

PROTOS E MÉTODOS DE ANÁLISE EM LABORATÓRIOS DE BIOTECNOLOGIA AGROALIMENTAR E DE SAÚDE HUMANA

**RAUL ANTONIO SPEROTTO
(ORGANIZADOR)**



Raul Antonio Sperotto
(Organizador)

Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana

1ª edição



Lajeado, 2014



Centro Universitário UNIVATES

Reitor: Prof. Me. Ney José Lazzari

Pró-Reitor de Pesquisa, Extensão e Pós-Graduação: Prof. Me. Carlos Cândido da Silva Cyrne

Pró-Reitora de Ensino: Prof^a Ma. Luciana Carvalho Fernandes

Pró-Reitora de Ensino Adjunta: Prof^a Ma. Daiani Clesnei da Rosa

Pró-Reitora de Desenvolvimento Institucional: Prof^a Dr^a Júlia Elisabete Barden

Pró-Reitor Administrativo: Prof. Me. Oto Roberto Moerschbaecher



Editora Univates

Coordenação e Revisão Final: Ivete Maria Hammes

Editoração: Glauber Röhrig e Marlon Alceu Cristófoli

Capa: Marlon Alceu Cristófoli

Conselho Editorial da Univates Editora

Titulares

Adriane Pozzobon

Augusto Alves

Beatris Francisca Chemin

Fernanda Cristina Wiebusch Sindelar

Suplentes

Simone Morelo Dal Bosco

Ieda Maria Giongo

Rogério Schuck

Ari Künzel

Avelino Tallini, 171 - Bairro Universitário - Lajeado - RS, Brasil

Fone: (51) 3714-7024 / Fone/Fax: (51) 3714-7000

editora@univates.br / <http://www.univates.br/editora>

P967 Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia

Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana / Raul Antonio Sperotto (Org.) - Lajeado : Editora da Univates, 2014.

329 p.:

ISBN 978-85-8167-077-5

1. Biotecnologia 2. Práticas de laboratório I. Título

CDU: 57.08

Catálogo na publicação – Biblioteca da Univates

As opiniões e os conceitos emitidos, bem como a exatidão, adequação e procedência das citações e referências, são de exclusiva responsabilidade dos autores.

CURRÍCULO DOS AUTORES

Adriana Ambrosini da Silveira

Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular (UFRGS), pós-doutoranda do Departamento de Genética (UFRGS) (<http://lattes.cnpq.br/4636000029112033>).

Adriane Pozzobon

Bióloga, doutora em Ciências Biológicas (Fisiologia - UFRGS), professora do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) e do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/5326585242755050>).

Aline Marjana Pavan

Acadêmica do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/0811332135994458>).

Andressa Dametto

Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/1249822214187049>).

Ângela Gerhardt

Acadêmica do curso de Farmácia do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/0841500995401008>).

Ângela Maria Schorr-Lenz

Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/3812332236676109>).

Angélica Vincenzi

Acadêmica do curso de Biomedicina do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/5380183879387576>).

Bárbara Parraga da Silva

Acadêmica do curso de Farmácia do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/3582106380302090>).

Bruna Caye

Acadêmica do curso de Biomedicina do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/9481761048475826>).

Camile Wünsch

Acadêmica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/6131793092812460>).

Camille Eichelberger Granada

Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, doutora em Genética e Biologia Molecular (UFRGS), professora do Centro de Gestão Organizacional (CGO) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/1836592557536308>).

Cátia Viviane Gonçalves

Bióloga, Mestre em Ecologia (UFRGS), professora do Curso Técnico em Química e coordenadora do Programa Interno de Separação de Resíduos (PISR) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/0531032456221369>).

Cláudia Stein

Acadêmica do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/7439949615267705>).

Claucia Fernanda Volken de Souza

Química Industrial, doutora em Biologia Celular e Molecular (UFRGS), professora do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas (CETEC) e do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/4215540900949347>).

Claudimar Sidnei Fior

Engenheiro Agrônomo, doutor em Fitotecnia (UFRGS), professor do Departamento de Horticultura e Silvicultura e do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia (PPGFito) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (<http://lattes.cnpq.br/7123252970342522>).

Christina Venzke Simões de Lima

Bióloga, doutora em Ciência do Solo (UFRGS), pós-doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/5107170428996876>).

Dalana Faleiro

Acadêmica do curso de Biomedicina do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/2923943354106911>).

Débora Mara Kich

Biomédica, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/7806847826466246>).

Édina Aparecida dos Reis Blasi

Acadêmica do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/2796217997488696>).

Eduardo Cremonese Filippi-Chiela

Biomédico, doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (<http://lattes.cnpq.br/0726009160227341>).

Eduardo Miranda Ethur

Químico Industrial, doutor em Química (UFSM), professor do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas (CETEC) e dos Programas de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) e Ambiente e Desenvolvimento (PPGAD) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/0536800052883688>).

Elisete Maria de Freitas

Bióloga, doutora em Botânica (UFRGS), professora do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) e do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/7345668866571738>).

Felipe Klein Ricachenevsky

Biólogo, doutor em Biologia Celular e Molecular (UFRGS), pós-doutorando do Departamento de Botânica (UFRGS) (<http://lattes.cnpq.br/8426211793966484>).

Fernanda Oliveira Diefenthaler

Acadêmica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/6782494373104028>).

Giseli Buffon

Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/5834242560363551>).

Greici Raquel Wildner

Farmacêutica, mestre em Biotecnologia (Centro Universitário UNIVATES) (<http://lattes.cnpq.br/8813491136706454>).

Guilherme Liberato da Silva

Biólogo, mestre em Fitossanidade (UFPel) e doutorando do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (UFRGS) (<http://lattes.cnpq.br/9587693374011290>).

Guilherme Pinto Bertuzzi

Biólogo, mestre em Genética e Biologia Molecular (UFRGS), professor de Biologia para Educação Básica (<http://lattes.cnpq.br/3003425308133539>).

Isabel Cristina Gouvêa de Borba

Bióloga, mestre em Fisiologia Vegetal (UFPel), doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Botânica (UFRGS) (<http://lattes.cnpq.br/0233191758488472>).

Ivan Cunha Bustamante Filho

Médico Veterinário, doutor em Zootecnia - Produção Animal (UFRGS), professor do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) e do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/5447836974424243>).

Jorge Almeida Guimarães

Médico veterinário, doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) pela Escola Paulista de Medicina (UNIFESP), professor da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (UFRGS). Presidente da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (<http://lattes.cnpq.br/7063936568198850>).

Júlia Pasqualini Genro

Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular (UFRGS), professora da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/3177897348100996>).

Luana Maria Wollinger

Nutricionista, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/9547985850246718>).

Lucélia Hoehne

Química Industrial, doutora em Química (UFSM), professora do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas (CETEC) e do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/1088266827926373>).

Lucélia Santi

Bióloga, doutora em Biologia Celular e Molecular (UFRGS), pós-doutoranda no *Proteomic Mass Spectrometry Lab*, Department of Chemical Physiology, The Scripps Research Institute, La Jolla - CA, EUA (<http://lattes.cnpq.br/7154170979832540>).

Luciana Knabben Oliveira Becker Delving

Médica, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/1880043506615687>).

Marcia Ines Goettert

Farmacêutica, doutora em Ciências Farmacêuticas (Universidade de Tuebingen), professora do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) e do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/5742493416858879>).

Mardja Manssur Bueno e Silva

Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (<http://lattes.cnpq.br/6836121028944714>).

Marelise Teixeira

Acadêmica do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/4505465308986872>).

Markus Berger Oliveira

Farmacêutico, doutor em Biologia Celular e Molecular (UFRGS), pós-doutorando no Laboratório de Bioquímica Farmacológica do Centro de Biotecnologia (UFRGS) (<http://lattes.cnpq.br/8841487917492985>).

Mariano Rodrigues

Químico, mestre em Biotecnologia (Centro Universitário UNIVATES), professor dos cursos Técnicos em Química e Nutrição do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/8641590738904901>).

Matheus dos Santos Rocha

Biólogo, mestrando do Programa de Pós-Graduação em Diversidade Animal e Vegetal (UNISINOS) (<http://lattes.cnpq.br/2563225109320691>).

Mônica Jachetti Maciel

Bióloga, mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFRGS), professora do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/2575088289818885>).

Noeli Juarez Ferla

Biólogo, doutor em Ciências (USP), professor do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) e dos Programas de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) e Ambiente e Desenvolvimento (PPGAD) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/6071378790176893>).

Pâmela Maria Seibel

Acadêmica do curso de Farmácia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) (<http://lattes.cnpq.br/6364366001687822>).

Pricila Girardi

Biomédica, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/5365985945824906>).

Raquel Piccinini Castoldi

Acadêmica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/8418988355549553>).

Raul Antonio Sperotto

Biólogo, doutor em Biologia Celular e Molecular (UFRGS), professor do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) e do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/0884712531887046>).

Ronize Zeni da Silva

Acadêmica do curso de Biomedicina do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/4880476350854468>).

Thais Fernanda Dornelles

Acadêmica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/2666961265541421>).

Verônica Contini

Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular (UFRGS), professora do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) e do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/3166654315161244>).

Vinicius de Abreu Waldow

Biólogo, mestre em Biologia Celular e Molecular (UFRGS), pesquisador na área de Biotecnologia do Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello (Cenpes), da Petrobras (<http://lattes.cnpq.br/3283240828625036>).

Walter Orlando Beys da Silva

Biólogo, doutor em Biologia Celular e Molecular (UFRGS), professor do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) e do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES (<http://lattes.cnpq.br/1353100437268465>).

PREFÁCIO

O número de artigos científicos publicados vem aumentando significativamente nos últimos anos nas mais diversas áreas e nos principais países do mundo, entre eles o Brasil. Não somente a publicação de artigos originais cresce, mas também as revisões completas e, com isso, aumenta o número de periódicos, edições, novas subáreas, meios alternativos de divulgação etc. Em função disso, tanto pesquisadores, profissionais das áreas da Saúde, da Biologia, da Química, das Ciências Agrárias, de Alimentos e de Engenharias como estudantes de Ensino Médio, de nível técnico, de graduação e pós-graduação vêm sendo diariamente imersos em um volume cada vez maior de informação.

Até recentemente, nós, pesquisadores, tínhamos o desafio de encontrar informação em uma esfera muito mais limitada e algumas vezes de difícil acesso. Hoje, o nosso maior desafio é filtrar e, por muitas vezes, decifrar a informação resumida contida em artigos científicos mediante busca limitada por certo número de palavras-chave e outras normas que dificultam a reprodutibilidade de experimentos e de protocolos. Além disso, com o aumento do número de referências e citações, muitas vezes não fidedignas, e pequenas modificações e outras omissões não incorporadas em protocolos insuficientemente descritos em artigos, frequentemente torna-se difícil ou mesmo impossível a reprodução de experimentos básicos em muitos laboratórios e grupos de pesquisa.

A publicação *on-line* como livro eletrônico de “Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana” tem como objetivo central disponibilizar informações sobre o uso de metodologia científica já testada em vários laboratórios, tornando mais acessível e simplificada a aplicação de protocolos com enfoque multidisciplinar nas áreas biomédicas e de saúde, biológicas em geral, agrárias e de biotecnologia. Os autores deste livro são profissionais com formação e *background* científico bastante diversificado e apresentam os protocolos de modo não só a facilitar a busca das referências e citações, mas também para que pesquisadores e estudantes possam aplicá-los e reproduzi-los de maneira simples. A inserção de notas ou “dicas” durante a descrição completa dos protocolos gera alternativas de aplicação e revela a informação que muitas vezes não está descrita nos artigos e que é fundamental para a reprodutibilidade dos experimentos e ensaios.

Simplificar o acesso a protocolos importantes com aplicabilidade em diversas e diferentes áreas científicas é o primeiro passo para o sucesso dos experimentos no desenvolvimento dos projetos de pesquisa, base para o avanço científico e tecnológico e, principalmente, para a formação qualificada de recursos humanos em nível escolar, técnico, de graduação e de pós-graduação.

Prof. Dr. Jorge Almeida Guimarães
Presidente da CAPES

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

PREPARO DE SOLUÇÕES, TÉCNICAS BÁSICAS E UTILIZAÇÃO DE EQUIPAMENTOS DE ROTINA.....	15
1.1 SEGURANÇA NO LABORATÓRIO.....	16
1.2 PRINCIPAIS VIDRARIAS.....	18
1.3 PRINCIPAIS TIPOS DE ÁGUA EMPREGADOS NO LABORATÓRIO.....	22
1.4 LIMPEZA E DESCONTAMINAÇÃO DE VIDRARIAS.....	24
1.5 SOLUÇÕES DE LIMPEZA E SECAGEM DE MATERIAL.....	26
1.6 MEDIDAS DE VOLUMES DE LÍQUIDOS.....	28
1.7 AQUECIMENTO EM BANHO MARIA.....	31
1.8 AQUECIMENTO EM ALTAS TEMPERATURAS.....	32
1.9 AQUECIMENTO EM BICO DE BUNSEN.....	34
1.10 RESFRIAMENTO EMPREGANDO BANHO DE GELO.....	36
1.11 UTILIZAÇÃO DE EVAPORADOR ROTATÓRIO (ROTAEVAPORADOR).....	37
1.12 TRANSFERÊNCIA DE LÍQUIDOS.....	38
1.13 TRANSFERÊNCIA DE SÓLIDOS.....	39
1.14 TÉCNICAS DE PESAGEM.....	40
1.15 MÉTODOS DE PESAGEM.....	43
1.16 MEDIDAS DE VOLUME.....	45
1.17 PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR FILTRAÇÃO.....	50
1.18 PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR CENTRIFUGAÇÃO.....	52
1.19 PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO.....	53
1.20 PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR DECANTAÇÃO.....	54
1.21 TÉCNICAS DE PREPARO DE SOLUÇÕES.....	55

CAPÍTULO 2

EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS E PROTEÍNAS.....	58
2.1 EXTRAÇÃO DE DNA HUMANO A PARTIR DE SANGUE PERIFÉRICO – MÉTODO DE <i>SALTING-OUT</i>	59
2.2 EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS VEGETAIS.....	62
2.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE RAIZ.....	65
2.4 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO DE SOLO.....	67
2.5 EXTRAÇÃO DE DNA DE UM ISOLADO BACTERIANO.....	69
2.6 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO DIRETAMENTE DE AMOSTRAS DE LEITE.....	71
2.7 EXTRAÇÃO DE PLASMÍDEO (MINIPREP).....	73
2.8 EXTRAÇÃO DE RNA UTILIZANDO TRIZOL®.....	75
2.9 EXTRAÇÃO DE RNA DE AMOSTRAS VEGETAIS UTILIZANDO CONCERT™ PLANT RNA REAGENT.....	76
2.10 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE AMOSTRAS DE TECIDO DE MAMÍFEROS.....	77
2.11 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE AMOSTRAS VEGETAIS.....	78
2.12 QUANTIFICAÇÃO DE DNA UTILIZANDO O QUBIT®.....	80
2.13 QUANTIFICAÇÃO DE RNA UTILIZANDO O QUBIT®.....	81
2.14 QUANTIFICAÇÃO DE DNA E RNA UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRIA DE DENSIDADE ÓPTICA - L-QUANT®.....	82
2.15 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO O QUBIT®.....	84
2.16 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD.....	85

2.17 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE LOWRY	87
2.18 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO BCA	89

CAPÍTULO 3

GENOTIPAGEM DE POLIMORFISMOS EM AMOSTRAS HUMANAS	90
3.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	91
3.2 DIGESTÃO ENZIMÁTICA.....	93
3.3 ELETROFORESE EM GEL	94
3.4 METODOLOGIAS DE GENOTIPAGEM BASEADAS NA PCR.....	96

CAPÍTULO 4

ANÁLISES FISIOLÓGICAS EM AMOSTRAS VEGETAIS E ANIMAIS	100
4.1 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILAS.....	101
4.2 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS.....	102
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE CARBONILAÇÃO OU OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS	103
4.4 QUANTIFICAÇÃO DO NÍVEL DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA UTILIZANDO TBARS.....	105
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE VAZAMENTO DE ELETRÓLITOS (<i>ELECTROLYTE LEAKAGE ASSAY</i>).....	106
4.6 LOCALIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA UTILIZANDO O REAGENTE DE SCHIFF	107
4.7 LOCALIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DA PERDA DE ESTABILIDADE DE MEMBRANA UTILIZANDO O REAGENTE EVANS BLUE	108
4.8 LOCALIZAÇÃO HISTOQUÍMICA <i>IN SITU</i> DO ACÚMULO DE RADICAL SUPERÓXIDO (O ₂ ⁻)	109
4.9 LOCALIZAÇÃO HISTOQUÍMICA <i>IN SITU</i> DO ACÚMULO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂)	110
4.10 PREPARAÇÃO DO TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO (K ₂ HPO ₄) - 10 mM (0,01 M) - PH 7,8.....	111
4.11 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂).....	112
4.12 ANÁLISE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD), CATALASE (CAT), E ASCORBATO PEROXIDASE (APX).....	113
4.13 TESTE DE COMETA E MICRONÚCLEO	116
4.14 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE POR ALAMAR BLUE	130
4.15 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MTT.....	132
4.16 OXIDAÇÃO DE H ₂ DCF-DA PARA AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO INTRACELULARES.....	133
4.17 MARCAÇÃO COM IODETO DE PROPÍDEO PARA DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DO CICLO CELULAR	135
4.18 COMARCAÇÃO COM ANEXINA V-FITC / IODETO DE PROPÍDEO PARA ANÁLISE DE MORTE CELULAR	137
4.19 MARCAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA PARA AVALIAÇÃO DA ETAPA FINAL DO MECANISMO DE AUTOFAGIA	139
4.20 ENSAIO DE AGREGAÇÃO DE GFP-LC3 PARA MENSURAÇÃO DA ETAPA INICIAL DA AUTOFAGIA	141
4.21 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE MITÓTICO PARA INFERÊNCIA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	142
4.22 ATIVIDADE DE BETA-GALACTOSIDASE ÁCIDA ASSOCIADA À SENESCÊNCIA (SA-β-GAL)	143
4.23 ENSAIO CLONOGÊNICO PARA MENSURAÇÃO DA CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE CÉLULAS ÚNICAS	145
4.24 MARCAÇÃO DE BROMODEOXIURIDINA (BrdU) PARA AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	146
4.25 ANÁLISE MORFOMÉTRICA NUCLEAR (NMA) PARA INFERÊNCIA DE APOPTOSE, SENESCÊNCIA E IRREGULARIDADES NUCLEARES.....	148

CAPÍTULO 5

ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM NÍVEL DE RNA	150
5.1 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE RNA COM DNASE I® E DNASE TURBO®	151
5.2 SÍNTESE DE PRIMEIRA FITA DE CDNA UTILIZANDO A TRANSCRIPTASE REVERSA M-MLV®	152
5.3 SÍNTESE DE PRIMEIRA FITA DE cDNA UTILIZANDO A TRANSCRIPTASE REVERSA SUPERScript II®	153
5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR SEMI-QUANTITATIVO	154
5.5 PREPARAÇÃO DE UMA PLACA DE RT-qPCR (PCR EM TEMPO REAL) DE 48 POÇOS	157
5.6 CONFIGURAÇÃO DO EQUIPAMENTO STEPONE (APPLIED BIOSYSTEMS) PARA ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA	160

CAPÍTULO 6

ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM NÍVEL DE PROTEÍNA.....	161
6.1 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM CONDIÇÃO DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA – SDS PAGE	162
6.2 MÉTODOS DE COLORAÇÃO DE GÉIS SDS-PAGE.....	166
6.3 IMUNOIDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING.....	168

CAPÍTULO 7

PRODUÇÃO E ANÁLISE DE BIOPRODUTOS.....	171
7.1 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS.....	172
7.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO	172
7.3 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA	172
7.4 DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TITULÁVEL.....	173
7.5 DETERMINAÇÃO DO pH.....	175
7.6 DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA MINERAL (CINZAS).....	176
7.7 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE, VOLÁTEIS E SÓLIDOS TOTAIS.....	178
7.8 DETERMINAÇÃO DE LIPÍDIOS	180
7.9 DETERMINAÇÃO DO NITROGÊNIO TOTAL	181
7.10 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL	184
7.11 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS E NUTRICIONAIS DE PROTEÍNAS.....	186
7.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	191
7.13 DETERMINAÇÃO DA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO)	194
7.14 DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS.....	197
7.15 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS	200

CAPÍTULO 8

CULTURA DE CÉLULAS ANIMAIS.....	205
8.1 CULTURA E MANIPULAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES	206
8.2 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS FOLICULARES DE TIREOIDE HUMANA.....	210

CAPÍTULO 9

CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	213
9.1 PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES ESTOQUE PARA O MEIO MS	214
9.2 PREPARO DO MEIO DE CULTURA MS (MURASHIGE E SKOOG)	216
9.3 OBTENÇÃO E DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES	219
9.4 ESTABELECIMENTO DOS EXPLANTES E CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO	222

9.5 MANUTENÇÃO DAS PLANTAS MATRIZES	225
---	-----

CAPÍTULO 10

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

227

10.1 ISOLAMENTO DE DIAZOTRÓFICOS ENDOFÍTICOS DE RAIZ	228
10.2 ISOLAMENTO DE DIAZOTRÓFICOS DE SOLO RIZOSFÉRICO	231
10.3 ISOLAMENTO DE DIAZOTRÓFICOS FORMADORES DE ENDÓSPOROS DE SOLO RIZOSFÉRICO	232
10.4 ISOLAMENTO DE RIZÓBIOS	234
10.5 IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO E ESPÉCIE BACTERIANA	235
10.6 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS	237
10.7 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO	238
10.8 PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS BACTERIANOS	239
10.9 ATIVIDADE DA ENZIMA ACC DEAMINASE	241

CAPÍTULO 11

ANÁLISES BÁSICAS DE BIOINFORMÁTICA.....

242

11.1 DESENHO DE INICIADORES (<i>PRIMERS</i>) PARA PCR UTILIZANDO SOFTWARES ONLINE	243
11.2 VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DOS <i>PRIMERS</i> PROJETADOS	244
11.3 PREPARAÇÃO DE ARQUIVO CONTENDO SEQUÊNCIA NO FORMATO FASTA	246
11.4 OBTENÇÃO DE SEQUÊNCIAS REVERSO-COMPLEMENTAR	247
11.5 BUSCA DE SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIAS UTILIZANDO UM BANCO DE DADOS DE SEQUÊNCIAS E AS FERRAMENTAS BLAST (<i>BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL</i>)	248
11.6 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E PROTEÍNAS (ALINHAMENTO GLOBAL)	254
11.7 LOCALIZAÇÃO DE DOMÍNIOS CONSERVADOS EM SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS	256
11.8 PREDIÇÃO DE DOMÍNIOS TRANSMEMBRANA A PARTIR DE SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS	257
11.9 PREDIÇÃO DE LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR, PRESENÇA DE PEPTÍDEO DE DIRECIONAMENTO N-TERMINAL E DE SINAL DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR, A PARTIR DE SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS	258
11.10 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA REGIÃO PROMOTORA DE GENES ORIUNDOS DE GENOMAS DE PLANTAS	261
11.11 PREDIÇÃO DE SECREÇÃO E LOCALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS	263

CAPÍTULO 12

CRIAÇÃO E APLICAÇÃO DE ÁCAROS PARA CONTROLE BIOLÓGICO.....

265

12.1 CRIAÇÃO E APLICAÇÃO DE ÁCAROS PARA CONTROLE BIOLÓGICO	266
--	-----

CAPÍTULO 13

CÉLULAS FÚNGICAS: PRODUÇÃO, CONTAGEM E VIABILIDADE APLICADAS AO CONTROLE BIOLÓGICO

268

13.1 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE FUNGOS FILAMENTOSOS	269
13.2 PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE CONÍDIOS (ESPOROS) DE FUNGOS FILAMENTOSOS	271
13.3 CONTAGEM DA SUSPENSÃO DE CONÍDIOS OU LEVEDURAS	272
13.4 TESTE DE VIABILIDADE DA SUSPENSÃO DE CONÍDIOS	273
13.5 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE DE CONÍDIOS FÚNGICOS	274

CAPÍTULO 14

MODELOS BIOLÓGICOS PRÉ-CLÍNICOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE SUBSTÂNCIAS FARMACOLOGICAMENTE ATIVAS.....	275
14.1 MODELO DE TROMBOSE VENOSA LOCAL.....	276
14.2 MODELO DE TROMBOSE VENOSA PROFUNDA.....	279
14.3 MODELO DE HEMORRAGIA.....	282
14.4 MODELO DE ASMA ALÉRGICA.....	284
14.5 MODELO DE PERMEABILIDADE VASCULAR.....	286
14.6 MODELO DE GASTRITE.....	288
14.7 MODELO DE COLITE.....	290

CAPÍTULO 15

QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	292
15.1 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA: AZOCASEÍNA.....	293
15.2 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA: TRIPSINA.....	295
15.3 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA: TROMBINA + SUBSTRATO SINTÉTICO.....	298
15.4 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA: TROMBINA + FIBRINOGENIO.....	300
15.5 ATIVIDADE LIPOLÍTICA, LIPASE: TITULAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS.....	302
15.6 ATIVIDADE LIPOLÍTICA, LIPASE: P-NITROFENIL-PALMITATO.....	304
15.7 ATIVIDADE AMIOLÍTICA.....	307
15.8 ATIVIDADE CELULÁSICA.....	309

CAPÍTULO 16

DETECÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA ATRAVÉS DE GÉIS DE ATIVIDADE/ ZIMOGRAMAS.....	311
16.1 GEL DE ATIVIDADE (ZIMOGRAMA) PARA DETECÇÃO DE QUITINASES (ST LEGER ET AL. 1993).....	312
16.2 GEL DE ATIVIDADE (ZIMOGRAMA) PARA DETECÇÃO DE PROTEASES (MODIFICADO DE ST LEGER ET AL. 1993).....	315
16.3 GEL DE ATIVIDADE (ZIMOGRAMA) PARA DETECÇÃO DE LIPASES E ESTERASES (TEO ET AL. 2003)....	317
16.4 GEL DE ATIVIDADE (ZIMOGRAMA) PARA DETECÇÃO DE CATALASES (ZIMMERMANN ET AL. 2006).....	319
16.5 GEL DE ATIVIDADE (ZIMOGRAMA) PARA DETECÇÃO DE SUPERÓXIDO DISMUTASES.....	321

CAPÍTULO 17

GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS EM LABORATÓRIOS DE BIOTECNOLOGIA.....	324
17.1 BROMETO DE ETÍDIO.....	325
17.2 ACRILAMIDA.....	327
17.3 FENOL.....	328

CAPÍTULO 1

PREPARO DE SOLUÇÕES, TÉCNICAS BÁSICAS E UTILIZAÇÃO DE EQUIPAMENTOS DE ROTINA

Claucia Fernanda Volken de Souza, Christina Venzke Simões de Lima,
Eduardo Miranda Ethur, Lucélia Hoehne, Mariano Rodrigues

Laboratório pode ser definido como o local construído com a finalidade de se realizar diferentes experimentos. A importância do laboratório na pesquisa, em escala industrial ou acadêmica, em qualquer de suas especialidades, seja química, dimensional, elétrica e biológica, baseia-se no exercício de suas atividades sob condições ambientais controladas e normatizadas. Esta é a forma de assegurar que não ocorram influências estranhas que alterem o resultado do experimento ou medição e, ainda, de modo que garanta a repetição do estudo em outro laboratório e com a mesma exatidão nos resultados (Oliveira et al., 2007). No entanto, o laboratório é um local de trabalho com potenciais riscos de acidentes, tendo em vista que se manipulam substâncias com uma periculosidade considerável e, que se indevidamente utilizadas, podem causar danos graves ao usuário do laboratório (Chambel, 2014), seja ele aluno, laboratorista ou professor.

Neste capítulo inicial, tem-se o objetivo de evidenciar as técnicas e procedimentos básicos que são usados em laboratórios de química e áreas afins para auxiliar profissionais desta área a ter uma uniformidade na execução dos métodos e diminuir ao máximo qualquer interferente, para que sejam obtidos resultados confiáveis.

Referências:

CHAMBEL, Silvia. **Segurança no laboratório**. 2005. Disponível em: <http://www.ideiasambientais.com.pt/seguranca_laboratorio.html>. Acesso em: 21 jan. 2014.

OLIVEIRA, C. M. A. et al. **Guia de laboratório para o ensino de química: instalação montagem e operação**. CRQ-IV: São Paulo, 2007. 53 p.

1.1 SEGURANÇA NO LABORATÓRIO

Em qualquer atividade de laboratório é necessário conhecer os procedimentos básicos de segurança, tais como:

- Verificar a existência de Equipamento de Proteção Coletiva (EPC) no laboratório. Ex.: capela de exaustão, chuveiro de emergência, lavador de olhos, cobertor de segurança, extintor de incêndio no prazo de validade.
- O laboratório deve ter uma caixa de primeiros socorros (água oxigenada, mercúrio, algodão, esparadrapo, material para curativo, vaselina, luva cirúrgica). Qualquer acidente deverá ser comunicado ao responsável do laboratório.
- Não deve ser permitida a entrada de pessoas estranhas na área de trabalho do laboratório.
- Não retirar os ralos protetores dos orifícios de evacuação das pias.
- Verificar (ler) o rótulo dos frascos antes de usá-los.
- Manter as amostras e frascos de reagentes arrolhadas ou tampadas quando estes não estiverem sendo utilizados.
- Lubrificar as bordas da boca do tubo de vidro ao tampá-los com rolha. No caso de rolhas de borracha, usar glicerina como lubrificante.
- Não manter contato de soluções alcalinas com bordas esmerilhadas tampadas por longos períodos (algumas horas), pois o vidro pode soldar, inutilizando a peça.
- Use sempre óculos de segurança: é essencial proteger os olhos quando estiver no laboratório, mesmo que não esteja diretamente envolvido em um experimento. Os óculos devem ser usados mesmo quando estiver lavando materiais, pois podem respingar fragmentos do material. Caso qualquer produto químico atinja seus olhos, vá ao lava-olhos e lave seu olhos e face com grande quantidade de água. Caso não haja um lava-olhos adequado faça esse procedimento em uma torneira.
- Não acender o bico de Bunsen sem antes verificar: vazamento nas saídas da mangueira e na própria, obstruções na mangueira, existência de inflamáveis na proximidade, regulagem ideal da abertura da chama.
- Cuide com chamas no laboratório: deve-se ter cuidado ao usar fósforo ou chamas. Antes de utilizar o fogo verifique sempre que tipos de reagentes seus colegas próximos estão trabalhando, pois substâncias inflamáveis são uma fonte em potencial de incêndio.
- Evite contato com reagentes e substâncias: use sempre luvas apropriadas ao manusear substâncias químicas. Reduza sempre a sua exposição ao produto ao mínimo, pois a exposição excessiva e repetida pode provocar problemas de saúde. O laboratório deve ser bem arejado e a manipulação com os reagentes deve ser realizada em capelas. Evite verificar os odores das substâncias.
- Jamais despeje resíduos na pia, utilize sempre recipientes adequados e identificados com as substâncias presentes.
- Não coma ou beba no laboratório; há sempre risco de contaminação de comida ou bebida com material potencialmente perigoso.
- Use vestimentas adequadas no laboratório: deve-se sempre usar jaleco de mangas longas de material não sintético, sapatos fechados e calças compridas. Caso tenha cabelo longo, mantenha-o sempre preso. Em caso de operações com maior grau de risco deve-se utilizar "toucas".
- Utilize luvas adequadas (de amianto) para a proteção contra calor e frio. Jamais se deve pipetar qualquer produto com a boca.
- Não leve as mãos na boca ou olhos quando estiver manuseando produtos químicos.
- Mantenha as bancadas sempre limpas e livres de materiais estranhos ao trabalho.
- Deve-se sempre rotular, imediatamente, qualquer reagente, solução preparada ou amostra coletada.
- Não utilize materiais de vidros trincados.

- Ao utilizar uma capela sempre verifique se a mesma está limpa e o sistema de exaustão está operando corretamente. Mantenha as janelas da capela com o mínimo de abertura possível, evitando sempre colocar o rosto para dentro da mesma.
- Se a toxicidade do produto for elevada, utilize máscara contra gases. No caso de diluições, sempre derramar o ácido sobre a água, nunca o contrário.
- Antes de usar qualquer aparelho, certifique-se que sabe manuseá-lo. Leia as instruções ou peça uma demonstração ao instrutor.
- Ao ligar qualquer aparelho à corrente elétrica, certifique-se do estado da fiação, tomadas e plugues, compatibilidade da voltagem do aparelho com a da rede elétrica, aterramento, condições da superfície de contato com o aparelho (não deve estar úmida) e da existência de produtos inflamáveis na proximidade.
- Colocar os lixos (seco, orgânico, contaminado, tóxico, vidros etc) em recipientes adequados. Não jogar na pia ou local indevido.
- Deve-se lavar as mãos antes de sair do laboratório.
- Ao sair do laboratório, verificar se as torneiras de água e gás (neste caso, inclusive o registro) estão fechadas, aparelhos desligados e janelas trancadas.

Referências:

CHRISPINO, Álvaro. **Manual De Química Experimental**. São Paulo: Editora Ática. 2ª Edição, 1994. 230 p.

CIENFUEGOS, Freddy. **Segurança No Laboratório**. Rio De Janeiro: Interciência, 2001. 269 p.

LENZI, Ervim et al. **Química Geral Experimental**. Rio De Janeiro: Freitas Bastos, 2009. 390 p.

PAVIA, Donald L. et al. **Química Orgânica Experimental: Técnicas De Escala Pequena**. Porto Alegre: Bookman, 2009. 880 p.

POSTMA, James M.; ROBERTS, Julian L.; HOLLENBERG, Leland. **Química No Laboratório**. Barueri, SP: Manole, 5ª Edição, 2009. 546 p.

ROSA, Gilberto; GAUTO, Marcelo; GONÇALVES, Fábio. **Química Analítica: Práticas De Laboratório**. Porto Alegre: Bookman, 2013. 128 p.

UNIFEB. **Apostila de Química Geral e Experimental**. 2009. Disponível em: <http://xa.yimg.com/kq/groups/24693296/1821154571/name/UNKNOWN_PARAMETER_VALUE>. Acesso em: 30 mar. 2014

1.2 PRINCIPAIS VIDRARIAS

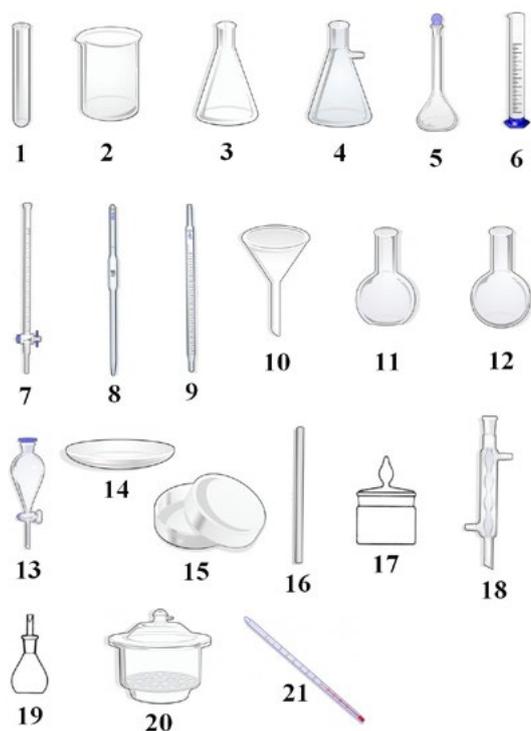
Nos laboratórios de pesquisa, encontram-se diversos tipos de vidrarias, materiais cerâmicos e demais utensílios específicos para a execução de determinadas análises e preparo de amostra, os principais são:

1.2.1 Materiais de vidro:

- Tubo de ensaio – utilizado para efetuar reações químicas em pequena escala, principalmente testes de reações (Figura 1.1).
- Bequer – recipiente com ou sem graduação, utilizado para o preparo de soluções, aquecimento de líquidos, recristalização, etc. (Figura 1.2).
- Erlenmeyer – frasco utilizado para aquecer líquido ou fazer titulações (Figura 1.3).
- Kitassato - frasco de paredes espessas, munido de saída lateral e usado em filtrações a vácuo (Figura 1.4).
- Balão volumétrico – recipiente calibrado, de precisão, destinado a conter um determinado volume de líquido, a uma dada temperatura; utilizado no preparo de soluções de concentração definidas (Figura 1.5).
- Proveta – frasco com graduações, destinado a medidas aproximadas de líquidos (Figura 1.6).
- Bureta – equipamento calibrado para medida precisa de volume de líquidos. Permite o escoamento do líquido e é muito utilizado em titulações (Figura 1.7).
- Pipeta volumétrica – equipamento calibrado para medida precisa de volume de líquidos. Existem dois tipos: pipeta graduada e pipeta volumétrica (Figura 1.8 e 1.9).
- Funil - utilizado na transferência de líquidos de um frasco para o outro ou para efetuar filtrações simples (Figura 1.10).
- Balão de fundo chato ou de Florence – utilizado para armazenar líquido e em destilações (Figura 1.11).
- Balão de Fundo Redondo - usado para aquecimento de líquidos e para realizar reações que envolvam desprendimento de gases (Figura 1.12).
- Funil de separação – equipamento utilizado na separação de líquidos imiscíveis (Figura 1.13).
- Vidro de relógio – usado geralmente para cobrir béquer contendo solução ou par evaporação em análise de líquidos (Figura 1.14).
- Placa de Petri - usada para cobrir cristalizadores, para o desenvolvimento de culturas (Figura 1.15).
- Bastão de vidro – utilizado na agitação e transferência de líquidos (Figura 1.16).
- Pesa filtro – recipiente destinado à pesagem de sólidos (Figura 1.17)
- Condensador – equipamento utilizado para condensação de vapores em destilações ou aquecimento sob refluxo (Figura 1.18).
- Picnômetro - utilizado na determinação da densidade de líquidos (Figura 1.19).
- Dessecador – utilizado no armazenamento de substâncias quando se necessita de uma atmosfera com baixo teor de umidade (Figura 1.20).
- Termômetro – utilizado para medir a temperatura de substâncias ou do ambiente (Figura 1.21)

A Figura 1 ilustra os materiais de vidro mais comuns utilizados em um laboratório.

Figura 1. Materiais de vidro de uso em laboratórios de química e áreas afins.



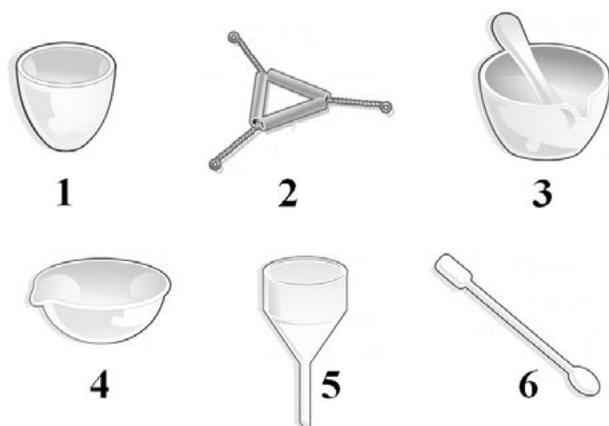
Fonte: Blog de vidraria de laboratório (2014).

1.2.2 Materiais de porcelana

- Cadinho – usado para calcinação de substâncias (Figura 2.1)
- Triângulo de porcelana – utilizado para sustentar cadinhos de porcelana em aquecimento no bico de Bunsen (Figura 2.2)
- Almofariz e pistilo – empregado para triturar e pulverizar sólidos (Figura 2.3).
- Cápsula de porcelana – usada para efetuar evaporações de líquidos (Figura 2.4).
- Funil de Buchner – utilizado em filtrações por sucção, devendo ser acoplado a um Kitassato (Figura 2.5).
- Espátula – usada para transferir substâncias sólidas (Figura 2.6).

A Figura 2 ilustra os materiais de porcelana mais comuns utilizados em um laboratório.

Figura 2. Materiais de porcelana de uso em laboratórios de química e áreas afins

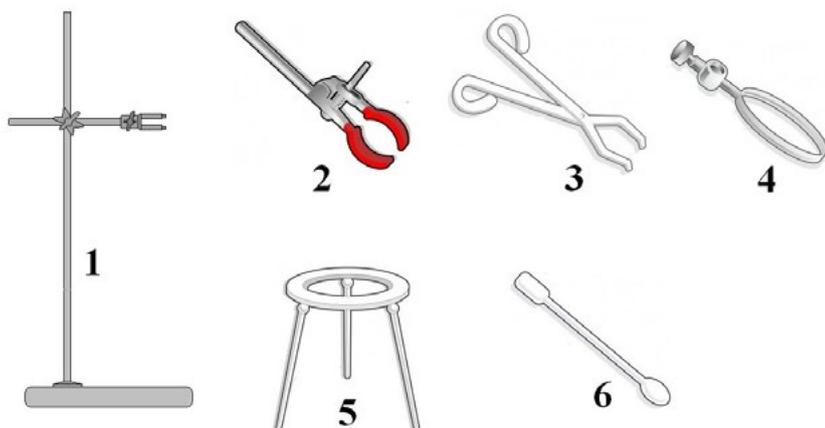


Fonte: Blog de vidraria de laboratório (2014).

1.2.3 Material Metálico

- Suporte (ou haste), mufa e garra – peças metálicas usadas para montar aparelhagens em geral (Figura 3.1).
- Garra metálica – usada para prender condensador, buretas, balões à haste do suporte universal. (Figura 3.2)
- Tenaz – usado para segurar objetos aquecidos (Figura 3.3)
- Argola – sustenta o funil na filtração (Figura 3.4)
- Tripé – usado como suporte, principalmente de telas ou triângulos (Figura 3.5)
- Espátula - similar a de porcelana é de uso mais comum devido ao preço e a grande variedade de formatos, contudo tem limitações quanto ao ataque por substâncias corrosivas (Figura 3.6).

Figura 3. Utensílios metálicos de uso em laboratório de química e áreas afins.



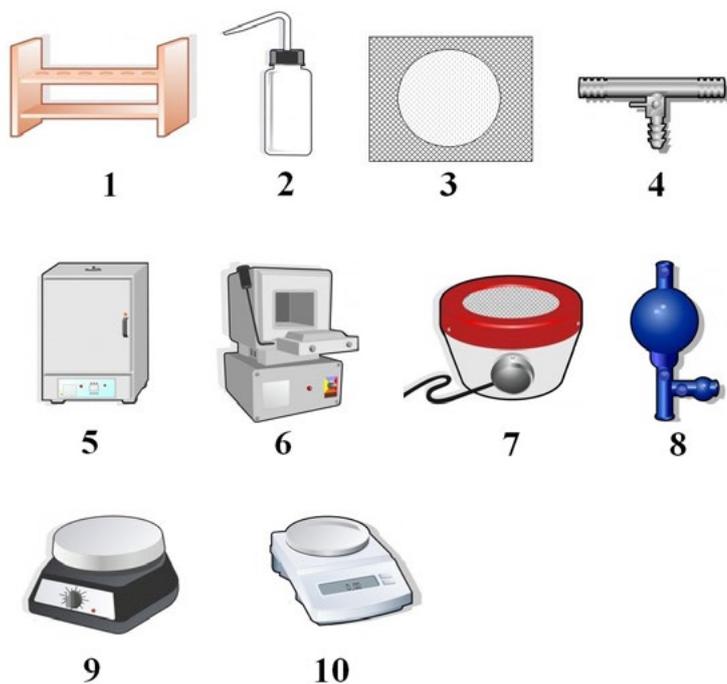
Fonte: Blog de vidraria de laboratório (2014).

1.2.4 Materiais Diversos

- Suporte (ou estante) – tubo para ensaios (Figura 4.1).
- Pisseta – frasco plástico, geralmente contendo água destilada (ou outro solvente), usado para efetuar a lavagem dos recipientes com jatos de líquido nela contido (Figura 4.2).
- Tela de amianto – Tela metálica, contendo amianto, utilizada para distribuir uniformemente o calor durante o aquecimento de recipientes de vidro à chama de um bico de gás (Figura 4.3).
- Pinça de madeira ou prendedor – utilizado para segurar tubos de ensaio.
- Trompa d'água – dispositivo para aspirar o ar e reduzir a pressão no interior de um frasco (Figura 4.4).
- Estufa – utilizada para a secagem de materiais (por aquecimento), em geral até 200 °C (Figura 4.5).
- Mufla ou forno – utilizado para calcinação de substâncias (por aquecimento), em geral até 1000 ou 1500 °C (Figura 4.6).
- Pipetador tipo pêra – usado em conjunto com uma pipeta ajuda a “puxar” e “expelir” pequenos volumes de líquido (Figura 4.7)
- Manta aquecedora – equipamento usado juntamente com um balão de fundo redondo: é uma fonte de calor que pode ser regulada quanto à temperatura (Figura 4.8)
- Agitador magnético – utilizado no preparo de soluções em reações químicas quando se faz necessário uma agitação constante (Figura 4.9)

- Balança analítica – é usada para se obter massa com alta exatidão. Balanças semi-analíticas são também usadas para medidas nas quais a necessidade de resultados confiáveis não é tão necessária (Figura 4.10)

Figura 4. Diversos materiais de uso comum em laboratórios químicos e áreas afins.



Fonte: Blog de vidraria de laboratório (2014).

Referências:

BLOG DE VIDRARIA DE LABORATÓRIO. **Relação de produtos mais utilizados em laboratórios**. Disponível em: <<http://www.vidrariadelaboratorio.com.br>>. Acesso em: 09 jun. 2014

UNIFEB. **Apostila de Química Geral e Experimental**. 2009. <http://xa.yimg.com/kq/groups/24693296/1821154571/name/UNKNOWN_PARAMETER_VALUE>. Acesso em 30 mar 2014

SILVA, R. R. Da; Bocchi, N.; Filho, R. C. R. **Introdução à Química Experimental**. São Paulo: McGraw-Hill, 1990.

Técnicas Laboratoriais Básicas. Disponível em: <<file:///C:/Users/user/Documents/UNIVATES/Ebooks%20finais/3c063ab671ad9b66895ffa8f310ab5c4.pdf>>. Acesso em: 31 mar 2014.

TRINDADE, D. F et al. **Química - básica experimental**. São Paulo: Cone, 1998.

1.3 PRINCIPAIS TIPOS DE ÁGUA EMPREGADOS NO LABORATÓRIO

A água é um dos principais solventes da natureza, sendo o principal constituinte do corpo dos seres vivos. Desta maneira, os ensaios laboratoriais que envolvem o uso da água devem ser feitos com água de qualidade comprovada.

A primeira maneira de purificar a água para uso laboratorial é a destilação, que imita o processo natural da evaporação.

A água destilada é empregada em praticamente todos os trabalhos de laboratório. A destilação da água é composta por duas etapas. Na primeira etapa, alguns elementos volatilizam antes da ebulição da água. Na segunda, ocorre a destilação da água propriamente dita. À medida que a água em ebulição evapora, ocorre a condensação da mesma em uma coluna de destilação, onde o vapor d'água é resfriado. A água que se condensa pela coluna de destilação (destilado) é recolhida em recipiente adequado, no fim da coluna de destilação.

1.3.1 Água destilada

A água destilada é empregada em praticamente todos os trabalhos de laboratório. A destilação da água é composta por duas etapas. Na primeira etapa, alguns elementos volatilizam antes da ebulição da água. Na segunda, ocorre a destilação da água propriamente dita. À medida que a água em ebulição evapora, ocorre a condensação da mesma em uma coluna de destilação, onde o vapor d'água é resfriado. A água que se condensa pela coluna de destilação (destilado) é recolhida em recipiente adequado, no fim da coluna de destilação.

1.3.2 Água bidestilada

Em certos casos, a água destilada comum não é suficientemente pura, tornando-se necessário preparar água destilada por processos especiais.

A água destilada obtida por meio da ebulição da água da torneira e condensação do vapor é livre dos constituintes não voláteis, como os íons sódio, potássio, cálcio, magnésio, ferro, cloreto, sulfato, carbonato, silicato etc. Uma parte, porém, destes constituintes pode ser arrastada mecanicamente durante a destilação.

Os constituintes voláteis originariamente presentes na água, como o dióxido de carbono e a amônia, ou que se formaram durante a destilação em consequência da decomposição de matéria orgânica, acompanham a água no processo de destilação. Outra fonte de contaminação é a constituída pelos materiais de que são fabricados os aparelhos. Se o condensador for, por exemplo, de vidro, a água destilada será contaminada em virtude da ação dissolvente que o vapor exerce sobre este material. Quando se faz uso de condensadores de cobre, a água conterà traços deste material, que pode ser altamente prejudicial em certos casos, principalmente se a presença do cobre é capaz de exercer uma ação catalítica.

Os melhores materiais para a construção dos condensadores são o estanho e o quartzo. A água destilada armazenada em frascos de vidro, mesmo tratando-se de vidro resistente, sofre contaminação apreciável. Em muitos casos, utiliza-se mais de uma destilação da água destilada, seguida de processos de deionização.

1.3.3 Água Deionizada

Este processo consiste na passagem da água em colunas contendo resinas trocadoras de íons – troca catiônica e aniônica. A troca catiônica captura os cátions dissolvidos na água, liberando íons H^+ . Já na troca aniônica, a resina absorve os ânions dissolvidos na água, liberando íons OH^- . Estas

resinas, com o passar do tempo, tornam-se saturadas de íons das impurezas da água. Este momento é detectado por um pequeno condutivímetro embutido no deionizador. Após um processo de renovação ou reciclagem, estas colunas podem ser reaproveitadas no deionizador.

1.3.4 Água ultrapura

Água ultrapura é uma água de extrema pureza, isenta de partículas, íons e substâncias orgânicas ou micro-organismos. É obtida pela passagem da água por sistemas de abrandamento como resinas trocadoras, que substituem o cálcio e o magnésio dissolvido na água por íons de Sódio, seguido de sistema de osmose reversa, que faz a remoção desses íons, seguido de um refinamento por uma série de filtros constituídos de resinas catiônicas e aniônicas, um leito de carvão ativo para remoção de contaminantes orgânicos e, finalmente, um filtro físico para remoção de particulados. É usado em laboratórios analíticos onde se requer uma água de altíssima pureza como, por exemplo, nas análises por HPLC.

Referências:

MABIC, S. Maintaining water quality in clinical chemistry. *Advance for Medical Laboratory Professionals*, v. 15, n. 8, 2007.

MABIC, S. *Water for clinical chemistry*. Application note, 2006.

1.4 LIMPEZA E DESCONTAMINAÇÃO DE VIDRARIAS

A limpeza e ordem do material a ser utilizado são essenciais no laboratório, pois muitas substâncias podem atacar o vidro ou causar interferências nos procedimentos realizados. O sucesso do trabalho depende, em grande parte, da lavagem adequada dos materiais utilizados em todos os procedimentos laboratoriais.

Visualmente, um utensílio de laboratório pode estar:

- a) Sujo;
- b) limpo.

O material do item a não pode ser usado nunca. O material do item b, embora visualmente possa parecer limpo, ainda pode estar realmente:

- a) contaminado com várias impurezas químicas e biológicas;
- b) contaminado com reduzida quantidade de impurezas químicas;
- c) realmente limpo para determinações muito sensíveis.

O material do item c pode ser usado em alguns casos em que a contaminação não seja séria; comumente análises rápidas e grosseiras. O material do item b pode ser utilizado para uso geral (muitas análises biológicas de rotina e análises químicas de baixa precisão). O material do item e é utilizado em análises químicas e biológicas finas, que exigem alto grau de pureza ou precisão, exigindo procedimentos especiais para limpeza.

As análises são comprometidas com a presença de impurezas, seja por contaminação da amostra a ser preparada, seja pela alteração no volume ou peso final das mesmas. Assim, a matéria gordurosa impede o perfeito escoamento nos aparelhos volumétricos, causando inexatidão do trabalho.

É indicado encher o aparelho volumétrico com água da torneira. Retira-se a mesma e observa-se se houve escoamento completo ou se permanecem gotículas que indicam a presença de pontos gordurosos. Lava-se com detergente e escova, enxaguando bem com água da torneira e, por último, procede-se o enxágue com água destilada.

1.4.1 Uso de Detergente

Existem diversas marcas de detergentes próprios para limpeza de vidraria. O Extran é um dos mais conhecidos, produzido pela Merck. Existem também outros tipos como o DECON 90, que é produzido pela Decon Laboratories, ou o DETERTEC, produzido pela Vetec. Estes podem ser diluídos em várias concentrações (definidas no rótulo), dependendo do grau de sujeira do aparelho a ser limpo. Podem ter características bem definidas como ação bacteriológica ou isenção de alguma substância química como, por exemplo, o fósforo.

Coloca-se o detergente no aparelho com gotículas, deixando-se em contato por três a cinco minutos. A seguir, recolhe-se a mistura para o frasco de origem. Esta mistura tem um efeito corrosivo sobre a pele. Portanto, deve-se manuseá-la com cuidado. Após, o aparelho é lavado várias vezes com água da torneira, e em seguida, duas ou três vezes com água destilada, secando-se as paredes externas.

1.4.2 Cuidados a serem observados durante a limpeza das vidrarias

- Não se deve agitar as pipetas, buretas, alcoômetros, densímetros termômetros durante a lavagem;
- Deve-se ter todo o cuidado ao colocar os vidros sobre o balcão, pois no choque com cerâmicas podem se quebrar facilmente;
- Os balões volumétricos devem ser guardados abertos com a tampa amarrada por um cordão;
- As soluções de limpeza devem ser utilizadas somente quando necessário.

Referências:

CHRISPINO, Álvaro. **Manual De Química Experimental**. São Paulo: Editora Ática. 2ª Edição, 1994. 230 p.

CIENFUEGOS, Freddy. **Segurança No Laboratório**. Rio De Janeiro: Interciência, 2001. 269 p.

DECON 90. <http://www.decon.co.uk/english/decon90.asp>. Acesso em: 31 mar 2014

LENZI, Ervim et al. **Química Geral Experimental**. Rio De Janeiro: Freitas Bastos, 2009. 390 p.

MERCK. **Reactivos, diagnóstica, productos químicos 1992/93**. Darmstadt, 1993. 1584 p.

PAVIA, Donald L. et al. **Química Orgânica Experimental: Técnicas de escala pequena**. Porto Alegre: Bookman, 2009. 880 p.

POSTMA, James M.; ROBERTS, Julian L.; HOLLENBERG, Leland. **Química no Laboratório**. Barueri, SP: Manole, 5ª Edição, 2009. 546 p.

ROSA, Gilberto; GAUTO, Marcelo; GONÇALVES, Fábio. **Química Analítica: Práticas de Laboratório**. Porto Alegre: Bookman, 2013. 128 p.

