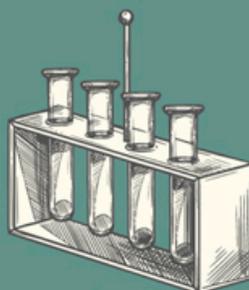
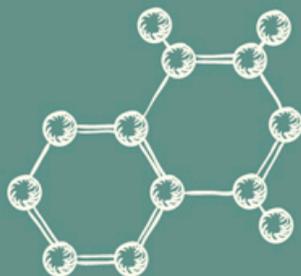
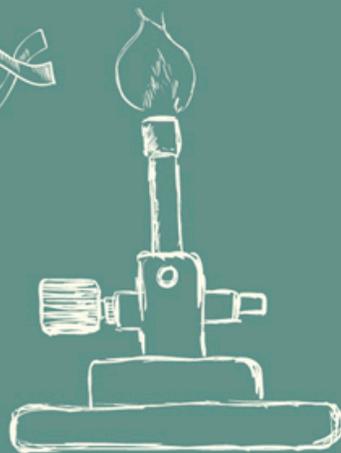


Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022

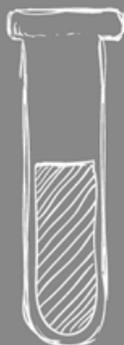
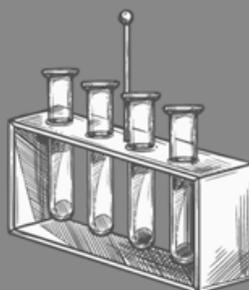
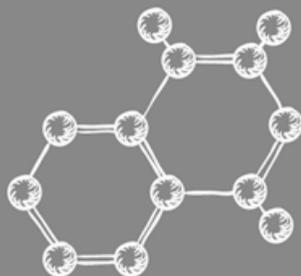
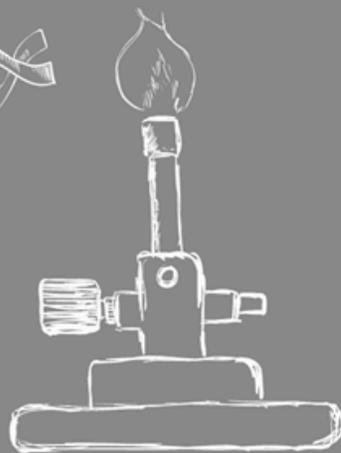


Paulo Afonso Granjeiro
Adriano Guimarães Parreira
Daniel Bonoto Gonçalves
José Antônio da Silva

- 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

Daniel Bonoto Gonçalves

Felipe Ferreira Silva

Priscila Amaral Diniz

Heloísa Carneiro Colares

Klédna Constância Portes Reis

Wanderson Duarte Penido

Anderson Fernandes de Melo

1. INTRODUÇÃO

Para serem considerados vivos, os organismos precisam ser capazes de realizar algumas funções básicas e possuir algumas características específicas, como: sensibilidade ou resposta ao meio ambiente, capacidade de reprodução e adaptação, crescimento e desenvolvimento, homeostase, obtenção e processamento de energia e principalmente ser capaz de evoluir. Para realizar tais funções diferentes grupos de macromoléculas são necessárias. Além de proteínas, carboidratos e lipídeos outro grupo importante de macromoléculas é essencial por guardar toda a informação contida em uma célula e ser responsável por codificar todos os processos celulares, estes grupos de macromoléculas são

denominados “ácidos nucleicos” (MINCHIN; LODGE, 2019).

Ácidos nucleicos são macromoléculas formadas por um conjunto de nucleotídeos e estes nucleotídeos são formados por três componentes: um açúcar de 5 carbonos (pentose), um grupo fosfato e uma base nitrogenada (adenina, citosina, timina, guanina e uracila) (Figura 22). Existem dois tipos de ácidos nucleicos: o ácido desoxirribonucleico, conhecido como DNA, e o ácido ribonucleico, ou RNA (Figura 23). A diferença estrutural entre os componentes dos dois ácidos nucleicos é a pentose, no qual no RNA a pentose é uma ribose, no DNA a pentose é uma desoxirribose (MULLEGAMA *et al.*, 2019).

