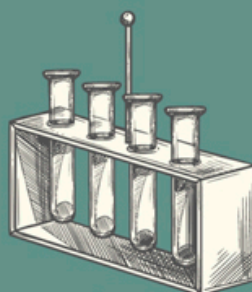
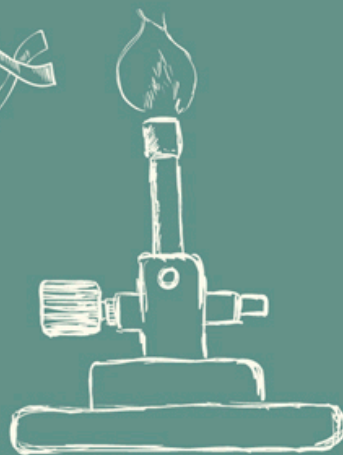


Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022

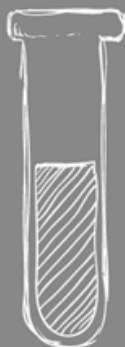
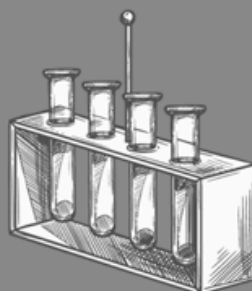
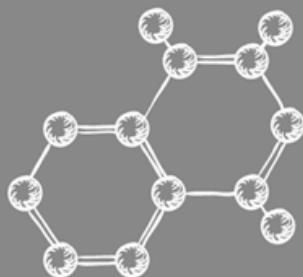


Paulo Afonso Granjeiro
Adriano Guimarães Parreira
Daniel Bonoto Gonçalves
José Antônio da Silva

- 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-Não-Derivativos 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

CAPÍTULO 12

CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDIOS

Paulo Afonso Granjeiro

Diego Fernandes Livio

Maria Auxiliadora de Oliveira

Adriano Guimarães Parreira

Vinícius Souza Tarabal

Tuânia Natacha Lopes Silva

1. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são metabólitos secundários encontrados na natureza na forma de moléculas complexas como: glicolípídeos, fosfolípídeos e lipopeptídeos, complexos de proteínas, polissacarídeos e ácidos graxos (Figura 15) (MARTINS, *et al.*, 2018; SAJID *et al.*, 2020; FARIQ, A.; YASMI, 2020; JAHAN *et al.*, 2020; KUMAR; NGUEAGNI, 2021; TWIGG *et al.*, 2021). Estas biomoléculas podem apresentar diferentes funções no desenvolvimento celular, inclusive atividade antimicrobiana (LIMA *et al.*, 2018). O tipo de biossurfactante gerado depende de cada cepa e de uma série de condições de crescimento celular, altamente influenciadas pelos constituintes do meio de cultivo, pH, temperatura, agitação e aeração (FADHILE ALMANSOORY *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2020) (Tabela 6).

As forças de interação entre as moléculas de mesmo estado físico são denominadas de interfaciais, e de diferentes estados físico de superficiais (SONI, 2019). Na interface líquido/ar as moléculas de superfície não estão completamente envolvidas por outras moléculas vizinhas, então elas são mais coesas com aquelas encontradas na interface entre o líquido e o ar, de modo que cada molécula de superfície é atraída pelas moléculas internas em direção ao centro do líquido. Portanto, a superfície externa do líquido permanece sob tensão, comportando-se como uma película fina elástica (Figura 16a). A tensão superficial depende de diversas variáveis, incluindo a composição do líquido, a temperatura e o ambiente circundante. Por exemplo, a tensão superficial geralmente diminui com o aumento da temperatura. O termo tensão superficial é geralmente aplicado quando há uma única superfície de líquido, por exemplo, na interface líquido-ar ou líquido-sólido. No caso de dois líquidos imiscíveis onde existe uma interface entre os dois líquidos, este efeito é frequentemente denominado tensão interfacial (SONI, 2019) (Fig. 16b).

