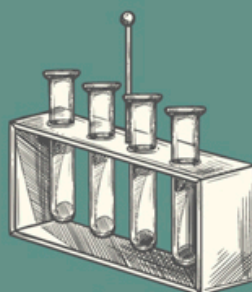


Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022

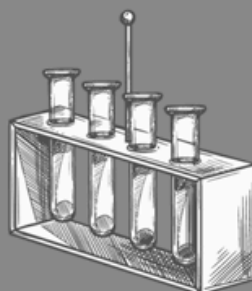
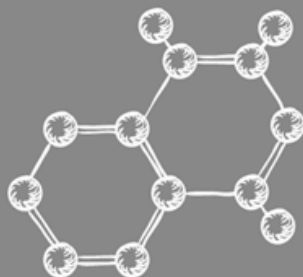


Paulo Afonso Granjeiro
Adriano Guimarães Parreira
Daniel Bonoto Gonçalves
José Antônio da Silva

- 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

Paulo Afonso Granjeiro

Raquel Valinhas e Valinhas

Heloísa Carneiro Colares

Tuânia Natacha Lopes Silva

Luísa Ferreira da Cruz

Felipe Ferreira Silva

Pablo Felipe Rodrigues Gonçalves

1. INTRODUÇÃO

Definição de carboidratos

Os carboidratos são um grupo diverso de substâncias com uma gama de propriedades químicas, físicas e fisiológicas. São principalmente substratos para o metabolismo energético, podem afetar a saciedade, a glicose e os níveis de insulina no sangue. Por meio da fermentação são capazes de influenciar a função colônica, o hábito intestinal, trânsito, células epiteliais, metabolismo e equilíbrio da flora comensal. Podem também ser imunomoduladores e influenciar a absorção de cálcio. Estas propriedades têm implicações para a nossa saúde geral. Contribuem particularmente para o controle do peso corporal, diabetes e

envelhecimento, doenças cardiovasculares, densidade mineral óssea, câncer de intestino grosso, constipação e resistência à infecção intestinal (CUMMINGS; STEPHEN, 2007).

Classificação

Os carboidratos podem ser classificados de acordo com o tamanho molecular, grau de polimerização (DP), o tipo de ligação e o carácter de monômeros individuais, de acordo com a classificação primária dos carboidratos na dieta, tal como proposto na Consulta de Peritos em Nutrição Humana da Organização Mundial da Alimentação e Agricultura (FAO)/Organização Mundial da Saúde (OMS), convocada em Roma em 1997 (FAO, 1998) (Quadro 18).

Classe	Subgrupo	Principais componentes
Açúcares (1-2)	Monossacarídeos	Glicose, frutose, galactose
	Dissacarídeos	Sacarose, maltose, lactose, trealose
	Polióis (açúcares álcoois)	Sorbitol, xilitol, manitol, lactitol
Oligossacarídeos (3-9)	Malto-oligossacarídeos	Maltodextrinas
	Não-alfa glicanos oligossacarídeos	Rafinose, inulina
Polissacarídeos (≥ 10)	Reserva	Amilose, amilopectina
	Não reserva	Celulose, hemicelulose, pectina, beta glicanos, mucilagens

Quadro 18 – Classificação dos carboidratos.

Fonte: Adaptado de FAO (1998).

Estrutura química

Estruturalmente, carboidratos ou hidratos de carbono são moléculas compostas principalmente por carbono, hidrogênio e oxigênio. A nível molecular, os carboidratos mais simples se tratam de hidrocarbonetos modificados através da adição de um grupo carbonila (aldeído ou cetona) e várias hidroxilas, onde as diferentes combinações destes grupos funcionais permitem a criação da estrutura básica dos carboidratos, os monossacarídeos. Existem milhares de carboidratos diferentes, porém todos eles são constituídos por uma ou mais unidades de monossacarídeos (KHOWALA *et al.*, 2008; HALL; MERTENS, 2017).

