

C. Realização do inóculo - Adaptado de Carvalho (2016)

1. Realizar a paramentação com jaleco de mangas compridas e luvas.
2. Limpar toda a superfície da capela com álcool 70%;
3. Ligar a luz UV durante 15 min para esterilização;
4. Desligar UV;
5. Passar álcool nas mãos;
6. Dentro da estufa bacteriológica, verter as culturas do pré-inóculo em tubos estéreis e vedá-los;
7. Centrifugar a uma rotação de 3500 rpm por 30 min;
8. Dentro da estufa bacteriológica, ressuspender o precipitado em solução salina estéril (0,85%) com um volume mínimo necessário. Repetir o procedimento por 2 vezes;
9. Após as lavagens, ressuspender em solução salina estéril (0,85%);
10. Realizar a diluição seriada de 10, 100 e 100 vezes em alíquotas de 1 mL para se obter o fator de diluição;
11. Calcular o volume necessário de inóculo para se obter 1×10^6 UFC/mL seguindo a fórmula apresentada a seguir:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

No qual, C1: Absorbância lida no espectrofotômetro (600 nm) x fator de diluição

V1: Volume desejado

C2: 0,1 (padronizado para se ter 1×10^6 UFC/mL)

V2: volume final do frasco de cultivo

Ex.: Para diluir 10 vezes deve se adicionar 100 µL de amostra + 900 µL de solução salina.

12. Dentro da capela de fluxo laminar, abrir os frascos de cultivo e inocular o volume de inóculo encontrado, com o auxílio de uma pipeta;
13. Vedar devidamente os frascos;
14. Colocar o frasco no shaker a 180 rpm por 80h a temperatura de 35 °C;
15. Desligar a chama;
16. Limpar toda superfície com álcool 70%;
17. Ligar a luz UV durante 15 min para esterilização;
- 18.. Desligar a luz UV e a capela.

PARTE II: Extração do biossurfactante

A. Precipitação ácida - Adaptado de Carvalho (2016)

1. Centrifugar as células cultivadas a uma rotação de 3500 rpm por 30 min.
2. Ressuspender o precipitado em água deionizada com um volume mínimo necessário. Repetir o procedimento por 2 vezes.
3. Após as lavagens, ressuspender em água deionizada com um volume mínimo necessário.
4. Adicionar ácido clorídrico (6M) até ajustar o pH final para 2,0.
5. Manter em refrigeração a 4°C *overnight* (16 horas).
6. Centrifugar por 15 min a uma rotação de 5000 rpm.
7. Ressuspender o precipitado em água deionizada com um volume mínimo necessário. Repetir o procedimento por 2 vezes para retirada do excesso de ácido clorídrico (HCl).
8. Adicionar NaOH (6M) até ajustar o pH final para 7.

B. Extração Orgânica - Adaptado de Carvalho (2016)

1. Em uma capela de exaustão, adicionar a solução contendo o biossurfactante em um funil de separação e acrescentar diclorometano na proporção de (1:1 v/v). Obs.: Podem ser utilizados outros solventes orgânicos como o clorofórmio, por exemplo;
2. Tampar o funil e agitá-lo lentamente por inversão;
3. Esperar a formação de 2 fases;
4. Abrir a válvula do funil e retirar a fase orgânica (interagida com o solvente);
5. Repetir os procedimentos 2, 3 e 4, mais três vezes;
6. Evaporar a fração orgânica através do rota-evaporador a vácuo a uma temperatura de 50-60°C;

7. Liofilizar o precipitado contendo o biossurfactante.

6 . QUESTÕES

1. Qual a importância de realizar o pré-inóculo?
2. Qual a importância de se realizar o processo de lavagem das células do pré-inóculo?
3. Qual a importância de se trabalhar em um ambiente estéril?
4. Qual a importância das etapas de purificação e quais principais propriedades devem ser levadas em consideração para obtenção de uma biomolécula?
5. Qual a importância dos micronutrientes na produção de biossurfactantes?

7 . CURIOSIDADES

Biossurfactantes: uma possível solução ambiental.