TIPO DE BIOSURFACTANTE	MICROORGANISMOS
Glicolipídeos - ramnolipídeos - soforolipídeos - trehalolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas - peptídeo-lipídeo - viscosina - serrawetina - surfactina - subtilisina - gramicidina - polimixina	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos - ácidos graxos - lipídeos neutros - fosfolipídeos	<i>Corynebacterium lepus</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos - emulsan - biodispersan - liposan - carboidrato-lipídeo-proteína - manana-lipídeo-proteína	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados - vesículas - células	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Várias bactérias

Tabela 6 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.

Fonte: NITSCHKE, 2002.

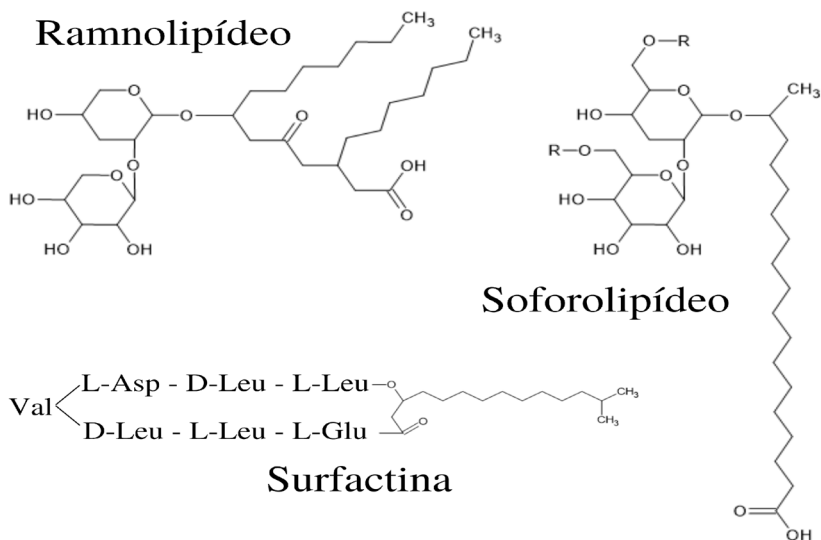


Figura 15 - Estruturas químicas de alguns biossurfactantes.

Fonte: do próprio autor, 2022.

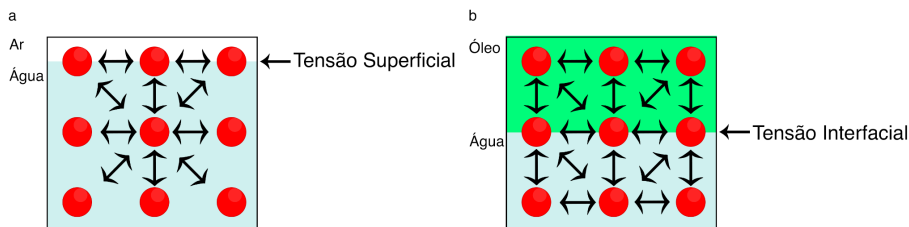


Figura 16 - Esquema das forças coesivas entre as moléculas, caracterizando a tensão superficial (A) e a tensão interfacial (B).

Fonte: do próprio autor, 2022.

A capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial é uma função chave das moléculas anfifílicas (MARTINS *et al.*, 2018). Este é um requisito para a formação de emulsões cineticamente estabilizadas, por exemplo. Moléculas anfifílicas, incluindo biossurfactantes, adsorvem em interfaces (ar / líquido, líquido / líquido, sólido / líquido) devido à sua natureza hidrofóbica-hidrofílica dupla. Como as moléculas de surfactante substituem as moléculas de água ou óleo ao longo da interface, elas reduzem efetivamente as forças intermoleculares entre as moléculas de solvente, reduzindo assim a tensão superficial ou interfacial (JAHAN *et al.*, 2020). Um bom surfactante permite baixar a tensão superficial da água de 72 para 35 mN/m e a tensão interfacial entre a água e n-hexadecano de 40 para 1 mN/m (PACHECO, 2008).