Monossacarídeos possuem sempre uma proporção de 1:2:1, um carbono para dois hidrogênios para um oxigênio, gerando uma fórmula molecular de $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Estas estruturas sempre possuem três ou mais carbonos e sua nomenclatura é dada pelo número de carbonos (triose, tetrose, pentose, hexose e assim por diante) e pelo grupo carbonila presente na cadeia carbônica (aldose ou cetose). Por exemplo, a fórmula molecular de dois monossacarídeos muito conhecidos, glicose e frutose, é $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, ambos monossacarídeos possuem a mesma fórmula molecular, mas os átomos que compõem as estruturas são arranjados de formas diferentes. A glicose é uma “aldohexose”, *aldo* por conter o grupo aldeído em sua estrutura e *hex* por ter seis carbonos, já a frutose é uma “ceto-hexose” *ceto* por conter o grupo cetona em sua estrutura e *hex* também por ter seis carbonos, como mostra a figura 18 (LEHNINGER *et al.*, 2000; NAVARRO *et al.* 2019).

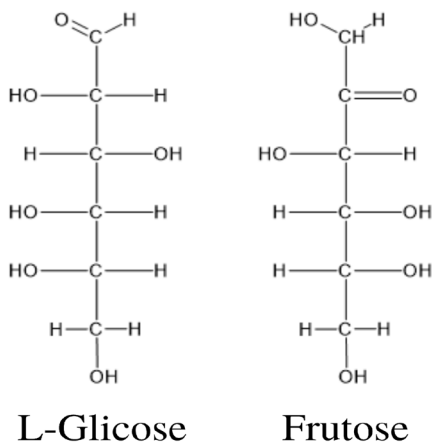


Figura 18 - Estrutura química das moléculas de glicose e frutose.

Fonte: do próprio autor (2022).

Além disso, monossacarídeos possuem outra classificação dependendo da posição das hidroxilas no carbono quiral mais distante do grupo carbonila (aldeído ou cetona), a

posição das hidroxilas neste carbono indica se o monossacarídeo é um monossacarídeo **D**, capaz de desviar a luz para a direita, ou **L**, capaz de desviar a luz para a esquerda. Esta classificação permite diferenciar enantiômeros de uma mesma molécula, conforme exemplos na figura 19 (LICHTENTHALER, 2003; NAVARRO *et al.*, 2019).

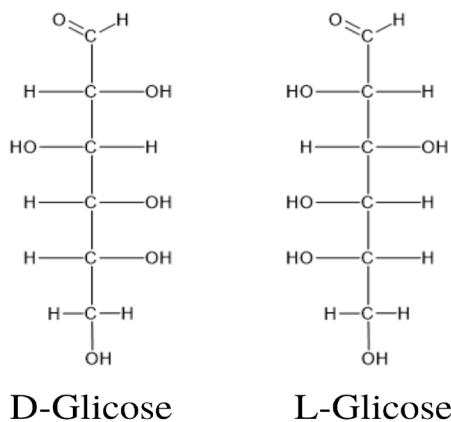


Figura 19 – Estrutura química da D-glicose e L-glicose.

Fonte: do próprio autor (2022).

Carboidratos em solução não tendem a permanecer lineares como ilustrado na figura anterior. Por questões de estabilidade estes monossacarídeos tendem a formar anéis quando presentes em uma solução. A formação do anel ocorre através da ligação do carbono anomérico (carbono da carbonila ou carbono 1) com uma das hidroxilas da estrutura. Ainda utilizando a glicose por exemplo, essa ligação pode ocorrer entre o carbono 1 e o carbono 5, gerando um anel de 6 componentes (1 oxigênio e 5 carbonos) conhecido como pirano, ou também entre o carbono 1 e o carbono 4, gerando um anel de 5 componentes (1 oxigênio e 4 carbonos) conhecido como furano, como demonstrado na figura 15 (KHOWALA *et al.*, 2008; RODWELL *et al.*, 2015).