Em meados de 1953, através dos resultados da pesquisadora Rosalind Franklin, os pesquisadores James Watson e Francis Crick determinaram a estrutura química do DNA. Eles observaram que o DNA é composto por uma fita dupla unida através de ligações de hidrogênio estabelecidas entre as bases nitrogenadas justapostas. Este processo ficou conhecido como pareamento de bases. Esse tipo de ligação é extremamente específico, ou seja, uma base nitrogenada sempre parecia apenas a outra base específica, sempre sendo uma purina (adenina e guanina) pareada com uma pirimidina (citosina, timina e uracila). A Adenina pareia com a Timina (ou Uracila no

caso do RNA) e a Guanina pareia com a Citosina. Através deste tipo de ligação também é possível concluir que a segunda fita do DNA é sempre complementar à primeira fita. (FRANKLIN; GOSLING, 1995).

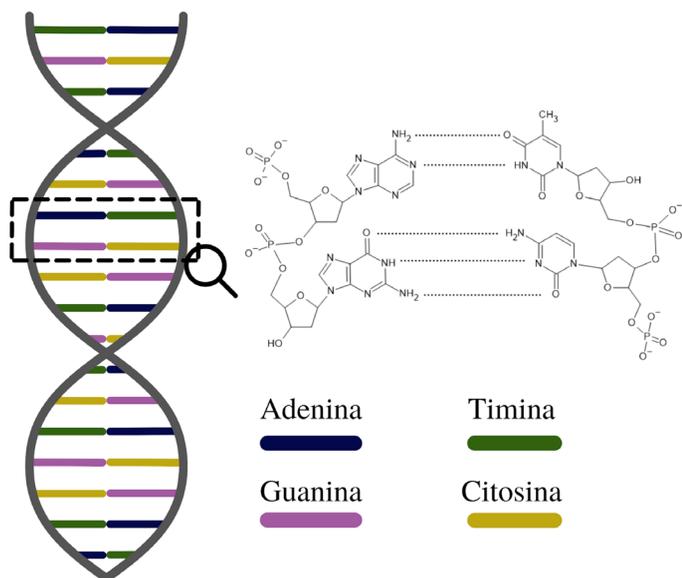


Figura 22 – Estrutura química do DNA.

Fonte: do próprio autor (2022).

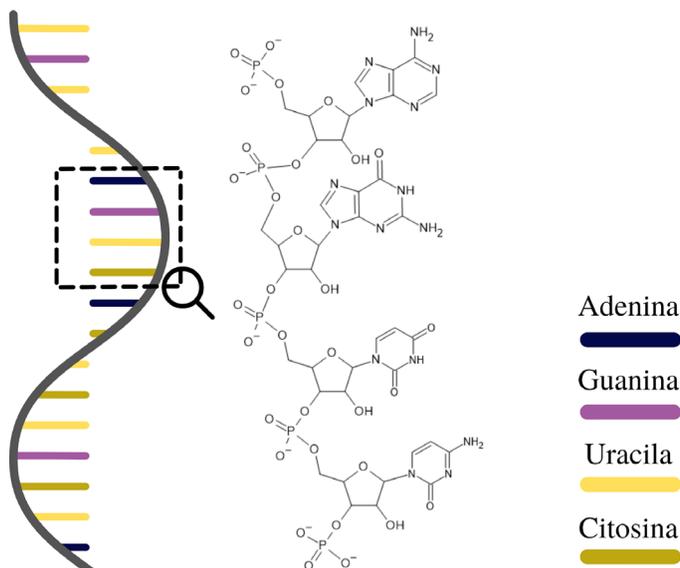


Figura 23 – Estrutura química do RNA.

Fonte: do próprio autor (2022).