A tensão superficial é, portanto, a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos. Com o aumento da concentração de surfactantes no meio, a tensão superficial diminui até atingir a estabilidade. A partir dessa concentração há a formação de micelas esféricas, sendo assim, este ponto denominado de concentração micelar crítica (CMC), corresponde à mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo (Fig. 17) (PIRES *et al.*, 2020; KUMAR; NGUEAGNI, 2021). A CMC é um dos índices mais utilizados para a avaliação da atividade surfactante.

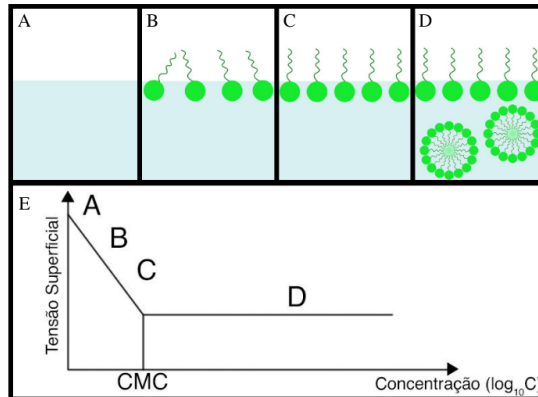


Figura 17 - Esquema da curva de Concentração Micelar Crítica (CMC) com as respectivas organizações das moléculas de biossurfactante na superfície da água.

Fonte: do próprio autor, 2022.

A etapa de purificação de biossurfactantes representa custos consideráveis em sua etapa de produção podendo acarretar um custo adicional de até 60% a 80% ao bioprocessamento, limitando sua aplicação industrial (NOAH *et al.*, 2002; SHALIGRAM; SINGHAL, 2010 INVALLY *et al.*, 2019; CAPPELLETTI; ZANNONI, 2020). Esse isolamento pode ser feito por precipitação através da acidificação do sobrenadante (bastante utilizada para o isolamento da surfactina) (HOROWITZ *et al.*, 1990); da adição de sais à solução de biossurfactante, como sulfato de amônio (isolamento de Alasan de *Acinetobacter radioresistens*) (NAVON-VENEZIA *et al.*, 1995) e adição de solventes miscíveis em água, tais como etanol, acetona e clorofórmio (PARASZKIEWICZ *et al.*, 2002).

2 . OBJETIVOS

- a. Realizar a caracterização do biossurfactante quanto ao colapso da gota, tensão superficial e atividade emulsificante;
- b. Classificar o biossurfactante caracterizado.

3 . MATERIAIS

- a. Biossurfactante liofilizado;
- b. Tampas de microplacas de 96 poços;
- c. Tensiômetro de bancada Kruss;
- d. Vórtex;
- e. Balança semianalítica e analítica.

4 . SOLUÇÕES

- a. Soluções com o biossurfactante em diferentes concentrações;
- b. Óleo de motor 10 W-40;
- c. Óleo diesel;
- d. Gasolina;
- e. Óleo de milho;
- f. Óleo de canola;
- g. Óleo de soja;
- h. Solução de Fenol 5 %;
- i. Ácido Sulfúrico;
- j. Reagente de Bradford;
- k. Solução de BSA.