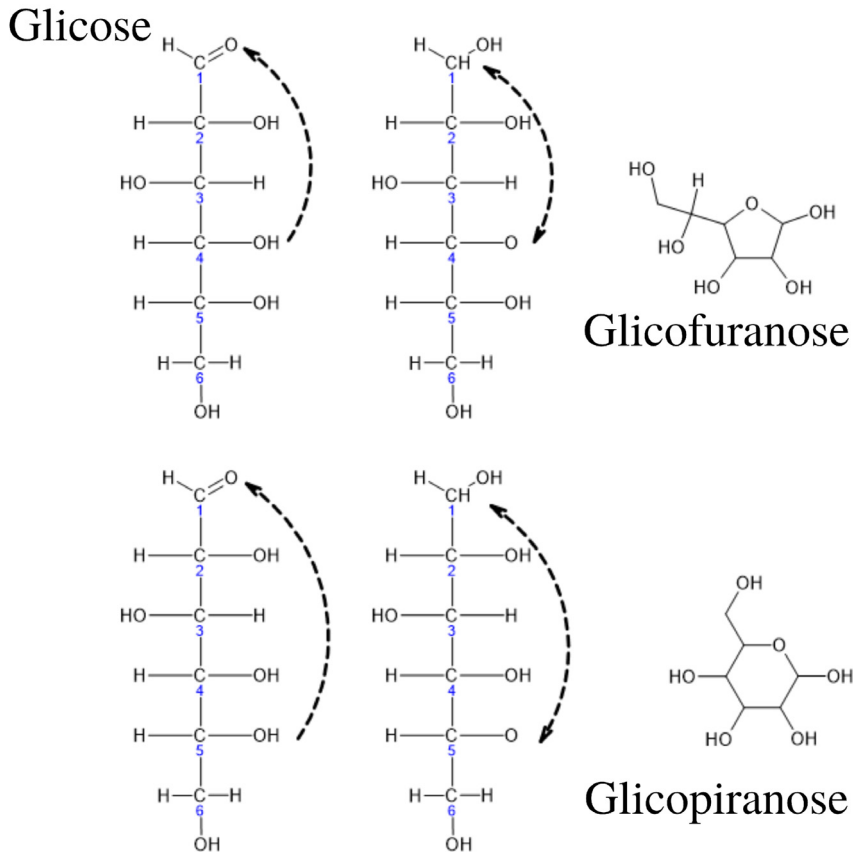
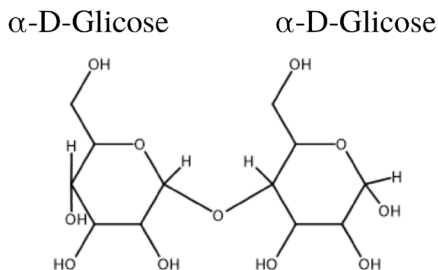


Figura 15 – Estrutura química da glicofuranose e Glicopirranose.

Fonte: do próprio autor (2022).

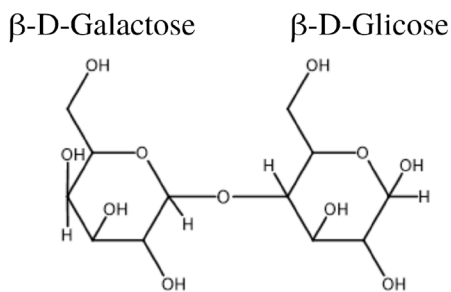
Para formar carboidratos mais complexos, há ligação de um monossacarídeo a outro, através da ligação glicosídica, uma reação de condensação que, através da remoção de água gera estruturas chamadas de dissacarídeos (união de dois apenas monossacarídeos), oligossacarídeos (união de dois a dez monossacarídeos) e polissacarídeos (união de mais de dez monossacarídeos). Alguns exemplos de oligossacarídeos mais comuns são a sacarose (glicose + frutose), a lactose (galactose + glicose) e a maltose (glicose + glicose). Como polissacarídeos é possível destacar macromoléculas de reserva energética ou de função estrutural como o amido e a celulose, ambos polímeros de glicose que se diferenciam a partir do tipo de ligação (α 1-4 no caso do amido e β 1-4 para a celulose). Na figura 21 está demonstrado um exemplo das ligações glicosídicas para formação de maltose (ligação do tipo α 1-4) e (lactose ligação do tipo β 1-4) (KHOWALA et al., 2008; NELSON; COX et al., 2014).

Maltose



Ligação α -glicosídica

Lactose



Ligação β -glicosídica

Figura 21 – Ligações glicosídicas em dissacarídeos.

Fonte: do próprio autor (2022).

