



Universidade Federal de São João del-Rei  
Departamento de Ciências Naturais

# Bioquímica Experimental

Professor Luiz Gustavo de Lima Guimarães

Professora Maíra Nicolau de Almeida

São João del-Rei

Julho de 2023

Autorizamos a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.



## Sumário

INFORMAÇÕES IMPORTANTES .....	3
EXPERIMENTO 1: EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E HIDRÓLISE DO AMIDO .....	4
EXPERIMENTO 2: EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO DE COCO .....	6
EXPERIMENTO 3: DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DA GLICINA.....	9
EXPERIMENTO 4: EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE PROTEÍNAS DA SOJA .....	10
EXPERIMENTO 5: ESTUDO DA ENZIMA INVERTASE DE SOJA .....	14
EXPERIMENTO 6: ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	16
EXPERIMENTO 7: EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE DNA .....	20

## INFORMAÇÕES IMPORTANTES

### 1. OBJETIVOS DA DISCIPLINA

A disciplina Bioquímica Experimental aborda técnicas básicas de um laboratório de Bioquímica. O aluno deverá obter noções fundamentais sobre a metodologia geral empregada no estudo da estrutura e função das biomoléculas, desenvolver a habilidade de analisar, tratar matematicamente os resultados experimentais, tirar conclusões e desenvolver raciocínio crítico que permita análise objetiva dos resultados obtidos.

### 2. CADERNO DE LABORATÓRIO

Muitas práticas são desenvolvidas ao longo de mais de uma aula. Para um melhor aproveitamento da disciplina, cada aluno deverá ter um Caderno de Laboratório. Neste caderno devem constar todas as informações e dados obtidos durante a aula de forma que possam ser utilizados para a próxima prática e para a confecção do relatório. Também recomenda-se fazer um pré-relatório antes da aula contendo as informações e cálculos necessários para a execução do experimento a ser realizado.

### 3. REGRAS DE CONDUTA:

Durante as aulas devem ser seguidas todas as normas de segurança em laboratório aprendidas ao longo do curso de Química, incluindo uso de jaleco, sapato fechado, óculos de segurança e luvas. De acordo com as regras da UFSJ será exigido o uso de máscaras faciais cobrindo o nariz e a boca durante toda a aula.

A tolerância de atraso é de no máximo 10 minutos após o início da aula. Passado este tempo não será permitida a entrada no laboratório.

O aluno só estará liberado para ir embora após o término de todas as atividades ou após o tempo definido para o término da aula, salvo em casos extremos.

### 4. RELATÓRIOS

Após o término de cada tópico da disciplina, o grupo entregará um relatório sobre o(s) experimento(s) realizado(s). Aspectos a serem considerados na confecção do relatório:

- Deve ser um documento original, ou seja, produzido pelos próprios alunos do grupo. Cópias serão pontuadas com a nota zero;
- Em caso de ausência na aula, não será permitido fazer o relatório; Caso o relatório for referente a mais de uma aula, será descontada a pontuação apenas da aula que houve ausência.
- Na nota final do relatório será excluída a menor nota;
- Deve ser entregue uma cópia impressa e uma cópia em arquivo no formato “.doc” (word) ou “.pdf” aberto;
- Deve ser entregue nas datas indicadas no cronograma;
- Deve informar as atividades realizadas e os resultados obtidos de forma clara e objetiva. Precisa ser escrito de forma a permitir que outras pessoas realizem o mesmo procedimento baseado nas informações nele contidas.
- No relatório deverão constar, nesta sequência, os seguintes itens: página de capa; introdução; objetivos; metodologia; resultados e discussão; conclusão; bibliografia (regras ABNT).
- São aceitas como referência: livros, artigos científicos de revistas nacionais e internacionais, sites oficiais (governamentais ou de Instituições oficiais)

O relatório será corrigido seguindo a seguinte pontuação: Introdução 2,0; Objetivos: 0,5; Metodologia: 1,0; Resultados e discussão: 4,0; Conclusão: 1,5; Bibliografia: 1,0

## EXPERIMENTO 1: EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E HIDRÓLISE DO AMIDO

### PARTE A: EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AMIDO DA BATATA

#### MATERIAIS E REAGENTES

1 batata média	Dessecador	1 manta aquecedora p/balão de 250 mL
2 béqueres de 250 mL	1 balão de fundo redondo 250 mL	Ciclohexano
1 ralador	1"dean stark" graduado	Proveta de 100 mL
1 bastão de vidro	1 condensador de bolas	Funil de vidro
Folhas de gaze	Suporte para filtração	Balança
Pipeta de Pasteur	Pérolas de vidro	Faca
2 Suportes Universal	espátula	Copo plástico
Mangueira para refluxo	Garra comum e para condensador	Termômetro
Chapa de aquecimento	Frasco plástico com tampa	

#### PROCEDIMENTO

Descasque e rale uma batata média. Essa batata ralada será usada para os demais procedimentos.

##### Determinação da umidade da batata

- Adicione 5 g de batata ralada em um balão de 250 mL e adicione 50 mL de ciclohexano;
- Adicione pérolas de vidro
- Acople o balão a um "dean stark" a um condensador de bolas e aqueça o sistema, utilizando uma manta de aquecimento (a água deve entrar embaixo e sair em cima)
- Mantenha a mistura em ebulição por 1 hora. Em seguida quantifique o volume de água presente em 5 g de batata. Expresse o teor de umidade da batata, e calcule o teor de amido da mesma em relação à massa seca.