5 . PROCEDIMENTOS

A. Avaliação da Tensão superficial

1. Pesar 20 mg de biossurfactante liofilizado;
2. Diluir o biossurfactante em 20 mL de água deionizada para se ter a concentração de 1 mg/mL (padrão de análise do equipamento que utiliza um frasco ocupando metade de seu volume com 20 mL);
3. Verificar o posicionamento do equipamento na bancada de acordo com o leitor de equilíbrio. O medidor encontra-se na base do tensiômetro, no canto esquerdo, de tal forma que a gota presente nesse orifício esteja centralizada. Caso esta não estiver, posicioná-la com ajuda dos parafusos presentes na base do tensiômetro;
4. Transferir a amostra 20 mg/20 mL do biossurfactante para o frasco apropriado ao equipamento e posicioná-lo no centro da mesa;
5. Posicionar o anel de platina cuidadosamente em seu suporte;
6. Centralizar a mesa e o frasco com o anel de platina utilizando as roscas laterais do equipamento para ajuste, presente na parte lateral da haste do tensiômetro;
7. Posicionar o medidor de tensão superficial na marca zero;
8. No equipamento há uma placa contendo o nível indicativo da posição correta que o anel deve estar para iniciar a leitura. Assim, deve-se abaixar o suporte com o anel até que este mergulhe e atinja a metade da altura da amostra, respeitando o nível indicado. Ao observar, à altura dos olhos, que o suporte se encontra centralizado na

marcação presente na placa branca, conclui-se que está devidamente posicionado;

9. Para realizar a leitura deve-se girar o medidor de tensão vagarosamente até que o anel de platina solte do líquido, rompendo a tensão superficial. O valor demarcado pelo medidor é o valor da tensão superficial em mN/m (mili Newton por metro).

OBS: Para cada análise o anel de platina deve ser flambado, e o frasco devidamente lavado e seco, evitando interferências. Para a confirmação da tensão superficial é recomendável que esta seja realizada em triplicata, sendo o solvente o padrão.

B. Teste do colapso da gota - Adaptado de Bodour e Miller-Maier (1998)

1. Untar os poços das tampas de microplacas contendo 96 poços rasos com 2 μL de óleo de motor 10W-40 e deixar secar por 24 h;

2. Preparar 500 μL de cada uma das soluções abaixo a partir da solução estoque de 4 mg/mL, utilizando a água deionizada como padrão. Caso deseje uma melhor visualização das gotas, recomenda-se a adição de corante azul de metila (1 μL /500 μL):

- Solução A: água destilada
- Solução B: Solução de biosurfactante de 1 mg/mL
- Solução C: Solução de biosurfactante 2x diluída
- Solução D: Solução de biosurfactante 10x diluída
- Solução E: Solução de biosurfactante 100x diluída
- Solução F: Solução de biosurfactante 1000x diluída

3. Elaborar o desenho experimental indicando as posições das soluções em cada um dos poços da placa, em triplicata;

4. Transferir 10 μL de cada uma das soluções de biosurfactante para cada um dos poços, em triplicata.

5. Aguardar 1 min e avaliar o espalhamento das gotas em comparação com o controle (água com ou/sem corante). O resultado será considerado positivo quando o diâmetro da gota contendo o biosurfactante for maior que o de uma gota contendo apenas água deionizada (YOUSSEF *et al.*, 2004).

6. Identificar no esquema abaixo, marcando com um X, os resultados positivos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

C. Determinação do índice de emulsificação (IE₂₄) – Adaptado de Cooper e Goldenberg (1987)

1. Preparar uma solução de biossurfactante e água deionizada a uma concentração de 1 mg/mL. Deve-se considerar que serão necessários 1 mL de solução para cada óleo avaliado;
2. Adicionar 1 mL de cada um dos compostos a serem avaliados em seus respectivos tubos de ensaio com tampa rosqueável. Os compostos utilizados foram os seguintes hidrocarbonetos: óleo de motor, óleo de canola, óleo de milho, tolueno e éter de petróleo;
3. Adicionar 1 mL de solução de biossurfactante em cada um dos tubos contendo os compostos, obtendo a concentração de 1:1;
4. Homogeneizar os tubos com o auxílio de um agitador vórtex na velocidade máxima por 1 minuto;
5. Deixar os tubos em repouso à temperatura de 25°C por um período de 24 horas;
6. Medir a altura da camada emulsificada (CE) e a altura total (AT) da mistura;
7. O índice de emulsificação será obtido através da equação 5.

$$IE (24h) = \left(\frac{AE}{AT} \right) * 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

IE (24): Índice de Emulsificação de 24 horas;

AE: altura da camada de emulsão;

AT: altura total da mistura.