Métodos de purificação

A purificação de carboidratos segue sendo um desafio. Entre as biomoléculas sua heterogeneidade estrutural, com diferenças baseadas nas orientações espaciais dos átomos e não em diferenças nos grupos funcionais, e suas propriedades dos materiais os tornam difíceis de alcançar a forma pura. Essas mudanças impossibilitam o desenvolvimento de métodos analíticos de alto rendimento para análise de carboidratos e consequentemente seu isolamento (NAGY, PENG, POHL, 2017).

Os métodos tradicionais utilizados para extração de carboidratos são fundamentados em membranas (ultrafiltração, nanofiltração, diafiltração etc.) ou técnicas cromatográficas (cromatografia de exclusão de tamanho, íon cromatografia de troca, etc.). Contudo, esses métodos não são seletivos para carboidratos e outros compostos podem ser extraídos. Além disso, são métodos demorados e os rendimentos e / ou pureza são baixos (MORENO *et al.*, 2014).

Atualmente novas técnicas de extração e purificação vêm surgindo com o intuito de aumentar o rendimento e /ou pureza e torná-las mais rápidas. Técnicas como as à base de

solvente aprimoradas e ecologicamente corretas, a chamada técnica verde. Essa consiste em utilizar solventes verdes, como líquidos iônicos e solventes eutéticos profundos. Além de, técnicas avançadas, como extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, extração com líquido pressurizado, extração com fluido supercrítico e extração assistida por enzima. Ademais a mistura de diferentes técnicas também vem sendo estudadas (MENA-GARCÍA *et al.*, 2019).

2 . OBJETIVOS

- a) Produzir e extrair o exopolissacarídeo através de técnicas especializadas a partir de microrganismos utilizando 2 meios de cultura diferentes.
- b) Produzir etanol a partir de microrganismos.

3 . MATERIAIS

- a. Erlenmeyer (250 mL)
- b. Beckers (50 mL e 100 mL)
- c. Tubos de Ensaio
- d. Alça de inoculação
- e. Centrífuga de tubo Falcon
- f. Espectrofotômetro
- g. Pipetas (1000 mL)
- h. Ponteiras (1000 mL)

4 . SOLUÇÕES

- a. Ácido sulfúrico concentrado
- b. Ácido tricloroacético (TCA) 80%
- c. Etanol absoluto gelado (4°C)
- d. Fenol 5%
- e. Leite em pó desnatado
- f. Goma acácia
- g. Sulfato de amônio
- h. Soro de leite
- i. Meio MRS

5 . PROCEDIMENTOS

Parte 1. Produção de polissacarídeos a partir de Bactérias Lácticas

1. Dividir em 2 grupos: 1 e 2;
2. Fazer estria das bactérias lácticas em tubos inclinados com MRS;
3. Incubar a 37°C por 24 horas;
4. Preparar 100 mL dos seguintes meios:
 - a) Grupo 1: Soro de leite suplementado com 4,5% de goma acácia e 0,4% de sulfato de amônio.
 - b) Grupo 2: Leite em pó desnatado (10% (p/v)) suplementado com 4,5% de goma acácia e 0,4% de sulfato de amônio.

Obs: preparar cada suplemento separadamente do meio de cultivo

5. Esterilizar os meios de cultivo e os suplementos em autoclave a 20 minutos, 121°C, 1 atm;
6. Adicionar ao meio estéril os suplementos estéreis (Na capela de fluxo);
7. Transferir uma alçada da bactéria para o meio de cultivo (100 mL);
8. Incubar a 37°C, 24h, 180 rpm;
9. Armazenar o material para a aula seguinte (capítulo 12).

Parte 2. Produção de polissacarídeos a partir de Leveduras

A. Inóculo do ensaio fermentativo para produção de etanol

1. Misturar em 100 mL de meio sintético fermentativo, o inóculo de 1% (m/v) de fermento biológico desidratado (levedura comercial – *Saccharomyces cerevisiae*);
2. Imediatamente após inóculo, encaixar o fermentômetro em cada frasco;
3. Pesar o sistema fermentativo em balança semianalítica.