##### Extração do amido da batata:

- Aqueça água até cerca de 60°C
- Pese 50 g do material ralado transfira para um frasco plástico com tampa;
- Adicione 100 mL de água destilada quente (mínimo de 60 °C), agite vigorosamente.
- Filtre em folhas de gaze dobradas, coletando o filtrado em um béquer de 250 mL, deixe o filtrado em repouso até a precipitação do amido ( $\pm 25$  min.), retire o sobrenadante. Caso não seja obtido um precipitado branco, adicione mais 100 mL de água destilada, agite e filtre novamente, até obtenção de um precipitado branco.
- Após retirar o sobrenadante, deixe o sólido secando em dessecador até a próxima aula. Na aula seguinte, pese e calcule o rendimento da extração.

### PARTE B: CARACTERIZAÇÃO E HIDRÓLISE ÁCIDA DO AMIDO

#### MATERIAIS E REAGENTES

18 tubos de ensaio	2 conta gotas	Ácido Clorídrico
2 béqueres (250 mL)	Solução 1% de glicose	Reagente de Benedict***
1 béquer (50 mL)	Ácido sulfúrico	Reativo de Molisch *
Bastão de vidro	Erlenmeyer de 100 mL	Lugol**
Pipeta volumétrica de 1 mL	Banho-Maria	Bico de busen
Pipeta graduada de 5 mL		

\* Molish: 5,0 g de  $\alpha$ -naftol em 100 mL de ácido acético concentrado (95%).

\*\* Dissolver 10 g de KI em 100 mL de água destilada, e em seguida adicionar 5 g de cristais de iodo.

\*\*\*Reagente de Benedict: sulfato de cobre, citrato de sódio e carbonato de sódio

## PROCEDIMENTO

### 1- Preparo de 100,0 mL de uma solução de amido 1% m/v

- Ferva 75 mL de água destilada em um béquer de 250 mL.
- Pese um grama do amido extraído na aula anterior e em um béquer de 250 mL adicione 25 mL de água destilada na temperatura ambiente, agite fortemente até deixar todo amido em suspensão.
- Adicione a suspensão resultante na água em ebulição lentamente sob agitação constante. Mantenha em aquecimento e agitação até a formação de uma solução opalescente. Armazene em um frasco e identifique a solução de amido.

### 2- Ensaio de caracterização:

#### 2.1- Caracterização de carboidratos pelo teste de Molisch

- Utilizando três tubos de ensaios, adicione 1 mL da solução de amido no tubo A, 1 mL de água no tubo B e 1 mL da solução 1 % de glicose no tubo C, em seguida adicione 3 gotas da solução de  $\alpha$ -naftol em cada um dos três tubos, e com os tubos inclinados acrescente 2,0 mL de ácido sulfúrico de modo a não misturar os dois líquidos, em cada um deles. Observe e anote o resultado.

#### 2.2- Caracterização do amido com iodo

- Utilizando três tubos de ensaios, adicione 1 mL da solução de amido no tubo A, 1 mL de água no tubo B e 1 mL da solução 1% de glicose no tubo C, em seguida adicione 1 gota de lugol à cada tubo. Observe e anote o resultado.

### 3- Hidrólise ácida do amido

- Adicione 50 mL da solução de amido em um Erlenmeyer, aqueça o mesmo em banho-maria (em ebulição) por 10 minutos.
- Neste intervalo de tempo, prepare 2 conjuntos contendo seis tubos de ensaio cada. Um conjunto de tubos será usado para teste de lugol (conjunto L) e o outro conjunto será usado para o teste de Benedict (conjunto B). Para cada conjunto numere os tubos de 0, 5, 10, 20, 30, 40.
- Adicione 3 mL de HCl concentrado ao Erlenmeyer contendo o amido, agite em seguida marque o tempo e retire imediatamente 2 mL da mistura, adicionando 1,0 mL no tempo zero do conjunto L e 1 mL no tempo zero do conjunto B, resfrie os tubos em água corrente. Este será o controle negativo da hidrólise.
- Deixe o Erlenmeyer em banho fervente e retire alíquotas de 2 mL nos tempos 5, 10, 20, 30 e 40 minutos de hidrólise e paralise a reação diminuindo a temperatura em água corrente. Adicione 1 mL da alíquota de cada tempo no respectivo tubo do conjunto B e 1 mL no respectivo tubo do conjunto L.
- No conjunto B adicione
- e 2 mL do reagente de Benedict e deixe em banho-maria fervente por 5 minutos.
- No conjunto L, adicione 1 gota da solução de lugol em cada tubo, agite em temperatura ambiente, observe e anote o resultado.
- Repita o procedimento acima nos tempos 5, 10, 20, 30 e 40 minutos.

## EXPERIMENTO 2: EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO DE COCO

### PARTE A: EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE COCO UTILIZANDO EXTRATOR SOXHLET

#### MATERIAIS E REAGENTES

Aparelho Soxhlet	Três garras	Hexano	Papel de filtro
1 balão de fundo redondo	Manta aquecedora	balança	Algodão
Condensador de bolas	Suporte universal	Proveta (250 mL)	Coco ralado
1 béquer (500 mL)	Mangueiras		

#### PROCEDIMENTO

- Preparar um cartucho com o papel de filtro.
- Montar o sistema de extração conforme a Figura 1.

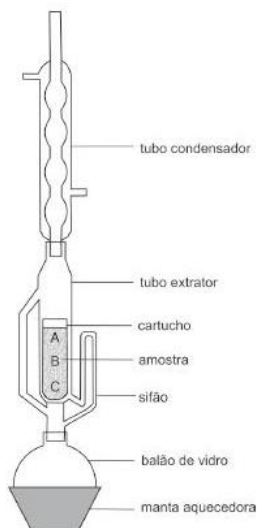


Figura 1 – Sistema de extração utilizando extrator Soxhlet.