UNIFEB. **Apostila de Química Geral e Experimental**. 2009. Disponível em: <http://xa.yimg.com/kq/groups/24693296/1821154571/name/UNKNOWN_PARAMETER_VALUE>. Acesso em 30 mar 14

1.5 SOLUÇÕES DE LIMPEZA E SECAGEM DE MATERIAL

As soluções de limpeza devem ser utilizadas de acordo com o fim desejado. Podem ser ácidas ou alcalinas. As mais utilizadas são as de HCl 1,0 mol.L⁻¹ e solução alcoólica de KOH. Em alguns casos, podem-se utilizar os alvejantes como solução de limpeza. Detergentes líquidos trazem no rótulo as diluições correspondentes ao tipo de material que será lavado, ou o tipo de contaminação encontrada no material, assim como as precauções que devem ser tomadas.

Para trabalhar com estas soluções de limpeza, deve-se ter o máximo de cuidado, pois todas são tóxicas e corrosivas, prejudicando a pele, os olhos e outros órgãos.

1.5.1 Solução de HCl 1,0 mol.L⁻¹

Pode ser utilizada em qualquer vidraria química. Prepara-se diluindo 8,5 mL de HCl concentrado em aproximadamente 50 mL de água, e completa-se o volume a 100 mL. A solução deverá ser preparada em proveta com tampa.

8,5 mL HCl p.a.100 mL H₂O q.s.p.

OBSERVAÇÃO: As unidades p.a. significam para análise, ou seja, o produto possui alto grau de pureza e q.s.p. significa quantidade suficiente para, isto é, a solução a ser preparada segue uma medida analítica.

1.5.2 Solução alcoólica de KOH

Muito utilizada na limpeza de materiais gordurosos. Não é recomendada para utilização em vidrarias volumétricas, como pipetas e buretas. Prepara-se esta solução dissolvendo-se 35 g de hidróxido de potássio em 20 mL de água e dilui-se em álcool isento de aldeídos, completando-se a 1000 mL.

35 g KOH em 20 mL H₂O.....1000 mL álcool q.s.p.

1.5.3 Secagem do material

Após a última lavagem, o material é levado a secar espontaneamente sobre estantes, bancadas ou secadores de vidrarias. Estufas a temperaturas de 100 – 105 °C aceleram a secagem, mas deve-se observar os seguintes passos, para obter uma secagem correta e com segurança:

Material volumétrico jamais é levado à estufa, pois sua calibração é alterada;

Verificar se os materiais (vidraria, recipientes, etc) resistem a temperatura utilizada;

Não secar utensílios de polietileno (plástico) a uma temperatura superior a 60 °C;

Algumas tintas usadas na identificação podem desaparecer a 100 °C;

Todo material lavado e seco deverá ser guardado em gavetas ou armários bem fechados. Os béqueres e cápsulas devem ser emborcados.

A boca de frascos, como Erlenmeyer, pode ser protegida com pequeno papel.

Material utilizado para medidas de volume (provetas, pipetas, balões volumétricos etc.), bem como outros objetos de vidro com paredes grossas, não podem ser aquecidos em estufas de secagem. A distorção térmica do material implicaria na completa alteração da graduação e aferição. Este tipo de material somente pode ser seco espontaneamente. Também pode ser usado o seguinte processo: lavar o objeto uma ou duas vezes com álcool etílico, depois com acetona. Finalmente, pode-se injetar ar comprimido dentro dos recipientes para acelerar a evaporação da acetona.

Caso desejar uma secagem mais rápida, pode-se enxaguar a aparelhagem com acetona e, a seguir, deixando-a secar ao ar ou na estufa.

Referências:

MOURA, J. A. S.; YOGUI, G. T. **Limpeza e preparação de vidrarias para análise de compostos orgânicos.** Procedimento Operacional Padrão Organo MAR-2012-05, Revisão n 1. Laboratório de Compostos Orgânicos em Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, 2012. 6p.

ROSA, Gilberto; GAUTO, Marcelo; GONÇALVES, Fábio. **Química Analítica: Práticas de Laboratório.** Porto Alegre: Bookman, 2013.128 p.

UNIFEB. **Apostila de Química Geral e Experimental.** 2009. Disponível em: <http://xa.yimg.com/kq/groups/24693296/1821154571/name/UNKNOWN_PARAMETER_VALUE>. Acesso em 30 mar 14

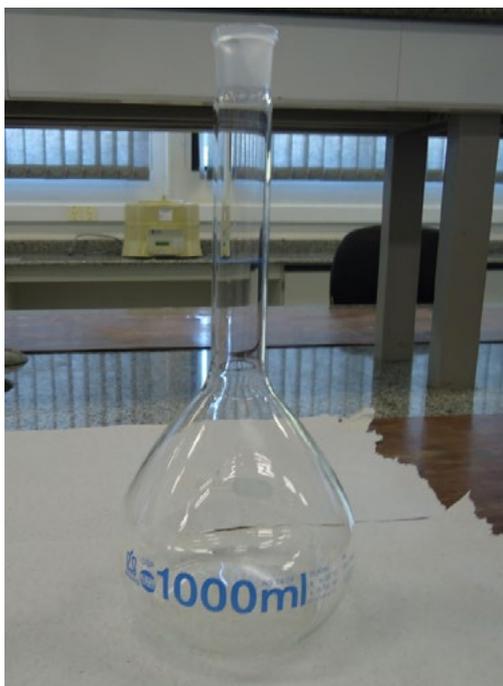
1.6 MEDIDAS DE VOLUMES DE LÍQUIDOS

Para se efetuar medida de volume de líquido, são empregados vários tipos de aparelhos que podem ser classificados de duas maneiras:

1.6.1 Aparelhos calibrados para conter um certo volume de líquido.

Exemplo: balão volumétrico (Figura 4).

Figura 4: Balão volumétrico



Fonte: Dos autores

1.6.2 Aparelhos calibrados para dar escoamento a certo volume de líquido.

Exemplo: pipetas volumétricas e buretas que possuem formato adequado para o escoamento dos líquidos.

Figura 5: pipetas volumétricas e buretas



A) pipeta volumétrica



B) bureta

Fonte: Pró-análise, 2014.

A medida de líquidos com qualquer aparelho está sujeita a uma série de erros devido às seguintes causas:

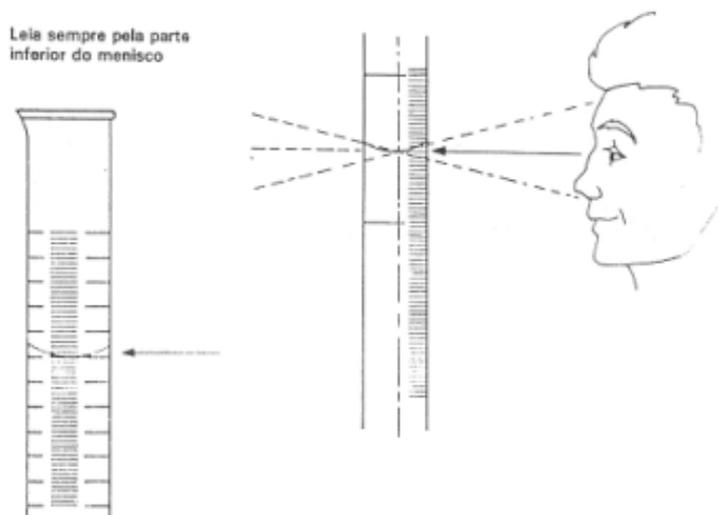
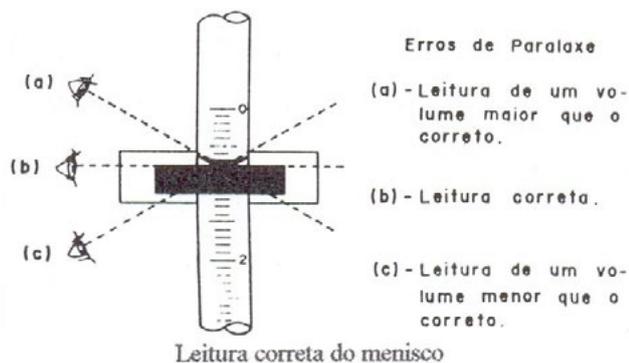
- Ação da tensão superficial sobre a superfície líquida;
- Dilatação e contração provocadas pela variação de temperatura;
- Imperfeita calibração dos aparelhos volumétricos.

Estes erros afetam a exatidão do aparelho. A bureta é mais exata que as pipetas graduadas, que por sua vez são mais exatas que as provetas. O béquer e o erlenmeyer não apresentam valor em termos de exatidão.

A leitura do volume contido no aparelho é feita comparando-se o nível do líquido com as linhas calibradas existentes nas paredes do aparelho. O nível do líquido é usualmente considerado como a parte inferior do menisco (superfície curva do líquido), que é mais facilmente localizada quando se coloca um retângulo preto a 1 mm abaixo do menisco. Este ficará com uma coloração escura, facilitando a leitura. A leitura deve ser feita quando a curvatura inferior do menisco coincidir com a altura dos olhos. Evita-se, assim, o erro de paralaxe.

Forma correta de medir um volume: LEITURA PELA PARTE INFERIOR DO MENISCO COM O OLHO AO NÍVEL APROPRIADO, conforme Figura 6:

Figura 6: Leitura de volume em proveta



Fonte: Busato, 2014.

Quando é feita a aquisição de aparelhos volumétricos estes já vêm com a graduação (calibração) feita pelo próprio fabricante. É recomendável, entretanto, verificar a correção desta graduação (aferição) no laboratório onde serão utilizados.

Atualmente existem empresas especializadas e credenciadas para a execução desta tarefa, de acordo com normas exigidas para credenciamento de laboratórios e com critérios de qualidade (Normas ISO). Neste sentido, deve-se também considerar as garantias de qualidade apresentadas pelo próprio fabricante que é fator relevante na hora da escolha de um fornecedor.

A medida de líquidos com qualquer aparelho está sujeita a uma série de erros devido às seguintes causas:

- dilatação e contração provocados pelas variações de temperatura;
- imperfeita calibração dos aparelhos volumétricos.

Referências:

BUSATO, Germano Luis Ferrari. Disponível em: <<http://followscience.com/content/368927/medidas-e-volumes>>. Acesso em 30 mar 2014.

CHRISPINO, Álvaro. **Manual De Química Experimental**. São Paulo: Editora Ática. 2ª Edição, 1994. 230 p.

CIENFUEGOS, Freddy. **Segurança No Laboratório**. Rio De Janeiro: Interciência, 2001. 269 p.

LENZI, Ervim et al. **Química Geral Experimental**. Rio De Janeiro: Freitas Bastos, 2009. 390 p.

POSTMA, James M.; ROBERTS, Julian L.; HOLLENBERG, Leland. **Química no Laboratório**. Barueri, SP: Manole, 5ª Edição, 2009. 546 p.

Pró-análise. Disponível em: <<http://www.pro-analise.com.br>>. Acesso em: 30 mar 2014.

ROSA, Gilberto; GAUTO, Marcelo; GONÇALVES, Fábio. **Química Analítica: Práticas de Laboratório**. Porto Alegre: Bookman, 2013. 128 p.

UNIFEB. **Apostila de Química Geral e Experimental**. 2009. Disponível em: <http://xa.yimg.com/kq/groups/24693296/1821154571/name/UNKNOWN_PARAMETER_VALUE>. Acesso em: 30-03-14

1.7 AQUECIMENTO EM BANHO MARIA

Utilizado para aquecer substâncias inflamáveis e com ponto de ebulição abaixo de 100 °C. Aparelhos mais sofisticados permitem o controle de temperatura por termostato. Consiste em um sistema que apresenta recipiente adequado para colocar água, que permite o aquecimento, conforme Figura 7.

Figura 7: Aquecimento em banho-maria



Fonte: Dos autores

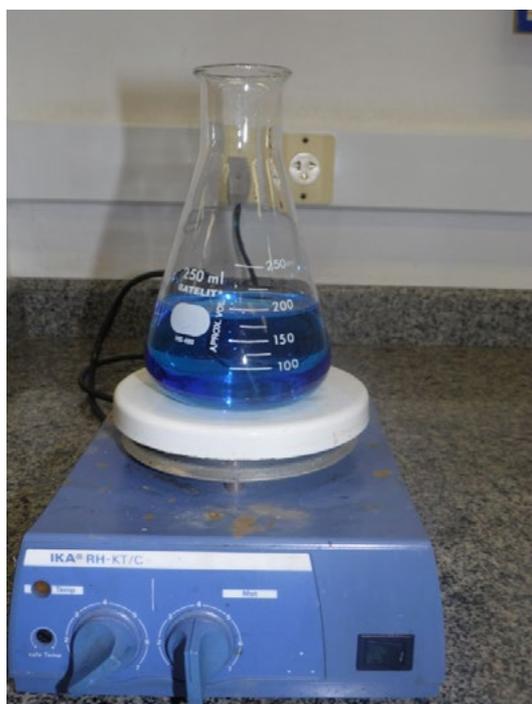
1.8 AQUECIMENTO EM ALTAS TEMPERATURAS

Quando se necessita aquecer substâncias em temperaturas superiores a 100 °C, deve-se utilizar outros materiais para esse fim: glicerina (até 220 °C), óleo minerais (250 a 300 °C), parafina (até 220 °C), fluidos de silicone (até 250 °C).

O aquecimento de qualquer líquido acima de seu ponto de ebulição pode provocar um superaquecimento; para evitar isso, aconselha-se adicionar pérolas de vidro ou de porcelana ao líquido, antes que se inicia o aquecimento. As mesmas têm a função de produzir um fluxo constante de pequenas bolhas de pequenas bolhas de vapor quando aquecidos em um solvente, quebrando as bolhas grandes dos gases produzidos, promovendo dessa forma uma ebulição suave e reduzindo a probabilidade de ocorrência de solavancos.

Também se pode recorrer a placas de aquecimento, porém as mesmas apresentam a dificuldade de medir a temperatura de trabalho, e as mudanças de temperatura são lentas. O controle da temperatura é realizado manualmente por uma chave de controle, sendo que o termostato indica quando a temperatura é atingida. Algumas chapas de aquecimento incluem um motor para agitação magnética, permitindo simultaneamente o aquecimento e a agitação de uma mistura, conforme pode ser visto na Figura 8.

Figura 8: Aquecimento em placas



Fonte: Dos autores

Outra ótima alternativa como fonte de calor são as mantas de aquecimento, cuja temperatura é regulada por um controlador de calor. A verdadeira temperatura da manta não pode ser controlada com facilidade; porém, após certa experiência torna-se relativamente fácil o controle. São ideais para reações e destilações que exigem temperaturas relativamente elevadas. São muito fáceis de usar e de operação segura, devendo-se tomar o cuidado em evitar o derrame de líquidos no poço da manta de aquecimento, já que a superfície da base de cerâmica pode estar muito quente e fazer o líquido pegar fogo. Na montagem da aparelhagem pode-se optar pela utilização de macacos de laboratório ou blocos de madeira, para serem colocados sob a manta de aquecimento; neste caso a manta é abaixada e a aparelhagem fica presa na mesma posição. Outro cuidado que se deve ter é

em utilizar manta de tamanho compatível com a vidraria que contém a solução, a fim de se evitar superaquecimentos (Figura 9).

Figura 9: Aquecimento em manta



Fonte: Dos autores

1.9 AQUECIMENTO EM BICO DE BUNSEN

Existem vários tipos de bicos de gás que são usados em laboratório, tais como: bico de Bunsen, bico de Tirril, bico de Mecker etc. Todos obedecem ao mesmo princípio de funcionamento: o gás combustível é introduzido em uma haste vertical, onde há uma abertura para a entrada de ar atmosférico, sendo queimado na sua parte superior. Tanto a vazão do gás como a entrada de ar podem ser controladas de forma conveniente.

O bico de Bunsen é um bico de gás, especialmente construído para uso de laboratório, utilizado para aquecimento até temperatura de 800 0C, por meio da combustão do gás (Figura 10).

Figura 10: Bico de Bunsen



Fonte: Dos autores

Observando o bico de Bunsen, verifica-se que ele é constituído de três partes: base, anel e tubo.

Entre a base e o tubo, há um anel de encaixe no qual existem orifícios ou janelas. A entrada de ar ocorre através das janelas emparelhadas. Quando elas estão justapostas, pode-se dizer que estão abertas; quando o anel cobre totalmente a janela do tubo, pode-se dizer que estão fechadas.

A chama luminosa (amarela) é obtida quando o anel está fechado. Neste caso, a quantidade de oxigênio é pequena, conseqüentemente menor será a queima e menor será a quantidade de calor produzida pela chama. A chama não luminosa (azul) é obtida quando o anel está aberto. Neste caso, a quantidade de oxigênio é maior; maior será a queima e maior será a quantidade de calor produzida pela chama.

Portanto, quando o anel está fechado, a combustão é incompleta e há formação de fuligem (carbono). Quando o anel está aberto, a combustão é completa e não há formação de fuligem.

Para acender o bico de Bunsen, proceda da seguinte maneira:

- Primeiramente, verifique se as janelas do anel estão fechadas: o bico de Bunsen deve ser aceso com as janelas fechadas para evitar que a chama se recolha para o interior do tubo.
- A seguir, abre-se a válvula de gás da bancada. Feito isso, segure um fósforo aceso um pouco acima e ao lado da extremidade do tubo. Abra o registro e acenda a chama. A chama que se obtém é grande, amarela e luminosa. Abre-se em seguida a entrada de ar, lentamente, até que a chama se torne azul. Controle a quantidade de gás com o registro e gire o anel gradativamente até abrir por completo as janelas do bico de Bunsen. Se, durante o funcionamento do bico, ouvir-se um ruído típico, deve-se regular a entrada de ar e de gás.

- Eventualmente, quando a mistura de ar e de gás não estiver bem regulada, a queima se dá dentro do tubo. Se isto acontecer, apague imediatamente o bico, não deixando o gás escapar, a fim de evitar explosões.

O método apropriado para desligar o bico é:

- 1) fechar a torneira da mesa do laboratório
- 2) fechar a entrada de gás do bico de Bunsen.

Utilizado para aquecimento de misturas ou soluções, de alguns graus acima da temperatura ambiente até cerca de 600 °C, podendo ser utilizados também para calcinações em cadinhos. Deve-se tomar o cuidado de não usar diretamente a chama do Bico de Bunsen para aquecer béquer, balões, erlenmeyer; nestes casos utilizar tela de amianto, que tem a função de distribuir o calor de maneira uniforme, não permitindo que a chama entre em contato direto com o material que contém o líquido a ser aquecido.

Pode-se aquecer um líquido em um tubo de ensaio, diretamente na chama. Neste caso o tubo deve estar seco por fora, deve ser ligeiramente inclinados e segurados por uma pinça e deve-se direcionar o tubo na direção em que não haja alguém.

1.10 RESFRIAMENTO EMPREGANDO BANHO DE GELO

Em muitas técnicas torna-se necessário resfriar o frasco que contém a nossa solução em temperaturas inferiores à temperatura ambiente. Neste caso, deve-se usar banho de gelo, que consiste num banho de gelo e água, cuja temperatura fica próxima a 0 °C. A quantidade de água deve permitir que o frasco fique apoiado ao fundo de maneira segura.

Caso desejar um banho com temperaturas levemente abaixo de 0 °C, deve-se adicionar um pouco de cloreto de sódio ao banho, atingido assim temperaturas de até – 10 °C.

Utilizando dióxido de carbono sólido (gelo seco), adicionados a um banho com álcool isopropílico, pode-se atingir temperaturas de – 78,5 °C. Neste caso, tome o cuidado para não se queimar com o gelo seco. Já utilizando nitrogênio líquido, pode-se atingir temperaturas de – 195,8 °C.

Referências:

CHRISPINO, Álvaro. **Manual De Química Experimental**. São Paulo: Editora Ática. 2ª Edição, 1994.230 p.

CIENFUEGOS, Freddy. **Segurança No Laboratório**. Rio De Janeiro: Interciência, 2001.269 p.

LENZI, Ervim et al. **Química Geral Experimental**. Rio De Janeiro: Freitas Bastos, 2009. 390 p.

1.11 UTILIZAÇÃO DE EVAPORADOR ROTATÓRIO (ROTAEVAPORADOR)

Pode-se evaporar um solvente, sob pressão reduzida, utilizando-se de evaporadores rotatórios. Este aparelho contém um motor que permite a evaporação rápida de solventes, por aquecimento, aplicando um vácuo no sistema, promovendo também o giro do balão que contém a solução. Pode-se colocar um banho de água sob o balão para aquecer a solução e aumentar a pressão de vapor do solvente. A velocidade de rotação do balão e a temperatura do banho de água podem ser selecionadas, de acordo com o desejado. Quando o solvente evapora, os vapores são resfriados pelo condensador e recolhidos em um balão, sendo que o produto permanece no balão em rotação (Figura 11).

Figura 11: Evaporador rotativo



Fonte: Dos autores.

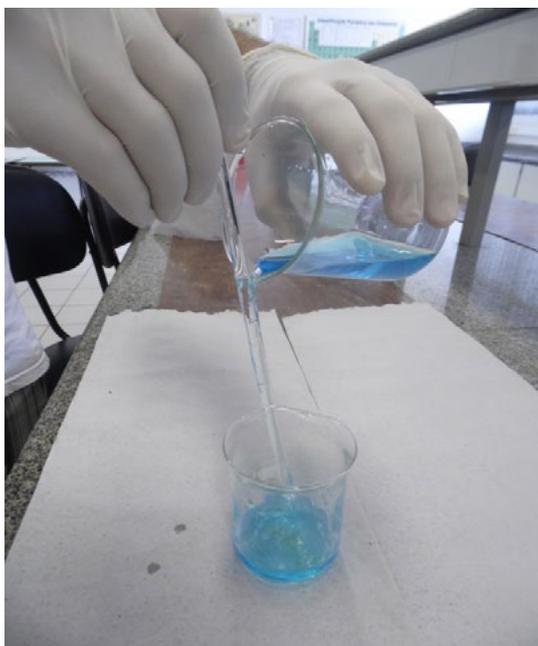
Referências:

- CHRISPINO, Álvaro. **Manual de Química Experimental**. São Paulo: Editora Ática. 2^a edição, 1994. 230 p.
- CIENFUEGOS, Freddy. **Segurança no laboratório**. Rio de Janeiro: Interciência, 2001. 269 p.
- LENZI, Ervim et al. **Química Geral Experimental**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 2009. 390 p.
- PAVIA, Donald L et al. **Química Orgânica experimental: Técnicas de escala pequena**. Porto Alegre: Bookman, 2009. 880 p.
- POSTMA, James M.; ROBERTS, Julian L.; HOLLENBERG, Leland. **Química no Laboratório**. Barueri, SP: Manole, 5^a edição, 2009. 546 p.
- ROSA, Gilberto; GAUTO, Marcelo; GONÇALVES, Fábio. **Química Analítica: Práticas de Laboratório**. Porto Alegre: Bookman, 2013. 128 p.

1.12 TRANSFERÊNCIA DE LÍQUIDOS

Se o material em manuseio for líquido, deve-se cuidar para que o frasco não esteja umedecido; caso isso tenha ocorrido, seque-o previamente. Ao verter o líquido de um frasco, deve-se fazê-lo do lado oposto ao rótulo. Isso evita que o mesmo seja danificado, caso o líquido escorra. Ao transferir o líquido de um frasco para o outro, deve-se utilizar um bastão de vidro, para evitar que o líquido escorra para fora do frasco. A Figura 12 mostra o procedimento.

Figura 12: Transferência de líquidos



Fonte: Dos autores.

Referências:

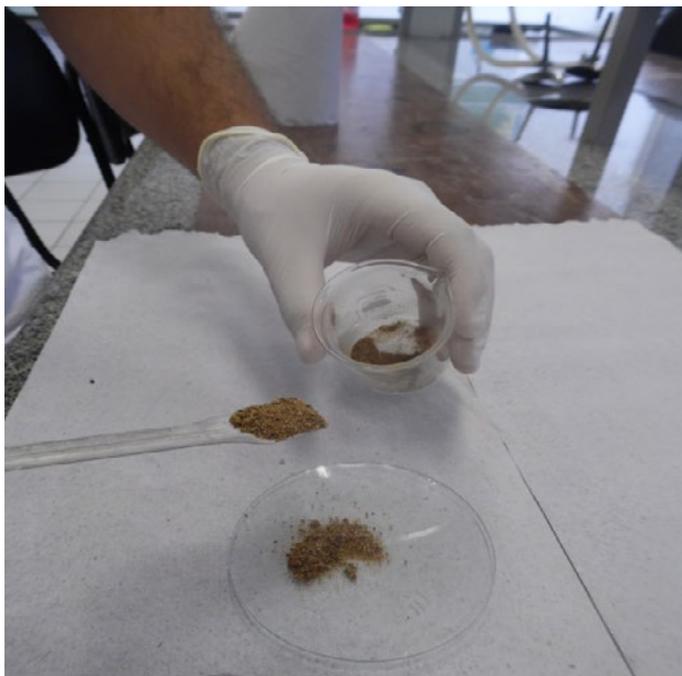
OLIVEIRA, C. M. A. et al. **Guia de laboratório para o ensino de química: instalação montagem e operação**. CRQ-IV: São Paulo, 2007. 53 p.

1.13 TRANSFERÊNCIA DE SÓLIDOS

Caso o sólido em manuseio seja corrosivo, deve-se cuidar para que o frasco não esteja umedecido. Caso esteja umedecido, limpe-o previamente. Quando retirar uma tampa plástica rosqueável de um frasco, evite deixá-la sobre a bancada com o lado aberto tocando a bancada, a fim de evitar contaminações. Jamais coloque objetos sujos no interior do frasco e só retorne uma substância ao seu frasco original, se tiver certeza absoluta que a mesma não foi contaminada durante o manuseio.

Para transferir o sólido, deve-se pegar uma pequena quantidade do mesmo com uma espátula, a Figura 13 apresenta o procedimento.

Figura 13: Transferência de sólidos



Fonte: Dos autores.

Referências:

ROSA, Gilberto; GAUTO, Marcelo; GONÇALVES, Fábio. **Química Analítica: Práticas de Laboratório**. Porto Alegre: Bookman, 2013. 128 p.

1.14 TÉCNICAS DE PESAGEM

A pesagem é feita com a utilização de balanças, sendo uma das mais importantes técnicas de laboratório. Existe uma grande variedade de balanças no mercado, diferenciando-se conforme a sensibilidade e precisão. As balanças podem ser:

- a) Semianalítica: apresentam o prato para colocação da amostra, podendo ou não ter proteções laterais (Figura 14) e superiores que evitam que as correntes de ar provoquem erros nas leituras ou instabilidade no valor informado. Sua sensibilidade é da ordem de 0,1 a 0,001 g;

Figura 14: Balança semianalítica



Fonte: Dos autores

- b) Analíticas: apresentam o prato para a colocação da amostra com proteção lateral, com o objetivo de evitar que as correntes de ar provoquem instabilidade ou erros de leitura. Apresentam sensibilidade de 0,0001 a 0,00001 g sendo, dessa forma, utilizadas quando se requer uma maior precisão na pesagem. É necessário salientar que, para uma maior estabilidade da balança durante a pesagem, é preciso construir uma plataforma com isolamento pra colocar a balança (Figura 15).

Figura 15: balança analítica



Fonte: Dos autores.

Cuidados com a balança:

- a) Não remova os pratos;
- b) Ligue-a previamente deixando-a estabilizar por cerca de 30 min;
- c) Observe se a balança está nivelada;
- d) Coloque as substâncias de maneira centralizada na balança e a temperatura ambiente;
- e) Coloque a balança em um local com o mínimo de vibração, variação de temperatura e mudanças de temperatura;
- f) Mantenha-a sempre limpa;
- g) Não coloque o material a ser pesado diretamente na balança; coloque-o em um recipiente seco e previamente pesado (tarado), tais como: béquer pequeno, papel filtro, vidro relógio etc.;
- h) Caso o material que for pesado tenha a propriedade de evaporar, oxide ou absorva a umidade, tampe o recipiente que contém a substância;
- i) Execute todas as operações cuidadosamente e com movimentos suaves;
- j) Não manuseie os objetos que estão sendo pesados com as mãos, utilize pinças ou espátulas.

Existem vários tipos de balança analítica: manuais, elétricas e digitais. O princípio, porém, é o mesmo. Consiste em se fazer uma comparação entre a massa que se quer medir e a massa de pesos de referência.

As balanças manuais, mais antigas, possuem dois braços iguais presos por estribos a uma barra central. Estes braços abrigam os pratos da balança, onde se efetua a pesagem. Os pesos de referência (analíticos) são manuseados sempre por intermédio de uma pinça adequada. Nunca são manuseados diretamente com a mão. Todo este sistema está armazenado dentro de uma caixa fechada com paredes de vidro e janelas laterais.

As balanças elétricas, ainda utilizadas, possuem o mesmo princípio. Porém, um dos pratos é interno e o outro externo. No prato externo coloca-se o corpo cuja massa se quer medir. O prato interno possui barras horizontais ao longo de sua altura, onde são depositados pesos analíticos (massas de referência) por meio de botões situados na parte frontal e balança. Existe uma escala fixa, que dá valores de massa da centena até o décimo de grama. Também existe uma escala móvel, que registra valores de massa das três últimas casas depois da vírgula.

As balanças digitais, mais modernas, possuem somente um prato. Internamente, possuem um sistema eletrônico, com placas de circuito impresso, que substitui os pesos de referência. Estas balanças são mais precisas e práticas de manusear, pois possuem um sistema de taragem. São calibradas com um peso de referência. Com a balança estabilizada e no nível, calibra-se o zero com o prato livre de qualquer corpo. Depois, procede-se a calibração da massa deste peso de referência. Tem-se, daí, um intervalo de calibração. A partir dele, o sistema eletrônico da balança está apto para medir qualquer outra massa, dentro de seu limite de medida.

A balança analítica é um instrumento de precisão, de construção delicada que exige do operador o máximo cuidado para obter resultados corretos. Por isso, recomenda-se observância rigorosa do que segue:

- a) A balança analítica deve ser instalada em local adequado, de preferência em sala especial, separada do laboratório, onde ela não fique sujeita à ação de vapores corrosivos. Um lugar onde, também não incida luz solar direta, nem se verifiquem mudanças bruscas de temperatura. A balança é colocada sobre uma plataforma fixa a uma parede tão livre quanto possível de vibrações e bem nivelada;
- b) Nenhum cristal, pó ou gota de material deve permanecer sobre a mesa da balança, ou no interior da mesma;
- c) A caixa da balança deve ser mantida fechada enquanto não estiver em uso;
- d) A balança deve ser conservada no nível;

- e) Enquanto não estiverem em uso, a alavanca e o prato deverão ser mantidos suspensos (travados) e sem objetos ou pesos sobre seu prato;
- f) A colocação de massas no prato deve ser feita cuidadosamente, evitando choque, com o auxílio de pinças apropriadas e sempre com a balança travada;
- g) Os reagentes nunca são colocados diretamente sobre o prato, mas em recipientes apropriados (vidro de relógio, frascos de pesagem etc.) e no caso de pequenas quantidades de material inofensivo, pode ser usado papel gessado ou papel de alumínio;
- h) Sendo voláteis, a pesagem de líquidos e sólidos corrosivos, requer cuidados especiais; semelhantes materiais têm de ser pesados em recipientes perfeitamente fechados;
- i) A carga máxima da balança nunca deve ser ultrapassada;
- j) O prato da balança sempre deve ser conservado rigorosamente limpo. Qualquer corrosão, mesmo pequena de sua cromagem requer a sua substituição ou conserto;
- k) Evitar apoiar-se sobre a plataforma-suporte da balança, quando em operação ou não, para evitar oscilações, desnível e, portanto, desequilíbrio do aparelho;
- l) É sempre aconselhável que as balanças sejam ligadas 30 minutos antes do uso, para ambientação e autocalibração;
- m) Colocar o recipiente de pesagem no centro do prato da balança;
- n) Cuidar para que o material de pesagem não encoste nas paredes da balança.

Referências:

- CHRISPINO, Álvaro. **Manual de Química Experimental**. São Paulo: Editora Ática. 2. edição, 1994. 230 p.
- CIENFUEGOS, Freddy. **Segurança no laboratório**. Rio de Janeiro: Interciência, 2001. 269 p.
- LENZI, Ervim et al. **Química Geral Experimental**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 2009. 390 p.
- PAVIA, Donald L et al. **Química Orgânica experimental: Técnicas de escala pequena**. Porto Alegre: Bookman, 2009. 880 p.
- POSTMA, James M.; ROBERTS, Julian L.; HOLLENBERG, Leland. **Química no Laboratório**. Barueri, SP: Manole, 5^a edição, 2009. 546 p.
- ROSA, Gilberto; GAUTO, Marcelo; GONÇALVES, Fábio. **Química Analítica: Práticas de Laboratório**. Porto Alegre: Bookman, 2013. 128 p.

1.15 MÉTODOS DE PESAGEM

Em resumo, as etapas envolvidas na utilização de uma balança analítica são: acerto do nível; acerto do zero; pesagem propriamente dita e leitura da massa do objeto no painel da balança. Normalmente, os objetos são pesados em frascos de pesagem. Estes são: vidro de relógio, pesa-filtro (frasco de forma cilíndrica e com tampa esmerilhada) e, em algumas situações, bequer de 50 mL ou 100 mL. Também são utilizados, em situações específicas, papel alumínio e papel gomado. Os dispositivos de trava e semitrava, os botões que acionam as massas aferidas (pesos de referência), bem como detalhes de operação, variam de uma balança para outra. Por isso, desenvolveremos as técnicas de pesagem aqui descritas de forma genérica.

Existem dois métodos comumente usados para pesagem de reagentes:

1.15.1 Pesagem por adição

Consiste em adicionar o reagente ao recipiente de pesagem.

Para balanças analíticas digitais, deve-se proceder da seguinte maneira: após a balança estar estabilizada e zerada, coloca-se um recipiente de pesagem adequado (vidro de relógio ou frasco de pesagem) sobre o prato da mesma. Proceda-se a taragem da balança, que é o procedimento de descontar a massa do recipiente. Após, com o auxílio de uma espátula adequada, vai-se colocando no recipiente pequenas porções do reagente a ser pesado, até atingir a massa desejada. Este procedimento deve ser feito de forma lenta e com todo o cuidado, pois qualquer quantidade de reagente que, por descuido, cair no prato da balança (fora do recipiente) vai gerar um erro de pesagem.

Etapas de pesagem por adição

Antes de iniciar o processo de pesagem, verifique se o prato da balança está limpo e se a balança está zerada.

As etapas envolvidas na utilização de uma balança analítica são:

- Ligar a balança apertando no botão ON.
- Zerar a balança, apertando na tecla TARE.
- Introduzir o recipiente de pesagem sobre o centro do prato da balança.
- Fechar as portas laterais da balança e tare a balança (botão TARE) com o recipiente no qual vai ser colocado o material a ser pesado.
- Adicionar o material sobre o recipiente.
- Fazer a leitura da massa do material diretamente no mostrador, cuidando para que as portas laterais da balança estejam fechadas.

1.15.2 Pesagem por diferença

Consiste em retirar de um recipiente (pesa-filtro) o valor a ser pesado.

Para balanças analíticas digitais, deve-se proceder da seguinte maneira: após a balança estar estabilizada e zerada, coloca-se o pesa-filtro (contendo uma quantidade de reagente superior a que se quer pesar) sobre o prato da mesma, e procede-se a taragem. A partir deste momento, o pesa-filtro não deve mais ser manuseado diretamente com a mão. Deve-se usar luvas ou um pedaço de papel filtro para manuseá-lo. Isto porque a gordura natural das mãos adere no frasco, alterando o peso inicial.

Após ter-se definido a massa de reagente a ser pesada, tira-se o frasco do interior da balança e se retira pequenas porções de reagente. Este procedimento deve ser feito com cuidado, inclinándose o frasco e batendo-se levemente a tampa deste na sua borda, para que o reagente caia aos poucos no recipiente que vai ser utilizado para solubilizar o sólido.

A cada retirada de pequena porção de reagente do pesa-filtro, tampa-se o mesmo, colocando-o na balança para, com a tampa lateral desta fechada, proceder-se nova leitura. Este procedimento é repetido várias vezes, até que a balança indique que já a quantidade desejada de reagente foi retirada.

Referências:

CHRISPINO, Álvaro. **Manual de Química Experimental**. São Paulo: Editora Ática. 2^a edição, 1994. 230 p.

CIENFUEGOS, Freddy. **Segurança no laboratório**. Rio de Janeiro: Interciência, 2001. 269 p.

LENZI, Ervim et al. **Química Geral Experimental**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 2009. 390 p.

PAVIA, Donald L et al. **Química Orgânica experimental: Técnicas de escala pequena**. Porto Alegre: Bookman, 2009. 880 p.

POSTMA, James M.; ROBERTS, Julian L.; HOLLENBERG, Leland. **Química no Laboratório**. Barueri, SP: Manole, 5^a edição, 2009. 546 p.

ROSA, Gilberto; GAUTO, Marcelo; GONÇALVES, Fábio. **Química Analítica: Práticas de Laboratório**. Porto Alegre: Bookman, 2013. 128 p.

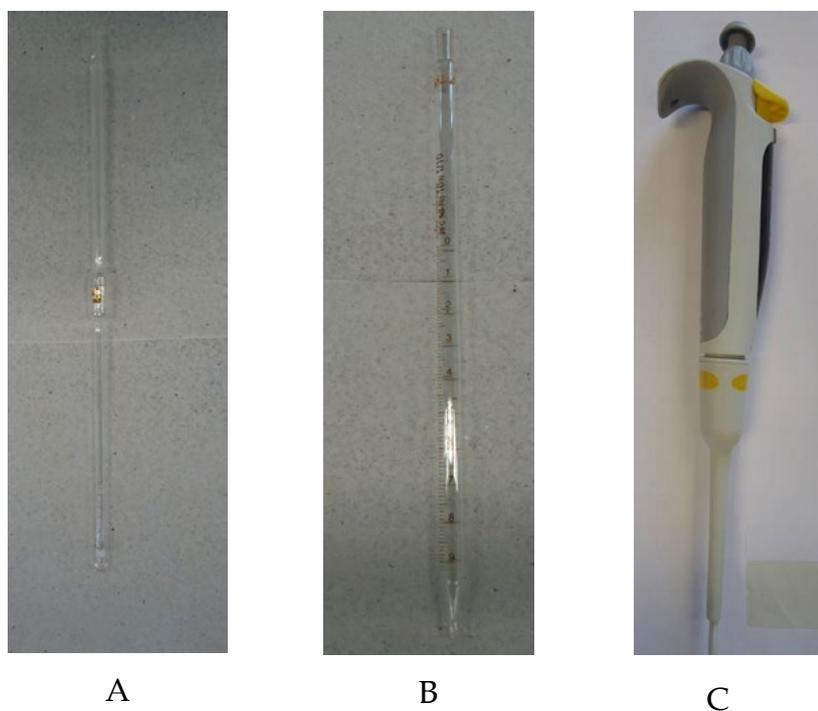
1.16 MEDIDAS DE VOLUME

Em trabalhos de laboratório, as medidas de volume são efetuadas com provetas graduadas, quando se deseja uma medida aproximada de volume. Já quando se quer uma medida mais grosseira, utilizam-se béqueres com escalas, e quando se deseja medidas precisas, utilizam-se aparelhos volumétricos como pipetas e balões volumétricos. A leitura do volume de líquidos deve ser feita pela parte inferior do menisco.

1.16.1 Pipetas

Há dois tipos de pipetas: pipetas de transferência (ou volumétricas) e pipetas graduadas. As de transferência apresentam um bulbo na parte central e apenas um traço de referência. Servem para escoar um determinado volume de um recipiente para outro. Com pipeta graduada pode-se medir vários volumes. As figuras de pipetas já foram evidenciadas, mas a título de diferenciação, a Figura 16 evidencia os diferentes tipos, assim como tem-se as pipetas automáticas, para volumes discretos.

Figura 16: Pipeta volumétrica (A), pipeta graduada (B) e pipeta automática (C)



Fonte: Dos autores.

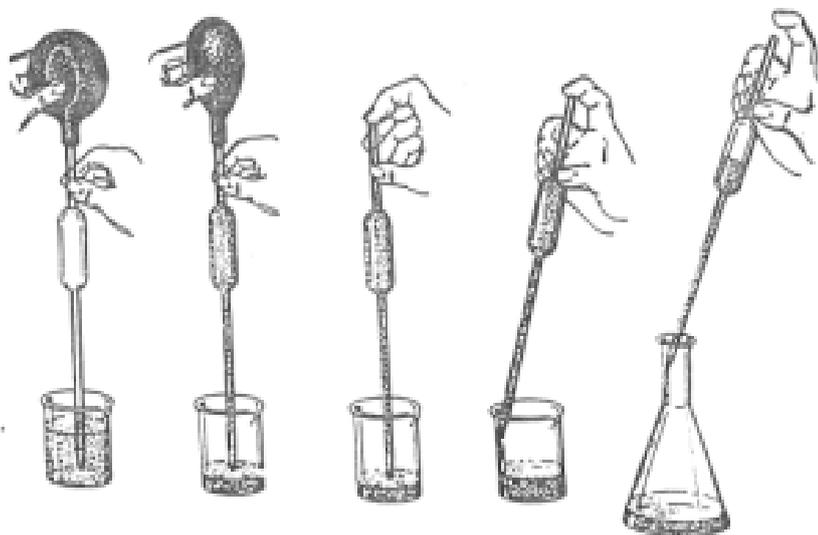
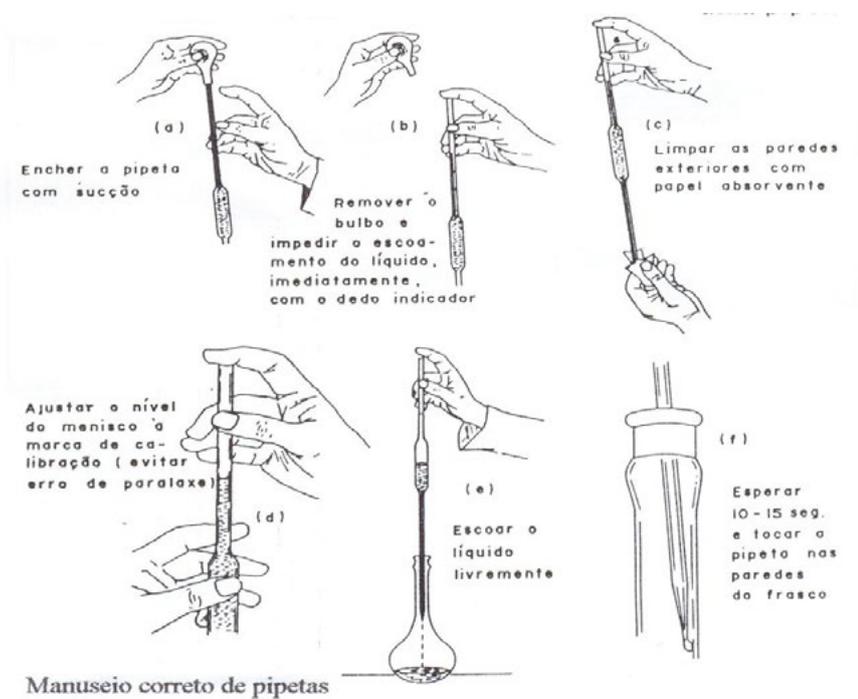
1.16.2 Uso de pipetas em geral

Depois de perfeitamente limpa, a pipeta é ambientada, lavando-se com pequenas quantidades de solução a medir, para remoção de possíveis gotas de água destilada, que provocariam uma pequena diluição na solução. Em seguida, é introduzida na solução. Faz-se a sucção (nunca com a boca) até acima da marca do zero (marca superior), tendo o cuidado de evitar a formação de bolhas. Após, a extremidade superior é fechada com o dedo indicador (nunca com o polegar). Seca-se a parte externa da pipeta com um papel filtro. Depois, relaxando levemente a pressão do dedo, deixa-se escoar lentamente o líquido para zerar e, só então, procede-se o escoamento desejado. Após o escoamento, aguarda-se 15 segundos. Se alguma gota ainda ficar na posição inferior da pipeta, esta é removida, encostando-se a ponta da mesma contra a parede do recipiente. Nunca se deve soprar

a pequena porção de líquido que fica retido na extremidade da pipeta, salvo em pipetas especiais. Estas possuem duas listras na ponta superior. Nestes casos, pode-se retirar o resíduo de líquido de seu interior, fechando-se a extremidade superior com o dedo indicador e, com a outra mão, segurando o bulbo da pipeta. Com isto, provoca-se ligeiro aumento da temperatura do ar interno, causando uma expansão suficiente para expulsar o resíduo de líquido.

A Figura 17 mostra como se manuseia corretamente uma pipeta.

Figura 17: manuseio correto da pipeta



Fonte: Manuseio de pipetas, 2014.

Para proceder à sucção de líquidos existem os pipetadores. O exemplo clássico de pipetador é o de três vias. Compreende de um bulbo de borracha com três aberturas:

- uma superior para se retirar o ar interno do bulbo e outras duas inferiores. Uma para fazer a sucção do líquido e a outra para liberá-lo. Ultimamente, foram confeccionados pipetadores tipo seringas, que promovem a sucção do ar interno da pipeta, fazendo com que o líquido suba.

As pipetas volumétricas e como todos os aparelhos volumétricos, devem ser aferidos quando se necessita utilizá-los em análises volumétricas. Esta técnica baseia-se na determinação da massa de água destilada contida dentro da pipeta. De uma forma resumida, são feitas três medidas de água destilada, em temperatura conhecida, para cada pipeta. Escoa-se esta quantidade para frascos erlenmeyer de 125 mL (com tampa), pesados previamente em balança analítica. Estes frascos são pesados novamente e, com o auxílio de tabelas apropriadas, faz-se a conversão dos pesos encontrados para os respectivos volumes corrigidos (nas temperaturas medidas).

Mais recentemente, surgiram as micropipetas. Estas servem para se obter medidas de volumes extremamente pequenos. Estas pipetas são utilizadas, em sua grande parte, em análises de cromatografia, onde se necessitam volumes muito pequenos de amostra para a leitura do aparelho.

Em alguns laboratórios, em que se exige maior precisão nas análises, são utilizadas pipetas automáticas. Deve-se evitar a sua utilização com líquidos corrosivos como ácido sulfúrico ou ácido clorídrico. Neste tipo de pipeta deve-se sempre utilizar ponteiras plásticas.

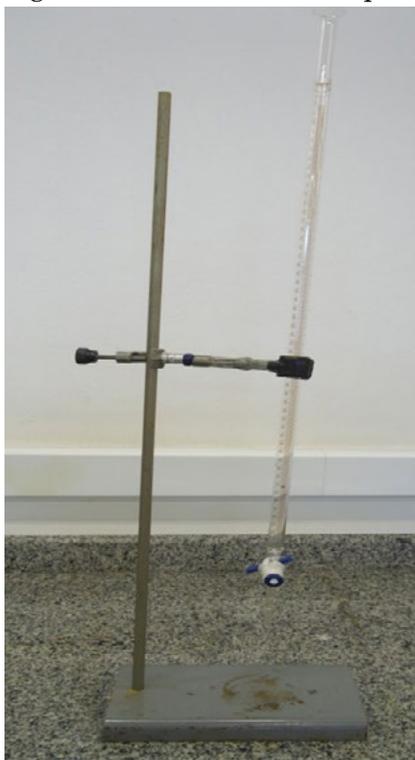
1.16.3 Uso de buretas

As buretas são constituídas de tubos de vidro calibrados que permitem o fácil controle de escoamento de volumes variáveis de líquidos.

Ao ser utilizada, deve ser fixada na posição vertical, fixa em um suporte. Inicialmente deve-se “ambientar” a mesma com o reagente a ser utilizado, lavando a mesma com cerca de 5 mL do mesmo, o qual deve ser adicionado com o auxílio de um funil. Enche-se então a bureta, até um pouco acima do marco zero, e deixa-se escoar o reagente até que atinja o zero da escala, tomando o cuidado na leitura do mesmo a fim de evitar erros. Durante esse processo deve-se eliminar todas as bolhas de ar que possam existir. Coloca-se então o frasco que vai receber o líquido abaixo da bureta, deixando o líquido escoar lentamente. A torneira da bureta deve ser controlada com a mão esquerda. Após escoar a quantidade necessária do líquido deve-se aguardar alguns segundos para fazer a leitura do volume retirado.

As buretas, assim como as pipetas volumétricas, também necessitam ser aferidas, caso sejam utilizadas em determinações quantitativas mais precisas. A técnica de aferição de buretas segue a mesma lógica da técnica descrita para aferição de pipetas volumétricas. Porém, é um pouco mais complexa, pois se faz a aferição de cada segmento de 5 ou 10 mL. A Figura 18 evidencia uma bureta.

Figura 18: Bureta em um suporte universal



Fonte: Dos autores.

1.16.4 Uso de Balões Volumétricos

Os balões volumétricos são balões de fundo chato, gargalo comprido e calibrado para conter determinados volumes líquidos. Apresentam um traço fino gravado em torno do gargalo, que indica até onde o nível do líquido deve ser elevado para completar o volume do frasco.

O gargalo deve ser estreito para que uma pequena variação de volume provoque uma sensível diferença na posição do menisco.

Para se acertar o menisco do líquido à marca, deve-se observar o balão apoiado numa superfície horizontal.

Os balões volumétricos são usados na preparação de soluções de concentração conhecida e na diluição de soluções já preparadas.

Procedimentos durante o uso do balão volumétrico na preparação de soluções:

O reagente é devidamente pesado e passado para um béquer, onde é dissolvido. A solução assim obtida é passada para o balão. O bequer é lavado várias vezes com pequenas porções de água destilada para que ocorra uma **transferência quantitativa**, cuidando-se para não exceder a marca do gargalo. Só então a solução é diluída, fazendo-se o solvente escoar pelas paredes do balão, até que o líquido chegue à extremidade inferior do gargalo. Espera-se o excesso de líquido escoar.

Com o auxílio de um bastão de vidro, cuja extremidade possui um pedaço de papel filtro preso com uma fita durex, promove-se a secagem da parte superior do gargalo. Somente depois deste procedimento é feito o ajuste final, com o auxílio de uma pequena pipeta, de tal maneira que o menisco fique tangente ao traço de referência do balão. Em seguida, agita-se vigorosamente até que a solução se misture perfeitamente. Em caso de diluições de soluções concentradas, se este processo for exotérmico, procede-se uma diluição inicial num bequer com pouco volume de água. Espera-se esfriar e, então, repete-se o procedimento para reagentes sólidos acima citados.

Referências:

Manuseio de pipetas. Disponível em: <<http://coracaodefarmaceutico.blogspot.com.br/2013/05/controle-de-qualidade-nocoes-basicas.html>>. Acesso em: 31/03/2014

ROSA, Gilberto; GAUTO, Marcelo; GONÇALVES, Fábio. **Química Analítica: Práticas de Laboratório.** Porto Alegre: Bookman, 2013.128 p.

1.17 PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR FILTRAÇÃO

A filtração tem por finalidade remover impurezas sólidas de um líquido ou de separar um sólido desejado de uma solução em que ele foi precipitado ou cristalizado. Isso é efetuado passando a mistura por um material poroso que retém as partículas do sólido.

A fase líquida (filtrado) atravessa o material poroso, enquanto a fase sólida (precipitado) fica retida.

Tal material poroso pode ser: papel de filtro, algodão, tecido, vidro sinterizado, porcelana porosa, fibras de vidro ou amianto etc. O mais usado em laboratório é o papel de filtro. Existem papéis de filtro de várias porosidades, e a escolha depende do tamanho e da natureza das partículas do sólido.

A passagem do líquido pelo material poroso pode ser efetuada pela ação da gravidade (filtração simples) ou por redução da pressão (filtração por sucção).

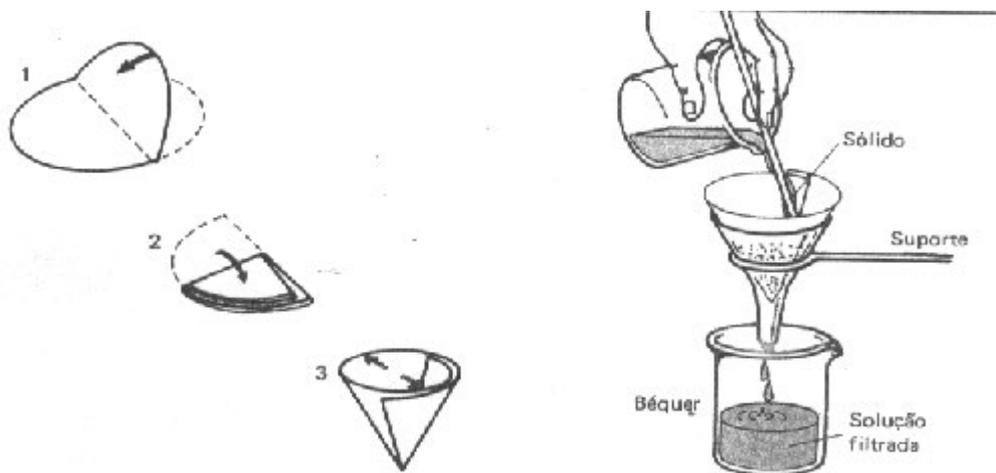
1.17.1 Filtração Simples

Utiliza-se um funil simples em que foi adaptado um cone de papel de filtro.

A filtração, com auxílio do papel de filtro, é feita por gravidade, sem sucção.

O papel de filtro circular é dobrado e inserido num funil de vidro, como está descrito na Figura 19. O papel de filtro, de forma circular, é dobrado pela metade e depois esta metade é dobrada novamente, adquirindo aproximadamente um quarto do tamanho original. A segunda dobra deve ser feita de maneira que fique um intervalo de 5 mm entre as duas pontas. De uma das pontas do papel, rasga-se um pequeno triângulo irregular, para facilitar a adesão do papel ao funil. Em seguida, abre-se o papel de tal maneira que adquira a forma de um cone, e coloca-se no funil de modo que o corte no papel fique aderido ao vidro. A Figura 19 mostra o procedimento do uso do papel filtro.

Figura 19: Uso do papel filtro para filtração simples



Fonte: Filtração, 2014.

Umedece-se o papel com uma pequena quantidade do solvente com que se está trabalhando, de modo a se obter uma boa aderência. Para uma rápida filtração, o papel deve ser ajustado no funil de modo que o ar não penetre entre o papel e o funil. O diâmetro do papel de filtro utilizado deve ser tal que sua parte superior deve estar a 1 cm abaixo da borda do funil de vidro.

A transferência é feita com o auxílio de um bastão de vidro, recolhendo-se o filtrado em um béquer. A extremidade inferior da haste do funil deve ser encostada na parede interna do béquer usado no recolhimento do filtrado. Deve-se manter, durante toda a filtração, o nível de solução a $\frac{3}{4}$ da altura do papel de filtro no funil. Os últimos traços do sólido são transferidos para o papel de filtro com o auxílio de jatos de solvente, utilizando um frasco lavador. Lava-se o sólido com pequenas porções do solvente.