A convenção adotada para qualificar a atividade emulsificante está apresentada na tabela 7.

ATIVIDADE EMULSIFICANTE	ALTURA DA EMULSÃO (TIPO ÁGUA EM ÓLEO)
Alta	≥ 2 cm
Moderada	De 1 a 1,9 cm
Baixa	< 1 cm

Tabela 7 - Convenção para qualificar a atividade emulsificante.

Fonte: Adaptado de Matsuura (2004).

D. Identificação do biossurfactante

D₁. Ensaio colorimétrico para determinação de carboidratos – Fenol Sulfúrico

1. Numerar os tubos de ensaio
2. Em um tubo de ensaio (Teste 1) adicionar 500 μL da amostra (glicose 0,01 mg/mL) + 500 μL de solução de Fenol 5 % + 2500 μL de ácido sulfúrico;
3. Em um tubo de ensaio (Teste 2) adicionar 500 μL da amostra (biossurfactante 1 mg/mL) + 500 μL de solução de Fenol 5 % + 2500 μL de ácido sulfúrico
4. Em um tubo de ensaio (Branco) adicionar 500 μL de água destilada + 500 μL solução de Fenol 5 % + 2500 μL de ácido sulfúrico;
5. Deixar esfriar até temperatura ambiente;
6. Fazer a leitura em espectrofotômetro a 490 nm.

D₂. Quantificação de peptídeos – Método de Bradford

1. Preparar o reagente de Bradford descrito na seção de Dosagem de Proteínas;
2. Elaborar a curva padrão de BSA;
3. Pipetar nos tubos os reagentes de acordo com o quadro 17.

Tubo	*BSA (mL)	Água (mL)	Bradford (mL)	**Abs _{595nm}
1 - Branco	-	0,500	0,50	
2	0,010	0,490	0,50	
2'	0,010	0,490	0,50	
3	0,020	0,480	0,50	
3'	0,020	0,480	0,50	
4	0,030	0,470	0,50	
4'	0,030	0,470	0,50	
5	0,040	0,460	0,50	
5	0,040	0,460	0,50	
6	0,050	0,450	0,50	
6'	0,050	0,450	0,50	

7	0,060	0,440	0,50	
7'	0,060	0,440	0,50	
8	0,100	0,400	0,50	
8	0,100	0,400	0,50	
'9	0,200	0,300	0,50	
9	0,200	0,300	0,50	
	Amostra	Água (mL)	Bradford (mL)	Abs_{595nm}
7	0,05	0,450	0,50	
7'	0,05	0,450	0,50	

*BSA: Albumina soro bovino, **Abs: absorvância.

Quadro 17 – Reagentes para dosagem de peptídeos pelo método de Bradford.

Fonte: do próprio autor (2022).

4. Agitar os tubos em vórtex por 30 segundos e aguardar 5 min a temperatura ambiente, no escuro;
5. Analisar as amostras no espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm;
6. Ajustar as concentrações: 1 mg/mL para amostra e 0,2 mg/mL para o BSA;
7. Elaborar um gráfico com os resultados obtidos.

6. QUESTÕES

1. Qual a importância de se determinar a Concentração Micelar Crítica (CMC)?
2. Explique como os tensoativos são capazes de diminuir a tensão superficial e interfacial entre diferentes fases.
3. Quais são as principais vantagens e desvantagens dos biossurfactantes em relação aos surfactantes sintéticos?