- Pesar 20 g do material e adicionar no interior do cartucho.
- Fechar a extremidade superior do cartucho, dobrando o papel ou colocando algodão.
- Adicionar o cartucho no interior do sistema de extração (Figura 1)
- Inserir 200 mL hexano no balão (volume aproximadamente de 1,5 a 2 vezes o volume do copo do Soxhlet), juntamente com algumas pedras de porcelana.
- Aquecer o sistema de forma a observar o gotejamento do solvente condensado sobre o cartucho, aguardar pelo menos uma hora. No último ciclo remover o máximo de hexano possível.
- Retirar o cartucho e aquecer o sistema novamente para iniciar a separação do solvente, tomando o cuidado para o solvente não atingir o nível do sifão.
- Deixe o sistema resfriar, retire o solvente do copo do Soxhlet e colete a solução concentrada do balão.
- 
- Pesar um béquer e verter a amostra. Deixar em estufa por 1 semana.



## PARTE B: DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE IODO

O índice de iodo é medida do grau de insaturação de um determinado óleo ou gordura. É expresso pela quantidade de iodo em gramas para cada 100 gramas do óleo ou da gordura.

### MATERIAIS E REAGENTES

2 Erlenmeyers (250 mL) com tampa	Espátula	Óleo de coco
1 bureta (50 mL)	Pipeta volumétrica de 2 mL	Solução de amido 1 %
1 proveta de 100 mL	Pipeta volumétrica de 10 mL	Solução iodo bromada
Suporte universal e garras	Pipeta volumétrica de 25 mL	Solução de iodeto de potássio 15 %
Balança	Clorofórmio	Solução de tiossulfato de sódio 0,1 mol/L (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O)

### PROCEDIMENTO

- Adicione de 0,1 a 0,5 g de óleo de coco em um Erlenmeyer de 250 mL;
- Adicione ao mesmo Erlenmeyer 10 mL de clorofórmio e 25 mL da solução iodo-bromada;
- Feche o Erlenmeyer e o coloque em repouso por 60 minutos ao abrigo da luz e a temperatura ambiente. Obs: A coloração castanha da solução deve persistir após o tempo de incubação. Caso contrário o experimento dever ser refeito utilizando uma menor quantidade de óleo de coco.
- Em seguida, adicione 10 mL da solução de iodeto de potássio a 15% e 100 mL de água recém fervida e fria.
- Titule com a solução de tiossulfato de sódio 0,1 M até o aparecimento de uma fraca coloração amarela.
- Adicione de 1 a 2 mL da solução indicadora (amido 1%) e continue a titulação com o tiossulfato de sódio 0,1 mol/L até o desaparecimento da cor azul.
- Faça o mesmo procedimento simultaneamente para um controle (ausência do óleo).

### CÁLCULO

$$\text{Índice de iodo} = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 12,69}{P}$$

Onde:

M = molaridade da solução de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O;

V<sub>b</sub> = volume (mL) da solução de tiossulfato gasto na titulação do controle;

V<sub>a</sub> = Volume (mL) da solução de tiossulfato gasto na titulação da amostra;

P = massa da amostra em gramas.

**\*Preparo da solução iodo-bromada** - dissolva 13,2 g de iodo puro em 1 L de ácido acético glacial e adicione 3 mL de bromo)

## PARTE C: DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO

O índice de saponificação é o número que representa a massa (em miligramas) de hidróxido de potássio necessária para saponificar 1 g de óleo ou gordura.

### MATERIAIS E REAGENTES

1 balão de fundo redondo (250 mL)	Espátula	Óleo de coco
1 bureta (25 mL)	Balança	Solução alcoólica de hidróxido de potássio 0,5 mol/L
Condensador de bolas	Mangueiras	Ácido clorídrico 0,5 mol/L
Manta aquecedora para balão de 250 mL	Suporte universal e garras	Solução alcoólica de fenolftaleína 1 %
2 Erlenmeyers (250 mL)	Conta gotas	

### PROCEDIMENTO

- Adicione de 1,5 a 2,0 g de óleo de coco em um balão de 250 mL;
- Adicione ao mesmo balão, com o auxílio de uma bureta, 25 mL de uma solução alcoólica de hidróxido de potássio 0,5mol/L.
- Montar o sistema de refluxo e deixar em ebulição por 30 min (adicionar pérolas de vidros ou equivalente).
- Após o aquecimento, adicionar três gotas de fenolftaleína e titular com a solução de ácido clorídrico 0,5M.
- Um controle deve ser realizado. Para tal, titule 25 mL da mesma solução alcoólica de hidróxido de potássio utilizada para saponificar a gordura, com ácido clorídrico 0,5 mol/L.
- A diferença entre a quantidade de ácido clorídrico gastos, nas duas titulações é equivalente à quantidade de hidróxido de potássio necessária para saponificar a gordura;
- Cálculos:  
Para obter o índice de saponificação, multiplique a diferença entre os volumes gastos da solução de ácido clorídrico por 28 e divida pela massa de gordura utilizada.

### EXPERIMENTO 3: DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DA GLICINA

#### MATERIAIS E REAGENTES

Béquer de boca larga (100 mL)	Pipeta volumétrica (1mL)	Agitador magnético
Bureta (50 mL)	Glicina -0,02 M	Barra magnética
pHmetro	Ácido clorídrico- 1,0 mol/L	Suporte universal
Pipeta volumétrica (25mL)	Hidróxido de sódio -0,1 mol/L	

#### PROCEDIMENTO

- Coloque 25 mL da solução de glicina 0,02 mol/L em um béquer.
- Adicione 1,0 mL de HCl 1,0 mol/L.
- Agite e meça o pH, anotando o valor do mesmo no Quadro (volume 0).
- Adicione 0,5 mL de NaOH 0,1 mol/L, agite e meça o pH.
- Repita o procedimento anterior até obter um valor de pH igual a 12.
- Construa um gráfico de pH versus volume de 0,1 mol/L adicionado, em papel milimetrado ou Excel.