1.17.2 Filtração por sucção

O processo de separação pode ser acelerado por meio de uma filtração por sucção, a chamada filtração à pressão reduzida ou filtração a vácuo.

É efetuada utilizando uma aparelhagem como a da Figura 20: o frasco kitassato A, provido de um funil de Buchner, é ligado a um frasco de segurança B, vazio, que por sua vez está conectado a uma trompa de água C (ou uma bomba de vácuo). Corta-se um círculo de papel de filtro, cujo diâmetro deve ser 1 a 2 mm menor do que o diâmetro interno do funil de Buchner. Coloca-se o papel no funil de modo a cobrir os orifícios do funil, sem entretanto chegar até as paredes do mesmo. Liga-se a trompa de água, umedece-se o papel de filtro com o solvente e efetua-se a filtração. Terminada esta, abre-se a entrada de ar do kitassato do frasco de segurança, antes de fechar a torneira da trompa de água.

Este tipo de filtração tem a vantagem sobre a filtração simples, por ser mais rápida e por deixar menor quantidade de impurezas e solvente no sólido.

Figura 20: Filtração por sucção



Fonte: Dos autores

Referências:

Filtração. Disponível em: <<http://www.soq.com.br/conteudos/ef/misturas/p2.php>>. Acesso em 31/03/2014.

POSTMA, James M.; ROBERTS, Julian L.; HOLLENBERG, Leland. **Química no Laboratório**. Barueri, SP: Manole, 5^a edição, 2009. 546 p.

ROSA, Gilberto; GAUTO, Marcelo; GONÇALVES, Fábio. **Química Analítica: Práticas de Laboratório**. Porto Alegre: Bookman, 2013. 128 p.

1.18 PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR CENTRIFUGAÇÃO

Muitas vezes a centrifugação é mais efetiva na remoção de impurezas sólidas do que as técnicas convencionais de filtração. É utilizada na separação de misturas sólido-líquidas ou de dois líquidos imiscíveis; baseando-se no princípio de que o sólido ou líquido de maior densidade irá para o fundo do recipiente, de maneira rápida e eficiente. Com esse processo partículas muito pequenas que poderiam passar pelos filtros tradicionais são removidas. Na centrifugação, deve-se tomar alguns cuidados:

- a) Utilizar óculos de proteção;
- b) Colocar os tubos aos pares na centrífuga e sempre em sentido oposto um ao outro, a fim de balancear o peso sobre o eixo central;
- c) Se ao ligar a centrífuga ocorrerem vibrações, desligá-la e revisar todos os seus passos.

A Figura 21 apresenta uma centrífuga.

Figura 21: Centrífuga



Fonte: Dos autores

Referências:

POSTMA, James M.; ROBERTS, Julian L.; HOLLENBERG, Leland. **Química no Laboratório**. Barueri, SP: Manole, 5ª edição, 2009. 546 p

ROSA, Gilberto; GAUTO, Marcelo; GONÇALVES, Fábio. **Química Analítica: Práticas de Laboratório**. Porto Alegre: Bookman, 2013. 128 p.

1.19 PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO

Quando se forma uma substância insolúvel pela reação de duas substâncias em solução, a substância insolúvel formada precipita-se, ou seja, deposita-se, mais ou menos lentamente, no fundo do recipiente em que ocorreu a reação.

Uma das maneiras de separar esse precipitado do restante da solução é através da filtração simples ou filtração a vácuo.

Referências:

POSTMA, James M.; ROBERTS, Julian L.; HOLLENBERG, Leland. **Química no Laboratório**. Barueri, SP: Manole, 5ª edição, 2009. 546 p.

ROSA, Gilberto; GAUTO, Marcelo; GONÇALVES, Fábio. **Química Analítica: Práticas de Laboratório**. Porto Alegre: Bookman, 2013. 128 p.

1.20 PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR DECANTAÇÃO

Neste processo não é necessário usar papel filtro para separar partículas insolúveis. Quando as partículas são grandes e pesadas pode-se deixar a solução em repouso para promover a decantação, ou seja: o depósito das mesmas no fundo do recipiente. A seguir, derrama-se cuidadosamente o líquido deixando as partículas sólidas.

Referências:

ROSA, Gilberto; GAUTO, Marcelo; GONÇALVES, Fábio. **Química Analítica: Práticas de Laboratório**. Porto Alegre: Bookman, 2013.128 p.

1.21 TÉCNICAS DE PREPARO DE SOLUÇÕES

Um dos procedimentos mais realizados em laboratório é o preparo de soluções.

As soluções são definidas como misturas homogêneas de dois ou mais componentes. Duas palavras muito empregadas na discussão das soluções são: soluto e solvente. A substância presente em maior quantidade é geralmente chamada de solvente e a de menor quantidade, soluto.

Os solutos podem ser de origem sólida ou líquida. Ambos podem ter sua massa pesada em balança. Porém, o mais comum é que somente os solutos sólidos tenham sua massa pesada em balança. A massa de soluto líquido, normalmente, é convertida a volume, por intermédio da respectiva massa específica e, posteriormente, este volume é medido com algum instrumento para medida de volume.

A maioria das reações que ocorre num laboratório envolve o uso de diferentes soluções comuns ou soluções padrão. As soluções comuns são usadas em reações nas quais não é necessário ter a concentração exata do soluto, ou seja, em procedimentos não quantitativos. As soluções padrões são utilizadas nas determinações quantitativas, ou seja, em ensaios que têm por objetivo determinar, com bom nível de exatidão, quantidades de uma substância a partir da reação com uma solução de concentração conhecida e exata. Por este motivo, o preparo destas soluções deve ter alto rigor analítico.

1.21.1 Preparação de soluções comuns

1.21.1.1 A partir de um reagente sólido (soluto sólido)

Etapas para o preparo de soluções a partir de um soluto sólido:

1. Passar água destilada em todo o material.
2. Secar cuidadosamente a espátula e o vidro de relógio.
3. Pesar no vidro de relógio a massa de soluto necessária.
4. Transferir o soluto do vidro de relógio para um béquer lavando o vidro de relógio com solvente, de modo a arrastar todo o soluto.
5. Dissolver todo o soluto utilizando apenas uma parte do solvente e agitando com um bastão de vidro.
6. Verter a solução para o balão volumétrico, com auxílio de um funil, lavando o béquer, o bastão de vidro e o funil com solvente para arrastar todo o soluto, cuidando para não exceder a marca do gargalo.
7. Após a solução é diluída, fazendo o solvente escoar pelas paredes do balão, até que o líquido chegue à extremidade inferior do gargalo. Se o gargalo do balão volumétrico estiver com a parte superior da marca molhado este deve ser secado com a ponta de um bastão de vidro envolvida com papel filtro. Faz-se o ajuste final, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur ou de um conta-gotas, lentamente, de tal maneira que o menisco fique tangente ao traço de referência.
8. Fechar o balão e homogeneizar a solução invertendo várias vezes o balão volumétrico.
9. A seguir, transfira a solução para um frasco apropriado e devidamente etiquetado com o nome do composto, a concentração da solução, identificação de quem preparou a solução e data.

1.21.1.2 A partir de um reagente líquido (soluto líquido ou diluição de uma solução previamente preparada)

Etapas para o preparo de soluções a partir de um soluto líquido:

1. Passar água destilada em todo o material.

2. Medir o volume de soluto necessário com o auxílio de uma pipeta e transferir para um béquer.
3. Diluir o soluto utilizando apenas uma parte do solvente e agitando com um bastão de vidro.
4. Verter a solução para o balão volumétrico, com auxílio de um funil, lavando o béquer, o bastão de vidro e o funil com solvente para arrastar todo o soluto, cuidando-se para não exceder a marca do gargalo.
5. Após a solução é diluída, fazendo-se o solvente escoar pelas paredes do balão, até que o líquido chegue à extremidade inferior do gargalo. Se o gargalo do balão volumétrico estiver com a parte superior da marca molhado este deve ser secado com a ponta de um bastão de vidro envolvida com papel filtro. Faz-se o ajuste final, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur ou de um conta-gotas, lentamente, de tal maneira que o menisco fique tangente ao traço de referência.
6. Fechar o balão e homogeneizar a solução invertendo várias vezes o balão volumétrico.
7. A seguir, transfira a solução para um frasco apropriado e devidamente etiquetado com o nome do composto, a concentração da solução, identificação de quem preparou a solução e data.

IMPORTANTE: Toda a solução ácida ou básica deve ser preparada adicionando-se ácido ou base à água (e nunca o contrário) para evitar explosão, devido ao alto calor de dissolução desses reagentes.

1.21.2 Preparação de solução padrão

Uma solução é denominada PADRÃO quando sua concentração é exatamente conhecida. A preparação de uma solução padrão requer, direta ou indiretamente, o uso de um reagente quimicamente puro e com composição perfeitamente definida. Os reagentes com tais características são chamados de PADRÕES PRIMÁRIOS. Portanto, se obtém uma solução padrão se esta for preparada diretamente a partir de um padrão primário, ou se for padronizada ao reagir com um padrão primário.

Para que uma substância possa servir como padrão primário, são requeridas certas exigências:

- Ela deve ser de fácil obtenção, purificação, dissecação e conservação;
- As impurezas que por ventura existam no reagente devem ser facilmente identificáveis;
- O reagente não deve ser higroscópico ou volátil;
- O reagente deve ser bastante solúvel.

Quando em uso numa titulação, uma bureta deve ser manipulada corretamente, para evitar maiores erros.

Coloca-se em um erlenmeyer a amostra a ser titulada, cuja massa ou volume deve ser conhecido com exatidão. Conforme o caso adiciona-se a seguir as substâncias que forem necessárias (ex.: solvente, indicador).

Separadamente, coloca-se a solução, que será usada como titulante, em uma bureta. Acerta-se o zero. Em seguida, coloca-se o erlenmeyer sob a bureta e deixa-se o titulante escoar, gota a gota. Controla-se a torneira da bureta com a mão esquerda ou direita.

Uma pessoa destra usará sua mão esquerda na torneira fazendo uma leve pressão nesta para a esquerda, de modo a prevenir vazamentos, e com a mão direita agitará continuamente o erlenmeyer. Um indivíduo canhoto deverá proceder de modo inverso. Quando possível, é aconselhável o uso de agitador com barra magnética, para uma melhor agitação do meio reagente.

Observa-se atentamente a solução do erlenmeyer. Cada gota do titulante, caindo na solução, provoca uma alteração visual (geralmente mudança de cor) que desaparece com a agitação. À medida que se aproxima o ponto final da titulação, a alteração demora mais tempo para desaparecer. Diminui-se a velocidade de adição do titulante, de modo que a gota se misture completamente com a solução, antes que caia a gota seguinte.

Além destes detalhes técnicos, quando o ponto final de uma titulação está próximo, frequentemente é necessário adicionar à mistura reagente uma fração de gota do titulante. Para fazer isto, deixa-se formar parcialmente uma gota e toca-se a extremidade da bureta com a parede interna do erlenmeyer. Lavam-se as paredes do frasco com uma pequena porção de água de um frasco lavador e agita-se a mistura.

Não se deve arrastar com água a fração da gota retida na extremidade da bureta.

Quando ocorrer uma alteração permanente na solução, interrompe-se a adição de titulante e lê-se o volume de líquido na bureta.

Referências:

CHRISPINO, Álvaro. **Manual de Química Experimental**. São Paulo: Editora Ática. 2ª edição, 1994. 230 p.

CIENFUEGOS, Freddy. **Segurança no laboratório**. Rio de Janeiro: Interciência, 2001. 269 p.

LENZI, Ervim et al. **Química Geral Experimental**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 2009. 390 p.

PAVIA, Donald L et al. **Química Orgânica experimental: Técnicas de escala pequena**. Porto Alegre: Bookman, 2009. 880 p.

POSTMA, James M.; ROBERTS, Julian L.; HOLLENBERG, Leland. **Química no Laboratório**. Barueri, SP: Manole, 5ª edição, 2009. 546 p.

ROSA, Gilberto; GAUTO, Marcelo; GONÇALVES, Fábio. **Química Analítica: Práticas de Laboratório**. Porto Alegre: Bookman, 2013. 128 p.

CAPÍTULO 2

EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS E PROTEÍNAS

**Adriane Pozzobon, Andressa Dametto, Ângela Maria Schorr-Lenz, Camille Eichelberger Granada,
Cláudia Stein, Edina Aparecida dos Reis Blasi, Fernanda Oliveira Diefenthaler, Giseli Buffon,
Guilherme Pinto Bertuzzi, Ivan Cunha Bustamante Filho, Jorge Almeida Guimarães,
Júlia Pasqualini Genro, Luana Maria Wollinger, Lucélia Santi, Marcia Ines Goettert,
Markus Berger Oliveira, Pâmela Maria Seibel, Raul Antonio Sperotto, Ronize Zeni da Silva,
Thais Fernanda Dornelles, Verônica Contini, Vinicius de Abreu Waldow,
Walter Orlando Beys da Silva**

2.1 EXTRAÇÃO DE DNA HUMANO A PARTIR DE SANGUE PERIFÉRICO – MÉTODO DE *SALTING-OUT*

A extração do DNA nuclear é o primeiro passo para a realização de análises genéticas em humanos, com aplicações tanto em pesquisas quanto em situações práticas do dia-a-dia. Constitui o passo essencial para análises de sequenciamento, análises forenses, diagnóstico molecular de doenças, entre outras aplicações. Embora o DNA humano possa ser extraído de qualquer célula nucleada, existem fontes mais ou menos abundantes e que apresentam graus variados de dificuldades técnicas.

Uma das fontes mais comumente utilizadas para a extração de DNA humano são os leucócitos circulantes do sangue. Basicamente, esse processo de extração consiste na lise das membranas das células, com a liberação do DNA, e posterior separação do DNA dos componentes proteicos. O método de *salting-out*, descrito por Lahiri e Nurnberger (1991), promove a remoção das proteínas através de uma solução saturada de cloreto de sódio. É considerado um método rápido, seguro e econômico para a extração de DNA a partir de sangue periférico.

Protocolo adaptado de: Lahiri DK, Nurnberger JIJr (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, 19: 5444.

1. Coletar sangue periférico (aproximadamente 4 mL) em um tubo contendo EDTA (100 µL EDTA 15%).

2. Transferir o sangue total para um tubo de centrífuga de 15 mL e, após, adicionar igual volume do reagente TKM1.

Dica: identificar a amostra no tubo e registrar a quantidade de sangue para colocar a mesma quantidade do reagente.

3. Adicionar 250 µL de Nonidet P-40 para causar a lise das células. Misturar vigorosamente e passar no vórtex.

Dica: o Nonidet é muito viscoso, portanto, é interessante realizar a pipetagem lentamente para que o reagente seja adicionado com facilidade e não ocorra desperdício. A mistura deve ser feita por agitação manual e deverá ocorrer a formação de espuma.

4. Centrifugar por 10 minutos a 3.000 rpm, em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$).

Importante: é necessário balancear as amostras na centrífuga.

5. Descartar o sobrenadante por inversão, com cuidado para não perder o *pellet* que se encontra ao fundo do tubo.

Dica: utilize um béquer grande, contendo hipoclorito de sódio, para fazer o descarte do produto líquido. Após descartar o sobrenadante, pode-se verter lentamente o tubo em papel absorvente, visando retirar o restante do líquido.

6. Ressuspender o *pellet* em 5 mL de TKM1.

Dica: agitar vigorosamente, ou utilizar o vórtex, visando a maior dissolução possível do material.

7. Centrifugar por 10 minutos a 3.000 rpm.

* Repetir os passos 5, 6 e 7, para que o *pellet* fique o mais limpo possível.

Dica: antes da última centrifugação, pode-se ligar o banho-maria para incubação a 55°C .

8. Retirar o sobrenadante por inversão. Ressuspender o *pellet* em 800 µL de TKM2 e transferir para um microtubo de 1,5 mL ou 2 mL.

Dica: dissolver o *pellet* o máximo possível, quando ele já estiver no microtubo. Pode-se utilizar o vórtex.

9. Adicionar 50 µL de SDS 10% e agitar.

Dica: pode-se misturar a suspensão com o auxílio de uma pipeta ou agitar manualmente.

10. Incubar por 10 a 20 minutos, a 55°C.

Dica: o objetivo da incubação é homogeneizar o material, mas é possível que algumas amostras não dissolvam totalmente ao fim dos 20 minutos.

11. Adicionar 300 µL de NaCl 6 M no tubo e agitar.

12. Centrifugar a 12.000 rpm, durante 5 minutos.

Dica: durante esta centrifugação, pode-se preparar os microtubos contendo 1 mL de etanol 70% gelado – Passo 15.

13. Coletar o sobrenadante em um novo tubo de 15 mL, previamente identificado, com o auxílio de uma micropipeta.

Dica: o DNA está contido no sobrenadante, portanto NÃO coletar o *pellet* (composto por resíduos de proteínas).

14. Adicionar ao sobrenadante dois volumes de etanol 100% gelado. Inverter o tubo lentamente para a precipitação do DNA.

Dica: a inversão do tubo deve ser suave, e o DNA aparecerá na forma de uma nuvem branca suspensa no líquido.

15. Com o auxílio de uma micropipeta, ou de uma pipeta de vidro descartável, coletar o DNA e transferi-lo para um microtubo de 1,5 mL, contendo 1 mL de etanol 70%.

16. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos.

17. Com o auxílio de uma micropipeta, remover o sobrenadante. O DNA compõe o *pellet* no fundo do tubo.

Dica: o *pellet* poderá ter diferentes tamanhos e coloração esbranquiçada ou transparente.

18. Deixar os tubos abertos por cerca de 30 minutos para que evapore o restante do etanol.

19. Adicionar em torno de 350 µL de TE, e inverter suavemente. Levar à geladeira.

20. Armazenar o DNA em temperatura ambiente, ou em 4 °C por um dia e, após, armazenar a -20 °C.

Materiais Utilizados:

- Tubos 15 mL. O dobro de tubos da quantidade de amostras.
- Microtubos 2,0 mL. O dobro de microtubos da quantidade de amostras.
- Etanol/álcool 100 % a temperatura ambiente ou gelado.
- Etanol/álcool 70 % gelado.

Reagentes:**Solução TKM 1 (1000 mL)**

- Tris 10 mM = 1,211 g
- KCl 10 mM = 0,745 g
- MgCl₂ 10 mM = 2,033 g
- EDTA 2 mM = 0,744 g
- Acertar pH em 7,6.
- Armazenar a 4 °C.

Solução TKM 2 (100 mL)

- 100 mL de TKM 1
- NaCl 0,4 mM = 2,337 g
- Armazenar a 4 °C.

SDS 10 % (10 mL)

- 1,0 g de SDS
- 10 mL de água Milli-Q
- Armazenar em temperatura ambiente.

NaCl 6M (100 mL)

- 32,66 g de NaCl
- 100 mL de água Milli-Q
- Aquecer para dissolver. Armazenar em temperatura ambiente.

Solução TE (50 mL)

- Tris 10 mM = 0,6 g
- EDTA 1 mM = 0,0186 g
- Acertar pH em 8,0. Armazenar a 4 °C.

2.2 EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS VEGETAIS

O processo de extração de DNA vegetal consta inicialmente, do rompimento da parede e membrana celular, liberando a molécula de DNA. O isolamento de DNA de plantas e de material vegetal proveniente de cultura de tecidos é uma etapa importante na análise da estrutura e organização do genoma de plantas.

Método de Doyle e Doyle (1987)

1. Utilizar cerca de 150 mg de lâminas de folhas frescas ou 50 mg de folhas liofilizadas ou secas. Pulverizar as amostras em nitrogênio líquido. O material pode ser triturado em cadinho e transferido para o tubo, ou diretamente no tubo, usando um micropistilo.

Dica: uma possibilidade é utilizar discos foliares cortados com a tampa dos tubos *epENDORF* de 1,5 mL.

2. Transferir o material para um tubo *epENDORF* de 2 mL, e adicionar 650 µL do tampão de extração:

para 10 mL

2 % CTAB	0,2 g
1,4 M NaCl	2,8 mL do estoque (5 M NaCl)
100 mM Tris-HCl (pH 8,0)	1 mL do estoque (1 M Tris Cl pH 8,0)
20 mM EDTA (pH 8,0)	400 uL do estoque (0,5 M EDTA, pH 8,0)
1 % polivinilpirrolidona	0,1 g do produto

3. Adicionar a uma alíquota do tampão a ser usado, pouco antes do uso:

0,2 % β-mercaptoetanol

50 mg.mL⁻¹ de proteinase K

4. Misturar os tubos em vórtex, e colocá-los em banho-maria a 55°C por uma hora.

5. Adicionar 650 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e misturar até formar uma emulsão.

6. Centrifugar a solução por 5 minutos a 12.000 rpm.

7. Coletar a fase aquosa superior e transferir para um novo tubo, com cuidado para não pipetar a interface. **Caso o volume da fase superior não for superior à fase intermediária com fragmentos de tecido, adicionar mais tampão, misturar vigorosamente e centrifugar novamente.**

8. Adicionar 200 µL do tampão de extração sem proteinase K e β-mercaptoetanol, e adicionar 650 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), misturando até formar uma emulsão.

9. Centrifugar a solução por 5 minutos a 12.000 rpm.

10. Coletar a fase aquosa superior e transferir para um novo tubo, com cuidado para não pipetar a interface.

11. Repetir esses três passos anteriores mais uma vez.

12. Coletar a fase aquosa superior e transferir para um novo tubo, e adicionar um volume igual de isopropanol.

13. Centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm.

14. Lavar o pellet com 1 mL de etanol 70% por duas vezes para remover sais e secar ao ar ou sob vácuo num dessecador.

15. Ressuspender o DNA em 20 μL de tampão TE contendo ribonuclease [RNase] (10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). Em geral prepara-se um estoque dissolvendo 100 mg de RNase em 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5) e 15 mM NaCl; aquecer em água fervente por 15 minutos e resfriar lentamente à temperatura ambiente.

Método de Dellaporta et al. (1983)

1. Ligar o Vapor trap e o banho a 65 °C.
2. Homogeneizar material em nitrogênio líquido.
3. Adicionar 500 μL EB (manter no gelo).
Dica: Realizar até o passo 8 na capela de exaustão.
4. Adicionar 35 μL de SDS 20%, agitar no vórtex, e manter a 65 °C por 10 minutos.
5. Adicionar 130 μL de Acetato de Sódio 5 M, e manter no gelo por 5 minutos.
6. Agitar no vórtex, e centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos.
7. Transferir sobrenadante para novo tubo.
8. Adicionar 60 μL de Acetato de Sódio 5 M e 640 μL de Isopropanol Absoluto.
9. Agitar no vórtex, e centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos.
10. Descartar sobrenadante.
11. Ressuspender o pellet em 200 μL de BTE.
12. Agitar no vórtex e centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos.
13. Transferir sobrenadante e adicionar 20 μL Acetato de Sódio 5 M e 450 μL Etanol Absoluto.
14. Agitar no vórtex e centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos.
15. Descartar sobrenadante.
16. Lavar o pellet com etanol 70%.
17. Secar no Speed Vac por 5 minutos.
18. Dissolver pellet em 50 μL de água Milli-Q (solução estoque)
19. Diluir 1 μL da solução estoque em 49 μL de água Milli-Q
20. Usar 1 μL para PCR.

EB (Extraction Buffer)

1,0 mL	Tris HCl 0,5 M (pH 8,0)	100 mM
1,0 mL	EDTA 0,25 M (pH 8,0)	50 mM
2,5 mL	NaCl 2 M	500 mM
7,2 μL	β -mercaptoetanol	10 mM
5,5 mL	H ₂ O	q.s.p.

BTE

0,50 mL	Tris HCl 0,5 M (pH 8,0)	50 mM
0,02 mL	EDTA 0,25 M (pH 8,0)	1 mM
9,50 mL	H ₂ O	q.s.p.

Referências:

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21, 1983.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15, 1987

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15, 1990.

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE RAIZ

Bactérias promotoras de crescimento vegetal podem ser encontradas dentro das raízes de plantas. Estas podem ocupar o espaço intracelular (em estruturas especializadas denominadas nódulos) ou extracelular (no espaço entre duas células vizinhas). O processo de extração de DNA inicia com a separação das células destes micro-organismos das células da planta, rompimento da sua parede celular liberando o DNA e sucessivas etapas de limpeza e purificação.

1. Separar a raiz do solo rizosférico.
2. Desinfestar as raízes obtidas por imersão em álcool 70 % e solução de hipoclorito (2 %) por 2 minutos cada. Após este procedimento, lavar as raízes com água destilada e esterilizada (cinco vezes).
3. O tecido vegetal desinfestado obtido deve ser cortado em pequenos pedaços.
4. Adicionar 10 gramas do tecido a 90 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85 %) e manter sob agitação por 12 horas a 28°C.
5. Filtrar o sobrenadante com filtro de porcelana G1 estéril, diretamente para um tubo Falcon estéril de 50 mL.
6. Centrifugar a 5.000 rpm por 25 minutos. Descartar o sobrenadante.
7. Repetir os passos 5 e 6 até que toda a solução do tecido vegetal seja filtrada.
8. Ressuspender o pellet em 1970 µL de solução TE1 e adicionar 50 µL de Lisozima (100 mg. mL⁻¹). Manter a 37 °C por 1 hora.

Dica: para aumentar a eficiência da lisozima, a solução pode ser levemente agitada a cada 15 minutos.

Dica: É recomendado colocar em banho a 37 °C.

Solução	Componentes	Quantidade	Objetivo
TE 1	Tris 1 M (pH 8)	1 mL (C _{Final} 10 mM)	Solução tampão Inibir a atividade das nucleases
	EDTA 0,5 M (pH 8)	5 mL (C _{Final} 25 mM)	
	Água destilada estéril	Completar para 100 mL	

Esta solução deve ser armazenada na geladeira. C_{Final} = concentração final.

9. Adicionar 400 µL da Solução de Lise, agitar fortemente e manter a 60 °C por 30 minutos, agitando o tubo eventualmente.

Solução	Componentes	Quantidade	Objetivo
Solução de Lise	EDTA 0,5M pH8	20 mL (CFinal 100mM)	Auxílio na lise da parede celular
	SDS	25 gramas	
	Tris-HCl 1M pH8	5 mL (CFinal 50mM)	
	Água destilada estéril	Completar para 100 mL	

C_{Final} = concentração final.

10. Retirar do banho e manter por 10 minutos a temperatura ambiente.
11. Adicionar 480 µL de Acetato de Amônio (CH₃COONH₄) 8M e manter no gelo por 1 hora.
12. Centrifugar a 5.000 rpm por 30 minutos.
13. Coletar o sobrenadante e transferi-lo para outro tubo.

Dica: Até este momento teremos aproximadamente 3 mL de solução para transferir para outro tubo. Para facilitar o manuseio dos tubos costuma-se dividir em 3 alíquotas de 1 mL e, a partir deste momento, trabalhar com microtubos de 2 mL.

14. Adicionar 1 volume de fenol-clorofórmio, agitar vigorosamente com a mão, e centrifugar a 10.000 rpm por 5 minutos e coletar a fase aquosa (parte superior).

15. Repetir a etapa 13 usando clorofórmio apenas.

16. Em um novo tubo, adicionar à fase aquosa 5 μ L de solução de NaCl 5M e 0,6 volumes de Isopropanol gelado. Manter a mistura *over night* no freezer.

17. Centrifugar a 12.000 rpm por 20 minutos.

18. Adicionar ao pellet 500 μ L de Etanol 70 % e centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos.

Dica: Nem sempre o pellet estará visível, por isso deve-se cuidar para não perdê-lo durante as lavagens.

19. Descartar o Etanol 70 % e secar o pellet por 1 hora a 35 °C.

20. Ressuspender o pellet em 30 μ L de TE2.

Solução	Componentes	Quantidade	Objetivo
TE 2	Tris 1 M (pH 8)	1 mL (C _{Final} 10 mM)	Manter o DNA extraído em ambiente adequado
	EDTA 0,5 M (pH 8)	200 μ L (C _{Final} 1 mM)	
	Água destilada estéril	Completar para 100 mL	

Armazenamento na geladeira. C_{Final} = concentração final.

21. Para verificar a eficiência a extração do DNA, checar 2 μ L da solução em gel de agarose 0,8 %.

2.4 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO DE SOLO

O solo é intensamente habitado por micro-organismos promotores de crescimento de plantas. Esta extração de DNA consiste na separação das células procarióticas dos agregados de solo, lise celular e sucessivas lavagens com o objetivo de remover o material orgânico contido no solo e que inibe muitas reações de biologia molecular.

1. Separar o solo das raízes da planta.

2. Pesar 10 gramas de solo e adicionar este a 50 mL de solução de Crombach. Deixar agitando por 10-12 horas.

Solução	Composição	Quantidade	Objetivo
Crombach	EDTA 0,5 M pH8	2 mL ($C_{\text{Final}} = 1 \text{ mM}$)	Estabilizar a solução
	Tris-HCl	4g ($C_{\text{Final}} = 25 \text{ mM}$)	
	Água destilada	Completar o volume para 1 L	

C_{Final} = Concentração final

3. Centrifugar o sobrenadante em tubos Falcon (15 mL) a 10.000 rpm por 10 minutos. Repetir o procedimento até obter um pellet de aproximadamente 3 gramas.

4. Ressuspender o pellet obtido em 8 mL de solução de Crombach e adicionar 0,1 grama de Lisozima.

5. Incubar a 37 °C por 3 horas.

Dica: para aumentar a eficiência da lisozima, a solução pode ser levemente agitada a cada 15-30 minutos.

6. Adicionar 750 µL de solução de SDS 10 % e incubar a 65 °C por 30-45 minutos.

Dica: a solução de SDS deve ser mantida em um frasco âmbar, protegido da luz.

7. Adicionar 1650 µL de acetato de potássio 8M (CH₃COOK) e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.

8. Centrifugar a 10.000 rpm por 20 minutos e coletar o sobrenadante.

9. Adicionar 4950 µL de solução de PEG 50 % NaCl 1 M e incubar no gelo por 1 hora.

Solução	Composição	Quantidade	Concentração final
PEG 50% NaCl 1 M	PEG 6000	250 g ($C_{\text{Final}} = 50 \%$)	50 %
	NaCl	29,22 g ($C_{\text{Final}} = 1 \text{ M}$)	1 M
	Água destilada	Completar para 500 mL	---

C_{Final} = concentração final

10. Centrifugar a 10.000 rpm por 20 minutos. Descartar o sobrenadante.

11. Ressuspender o pellet em 750 µL de TE2 e transferir a solução para um microtubo de 1,5 mL (a composição da solução TE2 está descrita no protocolo de extração de DNA de bactérias endofíticas da raiz).

12. Adicionar 1 volume de fenol:clorofórmio e agitar vigorosamente.

13. Centrifugar a 5.000 rpm por 5 minutos, retirar a fase aquosa (parte superior) e transferir para um novo microtubo estéril.

14. Repetir os passos 12 e 13 duas vezes usando apenas clorofórmio.

15. Precipitar o DNA com 0,6 volumes de isopropanol gelado e manter no freezer *over night*.

16. Centrifugar a 12.000 rpm por 20 minutos e descartar o sobrenadante.
17. Lavar o pellet com 500 μ L de etanol 70 %, centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos.
18. Descartar o etanol 70 % e secar o pellet por 1 hora a 35 °C.
19. Ressuspender o pellet em 30 μ L de TE2.
20. Para verificar a eficiência da extração do DNA, 2 μ L da solução devem ser checados em gel de agarose 0,8 %.
21. Após verificar se a extração foi eficiente, purificar o DNA obtido em coluna específica para DNA de solo.

Dica: a purificação do DNA ao final do procedimento é uma etapa essencial. O solo carrega consigo uma quantidade muito grande de compostos orgânicos que não conseguimos remover totalmente pela extração convencional. Estes compostos inibem a maioria dos procedimentos de biologia molecular.

2.5 EXTRAÇÃO DE DNA DE UM ISOLADO BACTERIANO

Para confirmação do gênero e da espécie bacteriana, é necessário o uso de técnicas de biologia molecular como caracterização do gene 16S rDNA. Para isso, devemos ter um DNA de excelente qualidade. A extração de DNA descrita a seguir inicia pela multiplicação do isolado bacteriano, seguida pela lise da parede celular e membrana plasmática e sucessivas lavagens para remoção de excessos de meio de cultura e demais componentes celulares.

1. Multiplicar o isolado bacteriano em um meio rico, que propicie seu pleno desenvolvimento.
2. Aliquotar 1,5 mL da cultura bacteriana crescida em microtubos de 1,5 ou 2 mL. Centrifugar por 3 minutos a 12.000 rpm.
3. Descartar o sobrenadante e adicionar 700 µL de **TES**. Homogeneizar e centrifugar por 3 minutos a 12.000 rpm.

Solução	Composição	Quantidade	Objetivo
TES	Tris 1 M (pH 8)	1 mL (C_{Final} 10 mM)	Solução de limpeza
	EDTA 0,5 M (pH 8)	5 mL (C_{Final} 25 mM)	
	NaCl 5 M	3 mL (C_{Final} 150mM)	
	Água destilada estéril	Complete para 100 mL	

Armazenamento: geladeira.

4. Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 500 µL de TE1 (a composição da solução TE1 está descrita no protocolo de extração de DNA de bactérias endofíticas).
5. Adicionar 25 µL de Lisozima (20 mg/mL) e incubar a 37°C por 30 minutos.
Dica: o uso de uma Lisozima de boa qualidade é de fundamental importância.
6. Adicionar 108 µL de SDS 20 % e 6 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e incubar a 58 °C por 15 minutos. Esfriar a temperatura ambiente.

Solução	Composição	Quantidade	Objetivo
Proteinase K	Proteinase K	100 mg (C_{Final} = 20mg/mL)	Degradação proteica
	Glicerol	2,5 mL	
	CaCl ₂ 0,5 M	200 µL	
	Tris 50 mM (pH 8)	1 mL	
	Água ultrapura estéril	1,3 mL	

Armazenamento no freezer. C_{Final} = concentração final.

Dica: a solução de SDS deve ser mantida em um frasco âmbar, protegido da luz.

7. Adicionar 200 µL de Acetato de Amônio (CH₃COONH₄) 8 M, agitar com cuidado e deixar no gelo (ou freezer) por 30 minutos.

Dica: esta solução deve ficar no gelo por no mínimo 30 minutos, mas pode ficar por tempo indeterminado sem prejudicar a amostra.

8. Retirar do gelo (ou freezer) e centrifugar por 20 minutos a 12.000 rpm.
9. Coletar todo o sobrenadante e transferir para um novo microtubo de 1,5 mL estéril.

Dica: se você não conseguir retirar o volume de 500 µL, completar com TE1.

10. Adicionar 1 volume de fenol:clorofórmio e agitar vigorosamente.

11. Centrifugar por 5 minutos a 5.000 rpm, coletar a fase aquosa (parte superior) e transferi-la para um novo microtubo.

Dica: se esta solução não tiver volume de no mínimo 500 µL, completar com TE2.

12. Repetir os passos 10 e 11 usando somente clorofórmio.

13. Repetir os passos 10 e 11 usando somente clorofórmio:álcool isoamílico (24:1).

14. Adicionar 8 µL de uma solução de NaCl 5 M e 0,6 volumes de isopropanol gelado. Misturar com cuidado e manter por 20 minutos no gelo.

Dica: nesta fase a solução deve ter 500 µL. Se não tiver, completar o volume com TE2.

Dica: esta solução deve ficar no gelo por no mínimo 20 minutos, mas pode ficar por tempo indeterminado sem prejudicar a amostra.

15. Centrifugar por 20 minutos a 12.000 rpm.

16. Descartar o sobrenadante, lavar o pellet com 500 µL de etanol 70 % e centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm.

17. Retirar o etanol 70 % e deixar o pellet secar a 35 °C por 1 hora.

18. Ressuspender o pellet em 30 µL de TE2 (a composição da solução TE2 está descrita no protocolo de extração de DNA de bactérias endofíticas).

19. Checar 2 µL da solução em gel de agarose 0,8 %.

2.6 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO DIRETAMENTE DE AMOSTRAS DE LEITE

O leite é um alimento com alto valor nutricional, sendo assim um substrato adequado para o crescimento de diversos micro-organismos, em especial patógenos associados às infecções alimentares. Os métodos bioquímicos para análise da presença de patógenos levam dias para ficar prontos, enquanto que as técnicas moleculares, cada vez mais utilizadas, podem ser úteis na detecção de patógenos. O protocolo a seguir é útil para o isolamento do DNA de bactérias gram-negativas, tais como *Listeria monocytogenes* (Agostini et al., 2012), *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*, diretamente do leite, sem ser necessário o seu isolamento em meio de cultura.

Protocolo de extração baseado em De Gracia (1997)

1. Em um microtubo de 1,5 mL, adicionar 200 µL da amostra de leite.
 2. Acrescentar 20 µL de Tween 20.
 3. Homogeneizar por 10 segundos em agitador orbital (vórtex).
 4. Centrifugar a 12.000 g por 10 minutos a 20 °C.
 5. Descartar o sobrenadante por inversão.
 6. Suspender o sedimento em 300 µL de tampão de Lise [60 µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM EDTA; 250 mM NaCl), 30 µL de SDS 10 %, 15 µL de pK 20 mg/mL, 195 µL de água Milli-Q autoclavada].
 7. Incubar a 37 °C por uma hora homogeneizando a cada 15 minutos.
 8. Adicionar 250 µL de fenol tamponado.
 9. Centrifugar a 12.000 g por 5 minutos.
 10. Transferir 200 µL de sobrenadante a um novo microtubo de 1,5 mL.
 11. Adicionar 100 µL de fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (25:24:1).
 12. Centrifugar a 12.000 g por 5 minutos.
 13. Transferir 150 µL do sobrenadante a um novo microtubo.
 14. Adicionar 26,5 µL de acetato de sódio (2M).
 15. Adicionar 400 µL de etanol absoluto.
 16. Precipitar por 18 horas a -20°C.
 17. Centrifugar a 12.000 g por 20 minutos.
 18. Descartar o sobrenadante por inversão.
 19. Secar o sedimento.
- Dica: pode-se usar um cotonete, tendo o cuidado para não tocar no *pellet*. Secar bem o tubo, pois o álcool interfere na qualidade do DNA.**
20. Dissolver o pellet com 30 µl de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).
 21. Incubar a 56 °C por 15 minutos.
 22. Estocar a -20 °C até o momento da amplificação.

Referências:

DE GRACIA, A. S. **Detecção de DNA de Brucella abortus em amostras de leite bovino experimentalmente contaminado através da reação em cadeia pela polimerase (PCR)**. 1997. 37 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses) – Faculdade de Medicina veterinária e zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

AGOSTINI, C. KRELING C.S, BUSTAMANTE-FILHO, I.C, SOUZA C.F. V, BIOLCHI, V, POZZOBON A. (2012). Detecção de Listeria monocytogenes pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de leite bovino in natura. **Rev. Inst. Latic.** “Cândido Tostes”, Nov/Dez, n° 389, 67: 15-20.

2.7 EXTRAÇÃO DE PLASMÍDEO (MINIPREP)

Plasmídeos são moléculas de DNA circular extracromossomais, em dupla hélice, que podem ser transferidos de célula para célula. Estas moléculas não carregam informação genética essencial para o desenvolvimento bacteriano em condições adequadas, porém, carregam genes acessórios que podem conferir resistência a ambientes inóspitos, torná-las mais competitivas, virulentas, etc.

1. Multiplicar o isolado bacteriano em um meio rico, que propicie seu pleno desenvolvimento.
2. Aliquotar 1,5 mL da cultura bacteriana multiplicada em microtubos de 1,5 ou 2 mL e centrifugar por 6 minutos a 12.000 rpm.
3. Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 200 µL da solução I.

Solução	Componentes	Quantidade	Objetivo
Solução I	Tris 1 M (pH 8)	2 mL	Homogeneização das células
	EDTA 0,5 M (pH 8)	2 mL	
	Glicose 1 M	2,5 mL	

Autoclavar a solução. Armazenar na geladeira.

4. Adicionar 5 µL de RNase e manter por 5 minutos a temperatura ambiente.

5. Adicionar 200 µL da solução II, agitar com a mão e manter no gelo por 5 minutos.

Solução	Componentes	Quantidade	Objetivo
Solução II	NaOH 1 M	20 mL	Lise celular e abertura de poros na membrana
	SDS 20%	5 mL	
	Água destilada estéril	Completar para 100 mL	

Não autoclavar a solução. Manter a temperatura ambiente.

6. Adicionar 200 µL da solução III, agitar com a mão e centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm.

Solução	Componentes	Quantidade	Objetivo
Solução III	Acetato de Amônio 5 M (pH 5,2)	60 mL	Precipitação de proteínas e restos celulares
	Ácido acético glacial	11,5 mL	
	Água destilada estéril	Completar para 100 mL	

Não autoclavar esta solução. Armazenar na geladeira. Colocar no gelo antes de usar.

7. Coletar sobrenadante para um novo microtubo e centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm.
8. Coletar sobrenadante, adicionar 1 volume de isopropanol gelado e manter no gelo por 20 minutos.

Dica: o tempo mínimo para precipitação do DNA plasmidial é 20 minutos, porém, se você deixar mais tempo, poderá aumentar a eficiência da precipitação.

9. Centrifugar por 20 minutos a 12.000 rpm.

10. Descartar o sobrenadante e adicionar ao pellet 500 µL de etanol 70 %.

Dica: nesta fase nem sempre o pellet está visível.

11. Centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm.

12. Retirar o máximo de líquido e secar a temperatura ambiente.

13. Ressuspender o pellet em 50 μL de solução TE2 (a composição da solução TE2 está descrita no protocolo de extração de DNA de bactérias endofíticas de raiz).
14. Para verificar a eficiência da extração, checar 2 μL em gel de agarose 0,8 %.

2.8 EXTRAÇÃO DE RNA UTILIZANDO TRIZOL®

O método de extração de RNA total pelo reagente Trizol® (Invitrogen) é uma adaptação do método original descrito por Chomczynski e Sacchi (1987) que utiliza uma solução de fenol e isotiocianato de guanidina, geralmente empregando 1 mL de Trizol® para 10 cm² de tecido.

1. Adicionar 1 mL de Trizol® em cada tubo *ependorf* contendo os fragmentos do tecido.
2. Fragmentar o tecido no homogenizador até completa dissolução do mesmo.
3. Manter 5 minutos em temperatura ambiente.
4. Adicional 0,2 mL de Clorofórmio.
5. Agitar por 15 segundos no vórtex.
6. Manter 3 minutos em temperatura ambiente.
7. Centrifugar 12.000 g por 15 minutos a 4 °C.

Dica: cuidado ao retirar os tubos da centrífuga, pois as fases separadas podem ser misturadas.

8. Pipetar a fase aquosa para um tubo limpo identificado.

Dica: aspirar lentamente a fase do sobrenadante que contém o clorofórmio e o RNA para não furar a interface que contém restos de membranas celulares.

9. Adicionar 0,5 mL de Isopropanol (álcool isopropílico).
10. Estocar no freezer (-20 °C) por 12 a 18 horas.
11. Centrifugar 12.000 g por 15 minutos a 4 °C.

Desprezar sobrenadante (o RNA precipita formando um *pellet*, como um gel).

Dica: cuidado ao verter, pois o *pellet* pode ser descolado.

12. Adicionar Etanol 75% gelado (1 mL por tubo).

Dica: retirar o etanol da geladeira ou freezer somente na hora de pipetar para manter gelado.

13. Centrifugar 8.000 g por 10 minutos a 4 °C.
14. Desprezar sobrenadante
15. Secar o *pellet* para remover todo o excesso do álcool.

Dica: pode ser utilizado um cotonete para secar o tubo, porém, tome cuidado para não encostar no *pellet*. O excesso de álcool interfere na leitura, portanto, tente deixar o mais seco possível.

16. Ressuspender o *pellet* com água Milli-Q com DEPC autoclavada conforme o tamanho do *pellet*.

Dica: para *pellets* menores usar entre 10 e 20 µL. Para *pellets* maiores, entre 30 e 50 µL.

17. Incubar em banho-maria por 10 minutos a 60 °C
18. Manter 1 minuto no gelo e dar uma breve centrifugada (4.000 rpm).
19. Estocar a -20 ou -80 °C ou proceder à quantificação.

Referência:

CHOMCZYNSKI, P; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162(1): 156-9. 1987.

2.9 EXTRAÇÃO DE RNA DE AMOSTRAS VEGETAIS UTILIZANDO CONCERT™ PLANT RNA REAGENT

Dentre alguns métodos indicados para a extração de RNA de tecidos vegetais ricos em polissacarídeos encontra-se o Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen). É indicado principalmente para tecidos de difícil extração, como raízes e sementes, produzindo RNA de alta qualidade e quantidade. Não deve ser utilizado para espécies de plantas que possuem altos níveis de compostos fenólicos e óleos.

1. Ligar a centrífuga a 4 °C.
2. Esfriar os tubos em nitrogênio líquido antes de transferir as amostras.
3. Homogeneizar material (no máximo 100 mg) em nitrogênio líquido até virar um pó.
4. Adicionar 500 µL do reagente Concert frio (4°C) e agitar bem no vórtex até ressuspender toda a amostra.
Deixar os tubos deitados por 5 minutos a temperatura ambiente. É importante deixar os tubos deitados, pois aumenta a superfície de contato da amostra com o reagente.
Dica: realizar esse procedimento na capela de exaustão.
- 5.
6. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos a 4 °C.
7. Transferir sobrenadante para novo tubo (cerca de 300 µL).
8. Adicionar 200 µL NaCl 2,5 M ou 100 µL NaCl 5 M.
Dica: agitar batendo na bancada algumas vezes.
9. Adicionar 300 µL Clorofórmio e misturar bem invertendo o tubo várias vezes.
10. Centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
11. Transferir sobrenadante para novo tubo
Dica: puxar lentamente para não perturbar a fase orgânica.
12. Adicionar um volume igual de Isopropanol Absoluto e misturar invertendo o tubo várias vezes.
13. Deixar 10 minutos sob temperatura ambiente.
14. Centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
15. Descartar sobrenadante, deixando somente o pellet.
16. Adicionar 1 mL de etanol 75 %.
17. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos.
18. Descartar sobrenadante, deixando somente o pellet.
19. Centrifugar brevemente e remover o líquido residual com a pipeta sem perturbar o pellet.
20. Dissolver pellet em 10-50 µL de água Milli-Q.
21. Se a solução estiver turva, centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto e transferir sobrenadante para novo tubo.
22. Guardar no Ultra-freezer.

2.10 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE AMOSTRAS DE TECIDO DE MAMÍFEROS

A obtenção de um extrato proteico de um tecido de mamífero (ex. miocárdio, mucosa intestinal) consiste na maceração da amostra em solução com lise da membrana celular. Para tanto, se utiliza um homogeneizador de tecido, seguido de centrifugações para separar *debris* celulares e proteínas eluídas na solução. As amostras processadas podem ser quantificadas por métodos usuais e analisadas por SDS-PAGE.

Extração de proteínas:

1. Dissecar 1 cm³ de amostra e pesar cerca de 100 mg;

Dica: realizar todo o procedimento com as amostra em contato com gelo para evitar degradação das proteínas.

2. Fatiar a amostra em uma placa de petry utilizando tesoura de ponta fina ou lamina de bisturi;

3. Acondicionar as amostras em microtubos e rotulá-los devidamente;

4. Adicionar 500 µL de Tampão de lise nos microtubos com as amostras;

	50 ml
50 mM Tris	0,3025 g do produto
150 mM	0,4383 g do produto
1 mM EDTA	0,01861 g do produto
0,1% SDS	0,050 g do produto
1% Triton X-100	500 µL do produto

Inibidor de protease – a escolher

Dica: pesar os reagentes em pó e após ressuspender estes em 40 mL de H₂O ultrapura, adicionar os reagentes líquidos (Triton X-100 e inibidores de protease). Fazer no dia da extração, mantendo-o gelado.

5. Homogeneizar as amostras em homogeneizador, 5x de 1 minuto ou até a obtenção de extrato aquoso. Adicionar 650 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e misturar até formar uma emulsão.

Dica: limpar o homogeneizador entre cada amostra, utilizar 2 falcons com 15 ml de Água destilada e SDS a 10 % (intercalar água, SDS, água pelo menos 3 x e trocar as soluções a cada nova amostra).

6. Centrifugar a amostra a 12.000 rpm, por 1 hora a 4 °C;

7. Transferir cuidadosamente o sobrenadante para novos microtubos, separar uma alíquota de 30 µL para quantificação de proteínas. Identificar e armazenar a -20°C. Descartar o pellet.

Referências:

FREDERICK M. Ausubel, et al. **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons, 2003.

2.11 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE AMOSTRAS VEGETAIS

Este kit comercial de extração de proteínas pode ser utilizado para extrair uma amostra qualitativa das proteínas totais presentes em qualquer amostra vegetal, proveniente de qualquer espécie de planta.

Protocolo de extração de proteínas de plantas utilizando o kit Plant Total Protein Extraction (SIGMA-ALDRICH®)

Dica: Os reagentes devem ser preparados somente na hora do procedimento de extração.

Preparando os reagentes:

Protein Extraction Reagent Type 4:

1. Adicionar 15 mL de água ultrapura ao conteúdo do frasco (vem com o kit). O volume final da solução será de 23 mL.

2. Inverter o frasco diversas vezes com cautela para homogeneizar (cuidado para não formar muita espuma). A completa solubilização pode exigir aquecimento de 20-25 °C. Não deixar a temperatura ultrapassar 30 °C, pois pode ser prejudicial às proteínas.

3. Fazer alíquotas da solução homogeneizada com volume de 990 µL e congelar a -20 °C para utilização futura.

Solução de metanol para extração de proteínas de seis amostras:

1. Identificar um frasco.

2. Colocar 41,58 mL de Metanol.

3. Adicionar 420 µL de *Protease Inhibitor Cocktail* (vem com o kit).

4. Misturar e armazenar no freezer.

Protocolo Detalhado para 6 amostras:

1. Pulverizar o tecido foliar da planta em nitrogênio líquido até formar um pó bem fino.

Dica: o tecido deve ser mantido congelado durante todo o procedimento. O pó das amostras do tecido deve permanecer com coloração cinza-esverdeada. Se o pó começar a ficar com coloração verde escuro é porque o tecido está sofrendo descongelamento.

2. Identificar tubos *eppendorfs* de 2 mL com o nome das amostras.

3. Transferir aproximadamente 250 mg da amostra congelada para os seus respectivos *eppendorfs*, mantendo a amostra sempre congelada.

Dica: Colocar gelo em um béquer e colocar o *eppendorf* dentro para pesar a massa necessária na balança semi-analítica. Após, deixar as amostras pesadas no nitrogênio líquido.

4. Adicionar 1,5 mL da Solução de Metanol em cada amostra. Homogeneizar no vórtex por 30 segundos. Armazenar no freezer por aproximadamente 5 minutos, colocando no vórtex periodicamente.

Dica: a baixa temperatura é essencial para manter as proteínas precipitadas e para evitar a solubilização da Solução de Metanol.

5. Retirar as amostras do freezer e centrifugar a 16.000 g por 5 minutos a 4 °C.

6. Descartar o sobrenadante com auxílio de uma pipeta.

Dica: tome muito cuidado para não perturbar o pellet.

7. Repetir os passos 4, 5 e 6 mais duas vezes.

Dica: Caso as amostras sejam de tecidos vegetais que apresentem alto teor de compostos fenólicos e taninos, repetir os passos 4, 5 e 6 em torno de 4 a 5 vezes para uma melhor extração destes componentes com a Solução de Metanol.

8. Inverter o *epENDORF* com a tampa aberta sobre um papel toalha para descartar qualquer resíduo de metanol.

Dica: O pellet não necessita estar totalmente seco. Porém, qualquer resíduo visível de solução de metanol deve ser evitado.

9. Adicionar 1,5 mL de acetona pré-refrigerada a -20 °C e agitar no vórtex por 30 segundos.

10. Armazenar no freezer por 5 minutos.

11. Centrifugar a 16000g durante 5 minutos a 4°C.

12. Descartar o sobrenadante invertendo o tubo.

Dica: Caso o pellet se mova, descartar o sobrenadante com uma pipeta, cuidando para não perturbar o pellet.

13. Adicionar novamente 1,5 mL de acetona pré-refrigerada a -20°C e agitar no vórtex por 30 segundos.

14. Armazenar no freezer por 5 minutos.

15. Centrifugar a 16000 g durante 10 minutos a 4°C.

16. Descartar sobrenadante com uma pipeta, cuidando para não perturbar o pellet.

17. Deixar o pellet secar por 10 minutos, para tanto deixar o *epENDORF* virado de lado com a tampa aberta sobre um papel toalha, a fim de remover qualquer acetona residual por evaporação.

18. Acrescentar 1 mL de *Working Solution* (WS) em cada amostra. → 990 µL *Reagent Type 4* (alíquotas feitas anteriormente) + 10 µL *Protease Inhibitor Cocktail*

Dica: a *Working Solution* deve ser preparada somente na hora.

19. Agitar no vórtex por 15 minutos.

Dica: Depois de ter adicionado a WS nas amostras, as mesmas devem ser agitadas continuamente. Cuidar para que a temperatura das amostras não passe dos 30°C para evitar degradação proteica.

20. Centrifugar as amostras a 16000 g por 30 minutos para sedimentar os restos de tecido da planta.

21. Coletar o sobrenadante (onde estão as proteínas) e colocar em um novo *epENDORF* devidamente identificado.

2.12 QUANTIFICAÇÃO DE DNA UTILIZANDO O QUBIT®

O fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) é altamente específico e sensível para quantificação de DNA dupla fita, DNA simples fita, RNA e proteínas. Ele utiliza corantes arcades (fluorescentes específicos) para quantificar as moléculas de interesse, sendo que a fluorescência é emitida apenas quando estão ligados a moléculas-alvo específicas, mesmo em baixas concentrações. Apresenta como vantagem o uso de um volume pequeno da amostra (1-20 µl) e boa sensibilidade, sendo capaz de quantificar amostras entre 10 pg/µL e 100 ng/µL.

Protocolo baseado nas instruções do fabricante do Kit Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) (Invitrogen).

1. Preparar a solução de trabalho (*Working Solution*) com o fluoróforo na proporção de 1:200.
2. Para a quantificação usa-se uma curva padrão com valor de 0 a 200, utilizando duas soluções padrão, na quantidade de 10 µL do padrão e 190 µL da solução de trabalho.
3. Adicionar 10 µL de cada padrão Qubit ao tubo apropriado e misturar em vórtex por 2-3 segundos, tomando cuidado para não criar bolhas.

Dica: deve-se pipetar com precisão, pois é fundamental para garantir a exatidão da análise.

4. Pipetar nos tubos 190 µL da solução e 10 µL do DNA extraído de cada amostra.

Dica: o DNA pode ser diluído 5, 10 ou 20 vezes, dependendo da amostra.