7. CURIOSIDADES

Os biossurfactantes já foram descritos em diversos estudos que apontam sua ampla capacidade em aplicações biotecnológicas. No contexto ambiental essas biomoléculas apresentam grande vantagem aos sintéticos, devido a sua biotecnologia sustentável. A poluição por óleo gera uma grande preocupação todos os anos afetando seriamente o ecossistema nos contextos econômico e sustentável (CHEBBI et al., 2018). A poluição das águas por óleos pode gerar também prejuízos à saúde humana. Sendo assim, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos eficazes e ecologicamente corretos de recuperação e biorremediação destes hidrocarbonetos (PHAM et al., 2019; SHARMA et

al., 2019). Os biossurfactantes devido à sua natureza anfipática possuem a capacidade de promover a emulsificação de óleos, facilitando assim sua disponibilidade para a recuperação dos ambientes. O uso de biossurfactantes na biorremediação de óleo em ambientes aquáticos é uma estratégia com crescente interesse industrial, o que faz dessas biomoléculas um produto de alto valor agregado (FEMINA et al., 2021).

REFERÊNCIAS

BODOUR, A.A.; MILLER-MAIER, R.M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal Microbiology Methods*, v. 32, n. 3, p. 273–280, 1998.

CAPPELLETTI M, PRESENTATO A, PIACENZA E, FIRRINCIELI A, TURNER RJ, ZANNONI D. *Biotechnology of Rhodococcus* for the production of valuable compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104 n.20, p. 8567-8594, 2020.

CHEBBI, A.; HENTATI, D.; CHEFFI, M.; BOUABDALLAH, R.; CHOURA, C.; SAYADI, S.; CHAMKHA, M. Promising abilities of mercapto-degrading *Staphylococcus capitis* strain SH6 in both crude oil and waste motor oil as sole carbon and energy sources: its biosurfactant production and preliminary characterization. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 93, p. 1401–1412, 2018.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

FADHILE-ALMANSOORY, A. et al. Biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading bacteria (HDB) *Serratia marcescens*: Optimization using central composite design (CCD). *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 47, p. 272–280, 2017.

FARIQ, A.; YASMIN, A. Production, characterization and bioactivities of biosurfactants from newly isolated strictly halophilic bacteria. *Process Biochemistry*, v. 98, p. 1–10, 2020.

FEMINA, C. C.; 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 Material*, p. 407, 2021.

HOROWITZ, S.; GILBERT, J.N.; GRIFFIN, M. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 6, p. 243-248. 1990.

INVALLY, K.; SANCHETI, A.; JU, L. K. A new approach for downstream purification of rhamnolipid biosurfactants. *Food and Bioproducts Processing*, v. 114, p. 122–131, 2019.

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.

KUMAR, C. F. C.; 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.

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.

MATSUURA, A.B.J. Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação. Tese de Doutorado. Ciências de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo. 2004.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, v. 133, p.183-198, 2004.

NAVON-VENEZIA, S.; ZOSIM, Z.; GOTTLIEB, A.; LEGMANN, R.; CARMELI, S.; RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 61, n. 9, p. 3240-3244, 1995.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 772-776. 2002.

NOAH, K.S., FOX, S.L., BRUHN, D.F.; THOMPSON, D. N.; BALA, A. G. Development of continuous surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in an airlift reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98, p. 803-813, 2002.

PACHECO, G.J. Produção de biossurfactantes por *Rhodococcus erythropolis* e sua aplicação na remoção de óleo de sedimentos arenosos. Dissertação de Mestrado. Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008.

PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; DLUNGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata* growth and product characterization. *Journal Biotechnology*, v. 92, p. 287-294. 2002.

PHAM, T. V.; NGUYEN, T. T.; NGUYEN, D. T.; THUAN, T. V.; BUI, P.O.T.; VIET, V. N. D.; BACH, L. G. The preparation and characterization of expanded graphite via microwave irradiation and conventional heating for the purification of oil contaminated water. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, v. 19, p.1122-1125, 2019.

PIRES, M. E. E.; PARREIRA, A. G.; SILVA, T. N. L.; COLARES, H. C.; DA SILVA, J. A.; DE MAGALHÃES, J. T.; GALDINO, A. S.; GONÇALVES, D. B.; GRANJEIRO, J. M.; GRANJEIRO, P. A. 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.

SAJID, M.; AHMAD, K. M. S.; SINGH, C. S.; SAFAR A. A. Biosurfactants: Potential applications as immunomodulator drugs. *Immunology Letters*, v. 223. p. 71-77, 2020.