$V_{\text{NaOH}}$ adicionado (mL)	n	$\text{pH}_{(n)}$	$\Delta\text{pH} = \text{pH}_{(n+1)} - \text{pH}_{(n)}$	$\Delta^2\text{pH} = \Delta\text{pH}_{(n+1)} - \Delta\text{pH}_{(n)}$
0	1		-	-
0,5 mL	2			-
1,0 mL	3			
1,5 mL	4			
2,0 mL	5			
2,5 mL	6			
3,0 mL	7			
3,5 mL	8			

1) Construir os gráficos e fazer a análise de cada curva.

- $V(\text{NaOH}) \times \text{pH}$
- $V(\text{NaOH}) \times \Delta\text{pH}$
- $V(\text{NaOH}) \times \Delta^2\text{pH}$

2) Calcular o pKa do grupo amino da glicina

3) Discutir o procedimento para determinar o pKa do grupo carboxílico da glicina

## EXPERIMENTO 4: EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE PROTEÍNAS DA SOJA

A soja (*Glycine max L.*) é uma leguminosa de origem asiática que tem uma grande relevância na agroindústria mundial devido ao seu alto teor de proteínas e óleo. As proteínas da soja podem representar até 40 % do grão e têm uma grande variedade de aminoácidos essenciais, o que a torna uma fonte importante de proteína para alimentação. Dentre as proteínas presentes nos grãos estão proteínas de reserva, como glicinina e  $\beta$ -conglucina, além de enzimas e outras proteínas de funções diversas. Neste experimento será realizada a extração, análise e precipitação das proteínas da soja. Serão verificados os efeitos da concentração de sal na solubilidade da proteína, realizando-se as técnicas de *salting in* e *salting out*. Por fim, as amostras obtidas serão dessalinizadas por diálise. A amostra obtida na Parte A deste experimento será utilizada nas partes B e C do experimento 4 e também no experimento 5 (partes A e B) e experimento 6.

### PARTE A: EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS

#### MATERIAIS E REAGENTES

Gral e pistilo gelados	Centrífuga	Grãos de soja germinados
Funil de vidro	Conta gotas	NaCl 0,07 mol/L gelado
1 Erlenmeyer (250 mL)	Espectrofotômetro	10
		tubos para centrífuga
Proveta (100 mL)	1 béquer (250 mL)	Frasco para pesagem
Gaze (4 por grupo)	3 frascos pequenos (30 - 50 mL) por grupo	Balança
Bastão de vidro	Espátula	Banho de gelo
Termômetro	Garra para tubo	

#### PROCEDIMENTO

- Pesar 10 g de grãos de soja (pré-incubados em ambiente úmido de 2-3 dias).
- Macerar os grãos com gral e pistilo, juntamente com solução de NaCl 0,07 mol/L, por 5 minutos. O volume final de NaCl adicionado deve ser de 100 mL.
- Filtrar a mistura resultante utilizando gaze, meça o volume com o auxílio de uma proveta.
- Colocar o filtrado em tubos de centrífuga e deixá-los em banho de gelo até o momento da centrifugação.
- Centrifugar o extrato gelado por 10 minutos a 3000 rpm.
- Após a centrifugação, transferir o sobrenadante para um béquer e descartar o precipitado.
- Separar a amostra em três alíquotas.
- Armazenar o extrato em freezer.

#### TÓPICO A SER DISCUTIDO NO RELATÓRIO

- Solubilização de proteínas – *salting in*.

## PARTE B: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DO BIURETO

Nesta prática será feita uma curva analítica do teste do Biureto para correlação matemática entre concentração de proteínas e absorvância. Na segunda parte será determinada a concentração de proteínas na amostra preparada na aula anterior.

Obs: A amostra de proteína e a solução de BSA devem permanecer no banho de gelo durante toda a aula.

### MATERIAIS E REAGENTES

25 tubos de ensaio	Reagente de biureto (25 mL por grupo)
1 béquer (100 mL)	Banho de gelo (um por grupo)
1 béquer (50 mL)	Amostra de proteína preparada na aula anterior (previamente descongelada em geladeira)
2 pipetas graduadas de 5 mL	Albumina de soro bovino –BSA – 1 mg/mL (previamente descongelada em geladeira) - 25 mL por grupo
2 pipetas graduadas de 2 mL	1 pêra

### PROCEDIMENTO:

#### 1- Preparo do reagente Biureto:

Adicionar 1,5 g de sulfato de cobre penta hidratado, 9 g de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado, 300 mL de hidróxido de sódio 10% e completar o volume para um litro com água destilada.

#### 2- Preparo da curva analítica:

Preparar seis soluções de concentrações distintas a partir da solução estoque albumina do soro bovino (BSA) de 1,0 mg/mL, de acordo com o Quadro 1 (faça uma repetição de cada tubo).

**Quadro 1** – Volume de solução de BSA e de H<sub>2</sub>O para o preparo da curva analítica.

Tubo	Volume de BSA 1,0 mg/mL (mL)	Volume H <sub>2</sub> O (mL)	Volume reagente Biureto (mL)	Concentração de BSA mg/mL	Absorvância (500 nm) – R1	Absorvância (500 nm) – R2
1	0	4,00	2,0			
2	0,50	3,50	2,0			
3	1,00	3,00	2,0			
4	2,00	2,00	2,0			
5	3,00	1,00	2,0			
6	4,00	0	2,0			

- Agitar os tubos e deixá-los em repouso na temperatura ambiente por 30 minutos.
- Após este período fazer as leituras no espectrofotômetro a 500 nm. O tubo número 1 é o controle negativo do ensaio e pode ser usado para zerar o espectrofotômetro.
- Preencher o Quadro 1 com os valores das concentrações e as absorbâncias apresentadas pelas soluções. Traçar um gráfico de concentração *versus* absorvância.