B. Processo fermentativo

1. Pesar o sistema fermentativo a cada 30 minutos, conforme o Quadro 19.

O processo fermentativo será realizado em anaerobiose. A evolução (desprendimento) do CO₂ produzido durante a fermentação será acompanhada através do uso de um dispositivo denominado fermentômetro (PIMENTA *et al.*, 2016) acoplado ao frasco (reator) de fermentação. Esse dispositivo possibilita acompanhar o processo fermentativo por meio de sucessivas pesagens do conjunto, em intervalos de tempo regulares, sendo a perda de peso obtida, decorrente do desprendimento de CO₂.

Data	Hora	Peso (g)		Diferença	
		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
xx/xx/xxx	14:30	381,4	411,2	0,00	0,00
xx/xx/xxx	15:00	378,9	408,5	2,5	2,7
xx/xx/xxx	15:30	376,5	402,0	4,9	9,2
xx/xx/xxx	16:00	372,0	398,0	9,4	13,2

Quadro 19 - Exemplo de anotações de CO₂.

Fonte: do próprio autor (2022).

6. QUESTÕES

1. Por que a extração de carboidratos ainda é um desafio?
2. Qual a função do soro de leite e do leite em pó?
3. Qual é a função da suplementação dos meios e por que deve ser feita com os componentes citados (goma acácia e sulfato de amônio)?
4. Por que é necessário esterilizar todo o material e manter o ambiente estéril durante o cultivo?
5. Qual a importância de se controlar a temperatura de crescimento dos microrganismos?

7. CURIOSIDADES

A vacinação tem sido um dos mecanismos mais importantes para o controle e prevenção de doenças infecciosas. Contudo, para algumas Doenças Tropicais Negligenciadas, não existem vacinas ou fármacos eficientes capazes de prevenir ou tratar essas doenças. Provocada pelo parasito protozoário tripanosomatídeo *Trypanosoma cruzi*, a doença de Chagas está entre os principais problemas de saúde na América Latina. Estudos vêm sendo desenvolvidos para criar vacinas contra essas doenças. Um estudo do ano de 2018 foi capaz de avaliar a eficácia de vacinas baseadas em carboidratos como α Gal e rhamnose, presentes na superfície de formas tripomastigotas do *T. cruzi*, acoplados ao bacteriófago modificado Q β “vírus like particle”, em animais deficientes em α 1,3-galactosyltransferase (α GalT-KO) que mimetizam o hospedeiro humano na produção de anticorpos anti- α Gal. Com resultados promissores o estudo é um importante passo para o tratamento mais eficiente da doença de Chagas (AZEVEDO, 2018).

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, M. A. Potencial de vacinas de carboidratos α Gal e raminose, acoplados a partículas virais-like (Q β - α Gal/Rham) na doença de Chagas. Universidade Federal de Minas Gerais. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, 2018.

CUMMINGS, J. H.; STEPHEN, A. M. Carbohydrate terminology and classification. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 61, n. 1, p. S5-S18, 2007.

FAO. 1998. Rome Declaration on World Food Security and World Food Summit Plan of Action. Disponível em: available at www.fao.org/docrep/003/w3613e/w3613e00.html. Acesso em: 19/08/2021.

GUO, R., CAO, N.; WU, Y. WU, J. Optimized extraction and molecular characterization of polysaccharides from *Sophora alopecuroides* L. seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 82, p.231–242, 2016.

HALL, M.B.; MERTENS, D.R. A 100-year review: Carbohydrates—Characterization, digestion, and utilization. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 12, p. 10078-10093. 2017.

IEA, 2020. International Energy Agency. Disponível em: <https://afdc.energy.gov/data/>. Acesso em: 21/09/2021.

KHOWALA, S.; VERMA, D.; BANIK, S. P. Carbohydrates. *Biomolecules (Introduction, Structure and Functions)*. Edition: 6th Publisher: National Science Digital Library, p.1-93, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Artmed. 6a ed. New York, 2014.

LICHTENTHALER, F. W. Carbohydrates. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2003.

MENA-GARCÍA, A.; Ruiz-Matute, A. I.; Soria, A. C.; Sanz, M. L. Green techniques for extraction of bioactive carbohydrates. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 119, n. 115612, 2019.