As práticas cotidianas de higiene e limpeza promovem o descarte de detergentes e sabões para nos esgotos sanitários que, geralmente, não são tratados, e acabam poluindo os rios, gerando desastres ambientais. Os principais responsáveis pela formação dessa espuma tóxica são os tensoativos sintéticos, como o lauril sulfato de sódio, um agente surfactante amplamente utilizado pela indústria de higiene e limpeza e de fabricação de produtos cosméticos. No fim de 2020, pescadores que vivem às margens do rio Guandu no Rio de Janeiro relataram a formação de espuma no rio e a mortalidade de peixes, fato também relatado pela estação de tratamento de água da região, ETA Guandu, que paralisou a produção de água tratada, afetando o abastecimento de 9 milhões de habitantes (REGUEIRA, 2020).

De modo a solucionar este problema, medidas emergenciais estão sendo tomadas para limpar os rios e tentar conter os efeitos deste tipo de poluição que já se mostra como o maior problema ambiental do Estado do Rio de Janeiro.

Neste contexto, os biossurfactantes, frutos da “tecnologia verde”, podem ser a solução alternativa para este problema por serem atóxicos e biodegradáveis, além de possuírem uma diversidade estrutural vasta que implica em uma grande variedade de propriedades biológicas e físico-químicas atribuindo a eles características equivalentes ou até superiores aos seus equivalentes sintéticos (DRAKONTIS; AMIN, 2020). Tal tendência é corroborada pelo fato de serem economicamente os compostos biotecnológicos de maior interesse no século XXI, relativamente considerados cruciais para melhoria, crescimento, avanço e sustentabilidade ambiental na área (JIMOH; LIN, 2019; SINGH; PATIL; RALE, 2019).

REFERÊNCIAS

- ADU, S. A.; NAUGHTON, P. J.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial Biosurfactants in Cosmetic and Personal Skincare Pharmaceutical Formulations. *Pharmaceutics*, v.12, n. 11, p.1099, 2020
- AMÉZCUA-VEGA, C.; POGGI-VARALDO, H. M.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RÍOS-LEAL, E.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. *Bioresour Technol*, v. 98, n.1, p. 237-40, 2007.
- ANESTOPOULOS, I.; KIOUSI, D. E.; KLAVARIS, A.; MAIJO, M.; SERPICO, A.; SUAREZ, A.; SANCHEZ, G.; SALEK, K.; CHASAPI, S. A.; ZOMPRA, A. A.; GALANIS, A.; SPYROULIAS, G. A.; GOMBAU, L.; EUSTON, S.R.; PAPPA, A.; PANAYIOTIDIS, M. I. Marine-Derived surface active agents: health-promoting properties and blue biotechnology-based applications. *Biomolecules*, v.10, n. 6, p.885 - 912, 2020
- BARROS, F.F.C.; QUADROS, C. P.; JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, v.30, n. 2, p. 409–414, 2007. biosurfactants-market-report. Acesso em 19 de janeiro de 2021.
- BUENO, S. M. Bactérias produtoras de biosurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual Paulista. São Paulo. 2008.
- CAPPELLETTI, M.; ZANNONI, D. Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds. 2020.
- CARVALHO, F. S. Produção e efeito da surfactina sobre os biomateriais de látex silicizado e titânio. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de São Del-Rei. Divinópolis. 2016.
- DRAKONTIS, C. E.; AMIN, S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 48, p. 77–90, 2020.
- GHOSH, S.; RAY, A.; PRAMANIK, N. Self-assembly of surfactants: An overview on general aspects of amphiphiles. *Biophysical Chemistry*, v. 265, p. 106429, 2020.
- GUDIÑA, E. J.; FERNANDES, E.C.; RODRIGUES, A. I.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES L. R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Frontiers Microbiology*, v. 6, n.59, p.1-7, 2015.
- JAHAN, R.; BODRATTI, A. M.; TSIANOU, M.; ALEXANDRIDIS, P. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 275, n. 102061, 2020.
- JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 184, 2019.
- KUMAR, P. S.; NGUEAGNI, P. T. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process. *Journal of Hazardous Materials*, v. 407, p. 124827, 2021.