- Anotar o número de identificação do espectrofotômetro no qual foi feita a curva padrão.

### 3- Determinação da concentração de proteína da amostra:

Para determinação da concentração de proteína na amostra (extrato de soja), a amostra deverá ser diluída 10 vezes.

– Adicionar 1 mL de amostra a 9 mL de água destilada

- Realizar o teste de Biureto com a amostra de acordo com o Quadro 2:

**Quadro 2** – Volume de solução da amostra e de H<sub>2</sub>O para quantificação da concentração de proteína. Realizar o ensaio em triplicata

Tubo	Volume de amostra (mL)	Volume H <sub>2</sub> O (mL)	Volume do reagente de Biureto (mL)	Abs R1	Abs R2	Abs R3
1 (controle negativo)	0	4,0	2,0			
3	1,0	3,0	2,0			
3	2,0	2,0	2,0			

- Agitar os tubos e deixá-los em repouso na temperatura ambiente por 30 minutos.
- Após este período fazer as leituras no espectrofotômetro a 500 nm.
- Usar a curva analítica obtida no item 2 para o cálculo da concentração de proteína na amostra. Considerar a diluição e o volume utilizado. Para o cálculo pode deve ser escolhido o tubo 2 ou 3 considerando o valor de absorvância encontrado (deve estar dentro da curva padrão).

### ITENS A SEREM DISCUTIDOS NO RELATÓRIO

- Princípios do Método do Biureto
- Curva analítica de concentração de proteínas *versus* absorvância.
- Quantificação da proteína na amostra (concentração e quantidade de proteína total).

### PARTE C: EFEITO DE SAL NA SOLUBILIDADE DE PROTEÍNAS

Esta prática está dividida em três partes. Primeiro, a amostra de proteína de soja será precipitada por sulfato de amônio. Na segunda parte a amostra será analisada pelo Método do Biureto para acompanhamento da eficiência. Por fim, a amostra será submetida à diálise para dessalinização.

### MATERIAIS E REAGENTES

3 pipetas graduadas (10 mL)	Pipeta Pasteur	Amostra de proteína preparada na aula anterior (previamente descongelada em geladeira)
Ponteiras para pipeta automática	20 tubos de ensaio	Solução gelada de sulfato de amônio saturada (cerca de 65 %).
1 Erlenmeyer (100 mL)	Centrífuga	
2 béqueres de 50 mL e 1 de 100 mL	Agitador magnético (1 por grupo)	Reagente de Biureto (6 mL por grupo)
Béquer de 2 L (1 por grupo)		
1 pipeta automática (1 mL)	1 barrinha magnética	Espectrofotômetro
1 pêra	Banho de gelo (um por grupo)	

2 provetas de 50 mL

## PROCEDIMENTO:

### 1- Precipitação da amostra proteica:

- Colocar 1 Erlenmeyer em banho de gelo. Adicionar 15 mL de amostra (anote o volume exato).
- Sob agitação, adicionar 20 mL da solução de sulfato de amônio usando uma pipeta Pasteur. A adição do sal deve ser lenta (pingar o sal encostando na parede interna do frasco e agitar). Agitar levemente a mistura por 3 minutos em banho de gelo.
- Após esse período centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos. Recolher os sobrenadantes em um béquer. Solubilizar o precipitado com um volume final de 7 mL de água destilada.

### 2- Determinação da concentração de proteína das frações pelo Método do Biureto:

- Diluir as amostras para quantificação da concentração de proteína (1 mL de amostra + 9 mL de água destilada)
- Identificar tubos de ensaio para análise das frações (sobrenadante e precipitado solubilizado).
- Em cada tubo de ensaio adicionar 1,0 mL da amostra correspondente, 3,0 mL de água destilada e 2,0 mL do Reagente de Biureto.
- Fazer um controle negativo contendo 4,0 mL de água destilada e 2,0 mL do Reagente de Biureto.  
Obs: Caso na aula anterior, o melhor volume para sua amostra tenha sido 2 mL, fazer o ensaio 2 mL de amostra + 2 mL de água + 2 mL de reagente de biureto.
- Agitar os tubos e deixá-los em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente.
- Ler a absorvância em espectrofotômetro a 500 nm.
- ATENÇÃO: utilizar o mesmo equipamento usado para fazer a curva padrão.

### ITENS A SEREM DISCUTIDOS NO RELATÓRIO

- Solubilidade de proteínas em alta concentração de sal (*salting out*);
- Cálculo do rendimento da precipitação;
- Preencher o quadro abaixo:

Amostra	Volume usado no ensaio	Diluição	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína (mg)	Rendimento (%)
Extrato de soja					
Precipitado					
Sobrenadante					

## EXPERIMENTO 5: ESTUDO DA ENZIMA INVERTASE DE SOJA

Enzimas são moléculas que catalisam reações químicas por diminuição de suas energias de ativação. Invertases ( $\beta$ -Fructofuranosidase, EC 3.2.1.26) são enzimas que catalisam a hidrólise de sacarose em glicose e frutose. Invertases microbianas têm sido utilizadas na indústria alimentícia para a produção de açúcar invertido, utilizado na preparação de geleias, doces e afins. Invertases também são produzidas por animais e plantas. Em sementes de soja, as invertases atuam no processo de germinação para obtenção de energia a partir dos carboidratos de reserva.