SHALIGRAM, N. S.; SINGHAL, R. S. Surfactin – A Review on Biosynthesis, Fermentation. Purification and Applications. v. 48, n. 2, p. 119–134, 2010.

SHARMA, S.; VERMA, R.; PANDEY, L. M. Crude oil degradation and biosurfactant production abilities of isolated *Agrobacterium fabrum* SLAJ731. Biocatal. Agric. Biotechnol., v. 21, p. 101322, 2019.

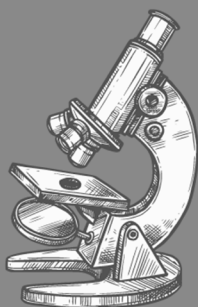
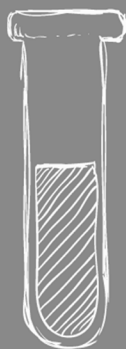
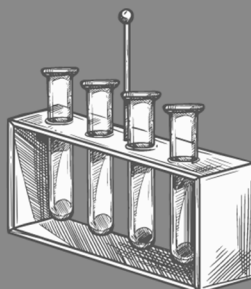
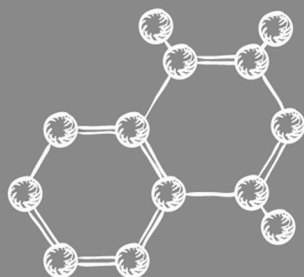
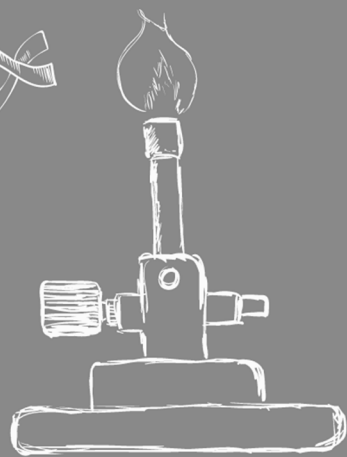
SONI, M. A simple laboratory experiment to measure the surface tension of a liquid in contact with air. v. 8, n. 2, p. 2197–2202, 2019.

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.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MCINERNEY, M.J; Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. Journal Microbiology Methods, v.56, n.3, p. 339-47. 2004.

Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022



www.atenaeditora.com.br 

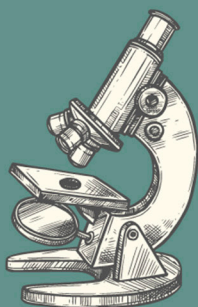
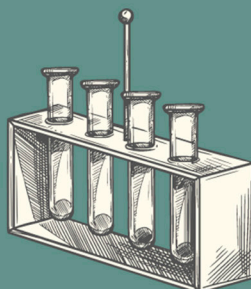
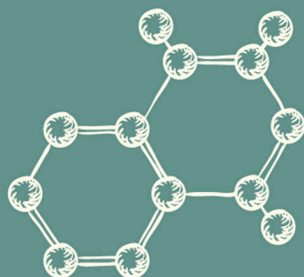
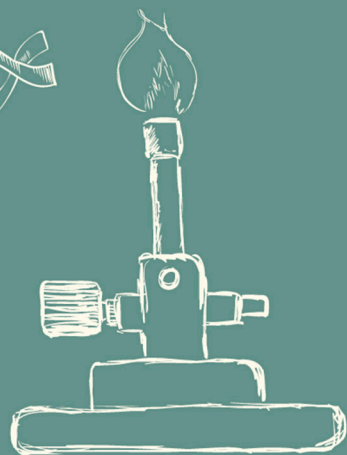
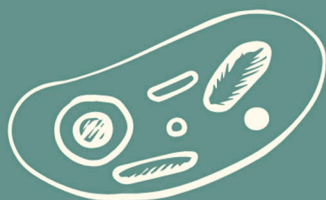
contato@atenaeditora.com.br 

@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 