5. Ligar o aparelho. Na tela inicial do Qubit 2.0 Fluorometer, pressione DNA, e em seguida, selecione dsDNA Alta Sensibilidade como o tipo de ensaio. A tela Padrões é exibida automaticamente. Se você já tiver realizado uma calibração para o ensaio selecionado, o aparelho irá pedir para escolher entre ler novos padrões ou usar a calibragem anterior.

6. Na tela Padrões, pressione *Yes* para executar uma nova calibração ou pressione *No* para utilizar a última calibração.

7. Para uma nova calibração, insira o tubo contendo padrão 1 no aparelho, feche a tampa e pressione *Read*. A leitura vai demorar cerca de 3 segundos.

8. Remova o padrão 1.

9. Insira o tubo contendo Padrão 2, feche a tampa e pressione *Read*.

10. Remova o padrão 2.

11. A tela *Sample* será automaticamente exibida.

12. Insira um tubo de amostra no aparelho, feche a tampa e pressione *Read*.

13. Após a conclusão da medição, o resultado será exibido na tela.

Importante: o valor obtido corresponde à concentração da amostra que foi diluída (em ng/mL). Para calcular a concentração da amostra original utilize o seguinte cálculo:

$$\text{Concentração da amostra} = \text{valor QF} \times (200)$$

onde: Valor QF = o valor dado pelo aparelho

X = microlitros da amostra adicionada

2.13 QUANTIFICAÇÃO DE RNA UTILIZANDO O QUBIT®

A quantificação de RNA pode ser realizada utilizando-se o *Qubit® RNA Assay Kit* e o equipamento *Qubit® Fluorometer*. É utilizado um fluoróforo que se liga especificamente às fitas de RNA e um fluorímetro que quantifica a intensidade de fluorescência presente em cada amostra, que é diretamente proporcional à concentração de RNA da amostra.

1. Diluir as amostras de RNA 20 vezes: 1 μL do RNA total + 19 μL de água Milli-Q.

2. Preparar a solução de trabalho (*Working Solution - WS*) que será utilizada na calibração e quantificação. Para cada amostra: 199 μL tampão (vem com o kit) + 1 μL fluoróforo (vem com o kit). O fluoróforo congela na geladeira, portanto, deve ser retirado alguns minutos antes da quantificação. Não esquecer que o equipamento deve sempre ser calibrado antes de qualquer quantificação. A calibração é realizada com os dois padrões que vêm junto com o kit (*Standard 1* = 0 $\text{ng}/\mu\text{L}$ e *Standard 2* = 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$). Logo, se você tiver quatro amostras para quantificar, deve preparar WS suficiente para seis amostras.

Dica: se você tiver que quantificar várias amostras, preparar WS para uma reação a mais, para que não falte WS devido a erros de pipetagem ou de calibração da micropipeta.

3. Preparação dos padrões para a calibração:

Standard 1: 190 μL WS + 10 μL *Standard 1*

Standard 2: 190 μL WS + 10 μL *Standard 2*

4. Preparação das amostras:

Cada amostra: 199 μL WS + 1 μL RNA (diluído 20X).

5. Agitar por 5 segundos no vórtex.

6. Ligar o fluorímetro e selecionar "RNA". Após calibrar o equipamento, quantificar cada uma das amostras de RNA.

Dica: caso alguma das amostras apresente uma concentração de RNA muito alta ou muito baixa (fora da curva padrão), é possível variar o volume de RNA diluído que se usa na reação. Por exemplo, ao invés de usar 1 μL de RNA diluído 20X, pode ser utilizado 2, 5 ou 10 μL . Basta informar ao equipamento o volume de RNA utilizado na reação. Tome cuidado que ao utilizar volumes maiores de RNA, o volume de WS será menor, pois a reação sempre tem volume final de 200 μL . Alternativamente, a solução de RNA pode ser menos diluída (5 ou 10X), ou mesmo utilizar RNA não diluído.

2.14 QUANTIFICAÇÃO DE DNA E RNA UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRIA DE DENSIDADE ÓPTICA - L-QUANT®

Após a extração do DNA é importante que seja realizada a quantificação do material obtido, pois isso irá possibilitar o aperfeiçoamento das demais análises genéticas que serão realizadas, por exemplo, uma reação em cadeia da polimerase (PCR). Uma das técnicas mais fáceis e rápidas de quantificação de ácidos nucleicos é através da espectrofotometria de densidade óptica, a qual se baseia no fato de que cada substância apresenta um comprimento de onda específico com o qual ocorre o máximo da absorção de luz. As moléculas de ácidos nucleicos - DNA e RNA - absorvem luz no comprimento de onda de 260 nm e as proteínas no comprimento de 280 nm.

O aparelho L-Quant® permite estimar a concentração de DNA e RNA, em ng/ μ L, de forma rápida e sem a necessidade de diluições do material. Além disso, também é possível identificar a pureza do DNA/RNA através da razão de absorbâncias a 260/280 nm.

Protocolo adaptado de: Manual de Instruções do equipamento Quantificador L- Quant. *Loccus biotecnologia*. Versão 1.0.0.

- Primeiramente prepare as amostras que pretende quantificar. Prepare também um microtubo com a solução que representará o BRANCO no momento da quantificação.

IMPORTANTE: Antes de ler qualquer absorbância de amostras, o branco deve ser lido. O branco se refere à solução na qual a amostra se encontra diluída antes da quantificação. Por exemplo, no caso de uma amostra ser diluída em água destilada, o branco deverá ser apenas água destilada. Essa leitura deve ocorrer antes das leituras das amostras para que seu valor seja diretamente descontado do valor total de leitura das absorbâncias referentes.

- Selecionar o tipo de amostra: No Menu Principal, **item 1 (Selecionar Tipo Amostra)** para selecionar o tipo de amostra da qual será realizada a leitura. Selecione a opção conforme sua amostra: DNA de fita dupla, DNA de fita simples, RNA ou proteína.

PASSO 1 – Leitura do BRANCO:

1. Abra as placas metálicas levantando a placa superior até o limite.
2. Com uma micropipeta, aplique 2 μ L da solução referente ao BRANCO no centro.
3. Abaixee delicadamente a placa metálica superior até o limite.

Dica: evite a formação de bolhas ao aplicar a solução. Em caso positivo, abra as placas metálicas, limpe as plataformas superiores e inferiores com o papel absorvente*, reaplique o branco e feche as placas novamente.

* Papel absorvente = usa-se guardanapos de lenço cortado em pequenos quadradinhos de 1 cm. Utilize uma pinça para pegar o quadradinho e realizar a limpeza do quantificador. **NÃO** utilizar papel higiênico ou papel toalha, pois estes podem riscar a base onde as amostras são aplicadas.

4. Selecione a opção BRANCO na seção Função e pressione a tecla *Enter*. Imediatamente, a leitura será iniciada, e aparecerá um aviso notificando sobre o sucesso da leitura.

5. Após a leitura do BRANCO, levante a placa metálica superior e limpe (suavemente, sem fazer força) as plataformas superior e inferior de leitura.

PASSO 2 – Leitura das AMOSTRAS:

1. Aplique 2 μ L da amostra no centro da plataforma de leitura, de modo a formar uma gota exatamente no centro.

2. Abaixe delicadamente a placa metálica superior. Verifique se houve formação de um canal conectando as duas superfícies da plataforma de leitura com a amostra aplicada. Em caso negativo, abra as placas metálicas, limpe as plataformas superiores e inferiores com o papel absorvente, reaplique a amostra e feche as placas novamente.

Dica: evite formação de bolhas.

3. Selecione a opção “Amostras” para iniciar a leitura da Amostra.

4. Após realizar a leitura, levante a placa metálica superior e limpe as plataformas de leitura (superior e inferior). O resultado da quantificação da amostra estará descrito no canto inferior direito em valor de ng/ μ L.

Dica: há a opção de visualizar os resultados das leituras clicando no terceiro item descrito como “Dados_08”, por exemplo.

5. Quando as leituras estiverem completas, selecione a opção Sair e Salvar. Assim, poderá voltar ao Menu Principal e imprimir os valores quantificados.

Atenção: se houver mais amostras para serem lidas com o mesmo BRANCO, repita os procedimentos do PASSO 2. As informações das leituras serão armazenadas conforme sua sequência. Então, tenha o cuidado de organizá-las, de modo que lembre a sequência. O equipamento permite salvar até 10 arquivos diferentes (Dados 01 - Dados 10), e em cada um desses arquivos podem ser registradas as leituras de até 30 amostras utilizando como referência um mesmo BRANCO.

2.15 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO O QUBIT®

A quantificação de proteína pode ser realizada utilizando-se o *Qubit® Protein Assay Kit* e o equipamento *Qubit® Fluorometer*. É utilizado um fluoróforo e um fluorímetro que quantifica a intensidade de fluorescência presente em cada amostra, que é diretamente proporcional à concentração de proteína da amostra.

1. Diluir as amostras de proteína 20 vezes: 1 μL de proteína total + 19 μL de água Milli-Q.

2. Preparar a solução de trabalho (*Working Solution - WS*) que será utilizada na calibração e quantificação. Para cada amostra: 199 μL tampão (vem com o kit) + 1 μL fluoróforo (vem com o kit). O fluoróforo congela na geladeira, portanto, deve ser retirado alguns minutos antes da quantificação. Não esquecer que o equipamento deve sempre ser calibrado antes de qualquer quantificação. A calibração é realizada com os três padrões que vêm junto com o kit (*Standard 1* = 0 ng/ μL , *Standard 2* = 200 ng/ μL e *Standard 3* = 400 ng/ μL). Logo, se você tiver quatro amostras para quantificar, deve preparar WS suficiente para sete amostras.

Dica: se você tiver que quantificar várias amostras, preparar WS para uma reação a mais, para que não falte WS devido a erros de pipetagem ou de calibração da micropipeta.

3. Preparação dos padrões para a calibração:

Standard 1: 190 μL WS + 10 μL *Standard 1*

Standard 2: 190 μL WS + 10 μL *Standard 2*

Standard 3: 190 μL WS + 10 μL *Standard 3*

4. Preparação das amostras:

Cada amostra: 199 μL WS + 1 μL proteína (diluído 20 X).

5. Agitar por 5 segundos no vórtex.

6. Ligar o fluorímetro e selecionar “proteína”. Após calibrar o equipamento, quantificar cada uma das amostras de proteína.

Dica: caso alguma das amostras apresente uma concentração de proteína muito alta ou muito baixa (fora da curva padrão), é possível variar o volume de proteína diluído que se usa na reação. Por exemplo, ao invés de usar 1 μL de proteína diluído 20 X, pode ser utilizado 2, 5 ou 10 μL . Basta informar ao equipamento o volume de proteína utilizado na reação. Tome cuidado ao utilizar volumes maiores de proteína, pois o volume de WS será menor, uma vez que a reação sempre tem volume final de 200 μL . Alternativamente, a solução de proteína pode ser menos diluída (5 ou 10 X), ou mesmo utilizar a solução de proteína não diluída.

2.16 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD

O método baseia-se na adição de etanol, ácido fosfórico e um corante chamado Azul Brillante de Coomassie G-250 à solução contendo proteínas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante da forma aniônica (vermelha) para a forma catiônica (azul), que absorve fortemente em 595 nm.

Método Bradford:

Reagentes

1. Albumina 1 mg/mL (armazenada a -20 °C)
2. Solução de *Comassie Blue* (armazenada 4 °C)
 - 0,05 g *Comassie (Briliant Blue G)*
 - 25 mL de Etanol 95%
 - 50 mL de Ácido ortofosfórico 85%
 - 500 mL de água Milli-Q

Procedimento

1. Identificar os tubos da **curva** e das **amostras**.
2. Descongelar a albumina em gelo;
3. Pipetar a **Curva padrão de Albumina**, em duplicata ou triplicata, conforme os volumes indicados na segunda coluna da tabela 1.

Tabela 1 – Volumes aplicados nos tubos para quantificação de proteína pelo método Bradford.

Tubos	Albumina 1mg/mL	NaOH 1N	Comassie Blue
Branco	-	50 µL	2,5 mL
1	10 µL	40 µL	2,5 mL
2	20µL	30 µL	2,5 mL
3	30 µL	20 µL	2,5 mL
4	40 µL	10 µL	2,5 mL

Dica: dependendo das necessidades do experimento, mais pontos de curva podem ser adicionados, ou a curva pode ter maior amplitude. Isto deve ser determinado para cada tipo de amostra.

4. Pipetar 10 µL das **amostras** em duplicata ou triplicata nos tubos identificados.
5. Nos tubos da curva de albumina, pipetar os volumes indicados de NaOH 1 N na terceira coluna da tabela 1, e homogeneizar no vórtex.
6. Nos tubos de amostras, pipetar 40 µL de NaOH 1 N e homogeneizar no vórtex.
7. Em todos os tubos, adicionar 2,5 mL de solução de *Coomassie Blue*, e homogeneizar no vórtex.
8. Reservar solução por 5 minutos e, posteriormente, fazer a leitura em 595 nm, zerando com o Branco e começando pela Curva.

Cálculo

Calcular o FCP (fator de calibração parcial) de cada ponto da curva:

$$FCP_1 = Q_1 / A_1$$

Onde: Q = quantidade de proteína adicionada e A = absorbância

Calcular a FCM (fator de calibração médio) = média das FCPs

Estabelecer uma faixa: FCM +10% e -10% ver quais se encaixam. Se algum ponto ficar fora, calcular novo FCM com os que estão dentro da faixa. Calcular a proteína das amostras:

$\text{Abs} \times \text{FCM} \times 100$ (para passar para mL) = mg/mL de proteína

Dicas:

Quando dosar um tipo de amostra nova, recomenda-se testar diferentes diluições da mesma para definir qual diluição resulta em absorbâncias que fiquem dentro da curva.

Para uma curva mais precisa, recomenda-se mais pontos por curva.

O presente protocolo recomenda que a quantificação seja feita em duplicata. Porém, realizar a curva e amostras em triplicata ou mesmo quatuplicata dará mais segurança estatística a dosagem de proteínas.

Em caso de amostras com pouca proteína, pode-se fazer uma curva diluída, usando BSA 0,1 mg/mL.

Evitar dosar amostras com excesso de detergentes (> 2%), o que pode levar a interferência no método.

Referências:

BRADFORD, M. Analytical Biochemistry. 72, 248-254, 1976.

2.17 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE LOWRY

O método de Lowry et al. (1951) é baseado na complexação do cobre em meio alcalino formando uma cuproproteína de cor azul, lido espectrofotometricamente. Os íons cobre, em meio alcalino, reagem com as ligações peptídicas das proteínas, formando um complexo de cor púrpura proporcional à concentração de proteínas presentes na amostra. A albumina bovina é utilizada como padrão.

Método de Lowry:

Reagentes

1. Albumina 1 mg/mL
2. Folin 1 N – armazenado na geladeira
3. Reativo A - Solução de NaOH 0,1 M com Na₂CO₃ 2%.
4. Reativo B – Partes iguais de B1 (CuSO₄ 1%) e B2 (tartarato de Na e K 2%):

Dica: Armazenar o reagente B1 em frasco âmbar; e o reagente B2 em frasco plástico.

5. Reativo C – Partes Reativo Alcalino Cobre:

50 partes do Reativo A para 1 parte do Reativo B. Preparar somente na hora do uso e em frasco âmbar.

Adicionar os reagentes na ordem: A, B1 e B2. Na tabela abaixo, alguns valores padrões para volumes de rotina.

Volume A	Volume B
20 mL	0,4 mL = 200 µL B1 + 200 µL B2
30 mL	0,6 mL = 300 µL B1 + 300 µL B2
40 mL	0,8 mL = 400 µL B1 + 400 µL B2
50 mL	1,0 mL = 500 µL B1 + 500 µL B2
100 mL	2,0 mL = 1.000 µL B1 + 1.000 µL B2

Procedimentos

1. Identificar os tubos da **curva** e das **amostras**.
2. Descongelar a albumina;
3. Preparar o Reativo C (quantidade necessária de acordo com o número de amostras e suas duplicatas);
4. Pipetar a **Curva padrão de Albumina**.

Tubos	Padrão de albumina 1mg/mL	Água Milli-Q	Q (Cálculo)
Branco	0	100 µL	0,00 mg
1, 1'	10 µL	90 µL	0,01 mg
2, 2'	20 µL	80 µL	0,02 mg
3, 3'	40 µL	60 µL	0,04 mg
4, 4'	60 µL	40 µL	0,06 mg
5, 5'	80 µL	20 µL	0,08 mg
6, 6'	100 µL	0	0,10 mg

5. Pipetar as **amostras** em duplicatas nos tubos identificados, adicionando em cada um 10 µL da amostra e 90 µL de água.

6. Adicionar 1 mL do reativo C na curva e nas amostras.

7. Homogeneizar os tubos no vórtex e após, deixar 10 minutos em repouso.
8. Adicionar 100 µL de Folin 1 N na curva e nas amostras.
9. Homogeneizar os tubos no vórtex e manter em ambiente escuro por 20 minutos (a cor é estável por até 2 horas).
10. Realizar leitura em espectrofotômetro a 650 nm, em cubeta de plástico, lavando-a com água entre diferentes amostras.

Cálculo

Calcular o FCP (fator de calibração parcial) de cada ponto da curva:

$$FCP1 = Q1/A1$$

Onde: Q = quantidade de proteína adicionada e A = absorbância

Calcular a FCM (fator de calibração médio) = média das FCPs

Estabelecer uma faixa: FCM +10% e -10% ver quais se encaixam. Se algum ponto ficar fora, calcular novo FCM com os que estão dentro da faixa. Calcular a proteína das amostras:

$$\text{Abs} \times \text{FCM} \times 100 \text{ (para passar para mL)} = \text{mg/mL de proteína}$$

Dicas:

Quando dosar um tipo de amostra nova, recomenda-se testar diferentes diluições da mesma para definir qual diluição resulta em absorbâncias que fiquem dentro da curva.

Para uma curva mais precisa, recomenda-se mais pontos por curva.

O presente protocolo recomenda que a quantificação seja feita em duplicata. Porém, realizar a curva e amostras em triplicata ou mesmo quatriplicata dará mais segurança estatística à dosagem de proteínas.

Em caso de amostras com pouca proteína, pode-se fazer uma curva diluída, usando BSA 0,1 mg/mL.

Evitar dosar amostras com excesso de detergentes (> 2 %), o que pode levar à interferência no método.

Referências:

LOWRY, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis-Farr, A., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

2.18 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO BCA

Método do ácido bicinconínico (BCA) (Smith et al., 1985):

1. O método de BCA é um ensaio colorimétrico utilizado para determinar a concentração de proteína em uma determinada amostra, com a sensibilidade variando de 0,5 µg/mL a 1,5 mg/mL. Este ensaio é baseado na detecção de algumas ligações peptídicas entre aminoácidos específicos da seguinte forma:

1.1 as ligações peptídicas das proteínas reduzem o Cu^{2+} presente em um dos reagentes

1.2 o ácido bicinconínico liga-se ao cobre reduzido (Cu^+), formando uma coloração púrpura que pode ser lida em espectrofotômetro (562 nm).

2. Curva padrão com albumina bovina (BSA), utilizando a solução de BSA padrão incluída no kit.

2.1 A curva padrão é preparada em *ependorfs*, sendo transferido um volume para a microplaca de 96 poços para quantificação, conforme descrito na tabela abaixo:

Tubo	Água (µL)	BSA Sol (µL)	Volume usado (µL)*	[BSA] (µg/mL)
1	0	300 do estoque	10	2000
2	125	375 do estoque	10	1500
3	375	325 do estoque	10	1000
4	175	175 do tubo 2	10	750
5	325	325 do tubo 3	10	500
6	325	325 do tubo 5	10	250
7	325	325 do tubo 6	10	125
8	400	0	10	0= branco

* será coletado para adicionar em cada poço da microplaca

2.2 Adicionar 200 µL do mix do reagente de BCA 50:1 (196 µL do reagente A + 4 µL do reagente B).

2.3 Incubar 30 min a 37 °C e fazer a leitura em espectrofotômetro (562 nm)

2.4 Plotar os dados em Excel e pedir a equação da reta: $y = a + bx$.

Dica: para uma curva ser considerada boa, o valor de R^2 deve ser o mais próximo de 1, sendo satisfatório valores acima de 0,98.

3. Ensaio:

3.1 A uma microplaca de 96 poços adiciona-se 10 µL de amostra e 200 µL do mix do reagente BCA 50:1 (196 µL do reagente A + 4 µL do reagente B).

Dica: preparar o mix do reagente de BCA em um *ependorf* ou tubo de ensaio para todas as amostras + um branco. Misturar. Desta forma, a solução será homogênea para todos.

3.2 Incubar o ensaio por 30 min a 37 °C

3.3 Passado o tempo, realizar a leitura em espectrofotômetro a 562 nm.

4. Cálculo:

4.1 Para leitura em placa de 96 poços: aplicar o valor de absorbância encontrado na equação da reta (para se obter a quantidade de proteína em µg) e multiplicar por 100 (para se obter a quantidade de proteína por mL)

4.2 O resultado é a quantidade de proteína de uma determinada amostra em µg/mL.

Referências:

SMITH, P.K., et al. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150:76-85.

CAPÍTULO 3

GENOTIPAGEM DE POLIMORFISMOS EM AMOSTRAS HUMANAS

Camile Wunsch, Guilherme Pinto Bertuzzi, Júlia Pasqualini Genro, Luana Maria Wollinger, Pricila Girardi, Raquel Piccinini Castoldi, Verônica Contini

A genotipagem de polimorfismos em humanos, geralmente, se baseia em técnicas básicas de biologia molecular. Contudo, há variação de utilização dessas técnicas de acordo com o tipo de polimorfismo a ser analisado. Para tanto, antes de definir os diferentes procedimentos metodológicos a serem utilizados, é necessário compreender alguns aspectos relacionados à classificação dos polimorfismos que ocorrem na espécie humana.

A variação do genoma humano, em pequena escala, pode se dar por meio de variações no tamanho de uma determinada região ou na sequência de bases nitrogenadas que ocorrem em um determinado ponto do material genético. As alterações mais comuns da sequência de bases nitrogenadas em um determinado local do genoma são conhecidas como **polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs)**, do inglês *single nucleotide polymorphisms*, os quais apresentam, na maioria das vezes, apenas dois alelos possíveis. Os SNPs descritos no genoma humano são catalogados em um banco de dados público e identificados por números iniciados por rs (do inglês, *reference SNP*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). Outras variantes polimórficas de sequência de bases podem caracterizar os polimorfismos de inserção/deleção (InDel), os quais são formados pela inserção (ou deleção) de um ou mais nucleotídeos não repetidos em um determinado ponto do genoma.

Os polimorfismos de tamanho, geralmente, apresentam uma sequência repetitiva, que aparece em número variável de vezes, conferindo tamanhos diferentes à região. São constituídos por blocos cujo número de unidades repetitivas é variável. De acordo com o comprimento dessa unidade de repetição, os polimorfismos de tamanho podem ser classificados em microssatélites (com unidades de repetição de 1, 2 ou 4 nucleotídeos) ou **minissatélites** (com unidades de repetição de 10 a 50 nucleotídeos) – que também podem ser denominados **VNTRs** (do inglês, *variable number tandem repeats*).

A seguir, serão apresentadas individualmente as técnicas básicas que são utilizadas para a genotipagem de polimorfismos em humanos. Na seção seguinte, descrevem-se mais especificamente as metodologias de genotipagem que se utilizam dessas técnicas.

3.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A genotipagem de polimorfismos, como os descritos acima, é realizada, geralmente, utilizando metodologias baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR consiste na amplificação (cópia) de determinadas regiões do genoma (neste caso, a região dos polimorfismos) a partir de alterações cíclicas de temperatura, que regulam a ação da enzima envolvida na reação, a **DNA Polimerase**. O procedimento é realizado em um aparelho, capaz de realizar as alterações de temperatura de acordo com programas previamente definidos, denominado **termociclador**. O resultado obtido é a amplificação da região de interesse com bilhões de cópias, o que permitirá as análises posteriores. Tal reação ocorre de acordo com as seguintes fases:

1. Desnaturação inicial (95 °C – 5 minutos)
 2. Desnaturação (95 °C – 15 segundos a 1 minuto)
 3. Anelamento (50 a 65 °C – 1 minuto)
 4. Extensão (72 °C – 1 minuto)
- * Os passos 2, 3 e 4 se repetem de 30 a 40 vezes.
5. Extensão final (72 °C – 10 minutos)

As temperaturas e os tempos apresentados acima são totalmente variáveis, de acordo com as especificidades da reação (propriedades dos *primers* utilizados, tamanho do fragmento de interesse, características da sequência de nucleotídeos etc.).

Para que ocorra a PCR, é necessária a presença de alguns reagentes específicos, os quais são discutidos abaixo:

- **DNA Polimerase:** enzima responsável por sintetizar as cópias da região de interesse. Atua adicionando nucleotídeos durante a fase de extensão.

Nota: as enzimas geralmente são comercializadas juntamente com uma solução tampão (*buffer*) específica, necessária para a ação correta da Polimerase. Deve-se, portanto, sempre estar atento às orientações trazidas pelo fabricante.

- **MgCl₂:** co-fator necessário para o correto funcionamento da DNA Polimerase.

- **Primers:** sequências de oligonucleotídeos específicas para determinadas regiões do genoma. Também conhecidos como iniciadores, são os responsáveis por indicar à DNA Polimerase o local a ser amplificado/copiado.

Nota: Portanto, cada polimorfismo a ser genotipado exige um conjunto de *primers* específico para a região na qual se encontra.

- **dNTPs:** desoxirribo nucleotídeos trifosfatados. São utilizados pela DNA Polimerase como “matéria-prima” para a amplificação do fragmento de interesse.

Nota: devem estar presentes dNTPs dos quatro tipos (Adenina, Citosina, Guanina e Timina), geralmente, em igual concentração.

As concentrações de todos os reagentes mencionados acima variam de acordo com a PCR que se está realizando. Em geral, esses reagentes compõem uma reação cujo volume total é de 25 µL ou 50 µL, com diferentes concentrações de cada reagente. Entretanto, é necessário o desenvolvimento de protocolos específicos para cada região do genoma a ser amplificada. Ou seja, cada polimorfismo a ser genotipado exige uma reação com concentrações que podem ser distintas.

Dessa forma, esse capítulo não irá definir volumes e condições de amplificação, uma vez que essas são características totalmente variáveis. Entretanto, existem algumas condições básicas que podem servir como ponto de partida para a padronização de reações de PCR específicas, as quais podem ser encontradas nos protocolos disponibilizados pelos fabricantes.

Protocolo de PCR básico

(*Taq DNA polymerase Life Technologies™ Protocols*)

<u>Componentes:</u>	<u>Concentração final na reação:</u>
10X PCR <i>buffer</i>	1X
10 mM dNTP mix	0,2 mM cada dNTP
50 mM MgCl ₂	1,5 mM
<i>Primer</i> mix (10 mM cada)	0,5 µM cada
Taq polimerase (5U/µL)	1,0 a 2,5U

Nota: deve-se acrescentar água Milli-Q, ou de injeção, para completar o volume final da reação. A concentração de DNA total acrescentado à reação pode variar conforme as especificações da PCR.

Cuidados durante a realização da técnica:

- Usar os EPI's (Equipamentos de Proteção Individual) necessários e falar o mínimo durante a realização do procedimento.

- Manter todos os reagentes protegidos da luz e no gelo até o momento em que for usá-los.

Dica: fazer alíquotas dos reagentes para que não haja contaminação desses.

- Identificar os microtubos conforme as amostras a serem amplificadas.

Preparar uma reação geral de PCR (contendo os reagentes básicos: buffer ou tampão, dNTPs, MgCl₂, primers, Taq polimerase, água) em um único microtubo, considerando o número de amostras a serem amplificadas. Em seguida, distribuir nos microtubos individuais, previamente identificados, e adicionar o DNA de cada amostra. No caso da realização da reação em uma placa, recomenda-se montar um “esquema/ desenho” da placa, com a localização de cada amostra a ser genotipada.

Dica: multiplicar a quantidade de cada reagente pelo número de amostras a serem amplificadas + Controle Negativo.

Importante: a presença de um tubo de Controle Negativo, sem adição de DNA, é essencial para garantir a qualidade do procedimento.

3.2 DIGESTÃO ENZIMÁTICA

A digestão enzimática, ou clivagem com enzima de restrição, é uma reação em que são utilizadas endonucleases de restrição com sítios de corte específicos. Essas enzimas são capazes de clivar o material genético em algumas regiões, a partir do reconhecimento de sequências específicas, denominadas **sítios de restrição**. Em outras palavras: as enzimas de restrição “cortam” as moléculas de DNA em cada região que apresente um sítio de restrição.

Nota: cada enzima de restrição apresenta um sítio específico e uma determinada condição para reação (tempo e temperatura de incubação, concentração, etc.); tais informações são sempre fornecidas pelo fabricante desses reagentes.

3.3 ELETROFORESE EM GEL

A eletroforese é um método utilizado, entre outras possibilidades, para visualização de material genético. A técnica se baseia na separação de fragmentos de espécies eletricamente carregadas, a partir da exposição a uma corrente elétrica.

Tecnicamente, o método consiste na produção de um gel – que pode ser de agarose ou de poliacrilamida – pelo interior do qual passam as moléculas a serem analisadas. No caso do DNA, as moléculas irão migrar pelo gel em direção ao pólo positivo, e, de acordo com o tamanho, migram em diferentes velocidades. Dessa forma, ao fim do processo, podem ser visualizadas bandas que correspondem a fragmentos de DNA de tamanhos distintos. Pela utilização de corantes fluorescentes, como o brometo de etídio, que se intercala às moléculas de DNA, por exemplo. As bandas ficam visíveis sob iluminação ultravioleta (UV).

Existem diferentes condições para realização da eletroforese. Além do material com o qual se produz o gel, pode-se variar a concentração do mesmo, o tempo de corrida e a intensidade da corrente elétrica. O principal fator determinante dessas condições é a diferença, em número de pares de bases (pb), entre os fragmentos a serem separados. Portanto, para cada protocolo de genotipagem, por exemplo, há um determinado conjunto de condições para a realização da eletroforese. Mais uma vez, esse capítulo não irá discutir essas condições específicas, uma vez que são altamente variáveis, mas faremos algumas considerações técnicas importantes.

Considerações técnicas:

- As técnicas de eletroforese em gel são realizadas em cubas, preenchidas por uma solução tampão líquida, onde o gel é imerso e pela qual passa a corrente elétrica. A solução tampão, geralmente, é formada por Tris, Ácido Bórico e EDTA (TBE 1X) e tem como função permitir o fluxo de elétrons.

Nota: Para a preparação de 1 litro de TBE 10X: dissolve-se 55 g de ácido bórico, 108 g de Tris-base e 9,25 g de EDTA em 1 litro de água Milli-Q (pH desejado de 8,6), Após o preparo é recomendado autoclavar a solução.

- Os géis são sintetizados em formas específicas, capazes de produzir uma estrutura sólida com poços verticais, onde são aplicadas as amostras de DNA a serem analisadas. O volume de agarose ou poliacrilamida necessário para preenchimento dessas formas varia de acordo com o tamanho do equipamento.

Eletroforese em gel de agarose:

- O preparo do gel é realizado diretamente a partir de agarose sólida.

- A concentração do gel é variável e a quantidade de agarose deve ser calculada de acordo com essa concentração. Por exemplo: para um gel com concentração de 1%, dissolve-se 1g de agarose em 100 mL da solução TBE 1X; portanto, um gel com concentração de 1,5 % deve ser feito a partir da dissolução de 1,5 g de agarose em 100 mL de TBE 1X.

- Para que ocorra a dissolução completa da agarose, e posterior solidificação, é necessário aquecer. Após o aquecimento, então, a solução fica homogênea – as partículas de agarose não mais estão visíveis – e pode ser colocada nas formas para solidificação.

Dica: ao aquecer, em um aparelho micro-ondas, evite que a solução transborde durante a fervura. Para isso, o ideal é pausar o aquecimento a cada 10 segundos, aproximadamente, e movimentar o frasco em movimentos circulares, para homogeneização. Em aproximadamente 30

segundos a mistura já se encontra dissolvida. É importante também evitar a formação de bolhas no momento de verter a solução na forma.

- O corante de visualização (brometo de etídio ou assemelhado) deve ser adicionado ao gel ainda no estado líquido, após resfriamento parcial.

Dica: o brometo de etídio é uma substância carcinogênica. Seu manuseio e de todo o material em contato deve ser feito cuidadosamente, utilizando luvas sem talco (azuis), em área isolada e específica. Ao homogeneizar a solução, não respirar o vapor.

- Após a solidificação do gel, imergir completamente em TBE 1X no interior da cuba e aplicar as amostras a serem analisadas.

Dica: no momento da aplicação das amostras é necessário adicionar um corante, como o azul de bromofenol, para monitorar a migração das moléculas de DNA no gel.

- Posicionar o gel sempre de modo que os poços estejam próximos ao pólo negativo para que, ao ser atraído pelo pólo positivo, o DNA migre pelo interior do gel.

- Examinar o resultado sob radiação UV (em um transiluminador).

Dica: não olhar diretamente para a luz UV, sempre fechar a tampa do transiluminador e utilizar óculos de proteção antes de ligá-lo.

- É essencial, em procedimentos de genotipagem de polimorfismos, adicionar um marcador de peso molecular (em pb), conhecidos com *Ladder*. Os diferentes marcadores auxiliam na identificação do tamanho dos fragmentos de interesse. Por exemplo, um *Ladder* de 50 pb produzirá uma sequência de fragmentos de 50 pb a 500 pb no gel, em múltiplos de 50 pb. **Nota:** os padrões gerados por diferentes *Ladders* são fornecidos pelo fabricante quando da compra do material.

- Devido ao potencial carcinogênico do brometo de etídio, o descarte do gel e das luvas utilizadas no seu preparo e manipulação deve ser feito em lixeiras específicas (saco laranja), próprias para material infectante e perigoso. A lavagem dos materiais utilizados deve ser realizada em local específico, assim como a vidraria de preparo dos géis de agarose deve ser de uso exclusivo dessa técnica.

Eletoforese em gel de poliacrilamida:

- O preparo do gel pode ser realizado diretamente a partir de acrilamida e bis-acrilamida sólidas. Entretanto, devido à toxicidade desses compostos no estado sólido, costuma-se preparar uma solução aquosa de acrilamida 30 %, a partir da qual são feitas diluições para se atingir a concentração de cada gel.

- Para preparação da solução de acrilamida 30 %: dissolve-se 15 g de acrilamida e 0,4 g de bis-acrilamida em 50 mL de água destilada.

- O gel assume estado sólido após o processo de polimerização da acrilamida, que forma uma rede de poliacrilamida. Para que essa polimerização ocorra, é necessária a adição dos catalisadores Persulfato de Amônio e TEMED.

Importante: as concentrações desses reagentes variam de acordo com o volume do gel a ser produzido.

- A montagem das cubas de eletroforese em gel de poliacrilamida pode variar significativamente de acordo com o modelo do equipamento. Em geral, as cubas são verticais e o gel é polimerizado entre duas placas de vidro. Geralmente, a corrida ocorre, assim como na eletroforese em gel de agarose, a partir da imersão em solução de TBE 1X.

- A coloração de géis de poliacrilamida pode ser realizada de diferentes maneiras. As mais comuns são a imersão em nitrato de prata ou em solução aquosa de brometo de etídio; entretanto, cada técnica apresenta condições e características bastante específicas.

3.4 METODOLOGIAS DE GENOTIPAGEM BASEADAS NA PCR

a) Genotipagem de VNTR: PCR

Para a genotipagem de polimorfismos do tipo VNTR, a metodologia é simples: consiste na realização de uma PCR específica para a região polimórfica, utilizando *primers* que se localizem em local externo à região repetitiva. Com isso, ocorrerá a amplificação de fragmentos de diferentes tamanhos, conforme o número de repetições que cada molécula de DNA apresenta.

Após a amplificação, realiza-se a eletroforese das amostras amplificadas e, de acordo com a posição das bandas no gel, é possível determinar os alelos presentes em cada amostra.

Dica: ao estabelecer um protocolo para genotipagem de VNTR, é essencial conhecer o tamanho da unidade de repetição, bem como o número de repetições presentes nos alelos mais frequentes. Isso permitirá desenvolver condições de amplificação e eletroforese mais adequadas à detecção dos fragmentos de tamanhos distintos.

b) Genotipagem de SNP: PCR-RFLP

A metodologia de genotipagem de SNP por PCR-RFLP (PCR – *Restriction Fragment Length Polymorphism*) baseia-se na detecção de padrões eletroforéticos distintos, após digestão das amostras a serem genotipadas com enzima de restrição específica. Por apresentarem sequências distintas, os dois alelos possíveis têm reações diferentes após a clivagem, e tal diferença fica visível após a realização da eletroforese.

Para realização da metodologia de PCR-RFLP, portanto, é necessário que o polimorfismo crie ou anule um sítio de restrição para alguma enzima. Ou seja: apenas um dos alelos possíveis apresentará o sítio de restrição, de modo que, em amostras de DNA que contenham tal alelo, o produto de PCR será clivado e observado na forma de fragmentos menores após a eletroforese.

Três etapas compõem tal metodologia de genotipagem:

(I) Amplificação do fragmento de interesse: consiste na realização de uma PCR, utilizando *primers* específicos, localizados em região externa ao local de ocorrência do SNP.

Dica: antes de fazer a clivagem, checar o produto da PCR em uma eletroforese simples, que objetiva a visualização de bandas de apenas um tamanho.

(II) Clivagem do produto da PCR com enzima de restrição específica: as condições para a reação de clivagem variam de acordo com a enzima utilizada. Cada enzima de restrição apresenta uma determinada concentração e determinado tempo e temperatura de incubação que possibilitam a clivagem dos fragmentos de PCR.

(III) Eletroforese para detecção dos diferentes alelos: na eletroforese final, podem ser visualizados três fragmentos distintos de tamanhos: (a) o fragmento de tamanho igual ao produto da PCR, que corresponde ao alelo que não apresenta o sítio de restrição para a enzima – e que, portanto não é clivado; (b) e (c) fragmentos de menor tamanho, resultado da clivagem do produto da PCR; correspondem ao alelo que apresenta o sítio de restrição – e que, portanto, é clivado durante a digestão.

Dica: poderão ser observados, então, três padrões eletroforéticos distintos para cada uma das amostras: (1) amostras de indivíduos homozigotos para o alelo que não apresenta o sítio de clivagem exibirão apenas um fragmento maior, o fragmento do produto da PCR; (2) amostras de indivíduos homozigotos para o alelo que possui o sítio de clivagem apresentarão dois fragmentos menores, produtos da digestão enzimática; e (3) amostras de indivíduos heterozigotos para o SNP apresentarão os três fragmentos possíveis.

c) Genotipagem de SNP: PCR em Tempo Real (Sistema de discriminação alélica TaqMan® - Applied Biosystems)

A metodologia para a genotipagem de SNPs pelo sistema de discriminação alélica TaqMan® segue o princípio geral da PCR convencional. No entanto, a PCR em tempo real permite a quantificação dos ácidos nucleicos durante o processo, por meio da utilização de compostos fluorescentes (fluoróforos), os quais emitem sinais de fluorescência na medida em que aumenta a quantidade de produto da PCR. A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação específica, com sistemas para a excitação e coleta da fluorescência e um *software* acoplado para a análise dos dados.

O sistema TaqMan® utiliza sondas (fragmentos de DNA marcados com fluoróforos) que hibridizam com regiões específicas do genoma, localizadas entre os sítios de ligação dos *primers*. A sonda é marcada com um fluoróforo repórter na extremidade 5' e com uma molécula *quencher* na extremidade 3'- assim, quando a sonda está intacta, a proximidade entre o fluoróforo repórter e o *quencher* impede a emissão de fluorescência. Durante a reação da PCR ocorre a hibridização dos *primers* e da sonda e, durante a extensão dos *primers* pela enzima Taq Polimerase, por sua atividade 5'-3' exonuclease, ocorre a clivagem da sonda. Desta forma, a fluorescência emitida pelo fluoróforo repórter pode ser detectada pelo sistema. Assim, o sistema é capaz de produzir, ao fim da PCR, uma descrição da intensidade de fluorescência detectada a cada ciclo.

Para a genotipagem de SNPs pelo sistema de discriminação alélica TaqMan® são necessárias, portanto, além dos reagentes de uma PCR convencional, duas sondas (marcadas com fluoróforos distintos), as quais são específicas para cada alelo do polimorfismo a ser genotipado. Diversos ensaios já padronizados, com conjuntos de *primers* e sondas específicas, estão disponíveis para a genotipagem de milhares de SNPs em humanos. Os demais reagentes necessários à PCR (enzima Taq Polimerase, dNTPs, tampão da reação) também podem ser adquiridos balanceados, e em conjunto, em um "*master mix*" específico para o sistema de discriminação alélica TaqMan®.

Existem diferentes modelos de equipamentos de PCR em tempo real, os quais podem variar nos sistemas ópticos, na capacidade de amostras e nos softwares de análise dos dados. No entanto, para a genotipagem de polimorfismos através do sistema de discriminação alélica TaqMan® algumas condições básicas podem ser observadas:

- O ensaio padronizado de cada SNP (contendo os *primers* e as sondas) é adquirido, geralmente, em uma concentração de 40X.

Dica: para cada ensaio é disponibilizado sempre a informação correspondente aos fluoróforos repórteres. De forma geral, os dois alelos possíveis do polimorfismo são marcadores com as fluorescências VIC e FAM, respectivamente.

- O *master mix* de genotipagem, geralmente, está em uma concentração de 2X.

Dica: recomenda-se uma padronização na concentração de DNA de todas as amostras a serem genotipadas.

Dica 1: recomenda-se sempre observar as condições descritas e sugeridas pelo fabricante, tanto na preparação da reação, quanto no funcionamento do *software*.

Cuidados durante a realização da técnica:

- Usar luvas sem talco (azul) para manusear o equipamento.
- Manter todos os reagentes TaqMan® protegidos da luz e no gelo até o momento em que for usá-los. A exposição excessiva à luz pode afetar as sondas fluorescentes.

Dicas: fazer alíquotas dos reagentes TaqMan® para que não haja contaminação desses; enrolar os tubos e alíquotas dos ensaios em um pedaço de papel alumínio para evitar a exposição excessiva de luz.

- Assim como em uma reação de PCR convencional, recomenda-se preparar uma reação geral de PCR (contendo o *master mix* e o ensaio) em um único microtubo, considerando o número de amostras a serem amplificadas, e distribuir posteriormente. Da mesma forma, é indispensável a presença de um ou mais controles negativos da reação.

Leitura dos resultados:

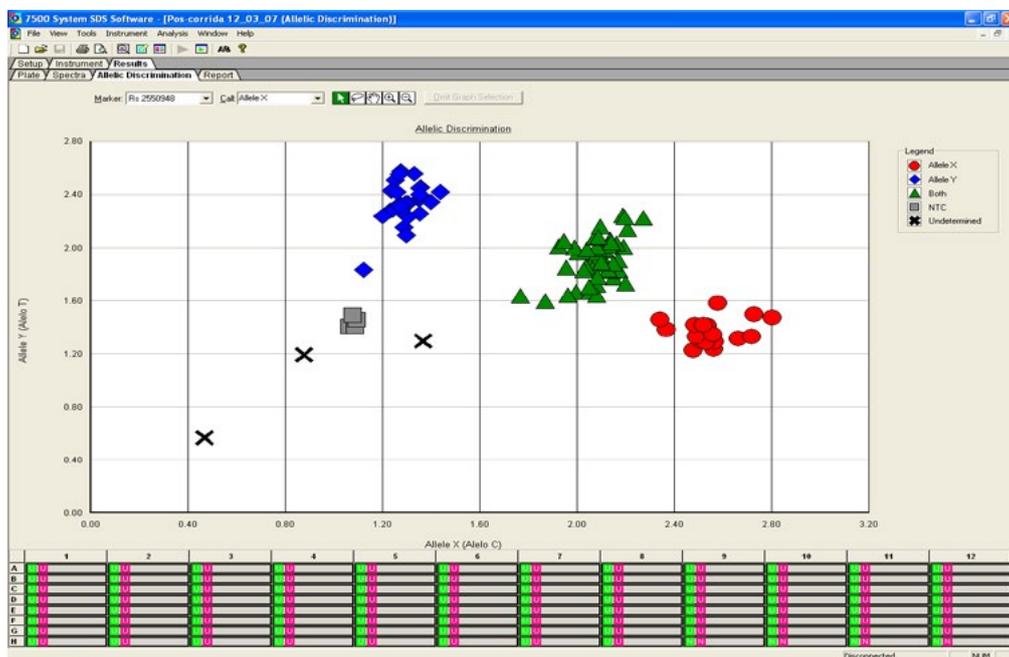
A leitura dos resultados da genotipagem de SNPs por PCR em tempo real é dita “*endpoint*”, pois avalia a emissão de fluorescência das sondas no final da termociclagem. Assim, para um determinado SNP, três grupos diferentes podem ser observados, de acordo com o tipo de fluorescência emitida. Por exemplo, para um SNP com os alelos T (sonda marcada com o fluoróforo VIC) e G (sonda marcada com o fluoróforo FAM), são possíveis três genótipos, cada qual correspondendo a uma leitura de fluorescência: (i) amostras homocigotas TT exibirão a fluorescência VIC; (ii) amostras homocigotas GG emitirão a fluorescência FAM e (iii) amostras de heterocigotos exibirão as duas fluorescências (VIC e FAM).

Embora o funcionamento do *software* de análise dos resultados varie conforme o modelo do equipamento de PCR em tempo real utilizado, basicamente os resultados podem ser visualizados de duas maneiras:

1. Allelic Discrimination Plot

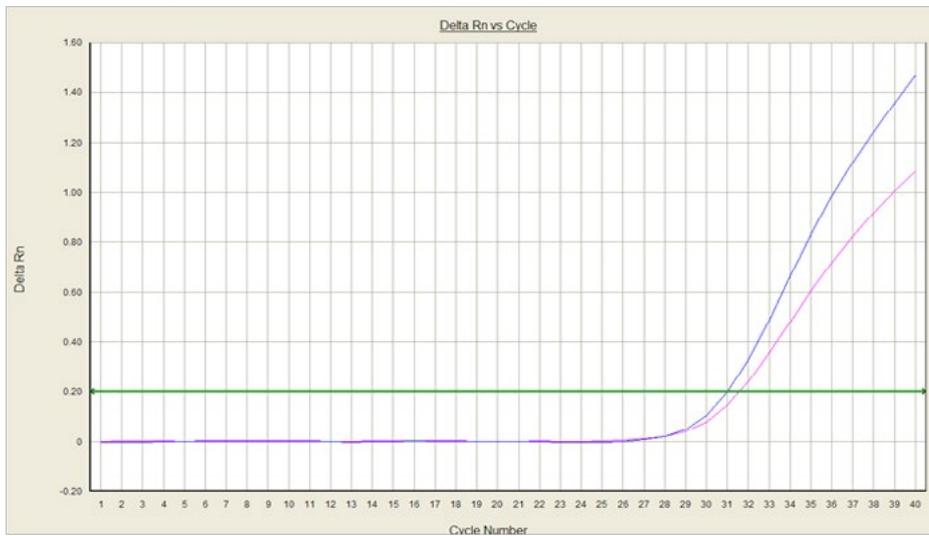
- Gráfico com o resultado final da reação. Exibe a classificação das amostras nos três genótipos possíveis do SNP analisado.

- Clicando sobre os poços individuais da placa é possível identificar a amostra no gráfico e vice-versa.



2. Amplification Plot

- Permite a visualização individual de cada amostra durante o ciclo da PCR.
- O exemplo abaixo corresponde a uma amostra heterozigota (detecção das duas fluorescências durante a amplificação).



CAPÍTULO 4

ANÁLISES FISIOLÓGICAS EM AMOSTRAS VEGETAIS E ANIMAIS

Adriane Pozzobon, Andressa Dametto, Bruna Caye, Cláudia Stein, Dalana Faleiro, Débora Mara Kich,
Édina Aparecida dos Reis Blasi, Eduardo Cremonese Filippi-Chiela, Giseli Buffon,
Isabel Cristina Gouvêa de Borba, Luciana Knabben Oliveira Becker Delving, Marcia Ines Goettert,
Mardja Manssur Bueno e Silva, Raul Antonio Sperotto, Ronize Zeni da Silva,
Vinicius de Abreu Waldow

4.1 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILAS

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas folhas, sendo fundamentais para a produção de oxigênio e açúcares por meio da fotossíntese. O conteúdo de clorofila nas folhas é comumente utilizado para estimar o potencial fotossintético e, conseqüentemente, analisar o desenvolvimento e crescimento da planta.

Método de Ross, 1974:

1. Identificar e pesar os tubos *ependorf* de 2,0 mL que serão utilizados (P_i).
2. Pulverizar o material vegetal em nitrogênio líquido (N_2) utilizando cadinho e pistilo.
3. Transferir para os tubos *ependorf* em torno de 100 mg do material pulverizado.
4. Adicionar 1,5 mL de Acetona 85% e agitar vigorosamente.
5. Deixar em repouso por 30 minutos em local escuro.

Dica: pode ser colocado em uma gaveta.

6. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos.
7. Coletar o sobrenadante em outro tubo (pode ser um tubo *Falcon* de 15 mL) e repetir o passo 4 e 6 com o *pellet* restante até a completa extração das clorofilas, que é alcançada quando o *pellet* apresenta-se descolorido. Colocar os tubos com o *pellet* em estufa a 60° C por no mínimo cinco dias. Após, pesar os tubos contendo o peso seco (P_f).

8. Acertar o volume final na proveta, pra facilitar o cálculo posterior.

Dica: Utilizar Acetona 85% para acertar o volume final em 10 mL.

11. Realizar a leitura no espectrofotômetro (645 nm e 663 nm).
12. Calcular as concentrações de clorofilas (g/l):

$$Cl_{o_a} = (0,0127 \times \text{Absorbância}_{663\text{nm}}) - (0,00269 \times \text{Absorbância}_{645\text{nm}})$$

$$Cl_{o_b} = (0,0229 \times \text{Absorbância}_{645\text{nm}}) - (0,00468 \times \text{Absorbância}_{663\text{nm}})$$

13. Calcular o peso seco: PS: $P_f - P_i$
14. Calcular a concentração de clorofila (a, b, ou total) em relação ao peso seco.

Referência:

ROSS, C. W. *Plant Physiology Laboratory Manual*. Belmont, CA, USA: Wadsworth Publishing Company, 1974.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS

Este protocolo é utilizado para quantificar os açúcares solúveis totais (glicose, frutose, sacarose) de uma amostra, utilizando-se o reagente Antrona.

1. Homogeneizar material em nitrogênio líquido.
2. Adicionar 2 mL de etanol 80% em 100 - 250 mg de material e agitar no vórtex.
3. Manter a 75 °C por 10 minutos.
4. Centrifugar a 10.000 g por 10 minutos.
5. Transferir sobrenadante para novo tubo e lavar o precipitado (fração insolúvel) com 2 mL de etanol 80%. Coletar novamente o sobrenadante.
6. Seguir imediatamente a reação.

Reação:

950 µL Antrona (Preparação: 150 mg Antrona + 100 mL H₂SO₄ 72%)

50 µL da amostra

7. Incubar reação em água fervente, por 10 minutos.
8. Após resfriamento das amostras, realizar leitura em espectrofotômetro (650 nm).
9. Calcular a concentração de açúcares solúveis totais através de uma curva de concentração de glicose (0-100 µg de glicose).
10. Calcular a razão entre o conteúdo de açúcares solúveis totais e o peso seco da amostra.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE CARBONILAÇÃO OU OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantificação de carbonilação de proteínas é um método para determinar a existência de estresse oxidativo em amostras biológicas, que levam a uma maior oxidação e, conseqüentemente, à degradação das mesmas.

Método de Levine et al., 1994:

1. Preparar o Tampão de Extração:

Tris HCl 1 M (pH 8,0)	0,5 mL	(50 mM)
EDTA 50 mM	0,4 mL	(2 mM)
PMSF 100 mM	100 µL	(1 mM)
Benzamidina 100 mM	100 µL	(1 mM)
H ₂ O MilliQ	q.s.p.	
TOTAL	10 ml	

2. Pulverizar material (0,2 - 0,5 g) em nitrogênio líquido (N₂).

3. Adicionar 1 mL do Tampão de Extração em cada amostra.

4. Centrifugar a 11000 g por 15 minutos a 4° C.

5. Coletar sobrenadante e utilizar imediatamente nos passos posteriores.

6. Transferir 500 µL do extrato para novo tubo.

7. Adicionar 50 µL de streptomicina 10% e manter a temperatura ambiente por 15 minutos.

8. Centrifugar a 11000 g por 10 minutos a 4° C.

9. Coletar sobrenadante e transferir para um tubo novo.

10. Adicionar 500 µL de TCA 20% e manter a temperatura ambiente por 15 minutos.

11. Centrifugar a 11000 g por 10 minutos a 4° C e descartar sobrenadante.

12. Ressuspender o precipitado em 500 µL de DNPH (10 mM, 2 M HCl).

13. Incubar por 1 hora a temperatura ambiente, agitando a amostra de 15 em 15 minutos.

14. Adicionar 500 µL de TCA 20% e manter a temperatura ambiente por 15 minutos.

15. Centrifugar a 11000 g por 10 minutos a 4° C e descartar sobrenadante.

16. Lavar precipitado com 1 mL de Etanol:Acetato de Etila (1:1) e manter a temperatura ambiente por 10 minutos.

17. Centrifugar a 11000 g por 3 minutos a 4° C.

18. Repetir a lavagem por mais duas vezes (passos 16 e 17).

19. Ressuspender precipitado em 0,6 mL de Ureia 6 M (pH 2,4) e manter a temperatura ambiente por 15 minutos.

20. Realizar leitura no espectrofotômetro (A₃₇₀).

21. Determinar o conteúdo de Carbonil de acordo com a fórmula:

$$\text{Carbonil } (\mu\text{M}) = (A_{370} / 22.000) \times 1.000.000$$

22. Determinar o teor de proteínas de cada amostra por Bradford (1976).

23. Calcular a razão entre o conteúdo de Carbonil e o teor de proteínas de cada amostra.

Referência:

LEVINE, R. L; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, v. 57, p. 233-346, 1994.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DO NÍVEL DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA UTILIZANDO TBARS

Este protocolo, indiretamente, é utilizado para quantificar o nível de peroxidação lipídica, por meio da quantificação de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Determinação de TBARS (Hodges et al., 1999)

1. Homogeneizar as amostras em N₂ líquido.
2. Adicionar 0,2 - 0,5 g em tubo previamente pesado e identificado.
3. Adicionar 1,5 ml de etanol 80%.
4. Centrifugar a 3.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Coletar sobrenadante e seguir imediatamente os passos seguintes.
6. Para determinação de TBARS, adicionar 0,5 ml de extrato diluído (1:5) nas reações:

TBA -

100 µl TCA 100%
50 µl BHT 0,1%
350 µl H₂O

TBA +

100 µl TCA 100%
50 µl BHT 0,1%
325 µl TBA 1%
25 µl H₂O

7. Agitar as amostras vigorosamente e incubar a reação à 95° C por 25 minutos.
8. Após o resfriamento, realizar as leituras em espectrofotômetro (440, 532 e 600nm).
9. Calcular os equivalentes de MDA (TBARS) da seguinte maneira:
$$[(\text{Abs } 532 + \text{TBA}) - (\text{Abs } 600 + \text{TBA}) - (\text{Abs } 532 - \text{TBA} - \text{Abs } 600 - \text{TBA})] = A$$
$$[(\text{Abs } 440 + \text{TBA} - \text{Abs } 600 + \text{TBA}) \times 0,0571] = B$$
$$\text{TBARS (nmol. ml}^{-1}\text{)} = (A - B/157.000) \times 10^6$$
10. Calcular a razão entre o conteúdo de TBARS e o peso seco da amostra.