Para determinação da atividade de invertase da soja, o extrato enzimático será avaliado quanto à hidrólise de sacarose em pH e temperatura constantes. A quantificação dos produtos da reação será realizada pelo método do DNS. Este método tem como princípio a redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico em ácido 3-amino-5-nitro salicílico pelos açúcares redutores glicose e frutose em condições alcalinas e sob aquecimento.

### PARTE A: CURVA PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

#### MATERIAIS E REAGENTES

22 tubos de ensaio pequenos	Glicose 1,0 g/L
1 pipeta graduada de 5 mL	1 bandeja com água com gelo
2 pipetas graduadas de 2 mL	Reagente de DNS (3,5-ácido dinitrossalicílico + NaOH + tartarato de sódio e potássio)
1 pipeta volumétrica de 1 mL	1 Pinça de madeira
1 Pêra	1 béquer de 250 mL
Espectrofotômetro	2 grades para tubos
Banho maria 100 °C	

#### PROCEDIMENTO

Prepare seis soluções de glicose com concentrações distintas a partir da solução estoque de glicose 1 g/L, de acordo com o Quadro 1 (faça três repetições de cada tubo).

Quadro 1: Volumes de água e de glicose para o preparo da curva analítica

Tubo	Glicose 1 g/L (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	DNS (mL)	Glicose ( $\mu$ mol)	Abs. (540 nm) 1a	Abs. (540 nm) 1b	Abs. (540 nm) 1c
1	0	3,50	1,0				
2a, 2b, 2c	0,20	3,3	1,0				
3a, 3b, 3c	0,50	3,00	1,0				
4a, 4b, 4c	1,00	2,50	1,0				
5a, 5b, 5c	1,30	2,20	1,0				
6a, 6b, 6c	1,50	2,00	1,0				
7a, 7b, 7c	1,80	1,70	1,0				
8a, 8b, 8c	2,00	1,50	1,0				

- Colocar todos os tubos em banho fervente por 5 minutos
- Esfriar os tubos em banho de gelo até próximo à temperatura ambiente.
- Ler a absorvância em espectrofotômetro a 540 nm. O tubo 1 é usado para zerar o aparelho.
- Fazer a regressão linear para encontrar a equação da reta (Absorvância x glicose (micromol/mol)). A partir da equação da reta, encontrar a quantidade de glicose produzida pela enzima.
- A curva também pode ser feita Absorvância x glicose (micromol/mL). Neste caso será necessário usar um cálculo diferente para determinar a atividade enzimática.



## PARTE B: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE INVERTASE DE SOJA

### MATERIAIS E REAGENTES

7 tubos de ensaio pequenos	Extrato de proteína de semente de soja germinada previamente descongelado em geladeira.
1 pipeta volumétrica de 1 mL	Sacarose 100 mmol/L
2 pipetas graduadas de 2 mL	Tampão fosfato 200 mmol/L pH 7,5
1 pipeta graduada de 5 mL	Reagente de DNS (3,5-ácido dinitrossalicílico + NaOH + tartarato de sódio e potássio)
1 pipeta graduada de 1 mL	1 bandeja de água com gelo
1 Pêra	1 tubo de ensaio com tampa
Espectrofotômetro	
Banho maria 100 °C	
Banho maria 37 °C	
2 béquer de 50 mL	
1 béquer de 100 mL	
1 suporte para tubos	

### PROCEDIMENTO:

- Preparo do controle negativo (enzima desnaturada): Separar 5 mL do extrato proteico em um tubo de ensaio com tampa, fechar o tubo fracamente (deixar a tampa um pouco frouxa para evitar quebrar o tubo no banho). Levar ao banho fervente por 5 minutos. Após a fervura, homogeneizar a solução recolhendo a água condensada na parede do tubo.
- Para a quantificação da atividade enzimática, o extrato enzimático deverá ser misturado ao tampão e à solução de sacarose (substrato da reação) conforme indicado na Tabela 2. Também deverão ser preparados dois controles negativos, o branco e o T0 da reação (Tabela 2).

Tabela 2: Preparo dos tubos de branco, controle negativo e atividade

Branco (1 tubo)	Controle negativo (3 repetições)	Atividade R1	Atividade R2	Atividade R3
1- Água: 3,5 mL	1-Tampão: 1,5 mL 2- Enzima fervida: 1,5 mL 3- Sacarose: 0,5 mL	1- Tampão: 1,5 mL 2- Enzima: 1,5 mL 3- Sacarose: 0,5 mL	1- Tampão: 1,5 mL 2- Enzima: 1,5 mL 3- Sacarose: 0,5 mL	1- Tampão: 1,5 mL 2- Enzima: 1,5 mL 3- Sacarose: 0,5 mL

- Incubar todos os tubos a 37 °C por 30 minutos.
- Retirar os tubos do banho maria e adicionar 1 mL de DNS.
- Colocar todos os tubos em banho fervente por 5 minutos
- Esfriar os tubos em banho de gelo ou água fria até a temperatura ambiente.
- Ler a absorvância em espectrofotômetro a 540 nm. O tubo “branco” é usado para zerar o aparelho.
- Utilizando a curva padrão, calcular a quantidade de açúcares redutores que foram produzidos.
- Após a obtenção deste valor, calcule a atividade enzimática em na Unidade internacional (U): quantidade de produto liberado (micromol)/tempo de reação (min)/volume da solução enzimática (mL).
- 1 unidade de enzima corresponde à quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 micromol de produto por minuto de reação.

## EXPERIMENTO 6: ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida é uma técnica muito útil para estimar a massa molecular e o grau de pureza de proteínas. A eletroforese de gel de poliacrilamida também pode ser utilizada em associação com outras técnicas como zimogramas e espectrometria de massa para identificação e caracterização de proteínas.