O DNA é uma molécula extremamente importante para os seres vivos. Ele armazena e transmite as informações genéticas e funciona como molde para a síntese da molécula de RNA (transcrição), que posteriormente será utilizada como molde para a síntese de proteínas (tradução) (MONTEIRO, 2017; PAUL et al., 2020). Biotecnologicamente, o DNA possui aplicações em diversas áreas como: indústria farmacêutica, na produção de bioprodutos através da expressão heteróloga como a insulina, o hormônio do crescimento (GH) e diversas outras proteínas. Na medicina através da produção de vacinas, diagnóstico de doenças e principalmente na terapia gênica, onde o DNA de determinadas células é modificado para produção de determinadas proteínas que antes estavam ausentes em pacientes. Na agricultura através de modificações genéticas de plantas e de patógenos que infectam plantas. Enfim, com os avanços tecnológicos alcançados nos últimos anos, o manuseamento do DNA tem sido cada vez mais de extrema importância para o melhoramento das condições de vida de todos os organismos vivos (RAJAKARUNA; TAYLOR-ROBINSON, 2016).

Diferentemente do DNA, que é responsável pelo armazenamento de informação genética e em arranjo de dupla hélice, o RNA consiste em uma estrutura de fita simples, com uma ampla gama de funções diversas. RNAs mensageiros (mRNAs) e transportadores (tRNAs) estão envolvidos na transcrição e/ou tradução da informação genética, culminando na síntese de proteínas. No entanto, existem ainda RNAs de função catalítica (ribozimas), como por exemplo o rRNA 23S de ribossomos procariotos, com papel estrutural, os rRNA que juntamente com proteínas constituem os ribossomos, com função de regulação de expressão gênica, como é o caso dos miRNAs. RNAs que atuam para promover variabilidade na geração de isoformas proteicas através de processamento alternativo de mRNA (snRNAs de spliceossomos), dentre outras funções. A importância do RNA é tão grande que se acredita que a vida baseada nesta molécula tenha precedido a vida codificada por DNA (ROBERTSON; JOYCE, 2012).

Para fins de pesquisa e aplicações biotecnológicas pode-se utilizar RNA em técnicas como Northern Blot, interferência por RNA, RNA Seq e microarranjo, para o estudo da expressão gênica, e ainda para síntese de cDNA e futura clonagem e expressão, principalmente de produtos de genes de eucariotos, resolvendo-se o problema de seqüências demasiadamente longas pela presença de íntrons (WATSON *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

Extrair os ácidos nucleicos (DNA/RNA) presentes na banana e em fermento biológico.

3 . MATERIAIS

A. Extração de ácidos nucleicos de banana

- a. 1 banana
- b. saco plástico ou cadinho para macerar a banana
- c. 3 Béqueres (200 mL)
- d. 100 mL de água destilada
- e. 25 mL de detergente
- f. 1 colher de sopa de NaCl (sal de cozinha)
- g. Filtro de papel (normalmente usado para coar café) ou gaze
- h. 1 tubo de ensaio
- i. 15 mL de etanol ou isopropanol gelado (4°C)
- j. Bastão de vidro
- k. Microtubos

B. EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE FERMENTO BIOLÓGICO

- a. Fermento biológico de pão seco
- b. Água ultra pura
- c. Solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1)
- d. NaCl 5 M
- e. Isopropanol gelado
- f. Álcool etílico 70% v/v gelado
- g. Microtubos

4 . SOLUÇÕES

- a. Solução de NaCl 5 M

292,5 g de cloreto de sódio (NaCl)

H₂O q.s.p. 1000 mL

- b. Solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1)

Para um volume final de 50mL de solução misture 2 mL de álcool isoamílico a 48 mL de clorofórmio. **Observação:** estes reagentes devem ser manuseados em capela.

5 . PROCEDIMENTOS

A. Extração de ácidos nucleicos de banana

O protocolo de extração de ácidos nucleicos de banana foi modificado a partir de SAYRES (2016) e a partir do protocolo recomendado pela revista Nova Science Now (disponível em pbs.org).