Referência:

HODGES, D.M.; DELONG, J.M.; FORNEY, C.F.; PRANGE, R.K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE VAZAMENTO DE ELETRÓLITOS (ELECTROLYTE LEAKAGE ASSAY)

Esta técnica permite avaliar a integridade das membranas celulares, uma vez que quanto menor a condutividade elétrica da solução, menor é a quantidade de eletrólitos que extravasaram, indicando o grau de integridade da membrana celular.

1. Coletar 10 discos foliares medindo aproximadamente 1 cm de diâmetro.
2. Incubar em 20 mL de água destilada.
3. Manter à 25 °C por 24 horas, com agitação leve e constante.
4. Medir a condutividade elétrica do extrato (L1), utilizando um condutivímetro.
5. Ferver as amostras por 1 hora, com os tubos vedados.
6. Medir novamente a condutividade elétrica (L2).
7. O percentual de danos nas membranas (DM) é estimado pela relação:

$$\%DM = (L1/ L2) \times 100$$

Referências:

BLUM, A., Ebercon, A. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Science* 21: 43-47, 1981.

SILVEIRA, J.A.G.; Melo, A.R.B.; Viégas, R.A., Oliveira, J.T.A. Salt-induced effects on the nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. *Environmental and Experimental Botany* 46: 171-179, 2001.

4.6 LOCALIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA UTILIZANDO O REAGENTE DE SCHIFF

Este método identifica os grupamentos aldeídos que são produzidos em resposta à peroxidação de lipídios, sendo um excelente marcador de estresse oxidativo e senescência.

Reagente de Schiff

2 g de fucsina básica

20 mL de HCl 1 N

2 g de metabissulfito de sódio

4 g de carvão ativado

400 mL de água destilada

Técnica para preparar o reagente de Schiff

1. Ferver a água destilada em um balão volumétrico.
2. Remover do calor e lentamente adicionar a fucsina básica, sempre agitando (aproximadamente 5 minutos).
3. Deixar esfriar para 50°C e adicionar o HCl. Filtrar.
4. Esfriar para 25°C e adicionar o metabissulfito de sódio. Agitar bem (aproximadamente 1 hora).
5. Envolver o recipiente em papel alumínio ou saco preto.
6. Deixar no escuro durante a noite.
7. No dia seguinte, adicionar o carvão ativado e filtrar imediatamente. Repetir este passo até que o filtrado torne-se incolor.

Detecção histoquímica da peroxidação lipídica descrita conforme Pompella et al. (1987)

As amostras devem ser coradas com reagente de Schiff durante 60 minutos para detectar aldeídos provenientes da peroxidação lipídica. Depois da reação com o reagente de Schiff, a amostra deve ser lavada com uma solução de sulfito (0,5% $K_2S_2O_5$ em HCl 0,05 M) e mantida nessa solução para manter a coloração.

Referência:

POMPELLA, A.; MAELLARO, E.; CASINI, A. F.; COMPORTI, M. Histochemical detection of lipid peroxidation in the liver of bromobenzenepoisoned mice. *American Journal of Pathology* 129: 295-301, 1987.

4.7 LOCALIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DA PERDA DE ESTABILIDADE DE MEMBRANA UTILIZANDO O REAGENTE EVANS BLUE

Este protocolo permite a localização histoquímica da perda de estabilidade de membrana (indicativo de morte celular) utilizando-se o corante Evans Blue, que penetra em células mortas, marcando o tecido com pontos ou regiões de cor azulada. Pode ser utilizado tanto para folhas como raízes.

Método de Romero-Puertas et al. (2004)

1. Preparar uma solução 0,25% de Evans Blue.

Dica: 0,25 g em 100 mL ou 0,50 g em 200 mL de água Milli-Q.

2. Imergir segmentos foliares de aproximadamente 5 cm nesta solução (ou raízes).

Dica: Pode ser usada uma placa de petri.

3. Manter imerso por cinco horas em temperatura ambiente.

4. Ferver em etanol absoluto para retirar a clorofila das folhas, e assim poder visualizar as regiões demarcadas pelo Evans Blue. Amostras de raízes não precisam ser fervidas.

Dica: Para retirada da clorofila pode ser utilizado uma chapa com aquecimento. Cuidar com a fervura do etanol.

5. Após a fervura, retirar as folhas e conservar em etanol 70% até a retirada de fotos para registro.

Dica: Cuidado no manuseio das folhas retiradas do etanol, pois as mesmas enrolam e rasgam com facilidade.

Referência:

ROMERO-PUERTAS, MC; Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA, Sandalio LM (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O_2^- and H_2O_2 in pea leaves. Plant, Cell and Environment 27: 1122-1134.

4.8 LOCALIZAÇÃO HISTOQUÍMICA *IN SITU* DO ACÚMULO DE RADICAL SUPERÓXIDO (O₂⁻)

O método de localização histoquímica *in situ* do acúmulo de radical superóxido (O₂⁻) em tecidos vegetais utiliza o reagente NBT (*Nitro blue tetrazolium*), que reage com o radical superóxido produzindo pontos de cor azul.

Método de Shi et al., (2010):

1. Preparar Tampão Fosfato de Potássio (K₂HPO₄), 10 mM, pH 7.8;

2. Preparar uma solução Tampão + NBT (1 mg NBT/mL de Tampão);

Dica: preparar na hora e dissolver bem. O NBT é sensível à luz, logo, seu frasco deve ficar protegido com papel alumínio e não se deve preparar mais do que o necessário para uso naquele momento.

3. Imergir segmentos do tecido (no caso de folhas, em torno de 5 cm) nesta solução;

Dica: podem ser usadas placas de petri para a imersão.

4. Manter três horas sob iluminação forte e constante;

Dica: pode ser usada a luz de uma capela de exaustão, mas é importante aproximar ao máximo as amostras da luz, para que esta seja eficiente.

5. Retirar as folhas da solução e ferver em etanol absoluto até descolorirem por completo, ficando esbranquiçadas;

Dica: bastante cuidado ao ferver o etanol absoluto. Pode ser utilizada uma chapa com aquecimento.

6. Retirar as folhas da fervura e conservá-las em etanol 70%.

7. Visualizar os pontos escuros (azuis) demarcados pelo NBT que mostram a reação com o O₂⁻.

Dica: cuidar ao manusear (fotografar na lupa, por exemplo), pois as folhas rasgam com facilidade e também logo enrolam fora do etanol 70%.

Referência:

SHI, J.; Fu, X.Z.; Peng, T.; Huang, X.S.; Fan, Q.J., Liu, J.H. 2010. *Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. Tree Physiology* 30: 914-922.

4.9 LOCALIZAÇÃO HISTOQUÍMICA *IN SITU* DO ACÚMULO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)

O método de localização histoquímica *in situ* do acúmulo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em tecidos vegetais utiliza o reagente DAB (*Diaminobenzidine*), que reage com o peróxido de hidrogênio produzindo pontos de cor marrom.

Método de Shi et al., (2010):

1. Preparar Tampão Fosfato de Potássio (K₂HPO₄), 10 mM, pH 7.8;
2. Preparar uma solução Tampão + DAB (1 mg DAB/mL de Tampão, pH 3.8);

Dica: preparar na hora e misturar bem, pois o DAB não dissolve facilmente. Dependendo do peso molecular do DAB utilizado, a quantidade de mg do mesmo pode variar em função do volume de Tampão. Ajustar o pH com HCl.

3. Imergir segmentos do tecido (no caso de folhas, em torno de 5 cm) na solução Tampão + DAB;

Dica: podem ser utilizadas placas de petri para a imersão.

4. Manter 8 horas sob iluminação forte e constante;

Dica: pode ser usada a luz de uma capela de exaustão, mas é importante aproximar ao máximo as amostras da luz, para que esta seja eficiente.

5. Retirar as folhas da solução e ferver em etanol absoluto até descolorirem por completo, ficando esbranquiçadas;

Dica: bastante cuidado ao ferver o etanol absoluto. Pode ser utilizada uma chapa com aquecimento.

6. Retirar as folhas da fervura e conservá-las em etanol 70%.

7. Visualizar os pontos escuros (marrons) demarcados pelo DAB que mostram a reação com o H₂O₂.

Dica: cuidar ao manusear (fotografar na lupa, por exemplo), pois as folhas rasgam com facilidade e também logo enrolam fora do etanol 70%.

Referência:

SHI, J.; FU, X.Z.; PENG, T.; HUANG, X.S.; FAN, Q.J., LIU, J.H. 2010. Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus *in vitro* plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. *Tree Physiology* 30: 914-922.

4.10 PREPARAÇÃO DO TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO (K_2HPO_4) - 10 mM (0,01 M) - PH 7,8

O tampão Fosfato de Potássio é necessário para dissolver os reagentes utilizados no método de localização histoquímica *in situ* de espécies reativas de oxigênio. Para o ajuste de seu pH utiliza-se a solução descrita abaixo:

Solução de KH_2PO_4 (fosfato de potássio monobásico)

- Verificar a molaridade do KH_2PO_4
- Pesar o necessário para a quantidade de mL's que se deseja preparar.

Exemplo: para preparar 500 mL (0,5 L) a 10 mM (0,01 M)

PM (g) - 1 M - 1 L

136,09 g - 1 L

X - 0,5 L (H_2O destilada)

$X = 136,09 \text{ g} \times 0,5$

$X = 68,05 \text{ g } KH_2PO_4$

Logo:

PM (g) - 1 M - 1 L

68,05 g - 1 M

X - 0,01 M

$X = 68,05 \text{ g} \times 0,01$

$X = 0,68 \text{ g}$ de KH_2PO_4 em 500 mL de H_2O destilada.

Em seguida misturar até dissolver por completo e reservar.

Tampão Fosfato de Potássio K_2HPO_4 - 10 mM (0,01 M) - pH 7,8

- Verificar a molaridade do K_2HPO_4 (fosfato de potássio dibásico)
- Pesar o necessário para a quantidade de mL's que se deseja preparar.

Exemplo: para preparar 500 mL (0,5 L) a 10 mM (0,01 M)

PM (g) - 1 M - 1 L

174,18 g - 1 L

X - 0,5 L (H_2O destilada)

$X = 174,18 \text{ g} \times 0,5$

$X = 87,09 \text{ g } K_2HPO_4$

Logo:

PM (g) - 1 M - 1 L

87,09 g - 1 M

X - 0,01 M

$X = 87,09 \text{ g} \times 0,01$

$X = 0,87 \text{ g}$ de K_2HPO_4 em 500 mL de H_2O destilada.

Em seguida misturar até dissolver por completo. Medir o pH do Tampão Fosfato de Potássio dibásico (K_2HPO_4) e ajustá-lo com a solução de KH_2PO_4 até chegar em 7,8.

4.11 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)

A presença de espécies reativas de oxigênio, como o H₂O₂, é comum em qualquer ser vivo. Porém, em quantidades elevadas podem causar danos às células, como peroxidação de lipídeos, oxidação de proteínas, danos aos ácidos nucleicos, inibição enzimática e aumento de morte celular. Portanto, a determinação do seu conteúdo é essencial para verificação do nível de estresse oxidativo.

Método de Alexieva et al.; (2001):

1. Homogeneizar as amostras (0,1 - 0,25 g) em nitrogênio líquido (N₂);

Dica: dependendo da quantidade de tecido, a pulverização pode ser realizada em cadinhos ou no próprio eppendorf.

2. Adicionar 1 mL de TCA 0,1 % e agitar no vórtex;

3. Centrifugar as amostras a 12.000 g por 15 minutos a 4°C;

Dica: lembrar-se de ligar a centrífuga refrigerada com antecedência para que, quando for utilizá-la, a mesma já esteja na temperatura ideal.

4. Transferir sobrenadante e seguir imediatamente para os próximos passos;

5. Reação: 0,5 mL de extrato + 0,5 mL de Tampão Fosfato 0,1 M (pH 7,0) + 2,0 mL de KI 1 M;

6. Incubar a reação no escuro por 1 hora;

7. Realizar leitura em espectrofotômetro a 390 nm;

8. Calcular a concentração de H₂O₂ através da curva (0-100 µM);

9. Calcular a razão entre o conteúdo de H₂O₂ e o peso seco.

Referência:

ALEXIAVA, V.; Sergiev, I.; Mapelli, S.; Karanov, E. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment* 24: 1337-1344.

4.12 ANÁLISE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD), CATALASE (CAT), E ASCORBATO PEROXIDASE (APX)

Para sobreviver a estresses bióticos ou abióticos, os organismos desenvolveram sistemas de remoção das EROs (Espécies Reativas de Oxigênio). O sistema antioxidante enzimático é de fundamental importância para aumentar a tolerância da planta ao estresse. Dentre as principais enzimas, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) são as que têm recebido maior atenção nesse mecanismo de proteção. Estas enzimas são especializadas na remoção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este oxidante é relativamente estável e, pela ausência de cargas, tem sua passagem facilitada pela bicamada lipídica da membrana celular, o que sinaliza para a apoptose celular. Portanto, a quantificação de tais enzimas é de fundamental importância quando se estuda os danos celulares oxidativos causados pelo acúmulo de EROs.

OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

1. PESAGEM DA MATÉRIA FRESCA

Pesar de 200 a 300 mg de matéria fresca.

Dica: caso a pulverização do material não seja feita no mesmo dia da coleta, deixe as amostras em nitrogênio líquido e logo armazene o material em ultrafreezer (-80 °C). Este processo é muito importante, pois não pode ocorrer degradação do material vegetal. Anote o valor do peso de cada amostra.

2. MEIO DE EXTRAÇÃO

Preparar Mix para pulverização.

Para 1 reação:

750 µL	Tampão Fosfato de Potássio 200 mM, pH 7,8
15 µL	EDTA 10 mM
150 µL	Ácido Ascórbico 200 mM
585 µL	Água Milli-Q

Dica: mantenha o Mix no gelo durante todo o processo de pulverização do material.

3. PULVERIZAÇÃO

Pulverizar a amostra fresca com nitrogênio líquido contendo PVPP (10% 0,04g) e acrescentar 1500 µL do meio de extração.

Dica: divida a alíquota do tampão de extração, desse modo com a primeira parte da alíquota contendo 750 µL é possível macerar com mais facilidade a amostra e verte-la para *ependorf* de 2 ml. A segunda parte da alíquota pode ser utilizada para recolher o restante do material que foi pulverizado, evitando perda excessiva do mesmo. Seja rápido e preciso na pulverização, mantendo sempre a amostra gelada.

4. CENTRIFUGAÇÃO

Centrifugar a 12.000 g por 20 minutos, a 4 °C. Após, coletar o sobrenadante e armazenar em ultrafreezer (-80 °C) ou no gelo até o momento das leituras.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

1. SUPERÓXIDO DISMUTASE (560 nm) - (Gianngiopolitis & Reis, 1977; Beauchamp & Fridovich, 1971)

1° Preparar Riboflavina → diluir 20 µL da solução estoque em 10 mL de água.

Dica: utilize um becker pequeno forrado com papel alumínio. Prepare uma solução estoque de riboflavina 100 mM. Dilua esta solução no dia da leitura.

Armazene a solução estoque em *epENDORF* forrado com papel alumínio e em ultrafreezer.

2° Prepare o MIX para reações em duplicata para cada amostra contendo:

Para duas reações:

2000 µL	Tampão Fosfato de Potássio 100 mM pH 7.8
800 µL	Metionina 70 mM
40 µL	EDTA 10 µM
300 µL	NBT 1 mM
620 µL	H ₂ O Milli-Q

3° Branco: Preparar um branco para o escuro (será utilizado para zerar o espectrofotômetro e o tubo deve ser envolto em papel alumínio) e dois brancos para a luz (que devem ser submetidos à luz, e quantificados).

Pipetar 1880 do Mix, 100 µL de água e 10 µL de riboflavina.

Observação: a preparação do branco no escuro tem por objetivo subtrair da amostra que será iluminada o processo de redução do NBT. O branco mantido na luz juntamente com as amostras é quantificado com o objetivo de definir uma unidade de SOD relativa à quantidade de enzima necessária para inibir 50% a máxima fotorredução do NBT.

4° Amostras: Pipetar nos tubos de ensaio 1880 µL do MIX (em duplicata por amostra), 100 µL da amostra e 20 µL de riboflavina.

Agitar no vórtex e em seguida submeter os tubos à iluminação intensa durante 10 minutos junto com os dois tubos do Branco para luz (não contendo a amostra).

Após 10 minutos na luz, transferir a solução para as cubetas uma a uma e realizar a leitura em espectrofotômetro a 560 nm.

Observação: programe o espectrofotômetro para uma leitura pontual.

Atenção: os tubos do Branco submetidos à luz deverão apresentar uma cor violeta escuro e devem ficar mais escuros que as reações com as amostras. A reação de cor violácea se dá pois após 10 minutos de iluminação ocorre a fotorredução do NBT pela formazana azul.

2. CATALASE (240 nm /10 em 10 segundos / por 90 segundos) – (Havir & Michale, 1987; Anderson et al., 1995)

1° Colocar no banho-maria a 27°C o tampão de incubação (contendo 500 µL de tampão fosfato de potássio 200 mM pH 7.0, 400 µL de água Milli-Q) e deixar em banho-maria durante 10 minutos.

2° Preparar 10 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), diluindo 260 µL de H₂O₂ em 10 mL de água Milli-Q.

3° BRANCO: preparar uma reação para zerar o equipamento, contendo 500 µL de fosfato de potássio + 50 µL de H₂O₂ + 450 µL de H₂O.

PARA A HORA DA LEITURA

4° Pipetar no tampão de incubação em banho Maria: 37,5 μL H_2O , 50 μL de H_2O_2 250 mM e 12,5 μL da amostra.

Verter em cubeta de quartzo e submeter à leitura em espectrofotômetro a 240 nm.

Volume final da reação 1 mL.

Observação: programe o espectrofotômetro para uma leitura cinética com duração de 90 segundos com intervalos de 10 em 10 segundos. O que deve ser observado é o decréscimo na absorbância.

Dica: o 4° passo de leitura da enzima deve ser feito de forma rápida e precisa, pois o H_2O_2 desencadeia o processo de redução pela enzima ao entrar em contato com a amostra.

3. ASCORBATO PEROXIDASE (290 nm/10 em 10 segundos / por 90 segundos) – (Nakano & Asada 1981)

1° Colocar no banho-maria a 27° C o tampão de incubação (contendo 500 μL de tampão fosfato de potássio 200 mM pH 7,0, 50 μL de ácido ascórbico 10 mM e 350 μL de H_2O) e deixar em banho-maria por 5 minutos.

2° Preparar o ácido ascórbico e o H_2O_2 :

Ácido Ascórbico → 1° pesar 0,176 g e diluir em 10 mL de água.

2° pegar 1 mL da solução e diluir em 9 mL de água Milli-Q.

H_2O_2 → Pegar 160 μL do peróxido preparado para a CAT e diluir em 20 mL de água.

3° BRANCO: preparar uma reação para zerar o equipamento, contendo 500 μL de fosfato de potássio, 50 μL de ácido ascórbico, 50 μL de H_2O_2 e 400 μL de H_2O .

PARA A HORA DA LEITURA

4° Pipetar no tampão de incubação em banho-maria: 37,5 μL de H_2O , 50 μL do H_2O_2 2 mM e 12,5 μL da amostra. Verter em cubeta de quartzo e submeter à leitura em espectrofotômetro a 290 nm.

Volume final da reação 1 mL.

Observação: programe o espectrofotômetro para uma leitura cinética com duração de 90 segundos com intervalos de 10 em 10 segundos. O que deve ser observado é o decréscimo na absorbância.

Dica: o 4° passo de leitura da enzima deve ser feito de forma rápida e precisa, pois o H_2O_2 desencadeia o processo de redução pela enzima ao entrar em contato com a amostra.

Referências:

ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, T.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyl of maize seedlings. *Plant Physiology*, v.109, p.1247-1257, 1995.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v.44, p.276-287, 1971.

GIANNOPOLITIS, I.; REIS, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*. v.59, p.309-314. 1977.

HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. *Plant Physiology*. v.84, p.450-455. 1987.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*. v.22, p. 867-880, 1981.

4.13 TESTE DE COMETA E MICRONÚCLEO

Os testes de mutagenicidade e genotoxicidade *in vivo* e *in vitro* têm sido utilizados pelas agências reguladoras e pela comunidade científica para a avaliação da segurança dos novos agentes terapêuticos. Dentre os métodos disponíveis para esta avaliação, destacam-se os ensaios de cometa e micronúcleo. O teste de micronúcleo é utilizado para avaliar vários tipos de danos ao DNA em nível cromossômico, atuando como uma importante ferramenta nas informações do potencial mutagênico de agentes químicos, físicos e biológicos (Fenech, 2000). Já o ensaio cometa é capaz de detectar lesões que são passíveis de correção, além de informar sobre a cinética e o tipo de lesão a ser reparada, embora não permita que se possa inferir com fidedignidade no processo de reparo (Singh et al., 1988).

Teste Cometa – células em suspensão:

Preparo das soluções:

PBS (10X) = Phosphate Buffer Solution / pH 7,4

80,0 g de NaCl

2,0 g de KCl

21,7 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sódio dibásico)

2,0 g de KH_2PO_4 (dihidrogenofosfato de potássio)

a) Em um béquer com capacidade de 1000 mL ou mais juntar todos os reagentes (NaCl, KCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e KH_2PO_4);

b) Adicionar aproximadamente 400 mL de água destilada e dissolver os reagentes utilizando um bastão de vidro;

c) Ajustar o pH para 7,4 com NaOH 10 M;

d) Completar até 1 litro com água destilada.

Solução de Lise

146,1 g de NaCl (2,5 M)

37,2 g de EDTA (100 mM)

1,2 g de Tris (10 mM)

NaOH (aproximadamente 7,0 g)

a) Pesar e juntar os reagentes (NaCl, EDTA, Tris);

b) Adicionar aproximadamente 400 mL de água destilada e mexer com o bastão de vidro;

c) Adicionar parte das 7,0 g de NaOH sólido e mexer com bastão de vidro, caso seja necessário, adiciona-se o restante de NaOH (os reagentes só dissolvem com o pH próximo a 10,0);

d) Ajustar o pH entre 10,0 e 10,5;

e) Completar com água destilada até 890 mL;

f) Guardar em temperatura ambiente, protegida da luz.

Solução de lise (uso):

89 mL da solução de lise (estoque)

10 mL de DMSO

1 mL de Triton X-100

Refrigerar por 60 minutos antes do uso.

Tampão de Eletroforese (300 mM NaOH / 1 mM EDTA) pH > 13

O tampão para eletroforese é formado por duas soluções: A e B

SOLUÇÃO A

200 g de NaOH

500 mL de água destilada

- Pesar 200 g de NaOH e colocar em um béquer com capacidade para 1 litro;
- Adicionar 500 mL de água destilada;
- Mexer com bastão de vidro até dissolver totalmente;
- Guardar em temperatura ambiente e, de preferência, sem exposição à luz.

SOLUÇÃO B

14,89 g de EDTA

200 mL de água destilada

- Pesar 14,89 g de EDTA e colocar em um béquer de 500 mL;
- Adicionar 200 mL de água destilada;
- Mexer com bastão de vidro até dissolver totalmente;
- Guardar em temperatura ambiente e de preferência sem exposição à luz.

Tampão de Eletroforese (uso):

30 mL solução A

5 mL solução B

Adicionar água destilada até completar 1000 mL

Tampão de neutralização – pH 7,5

48,5 g de Tris

- Pesar 48,5 g de Tris e colocar em um béquer com capacidade para 1 L;
- Adicionar cerca de 500 mL de água destilada;
- Mexer com bastão de vidro até dissolver totalmente, caso seja necessário adicionar mais água, porém não completar ainda para 1 L;
- Acertar o pH com HCl 6 N para 7,5;
- Adicionar água destilada até completar 1 L;
- Guardar em temperatura ambiente, protegida da luz.

Solução fixadora (coloração com Nitrato de Prata)

150 g de ácido tricloroacético (15%)

50 g de sulfato de zinco (5%)

50 mL de glicerol (5%)

- Pesar e juntar os reagentes em um béquer com capacidade para 1 L;
- Adicionar 500 mL de água destilada e dissolver os reagentes;
- Completar a solução até 1 L de água destilada;
- Guardar a solução em temperatura ambiente, protegido da luz.

Solução corante (estoque)

A solução corante é formada por duas soluções: C e D

SOLUÇÃO C:

5 g de carbonato de sódio (5%)

- Pesar o carbonato de sódio e colocar em um béquer com capacidade para 100 mL;
- Adicionar cerca de 50 mL de água destilada e dissolver o reagente;
- Completar até 100 mL da solução com água destilada;
- Guardar em temperatura ambiente, protegido da luz.

SOLUÇÃO D:

0,1 g de nitrato de amônio (0,1%)

0,1 g de nitrato de prata (0,1%)

0,25 g de ácido tungstosalicílico (0,25%)

0,15 mL de formaldeído (0,15%)

- Pesar e juntar os reagentes em um béquer com capacidade para 100 mL;
- Adicionar cerca de 50 mL de água destilada e dissolver os reagentes;
- Completar até 100 mL da solução com água destilada.
- Guardar em temperatura ambiente, protegido da luz.

Solução corante (uso):

66 mL da solução C + 34 mL da solução D

Preparar na hora do uso!

Solução de parada

- Em um béquer com capacidade para 100 mL, colocar 1 mL de ácido acético e 99 mL de água destilada.

Agarose Low Melting Point (LMP)

0,07 g de agarose Low Melting Point

10 mL de PBS (1X)

- Pesar a agarose e colocar em um béquer com capacidade para 20 mL;
- Adicionar 10 mL de PBS (1X);
- Dissolver em microondas;
- Armazenar na geladeira. Antes de ser utilizada deve ser dissolvida novamente em microondas.

Dica: esta solução pode ser armazenada em geladeira e ser reutilizada por até 3 vezes.

Agarose Normal Melting Point (NMP)

0,15 g de agarose Normal Melting Point

20mL de PBS (1X)

- Pesar a agarose e colocar em um béquer com capacidade para 50 mL;
- Adicionar 20 mL de PBS (1X);
- Dissolver em microondas;
- Armazenar na geladeira. Antes de ser utilizada, deve ser dissolvida novamente em microondas.

Dica: a agarose não deverá ser reutilizada, pois fusões sucessivas alteram sua concentração.

PREPARO DAS LÂMINAS

1. Utilizar sempre lâminas novas, de preferência com tarja fosca;
2. Lavar cada uma com detergente (para retirar a gordura);
3. Estocar em álcool 70% dentro da geladeira até o uso;
4. Identificar as lâminas no alto do canto esquerdo;
5. Em um béquer misturar a agarose e o PBS 1X e levar ao microondas até que a agarose esteja totalmente dissolvida;
6. Mergulhar as lâminas, deixando a ponta fosca de fora;
7. Escorrer em papel absorvente e tirar o excesso de gel da região posterior da parte fosca;
8. Deixar secar em temperatura ambiente.

Dica: preparar as lâminas no mínimo 6 dias antes de serem utilizadas.

PROCESSAMENTO

Dica: o processamento, corrida e coloração devem ser realizados com o mínimo possível de luminosidade!

1. Preparar a Solução de Lise Final (envolver com papel laminado) e deixar 60 minutos na geladeira, antes de iniciar o processo;
2. Envolver os tubos de coleta com papel laminado;
3. Realizar a coleta de sangue total;
4. Tratar as amostras (sangue total) com o extrato e com o controle positivo (etilmetanosulfonato – EMS), em concentrações pré-determinadas;

Concentração do agente teste

Quando o agente teste estudado é desconhecido, recomenda-se que as concentrações testadas não ultrapassem 0,01M, 5 mg/mL ou 5 µl/mL (OECD, 2009).

Exemplo:

Concentração final do EMS: 200 µg/mL

Concentração dos extratos – Solução estoque: 20.000 µg/mL

Concentração final dos extratos – 200, 100, 50, e 25 µg/mL

(Usar a seguinte fórmula para os cálculos das diluições: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$)

1. Pipetar 500 µL de cada amostra tratada em placas contendo 24 poços;
2. Envolver a placa com papel laminado;
3. Armazenar em estufa a 37 °C durante 3 horas (exposição ao agente mutagênico de 3 a 5 horas);
4. Dissolver a agarose Low Melting Point em microondas e deixar em banho Maria (40° C);
5. Pipetar 5 µL de cada amostra tratada e dispensar em um microtubo;
6. Pipetar 85 µL de agarose LMP e dispensar no mesmo *ependorf* das amostras tratadas e, ao mesmo tempo, repipetar a mistura;
7. Colocar a amostra na lâmina com pré-cobertura, cobrindo com lamínula;
8. Colocar as lâminas em câmara úmida por 10 minutos na geladeira;
9. Retirar a lamínula, bem devagar, de maneira que a amostra fique na lâmina;

10. Colocar a grade com lâminas na Solução de Lise Final e deixar na geladeira por, no mínimo, 24 horas (máximo 48 horas).

CORRIDA (somente depois de 24 horas)

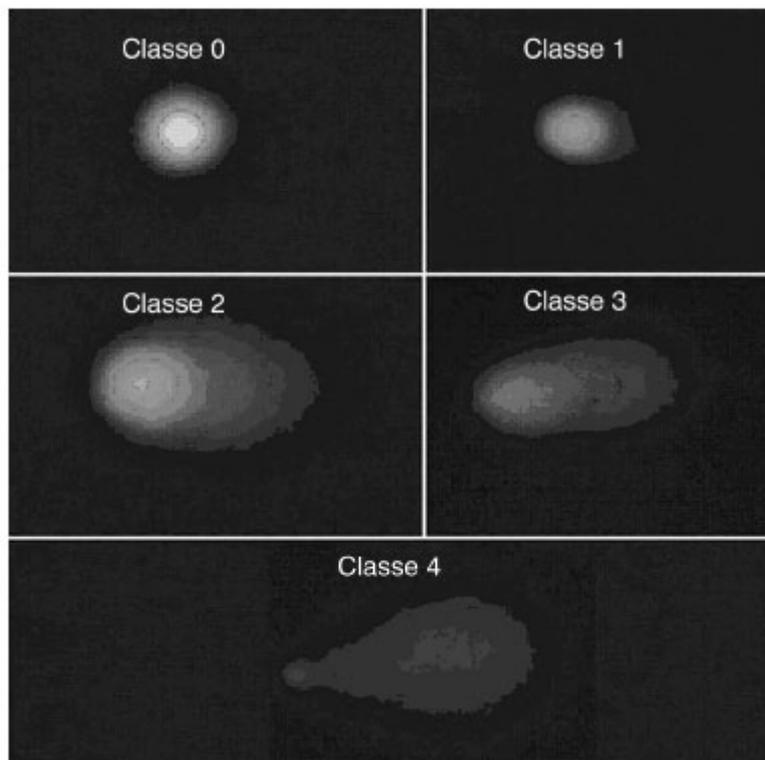
1. Preparar o tampão de eletroforese por, no mínimo, 24 horas antes de iniciar a corrida e deixar na geladeira, até a temperatura do tampão alcançar 4 °C;
2. Quando a temperatura estiver em 4 °C, retirar as lâminas da solução de Lise Final com o auxílio de uma pinça;
3. Secar a parte de baixo e a lateral da lâmina com papel absorvente;
4. Colocar as lâminas na horizontal na cuba de eletroforese, sem espaço entre elas e entre as duas colunas lâminas, de maneira que fiquem com as tarjas para a direita (lado positivo);
5. Colocar gelo e água envolta da cuba, controlando a temperatura que deve ser de 4 °C;
6. Colocar o tampão de eletroforese (4 °C) até cobrir as lâminas e deixar por 25 minutos;
7. Após os 25 minutos, colocar o eletrodo vermelho no lado da parte fosca da lâmina, e o eletrodo preto no lado oposto;
8. Programar a fonte de eletroforese para 25 V constantes e 300 mA (a corrente é controlada com o volume do tampão);
9. Correr durante 25 minutos;
10. Após, retirar as lâminas com o auxílio de uma pinça, secando-as na lateral e na região posterior da parte fosca;
11. Colocar as lâminas na grade e cobri-las com tampão de neutralização durante 5 minutos (repetir 3X).

COLORAÇÃO

1. Depois, lavar 2X com água destilada;
2. Deixar secar por, no mínimo, 2 horas a 37 °C na estufa (por mais tempo se for em temperatura ambiente);
3. Fixar por 10 minutos na solução fixadora (depois de usar, recolocar no frasco âmbar);
4. Lavar 3X com água destilada;
5. Deixar secar por, pelo menos 5 horas a temperatura ambiente, ou por 1,5 horas a 37° C na estufa;
6. Reidratar os géis por 5 minutos em água destilada;
7. Corar as lâminas (colocadas na grade de vidro, costa-a-costa) por 30 minutos utilizando a solução corante que deve ser preparada na hora, com agitação no escuro;
8. Lavar as lâminas 3X com água destilada;
9. Colocar as lâminas na solução de parada por 5 minutos;
10. Lavar as lâminas 3X com água destilada;
11. Deixar secar em temperatura ambiente.

ANÁLISE

Em microscópio óptico, analisar 100 núcleos em aumento de 100X. Classificá-los de 0 a 4. Obter score de 0 a 400 para cada amostra.



Teste Cometa – células em adesão:

PREPARO DAS SOLUÇÕES

Meio DMEM

- 1000 mL Água Milli-Q autoclavada;
- 8,6 g DMEM ou meio de cultura específico para a linhagem celular em uso
- 1,2 g NaHCO_3
- 0,1 g Penicilina
- 0,06 g Estreptomicina
- Ajustar o pH para 7,3 antes de filtrar o meio
- Esterilizar: realizar a filtração do meio com filtro 0,22 μm

Solução de Hanks (1L)

- 1000 mL Água Milli-Q autoclavada;
- 1 embalagem de Hanks em pó;
- 1,8 g de NaHCO_3 (bicarbonato de sódio)
- Realizar a filtração da solução de Hanks com filtro 0,22 μm

Obs.: as demais soluções descritas no protocolo para células em suspensão devem ser preparadas para a realização deste ensaio.

PREPARO DAS LÂMINAS

1. Utilizar sempre lâminas novas, de preferência com tarja fosca;

2. Lavar cada uma com detergente (para retirar a gordura);
3. Estocar em álcool 70% dentro da geladeira até o uso.

PROCESSAMENTO

Cultura das células

- a) Fazer a contagem das células CHO-k1;
- b) Transferir para frascos de cultura com meio de cultura (DMEM + HAM F-10);
Dica: podem ser utilizadas placas de cultura de 6 poços ao invés de frascos de cultura.
- c) Incubar overnight na estufa a 37° C com 5% CO₂;
- d) Após este período, tratar as amostras com o extrato e com o controle positivo (etilmetanosulfonato – EMS), em concentrações pré-determinadas;
- e) Incubar por 3 horas na estufa a 37° C com 5% CO₂;
- f) Retirar o meio de cultura das garrafas de cultura;
- g) Lavar com 2 mL de solução de Hanks (repetir este processo 2 vezes);
- h) Adicionar 1 mL de tripsina-EDTA no frasco de cultura;
- i) Colocar a frasco de cultura por 3 minutos na estufa a 37° C para desprendimento das células;
- j) Preparar meio de cultura completo (10% SBF) em um tubo falcon;
- k) Passados 3 minutos, verificar por meio de microscopia se as células estão soltas;
- l) Certificado o desprendimento das células, injetar 3 mL de meio completo para inativar a tripsina-EDTA;
- m) Descartar o meio com o restante da tripsina-EDTA e adicionar novo meio de cultura completo nos frascos com as células;
- n) Dissolver a agarose Low Melting Point em microondas e deixar em banho Maria (40 °C);
- o) Pipetar 5 µL de cada amostra tratada e dispensar em um *eppendorf*;
- p) Pipetar 85 µL de agarose LMP e dispensar no mesmo *eppendorf* das amostras tratadas e, ao mesmo tempo, repipetar a mistura;
- q) Colocar a amostra na lâmina com pré-cobertura, cobrindo com lamínula;
- r) Colocar as lâminas em câmara úmida por 10 minutos na geladeira;
- s) Retirar a lamínula, bem devagar, de maneira que a amostra fique na lâmina;
- t) Colocar a grade com lâminas na Solução de Lise Final e deixar na geladeira por no mínimo 24 horas (máximo 48 horas).

Obs.: após esse processo, segue-se o protocolo anterior a partir do item CORRIDA.

Teste de Micronúcleo – células em suspensão:

PRODUTOS UTILIZADOS

- Soro bovino fetal (contém substratos para o meio);
- RPMI 1640 (meio de cultura específico para linfócitos T);
- Fitohemaglutinina (induz a divisão dos linfócitos T em G0);
- Formalina 1% (conserva amostras biológicas);
- Citrato de Sódio 1% (estabiliza proteínas);

- Fixador Carnoy (retirar os resíduos da amostra - hemácias e fixar) – 3 metanol/1 ácido acético;
- Padrão Etil-metanosulfonato – EMS;
- Citocalasina B (interrompe a citocinese durante a anáfase);

PREPARO DAS SOLUÇÕES

Citocalasina (Solução Mãe) - (2 mg/ml):

- No próprio frasco comercial, acrescenta-se 5 mL de DMSO a 10 mg de Citocalasina B;
- Armazenar no congelador.

Citocalasina (Solução de Uso) (4 µg/ml):

- Acrescenta-se 9,5 mL de Meio RPMI 1640 a 0,5 mL de Solução Mãe em tubo estéril;
- Armazenar na geladeira.

PBS (10X) = Phosphate Buffer Solution / pH 7,4

80,0 g de NaCl

2,0 g de KCl

21,7 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sódio dibásico)

2,0 g de KH_2PO_4 (dihidrogenofosfato de potássio)

a) Em um béquer com capacidade de 1000 mL ou mais juntar todos os reagentes (NaCl, KCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e KH_2PO_4);

b) Adicionar aproximadamente 400 mL de água destilada e dissolver os reagentes utilizando um bastão de vidro;

c) Ajustar o pH para 7,4 com NaOH 10 M;

d) Completar até 1 litro com água destilada.

Solução de Giemsa (coloração da amostra)

20% em PBS

Meio de Cultura RPMI 1640 – Meio Incompleto

10 g meio RPMI 1640

10 mg Estreptomicina

100 Unidades/mL ou 5 mg 10×10^6 U Penicilina

1000 mL H_2O destilada ou Milli-Q.

a) Em vidraria preferencialmente esterilizada colocar todos os compostos e dissolver sob agitação;

b) Medir o pH e ajustar com HCl 1N ou NaOH 1N até que o pH chegue a $\pm 7,3$;

c) Na Cabine de Segurança Biológica filtrar o meio usando membrana de Millipore (0,02 µm) estéril e verificar o pH novamente.

d) Armazenar em frascos estéreis de ~250 mL identificados com: nomes do meio e do responsável, data fabricação e pH.

Obs.: congelar os frascos em estoque a -20°C .

Dica: recomenda-se que o pH fique em torno de 7.25, pois após a filtração o pH pode elevar.

Meio de Cultura RPMI 1640 – Meio Completo

78% Meio RPMI 1640 Incompleto

20% Soro Bovino Fetal (SFB)

2% Fitohemaglutinina A

a) Em um frasco estéril adicionar o meio, soro bovino fetal e fitohemaglutinina A e após homogeneizar;

Dica: Preparar o meio completo somente no momento do uso.

PREPARO DAS LÂMINAS

1. Utilizar sempre lâminas novas, de preferência com tarja fosca;

2. Lavar cada uma com detergente (para retirar a gordura);

3. Estocar em álcool 70% dentro da geladeira até o uso.

* Sempre iniciar o cultivo em segunda-feira ou terça-feira (DIA 0)

PROCESSAMENTO

DIA 0 – Cultura das células

a) Coletar a amostra de sangue (5 mL) em tubo heparinizado;

b) Retirar da geladeira 20 minutos antes do início da cultura, o SBF, a Fitohemaglutinina e o meio RPMI 1640;

c) Limpar a capela de fluxo laminar com álcool 70%;

d) Colocar na capela todos os materiais que serão utilizados na cultura das células em suspensão;

e) Ligar a lâmpada UV por 20 minutos;

f) Desligar a UV, e ligar o exaustor e lâmpada fria;

g) Colocar na capela, limpando frasco com álcool 70% antes, o SBF, a Fitohemaglutinina, o meio RPMI 1640 e as amostras de sangue coletado;

h) Adicionar 500 uL de sangue total em frascos ou placas de 12 poços contendo 5 mL de meio completo;

i) Incubar na estufa a 37°C.

DIA 1: 24 horas após o preparo da amostra

a) Tratamento das amostras (sangue total) com o extrato e com o controle positivo (Etilmetanosulfonato – EMS), em concentrações pré-determinadas;

Concentração do EMS: 200 µg/mL

Concentração dos extratos – Solução estoque: 20.000 µg/mL

Concentração dos extratos: 200, 100, 50, e 25 µg/mL

(Usar a seguinte fórmula para os cálculos das diluições: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$)

b) Recolocar as amostras na estufa a 37 °C.

Obs.: o tratamento com agentes mutagênicos deverá ser inserido na cultura de acordo com o protocolo adotado. Para maiores detalhes, ver protocolo da OECD.

Tabela 1. Incubação da cultura celular

0 h	24 h	44 h	48 h	72 h	96 h
Incubar a 37°C	Homogeneizar	Adicionar CtB	-	Coletar ou prosseguir a incubação	Coletar

Obs.: os agentes testes deverão ser adicionados na cultura conforme protocolo abaixo.

Concentração do agente teste

Quando o agente teste estudado é desconhecido, recomenda-se que as concentrações testadas não ultrapassa 0,01M, 5 mg/mL ou 5 µl/mL (OECD, 2009).

Protocolo de tratamento por indução de agente teste.

Tabela 2. Protocolo de tratamento das células e colheita para o ensaio do MN *in vitro*.

Linfócitos e Células de linhagem celular, tratadas com CtB.	Exposição Curta	Tratamento por 3-6 horas; remove a substância do meio e adiciona novo meio e CtB.	Coletar após 1,5-2,0 ciclos celulares.
	Exposição Longa	Tratar por 1,5-2,0 ciclos celulares na presença da CtB.	Coletar no final do período de exposição.
		Tratar por 1,5-2,0 ciclos celulares removendo a substância teste e após adicionar novo meio e a CtB.	Coletar após 1,5-2,0 ciclos celulares.

Adaptado da OECD 487/2010.

DIA 2: 44 horas após o preparo da amostra

- Adicionar de 3-6 µg de CtB/mL;
- Recolocar as amostras na estufa a 37°C até completar 72 horas ou 96 horas, dependendo do protocolo utilizado.

DIA 3 OU 4 (depende do protocolo de tratamento a ser utilizado): 72 ou 96 horas após o preparo das amostras

COLETA DAS CÉLULAS

- Após o final da incubação (72 h ou 96 h), colocar a Formalina 1% e o Citrato de Sódio 1% no banho Maria a 37°C;
- Transferir o conteúdo dos frascos ou placas de 12 poços (meio + células) em tubo cônico de aproximadamente 10 mL com tampa e devidamente identificados;
- Centrifugar a 1.500 rpm por 7 minutos, cuidando o balanceamento;
- Enquanto centrifuga, preparar para cada amostra:
 - Identificar um tubo cônico de plástico e uma pipeta de Pasteur de plástico;
 - Preparar fixador Carnoy: média de 26 mL de fixador para cada amostra.
- Ao término da centrifugação, descartar o sobrenadante com auxílio de pipeta de Pasteur;
- Adicionar 4 gotas de Formalina 1% em cada amostra;
- Agitar cada amostra com o vórtex;
- Colocar as amostras em banho Maria a 37°C por 5 minutos;
- Adicionar 4 mL de Citrato de Sódio 1%;

- f) Logo em seguida, ressuspender com a pipeta de Pasteur específica da amostra;
- g) Colocar as amostras no banho Maria a 37 °C por 7 minutos;
- h) Adicionar 0,5 mL de fixador Carnoy;
- i) Em seguida, ressuspender com a pipeta de Pasteur específica da amostra;
- j) Centrifugar a 1.500 rpm por 7 minutos;
- k) Desprezar o sobrenadante com a pipeta de Pasteur;
- l) Adicionar 5 mL de fixador e ressuspender (adicionar e ressuspender uma amostra após a outra);
- m) Centrifugar a 1.500 rpm por 7 minutos;
- n) Desprezar o sobrenadante com a pipeta de Pasteur;
- o) Estocar em congelador ou geladeira por, no mínimo, 15 minutos;
- p) Durante este tempo, realizar a preparação das lâminas:
 - Retirá-las do álcool 70%;
 - Colocá-las dispostas em cubetas, sob água corrente da torneira, para remover o álcool;
 - Remover toda a água da torneira e preencher a cubeta com água destilada.
- a) Retirar as amostras da geladeira, centrifugar a 1.500 rpm por 7 minutos e desprezar o sobrenadante;
- b) Adicionar 5 mL de fixador e ressuspender;
- c) Centrifugar a 1.500 rpm por 7 minutos e desprezar o sobrenadante;

Dica: se necessário, realizar essas lavagens até a amostra obter aparência límpida, clara e translúcida.

- a) Na última lavagem, ao desprezar o sobrenadante cuidar para manter aproximadamente 1 mL (2 dedos);
- b) Ressuspender a amostra, contendo agora, apenas 1 mL.

Dica: esse material pode ficar estocado no freezer, desde que tampado com rolhas e identificado.

COLORAÇÃO

- a) As lâminas devem ser retiradas das cubetas contendo água destilada com pinça, deixando a parte superior molhada (“barriguinha” de tensão superficial);
- b) Pingar na lâmina 3 a 4 gotas do material na vertical, utilizando pipeta de Pasteur de plástico;
- c) Deixar secar em temperatura ambiente, sob papel absorvente;
- d) Preparar a solução de Giemsa a 20% em Tampão PBS;
- e) Preencher toda a lâmina com a solução de Giemsa 20%;
- f) Deixar agir por 5 min (máximo 7 min);
- g) Desprezar o corante em água corrente abundante;
- h) Desprezar o excesso de água batendo a lâmina lateralmente em papel absorvente;
- i) Deixar secar em temperatura ambiente;
- j) Quando secas, observar, no microscópio, se as lâminas estão boas para a análise.

ANÁLISE

Critérios para seleção das células

Analisar 1000 células binucleadas/lâmina em aumento de 1000 vezes com as seguintes características: núcleos intactos e tamanhos aproximadamente iguais, núcleos com o mesmo padrão de coloração e dentro do limite citoplasmático, membrana celular intacta, célula claramente distinguível das células adjacentes.

Características do micronúcleo

Morfologia idêntica à dos núcleos principais; diâmetro entre 1/16 até, no máximo de 1/3 dos núcleos principais; mesma coloração dos núcleos; não estar ligado ou conectado a um dos núcleos principais e nem sobreposto.

Parâmetros considerados na análise

- Número de células binucleadas;
- Distribuição de células binucleadas com 0, 1, 2, 3 ou mais MNs em 1000 células binucleadas;
- Número total de micronúcleos nas células binucleadas;
- Frequência de MNs/1000 células binucleadas;
- Frequência de células binucleadas/500 células viáveis;
- Índice de Divisão nuclear (IDN)

$$\text{IDN} = [M_1 + 2 (M_2) + 3 (M_3) + 4 (M_4)] / N$$

$M_1 - M_4$ = n° de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos.

N = n° total de células viáveis.

Teste de Micronúcleo – células em adesão:

PRODUTOS UTILIZADOS

- Tripsina-EDTA;
- Soro Bovino Fetal;
- Formalina 1%;
- Citrato de Sódio 1%;
- Fixador Carnoy – 3 metanol/1 ácido acético;
- Citocalasina B (4 µg/mL);
- Solução de Giemsa (20% em PBS).

PREPARO DAS SOLUÇÕES

Meio DMEM + HAM F10: para linhagem CHO-K1

- 1000 mL Água Mili-Q autoclavada;
- 8,656 g DMEM + 4,9 g HAM F10
- 1,2 g NaHCO₃ (bicarbonato de sódio)
- 0,1 g Penicilina
- 0,06 g Estreptomicina

Ajustar o pH para 7,3 antes de filtrar o meio
Realizar a filtração do meio com filtro 0,22 µm

Solução de Hanks

1000 mL Água Mili-Q autoclavada;
1 embalagem de Hanks em pó;
1,8 g de NaHCO₃ (bicarbonato de sódio)
Realizar a filtração da solução de Hanks com filtro 0,22 µm

PREPARO DAS LÂMINAS

1. Utilizar sempre lâminas novas, de preferência com tarja fosca;
2. Lavar cada uma com detergente (para retirar a gordura);
3. Estocar em álcool 70% dentro da geladeira até o uso.

PROCESSAMENTO

DIA 0 – Cultura das células

- a) Fazer a contagem das células CHO-K1;
- b) Transferir para frascos de cultura com meio de cultura (DMEM + HAM F-10);
Dica: podem ser utilizadas placas de cultura de 6 poços ao invés dos frascos.
- c) Incubar overnight na estufa a 37 °C com 5% CO₂.

DIA 1

- d) Tratar as amostras com o extrato e com o controle positivo (Etil-metanosulfonato – EMS), em concentrações pré-determinadas;
Concentração final do EMS: 200 µg/mL
Concentração dos extratos – Solução estoque: 20.000 µg/mL
Concentração final dos extratos: 200, 100, 50, e 25 µg/mL
(Usar seguinte fórmula para os cálculos das diluições: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$)
- e) Incubar por 24 h na estufa a 37 °C com 5% CO₂

DIA 2

- f) Retirar o meio de cultura das garrafas de cultura;
- g) Lavar com 2 mL de solução de Hanks (repetir esse processo 2 vezes);
- h) Adicionar 1 mL de tripsina-EDTA no frasco de cultura;
- i) Colocar a frasco de cultura por 3 minutos na estufa a 37 °C para desprendimento das células;
- j) Preparar meio de cultura completo (10% SBF) em um tubo falcon;
- k) Passados 3 minutos, verificar através de microscopia se as células estão soltas;
- l) Certificado o desprendimento das células, injetar 3 mL de meio completo (DMEM+F10+SBF) para inativar a tripsina;
- m) Coletar as células e passar para tubos falcon;

- n) Centrifugar 1.000 rpm por 5 min;
- o) Descartar o sobrenadante;
- p) Ressuspender o *pellet* lentamente e delicadamente 10 vezes;
- q) Adicionar 5 mL de Citrato de Sódio 1% gelado;
- r) Ressuspender o material 10 vezes delicadamente com o citrato de Na⁺;
- s) Aguardar 15 segundos;
- t) Adicionar 5 mL de Fixador (3 metanol:1 ácido acético) e 4 gotas de formaldeído;
- u) Ressuspender 30 vezes delicadamente;
- v) Centrifugar 1.000 rpm por 5 min;
- w) Descartar o sobrenadante;
- x) Ressuspender 30 vezes;
- y) Centrifugar a 1.000 rpm por 5 min;
- z) Repetir os passos t a x novamente, sem o formaldeído;
- aa) Manter aproximadamente 1 mL do sobrenadante (2 dedos);
- bb) Ressuspender a amostra, contendo agora, apenas 1 mL.

Dica: esse material pode ficar estocado no freezer, desde que tampado com rolhas e identificado.

PREPARO DAS LÂMINAS

- a) Retirá-las do álcool 70%;
- b) Colocá-las dispostas em cubetas, sob água corrente da torneira, para remover o álcool;
- c) Remover toda a água da torneira e preencher a cubeta com água destilada.

Obs.: após este processo, segue-se o protocolo para teste de micronúcleo (células em suspensão) a partir do item **COLORAÇÃO**.

Referências:

FENECH, M. 2000. The in vitro micronucleus technique, Mutation Research, 455: 81-95.

OECD. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE 4: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, 487, 2009. Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/45/51/43996258.pdf>

SINGH, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, Experimental Cell Research, 175: 184-191.

4.14 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE POR ALAMAR BLUE

Os ensaios de citotoxicidade foram um dos primeiros bioensaios *in vitro* utilizados para prever toxicidade de substâncias a vários tecidos. Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de diferentes amostras são padronizados utilizando-se culturas celulares. O índice de citotoxicidade (IC) pode ser avaliado por meio do alamar blue (AB) ou resazurina que é um indicador de oxirredução e da função mitocondrial, sendo reduzido apenas por células viáveis a resorufina (lilás), conforme Al-Nasiry et al. (2007). O AB tem sido utilizado como ferramenta efetiva para avaliar a atividade metabólica e proliferação de linhagens celulares.

Para realização do experimento, utilizar os seguintes materiais e reagentes:

- * Controle positivo: Doxorubicina
- * Células da linhagem CHO-K1 $2,0 \times 10^4$ células/poço/200 μ L;
- * 20 μ L de alamar blue a 10% (ex: 180 μ L de meio + 20 μ L de Alamar blue);
- * Meio de cultura para células – DMEM + HAM-F10 suplementados com SBF 10%;
- * Leitor de placa com filtros para os comprimentos de onda 540 e 630 nm.
- * DMSO
- * Placa para cultura de células em poliestireno com 96 poços – TPP
- * TPP Frasco (garrafa) em poliestireno de alta transparência

1. Cultivar as células CHO-K1 em frascos de cultivo celular, em meio DMEM+HAM-F10, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), antibióticos estreptomicina (0,1 mg/mL), penicilina (0,06 mg/mL), bicarbonato (1,8 mg/mL) e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ até atingir confluência de 80% - 90 %.

2. A cultura celular, após adquirir semiconfluência, deverá ser lavada com a solução tampão Hanks ou PBS, tripsinizada e contadas em câmara de Neubauer, ajustando o número de células para $2,0 \times 10^4$ células/poço/200 μ L em meio de cultura suplementado com SBF;

3. Realizar a semeadura das células em placas de 96 poços (triplicata) e incubar a 37 °C e 5% de CO₂ por 4 horas;

4. Realizar a pesagem das amostras e prepará-las;

5. A amostra poderá ser diluída em DMSO estéril (solução estoque) e as diluições consecutivas serão realizadas em meio de cultura completo;

Dica: a concentração final de DMSO não deverá ultrapassar 1% devido à toxicidade, e deve ser constante em todas as amostras.