### MATERIAIS E REAGENTES

Solução de Bis/Acrilamida	1 béquer de 1 L
Tampão do gel separador – Tris-HCl, pH 8,6	1 barrinha magnética
Tampão do gel empilhador – Tris-HCl, pH 6,8	1 béquer de 250 mL
Dodecil sulfato de sódio - SDS 10 %	1 béquer de 100 mL
TEMED: tetrametiletilenoamina	2 béquer de 50 mL
Persulfato de Amônia (PSA) -10% (Preparado no momento do uso)	1 pipeta automática de 1 mL e suas ponteiros
Tampão de extração: Tris-HCl 6,8, SDS, glicerol, azul de bromofenol	1 pipeta automática de 200 microlitros e suas ponteiros
Tampão de tanque: Tris-HCl 8,6, glicina, SDS	1 pipeta automática de 10 microlitros e suas ponteiros
Álcool comercial (96 %)	15 tubos de ensaio
Butanol	Papel higiênico
Solução corante	2 Recipientes descartáveis para pesagem
Solução descorante	1 espátula
Balança	Centrífuga
Agitador magnético	

### 2- PROCEDIMENTO:

#### 2.1- MONTAGEM DO GEL

a) Limpar a bancada, placas de vidro, espaçadores, pentes e demais equipamentos que serão utilizados na montagem do gel com álcool (comercial – 96 %).

b) Montar as plaquinhas do sistema fora do suporte.

c) Colocar a placa no suporte e testar se há vazamento.

d) Preparar o gel separador (quantidade para 1 minigel)

- 1,670 mL de água
- 1,25 mL de tampão Tris pH 8,6
- 2,0 mL de Bis/acrilamida
- 0,05 mL de SDS 10%
- 0,03 mL de PSA 10% (preparado no momento do uso)
- 0,01 mL de TEMED

\*TEMED deve ser aplicado à mistura somente no momento de derramar a mistura na placa.

e) Verter a solução do gel separador na placa até o limite demarcado para o gel empilhador.

**f)** Aplicar uma fina camada de butanol sobre a solução do gel separador derramada na placa para nivelar a porção superior do gel.

**g)** Esperar a completa polimerização do gel (15-20 minutos).

**h)** Retirar o butanol e lavar a extremidade superior do gel com água destilada.

**i)** Preparar o gel empilhador

- 3 mL de água
- 1,25 mL de tampão Tris pH 6,8
- 0,65 mL de Bis/acrilamida
- 0,05 mL de SDS 10%
- 0,025 mL de PSA 10%
- 0,015 mL de TEMED

**j)** Colocar o pente no gel

**k)** Verter o gel empilhador na placa. Importante observar que após a adição do TEMED à mistura, deve-se derramar o gel o mais rápido possível, pois a polimerização se processa de forma muito rápida.

**l)** Esperar a total polimerização do gel (Cerca de 20 minutos).

**Observação:** no momento de verter as soluções dos géis na placa (tanto separador como empilhador) atentar para a formação de bolhas de ar. A presença de bolhas de ar no gel inviabiliza o procedimento.

## **2.2- PREPARO DAS AMOSTRAS**

Amostra: extrato bruto de proteínas de soja (Experimento 4)

Centrifugar a amostra 5 minutos, 2500 rpm. Recolher o sobrenadante e diluir no tampão de extração em uma proporção 5:1 (amostra:tampão). Colocar em banho fervente por 5 minutos.

## **2.3- APLICAÇÕES DAS AMOSTRAS NO GEL E CORRIDA**

Após o preparo das amostras, estas devem ser aplicadas no gel.

**a)** Acoplar as placas no suporte.

**b)** Colocar tampão de tanque no espaço entre-placas até encobrir o gel (verificar possíveis vazamentos).

**c)** Utilizando uma pipeta, aplicar as amostras em suas respectivas raias (cerca de 20 microlitros).

**e)** Colocar o suporte contendo as placas de gel em uma cuba (específica do “Kit”).

**f)** Colocar tampão de tanque na cuba ate cobrir a parte inferior das placas (cerca de 1 cm acima).

**h)** Com o auxílio de uma seringa, eliminar bolhas de ar que possam ter se formado na parte inferior do gel.

**i)** Encaixar os eletrodos e ligar o aparelho para a execução da corrida. É recomendável utilizar uma voltagem de 100 – 150 mv para mini-géis.

**j)** Aguardar o término da corrida. Nestas condições, geralmente o tempo de corrida varia entre 2 e 3 h. A corrida está completa quando se pode perceber que o azul de bromofenol saiu pela parte inferior do gel.

## **2.4- COLORAÇÃO DO GEL:**

**a)** Ao término da corrida o gel deve ser cuidadosamente retirado da placa com o auxílio de uma espátula larga e colocado diretamente em um recipiente contendo água e agitado manualmente. Faça a lavagem com água por 3 vezes

para retirar o excesso de SDS. Posteriormente incube o gel em solução corante de Coomassie Brilliant blue. O gel deve permanecer na solução corante por pelo menos 4 horas sob agitação lenta e constante em um agitador magnético.

**b)** O gel deve ser descorado em solução descorante após 3 lavagens de 15 minutos (ou até as bandas ficarem visíveis). A descoloração do gel será realizada na próxima aula.