LIMA, W.; PARREIRA, A. G.; NASCIMENTO, L. A.; LEONEL, C. A.; ANDRADE, J. T.; PALUMBO, J. M.; SOARES, A. C.; GRANJEIRO, P.; FERREIRA, J. M. Absence of antibacterial, anti-candida, and anti-dengue activities of a surfactin isolated from *Bacillus subtilis*. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, v. 9, n. 1, p. 27-32, 2018.

LIU, K.; SUN, T.; CAO, M.; WANG, J.; LU, J. R.; XU, H. Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 45, p. 57–67, 2020.

MAHANTI, P.; KUMAR, S.; PATRA, J. K. Biosurfactants: An agent to keep environment clean. *Microbial Biotechnology*, v. 1, p. 413–428, 2018.

MAKKAR, R.S.; ROCKNE, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 22, n. 10, p. 2280–2292. 2003.

MARKETASNDMARKETS. Disponível em <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactant-market-163644922.html>. Acesso em 21 de jan. de 2021.

MARTINS, P. C.; BASTOS, C. G.; GRANJEIRO, P. A.; MARTINS, V. G. New lipopeptide produced by *Corynebacterium aquaticum* from a low-cost substrate. *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 41, n. 8, p. 1177-1183, 2018.

MOUAFO, T. H.; MBAWALA, A.; NDJOUENKEU, R. Effect of different carbon sources on biosurfactants production by three strains of *Lactobacillus* spp. *BioMed Research International*, v. 2018, n. 5034783, 2018.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnology*, v. 24, p. 509-515, 2006.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, n. 1-2, pp. 81-85, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

OHADI, M.; SHAHRAVAN, A.; DEGHANNOUDEH, N.; ESLAMINEJAD, T.; BANAT, I.; DEGHANNOUDEH, G. Potential use of microbial surfactant in microemulsion drug delivery system: a systematic review. *Drug Design, Development and Therapy*, v.14, p. 541–550, 2020.

PIRES, M. E. E. et al. Recent Patents on Impact of Lipopeptide on the biofilm formation onto titanium and stainless steel surfaces. *Recent patents on biotechnology*, v. 14, n. 1, p. 49-62, 2020.

PŁAZA, G.; ACHAL, V. Biosurfactants: eco-friendly and innovative biocides against biocorrosion. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 21, p. 1-11, 2020.

RANE, A. N. et al. Agro-industrial wastes for production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* ANR 88 and its application in synthesis of silver and gold nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1–12, 2017.

REGUEIRA, C. G1 Rio de Janeiro. Disponível em <https://g1.globo.com/rj/rio-de-janeiro/noticia/2020/09/19/espuma-branca-surge-no-rio-guandu-e-preocupa-pescadores-em-nova-iguacu.gh.html>. Acesso em 21 de janeiro de 2021.

RODRÍGUEZ-LOPEZ, L.; LÓPEZ-PRIETO, A.; LÓPEZ-ÁLVAREZ, M.; PEÑEZ-DAVILA, S.; SERRA, J.; GONZÁLEZ, P.; CRUZ, J.; MOLDES, A. Characterization and cytotoxic effect of biosurfactants obtained from different sources. *ACS Omega*, v.,5, n. 48, p. 31381–31390, 2020.

SEKHON, K.K.; KHANNA, S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production and potential correlation with esterase activity. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, v. 3, n. 7, p. 1-10, 2012.

SHI, J. et al. Improving iturin A production of *Bacillus amyloliquefaciens* by genome shuffling and its inhibition against *Saccharomyces cerevisiae* in orange juice. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 2018.

SINGH, P.; PATIL, Y.; RALE, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*, v. 126, n. 1, p. 2–13, 2019.

TABATABAEE, A.; MAHNAZ, A. M. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering* 2, n. 1, p. 6–12, 2005.