6. Concentração da Doxorubicina no experimento: 100, 10, 1, 0.1, 0.01 μ M.

7. Retirar a placa da estufa e remover o meio de cultura;

8. As células deverão ser novamente lavadas com 100 μ L de PBS;

9. Adicionar as amostras às células e incubar por 72 horas (tempo determinado sob condições pré-determinadas) em estufa a 37 °C e 5% CO₂.

- Controle positivo: (células + Doxorubicina + DMSO)

- Controles negativos: (células em meio)

(células em meio + DMSO)

- Amostras (células em meio + amostra em diferentes concentrações + DMSO)

Retirar as substâncias adicionadas às células e adicionar o reagente alamar blue a 10% em meio de cultura incompleto (sem SBF), com volume final de 200 μ L;

Dica: Proteger a placa com papel alumínio e incubar em estufa a 37°C

Aproximadamente, após 4 a 5 horas verificar a redução do Alamar Blue nos controles negativos (coloração rósea);

Realizar a leitura nos comprimentos de onda de 540 nm (oxidado) e 630 nm (reduzido)

A porcentagem de azul de alamar reduzido é calculada utilizando-se a equação:

% redução = $AO - (AR \times RO) \times 100$ onde:

AO = absorbância do estado oxidado;

AR = absorbância do estado reduzido;

RO = razão AOO / ARO;

AOO = absorbância do meio sozinho subtraído do meio com alamar blue em 540 nm;

ARO = absorbância do meio sozinho subtraído do meio com alamar blue em 630 nm;

Referências:

AL-NASIRY, S.; Geusens, N.; Hanssens, M.; Luyten, C.; Pijnenborg, R. 2007. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human Reproduction*. 22(5):1304-309.

FRESHNEY, R.I. *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 5th Ed. Hoboken NJ, John Wiley & Sons, 2005.

NAKASHIMA, T.; Tamura, T.; Kurachi, M.; Yamaguchi, K.; Oda, T. 2005. Apoptosis-Mediated Cytotoxicity of Prodigiosin-Like Red Pigment Produced by γ -Proteobacterium and Its Multiple Bioactivities. *Biol. Pharm. Bull.* 28(12): 2289-295.

4.15 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MTT

A proliferação celular pode ser avaliada pela técnica do MTT (*dimethylthiazol-diphenyltetrazolium bromide*) (Mosmann, 1983). O MTT é um sal tetrazolium reduzido a formazan pelo sistema mitocondrial succinato-tetrazolium redutase. A proliferação das células resulta em um aumento da atividade do sistema mitocondrial que conduz a um aumento na quantidade de formazan formado. A coloração produzida nessa reação é medida por densidade óptica, sendo diretamente proporcional ao número de células viáveis na placa.

1. Preparar o reagente MTT na concentração de 5 mg/mL de PBS (phosphate buffered saline) pH 7,2.

Dica: utilizar o banho ultrassônico para diluir o MTT.

Preparo do PBS: Pesar 1,120 g de Na_2HPO_4 ou 1,63 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7(\text{H}_2\text{O})$, 9 g de NaCl, 0,2 g de KH_2PO_4 e 0,2 g de KCl. Dissolver os sais em parte da água Milli-Q (500 mL) em agitador. Ajustar o pH para 7,4 e completar o volume para 1 litro. Autoclavar.

2. Com as células cultivadas em placas de 24 poços com 500 μL de meio de cultura por poço, retirar 50 μL do meio de cultura das placas e adicionar 50 μL do MTT.

3. Incubar as células por 4 horas a 37°C.

4. Aspirar o meio de cultura das placas.

5. Adicionar 100 μL de DMSO por poço.

6. Transferir o conteúdo para placa de 96 poços para fazer a leitura em ELISA no comprimento de onda de 540 nm

Dica: fazer um grupo “branco” para a leitura (apenas com DMSO).

Referência:

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.

4.16 OXIDAÇÃO DE H₂DCF-DA PARA AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO INTRACELULARES

Este protocolo se baseia na detecção da molécula fluorescente DCF (2',7'-diclorofluoresceína fluorescente), a qual é gerada como produto da clivagem e oxidação da molécula não fluorescente H₂DCF-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato). O composto gerado (DCF) fica retido no ambiente intracelular e emite fluorescência verde, que pode ser mensurada por microscopia de fluorescência ou citômetro de fluxo. Assim, quanto maior a fluorescência verde medida, maior a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular.

Método de Keston et al. (1965)

Protocolo referente à placa de 24 poços; os volumes podem ser ajustados de maneira diretamente proporcional, conforme o tipo de placa (Ex.: placa de 6 poços = volumes 4x maiores; placas de 12 poços = volumes 2x maiores).

1. Retirar o meio de cultura e lavar as células com 300 mL de CMF 1x

Dica: CMF-BSS = Solução Salina Fosfato-tamponada Livre de Cálcio e Magnésio. É uma solução salina muito semelhante ao PBS 1x, porém tamponada e livre de Ca₂₊ e Mg₂₊, o que facilita a atividade da tripsina em soltar as células da placa de cultura.

Dica 2: CMF 10 x = NaCl 40 g; KCl 2 g; Na₂HPO₄ 0,24 g; KH₂PO₄ 0,75 g; Na₂SO₄ 0,5 g; H₂O destilada autoclavada - 500 mL q.s.p. Ajustar o pH para 7.4 e autoclavar. Diluir antes do uso.

2. Remover gentilmente o CMF e adicionar 150 µL de tripsina aos poços, colocando a placa na estufa a 37 °C por 2-5 minutos

Dica: o tempo de tripsinização varia de acordo com o tipo celular; células muito aderentes requerem tempo maior de incubação (5 minutos). Não é aconselhável exceder 5 minutos de tripsinização, sob pena de redução de viabilidade celular.

3. Neutralizar a tripsina com 300 µL de meio de cultura contendo Soro Fetal Bovino e homogeneizar (*"up and down"*) aproximadamente 10 vezes, e passar o volume para um ependorfe de 1,5 mL

Dica: *"Up and down"* é fundamental para uma dissociação eficiente das células; citômetros de fluxo que utilizam capilar como célula de leitura sofrem entupimento quando há a presença de agregados celulares.

4. Centrifugar 5 minutos a 1.500 rpm, seguido da remoção do sobrenadante

Dica: pode-se descartar o sobrenadante tanto por meio do uso de pipeta quanto vertendo diretamente o líquido, sem agitação.

5. Ressuspender o pellet celular com CMF 1x e centrifugar a 1.500 rpm por 5 minutos

6. Ressuspender o pellet celular com 300 µL de CMF1x + DCFH 10 mM e incubar por 30 minutos a 37 °C

Dica 1: DCFH 10 mM (solução de trabalho) - 0,001 g de DCFH em 200 µL de DMSO. Esta solução deverá ser armazenada a -20 °C, protegida da luz. A estabilidade média é de 2 a 6 meses.

Dica 2: o ideal é fazer um mix total (com o volume final a ser utilizado no experimento). É importante sempre calcular esse volume considerando n poços + 1. Por exemplo, para 24 poços serão necessários 7,5 mL de CMF 1x + 7,5 µL de DCF 10 mM.

7. Centrifugar a 1.500 rpm por 5 minutos

8. Ressuspender o pellet em 200 µL de CMF 1x 37 °C e realizar a leitura no citômetro de fluxo

Dica: o volume de CMF no qual o pellet deverá ser ressuspensão varia de acordo com o tipo de citômetro a ser utilizado. Em citômetro com leitor de placa de 96 poços deve-se ressuspender em 150 - 200 μ L, enquanto para leitura em tubo deve-se ressuspender em volume de 200 - 400 μ L.

Referências:

KESTON AS, Brandt R. (1965) The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* 11: 1-5.

MYHRE O, Andersen J, Aarnes H, Fonnum F (2003) Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem. Pharmacol.* 65: 1575-1582.

4.17 MARCAÇÃO COM IODETO DE PROPÍDEO PARA DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DO CICLO CELULAR

O presente protocolo baseia-se na marcação estequiométrica do DNA celular com Iodeto de Propídeo (IP), o qual intercala na dupla fita de DNA e emite fluorescência vermelha correspondente à quantidade de DNA presente na célula. Células em fase G2/M apresentam o dobro de fluorescência vermelha do que células em fase G1, enquanto células em fase S emitem fluorescência intermediária. Esta marcação também permite a determinação de células que sofreram perda de DNA (em evento de morte celular apoptótica, por exemplo), as quais emitem fluorescência com intensidade inferior às células de fase G1, sendo por isso denominadas como sub-G1, bem como células hiperdiploides, que emitem níveis de fluorescência superiores às células de fase G2/M.

Método de Krishan et al. (1975)

Protocolo referente à placa de 12 poços; os volumes podem ser ajustados de maneira diretamente proporcional conforme o tipo de placa (Ex.: placa de 6 poços = volumes 2x maiores; placas de 24 poços = metade dos volumes).

1. Plaquear 4×10^3 células em placa de 12 poços e realizar o tratamento de interesse.
2. Retirar o meio de cultura para um eppendorf de 2 mL e lavar as células com 600 mL de PBS 1x.

Dica: PBS 10x - NaCl 80 g; KCl 2 g; NaHPO₄ 14,4 g; KH₂PO₄ 2,4 g; H₂O destilada autoclavada - 1000 mL q.s.p. Ajustar o pH para 7,4 e autoclavar. Diluir antes do uso.

3. Remover gentilmente o PBS para dentro do mesmo *eppendorf* de 2 mL onde o meio de cultura foi acondicionado e adicionar 250 µL de tripsina aos poços, colocando a placa na estufa a 37 °C por 2-5 minutos.

Dica: o tempo de tripsinização varia de acordo com o tipo celular; células muito aderentes requerem tempo maior de incubação (5 minutos). Não é aconselhável exceder 5 minutos de tripsinização, sob pena de redução de viabilidade celular.

4. Neutralizar a tripsina com 500 µL de meio de cultura contendo Soro Fetal Bovino e homogeneizar (“*up and down*”) aproximadamente 10 vezes, e passar o volume para o mesmo eppendorf de 2 mL onde o meio de cultura e o PBS foram guardados.

Dica: “*Up and down*” é fundamental para uma dissociação eficiente das células; citômetros de fluxo que utilizam capilar como célula de leitura sofrem entupimento quando há a presença de agregados celulares.

5. Centrifugar 5 minutos 1.500 rpm, seguido da remoção do sobrenadante.

Dica: pode-se descartar o sobrenadante tanto por meio do uso de pipeta quanto vertendo diretamente o líquido, sem agitação.

6. Ressuspender o pellet celular com 1 mL de PBS 1x e centrifugar a 1.500 rpm por 5 minutos
7. Centrifugar 5 minutos a 1.500 rpm.

8. Fixar as células com 1 mL de etanol 70% (em PBS 1x) gelado, gotejando-o enquanto as células são agitadas no vórtex.

Dica: deve-se deixar fixando por pelo menos 30 minutos a 4 °C (ideal: aproximadamente 2 horas); pode-se parar aqui e guardar as células por até 3 meses a -20 °C até que o ensaio seja realizado.

9. Centrifugar por 6 minutos a 1.500 rpm.

10. Suspende o pellet em 1 mL de PBS 1x e centrifugar por 6 minutos a 1.500 rpm.

11. Ressuspender o pellet celular em 200 µL de PSSI – incubar, no mínimo, por 15 minutos a 37 °C ou 30 minutos a temperatura ambiente.

Dica 1: PSSI - 1,4 µL de Triton X-100 1%; 20 µL de RNase (20 mg); 60 µL de Iodeto de Propídeo 2 mg/mL; 10 mL q.s.p. de PBS 1x.

Dica 2: pode-se guardar no escuro por no máximo 1 semana.

12. Leitura no citômetro de fluxo.

Referências:

KISHAN A (1975) Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. J. Cell Biol. 66: 188-193.

NUNEZ R (2001) DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. Curr. Issues Mol. Biol. 3: 67-70.

4.18 COMARCAÇÃO COM ANEXINA V-FITC / IODETO DE PROPÍDEO PARA ANÁLISE DE MORTE CELULAR

Em células saudáveis, o fosfolípido de membrana fosfatidilserina (FS) se localiza exclusivamente na face citoplasmática da membrana plasmática. Durante o processo de apoptose, porém, este fosfolípido sofre *flip-flop* e é externalizado na membrana plasmática. Este protocolo se baseia na detecção da FS extracelular por meio da marcação específica com anexina V conjugada ao fluoróforo verde fluorescente FITC, por meio de microscopia e/ou citometria de fluxo. Ainda, é feita a comarcação com Iodeto de Propídeo (IP), o qual é permeável apenas em células que sofrem alterações na permeabilidade da membrana, sinal típico de necrose celular.

Método de Zhang et al. (1997)

Protocolo referente à placa de 24 poços; os volumes podem ser ajustados de maneira diretamente proporcional conforme o tipo de placa (Ex.: placa de 6 poços = volumes 4x maiores; placas de 12 poços = volumes 2x maiores).

1. Plaquarem 3×10^3 células em placa de 24 poços, seguido do tratamento de interesse.

2. Passar o meio de cultura para um ependorfe de 2 mL e lavar as células com 300 mL de PBS 1x. Recolher o PBS da lavagem para o mesmo ependorfe onde foi colocado o meio de cultura.

Dica: Recolhe-se o meio de cultura, pois células aderidas que sofrem apoptose soltam-se da placa de cultura.

3. Adicionar 150 μ L de tripsina aos poços, colocando a placa na estufa a 37 °C por 2-5 minutos.

Dica: o tempo de tripsinização varia de acordo com o tipo celular; células muito aderentes requerem tempo maior de incubação (5 minutos). Não é aconselhável exceder 5 minutos de tripsinização, sob pena de redução de viabilidade celular.

4. Neutralizar a tripsina com 300 μ L de meio de cultura contendo Soro Fetal Bovino e homogeneizar (“*up and down*”) aproximadamente 10 vezes, e passar o volume para o mesmo ependorfe onde foram acondicionados o meio de cultura e o PBS.

5. Centrifugar o ependorfe contendo meio de cultura + PBS + células recolhidas por 5 minutos a 1.600 rpm.

6. Remover o sobrenadante e ressuspender o pellet celular em 100 μ L Annexin Binding Buffer.

Dica: o Annexin Binding Buffer é um componente dos kits de anexina; basta realizar a diluição deste tampão (usualmente 10x concentrado) para uma solução final 1x concentrada.

7. Adicionar 50 μ L do mix de marcação contendo anexina e PI.

Dica: mix de marcação - por amostra, 50 μ L de Annexin Binding Buffer + 1 μ L de anexina V-FITC + 3 mM de Iodeto de Propídeo. O ideal é fazer um mix total (com o volume final a ser utilizado no experimento). É importante sempre calcular esse volume considerando n poços + 1. Por exemplo, para 24 poços serão necessários 1250 mL de Annexin Binding Buffer + 12,5 μ L de anexin V-FITC + 1,25 μ L de IP 3 mM.

Dica 2: os kits de preparação de anexina usualmente sugerem uma quantidade muito elevada de anexina (5 μ L por amostra); esta quantidade, porém, pode gerar falso-positivos em células que marcam eficientemente, em função da perda de especificidade. Por isso, aconselha-se a fazer um teste piloto com uma curva de 0.5 - 5 μ L de tripsina previamente aos experimentos de fato.

Referências:

ZHANG G, Gurtu V, Kain SR, and Yan G (1997) Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V. *BioTechniques* 23: 525-531.

VAN ENGELAND M, Nieland L, Ramaekers F, Schutte B, Reutelingsperger C (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31: 1-9.

4.19 MARCAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA PARA AVALIAÇÃO DA ETAPA FINAL DO MECANISMO DE AUTOFAGIA

O mecanismo de autofagia se baseia na formação do autofagossomo, o qual contém conteúdos próprios da célula e funde-se com lisossomos, gerando os autolisossomos onde o material é degradado. A sonda laranja de acridina (AO) emite fluorescência verde quando em meio intracelular, mas sofre uma protonação em organelas vacuolares ácidas (AVOs), como lisossomos e autolisossomos, e passa a emitir fluorescência vermelha. Este protocolo se baseia na marcação de células com AO e detecção da porcentagem de células marcadas positivamente com AO (ou seja, células positivas para a marcação vermelha), bem como a intensidade de marcação, como uma inferência da quantidade de autolisossomos formados na célula.

Método de Traganos et al. (1995) e Stankiewicz et al. (1996)

Protocolo referente à placa de 24 poços; os volumes podem ser ajustados de maneira diretamente proporcional conforme o tipo de placa (Ex.: placa de 6 poços = volumes 4x maiores; placas de 12 poços = volumes 2x maiores).

CITOMETRIA DE FLUXO

1. Plaquarear 3×10^3 células em placa de 24 poços, seguido do tratamento de interesse.
2. Preparar a solução de marcação contendo 300 μ L de meio de cultura e 1,5 μ g/mL de AO.

Dica 1: preparar 10 mL de solução estoque de AO - 5 g de AO em 10 mL de água destilada (concentração final: 500 μ g/mL).

Dica: o ideal é fazer um mix total (com o volume final a ser utilizado no experimento). É importante sempre calcular esse volume considerando n poços + 1. Por exemplo, para 24 poços serão necessários 7,5 mL de CMF 1x + 22,8 μ L de AO 500 μ g/mL.

3. Retirar o meio de cultura e lavar as células com 300 mL de CMF 1x.
4. Remover gentilmente o CMF e adicionar 150 μ L de tripsina aos poços, colocando a placa na estufa a 37 °C por 2-5 minutos.

Dica: o tempo de tripsinização varia de acordo com o tipo celular; células muito aderentes requerem tempo maior de incubação (5 minutos). Não é aconselhável exceder 5 minutos de tripsinização, sob pena de redução de viabilidade celular.

5. Neutralizar a tripsina com 300 μ L de meio de cultura contendo AO (passo 1) e homogeneizar (“up and down”) aproximadamente 10 vezes, e passar o volume para um *eppendorf* de 0,6 μ L.
6. Incubar as células por 15 minutos a temperatura ambiente e proceder a leitura em citômetro de fluxo.

Dica: as amostras devem ser lidas em até 45 minutos após a marcação. Por isso, em casos em que há muitas amostras, o ideal é dividir a leitura em duas etapas.

MICROSCOPIA

1. Plaquarear 3×10^3 células em placa de 24 poços, seguido do tratamento de interesse.
2. Ao final do período de tratamento, adicionar 1 μ g/mL AO ao meio de cultura diretamente no poço.
3. Incubar no escuro por 15 minutos e, após, fotografar nas fluorescências verde e vermelha utilizando objetiva de 40x.

Referências:

TRAGANOS F, DARZYNKIEWICZ Z (1994) Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations. *Meth. Cell Biol.* 41: 185-194.

STANKIEWICZ M, Jonas W, Hadas E, Cabaj W, Douch PG (1996) Supravital staining of eosinophils. *Int. J. Parasitol.* 26: 445-446.

4.20 ENSAIO DE AGREGAÇÃO DE GFP-LC3 PARA MENSURAÇÃO DA ETAPA INICIAL DA AUTOFAGIA

LC3 é uma proteína específica de autofagossomos e importante para a formação e fechamento dos mesmos, sendo recrutada para o autofagossomos em formação e permitindo o recrutamento de material a ser autofagocitado bem como o fechamento do mesmo. Este método se baseia na transfecção ou transdução de células com plasmídeo pEGFP-LC3, o qual contém a sequência da proteína LC3 fusionada à sequência da Proteína Verde Fluorescente (GFP), a qual marca os autofagossomos como pontos verdes intracelulares, permitindo sua quantificação por meio de microscopia de fluorescência.

Método de Kabeya et al. (2000)

A descrição abaixo inclui a etapa de transfecção. Em caso da utilização de células transduzidas com o plasmídeo contendo a sequência da proteína LC3-GFP deve-se proceder a partir do item 3 do corrente protocolo. Protocolo descritivo para placa de 24 poços.

1. Plaquear 3×10^4 células/poço no dia anterior à transfecção. No dia seguinte, realizar a transfecção com o plasmídeo pEGFP-LC3.

Dica: os protocolos de transfecção são bastante variáveis e dependem do tipo de método e do reagente que será utilizado; de qualquer forma, todos eles possuem um protocolo de uso que deve ser respeitado.

2. Trocar o meio das células no dia seguinte à transfecção.

Dica: é relativamente comum o processo de transfecção ser um pouco tóxico às células de modo que debris celulares aparecem no dia seguinte à transfecção.

3. Expor as células ao tratamento de interesse.

4. Fotografar as células utilizando objetiva de 20x ou 40x ao longo do experimento.

Dica: as células não devem ser mantidas por mais do que 30 minutos fora da estufa.

4. Ao final do período de tratamento, retirar o meio de cultura, lavar 3 x com PBS 1x e adicionar paraformaldeído 2 % para fixação das células por 15 minutos a temperatura ambiente.

Dica: O paraformaldeído 4% deve ser preparado na capela de exaustão, pois é tóxico. Em 100 mL de PBS, pesar 4 g de PFA e aquecer de 58-63°C (não mais do que isso); adicionar 100-150 µL de NaOH 1 N, até clarear a solução (pH~7,4); manter agitando a 58-63°C por 30 minutos, seguido da filtração da solução em papel filtro. A solução estoque deve ser armazenada a -20°C.

5. Após retirar o paraformaldeído, lavar 1x com PBS 1x e adicionar uma solução contendo 400 nM de DAPI em PBS 1x por 30 minutos no escuro, a fim de contraporar o núcleo celular.

6. Contar o número de células que contém cinco ou mais pontos verdes no citoplasma entre pelo menos 100 células verdes. A porcentagem de células autofágicas se dá pela razão do número de células contendo pelo menos cinco pontos verdes em função do total de células contado.

Dica: experimentos de longo prazo (mais do que 7 dias) devem ser realizados com células transduzidas, que apresentam expressão estável da proteína, e não transfectadas.

Referências:

KABEYA Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. EMBO J. 19: 5720-5728.

MIZUSHIMA N, Yoshimori T, Levine B (2010) Methods in mammalian autophagy research. Cell 140: 313-326.

4.21 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE MITÓTICO PARA INFERÊNCIA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Este protocolo se baseia na marcação de DNA celular in situ com uma molécula fluorescente (DAPI ou Iodeto de Propídeo) e determinação da porcentagem de figuras mitóticas em uma determinada condição por meio de observação direta em microscopia de fluorescência.

Método de Tarnowski et al. (1993)

Protocolo referente à placa de 24 poços. Os volumes podem ser ajustados de maneira diretamente proporcional conforme o tipo de placa (Ex.: placa de 6 poços = volumes 4x maiores; placas de 12 poços = volumes 2x maiores).

1. Plaquear 2×10^4 células em placa de 24 poços, e realizar o tratamento de interesse.

Dica: deve-se evitar uma confluência acima de 70% ao final do experimento, principalmente no controle, pois isso dificulta a contagem das figuras mitóticas. Em função disso, pode-se alterar o número inicial de células, dependendo do desenho experimental e da proliferação celular.

2. Retirar o meio e lavar os poços 3x com PBS 1x.

Dica: adicionar e retirar o PBS vagarosamente, para não soltar as células aderidas.

3. Incubar as células com 100 μ L paraformaldeído 4% a temperatura ambiente por 15 minutos.

4. Retirar o paraformaldeído e lavar 3x com PBS/CMF.

Dica 1: Pode-se deixar até cinco dias as células em PBS 1x até proceder a marcação.

Dica 2: a realização deste protocolo em ambiente estéril (fluxo laminar) mantém as células íntegras e ajuda a manter a morfometria celular.

5. Marcar as células com 300 μ L de PBS 1x + 0,5 μ L de Triton X-100 0,1% + 300 nM de DAPI por 30 minutos.

Dica: DAPI é um corante fluorescente que se liga ao DNA. Este protocolo pode ser realizado substituindo-se o DAPI por Iodeto de Propídeo 6 mM.

Dica: a marcação pode ser feita com Iodeto de Propídeo.

6. Retirar a solução de marcação contendo DAPI e adicionar 500 μ L de PBS 1x / poço.

Dica: a marcação permanece relativamente estável por 10 dias no escuro.

7. Fotografar os poços de interesse para o visível e fluorescência utilizando objetiva de 20x.

8. Conta-se o número de figuras mitóticas em pelo menos 100 células de cada condição.

Dica: a escolha do campo a ser fotografado deve ser feita de maneira 'cega', na luz visível.

Referência:

TAMOWSKI BI, Sens DA, Nicholson JH, Hazen-Martin DJ, Garvin AJ, Sens MA (1993) Automatic quantitation of cell growth and determination of mitotic index using DAPI nuclear staining. *Pediatr. Pathol.* 13: 249-265.

4.22 ATIVIDADE DE BETA-GALACTOSIDASE ÁCIDA ASSOCIADA À SENESCÊNCIA (SA-β-GAL)

Células senescentes apresentam aumento da expressão e atividade da proteína beta-galactosidase ácida lisossomal. Este protocolo se baseia na determinação da atividade desta enzima por meio da incubação das células *in vitro* com o substrato cromogênico x-gal, o qual é convertido a um produto azul que se acumula intracelularmente, marcando as células senescentes.

Método de Dimri et al. (1995)

Protocolo referente à placa de 24 poços; os volumes podem ser ajustados de maneira diretamente proporcional conforme o tipo de placa (Ex.: placa de 6 poços = volumes 4x maiores; placas de 12 poços = volumes 2x maiores).

1. Plaquarear 1×10^4 células em placa de 24 poços e realizar o tratamento de interesse.

Dica: deve-ser atentar para que o controle não atinja máxima confluência antes do final do experimento. Pode-se alterar o número inicial de células dependendo do desenho experimental.

2. Retirar o meio e lavar os poços 3x com PBS 1x.

Dica: adicionar e retirar o PBS vagarosamente, para não soltar as células aderidas.

3. Incubar as células com 100 µL paraformaldeído 4% a temperatura ambiente por 15 minutos.

4. Retirar o paraformaldeído e lavar 3x com PBS/CMF.

Dica 1: Pode-se deixar até 5 dias as células em PBS 1x até proceder a marcação.

Dica 2: a realização deste protocolo em ambiente estéril (fluxo laminar) mantém as células íntegras e ajuda a manter a morfometria celular.

5. Incubar as células com 300 µL da solução de marcação contendo o substrato X-gal por 6-14 horas a 37 °C em estufa sem CO₂.

Dica 1: deve-se preparar um mix de solução de marcação referente ao total de poços de interesse, calculando o volume para n poços + 1 (por exemplo, para placa de 24 poços, deve-se preparar volume para 7,5 mL de solução de marcação, com base na tabela abaixo).

Solução	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	12 mL
X-gal 20 mg/mL	50 µL	100 µL	150 µL	200 µL	250 µL	300 µL	600 µL
TF 200 mM / Ác. Cítrico 80 mM	500 µL	1 mL	1,5 mL	2 mL	2,5 mL	3 mL	6 mL
NaCl 500 mM	300 µL	600 µL	900 µL	1,2 mL	1,5 mL	1,8 mL	3,6 mL
MgCl 500 mM	4 µL	8 µL	12 µL	16 µL	20 µL	24 µL	48 µL
K ₃ FeCN ₆ 50 mM	100 µL	200 µL	300 µL	400 µL	500 µL	600 µL	1,2 mL
K ₄ FeCN ₆ 100 mM	50 µL	100 µL	150 µL	200 µL	250 µL	300 µL	600 µL

Dica 2: o tempo de incubação com o substrato é bastante variável dependendo do tipo celular. Deve-se padronizar esse período em experimento piloto com diferentes tempos de marcação, a fim de evitar marcação falso-positiva ou falso-negativa.

6. Retirar a solução de marcação e contracorar os núcleos celulares, por meio da incubação com 300 µL de PBS 1x + 300 nM de DAPI por 30 minutos no escuro.

Dica: DAPI é um corante fluorescente que se liga ao DNA.

Dica 1: esta marcação nuclear tem como objetivo dirigir a contagem posterior do número de células positivamente marcadas para X-gal.

7. Retirar a solução de marcação contendo DAPI e adicionar 500 µL de PBS 1x / poço.

Dica: a marcação permanece relativamente estável por dez dias no escuro.

8. Fotografar os poços de interesse para o visível (X-gal) e fluorescência (DAPI) utilizando objetiva de 20x.

9. Conta-se o número de células azuis (marcadas para o substrato X-gal) em pelo menos 100 células de cada condição.

Dica: a escolha do campo a ser fotografado deve ser feita de maneira 'cega', inicialmente pela luz fluorescência azul referente à marcação com DAPI.

Referência:

DIMRI GP, Lee X, Basile G, et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9363-9367.

4.23 ENSAIO CLONOGÊNICO PARA MENSURAÇÃO DA CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE CÉLULAS ÚNICAS

Este protocolo se baseia na mensuração da capacidade proliferativa de células únicas (clones). Células são expostas a diferentes condições/tratamentos, plaqueadas em baixas densidades e crescidas de modo a permitir a formação de colônias, que são posteriormente contadas a olho nu e/ou observadas em microscopia. Quanto maior o número de colônias, maior a capacidade clonogênica das células em questão.

Método de Franken et al. (2009)

Para o ensaio clonogênico não é necessário um número grande de células. Assim, pode-se preparar uma placa de 24 poços com 2×10^3 células/poço e proceder o tratamento de interesse. A partir das células tratadas é que se inicia o protocolo do ensaio clonogênico.

1. Uma vez encerrado o tempo de tratamento de interesse, retirar o meio de cultura, tripsinizar as células e acondicionar as mesmas em tubo *falcon* ou *eppendorf*.

2. Contar as células (em hemocitômetro ou citômetro de fluxo) e determinar o volume necessário para obter 100 células para cada poço de placa de cultura de 6 poços.

Dica: o ideal é que o ensaio seja feito, no mínimo, em duplicatas. Assim, deve-se fazer um mix total contendo 200 células e 4 mL de volume final de meio de cultura, para plaqueamento de 2 mL por poço contendo 100 células em cada.

Dica 2: é aconselhável que seja feita uma diluição do número de células para que o volume a ser pipetado contendo as 100 células não seja inferior a 10 μ L.

3. Plaquear as células em placa de 6 poços (100 células em 2 mL de meio por poço) e deixar estas células proliferarem clonalmente por 10-15 dias, com uma troca do meio de cultura no 7º dia após o plaqueamento.

Dica: o tempo de crescimento de cada tipo celular varia; algumas células já mostram colônias com sete dias de crescimento, enquanto outras levam em torno de 15 dias para isso.

Dica 2: alguns tipos celulares não apresentam capacidade de proliferação clonogênica, inviabilizando o ensaio.

4. Após o período de proliferação celular, fixar as células adicionando lentamente 1 mL de metanol 100% gelado por 5 minutos a temperatura ambiente.

5. Remover o metanol e adicionar 1 mL de cristal violeta 0,1% (0,1 g em 100 mL de H₂O destilada) por 1 minuto.

6. Retirar o cristal violeta e lavar com água destilada até que a coloração violeta de fundo seja removida e apenas as colônias permaneçam coloridas

7. Contar o número de colônias com pelo menos 50 células formadas em cada tratamento.

Referência:

FRANKEN, Rodermond H, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. Nature Protocols 1: 2315-2319.

4.24 MARCAÇÃO DE BROMODEOXIURIDINA (BrdU) PARA AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Este protocolo baseia-se na incubação de células em cultura durante um período que varia de 30 minutos a 3 horas com o nucleotídeo alterado Bromodeoxiuridina (BrdU), o qual é incorporado ao DNA celular de células em proliferação (que progridem pela fase S do ciclo celular). Após a incubação com BrdU, este é detectado por meio da marcação com anticorpo fluorescente específico, e a porcentagem de células positivas é determinada por citometria de fluxo.

Método de Dolbeare et al. (1983)

Protocolo referente à placa de 12 poços; os volumes podem ser ajustados de maneira diretamente proporcional conforme o tipo de placa (Ex.: placa de 6 poços = volumes 2x maiores; placas de 24 poços = metade dos volumes).

1. Plaquarear 5×10^4 células em placa de 12 poços e realizar o tratamento de interesse no dia seguinte

2. Incubar as células com $10 \mu\text{M}$ de BrdU (diretamente no meio de cultura) por 1-3 horas

Dica: o tempo de incubação varia de acordo com o tipo celular - células que proliferam com índice elevado requerem tempo menor (1 hora) de incubação com o BrdU.

3. Remover o meio de cultura e lavar as células com PBS 1x; adicionar $250 \mu\text{L}$ de tripsina aos poços, colocando a placa na estufa a 37°C por 2-5 minutos

Dica: o tempo de tripsinização varia de acordo com o tipo celular; células muito aderentes requerem tempo maior de incubação (5 minutos). Não é aconselhável exceder 5 minutos de tripsinização, sob pena de redução de viabilidade celular.

4. Neutralizar a tripsina com $500 \mu\text{L}$ de meio de cultura contendo Soro Fetal Bovino e homogeneizar (“up and down”) aproximadamente 10 vezes, e passar o volume para um *eppendorf* de $1,5 \text{ mL}$

Dica: “Up and down” é fundamental para uma dissociação eficiente das células; citômetros de fluxo, que utilizam capilar como célula de leitura, sofrem entupimento quando há a presença de agregados celulares.

5. Centrifugar 5 minutos a 1.500 rpm , seguido da remoção do sobrenadante

Dica: pode-se descartar o sobrenadante tanto por meio do uso de pipeta quanto vertendo diretamente o líquido, sem agitação.

6. Ressuspender o pellet celular com 1 mL de PBS 1x e centrifugar a 1.500 rpm por 5 minutos.

7. Centrifugar 5 minutos a 1.500 rpm .

8. Fixar as células com 1 mL de etanol 70% (em PBS 1x) gelado, gotejando-o enquanto as células são agitadas no vórtex

Dica: deve-se deixar fixando por pelo menos 30 minutos a 4°C (ideal: aproximadamente 2 horas).

9. Centrifugar por 6 minutos a 1.500 rpm .

10. Suspender o pellet em 1 mL de PBS 1x e centrifugar por 6 minutos a 1.500 rpm .

11. Ressuspender o pellet celular em $500 \mu\text{L}$ de HCl 2 N por 30 minutos a temperatura ambiente.

12. Centrifugar a 1.500 rpm por 6 minutos; ressuspender o pellet celular em 1 mL de PBS 1x e centrifugar novamente a 1.500 rpm por 6 minutos.

13. Ressuspender o pellet celular em 380 μ L de PBS-T e adicionar 20 μ L de anticorpo anti-BrdU conjugado a FITC por 1 hora no escuro sob agitação.

Dica: PBS-T = preparar 50 mL (50 mL PBS 1x + 500 μ L BSA 1 mg/mL + 250 μ L Tween 20).

14. Centrifugar a 1.500 rpm por 6 minutos e, após, adicionar 1 mL de PBS 1x ao pellet celular, seguido de centrifugação a 1.500 rpm por 6 minutos

15. Ressuspender o pellet celular em 200 μ L de PSSI – incubar, no mínimo, 15 minutos a 37 °C ou 30 minutos a temperatura ambiente

Dica 1: PSSI - 1,4 μ L de Triton X-100 1%; 20 μ L de RNase (20 mg); 60 μ L de Iodeto de Propídeo 2 mg/mL; 10 mL q.s.p. de PBS 1x.

16. Proceder a leitura em citômetro de fluxo.

Referência:

DOLBEARE F, Gratznert H, Pallavicini M, Gray JW (1983) Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 5573-5577.

4.25 ANÁLISE MORFOMÉTRICA NUCLEAR (NMA) PARA INFERÊNCIA DE APOPTOSE, SENESCÊNCIA E IRREGULARIDADES NUCLEARES

Este protocolo baseia-se na mensuração de tamanho e forma de núcleos de células eucarióticas in vitro. Por meio da morfometria nuclear é possível inferir mecanismos de senescência, apoptose e catástrofe mitótica. O método se baseia em três etapas: 1) Aquisição das imagens; 2) Obtenção dos dados morfométricos; 3) Análise dos dados no Excel.

Método de Filippi-Chiela et al. (2012)

Protocolo referente à placa de 24 poços; os volumes podem ser ajustados de maneira diretamente proporcional conforme o tipo de placa (Ex.: placa de 6 poços = volumes 4x maiores; placas de 12 poços = volumes 2x maiores).

ETAPA 1: Aquisição das imagens

1. Plaques 2 x 10⁴ células em placa de 24 poços. No dia seguinte, realizar o tratamento de interesse.

Dica: deve-se evitar uma confluência acima de 70% ao final do experimento, principalmente no controle, pois isso dificulta a contagem das figuras mitóticas. Em função disso pode-se alterar o número inicial de células, dependendo do desenho experimental e da proliferação celular.

2. Após o período do tratamento, remover o meio de cultura e lavar os poços 3x com PBS 1x.

Dica: adicionar e retirar o PBS vagarosamente, para não soltar as células aderidas.

3. Incubar as células com 100 µL para formaldeído 4% a temperatura ambiente por 15 minutos.

4. Retirar o paraformaldeído e lavar 3x com PBS/CMF.

Dica 1: Pode-se deixar até cinco dias as células em PBS 1x até proceder a marcação.

Dica 2: a realização deste protocolo em ambiente estéril (fluxo laminar) mantém as células integras e ajuda a manter a morfometria celular.

5. Marcar as células com 300 µL de PBS 1x + 0,5 µL de Triton X-100 0,1% + 300 nM de DAPI por 30 minutos.

Dica: DAPI é um corante fluorescente que se liga ao DNA.

6. Retirar a solução de marcação contendo DAPI e adicionar 500 mL de PBS 1x por poço.

Dica: a marcação permanece relativamente estável por 10 dias no escuro.

7. Fotografar os poços de interesse para o visível e fluorescência utilizando objetiva de 20x.

ETAPA 2: Obtenção dos dados morfométricos

1. Abrir o arquivo da primeira imagem a ser analisada no software Image Pro Plus (IPP).

2. Clicar em “Irregular AOI” e clicar seguidamente no primeiro núcleo a ser analisado, até que este adquira o contorno vermelho em conformidade com sua morfometria.

Dica: é preciso ter cuidado durante a marcação dos núcleos - marcação além da área nuclear ou inferior a mesma gera dados incorretos. Exemplos de marcações corretas ou incorretas podem ser encontrados na referência abaixo.

3. Ao término da seleção correta do primeiro núcleo, manter a tecla “Ctrl” pressionada e clicar sobre o próximo núcleo a ser marcado, e assim sucessivamente.

4. Quando todos os núcleos a serem considerados estiverem marcados, selecionar: *Count > Measure Objects > Measure > Select measures > Aspect, Area/Box, Radius Ratio e Roundness*.
5. Na sequência, selecionar *Edit > Convert AOI(s) to Objects* e, finalmente, *File > Data to Clipboard*.
6. Colar os dados diretamente no Excel.

ETAPA 3: Análise dos dados no Excel

1. Abrir a planilha do Excel para o NMA (<http://www.ufrgs.br/labsinal/NMA>).
2. Selecionar núcleos regulares / normais e copiar os dados destes núcleos. Colar na tabela “*Normal Nuclei and Settings*” (tabela laranja à esquerda) para fazer a setagem dos núcleos.

Dica: a análise de NMA é semelhante à citometria de fluxo - inicialmente é feita uma setagem (aba “*Normal Nuclei and Settings*”) para, na sequência, ser feita a análise das diferentes.

3. Ajustar o tamanho da ‘elipse normal’ para que fique representativa da população controle / normal.

Dica: exemplos de elipses normais corretas ou incorretas podem ser encontradas na referência abaixo.

4. Copiar e colar TODOS os dados obtidos na área “*Treated Nuclei*” da aba “*Normal Nuclei and Settings*” (tabela laranja à direita).
5. Ajustar os limiares que dividem as populações, alterando o número de desvios padrão nas células S4, S6, S8 e S10.
6. Para a análise propriamente dita, duplicar a planilha “*Condition 1*” até o número necessário correspondente ao número de tratamentos de interesse.
7. Colar os dados das variáveis obtidas no IPP dos núcleos de cada tratamento no espaço amarelo de cada planilha referente aos tratamentos.
8. Apagar os “X” da coluna I onde não houver dados.

Dica: diferentes experimentos devem ser colocados na ordem indicada na coluna A.

9. A porcentagem de células em cada condição é dada na coluna AH. Os gráficos representam Área nuclear versus Índice de Irregularidade Nuclear (NII), à esquerda, e a porcentagem de cada mecanismo celular (à direita).

Referência:

FILIPPI-CHIELA EC, Oliveira MM, Jurkovski B, Callegari-Jacques SM, da Silva VD, Lenz G (2012) Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. PLoS One 7: e42522.

CAPÍTULO 5

ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM NÍVEL DE RNA

**Adriane Pozzobon, Andressa Dametto, Édina Aparecida dos Reis Blasi, Giseli Buffon,
Raul Antonio Sperotto, Ronize Zeni da Silva, Vinicius de Abreu Waldow**

5.1 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE RNA COM DNASE I® E DNASE TURBO®

O tratamento das amostras de RNA com DNase é utilizado para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico que, durante o processo de extração de RNA, possa ter sido extraído.

DNase I®

1.	Pipetar em cada tubo: (Manter no gelo)	10x DNase I Reaction Buffer DNase I 1 µg de RNA Total H ₂ O Milli-Q TOTAL	1 µL 1 µL q.s.p. 10 µL
2.		Deixar 15 minutos sob temperatura ambiente.	
3.		Pipetar em cada tubo 1 µL de EDTA 25 mM.	
4.		Manter a 65 °C por 10 minutos. A enzima é inativada por calor e EDTA.	
5.		Guardar no ultrafreezer.	

DNase Turbo®

1.	Pipetar em cada tubo: (Manter no gelo)	H ₂ O Milli-Q 10x DNase Reaction Buffer DNase Turbo 1 µg de RNA Total TOTAL	q.s.p 1 µL 1 µL 10 µL
2.		No termociclador, manter a 37 °C por 30 minutos.	
3.		Pipetar em cada tubo 1 µL de EDTA 25 mM.	
4.		Manter a 75 °C por 10 minutos.	
5.		Guardar no ultrafreezer.	

5.2 SÍNTESE DE PRIMEIRA FITA DE CDNA UTILIZANDO A TRANSCRIPTASE REVERSA M-MLV®

A enzima transcriptase reversa M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) é utilizada para sintetizar uma fita de DNA complementar à fita de RNA, chamada de primeira fita de cDNA. A conversão do RNA em cDNA é possível, pois utiliza-se um primer oligo (dT) que anela na cauda poliA dos mRNAs, permitindo a análise da expressão de genes específicos em uma amostra biológica.

1.	Pipetar em cada tubo:	Primer oligo (dT)	1 µL
		dNTPs Mix 10 mM	1 µL
		1 µg de RNA total tratado com DNase	
		H ₂ O Milli-Q	q.s.p.
		TOTAL	13 µL
2.		Manter a 65 °C por 5 minutos.	
3.	Pipetar em cada tubo:	5X First-Strand Buffer	4 µL
		DTT 0,1 M	2 µL
4.		Manter a 37 °C por 2 minutos.	
5.		Pipetar em cada tubo:	
		1µL de M-MLV (200 U/ µl)	
6.		Manter a 37 °C por 50 minutos.	
7.		Manter a 70 °C por 15 minutos para inativação da enzima.	
8.		Guardar na geladeira.	

5.3 SÍNTESE DE PRIMEIRA FITA DE cDNA UTILIZANDO A TRANSCRIPTASE REVERSA SUPERScript II®

A síntese de cDNA (DNA complementar) é feita por transcrição reversa a partir do RNA total, utilizando oligonucleotídeos (*primers*) complementares à cauda poli-A característica do mRNA (RNA mensageiro), produzindo um cDNA mais puro, exclusivamente a partir do mRNA. Considerando que a fração do mRNA corresponde a aproximadamente 3-4% do RNA total, estima-se que 1 µg de RNA total fornece 20 ng de cDNA. O cDNA posteriormente é utilizado para a amplificação de genes de interesse pela PCR. A técnica de RT-PCR pode ser usada para comparar os níveis de mRNA e caracterizar seus padrões de expressão (Wang & Brown, 1999).

Protocolo baseado no Kit SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen)

1. Após a quantificação do RNA, construir uma tabela com os volumes correspondentes para x µg de RNA/µl de solução;

Amostra de RNA	mg/µL de RNA	p/ 1µg de RNA/µl	H ₂ O Completar para 10 uL

2. Preparar a MIX (sempre para o número de tubos + 1 extra).

Mix	cada reação	p/n tubos + 1 (ex.: 8)
10X PCR Buffer	2 µL	18 µL
25 mM MgCl ₂	4 µL	36 µL
0,1 M DTT	2 µL	18 µL
RNAse OUT	1 µL	9 µL

Dica: sempre centrifugar brevemente (spin) os reagentes antes de usar. Descongelar e manter todos os reagentes (e principalmente o RNA) no gelo.

3. Pipetar o volume respectivo de H₂O com DEPC (do Kit) em cada tubo;
4. Pipetar o volume correspondente de RNA e manter a amostra sempre no gelo.
5. Adicionar 1 µL de dNTP mix em cada tubo.
6. Adicionar 1 µL de primer OligodT (10 mM) a cada tubo.
7. Incubar à 65°C por 5 minutos.
8. Adicionar 9 µL da Mix a cada tubo.
9. Incubar à 42 °C por 2 minutos.
10. Adicionar 1 µL da enzima transcriptase reversa, Superscript II® (Invitrogen) por tubo.

Dica: tirar a enzima do freezer somente na hora de pipetar e misturar com a ponteira após adicionar no tubo.

11. Incubar à 42°C por 50 minutos.
12. Terminar a reação à 70°C por 15 minutos.
13. Colocar no gelo.
14. Coletar a reação por breve centrifugação.
15. Adicionar 1 µL de RNase H em cada tubo.

Dica: retirar a enzima do freezer somente na hora de pipetar.

16. Incubar por 20 minutos à 37°C antes de proceder a amplificação por PCR.

Referência:

WANG, T. and M. J. Brown (1999). mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection Anal Biochem 269(1): 198-201.

5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR SEMI-QUANTITATIVO

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *polimerase chain reaction*) é uma técnica que permite a amplificação de uma sequência de DNA específica. Durante a PCR, a desnaturação do DNA é realizada através de altas temperaturas e permitindo que os *primers* se liguem à sequência complementar no DNA e delimitem a região alvo. Além disso, a enzima termoestável *Taq* DNA Polimerase adiciona os nucleotídeos produzindo cópias do trecho de interesse. A RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*) usa o cDNA (DNA complementar) ao invés do DNA genômico, e permite que sejam analisados padrões de expressão gênica.

1. Amplificação por PCR semiquantitativa (gene da b-microglobulina humana)
2. Preparar tubos *ependorfs* (0,2 mL) numerados segundo as amostras.
3. Colocar as amostras no gelo e os componentes da Mix Inicial e Pós Hot-Start
4. Preparar a *Mix Inicial* e a *Pós Hot-Start*.

Dica: não adicionar na Pós Hot-Start à enzima *Taq* DNA polimerase, deixar para acrescentar apenas no final para impedir a formação de dímeros de primers. Preparar a Mix e a Pós sempre para uma reação a mais. Ex.: 14 amostras + 1:

Exemplo:

	Mix inicial	Pós Hot-Start
Água DEPC	32,8 x 15 = 492 µL	6,4 x 15 = 103,5 µL
PCR Buffer 10X	4,0 x 15 = 60 µL	1,0 x 15 = 15 µL
MgCl ₂ 50 mM	1,2 x 15 = 18 µL	0,3 x 15 = 4,5 µL
DNTP Mix 10 mM	-	1,0 x 15 = 15 µL
<i>Primer Sense</i>	-	0,5 x 15 = 4,5 µL
<i>Primer Antisense</i>	-	0,5 x 15 = 4,5 µL
cDNA	2,0	-
<i>Taq</i> DNA Polimerase	-	0,3 x 15 = 3,0 µL
TOTAL	40 µL	10 µL

5. Adicionar a cada tubo 38 µL da Mix Inicial.
6. Adicionar 2 µL de cDNA de cada amostra no seu respectivo tubo.
7. Colocar no termociclador.
8. Após 2 minutos (01:59) dar Pausa no programa.
9. Retirar os tubos da máquina, dar um *spin* e colocar no gelo.
10. Adicionar a enzima *Taq* DNA Polimerase na solução Pós Hot-Start.
11. Adicionar 10 µL da Pós Hot-Start em cada tubo.
12. Recolocar os tubos no termociclador e apertar "*Pause*" para continuar o programa.
13. Sequência analisada: sense 5' CTATCCAGCGTACTCCAAAG 3' e e antisense: 5'ACAAGTCTGAATGCTCCACT 3'.

Programa para amplificar a β-microglobulina:

1. 94°C por 2 minutos
2. 94°C por 30 segundos

3. 55°C por 30 segundos
4. 72 °C por 30 segundos
5. Repetir os passos 2, 3 e 4: 29 vezes
6. 72 °C por 5 minutos

END

Para a análise dos produtos da PCR, deve-se realizar a eletroforese em gel de agarose. O tamanho e a concentração do gel dependem do fragmento que se quer analisar. Neste caso, utiliza-se 1,5 %, pois o gene analisado possui 165 pares de bases.

Exemplos de cálculo:

Gel Médio (1,5 %)	80 mL TBE 1X
	1,2 g Agarose
	1µL Brometo de Etídeo

1. Pesar agarose de acordo com o volume de TBE 1X a ser utilizado.
2. Misturá-la ao TBE 1X em um becker.
3. Fazer uma marca no menisco da solução para completar o volume após a fervura.
4. Tapar o recipiente com plástico-filme de polietileno.

Dica: fazer alguns pequenos furos com a ponta da tesoura.

5. Preparar o suporte do gel e acoplar o pente.
6. Ferver a mistura em micro-ondas até dissolver completamente a agarose.
7. Completar o volume evaporado com o TBE 1X.
8. Aguardar o resfriamento parcial e acrescentar o Brometo de Etídeo.

Dica: toda a manipulação com o Brometo de Etídeo deve ser feita com luvas apropriadas.

9. Homogeneizar e verter a mistura no suporte com cuidado para não formar bolhas.

Dica: agitar delicadamente o erlenmeyer para misturar bem o brometo de etídeo e evitar a formação de bolhas. Se formar bolhas próximas ao pente, estas podem ser removidas com o auxílio de uma ponteira.

10. Aguardar a polimerização (em torno de 30 minutos) para desenformar o gel.
11. Posteriormente ao preparo do gel, proceder a pipetagem das amostras no gel.
12. Cortar um pedaço de parafilm e pipetar 5 µL de tampão de corrida conforme o número de amostras.
13. Pipetar 7 µL de amostra em cada “bolinha” de tampão de corrida.
14. Aspirar a mistura e pipetar a amostra no poço do gel.

Dica: sempre reservar o primeiro poço para o marcador de peso molecular. Pipetar entre 1 e 2 µL. Pipetar lentamente, cuidando para não furar o gel e verificando se o tampão da cuba de eletroforese cobre todo o gel, principalmente os poços.

15. Fechar a cuba, conectar os eletrodos e ligar a fonte a 100 mV, 300 mA por aproximadamente 1 hora (o tempo depende do fragmento a ser analisado e da concentração do gel de agarose).
16. Visualizar a amplificação no transluminador (luz UV).

Observações:

Preparo do tampão TBE 10X

Para 1 litro:

Pesar: 55 g de ácido bórico, 108 g de TRIS e 9,25 g de EDTA. Dissolver os sais em parte da água Milli-Q (aproximadamente 600 mL). Após dissolver, acrescentar o restante da água (400 mL). Verificar o pH (deve estar entre 8 e 9). Distribuir em duas garrafas de meio litro e autoclavar.

Dica: se o pH não estiver entre 8 e 9, desprezar o tampão e refazer, pois o pH não deve ser ajustado.

Para preparar a solução TBE 1X, diluir 100 mL de TBE 10X em 900 mL de água Milli-Q autoclavada.

Preparo do tampão de corrida: Tampão Type III

Para 5 mL: Pesar 0,0125 g de xylene cyanol e 0,0125 g de azul de bromofenol. Misturar em um becker 1,5 mL de glicerol, 3,5 mL de água Milli-Q e os corantes. Agitar até dissolver. Distribuir em cinco tubos *ependorfs* e armazenar na geladeira.

Referência

WATSON, James D. et al. 2006. *Biologia Molecular do Gene*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed.

5.5 PREPARAÇÃO DE UMA PLACA DE RT-qPCR (PCR EM TEMPO REAL) DE 48 POÇOS

O PCR em Tempo Real é utilizado para analisar a expressão de genes específicos de maneira precisa e altamente reprodutível, por meio de um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência. A técnica também pode ser aplicada para quantificação de carga viral, genotipagem, detecção de agentes infecciosos, testes de eficiência terapêutica e todas as aplicações da PCR convencional.

Protocolo para análise de expressão gênica de 4 genes (3 genes testes + 1 gene controle):

Dicas: As amostras devem ser testadas sempre em triplicatas biológicas e quadruplicatas técnicas. Todo o procedimento deve ser realizado no gelo.

1. Identificar 4 tubos *ependorf* de 1,5 mL com os nomes dos respectivos genes.
2. Pipetar os seguintes itens em cada *ependorf* identificado (mix para $\frac{1}{4}$ de placa - 12 poços):

H ₂ O	49,7 µL
Tampão 10X	10X 26,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	15,9 µL
dNTPs Mix (10 mM)	2,7 µL
Primer F (10 mM)	5,3 µL
Primer R (10 mM)	5,3 µL
SYBR Green diluído*	26,5 µL
Platinum Taq DNA Polimerase	0,7 µL

*Diluição do SYBR Green: 1,1 µL SYBR Green + 108,9 µL H₂O

3. Misturar bem o mix com auxílio de uma pipeta.
4. Colocar a placa de 48 poços sobre uma estante de microtubos.
5. Colocar três *ependorfs* de 0,2 mL alinhados na estante (ao lado da placa) e adicionar 45 µL do mix do gene 1 em cada um deles.
6. Com a pipeta multicanal, transferir 10 µL do mix do gene 1 em cada pocinho da coluna 1, 2, 3 e 4 das linhas A, B e C.
7. Descartar os *ependorfs* auxiliares.
8. Colocar três novos *ependorfs* de 0,2 mL alinhados na estante (ao lado da placa) e adicionar 45 µL do mix do gene 2 em cada um deles.
9. Com a pipeta multicanal, transferir 10 µL do mix do gene 2 em cada pocinho da coluna 5, 6, 7 e 8 das linhas A, B e C.
10. Descartar os *ependorfs* auxiliares.
11. Colocar três novos *ependorfs* de 0,2 mL alinhados na estante (ao lado da placa) e adicionar 45 µL do mix do gene 3 em cada um deles.
12. Com auxílio da pipeta multicanal, transferir 10 µL do mix do gene 3 em cada pocinho da coluna 1, 2, 3 e 4 das linhas D, E e F.
13. Descartar os *ependorfs* auxiliares.
14. Colocar mais três novos *ependorfs* de 0,2 mL alinhados na estante (ao lado da placa) e adicionar 45 µL do mix do gene 4 em cada um deles.