### **3 – ITENS A SEREM DISCUTIDOS NO RELATÓRIO:**

- Princípio da técnica de eletroforese e suas aplicações
- Função dos reagentes utilizados no preparo do gel e da amostra
- Resultados observados

#### **ADENDO:**

#### **PREPARO DAS SOLUÇÕES**

**a) Solução de Bis/Acrilamida:** 2,9 g de Acrilamida; 0,08 g de Bis acrilamida; completar para 10 mL com água. O preparo da solução de Bis/acrilamida deve ser feito na capela de exaustão e utilizando os devidos EPIs (essas substâncias são tóxicas antes serem polimerizadas). Os reagentes devem ser dissolvidos em água em um béquer envolto em papel alumínio devido a instabilidade destes reagentes quando expostos a luz. A solução deve ser filtrada em papel filtro e armazenada em um frasco fosco a 4°C. Esta solução possui uma vida útil de aproximadamente 3 meses.

**b) Tampão do gel separador - pH 8,6:** 4,5 g de Tris; 10 mL de água destilada. Ajustar o pH utilizando HCl concentrado. Completar para 25 mL com balão volumétrico. Armazenar a 4°C.

**c) Tampão do gel empilhador - pH 6,8 :** 1,5 g de Tris; 10 mL de água destilada. Ajustar o pH utilizando HCl concentrado. Completar para 25 mL com balão volumétrico. Armazenar a 4°C.

**d) Solução de SDS 10 %:** 2,5 g de Dodecil Sulfato de Sódio; 25 mL de água; armazenar em temperatura ambiente.

**e) Solução de Persulfato de Amônia (PSA) -10%:** Devido a grande instabilidade deste reagente, é recomendável que se prepare uma nova solução no momento do uso. Será preparado pelos alunos. 0,1 g de PSA; 1 mL de água.

**f) Tampão de extração:** 1,2 mL de tampão do gel empilhador; 2 mL de SDS 10 %; 1 mL de glicerol; 0,5 mL de solução de azul de bromofenol 0,5% (Esta medida pode ser substituída por um “traço” de azul de bromofenol em pó). Armazenar a temperatura ambiente ou a 4 °C.

**g) Tampão de tanque:** 3 g de Tris; 14 g de glicina; Ajustar o pH para 8,6; 10 mL de SDS 10%; Completar com água para 1 L em balão volumétrico. Armazenar a 4 °C.

**h) Solução corante:** 0,25 g de Coomassie; 50 mL de metanol 95%; 12 mL de ácido acético; 38 mL de água; Armazenar em temperatura ambiente.

**i) Solução descorante:** 100 mL de metanol 95 %; 24 mL de ácido acético; 76 mL de água. Armazenar em temperatura ambiente

## EXPERIMENTO 7: EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE DNA

Os ácidos nucleicos, DNA e RNA, são moléculas formadas por unidades monoméricas de nucleotídeos. Essas macromoléculas são as responsáveis pelo armazenamento e transmissão da informação genética dos seres vivos. Processo de extração de DNA é de fundamental importância para análises genéticas. Métodos de extração de DNA são usados em análises forenses, testes de paternidade, verificação de adulteração de alimentos e demais técnicas de Biologia Molecular. Nesta prática, será realizada a extração e quantificação do DNA de morango.

### MATERIAIS E REAGENTES

2 pipetas de 10 mL	Gaze (2 por grupo)
2 pipetas de 2 mL	Banho de gelo (um por grupo)
1 Pêra	Espectrofotômetro com leitura UV
Palito de madeira	Água fervida e resfriada (20 mL por grupo)
Erlenmeyer de 125 mL	Cubeta de Quartzo
Gral e pistilo gelados	Solução de lise
Proveta de até 50 mL	Etanol 95 % gelado
Funil	Fósforo
2 Béqueres de 50 mL	Morango
Faca	

### PROCEDIMENTO

#### PARTE 1: EXTRAÇÃO DO DNA

- Manter a amostra em banho de gelo durante todo o procedimento.
- Pesar 6 gramas de morango, colocar em um gral e adicionar 12 mL de solução de lise. Macerar. Deixar em repouso 5-10 minutos no banho de gelo.
- Filtrar a solução com gaze para retirar os fragmentos usando um Erlenmeyer para recolher o filtrado.
- Medir 10 mL do filtrado com uma pipeta e descartar o restante.
- Adicionar 20 mL de etanol 95 % gelado no Erlenmeyer e agitando levemente. O precipitado branco que se forma é o DNA.
- Recolher o DNA com um palito de madeira e solubilizar todos os precipitados em um único béquer contendo 5 mL água previamente fervida e resfriada.

#### PARTE 2: QUANTIFICAÇÃO DO DNA

- Diluir a amostra 10 vezes em água previamente fervida e resfriada.
- Ler a absorvância da amostra no espectrofotômetro em comprimento de onda 260 nm (leitura de DNA) e em comprimento de onda 280 nm (leitura de proteína).
- Quantificar o DNA. Uma unidade de absorvância A<sub>260</sub> é igual a 50 µg de DNA.
- Analisar a qualidade do DNA extraído pela relação A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>.

### TÓPICOS A SEREM DISCUTIDOS NO RELATÓRIO:

- Relevância da técnica de extração de DNA e outras metodologias disponíveis
- Quantificação de DNA por espectrometria UV
- Quantificação de proteína por espectrometria UV

- Resultados obtidos
- Função dos reagentes em cada etapa do processo

**Adendo:**

**Solução de lise:**

Pesar 0,15 g de Tris

Pesar 0,3 g de NaCl

Pesar 1,5 g de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)

Dissolver em 30 mL de água destilada (previamente fervida e resfriada)

Acertar o pH para 8 com NaOH (o EDTA só dissolve em pH 8)

Adicionar 2 g de SDS (dodecil sulfato de sódio)

Completar o volume em bureta ou balão volumétrico para 50 mL com água destilada previamente fervida e refriada.

**Água para solubilização do DNA:**

Ferver uma grande quantidade de água. Lavar a vidraria na qual a água irá ser armazenada e descartar a água.

Adicionar água destilada fervida no recipiente e armazenar em geladeira.