1. Descascar a banana e colocar em saco plástico ou cadinho para maceração;
2. Macerar a banana até que o conteúdo fique pastoso (caso necessário adicionar uma pequena quantidade de água);
3. Preparar em um béquer de 200 mL uma solução com 100 mL de água destilada, 25 mL de detergente e uma colher de sopa de NaCl. Misturar bem até que o detergente e o NaCl estejam diluídos na solução. Esta etapa deve ser feita com bastante cuidado para que não sejam geradas bolhas;
4. Após homogeneizar a solução, adicionar a este béquer, cuidadosamente, o macerado de banana;
5. Misturar, com a ajuda do bastão de vidro, durante 15 minutos para homogeneizar a amostra. Esta etapa deve ser feita com bastante cuidado para que não sejam geradas bolhas;
6. Em outro béquer, posicionar o filtro de papel/gaze e começar a filtrar a amostra. Para isso, é importante verter vagarosamente a amostra e deixar filtrando durante 10 minutos;
7. Após o tempo de filtragem, remova o filtro/gaze e misture cuidadosamente o conteúdo filtrado;
8. Transferir uma porção da amostra filtrada para um tubo de ensaio (aproximadamente 2 a 3 dedos no fundo do tubo de ensaio);
9. Inclinando o tubo de ensaio, e com a ajuda de uma pipeta, adicionar cuidadosamente pela parede do tubo o etanol ou isopropanol gelado (aproximadamente $\frac{1}{2}$ da quantidade da amostra). Será possível observar a formação de duas fases (amostra e álcool) e entre estas duas fases será possível observar a formação de pequenos “fiapos” de cor branca, estes fiapos são moléculas de ácidos nucleicos. **Observação:** É necessário que o álcool esteja gelado e seja adicionado cuidadosamente na parede do tubo.
10. Deixar a amostra parada durante 4 minutos;
11. Com a ajuda de um bastão de vidro ou madeira remover cuidadosamente os ácidos nucleicos da solução. **Dica:** rotacione o bastão para “pescar” o conteúdo;
12. Após remover os ácidos nucleicos deixar secar por alguns minutos ao ar livre para a evaporação do etanol e suspender a solução em 500 μ L de água ultrapura em um microtubo. Caso tenha grandes quantidades de ácidos nucleicos, dividir o

conteúdo em dois tubos.

13. A amostra reidratada poderá ser analisada através de eletroforese em gel de agarose ou espectrofotometria.

B. Extração de ácidos nucleicos de fermento biológico

O protocolo de extração de ácidos nucleicos de fermento biológico foi modificado a partir de BERBERT *et al.* (2018).

1. Pesar 200 mg de fermento biológico em microtubo de 1,5 mL, adicionar 500 μ L de água ultrapura ou deionizada e homogeneizar o conteúdo em vórtex;
2. Adicionar 500 μ L da solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), 200 μ L de NaCl 5 M e homogeneizar novamente o conteúdo em vórtex;
3. Centrifugar o conteúdo a 10.000 g por 10 minutos;
4. Após a centrifugação será possível observar que o conteúdo no tubo está disposto em quatro fases distintas: fração polar (ácidos nucleicos), interfase fina (proteínas), fração apolar (lipídeos) e *pellet* (resíduos celulares maiores). Retirar, com auxílio de uma pipeta automática, apenas o sobrenadante, ou seja, a primeira fase em que se encontra o DNA e adicionar o conteúdo em outro microtubo de 1,5 mL.

Observação: é necessário que esta etapa seja feita com bastante cuidado e é muito importante que a ponta da pipeta não encoste na interfase, onde se encontram as proteínas;