15. Com o auxílio da pipeta multicanal, transferir 10 µL do mix do gene 4 em cada pocinho da coluna 5, 6, 7 e 8 das linhas D, E e F.

16. Adicionar 10 µL de cDNA (diluído 100X) em cada pocinho correspondente a cada amostra.

17. Os pocinhos C4, C8, F4 e F8 serão os controles negativos dos respectivos genes 1, 2, 3 e 4. Nestes poços adicionar 10 µL de H₂O, ao invés do cDNA.

Dica: Caso se formem algumas bolhas na parede dos pocinhos, as mesmas deverão ser empurradas para baixo com o auxílio de uma ponteira, ou com uma centrífuga de placas. Cuidar para não contaminar os poços vizinhos.

18. Colocar o adesivo na placa.

Dica: O adesivo deve estar bem fixado para evitar a evaporação dos reagentes.

19. Colocar a placa dentro do equipamento de RT-qPCR para análise da expressão gênica.

20. Criar ou editar um template e salvá-lo com um nome apropriado.

21. Iniciar a reação.

22. Salvar o arquivo e calcular os valores de expressão.

Protocolo para análise de expressão gênica de 2 genes (1 gene teste + 1 gene controle):

1. Identificar 2 *ependorfs* de 1,5 mL com os nomes dos respectivos genes.

2. Pipetar os seguintes itens em cada *ependorf* identificado (mix para meia placa - 24 poços):

H₂O 99,4 µL

Tampão 10X 53 µL

MgCl₂ (50 mM) 31,8 µL

dNTPs Mix (10 mM) 5,3 µL

Primer F (10 mM) 10,6 µL

Primer R (10 mM) 10,6 µL

SYBR Green diluído* 53 µL

Platinum Taq DNA Polimerase 1,4 µL

*Diluição do SYBR Green: 1,1 µL SYBR Green + 108,9 µL H₂O

3. Misturar bem o mix com auxílio de uma pipeta.

4. Colocar a placa de 48 poços sobre uma estante de microtubos.

5. Colocar 6 *ependorfs* de 0,2 mL alinhados na estante (ao lado da placa) e adicionar 45 µL do mix do gene 1 em cada um deles.

6. Com a pipeta multicanal, transferir 10 µL do mix do gene 1 em cada pocinho da coluna 1, 2, 3 e 4 das linhas A, B, C, D, E e F.

7. Descartar os *ependorfs* auxiliares.

8. Colocar 6 novos *ependorfs* de 0,2 mL alinhados na estante (ao lado da placa) e adicionar 45 µL do mix do gene 2 em cada um deles.

9. Com a pipeta multicanal, transferir 10 µL do mix do gene 2 em cada pocinho da coluna 5, 6, 7 e 8 das linha A, B, C, D, E e F.

10. Descartar os *ependorfs* auxiliares.

11. Adicionar 10 µL de cDNA (diluído 100X) em cada pocinho correspondente a cada amostra.

11. Os pocinhos F4 e F8 serão os controles negativos dos respectivos genes 1 e 2. Nestes, adicionar 10 µL de H₂O, ao invés do cDNA.

Dica: Caso se formem algumas bolhas na parede dos pocinhos, as mesmas deverão ser empurradas para baixo com o auxílio de uma ponteira, ou com uma centrífuga de placas. Cuidar para não contaminar os poços vizinhos.

12. Colocar o adesivo na placa.

Dica: O adesivo deve estar bem fixado para evitar a evaporação dos reagentes.

13. Colocar a placa dentro do equipamento de RT-qPCR para análise da expressão gênica.

14. Criar ou editar um template e salvá-lo com um nome apropriado.

15. Iniciar a reação.

16. Salvar o arquivo e calcular os valores de expressão.

5.6 CONFIGURAÇÃO DO EQUIPAMENTO STEPONE (APPLIED BIOSYSTEMS) PARA ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA

Análises de expressão gênica permitem a identificação de quais genes estão sendo expressos em determinado tecido em uma determinada situação, além de permitir a quantificação dos níveis de expressão.

1. Abrir o programa StepOne (Applied Biosystems).
2. Clicar na janela “Setup”, após “Run Method” e programar a reação:

Etapa inicial de desnaturação 95°C por 5 minutos

(*Holding Stage*)

40 ciclos 95° C por 30 segundos

(*Cycling Stage*) 60° C por 30 segundos

72° C por 30 segundos

Curva dissociação 95° C por 15 minutos

(*Melt Curve Stage*) 60° C por 1 minuto

Dica: na curva de dissociação ocorre um aumento gradual da temperatura (de 0,3 em 0,3 °C por segundo) até chegar aos 95 °C. Quando atinge esta temperatura, permanece por 15 min. Após permanece 1 min a 60 °C.

3. Clicar na janela “Setup”, após “Plate Setup” e, por último, “Define Targets and Samples”. Definir os nomes dos genes e das amostras a serem avaliados nos respectivos campos.

4. Clicar na janela “Assign Targets and Samples” e organizar o *layout* da placa (distribuição dos genes e amostras de cada poço, lembrando-se de identificar os controles negativos).

5. Colocar a placa preparada no aparelho.

6. Clicar em “Start Run” para iniciar o procedimento.

CAPÍTULO 6

ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM NÍVEL DE PROTEÍNA

Ângela Maria Schorr-Lenz, Ivan Cunha Bustamante Filho, Jorge Almeida Guimarães, Lucélia Santi,
Markus Berger Oliveira, Pâmela Maria Seibel, Walter Orlando Beys da Silva

6.1 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM CONDIÇÃO DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA – SDS PAGE

Protocolo de SDS-PAGE:

A separação de proteínas pelo método SDS-PAGE consiste na migração de proteínas em uma matriz em gel de poliacrilamida, induzida por diferença de potencial elétrico. Esse processo permite a separação de várias proteínas da amostra por massa molecular, sendo que as menores ficarão retidas na parte inferior do gel e as maiores, na parte superior. Este protocolo baseia-se no sistema Mini Protean Tetra® da Bio-Rad®.

SDS-PAGE – preparo das soluções:

1. Tampão de corrida concentrado 10X (*Running Buffer*) – pH 8,3:

	1 L
Glicina	144 g do produto
SDS	10 g do produto
Tris	30,3 g do produto

Dica: dissolver em 1 L de água destilada. Água ultrapura pode ser utilizada para evitar o crescimento de fungos na solução estoque. Não ajustar o pH com ácidos ou bases, pois altera as características iônicas do tampão. Armazenar a 4°C. Se ocorrer precipitação, aqueça a temperatura ambiente antes do uso.

2. Tampão de corrida 1X (*Running Buffer*) – Solução de uso:

Diluir o *Running Buffer* 10X 1:10 em água destilada. Por exemplo, 50 mL de solução concentrada em 450 mL de água destilada. Guardar na geladeira e utilizar gelado.

Dica: pode ser utilizado pelo menos 3 x.

3. Solução de Acrilamida 40% (39:1):

	100 ml
Acrilamida (39%)	39 g do produto
Bisacrilamida (1%)	1 g do produto

Homogeneizar os reagentes em um béquer com o auxílio de um bastão de vidro e ajustar o volume. Filtrar. A solução deve ser armazenada a 4°C em um frasco âmbar, coberto de papel alumínio e sob refrigeração.

4. Tampão Tris 1,5 M pH 8,8:

	150 ml
Tris	27,23 g do produto
Água ultrapura	80 mL

Ajustar o pH a 8,8 com HCl 6N. Adicionar água ultrapura para obter o volume final de 150 mL. Armazenar a 4°C.

5. Tampão Tris 0,5 M pH 6,8:

	100 ml
Tris	6 g do produto
Água ultrapura	60 mL

Ajustar o pH a 6,8 com HCl 6N. Adicionar água ultrapura para obter o volume final de 100 mL. Armazenar a 4°C.

6. Solução de SDS 1%:

Para 100 mL, pesar 1 g de SDS. Homogeneizar gentilmente em 90 mL de água ultrapura com barra magnética para evitar bolhas em excesso. Ajustar para 100 mL e armazenar a temperatura ambiente.

7. Solução de Persulfato de Amônio (APS) 10%:

Para 100 mL de solução, pesar 10 mg de APS. Em um béquer, dissolver o APS em 80 mL de água ultrapura. Após completa dissolução, ajustar em balão volumétrico para 100 mL. Aliquotar em microtubos de 0,5 a 1 mL e armazenar a -20°C.

Dica: o reagente APS é higroscópico. Mantê-lo em um frasco fechado com sílica para evitar a degradação do mesmo.

SDS-PAGE – preparo do gel de poliacrilamida:

1. Preparar os suportes e placas de vidro para polimerizar o gel;

Dica: os suportes que prendem as placas de vidro devem ser montados primeiro e após, fixados no suporte maior. Encaixar e nivelar as placas de vidro em superfície plana, para evitar o vazamento do gel.

2. Preparar o gel de separação de poliacrilamida em um béquer;

Para cada gel de 0,75 mm, preparar as soluções abaixo:

Solução de gel de separação (*Resolving gel*) 10%

Acrilamida (40%)	1270 µL do produto
Tris 1,5 M	850 µL do produto
SDS 1%	350 µL do produto
Glicerol	280 µL do produto
Água ultrapura	2190 µL do produto

Dica: colocar as soluções na ordem descrita e homogeneizar após cada uma. Para acrescentar o Glicerol, deve-se cortar a ponteira, para facilitar a pipetagem.

3. Acrescentar 35 µL de Persulfato de Amônio 10% e 3 µL de Temed no béquer e homogeneizar;

4. Transferir imediatamente a solução do gel de separação de poliacrilamida entre as duas placas de vidro, até quase 1,5 cm do final da placa menor, aguardar para ver se não há vazamentos e pipetar álcool etílico absoluto até o topo da placa;

Dica: marcar a placa de vidro com uma caneta até o ponto onde a solução do gel de acrilamida foi pipetada. O álcool etílico isola o gel de separação do ar, permitindo uma borda de gel lisa. SDS 0,1% também pode ser usado.

5. Aguardar a polimerização – 30 minutos;

Dica: nos minutos finais, prepara-se a solução do gel de entrada de poliacrilamida (próximo passo).

6. Preparar a solução do gel de entrada de poliacrilamida;

Solução de gel de entrada (Stacking gel) 4,5%

Acrilamida (40%) 300 µL do produto

Tris 0,5 M 690 µL do produto

SDS 1% 270 µL do produto

Água ultrapura 1400 µL do produto

7. Descartar, por inversão e com o auxílio de um papel absorvente, o álcool etílico das placas contendo o gel de separação polimerizado;

Dica: não desmontar os suportes, apenas descartar o álcool por inversão dos mesmos. Retirar o excesso com papel filtro.

8. Acrescentar 2,5 µL de Persulfato de Amônia 10% e 27 µL de Temed no béquer;

9. Transferir a solução do gel de entrada de poliacrilamida em cima do gel de separação polimerizado, até o final da placa;

10. Inserir o pente de plástico, que dará o formato dos poços do gel de entrada;

Dica: proteja seus olhos durante esse procedimento, pois há possibilidade de respingos no momento da inserção do pente.

11. Aguardar a polimerização – 30 minutos;

12. Retirar o pente de plástico e utilizar o gel;

Dica: caso não utilize o gel imediatamente, guarde o mesmo na geladeira, envolto por papel umedecido com água destilada e plástico filme, dentro de um recipiente com tampa. O gel pode ser utilizado em até três dias.

SDS-PAGE – preparo das amostras:

1. Descongelar e manter as amostras no gelo;

2. Para cada amostra a ser pipeta no gel, preparar um microtubo e identificá-lo com o nome ou número da amostra;

3. Preparar o Tampão de amostra (*Stock Sample Buffer*) conforme abaixo:

Tris 0,5 M (pH 6,8) 1,25 mL do produto

SDS 10% (p/v) 2 mL do produto

Glicerol 2,5 mL do produto

Água ultrapura 3,55 mL do produto

Azul de Bromofenol 0,5% (p/v) 0,2 mL

Este tampão pode ser estocado em um tubo de 15 mL a temperatura ambiente. No dia do uso, a quantidade necessária deve ser aliqüotada em microtubo e adicionada de 5% de β-mercaptoetanol, sendo esta a solução de uso.

4. Para preparar a amostra para aplicar no gel, deve-se determinar a quantidade de proteína total a ser carregada no poço. Isto deve ser definido experimentalmente. Para géis corados com *Coomassie Blue*, 20 µg são geralmente suficientes. Para *Western blot*, este valor pode chegar a 80 µg.

Ex. Se uma amostra tem 10 µg/µL, deve ser pipetado:

2 µL de amostra (total de 20 µg)

4 µL de tampão de amostra com β-mercaptoetanol

10 µL de água ultrapura (qsp para 16 µL)

5. Colocar os microtubos em banho com água fervente por 5 minutos para promover a desnaturação das proteínas. Homogeneizar os tubos em vórtex e centrifugar a baixa rotação antes de aplicar no gel.

SDS-PAGE:

1. Preparar a cuba de eletroforese: encaixar as placas de vidro com o gel no suporte com eletrodos e preencher as cisternas interna e externa com o tampão de corrida 1X gelado;

Dica: verificar se as placas estão encaixadas corretamente, pois pode ocasionar a interrupção do processo posteriormente. Encher primeiro a cisterna interna para verificar se ocorre algum vazamento. Se sim, remonte o sistema.

2. Após encaixar a guia de pipetagem amarela, pipetar gentilmente as amostras nos poços, evitando a mistura e derramamento para os poços vizinhos;

Dica: encaixar a pipeta exatamente entre as duas placas de vidro, acima do poço a ser pipetado, inclinando-a suavemente.

3. Pipetar o marcador de massa molecular;

Dica: pode-se aquecer um pouco o marcador antes de pipetá-lo, para torná-lo mais homogêneo.

4. Cobrir com o restante do tampão de corrida os suportes e as placas de vidro, até a marcação da cuba (para 2 ou 4 géis);

5. Encaixar a tampa da cuba, ajustar a voltagem (60-120V) ou amperagem e iniciar a corrida;

Dica: usar uma voltagem menor (60-80V) enquanto as proteínas estiverem no gel de entrada. Quando estas entrarem no gel de separação, pode-se aumentar a voltagem (90-120V). A tampa deve ser encaixada corretamente, levando-se em conta a disposição dos eletrodos e os polos (negativo/positivo). O final da corrida depende do tipo de proteína que se pretende visualizar (alto ou baixo peso molecular). Nos géis de 10%, a frente de corrida (linha azul) deve sair do gel. Em géis de 12 ou 14% o gel deve correr 10 a 20 minutos a mais após a saída da frente de corrida. O uso de marcadores de massa molecular pré-corados auxilia no acompanhamento da corrida.

6. Após o término da corrida, proceder com o *Western Blotting* ou coloração com *Coomassie*;

Referências:

AUSUBEL FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds.) **Current Protocols in Molecular Biology**, John Wiley & Sons, 2003.

LAEMMLI UK, **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage**. *Nature*, 227, 680–685 (1970).

6.2 MÉTODOS DE COLORAÇÃO DE GÉIS SDS-PAGE

Diversos métodos de coloração de gel SDS-PAGE podem ser utilizados. O mais comum é o *Comassie Blue* (coloidal ou não), capaz de detectar, no mínimo, 5 mg de proteína. Para quantidades menores de proteína pode-se utilizar a coloração de prata (10 ng). A coloração do gel é um passo importante, visto que desta forma pode-se visualizar as proteínas separadas pela eletroforese.

1. *Comassie Blue*

1.1 Após a eletroforese, remover cuidadosamente o gel das placas de vidro e colocar em um recipiente com dimensão que comporte a imersão do mesmo.

1.2 Adicionar o corante *Comassie Blue* até cobrir inteiramente o gel.

1.3 Homogeneizar gentilmente de 2 a 16 horas no homogeneizador automático.

1.4 Para descorar, utilizar solução descorante.

Dica: se deseja acelerar o processo, pode-se adicionar água e levar ao micro-ondas algumas vezes, por 2 minutos (trocar a água e entre as fervuras).

Comassie Blue #1

0,1% Comassie Blue R250

50% Metanol*

*abrir em capela de exaustão

Comassie Blue #2

2 g Comassie Blue R250

100 mL Ácido acético

475 mL Etanol

425 mL H₂O destilada

Solução descorante #1

100 mL Ácido acético

450 mL Metanol

450 mL H₂O destilada

Solução descorante #2

80 mL Ácido acético

210 mL Etanol

510 mL H₂O destilada

2. *Comassie coloidal*

2.1 É mais sensível que o *Comassie Blue*.

2.2 Da mesma forma que o anterior, após a eletroforese, remover cuidadosamente o gel das placas e acondicionar em um recipiente específico.

2.3 Adicionar o corante *Comassie Blue* até cobrir inteiramente o gel.

2.4 Homogeneizar gentilmente de 2 a 16 horas no homogeneizador automático com agitação leve.

2.5 Para descolorar, remover a solução e adicionar água destilada.

Comassie coloidal

0,05%	Comassie Blue G*
10%	Sulfato de amônio
20%	Metanol
2%	Ácido fosfórico

*deve ser adicionado por último e não ser agitado – pode-se mexer levemente com um bastão de vidro. Manter protegido da luz a temperatura ambiente.

3. Coloração de prata (Blum et al. 1987)

3.1 É uma coloração muito sensível e o gel deve ser manipulado o mínimo possível.

3.2 Após a eletroforese, remover o gel cuidadosamente e colocar em um recipiente com dimensão que comporte a imersão do mesmo.

3.3 Cobrir o gel com 50 mL metanol / 12 mL ácido acético / 50 µL formaldeído / 38 mL água e deixar por 1 hora a temperatura ambiente.

3.4 Lavar o gel com etanol 50%, 3 x por 20 minutos.

3.5 Adicionar 0,02% de solução de tiosulfato de sódio (0,01 g em 50 mL água) e aguardar 1 minuto.

Dica: separar 1 mL para cada gel a ser corado.

3.6 Lavar com água 3 x por 20 segundos.

3.7 Adicionar 100 mL de solução de coloração fresca e manter por 20 minutos no escuro.

3.8 Lavar com água 2 x por 20 segundos.

3.9 Adicionar solução de revelação até surgirem as bandas.

3.10 Parar a revelação com ácido acético 1% (1 mL em 99 mL água).

Solução de coloração*

0,1 g	Nitrato de prata
38 mL	Formaldeído 37%
50 mL	H ₂ O destilada

*utilizar luvas para manipular a prata.

Solução de revelação

3 g	Carbonato de sódio
25 µL	Formaldeído 37%
1 mL	Tiosulfato de sódio 0,02%
49 mL	H ₂ O destilada

6.3 IMUNOIDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING

A técnica de Western Blotting baseia-se na transferência de proteínas separadas previamente por eletroforese em gel de poliacrilamida, por indução de carga elétrica, para uma matriz não porosa, tipicamente membranas de nitrocelulose ou PVDF (polyvinylidene difluoride). Nesta matriz, as proteínas são marcadas por anticorpos contra a proteína de interesse, podendo ser quantificada por quimiluminescência ou reação cromogênica. O presente protocolo está otimizado para uso do TransBlot Turbo® da Bio-Rad®.

Western Blotting – preparo de soluções:

Antes de iniciar o experimento, preparar as seguintes soluções:

1. Solução de Tampão de transferência (*Towbin*), pH 8,3

	1 L
Tris 0,025 M	3,0285 g do produto
Glicina 0,192 M	14,4134 g do produto
20% de Metanol	200 mL do produto

Em um béquer, homogeneizar o Tris e a Glicina com agitador magnético em 700 mL de água destilada. Ajustar o pH e avolumar com água destilada para 800 mL. Após, adicionar 200 mL de Metanol. Armazenar em frasco âmbar, sob refrigeração.

2. Solução de PBS concentrado 10X – pH 7,4

	1 L
NaCl	80 g do produto
KCl	2 g do produto
Na ₂ HPO ₄	14,4 g do produto
KH ₂ PO ₄	2,4 g do produto
Água ultrapura	800 mL do produto

Em um béquer, homogeneizar todos os reagentes com agitador magnético. Ajustar o pH e avolumar com água ultrapura.

3. Solução de PBS 1X– pH 7,4

Para preparar 1 L, adicionar em proveta graduada 100 mL de PBS 10X, e 900 mL de água ultrapura. Para prevenir uma possível contaminação, transferir a solução da proveta para um frasco autoclavado.

4. Solução de T-PBS (PBS + *Tween* 20 0,05%)

Em 250 mL de PBS, adicionar 125 µL de *Tween*. Homogeneizar gentilmente (para evitar a formação de espuma). Armazenar à 4°C.

5. Solução de M-T-PBS (PBS + *Tween* 20 0,05% acrescido de 5% de leite em pó desnatado).

Em 20 mL de T-PBS, adicionar 1 g de leite em pó desnatado. Homogeneizar com barra magnética. Utilizar para bloqueio a membrana de nitrocelulose/PVDF ou para diluir anticorpos.

Dica: pode ser armazenado congelado para posterior utilização. Atenção: alguns anticorpos não podem ser diluídos em M-T-PBS, assim, recomenda-se a substituição do leite em pó desnatado na solução de bloqueio por albumina sérica bovina (BSA), em concentrações de 0,1 a 1%.

Western Blotting:

1. Preparar um recipiente e adicionar o *Towbin* a uma quantidade suficiente para cobrir toda a membrana.

Dica: o recipiente deve ter tampa e dimensões ideais para abrigar a membrana.

2. Após o término da eletroforese SDS-PAGE, retirar o gel reserva-lo no recipiente com *Towbin* por 10 minutos.

Dica: o gel pode ser cortado na região de interesse, isto resulta em menos área de membrana a ser utilizada e, conseqüentemente, economia de membrana e anticorpos. O gel deve ser cortado em cima da placa de vidro que o abriga, e observando-se a marcação do marcador de peso molecular. O enxágue pode durar até dez minutos, tempo suficiente para preparar o cassete do equipamento de Western Blotting.

3. Colocar o papel filtro no cassete do equipamento de *Western Blotting*, e umedecer generosamente com *Towbin*;

4. Cortar a membrana de nitrocelulose no tamanho exato do gel e colocá-la no centro do cassete, com o lado mais brilhante para cima;

5. Colocar o gel exatamente em cima da membrana de nitrocelulose;

Dica: cuidar para não ficar nenhuma bolha entre a membrana de nitrocelulose e o gel, pois pode atrapalhar na transferência das proteínas.

6. Colocar gentilmente outro papel filtro umedecido generosamente com *Towbin* por cima do gel no cassete do equipamento.

7. Remover o excesso de bolhas passando o rolo plástico por cima do papel filtro;

8. Fechar o cassete e encaixá-lo no equipamento TransBlot Turbo;

9. Iniciar a transferência de proteínas, selecionando a amperagem/voltagem e o tempo.

O equipamento possui diversos programas que podem ser padronizados para cada tipo de amostra ou massa molecular da proteína de interesse. Para o protocolo padrão de um minigel no cassete A, acesse os seguintes comandos:

List > Bio-Rad > 1 mini gel > StandardSD > Run > A:Run

10. Encerrada a transferência, retirar o cassete do equipamento e abri-lo com cuidado. Descartar tudo, menos a membrana de nitrocelulose;

Dica: use marcador pré-corado para confirmar se a transferência ocorreu corretamente. Alternativamente, pode-se corar a membrana de nitrocelulose com uma solução de Ponceau S 0,1%.

100 mL de Ponceau 0,1%

Ponceau S	0,1 g do produto
Ácido Acético	5 mL do produto
Na ₂ HPO ₄	14,4 g do produto
KH ₂ PO ₄	2,4 g do produto
Água ultrapura	80 mL do produto

Ajustar para 100 mL com água ultrapura. Armazenar à 4°C, não congelar. A solução pode ser reutilizada para corar membranas até 10 vezes.

11. Proceder com o bloqueio da membrana: colocar a membrana de nitrocelulose em um recipiente com MTPBS, tendo o cuidado de cobrir ela totalmente. Incubar em agitador orbital por 1h a 4°C.

Dica: cortar um das pontas da membrana para identificar a posição do marcador e o sentido da pipetagem.

12. Descartar o MTPBS;

13. Incubar a membrana com o anticorpo primário (6 a 16 horas), homogeneizando sob refrigeração;

Dica: certificar-se de que a membrana está totalmente submersa, para ocorrer a ligação dos anticorpos às proteínas.

14. Após a incubação, retirar o anticorpo primário e guardá-lo no respectivo tubo e congelá-lo. Anotar o número de utilizações.

15. Cobrir a membrana com TPBS. Agitar por 5 minutos e descartar. Repetir essa lavagem 5 vezes;

16. Descartar o TPBS da última lavagem e incubar a membrana com o anticorpo secundário. Agitar sob refrigeração por 2 horas;

17. Ao final da incubação, retirar o anticorpo secundário e guardá-lo no respectivo tubo e congelá-lo. Anotar o número de utilizações.

18. Cobrir a membrana com TPBS. Homogeneizar por 5 minutos e descartar. Repetir essa lavagem 5 vezes;

19. Preparar o *e-cran*, colocando a membrana entre o plástico dobrado;

Dica: fazer uma marcação no plástico das dimensões da membrana para facilitar a visualização na sala de escura. Esta marcação é importante também para a identificação dos marcadores de massa molecular.

20. Preparar o reativo ECL: para uma membrana inteira, recomenda-se o uso de 200 uL de reagente ECL. Para prepará-lo, homogeneizar em vortex proporções iguais dos dois reagentes em um microtubo, ou seja, 100 uL de cada.

Dica: a preparação do reativo deve ser feita ao abrigo de luz e o mesmo deve ser pipetado imediatamente sobre a membrana. Este procedimento está adaptado para o *Western Lightnin Plus-ECL* da *PerkinElmer*. Caso outros reagentes forem utilizados, o protocolo deve ser adaptado de acordo com as recomendações do fabricante.

21. Pipetar o reativo ECL em cima da membrana de nitrocelulose, distribuindo uniformemente;

22. Fechar o *e-cran*, aguardar 5 minutos e iniciar a revelação na sala escura;

23. Cortar um pedaço do filme radiográfico e posicioná-lo em cima da membrana. Fechar o *e-cran* e aguardar alguns minutos.

Dica: o tempo de exposição da revelação dependerá da intensidade da luminosidade produzida na membrana. Deve ser padronizado para cada filme.

24. Retirar o pedaço de filme e mergulhar na solução de revelação, até aparecerem as bandas. Após, mergulhar na solução de ácido acético 10% e, por fim, na solução fixadora.

Dica: os tempos de exposição do filme à membrana e de imersão na solução reveladora devem ser ajustados conforme o resultado das primeiras revelações.

25. Após imersão na solução fixadora por, no mínimo, 3 minutos, lavar com água corrente e aguardar a secagem;

26. Finalizada a exposição, os filmes são escaneados a 300 pdi em formato TIFF para quantificação das bandas;

Referências:

AUSUBEL FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds.) **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons, 2003.

BIO-RAD. **Trans-Blot Turbo Blotting System Instruction manual**. Bio-Rad Laboratories, 2010.

CAPÍTULO 7

PRODUÇÃO E ANÁLISE DE BIOPRODUTOS

Ângela Gerhardt, Angélica Vincenzi, Bárbara Parraga da Silva, Cláucia Fernanda Volken de Souza, Christina Venzke Simões de Lima, Eduardo Miranda Ethur, Greici Raquel Wildner, Lucélia Hoehne, Mariano Rodrigues, Mônica Jachetti Maciel

A análise de alimentos desempenha importante papel avaliador da qualidade e segurança dos alimentos. Devido à complexidade da sua constituição orgânica, os alimentos muitas vezes são considerados matrizes difíceis de serem manipuladas; o analista deverá estar devidamente treinado, e somente a experiência ao longo dos anos poderá fornecer segurança analítica (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

Na literatura científica encontram-se inúmeros métodos para detectar e quantificar níveis de contaminantes químicos e avaliar a autenticidade de alimentos. Há necessidade da disposição de métodos alternativos de análises, quando possível, que estejam ao alcance da maioria dos laboratórios. Nem sempre o método que faz uso do equipamento sofisticado e dispendioso é o mais adequado; às vezes, dependendo do analito e da sua concentração em um dado alimento, a utilização de metodologia tradicional e de baixo custo torna-se, também, muito eficiente. (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

Referências:

Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005. 1018 p. (Série A – Normas e Manuais Técnicos).

7.1 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

Os microrganismos empregados periodicamente em experimentos de cultivo devem ser mantidos em meio de cultura sólido específico em temperatura de aproximadamente 4 °C. Periodicamente, devem ser realizados repiques para a manutenção das cepas.

Uma cultura estoque em 20% de glicerol deve ser armazenada em freezer.

7.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Esta etapa consiste na ativação e quantificação de células microbianas empregadas em experimentos de cultivo de microrganismos e produção de bioprodutos.

1. Preparar o meio de cultura para a ativação microbiana e os materiais estéreis necessários;
2. Inocular uma colônia isolada da placa de petry em meio de cultura líquido;
3. Colocar o caldo de cultura inoculado em incubadora com agitação orbital (shaker), overnight, em temperatura adequada para crescimento do microrganismo, normalmente entre 30 - 37 °C;

Dica: nessa fase, ocorre a ativação e o crescimento das células microbianas.

4. Após, padronizar o número de células do inóculo por meio da leitura da densidade ótica (DO) no espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm até $DO_{600} = 1,0$. Caso o inóculo fique mais concentrado é necessário adicionar caldo nutriente específico;

Dica: o valor da absorbância deve ficar sempre o mais próximo de 1.

5. Transferir de 5 a 10% (v/v) de inóculo padronizado com $DO_{600} = 1,0$ para o frasco contendo o meio de cultura no qual será conduzido o processo de cultivo do microrganismo e produção do bioproduto;

6. Iniciar o cultivo em condições adequadas de temperatura e agitação e periodicamente retirar alíquotas para análises diversas.

7.3 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA

Este teste tem o propósito de quantificar a massa de microrganismos ao longo dos processos de cultivo.

Método do peso seco

1. Acondicionar em estufa (60 °C) pelo período de 24 horas os tubos Falcon previamente identificados e desprovidos de tampa;

Dica: essa etapa consiste em eliminar qualquer interferente que possa influenciar na quantificação da biomassa.

2. Antes de pesar, deixar os tubos Falcon em dessecador até atingirem a temperatura ambiente;

Dica: manusear os tubos Falcon com luvas, pois a gordura da mão pode influenciar o peso dos tubos.

3. Pesar os tubos Falcon e anotar as respectivas pesagens conforme identificação prévia;

4. Colocar 10 mL do meio de cultivo em um tubo Falcon e centrifugar a 3.500 rpm por 15 minutos à 4 °C;
5. Retirar o sobrenadante e analisar conforme as metodologias abaixo descritas;
6. Adicionar 10 mL de água destilada gelada ao tubo Falcon, homogeneizar as amostras com o auxílio do vórtex e centrifugar a 3.500 rpm por 15 minutos a 4 °C;
Dica: as lavagens da biomassa são realizadas com o intuito de eliminar qualquer interferente.
7. Eliminar o sobrenadante;
8. Repetir os itens 6 e 7 por mais duas vezes;
9. Colocar o tubo Falcon com a biomassa em estufa (60 °C) até atingir o peso constante;
Dica: o peso constante deve ser atingido após a permanência do tubo em 24 horas na estufa.
10. Ao finalizar o tempo de permanência na estufa, colocar o tubo Falcon com a biomassa em dessecador até atingir a temperatura ambiente;
11. Realizar a pesagem do tubo Falcon com a biomassa e anotar conforme prévia identificação;
12. Fazer o cálculo: (peso final do tubo Falcon com a biomassa) – (peso inicial do tubo Falcon vazio). O resultado será a quantidade de biomassa formada para uma alíquota de 10 mL durante o cultivo do microrganismo.

7.4 DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TITULÁVEL

Esse método é empregado na determinação da acidez titulável de amostras de alimentos obtidos por meio de processos de cultivo de microrganismos, ou seja, de alimentos fermentados. Consiste na titulação de uma quantidade conhecida de amostra com uma solução alcalina, normalmente de NaOH, de concentração exata e conhecida (ou seja, padronizada), utilizando como indicador a fenolftaleína.

Método de BRASIL (1981):

Equipamentos:

Balança analítica.

Vidrarias, utensílios e outros:

Bastão de vidro;

Erlenmeyer de 125 mL;

Bureta de 25 mL.

Reagentes:

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N;

Solução alcoólica de fenolftaleína (C₂₀H₁₄O₄) a 1 % (m/v).

1. Preparação conforme tipo de amostra:

1.1. **Leite fermentado:** Pesar 10 g da amostra, adicionar 10 mL de água isenta de gás carbônico e homogeneizar.

1.2. **Queijo:** Pesar 10 g da amostra, acrescentar cerca de 50 mL de água morna isenta de gás carbônico (40 °C) e agitar com bastão de vidro até dissolução possível. Transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL, esfriar em água corrente e completar o volume. Transferir uma alíquota de 50 mL para um erlenmeyer.

1.3. **Manteiga:** Fundir uma determinada quantidade da amostra em estufa a 40 - 50 °C em béquer. Deixar que ocorra a separação de fase e filtrar a fase lipídica em papel de filtro, recebendo em outro béquer. Pesar uma alíquota de 5 g da gordura filtrada, em béquer de 250 mL, acrescentar cerca de 40 mL de solução álcool etílico e éter etílico (1+2) neutralizada.

Dica: água isenta de gás carbônico: água fervida e resfriada ou água recém-destilada.

2. Adicionar às amostras previamente preparadas, conforme 1.1 e 1.2, 10 gotas do indicador - solução alcoólica de fenolftaleína (C₂₀H₁₄O₄) a 1 % (m/v) – e 4 a 5 gotas do indicador para amostras preparadas conforme 1.3.

3. Titular com a solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N até aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos.

4. Cálculos:

$$\% \text{ em ácido láctico} = (V \times f \times 0,9) / m$$

Onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 N (normalidade real dividida por 0,1)

0,9 = fator de conversão do ácido láctico;

m = massa da amostra na alíquota, em gramas ou em mL.

Cálculo para manteiga:

$$\text{Solução alcalina normal (SAN) \%} = V \times f \times 100 / m$$

Onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 N;

m = massa da gordura, em gramas.

Dica: algumas das amostras não apresentam coloração rósea nítida no fim da titulação, devido as suas características próprias de cor opaca ou escura, por isso é aconselhável trabalhar em ambiente claro e colocar um papel branco embaixo da bureta durante a titulação, dessa forma facilitando a visualização da viragem.

Referências:

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos.** Brasília, DF, 1981. v. II, cap. 18, p. 2. cap.15, p. 4-5. cap. 21, p., p. 4-5. cap. 17, p. 5.

MERCK. **Reactivos, diagnóstica, productos químicos** 1992/93. Darmstadt, 1993. 1584 p.

RICHARDSON, G.H. Dairy products. In: HELRICH, K. (Ed.) **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists: food composition: additives: natural contaminants.** 15th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1990. v. 2, cap. 33, p. 805.

WOOLLEN, H.(Ed). **Food Industries Manual**, 20 th ed. New Iork1: Chemical Publishing, 1970.

7.5 DETERMINAÇÃO DO pH

Esse método é empregado na determinação do pH de amostras de alimentos obtidos por meio de processos de cultivo de microrganismos, ou seja, de alimentos fermentados. Fundamenta-se na medida da concentração de íons hidrogênio na amostra.

Método de BRASIL (1981):

1. Preparação conforme tipo de amostra:

1.1. Produtos líquidos: medir o pH colocando cerca de 50 mL de amostra em um béquer;

1.2. Queijos: adicionar cerca de 20 mL de água em um béquer de 50 mL. Acrescentar quantidade suficiente de amostra previamente preparada, misturando com bastão de vidro de modo a obter uma pasta homogênea;

1.3. Produtos em pó: reconstituir a amostra pesando uma quantidade conhecida de aproximadamente 10 g e diluir com 100 mL de água.

2. Realizar a leitura do pH em aparelho pHmetro calibrado.

Referência:

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos. Brasília, DF, 1981. v. II, cap. 17, p. 5 -6.

7.6 DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA MINERAL (CINZAS)

Esse método é empregado na determinação da matéria mineral de amostras de alimentos obtidos por meio de processos de cultivo de microrganismos, ou seja, de alimentos fermentados. Fundamenta-se na eliminação da matéria orgânica a temperatura de 550 °C. O produto obtido é denominado de resíduo mineral fixo.

Método de BRASIL (1981):

Equipamentos:

Balança analítica;

Mufla;

Chapa aquecedora ou estufa.

Vidrarias, utensílios e outros:

Cadinhos de porcelana;

Dessecador;

Tenaz metálico.

Procedimento:

1. Numerar os cadinhos com lápis de escrever;

Dica: utilizar, preferencialmente, lápis 6B.

2. Calcinar cadinhos para eliminação de possíveis interferentes, colocando-os na mufla à 550 °C por 1 hora;

3. Aguardar os cadinhos atingirem temperatura inferior à 300 °C;

Dica: deixar a mufla levemente aberta agiliza o processo.

4. Transferir os cadinhos para o dessecador até atingirem temperatura ambiente;

5. Pesar os cadinhos em balança analítica e anotar as massas (peso inicial);

6. Pesar 5 g de amostra;

7. Colocar os cadinhos com a amostra previamente pesada em estufa à 105° C ou chapa aquecedora até que a amostra evapore (amostra líquida) e queime (demais amostras);

Dica: cuidar para que a amostra não respingue e não ferva.

8. Calcinar as amostras na mufla à 550 °C por 3 horas ou pelo tempo necessário para estarem com coloração branco/acinzentada;

Dica: se a amostra ao sair da mufla apresentar coloração enegrecida colocar 2 a 3 gotas de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% e retornar a mufla por tempo necessário para ficarem branco/acinzentada.

9. Aguardar os cadinhos atingirem temperatura inferior à 300 °C;

Dica: deixar a mufla levemente aberta.

10. Transferir os cadinhos para o dessecador até atingirem temperatura ambiente;

11. Pesar os cadinhos em balança analítica e anotar as massas (peso final).

Dica: cuidar ao abrir o dessecador, soltar o ar levemente para as cinzas não voarem.

12. Cálculo:

Matéria Mineral (%) = (Peso final – Peso inicial) / massa da amostra x 100

Onde:

Peso inicial: Peso do cadinho vazio (g)

Peso final: Peso do cadinho com amostra após ser retirado da mufla (g)

Referências:

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos**. Brasília, DF, 1981. v. II, cap. 2, p. 3.

MERCK. **Reactivos, diagnóstica, productos químicos** 1992/93. Darmstadt, 1993. 1584 p.

7.7 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE, VOLÁTEIS E SÓLIDOS TOTAIS

Esse método é empregado na determinação da umidade de amostras de alimentos obtidos por meio de processos de cultivo de microrganismos, ou seja, de alimentos fermentados. A umidade é determinada pela perda de massa, em condições em que água e substâncias voláteis são removidas. O resíduo obtido após evaporação representa os sólidos totais da amostra.

Método de BRASIL (1981):

Equipamentos:

Balança analítica;

Estufa.

Vidraria, utensílios e outros:

Dessecador;

Espátula;

Pérolas de vidro com 3 mm de diâmetro;

Cápsula de alumínio, aço inox, porcelana ou níquel;

Tenaz metálico.

Procedimento:

1. Colocar a cápsula, em estufa à 102 ± 2 °C, durante uma hora;

2. Esfriar em dessecador e pesar (massa da cápsula vazia);

3. Pesar a amostra preparada e homogeneizada e levar à estufa 102 ± 2 °C, por três horas;

4. Esfriar em dessecador e pesar;

5. Repetir as duas últimas etapas anteriores até massa constante;

Dica: diferença de 0,0005 g para cada 1 g de amostra pesada. Ou seja, se pesar 5 g de amostra, para dizer que a massa está constante a diferença entre uma pesagem e outra deve ser no máximo de 0,0025 g. As operações de pesagem devem ser feitas o mais rápido possível e a secagem deve ser conduzida sem que haja escurecimento da amostra.

Pesagem conforme tipo de amostra:

Leite em pó e soro de leite em pó:

Massa da amostra: 5 g;

Temperatura da estufa: 85 ± 2 °C;

Tempo até a primeira pesagem: 2 horas;

Tempo, na estufa, entre pesagens até massa constante: 30 minutos.

Doce de leite e leite condensado:

Massa da amostra 3 g;

Temperatura da estufa: 85 ± 2 °C;

Tempo até a primeira pesagem: 6 horas;

Tempo, na estufa, entre pesagens até massa constante: 1 hora.

Creme de leite:

Massa da amostra: 5 g em cápsula com pérolas de vidro;

Temperatura da estufa: 102 ± 2 °C;

Tempo até a primeira pesagem: 2 horas;

Tempo, na estufa, entre pesagens até massa constante: 30 minutos.

Queijo:

Massa da amostra: 5 g;

Temperatura da estufa: 102 + 2 °C;

Tempo até a primeira pesagem: 3 horas;

Tempo, na estufa, entre pesagens até massa constante: 1 hora.

Manteiga e Margarina:

Massa da amostra: 5 g;

Temperatura da estufa: 102 + 2 °C;

Tempo até a primeira pesagem: 3 horas;

Tempo, na estufa, entre pesagens até massa constante: 30 minutos.

Leite fermentado:

Massa da amostra: 5 g em cápsula contendo pérolas de vidro;

Temperatura da estufa 102 + 2 °C;

Tempo até a primeira pesagem: 4 horas;

Tempo, na estufa, entre pesagens até massa constante: 1 hora.

6. Cálculos:

% umidade e voláteis = (massa da cápsula vazia + massa da amostra) – (peso constante final) x 100 / massa da amostra

% sólidos totais = 100 - % umidade e voláteis

Referências:

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos**. Brasília, DF, 1981. v. II, cap. 15, p. 1.

7.8 DETERMINAÇÃO DE LIPÍDIOS

Esse método é empregado na determinação do teor de lipídios em amostras de alimentos obtidos por meio de processos de cultivo de microrganismos, ou seja, de alimentos fermentados.

Consiste no tratamento da amostra com ácido sulfúrico e álcool isoamílico. O ácido digere as proteínas que se encontram ligadas à gordura, diminuindo a viscosidade do meio, aumentando a densidade da fase aquosa e fundindo a gordura, devido à liberação do calor proveniente da reação, o que favorece a separação da gordura pelo extrator (álcool isoamílico). A leitura é feita na escala graduada do butirômetro, após centrifugação e imersão em banho-maria.

Método de BRASIL (1981):

Equipamentos:

Banho-maria;

Centrífuga de Gerber.

Vidraria, utensílios e outros:

Butirômetro de Gerber para leite com rolhas;

Pipetadores automáticos de 1 e 10 mL;

Reagentes:

Ácido sulfúrico: Para esta análise o ácido sulfúrico precisa ter **densidade de 1,820 a 1,825**. Colocar 125 mL de água deionizada em um béquer de vidro. Adicionar 925 mL de ácido sulfúrico p.a. lenta e cuidadosamente, em banho de gelo.

Álcool isoamílico (C₅H₁₂O) – Utilizar o p.a. com densidade de 0,81 a 20 °C.

Procedimento:

1. Adicionar a um butirômetro, 10 mL da solução de ácido sulfúrico;
2. Transferir 11 mL de amostra homogeneizada, para o butirômetro lentamente e pela parede deste, para evitar sua mistura com o ácido;
3. Acrescentar 1 mL de álcool isoamílico;
4. Limpar as bordas do butirômetro com papel de filtro e fechar com rolha apropriada;
5. Envolver o butirômetro em um pano, colocando o bulbo maior na palma da mão, de forma tal que o dedo polegar exerça pressão sobre a tampa, impedindo sua projeção;
6. Agitar o butirômetro, de modo a promover a mistura completa dos líquidos no interior do aparelho, tomando precauções para evitar acidentes e mantendo o polegar sobre a tampa;
7. Centrifugar durante 5 minutos de 1.000 a 1.200 rpm com a rolha para baixo;
8. Transferir para banho-maria a 65 °C por 5 minutos com a rolha para baixo;
9. Repetir as operações de centrifugação e de incubação.
10. Ler a porcentagem de gordura diretamente na escala do aparelho e na base do menisco formado pela camada de gordura, imediatamente após retirar o aparelho do banho-maria. Se a coluna não estiver bem delineada, misturar novamente o conteúdo do aparelho e repetir os procedimentos de centrifugação e aquecimento.

Referências:

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos**. Brasília, DF, 1981. v. II, cap. 14, p. 4-5.

MERCK. **Reactivos, diagnóstica, productos químicos** 1992/93. Darmstadt, 1993. 1584 p.

7.9 DETERMINAÇÃO DO NITROGÊNIO TOTAL

Esse método é empregado na determinação do teor de proteínas de amostras de alimentos obtidos por meio de processos de cultivo de microrganismos, ou seja, de alimentos fermentados. O procedimento do método baseia-se no aquecimento da amostra com ácido sulfúrico para a digestão, até que o carbono e o hidrogênio sejam oxidados. O nitrogênio da proteína é reduzido e transformado em sulfato de amônia. Adiciona-se hidróxido de sódio concentrado e aquece-se para a liberação da amônia dentro de um volume conhecido de uma solução de ácido bórico, formando borato de amônia. O borato de amônia formado é dosado com uma solução ácida padronizada.

Método de BRASIL (1981):

Equipamentos:

Balança analítica;

Bloco digestor;

Destilador de nitrogênio.

Vidrarias, utensílios e outros:

Espátula;

Proveta de 50 mL;

Erlenmeyer de 250 mL;

Bureta;

Pinça de Castaloy.

Reagentes:

Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) p.a.

Mistura catalítica:

a) Sulfato de potássio (K_2SO_4) p.a.;

b) Sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) p.a.;

c) Misturar (a) e (b) na proporção de (10+1), triturando até obter um pó fino.

Indicador Misto: Pesar 0,132 g de vermelho de metila ($C_{15}H_{15}N_3O_2$) e 0,06 g de verde de bromocresol ($C_{21}H_{14}Br_4O_5S$).

Dissolver em 200 mL de solução de álcool etílico a 70 % (v/v).

Filtrar, se necessário, e guardar em frasco âmbar.

Ácido bórico (H_3BO_3) a 4 % (m/v): Pesar 4 g de ácido bórico p.a., transferir para um béquer de 250 mL, adicionar 80 mL de água, e aquecer sob agitação branda até dissolução. Resfriar, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar com água.

Ácido sulfúrico 0,1 N:

Na capela, adicionar 3 mL do ácido sulfúrico p.a. em um balão volumétrico de 1 L contendo 500 mL de água. Avolumar e inverter. Padronizar.

Ácido clorídrico 0,1 M:

Na capela, adicionar 8,3 mL do ácido clorídrico p.a. em um balão volumétrico de 1 L contendo 500 mL de água. Avolumar, inverter. Padronizar.

Hidróxido de sódio NaOH 40% (m/v): Pesar 40 g de NaOH p.a.

Aos poucos ir adicionando as 40 g de NaOH em 100 mL de água, em banho de gelo. Agitar até dissolver. Avolumar para 100 mL.

Procedimento:

Parte 1: Preparo inicial

1. Pesagem de amostra: Pesar 5 g para leite fluído e bebida láctea; 3 g para creme de leite; 0,5 g para leite desidratado, soro desidratado, queijo e doce de leite. Para produtos muito gordurosos, digerir a amostra com adição de um antiespumante. Preparar junto com as amostras uma prova em branco;

Dica: quando a balança analítica não suportar o peso do tubo de proteína e não for possível pesar diretamente no tubo, pode-se pesar em papel filtro e algodão. Após, transferir o mesmo para o tubo cuidando para não haver perda de amostra.

2. Colocar 2,5 g de mistura catalítica;

3. Em capela de exaustão, colocar 15 mL de ácido sulfúrico P.A. lentamente.

Dica: a quantidade de ácido sulfúrico adicionada pode variar entre uma amostra e outra devido às características do produto. Algumas dicas importantes: 1 g de gordura consome 18 g de ácido; 1 g de proteína consome 9 g de ácido; 1 g de carboidrato consome 7 g de ácido; 1 g de sacarose consome 7 g de ácido.

Parte 2: Digerir amostra no bloco digestor

4. Fechar a abertura do tubo com papel alumínio, deixando uma pequena abertura acima de cada tubo para saída do vapor;

5. Colocar as amostras no bloco digestor e deixar até que não reste nada da coloração escura, ficará de outra cor, verde ou um tom azulado quando estiver pronto. A temperatura deverá ser elevada gradativamente até 400 °C conforme sugestão abaixo ou de acordo com as instruções do equipamento.

Curva de aquecimento no bloco digestor:

- 100 °C por 20 min

- 200 °C por 30 min

- 250 °C por 30 min

- 300 °C por 30 min

- 400 °C até que digerir a amostra.

O processo demora em média 2h50min.

Dica: se a amostra não digerir corretamente, ou seja, restar algum resquício de coloração escura, adicionar um pouco mais de ácido sulfúrico p.a. e retorná-las ao bloco digestor com escala direta.

6. Quando as amostras estiverem digeridas, retirá-las e deixar esfriar. Adicionar aproximadamente 10 mL de água deionizada.

Parte 3: Destilar amostra

7. Adaptar o tubo de Kjeldahl ao destilador e adicionar a solução de hidróxido de sódio a 40 % até que a mesma se torne negra (cerca de 20 mL);

8. Proceder a destilação coletando cerca de 100 mL do destilado. A solução receptora deve ser mantida fria durante a destilação.

Preparação da solução receptora para recolher o destilado: Pingar 5 gotas de indicador misto. Adicionar 50 mL de água deionizada/destilada + 20 mL de ácido bórico 4%.

Dica: ao pingar as gotas de indicador misto, observar. Se essas ficarem verdes, é porque o erlenmeyer está contaminado.

Parte 4: Titulação

9. Titular com solução de ácido sulfúrico 0,1 N ou solução de ácido clorídrico 0,1 M até a viragem do indicador.

Cálculo:

$$\text{Proteína Bruta \%} = (V_a - V_b) \times M \times 6,38 \times 0,014 \times 100 / m$$

Onde:

V_a = Volume de HCl 0,1 M ou H_2SO_4 0,1 N gasto na titulação

V_b = Volume de HCl 0,1 M ou H_2SO_4 0,1 N gasto na prova em branco

N = Normalidade real do ácido utilizado para a titulação

6,38 = Fator de transformação do nitrogênio em proteína, específico para derivados lácteos

0,014 = Miliequivalente grama do nitrogênio

m = massa da amostra em gramas

Referência:

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos**. Brasília, DF, 1981. v. II, cap. 2, p. 3-6.

7.10 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL

Diversos estudos determinaram a quantidade de proteínas solúveis pelo método de Lowry, que é um método colorimétrico para a dosagem de concentração de proteínas. Este método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas na presença de Cu (II), reduzindo o composto com absorção máxima em 750 nm .

Esta técnica é muito utilizada para determinar proteínas em alimento e no tecido animal; porém, apesar de ser bastante sensível, pode estar sujeita à ação de diversos interferentes. Estes interferentes podem aumentar o valor de absorvância do branco ou a formação de algum tipo de precipitado. O uso de tricloroacético, para provocar a precipitação das proteínas, elimina a maior parte de interferentes deste método.

Método LOWRY (1951):

Equipamentos:

Balança analítica

Espectrofotômetro

Vidrarias, utensílios e outros:

Bequer 50 e 100 mL

Tubos de ensaio

Bastão de vidro

Proveta de 100 mL

Espátula

Pipeta

Reagentes:

Sulfato de Cobre Pentahidratado

Citrato de Sódio

Carbonato de Sódio

Hidróxido de Sódio

Folin Ciocaltens 2N

Albumina Bovina

Procedimento:

a) Fazer os reagentes A, B, C e D

Reagente A: Dissolver 0,5 g de sulfato de cobre pentahidratado e 1 g de citrato de sódio em 100 mL de água destilada.

Reagente B: Dissolver 1 g de carbonato de sódio e 0,2 g de hidróxido de sódio em 50 mL de água destilada.

Reagente C: juntar uma parte do reagente A + 50 partes do reagente B. Preparar no momento da análise.

Reagente D: Partes iguais de reagente de Folin Ciocaltens 2 N e água (proporção 1:1). Pode ser estocada já sob a forma diluída.

b) Para fazer o padrão de Albumina Bovina (BSA: Bovine Serum Albumine):

Fazer uma solução de 5 mg/mL, pesando 0,5 g de albumina bovina em 100 mL de água destilada.

c) Primeiramente, faz-se a curva para a albumina. O preparo pode ser em tubos de ensaio ou em frascos plásticos.

Ponto da curva	Concentração	Volume da solução	Volume de água
	Proteína (mg/mL)	de BSA (0,5 mg/mL) em μL	destilada μL
Tubo A	0	0	2000
Tubo B	0,1	40	1960
Tubo C	0,2	80	1920
Tubo D	0,3	120	1880
Tubo E	0,4	160	1840
Tubo F	0,5	200	1800

d) Retirar 500 μL de cada tubo da curva anterior e transferir para novos tubos de ensaio (ou outros frascos de plástico). Fazer em triplicatas, ou seja:

Para a construção da curva para a leitura no espectrofotômetro:

Tubo 1: 500 μL do tubo A da tabela anterior + 2,5 mL de reagente C

Tubo 2: 500 μL do tubo B da tabela anterior + 2,5 mL de reagente C

Tubo 3: 500 μL do tubo C da tabela anterior + 2,5 mL de reagente C

Tubo 4: 500 μL do tubo D da tabela anterior + 2,5 mL de reagente C

Tubo 5: 500 μL do tubo E da tabela anterior + 2,5 mL de reagente C

Tubos 6 , 7 e 8: 500 μL da amostra + 2,5 mL de reagente C

Deixar todos os tubos a temperatura ambiente por 10 min.

e) Adicionar em todos os tubos 250 μL do reagente D (Reagente de folin-Ciocaltens e água 1:1) e aguardar por 30 min.

f) Ler no espectrofotômetro a 750 nm.

g) Construir a curva e fazer o gráfico concentração (mg/mL) x absorvância. Verificar a equação da reta.

Observação: a amostra deve ser diluída de forma que sua concentração fique dentro da amplitude da curva de calibração.

Referências:

LOWRY, O. H et al. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** Journal Biol. Chem., p. 265-275, 1951.

7.11 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS E NUTRICIONAIS DE PROTEÍNAS

As propriedades funcionais são definidas como as propriedades físico-químicas que afetam o comportamento do alimento ou de um dos seus componentes, influenciando nas propriedades sensoriais. As proteínas nos alimentos podem ser influenciadas pela composição e sequência de aminoácidos, estruturas em que se encontram, bem como a polaridade. As principais propriedades funcionais das proteínas em alimentos são: emulsificação, retenção ao óleo e capacidade emulsificante.