TRIPATHI, L.; TWIGG, M.; ZOMPRA, A.; SAŁEK, K.; IRORERE, V.; GUTIERREZ, T.; SPYROULIAS, G. A. MARCHANT, R. BANAT, I. Biosynthesis of rhamnolipid by a *Marinobacter* species expands the paradigm of biosurfactant synthesis to a new genus of the marine microflora. *Microbial Cell Factories*, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2019.

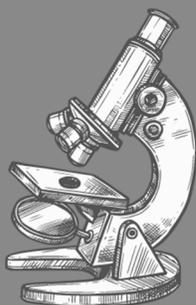
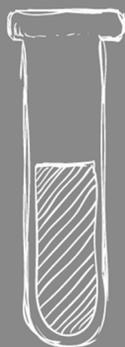
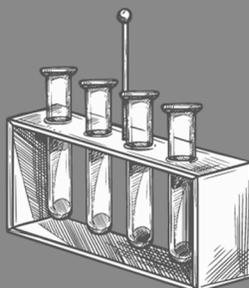
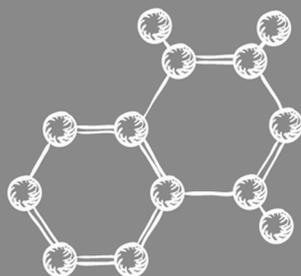
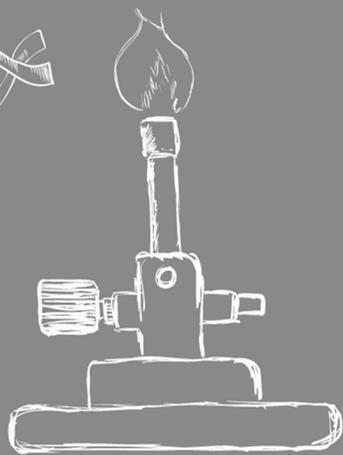
TWIGG, M.; BACCILE, N.; BANAT, I.; DÉZIEL, E.; MARCHANT, R.; ROELANTS, S.; BOGAERT, I. Microbial biosurfactant research: time to improve the rigour in the reporting of synthesis, functional characterization and process development. *Microbial Biotechnology*. v.14, n. 1, p. 147–170, 2021.

VARJANI, S.; UPASANI, V. N. Evaluation of rhamnolipid production by a halotolerant novel strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource Technology*, v. 288, n. 121577, 2019.

WANG, C.; CAO, Y.; WANG, Y.; SUN, L.; SONG, H. Enhancing surfactin production by using systematic CRISPRi repression to screen amino acid biosynthesis genes in *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, v.18, n. 1, p. 1–13. 2019.

Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022



www.atenaeditora.com.br 

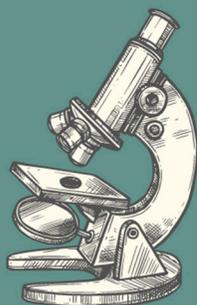
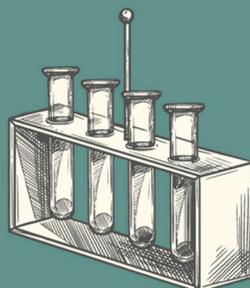
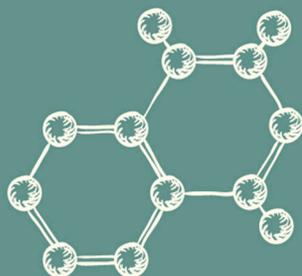
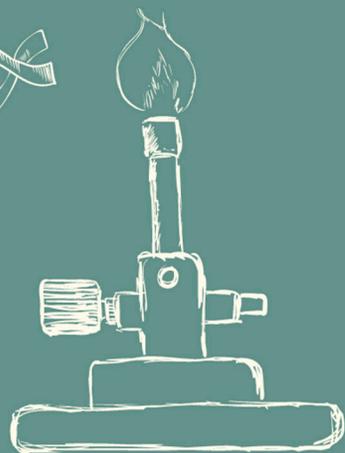
contato@atenaeditora.com.br 

@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 