5. Separar o microtubo com a primeira fase (onde se encontram os ácidos nucleicos) e repetir a etapa de extração com o microtubo que contém o *pellet* para aumentar o rendimento da extração. Adicionar 500 μ L da solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e 200 μ L de NaCl 5 M ao microtubo com o *pellet* (precipitado) e homogeneizar no vórtex novamente. Centrifugar a 10.000 g por 10 minutos e coletar novamente apenas a primeira fase, colocando no mesmo microtubo separado no passo anterior, onde se encontra o DNA;
6. Descartar o tubo com o *pellet*, que contém apenas restos celulares e proteínas;
7. No microtubo com os ácidos nucleicos, adicionar 500 μ L de isopropanol gelado, homogeneizar CUIDADOSAMENTE com auxílio de uma pipeta automática e incubar a -20 °C por pelo menos 60 minutos;
8. Após os 60 minutos de incubação, centrifugar o material a 10.000 g por 15 minutos;
9. Descartar, com bastante cuidado, o sobrenadante. O descarte pode ser feito através da inversão do tubo;
10. Adicionar 500 μ L de álcool 70% (v/v) gelado, homogeneizar com auxílio de uma pipeta e centrifugar novamente por 10 minutos;
11. Descartar, com bastante cuidado, o sobrenadante e deixar o tubo aberto para que ocorra toda a evaporação do álcool;
12. Ressuspender o conteúdo em 50 μ L de água ultrapura;

13. A amostra de DNA reidratada poderá ser analisada através de eletroforese em gel de agarose ou espectrofotometria.

6 . QUESTÕES

1. Qual o principal objetivo da maceração para o procedimento?
2. Qual o papel do detergente no experimento?
3. Por que o sal de cozinha é utilizado na extração de ácidos nucleicos?
4. Qual a importância do álcool para a extração de ácidos nucleicos?
5. Cite 3 exemplos de aplicação do DNA que acabou de ser extraído.

7 . CURIOSIDADES

Todos nós sabemos da importância das vacinas na prevenção de doenças. Existem diversos tipos de vacinas, uma das classes mais modernas são as constituídas de DNA. Vacinas de DNA (ou vacinas gênicas) são baseadas na informação genética do patógeno, chamado de alvo. Estas vacinas são compostas por um pequeno fragmento de DNA, responsável por codificar uma ou mais proteínas do organismo patogênico, capazes de gerar resposta imune utilizando a maquinaria do próprio hospedeiro. Tais proteínas recebem o nome de antígenos, que são incapazes de causar o quadro clínico no paciente, mas suficientemente capazes de gerar resposta imune dos mesmos. Os antígenos irão estimular a produção de anticorpos, células citotóxicas e células de memória no hospedeiro. Assim, quando o indivíduo entrar em contato com esse patógeno será capaz de apresentar uma resposta imune e não desenvolverá a doença. Existem diversas pesquisas de vacinas de DNA contra a COVID-19. Além disso, como as vacinas de DNA ativam a resposta imunológica celular e são muito específicas, elas também apresentam grande potencial de aplicação em diversas áreas, como nas terapias contra vários tipos de câncer, por exemplo (LEE *et al*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2021).

REFERÊNCIAS

BERBERT, L.C.; SUCCAR, J. B.; FLORES, V. R.; DIREITO, I. C. N. Protocolo para extração de DNA para utilização em aulas práticas no ensino superior. *Acta Scientiae et Technicae*, v.6, n. 1, 2018.

FRANKLIN, R. E.; GOSLING, R. G. Molecular structure of nucleic acids. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 758, p.16-17, 1995.

LEE, J.; KUMAR, S. A.; JHAN, Y. Y.; BISHOP, C. J. "Engineering DNA vaccines against infectious diseases." *Acta biomaterialia*, v. 80, p.31-47, 2018.

MINCHIN, S.; LODGE, J. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays in Biochemistry*, v. 63, n.4, p. 433–456, 2019.

MONTEIRO, S. G. As Aplicações Biotecnológicas. *Revista de Investigação Biomédica*, v. 9, n. 1, 2017.

MULLEGAMA, S. V.; ALBERTI, M. O.; AU, C.; LI, Y.; TOY, T.; TOMASIAN, V.; XIAN, R.R. Nucleic Acid Extraction from Human Biological Samples. *Methods in Molecular Biology*, v. 1897, p.359-383, 2019.

NOVA SCIENCE NOW. Extracting DNA from Bananas” activity, 2007. Disponível em: <https://www.pbs.org/wgbh/nova/education/activities/pdf/3214_01_nsn_01.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2021.