MORENO, F. J.; CARRERO-CARRALERO, O. C.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, O.; SANZ, M. L. Fractionation of food bioactive oligosaccharides. *Food Oligosaccharides*. v.15, p.255-283, 2014.

NAGY, G.; PENG, T.; POHL, N. L. B. Recent liquid chromatographic approaches and developments for the separation and purification of carbohydrates. *Analytical Methods*, v. 9, n. 24, p. 3579-3593. 2017.

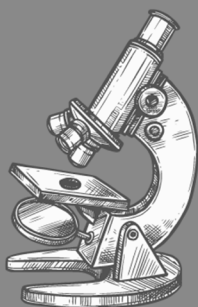
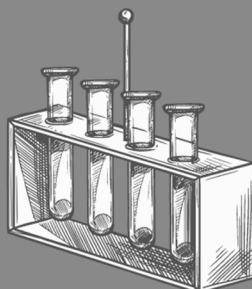
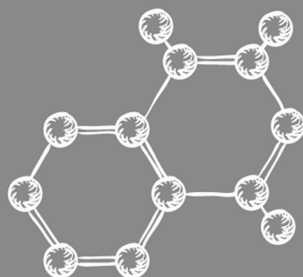
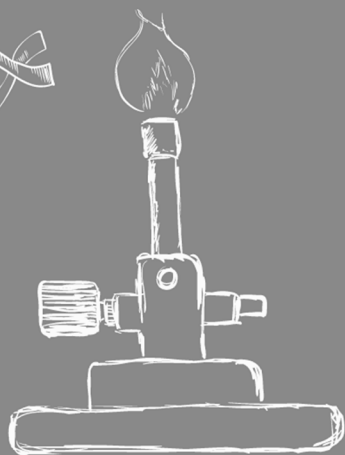
NAVARRO, D. M. D. L.; ABELILLA, J. J.; STEIN, H. H. Structures and characteristics of carbohydrates in diets fed to pigs: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 10, n. 1, p. 1-17. 2019.

PIMENTA, J. L.; SANTOS, R. S.; MUNAYER, A. A. G.; PANTOJA, L. A.; SANTOS, A. S. Sacarificação e fermentação simultânea de tortas de algodão e girassol na produção de etanol de 2ª geração utilizando extrato holocelulolítico bruto produzido por *Aspergillus tubingensis* AN1257. In: 5º Congresso Internacional de Tecnologias para o meio ambiente, 2016.

RODWELL, V. W.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; WEIL, P. A.; BENDER, D. A. *Harper's illustrated biochemistry* (30th ed.). New York, N.Y.: McGraw-Hill Education LLC, 2015.

Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022



www.atenaeditora.com.br 

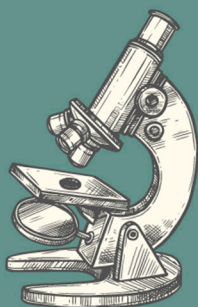
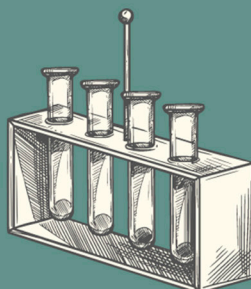
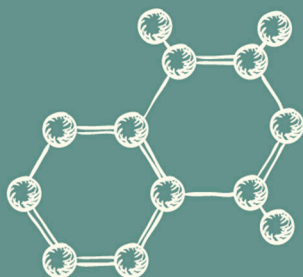
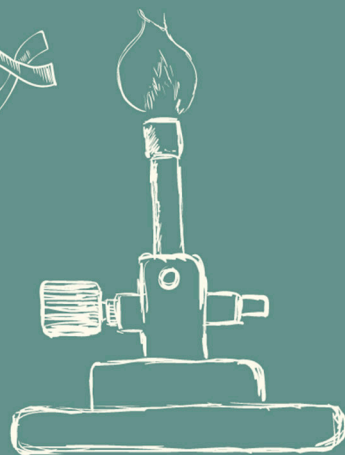
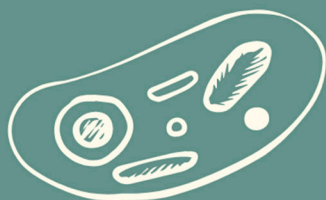
contato@atenaeditora.com.br 

@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 