PAUL, R.; OSTERMANN, E.; WEI, Q. Advances in point-of-care nucleic acid extraction technologies for rapid diagnosis of human and plant diseases. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 169, p.112592, 2020.

RAJAKARUNA, S. S.; TAYLOR-ROBINSON, A. W. Application of recombinant DNA technology (genetically modified organisms) to the advancement of agriculture, medicine, bioremediation and biotechnology industries. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, v. 1, n. 3, p. 78-80, 2016.

ROBERTSON, M. P.; JOYCE, G. F. The origins of the RNA world. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 4, n.5, 2012.

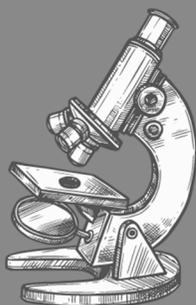
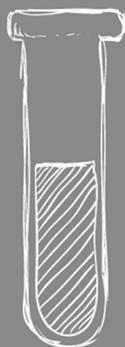
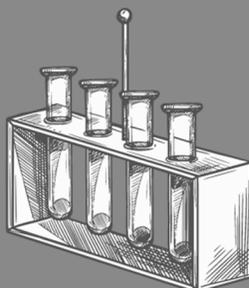
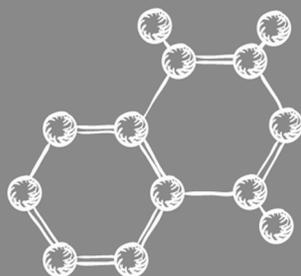
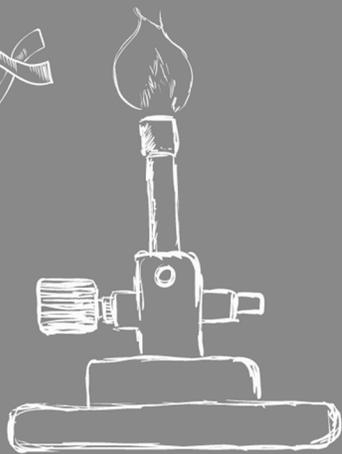
SAYRES, M. W. Seeing DNA. ASU - Ask A Biologist, 2016. Disponível em: <<https://askabiologist.asu.edu/activities/banana-dna>>. Acesso em: 14 jan. 2021.

SILVEIRA, M. M.; MOREIRA, G.; MENDONÇA, M. DNA vaccines against COVID-19: Perspectives and challenges. *Life sciences*, v. 267, p. 118919, 2021.

WATSON, J. D.; MYERS, R. M.; CAUDY, A. A.; WITKOWSKI, J. A. DNA Recombinante –Genes e Genomas, 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed. 2009.

Práticas em Bioquímica Analítica

Atena
Editora
Ano 2022



www.atenaeditora.com.br 

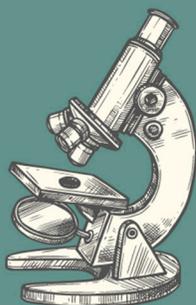
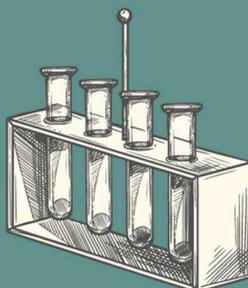
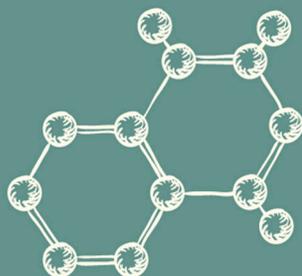
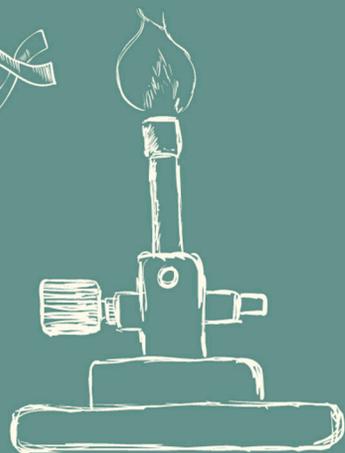
contato@atenaeditora.com.br 

@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 