As propriedades funcionais das proteínas dependem das suas propriedades físico-químicas, expressando o comportamento das proteínas em um sistema alimentício. Já as propriedades funcionais de um determinado alimento depende tanto das proteínas, como dos outros componentes da sua composição. As propriedades funcionais podem ser avaliadas quanto a sua afinidade pela água, pela sua capacidade das moléculas se unirem e formarem uma película, da habilidade em formar ligações cruzadas e também as que se manifestam pelos sentidos.

7.11.1 Capacidade emulsificante (CE)

A emulsão consiste em um líquido imiscível, sendo assim uma mistura heterogênea, na forma de gotículas com diâmetro superior a 0,1 micron. Para se fazer uma emulsão é necessário: água, óleo, emulsificante e energia mecânica. Quando as gotículas de óleo estão imersas na fase aquosa a emulsão é classificada como óleo/água; já quando as gotículas de água estão dispersas na fase oleosa a mesma é classificada como emulsão água/óleo .

Qualquer substância capaz de formar uma mistura homogênea, anteriormente imiscível é chamada de agente emulsificante. Devem ser entendidos como moléculas que se aderem às superfícies das gotículas, formando uma membrana protetora que evita a agregação. As proteínas podem apresentar esta propriedade, pois migram para o interior da emulsão óleo/água, tornando a mistura homogênea. A principal função destes agentes, que possuem grupos hidrofílicos e lipofílicos, é promover a formação e estabilidade das emulsões.

Adaptado do Método SCHMIDT (2008)

Equipamentos:

Balança analítica

Liquidificador doméstico

Centrífuga

Aparelho de banho maria digital

Vidrarias, utensílios e outros:

Béquer 50 e 100 mL

Espátula

Pipeta graduada

Proveta 100 mL

Bureta

Tubos de centrífuga

Proveta graduada

Reagentes:

NaCl 3%

Óleo vegetal

Procedimento:

Prepara-se uma suspensão contendo 1 g de proteína com 34 mL de solução de NaCl 3%, em liquidificador doméstico por 30 segundos em velocidade baixa. Com auxílio de uma bureta adiciona-se 30 mL de óleo vegetal de soja a uma vazão de 10 mL/min sob agitação. A emulsão formada deve ser transferida para tubos de centrífuga e levados a um banho de água a 85 °C por 15 minutos. A seguir, as amostras devem ser centrifugadas a 3000xg por 40 minutos.

Após a centrifugação, o volume de óleo separado em cada amostra deve ser transferido para uma proveta graduada e efetuada a leitura. A diferença entre a quantidade de óleo medido e a quantidade de óleo adicionado é expressa como a quantidade de óleo emulsificado por grama de proteína contida na amostra e deve ser calculada da seguinte forma:

$$CE = \frac{\text{quantidade de óleo emulsificado (mL)}}{\text{massa de proteína (g)}}$$

7.11.2 Capacidade de retenção de óleo (CRO)

A capacidade de retenção do óleo é determinada a partir da quantidade que a amostra tem a capacidade de absorver certa quantidade de óleo. O mecanismo de retenção de absorção de óleo é atribuído à ligação física do óleo. Observa-se que, quanto maior for a densidade da proteína, maior será a absorção do óleo, devido ao caráter hidrófobo da proteína.

Equipamentos:

Balança analítica

Chapa com agitação magnética

Barra magnética

Centrífuga

Vidrarias, utensílios e outros:

Proveta 50 mL

Tubos de centrífuga

Becker 50 mL

Proveta

Reagentes:

Óleo vegetal

Procedimento:

Pesa-se 1 g de proteína e mistura-se com 20 mL de óleo vegetal de soja e agita-se por 10 minutos em agitador magnético. A seguir, a mistura deve ser centrifugada a 9000xg por 15 min em centrífuga, e o volume de óleo não absorvido medido em proveta graduada. A quantidade de óleo absorvido foi obtida pela diferença entre a quantidade de óleo inicial e a quantidade de óleo não absorvida. A capacidade de retenção de óleo é expressa como a quantidade de óleo retido por grama de proteína, e é calculada da seguinte forma:

$$CRO = \frac{\text{quantidade de óleo absorvido (mL)}}{\text{peso da amostra (g)}} \times 100$$

7.11.3 Capacidade espumante (CFE)

As espumas consistem de uma fase aquosa e uma gasosa, sendo que as minúsculas partículas de ar dispersas provocam as propriedades sensoriais em produtos com essa propriedade. As proteínas são os agentes ativos que ajudam na formação e na estabilização da fase gasosa. Normalmente a formação de bolhas ou simplesmente o fato de agitar uma solução proteica criam espumas estabilizadas por proteínas.

Podem-se utilizar proteínas em alguns tipos de alimentos para estabilizar ou formar espuma. As proteínas formam películas, estabilizando-se, ao redor da espuma. A adsorção e união das proteínas (caráter hidrofóbico) reduzem a tensão superficial da água, facilitando a formação de maior quantidade de espuma, até que ocorra a estabilidade. Quanto mais facilmente a proteína for desnaturada, maior será o seu poder espumante.

A capacidade de formação de espuma, por uma proteína, refere-se à expansão de volume com o acréscimo de ar, por batimento, agitação ou aeração. Depende da natureza da proteína, da solubilidade e do estado de desnaturação da proteína, da presença de sais e de outros aditivos utilizados no processamento dos alimentos.

Pode-se medir a capacidade de formação de espuma a partir do aumento do volume de uma dispersão proteica, que pode ser provocada por agitação. Para que as mesmas tenham boa capacidade de formar espuma, as proteínas devem formar uma membrana em torno das bolhas de ar passando por certo grau de desnaturação que parece ser crítico para a estabilização das espumas e de sua estrutura tridimensional.

Geralmente o poder espumante aumenta com a concentração proteica, até um valor máximo. A formação de espuma pode ser influenciada pelo pH, sais, açúcares, lipídios e a concentração proteica.

Equipamentos:

Liquidificador

Vidrarias, utensílios e outros:

Proveta graduada

Balança analítica

Espátula

Béquer

Procedimento:

Prepara-se uma suspensão proteica de 5 g de amostra com 100 mL de água. A suspensão deve ser agitada em liquidificador doméstico por 5 minutos sob agitação média, em seguida transfere a dispersão para uma proveta graduada de 250 mL, sendo que a capacidade de formação de espuma é calculada da seguinte forma:

$$CFE = \frac{(B - A) \times 100}{A}$$

Onde: A = volume antes da agitação (mL);

B = volume após a agitação (mL).

7.11.4 Digestibilidade *in vitro*

A digestibilidade é um fator extremamente importante na determinação do valor nutritivo de uma proteína. As proteínas de origem animal apresentam digestibilidade acima de 90%, enquanto que as de origem vegetal abaixo de 80%; sendo que quando as proteínas são isoladas de sua forma

natural (com bastantes cuidados) e que sofreram desnaturação, podem apresentar maior grau de digestibilidade. No entanto, desnaturações com a ação do calor tendem a diminuir o grau de digestibilidade.

A digestibilidade de uma proteína representa a parte da proteína que pode ser hidrolisada pelas enzimas digestivas; estas proteínas seriam então quebradas em aminoácidos, estando disponíveis ao organismo humano. Nestes ensaios, procura-se imitar as condições de acidez do estômago, sendo por isso chamada *in vitro*. Consiste numa propriedade importante pois representa o valor nutritivo de uma proteína.

Equipamentos:

Balança analítica

Aparelho de banho Maria digital

pHmetro

Centrífuga

Vidrarias, utensílios e outros:

Espátula

Proveta graduada

Pipeta graduada

Béquer

Tubos de ensaio

Espátula

Béquer 50 mL

Tubos de centrífuga

Pipeta de pasteur

Reagentes:

Pepsina

HCl 0,1 N

Merthiolate incolor

NaOH 0,2 N

Pancretaína

Tampão de fosfato

Ácido tricloro acético 5%

Procedimento:

Inicialmente, pesa-se uma quantidade de amostra que corresponda ao equivalente a 0,5 g de proteína. Prepara-se uma solução de 1,5 mg de pepsina por mL de HCl 0,1 N, e adiciona-se 15 mL desta solução à amostra. A seguir, adiciona-se 0,5 mL de solução de merthiolate incolor. Homogeneiza-se bem e leva-se a banho-maria a 37 °C por 3 horas, com agitação periódica. Decorrido este tempo, os tubos contendo as amostras devem ser resfriados e a solução ajustada a pH 8,0 com uma solução de NaOH 0,2 N, utilizando um pHmetro .

Prepara-se, também, uma solução de 0,5 mg de pancreatina por mL de tampão fosfato pH 8,0. Adiciona-se 10 mL da solução de pancreatina ao produto hidrolisado pela pepsina e leva-se novamente ao banho-maria a 37 °C, porém por 24 horas com agitação periódica. Após o tempo de hidrólise, adiciona-se 5 mL de uma solução de tricloro acético 5% à amostra e centrifuga-se por 15

minutos a 5000 xg para separação do material insolúvel, sendo o filtrado recolhido para posterior determinação do nitrogênio digerido, pelo método de Kjeldhal.

A digestibilidade *in vitro* é expressa como a porcentagem de nitrogênio digerido em relação ao nitrogênio total na amostra inicial, sendo calculada da seguinte forma:

$$\text{Digestibilidade (\%)} = \frac{\text{Nitrogênio digerido}}{\text{Nitrogênio total}} \times 100$$

Referências:

- A.O.A.C. Official Methods of Analysis. **Association of Official Analytical Chemists.**, 18ª edition, v. 1-2, USA. 2005.
- ARAÚJO, J. M. **Química de alimentos: teoria e prática.** 4 ed. Viçosa: UFV, 2008. 596 p.
- BALTI, R. et al. Comparative study on biochemical properties and antioxidative activity of cuttlefish (*Sepia officinalis*) protein hydrolysates produced by alcalase and bacillus licheniformis NH1 proteases. **Journal of amino acides.** V. 2, 2011. 11 p.
- BELITZ, H. D.; Grosch, W. **Química de los alimentos.** 2a edição. Editora: Acribia, S.A. Zaragoza. Espanha. 1997.
- DAMODARAN, S.; Parkin, K.L; Fennema, O.R. **Química de alimentos de fennema.** Tradução Adriano Brabdelli et al. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.
- KRISTINSSON, H. G.; Rasco, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical reviews in food science and nutrition.** v. 40, p. 43. 2000.
- LOWRY, O. H et al. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** Journal Biol.Chem., p. 265-275, 1951.
- SCHMIDT, C. G. **Hidrólise enzimática das proteínas de carne de frango.** Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande: FURG, 2008, 130 p.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações.** 1. Ed. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.
- ZAIA et al. Determinação de proteínas totais vias epectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. São Paulo: **Química Nova**, n.1, v.6. 1998. p 787-793.

7.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A oxidação dos lipídios consiste num processo que acarreta a deterioração de muitos alimentos, levando os mesmos à perda da qualidade e de valor nutricional, podendo, inclusive, ocasionar a formação de produtos tóxicos. A oxidação ocasiona a formação de radicais livres, os quais podem acarretar muitos problemas de saúde. A oxidação nos alimentos afeta a cor, flavor, vitaminas, minerais, carboidratos, lipídios e proteínas, sendo necessário adicionar antioxidantes aos alimentos.

O efeito antioxidante consiste na inativação dos radicais livres, na complexação dos íons metálicos ou na redução de hiperóxidos. A escolha de um antioxidante segundo o mesmo deve estar baseada no seu conhecimento químico, seu modo de ação, sendo que a estrutura do mesmo influi nas diferenças de atividades antioxidantes.

Método Adaptado de Mensor et al. (2001)

Equipamentos:

Balança analítica

Espectrofotômetro

Vidrarias, utensílios e outros:

Balão volumétrico de 50 e 100 mL

Espátula

Béquer de 50 e 100 mL

Pipeta automática

Cubetas de quartzo

Reagentes:

2,2 Difenil-1-Picril-Hidrazila (DPPH) a 0,004%

Álcool metílico

Ácido Ascórbico

Procedimento:

Parte 1:

Preparo da solução de DPPH a 0,004%

Dissolver 0,004 g de DPPH em álcool metílico e completar o volume para 100 mL em um balão volumétrico com álcool metílico, homogeneizar e transferir para um frasco âmbar, devidamente etiquetado, ou proteger o balão volumétrico com a solução de DPPH com papel alumínio. Preparar e usar no dia da análise.

Parte 2:

Curva padrão ácido ascórbico (ou rutina)

Curva padrão Controle positivo

A partir de uma solução estoque do ácido ascórbico de 1 mg/ml, diluindo nas concentrações de 50, 30, 15, 10, 8, 4, 2, 1 e 0,5 µg/mL, em metanol (fazer em triplicata).

Obs. Amostra: Incubar, a temperatura ambiente, 2,0 mL da solução de DPPH e 1 mL das soluções metanólicas de extrato e ou ácido ascórbico durante 30 min. (Aconselha-se cronometrar o tempo exato de cada tubo, para evitar leituras muito heterogêneas entre as triplicatas – 40 segundos entre os tubos).

Decorrido o tempo de incubação realizar a leitura das amostras em espectrofotômetro em comprimento de onda de 517 nm.

Preparar um branco da amostra, incubando por 30 min, 2,0 mL de metanol e 1 mL das soluções do extrato. Ler em 517 nm, zerando o aparelho com o metanol.

Preparar um controle (negativo), incubando por 30 min, 2,0 mL de DPPH e 1 mL de metanol. Ler em 517 nm, e zerando novamente o aparelho com o metanol.

Este controle negativo pode também ser utilizado para zerar o aparelho e, em seguida, efetuar a leitura das amostras de extrato ou ácido ascórbico incubadas com a solução metanólica de DPPH.

Observações:

Aconselha-se realizar o ensaio por etapas: em uma manhã realizar a curva do ácido ascórbico. À tarde ou no outro dia realizar o ensaio das soluções metanólicas do extrato e, assim, sucessivamente;

É necessário fazer um controle negativo e o branco das amostras específicos para cada etapa;

3. Sempre preparar uma nova solução de DPPH. Nunca armazenar o restante para ser utilizado outro dia ou período.

4. O ideal é que as luzes próximas ao local onde o ensaio será realizado permaneçam apagadas, evitando-se a interferência da mesma nas análises. Aconselha-se deixar ligadas apenas as luzes distante do local ou ainda trabalhar com a luz ambiente.

Amostras

Leitura das medidas de absorvância das amostras

Partir de uma solução estoque do extrato bruto de 1 mg/mL, diluindo nas concentrações de 250, 200, 150, 100, 50, 25 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em metanol (fazer em triplicata). Em ambiente escuro, transferir uma alíquota de 1 mL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio ou falcon com 2 mL do radical DPPH (0,1 mM ou 100 μM ou 0,004%) e homogeneizar em agitador de tubos. As absorvâncias são lidas em espectrofotômetro a 517 nm, no 1°, 5° e 10° min até (de 10 em 10 min realizar a leitura) onde é observada a redução da absorvância até a sua estabilização. Ou faz-se a leitura em 30 min. se estabilizar neste tempo, como o ácido ascórbico.

Utilizar como:

Álcool metílico, como branco para calibrar o espectrofotômetro! AUTO ZERO!

BRANCO (Abs. Branco): 2 mL de metanol com 1 mL das soluções do extrato;

CONTROLE NEGATIVO (Abs. controle): 1 mL da solução metanol com 2 mL do radical DPPH e homogeneizar.

CONTROLE POSITIVO (Abs. Amostra): 1 mL do ácido ascórbico/amostra com 2 mL do radical DPPH e homogeneizar.

$$\%AA = \frac{100 - (\text{Absamostra} - \text{Absbranco}) * 100}{\text{Abscontrole}}$$

Referências:

A.O.A.C. Official Methods of Analysis. **Association of Official Analytical Chemists.**, 18ª edition, v. 1-2, USA. 2005.

ARAÚJO, J. M. **Química de alimentos:** teoria e prática. 4 ed. Viçosa: UFV, 2008. 596 p.

BALTI, R. et al. Comparative study on biochemical properties and antioxidative activity of cuttlefish (*Sepia officinalis*) protein hydrolysates produced by alcalase and bacillus licheniformis NH1 proteases. **Journal of amino acides.** V. 2, 2011. 11 p.

BELITZ, H. D.; Grosch, W. **Química de los alimentos.** 2a edição. Editora: Acribia, S.A. Zaragoza. Espanha. 1997.

DAMODARAN, S.; Parkin, K.L; Fennema, O.R. **Química de alimentos de fennema**. Tradução Adriano Brabdelli et al. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical reviews in food science and nutrition**. v. 40, p. 43. 2000.

MENSOR, L.L et al. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of the DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**., v.15,n.2, 2001, pag 127-130.

7.13 DETERMINAÇÃO DA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO)

Esse método é empregado na determinação da DQO dos resíduos gerados após o processo de cultivo de microrganismos. O método de refluxo aberto é uma medida equivalente em oxigênio, da porção de matéria orgânica na amostra suscetível à oxidação por um oxidante químico forte. O teste consiste em oxidar a amostra com excesso de dicromato, em meio fortemente ácido e sob refluxo, e determinar a quantidade de dicromato remanescente, por titulação com sulfato ferroso amoniacal.

Método de STANDARD (2012):

Equipamentos:

Chapa aquecedora.

Vidrarias, utensílios e outros:

Erlenmeyer de fundo chato e boca esmerilhada;

Condensadores;

Mangueiras para conectar condensadores;

Rolo de fita veda rosca;

Garras/suporte para condensadores (1 por erlenmeyer);

Béquer 100 mL;

Bureta de 50 mL;

Proveta 50 mL;

Proveta 250 mL.

Reagentes:

Sulfato de mercúrio p.a.;

Ácido Sulfúrico p.a.;

KOH 6%.

Ácido Sulfúrico/Sulfato de prata:

Pesar 10 g de sulfato de prata;

Transferir o conteúdo para um béquer de 1 L;

Na capela, adicionar 600 mL de ácido sulfúrico para dissolver o sulfato

Transferir para o balão de 1 L e completar com ácido sulfúrico p.a.

Dicromato de potássio 0,25 N (Para amostras com DQO > 50 mg/L)

Dica: para amostras com DQO <50 mg/L, utilizar dicromato de potássio com concentração de 0,025 N.

Pesar 15 g de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em uma cápsula;

Deixar secar por 2 h a 105 °C em estufa;

Colocar no dessecador até esfriar;

Em balança analítica pesar 12,259 g de dicromato seco;

Dissolver com água;

Transferir para balão de 1 L e avolumar.

Sulfato ferroso amoniacal $Fe(NH_4)(SO_4)_2$

Pesar 98 g de sulfato ferroso amoniacal hexahidratado p.a. e dissolver em água;

Adicionar 20 mL de ácido sulfúrico p.a.;

Transferir para balão de 1 L e avolumar.

Indicador ferroína

Dissolva 1,485 g de 1-10 fenantrolina monohidratada ($C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$) juntamente com 0,695 g de sulfato ferroso P.A. ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) em água destilada e dilua a 100 mL.

Preparo da vidraria

Lavar primeiramente com água da torneira e sabão;

Passar um pouco de KOH 6%;

Lavar novamente com água da torneira;

Enxaguar com água deionizada.

Dica: tomar cuidado porque a vidraria fica lisa!

Procedimento:

1. Pipetar 50 mL da amostra para erlenmeyer de fundo chato de 500 mL.

Dica: para amostras com DQO > 900 mg/L é necessário fazer diluição.

Exemplos de diluição:

Soro de queijo: 1:500

1 mL da amostra em 500 mL de água (avolumar em balão volumétrico)

Soro de ricota: 1:200

1 mL da amostra em 200 mL de água (avolumar em balão volumétrico)

2. Adicionar 1 g de sulfato de mercúrio e pérolas ao mesmo erlenmeyer;

3. Adicionar 5 mL de ácido sulfúrico/sulfato de prata gelado para o Erlenmeyer, homogeneizando bem. Esfriar enquanto estiver agitando para evitar a perda de material volátil;

4. Adicionar 25 mL de dicromato de potássio 0,25 N;

5. Conectar erlenmeyers de fundo chato e abrir a água;

6. Adicionar mais 70 mL de ácido sulfúrico/sulfato de prata gelado aos erlenmeyers sob agitação. Antes de ser aquecida, a amostra deve estar bem homogeneizada.

7. Ligar o aquecimento da chapa em 150 °C;

8. Deixar por 2 horas no aquecimento (contar a partir do momento em que começa a borbulhar ou corre pelas paredes).

9. Após 2 horas no refluxo, desligar a chapa e deixar esfriar. Lavar o condensador com água até diluir cerca de duas vezes o volume inicial da amostra. Agitar e deixar até ficar em temperatura ambiente.

10. Adicionar 2 a 3 gotas de indicador ferroína em cada erlenmeyer.

Titulação:

Titular com sulfato ferroso amoniacal até virar a cor para marrom avermelhado.

Cálculos:

$$DQO \text{ (mg/L)} = (B - A) \times N \times 8000$$

Volume de amostra (mL)

Onde:

B= volume da solução de sulfato ferroso amoniacal gasto para titulação do branco (mL)

A= volume da solução sulfato ferroso amoniacal gasto para titulação do amostra (mL)

N= Normalidade da solução de sulfato ferroso amoniacal

8000= equivalente-grama de oxigênio para 1 L de água.

Se for utilizada diluição, multiplicar pelo fator de diluição utilizado.

Referência:

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22 st edition. Método 5220 B, pág 5-17, 2012.

7.14 DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS

Protocolo para Quantificação de Polifenóis Totais em Extratos Secos pelo Método de Folin-Ciocalteu:

Compostos fenólicos compreendem um dos mais importantes grupos de metabólitos secundários em plantas, podendo ser divididos em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Podem atuar na defesa da planta contra agressões do ambiente, bem como agir como antioxidantes devido a sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons gerando radicais intermediários estáveis que impedem a oxidação de vários ingredientes em alimentos, em particular da peroxidação lipídica.

Adaptado de Singleton & Rossi (1965) e Souza et al. (2007):

1. Material necessário:

- a. 8 Balões volumétrico de 10 mL
- b. 1 Balão volumétrico de 50 mL
- c. 4 Becker
- d. Tetina
- e. 8 Pipeta Pasteur
- f. 1 Pipeta automática de 100-1000 μ L
- g. Cubetas de vidro
- h. 2 Tubos de ensaio
- i. 1 Espectrofotômetro
- j. 1 Balança analítica
- k. 1 Banho-maria
- l. 1 Vórtex
- m. Cronômetro

2. Solventes/ Soluções

- a. Água destilada
- b. Metanol
- c. Folin-Ciocalteu 1 N
- d. Solução de carbonato de sódio

- 75g de carbonato de sódio anidro em 400 mL de água. Ferver a solução e após resfriar. Adicionar cristais de carbonato de sódio, após 24 horas, filtrar e completar o volume com água a 550 mL.

- e. Solução de Ácido Gálico
- f. Extrato Vegetal seco

3. Cuidados aplicáveis:

- a. Cuidar com a identificação das Plantas, bem como não misturar duas plantas diferentes no mesmo processo ao mesmo tempo.
- b. Este experimento deve ser realizado com a menos luminosidade possível.
- c. Recomenda-se realizar este experimento sempre em triplicata.

4. Procedimento:

- A determinação de fenóis totais é quantificada por meio de espectrofotometria UV/Vis.

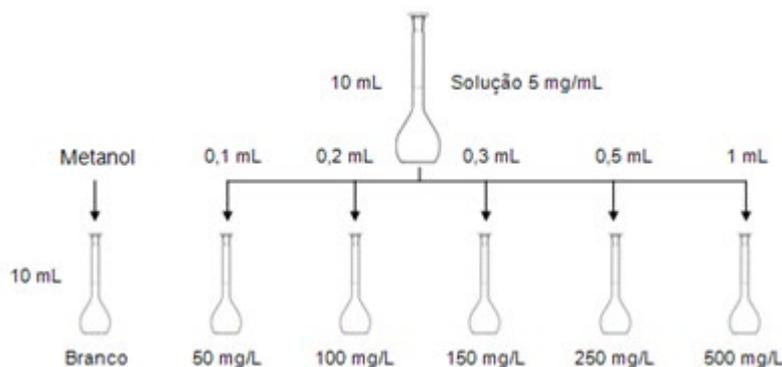
a. Inicialmente, realiza-se a curva padrão, utilizando para isso uma Solução de Ácido Gálico.

b. Para realizar a curva de ácido gálico, dilui-se em um balão volumétrico de 10 mL, 50 mg de Ácido Gálico em Metanol.

c. Partindo desta solução, realizam-se sucessivas diluições em metanol, conforme figura abaixo, obtendo-se as seguintes concentrações: 500 mg/L, 250 mg/L, 150 mg/L, 100 mg/L e 50 mg/L.

d. Para o branco foi utilizado apenas o metanol. A Figura 1 mostra o procedimento da diluição dos padrões.

Figura 1: procedimento para a diluição de padrões para a determinação de fenóis totais



Fonte: dos autores.

e. Em cada tubo de ensaio, acrescenta-se: 40 μ L da solução; 3,16 mL de água destilada; 200 μ L de reagente Folin-Ciocalteu 1N e 600 μ L de solução de Na_2CO_3 saturada previamente preparada.

f. Realiza-se leitura após 30 minutos em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 765 nm.

g. Os dados obtidos são calculados segundo equação da reta, formando uma curva onde R^2 deve ser o mais próximo possível de 1.

h. Ao término da construção da curva, procede-se com a pesagem das amostras do Material Vegetal seco.

i. A concentração da solução deve ser de 1 mg/mL.

j. Em tubo de ensaio, acrescenta-se: 40 μ L da solução do extrato; 3,16 mL de água destilada; 200 μ L de reagente Folin-Ciocalteu 1N e 600 μ L de solução de Na_2CO_3 saturada previamente preparada.

k. Agita-se por 15 segundos em Vórtex, e após aguardar por 30 minutos em banho-maria a 40 $^\circ\text{C}$,

l. Procede-se com a leitura em espectrofotômetro a 765 nm.

m. Para a realização do branco da amostra, procede-se da mesma forma que na amostra, mas adicionou-se metanol ao invés da solução de extrato.

n. Os valores obtidos são comparados com a curva de Ácido Gálico, obtendo assim o valor em equivalentes de ácido Gálico (mg de EAG/g de extrato EtOH \pm DP).

Referências:

SINGLETON, V. L.; Rossi, J. A. **Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic Phosphotungstic Acid Reagents**. American Journal of Enology and Viticulture. 16:144-158, 1965.

SOUSA, C. M de M. et al. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**. Química Nova. 30: 351-355, 2007.

7.15 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS

A pesquisa fitoquímica tem por objetivos conhecer os principais constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença. Classicamente, em análises preliminares (sem o objetivo de isolamento de substâncias químicas), a caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais de interesse tem sido conseguida pela realização de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico. Esses ensaios caracterizam qualitativamente as principais classes desses metabolitos, servindo como uma indicação para possíveis propriedades químicas ou biológicas.

Adaptado de Brasil (2005), Harbore (1998) e Simões (2004)

Material necessário:

- 8 Becker 25 mL
- 5 Provetas
- 7 Funis pequeno de vidro
- 7 Papeis filtro
- 1 Tesoura
- 13 Tubos de ensaio
- 5 Tubos de ensaio grande
- Pipeta Pasteur
- Tetina
- 5 Espátulas
- 1 Balança
- 1 Banho Maria
- 4 Grade para tubo de ensaio
- 1 Régua
- 1 Cronômetro
- 1 Papel alumínio
- 4 Vidros de relógio
- 1 Cadinho (cápsula de porcelana)
- Atilho
- Planta seca e moída

Solventes/ Soluções

- Água
- Solução aquosa de cloreto férrico 1%
- Solução aquosa de hidróxido de potássio 3%
- Solução aquosa de gelatina 1%
- Solução aquosa de cloreto férrico 1%
- N-butanol
- Metanol

- Ácido clorídrico concentrado
- 0,1 g de magnésio metálico
- Solução metanólica de hidróxido de potássio 5%
- Hidróxido de potássio 5%
- Ácido acético
- Tolueno
- Solução de hidróxido de potássio 3%.
- Ácido clorídrico 10%
- Reagente de bornträger.
- Ácido clorídrico 10%
- Metanol.
- Ácido clorídrico 10%.
- Reagentes de : mayer, dragendorff, wagner e bertrand.
- Acetona

Cuidados aplicáveis:

Cuidar com a identificação das Plantas, bem como não misturar duas plantas diferentes no mesmo processo ao mesmo tempo.

Este Screening Fitoquímico é adaptado das referências citadas, para utilizar-se como Material Vegetal o extrato seco da planta, anteriormente preparado.

Procedimento:

Compostos fenólicos

- Pesa-se cerca de 0,5 g dos extratos vegetais;
- Adicionam-se 20 mL de água destilada e aquece-se em banho-maria fervente durante 30 minutos;
- Após resfriamento, filtra-se o conteúdo;
- O conteúdo deve ser dividido em três tubos de ensaio (A, B e C);
- No tubo A, adicionam-se algumas gotas de uma solução aquosa de cloreto férrico 1%. O desenvolvimento de coloração verde ou azul escura é indicativo da presença de compostos fenólicos;
- No tubo B, adicionam-se algumas gotas de uma solução aquosa de hidróxido de potássio 3%. O aparecimento ou intensificação da cor amarela ou laranja é indicativo da presença destes compostos;
- O tubo C é utilizado como controle para verificação da coloração inicial do extrato.

Taninos

- Pesa-se cerca de 0,1 g dos extratos vegetais;
- Aquece-se em 20 mL de água destilada por 30 minutos;
- Após resfriamento, filtra-se e divide-se em três tubos de ensaio (A, B, C);

A técnica de detecção baseia-se na propriedade dos taninos de precipitar a gelatina.

- Ao tubo A, adiciona-se 1 mL da solução aquosa de gelatina 1%, preparada anteriormente.
- Na presença de taninos, haverá a formação de turvação ou precipitado.

- Este teste não é específico, já que alguns fenóis apresentam reação positiva, quando estão em altas concentrações.

- Para a técnica de caracterização, é uma reação geral para substâncias fenólicas onde a complexação de hidroxilas com o íon Fe^{2+} leva ao desenvolvimento de substâncias de coloração azulada ou esverdeada, conforme estrutura da molécula.

- Adicionam-se três gotas da solução aquosa de cloreto férrico 1%, preparadas anteriormente, ao tubo B, contendo os extratos.

- Na presença de taninos hidrolisáveis ocorre o desenvolvimento de coloração azulada e na presença de taninos condensados a coloração verde.

- O tubo C será utilizado como controle para verificação da coloração inicial do extrato.

Flavonoides

- Pesam-se cerca de 0,2 g de extrato,

- Adicionam-se aproximadamente 50 mL de água em banho-maria fervente por 30 minutos.

- Esfria-se, filtra-se, e extrai-se duas vezes em funil de separação utilizando 10 mL de n-butanol.

- Evapora-se a fração butanólica à secura em cápsula de porcelana, e retoma-se o extrato em metanol (cerca de 10 mL).

- Transfere-se para 2 tubos de ensaio (A e B).

- No tubo A adicionam-se 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado e após 0,1 g de magnésio metálico.

- O desenvolvimento da coloração laranja indica a presença de flavonas, a coloração violácea indica flavanonas e a cor vermelha a presença de flavonóis.

- O tubo B será utilizado como controle para a verificação da coloração inicial do extrato.

Cumarinas

- Aquece-se em tubo de ensaio, cerca de 0,1 g dos extratos em banho-maria fervente.

- Deve-se tampar o tubo de ensaio com papel filtro previamente impregnado e seco com uma solução metanólica de hidróxido de potássio 5%.

- Após 10 minutos, o papel será exposto à luz ultra violeta (UV) de 365 nm.

- O desenvolvimento da fluorescência azul e amarela indica a presença de cumarinas voláteis.

Sugere-se utilizar como padrão sementes de flavatonca, ricas em cumarinas voláteis.

Quinonas

- Pesam-se 0,2 g dos extratos vegetais e extrair em banho-maria fervente durante 10 minutos, com 5 mL de hidróxido de potássio 5%.

- Resfria-se, filtra-se o extrato e acidifica-o com ácido acético.

- Em seguida, extrai-se com 5 mL de tolueno em funil de separação.

- Separa-se em um béquer a fase orgânica e adicionam-se 2 mL de solução de hidróxido de potássio 3%.

- O desenvolvimento de coloração vermelha indica a presença de antraquinonas, a coloração violácea indica a presença de naftoquinoides e o surgimento de coloração azul indica a presença de benzoquinoides.

- Para verificar a presença de quinonas glicosídicas, ferve-se em banho-maria cerca de 0,1 g dos extratos vegetais com 10 mL de ácido clorídrico 10% durante 15 minutos.

- Resfria-se, filtra-se e adicionam-se 5 mL de tolueno ao extrato.

- Separaram-se as fases. Na fase orgânica, adicionam-se 2 mL do reagente de Bornträger.
- O aparecimento da coloração vermelha na fase aquosa indica a presença de quinonas glicosídicas.

Saponinas

Esta análise será baseada na propriedade das saponinas de formar espuma após agitação enérgica.

- Pesa-se cerca de 0,1 g dos extratos vegetais e adicionam-se 20 mL de água em banho-maria fervente por 15 minutos.
- Resfria-se, filtra-se e coloca-se em um tubo de ensaio.
- O tubo deve ser agitado vigorosamente durante 15 segundos, e a altura da coluna de espuma formada, é medida com o auxílio de uma régua.
- O desenvolvimento de espuma com altura superior a 1 cm e persistência da mesma, após repouso de 15 minutos e adição de ácido clorídrico 10%, indica a presença de saponinas.

Alcalóides

- Dilui-se aproximadamente 0,1 g dos extratos vegetais em 20 mL de metanol.
- Após, esta solução é dividida igualmente em três tubos de ensaio. Na sequência, serão adicionados a cada tubo, 5 mL de ácido clorídrico 10%.
- Aquece-se em banho-maria (40 °C) durante 30 minutos.
- Após o resfriamento, filtra-se e transfere-se uma parte deste para um vidro de relógio, onde são adicionados gota a gota os seguintes reagentes de detecção: Mayer, Dragendorff, Wagner e reagente de Bertrand.
- O aparecimento de um precipitado indica a presença de alcalóides.

Referências:

BRASIL, *Farmacopéia Brasileira*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988-2005.

HARBORE, J.B. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall. 3.ed. 1998.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre 2004.

Anexo 1 – Ficha de avaliação para o screening fitoquímico.

Screening fitoquímico

Planta: _____ Data: _____

Responsável: _____

	Característica confirmatórias	Positivo	Negativo
Compostos fenólicos	Aparecimento ou intensificação da cor amarela ou laranja.		
Taninos	Taninos hidrolisáveis à desenvolvimento de coloração azulada		
	Taninos condensados à desenvolvimento de coloração verde		
Flavonóides	Flavonas à desenvolvimento de coloração laranja		
	Flavanonas à desenvolvimento de coloração violácea		
	Flavonóis à desenvolvimento de cor vermelha		
Cumarinas	Cumarinas voláteis à fluorescência azul e amarela		
Quinonas	Antraquinonas à desenvolvimento de coloração vermelha		
	Naftoquinoides à desenvolvimento de coloração violácea		
	Benzoquinoides à desenvolvimento de coloração azul		
	Quinonas glicosídicas à desenvolvimento de coloração vermelha na fase aquosa		
Saponinas	Desenvolvimento de espuma com altura superior a 1 cm e persistência da mesma após repouso de 15 minutos e adição de ácido clorídrico 10%		
Alcaloides	Aparecimento de um precipitado		

CAPÍTULO 8

CULTURA DE CÉLULAS ANIMAIS

Adriane Pozzobon, Bruna Caye, Dalana Faleiro, Débora Mara Kich, Marcia Ines Goettert

8.1 CULTURA E MANIPULAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES

Linhagens celulares podem ser conservadas por criopreservação para posterior manipulação e aplicação. As células devem ser mantidas assepticamente em condições bastante estritas de temperatura (35-37°C), pH (7.3-7.5), umidade, 5 - 10% CO₂ e em meio de cultura nutritivo. Os protocolos descritos neste capítulo são destinados para a manutenção e manipulação de células aderentes, às quais se multiplicam na superfície de um suporte inerte (vidro ou plástico), formando uma monocamada. Entretanto, outras células como os linfócitos, podem crescer livremente em suspensão.

Manutenção das células (troca de meio)

Materiais: meio de cultura nutritivo, soro fetal bovino (SBF), detergente Hanks ou PBS, pipetas, ponteiras, frasco para descarte, álcool 70%, algodão ou papel descartável, EPI's (luvas, máscara e jaleco).

É realizada sempre que o meio apresenta ter sido consumido (cor alaranjada).

1. Retirar meio de cultura, o detergente Hanks e soro fetal bovino do refrigerador para atingirem a temperatura ambiente;

Dica: uma possibilidade é colocar o soro e o meio de cultura na estufa anteriormente;

2. Ligar o fluxo;

3. Disponibilizar todos os EPI's necessários, realizar a limpeza da cabine de fluxo laminar com álcool 70% e colocar todo o material que irá ser utilizado, passando álcool 70% em todos os utensílios antes de inserir na cabine;

4. Com a cabine limpa e com todos os materiais dentro, exceto material biológico (células, soro fetal bovino), ligar a lâmpada germicida por 15 min (**NÃO SE EXPONHA À LUZ**);

5. Ligar a luz fluorescente e o fluxo de ar;

6. Sempre limpar as mãos e qualquer utensílio com álcool 70% ao inseri-los no fluxo;

7. Retirar o frasco com células da estufa e verificar a condição das mesmas ao microscópio invertido;

8. Dentro do fluxo, abrir o frasco de cultura sempre com a tampa para cima, evitando contaminações;

9. Desprezar o meio de cultura consumido;

10. Colocar detergente Hanks ou PBS (usar 2 mL em frasco de cultura pequeno e 4 mL para frascos grandes), movimentar lentamente para lavar, descartá-lo. Repetir esse processo duas vezes;

11. Preparar o meio de cultura suplementado com 10% de SBF (5 mL para frasco de cultura pequeno e 10 mL para frasco grande);

Dica: pipetar o meio sempre de um tubo falcon para evitar contaminações;

12. Verificar a condição das células ao microscópio novamente;

13. Retornar os frascos de cultura na estufa;

14. Realizar a limpeza do fluxo novamente com álcool 70% e ligar a luz germicida por mais 15 minutos, para evitar contaminação cruzada caso for trabalhar com outra linhagem celular.

Meio de cultura para manutenção de linhagens celulares (ex:CHO-K1):

DMEM + HAM F 10

1000 mL Água Milli-Q autoclavada

8,65 g DMEM + 4,9 g HAM F10

1,2 g NaHCO₃

0,1 g Estreptomicina

0,06 g Penicilina

Dica: ajustar o pH para 7.2 antes de realizar a esterilização por filtração. Após a filtração, o pH eleva-se para 7.3 – 7.4.

Usar filtros de 0,22 µm.

PBS 10x (1L)

90 g NaCl

2 g KCl

11,2 g Na₂HPO₄

2 g KH₂PO₄

1000 mL Água Milli-Q

Ajustar o pH para 7.4 e autoclavar.

Repique/Passagem de células e viabilidade celular:

Materiais: Meio de cultura nutritivo, tripsina-EDTA, soro bovino fetal (SBF), antibiótico de escolha, PBS, descarte, álcool 70%, azul de tripan, pipetas, pipetador, garrafas estéreis ou frascos de cultura, câmara de Neubauer (hemocitômetro), ponteiras, tubos *ependorf* e tubos falcon.

Quando as células atingem confluência de 80-90%, é necessário sujeitá-las à subcultura evitando-se, deste modo, a morte celular.

1. Trazer o meio de cultura, tripsina, SBF e PBS a temperatura ambiente;
 2. Ligar o fluxo;
 3. Limpar os materiais com álcool 70% e colocá-los no fluxo, ligar a lâmpada germicida por 15 minutos;
 4. Inicia-se o processo pela lavagem das garrafas;
- Dica:** ao abrir os frascos sempre deixar a tampa virada para cima (evitando contaminações)
5. Desprezar o meio consumido;
 6. Colocar 2 mL de PBS para lavar (em frascos pequenos) e 4 mL em frascos grandes;
 7. Desprezar o PBS;
 8. Colocar 1 mL de tripsina no frasco de cultura;
 9. Incubar 2-3 minutos na estufa a 37°C para desprendimento das células;
- Dica:** não manter por mais de 3 minutos. Degradação celular!!!
10. Preparar meio completo suplementado com 10% soro bovino fetal;
 11. Passados 3 minutos na estufa, verificar por meio de microscopia o desprendimento das células;
 12. Certificado o desprendimento das células, injetar aproximadamente 3 mL de meio (retirar do tubo falcon para evitar contaminações);
 13. Transferir a solução do frasco de cultura para um novo tubo falcon;
 14. Centrifugar as células tripsinizadas por 10 minutos a 2000 rpm;

15. Aproveitar o tempo de centrifugação para limpar a câmara de Neubauer com álcool 70%;
16. Terminado o processo de centrifugação, descartar a tripsina;
17. Ressuspender as células com 1 mL de meio completo;
18. Homogeneizar a célula com uma pipeta lentamente;
19. Colocar a lamínula de vidro sobre a câmara de Neubauer;
20. Pipetar 90 µl da solução azul de tripan no tubo *eppendorf* para diluição das células (1:10);
21. Adicionar 10 µl da suspensão de células ao tubo *eppendorf*;
22. Pipetar 10 µl solução corada na lamínula da câmara de Neubauer;
23. Realizar a contagem de células por microscopia;
24. Após a contagem, lavar a lamínula e câmara com água corrente e secar;
25. Colocar 7 mL de meio nutritivo completo no frasco de cultura e transferir as células ressuspensas (ou a quantidade desejada) para uma nova garrafa;
26. Identificar o frasco de cultura:
 - Usuário
 - Número de passagem
 - Linhagem celular
 - Data
27. Visualizar as células novamente ao microscópio;
28. Armazená-la na estufa.

Congelamento de células

Materiais: Meio de cultura nutritivo, soro bovino fetal (SBF), álcool 70%, azul de tripan, frascos de cultura, câmara de Neubauer, criotubos, DMSO e tubos falcon.

Simulação:

1º quadrante: 33

2º quadrante: 43

3º quadrante: 28

4º quadrante: 30

1. Realizar a contagem celular;
2. Ajustar o cálculo para a quantidade de células desejadas conforme exemplo acima;
3. Retirar a quantidade necessária de células da suspensão e o restante transferir para o frasco de cultura, adicionar a quantidade necessária de meio de cultura nutritivo completo e armazenar na estufa;
4. Centrifugar a suspensão celular;
5. Desprezar o sobrenadante;
6. Acrescentar solução de congelamento (5-10% DMSO ou Glicerol + SBF) conforme o cálculo;
7. Identificar os criotubos (linhagem, quantidade de células, passagem, data, nome);
8. Pipetar 1 mL da solução em cada criotubo (processo realizado sobre gelo);
9. Armazenar os criotubos em refrigerador 4 °C por aproximadamente 1h;
10. Transferir os criotubos para o freezer (-20 °C) por 1-2h;

11. Acondicionar os criotubos a -80 °C por aproximadamente 12 horas;
12. Armazenar os criotubos em nitrogênio líquido;
13. Limpar o fluxo com álcool 70% e ligar a lâmpada UV por 15 minutos.

Descongelamento de células

1. O meio de cultura e o SBF devem estar a temperatura ambiente;
2. Limpar o fluxo com álcool 70% e transferir os materiais necessários para a realização do descongelamento e limpá-los com álcool 70%;
3. Ligar a lâmpada germicida por 15 minutos;
4. Transferir 5 mL de meio de cultura com 20% de soro fetal bovino;
5. O criotubo deve ser retirado do nitrogênio líquido e **descongelado rapidamente**, em banho-maria a 36°C ou por “fricção” com as mãos;
6. Após o total descongelamento, o conteúdo deve ser transferido com uma pipeta para o frasco de cultura, observando as células ao microscópio;
7. Armazenar na estufa de CO₂ a 37°C.

Referências:

- FRESHNEY, R.I. Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 5th Ed. Hoboken NJ, John Wiley & Sons, 2005.
- MALAJOVICH, M.A.- Biotecnologia 2011. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feller do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.
- ANIMAL Cell Culture Protocols & Applications. Disponível: <<http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/spotlight/protocols-and-applications-guide/animal-cell-culture/>> Acesso em: 14.02.2014

8.2 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS FOLICULARES DE TIREOIDE HUMANA

O método de cultura primária é utilizado para ensaios *in vitro*. Essas células possuem as características do tecido de origem, podem crescer em cultura por um determinado período de tempo.

Uma cultura primária é estabelecida a partir do crescimento de células oriundas de um fragmento de tecido obtido por dissociação mecânica ou enzimática. As células que conseguirem sobreviver ao processo de dissociação e aderirem à placa formarão a primeira monocamada de células daquele tecido.

Método Adaptado de Spritzer et al (1995):

Coleta do material nos centros cirúrgicos.

Dica: o tecido não pode estar formalizado, deve ser coletado a fresco ou colocado em meio de transporte (Solução de Hank's + antibiótico). Trazer o material imediatamente ao laboratório para a realização da lavagem.

Após a esterilização da capela, colocar o seguinte material: um Becker grande, ou frasco para desprezar o meio de transporte; quatro Beckers pequenos para a lavagem do material; um frasco previamente pesado para futuro armazenamento do tecido; um estojo com tesoura e pinça; uma placa de Petry.

Desprezar o meio de transporte segurando o tecido com uma pipeta Pasteur;

Dica: se o material for grande, cortá-lo na placa de Petry retirando as partes queimadas e pintadas bem como fragmentos da cápsula e coágulos sanguíneos;

Lavar os pedaços, passando-os pelos quatro Beckers com solução de Hank's + antibiótico.

Dica: durante a lavagem do material, a solução utilizada deverá permanecer o mais resfriada possível, objetivando manter o meio livre da ação bacteriana. Isto é, com a baixa temperatura estaremos oferecendo condições desfavoráveis à proliferação bacteriana ao mesmo tempo em que são favoráveis à conservação do tecido.

Colocar o material no frasco pesado previamente e pesar o material, descontando o peso do frasco. Posteriormente, acrescentar a solução de Hank's + Kana e armazenar na geladeira.

Colocar na capela: um frasco pequeno com tampa preta; uma seringa 10 mL; um filtro Millex; um Erlenmeyer grande; uma barrinha magnética; solução de Hank's + antibiótico (deve permanecer no banho-maria).

Calcular a quantidade de colagenase a ser usada a partir do peso do tecido, tarar um Becker pequeno e, pesar a colagenase (7,5 mg/g de Tecido).

Calcular a quantidade de Hank's + antibiótico necessária para a diluição da colagenase, a partir do volume de tecido, na proporção de 2,5 mL /g de Tecido.

No Erlenmeyer colocar a colagenase acrescentada de parte da solução de Hank's, homogenizando com uma pipeta. Colocar uma barrinha magnética e agitar por aproximadamente 30 minutos a 37°C. Filtrar a colagenase em Millex com o auxílio da seringa e acrescentar o resto do volume da solução de Hank's.

Dica: em caso de volumes muito pequenos de solução (10-15 mL), pode-se usar todo o volume de Hank's na diluição da enzima.

Colocar na capela: um estojo com pinça e tesoura; uma placa de Petry; um Becker ou frasco para desprezar o meio de transporte; um Erlenmeyer de tripsinização; uma barrinha magnética;

uma colherinha. Desprezar o meio de transporte que contém os fragmentos lavados. Com o frasco na horizontal, colocar os fragmentos na placa de Petry. Com a pinça e tesoura triturar o tecido e com o auxílio da colherinha, colocar o material triturado no Erlenmeyer, bem como a collagenase (acondicionada no Banho Maria a 37 °C) e a barrinha magnética; Fechar o Erlenmeyer com o papel alumínio que estava na boca do mesmo; (pode-se colocar uma fita ao redor do papel alumínio para melhor fixá-lo) e colocar sob agitação por 2 horas a 37 °C.

Dica: ao abrir o Erlenmeyer na capela, deve-se ter o cuidado para não tocar na porção interna do papel alumínio, pois este está esterilizado e será utilizado para tapar o Erlenmeyer durante a agitação. Durante todo o processo de lavagem e trituração do tecido, deve-se ter o cuidado de não tocar com as mãos no mesmo, sujeito a contaminações. Outro cuidado importante é com o tempo desperdiçado na trituração, passo no qual as células ficam expostas ao ambiente sem a devida manutenção de suas condições basais, proporcionada pela solução de Hank's. Durante a dissociação enzimática, a temperatura deverá permanecer em torno dos 37° C proporcionando, assim, condições ótimas à ação enzimática.

Antes do final da dissociação (45 minutos), colocar na capela: filtros com malha de 250 e 150 µm encaixados em Erlenmeyers; tubos Corn esterilizados (tampa laranja. Ligar a UV por 30 minutos;

Ao Erlenmeyer de tripsinização acrescentar igual volume de Hank's utilizado para a dissociação enzimática, a fim de inibir a ação da collagenase (poderá ser medido em um tubo cônico, pois não requer precisão de volume). Colocar o meio de cultura de interesse no Banho Maria a 37° C. Despejar a solução contendo o tecido dissociado no filtro de 250 µm com cuidado e vagarosamente, para não transbordar a malha. Verter o filtrado na membrana de 150 µm. Distribuir o filtrado nos tubos Corns, não encher muito (40 mL / tubo máx.).

Centrifugar por 10 minutos a 1.500 rpm. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em solução de Hank's (15 - 20 mL), homogeneizar e juntar todo o volume de suspensão em um único tubo (em um terceiro tubo). Centrifugar por 10 minutos a 1.500 rpm. Preparar o filtro de 60 µm, verificando se a rosca está bem apertada, e colocando-o em um tubo Corn, com um copo de seringa acoplada ao filtro.

Dica: deve-se ter o cuidado ao desenrolar o filtro de 60 µm, pois o papel que o envolve será utilizado para forrar a base da capela ao abri-lo.

Colocar na capela dois Beckers pequenos com Hank's para lavar a membrana. Retirar os tubos da centrífuga e desprezar o sobrenadante. Ressuspender o pellet em solução de Hank's, homogeneizar e filtrar com o filtro de 60.

Dica: o volume de Hank's utilizado deverá ser de quatro vezes o tamanho do pellet, ± 25 mL.

Abrir o filtro sobre o papel alumínio e retirar a membrana com o auxílio de pipetas Pasteur, fazendo uma trouxinha. Lavar a membrana nos Beckers com solução de Hank's. Colocar a suspensão celular da lavagem da membrana em tubo Corn e centrifugar todos os tubos por 10 minutos a 1.500 rpm.

Colocar na capela as placas de Petry e em um Becker médio colocar o meio de cultura de interesse. Separar bandejas para colocar placas e garrafas.

Retirar os tubos da centrífuga, desprezando o sobrenadante e ressuspender as células epiteliais no meio de cultura (meio 199).

Dica: preparo do Meio 199:

1 pacote de pó MEIO199

1 litro de água Milli-Q

10 mL de Kanamicina

0,35 g de Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3)

1 Becker de 1 litro

1 barra magnética grande

Colocar em um Becker de um litro a Kanamicina, o meio 199, o bicarbonato e parte da água. Agitar no agitador magnético até homogeneizar. Acertar o pH para 7,2 e completar o volume para um litro. Filtrar para esterilização com filtro a vácuo (membrana de $0,22 \mu\text{m}$). Suplementar com soro bovino fetal na concentração desejada (5 a 10%).

Colocar uma gota da suspensão em um tubo de ensaio e fazer a contagem das células (20 μL corante azul de tripan + 20 μL suspensão celular) e olhar no microscópio o volume de suspensão que deve ser plaqueado em cada placa. O volume a ser plaqueado é 1×10^5 células/mL. Partindo dessa densidade, calcula-se o volume de suspensão (mL) a ser plaqueado nas placas.

Dica: células contadas no hemocítômetro: 4+6+2+5

3+7+3+2: soma total = 32. Divide-se por 8 =

4, este número será multiplicado por 2 que representa o fator de diluição do corante resultando em 8. Teremos desta forma, 8×10^4 células/mL; no entanto, o volume a ser plaqueado é 1×10^5 cél/mL logo: 8×10^4 cél./mL = $0,8 \times 10^5$ cél/mL. Desta forma, calcula-se o volume a ser plaqueado por meio de uma regra de três. Por exemplo:

$0,8 \times 10^5$ cél.----- 1 mL

$1,0 \times 10^5$ cél.----- X

X = 1,25 mL. Este será o volume a ser plaqueado para que tenhamos a densidade celular de 1×10^5 cél/mL em cada placa.

Distribuir em placas de plástico estéreis de cultura de 35 mm na concentração de 1×10^5 células/mL e incubar em estufa a 37°C com atmosfera úmida e adição automática de 3% CO_2 .

Referências:

SPRITZER, P. M., I. S. SILVA, et al. 1995. Culture of adult human prostatic epithelial cells: A simplified method for obtaining primary cultures. Med Sci Res 23: 379-381.

Manutenção das células de cultura primária da tireoide humana:

As células em cultura devem ser observadas a cada 24 horas em microscópio invertido, antes de ser efetuada a troca do meio de incubação. A primeira troca do meio de cultura das células deve ser realizada 24 horas após a semeadura para facilitar a adesão das células nas placas, sendo este considerado o dia zero. O meio deve ser trocado para F-12 suplementado com glutamina, bicarbonato de sódio, soro de vitelo, TSH e antibiótico (Kanamicina). Antes de atingir a confluência, as células devem ser privadas do meio com TSH durante, no mínimo, 48 horas. Após este período, as células devem ser separadas em grupos e tratadas em diferentes condições.

CAPÍTULO 9

CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

Claudimar Sidnei Fior, Elisete Maria de Freitas, Aline Marjana Pavan e Marelise Teixeira

A tecnologia de cultura de células, protoplastos e tecidos de plantas constitui uma das áreas de maior êxito da biotecnologia. Após meio século de progresso, conquistou destacada posição na propagação comercial e industrial de plantas.

A técnica permite a preservação de material genético *in vitro*, vindo a somar com as demais ferramentas utilizadas atualmente na conservação de espécies, ou mesmo genótipos específicos. Possibilita a conservação de plantas ou tecidos de diferentes procedências, em condições de crescimento mínimo ou associado à criopreservação, para uso no melhoramento genético, para evitar a extinção de espécies ou mesmo, para intercâmbio entre instituições sem os riscos de disseminação de pragas ou doenças.

A aplicação da técnica de cultura de tecidos vegetais exige uma sequência de procedimentos conforme descrito a seguir:

1. Preparação de solução estoque
2. Preparação do meio de cultura
3. Obtenção e desinfestação dos explantes
4. Estabelecimento dos explantes e condições de incubação
5. Manutenção das plantas matrizes

9.1 PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES ESTOQUE PARA O MEIO MS

As soluções estoque são necessárias quando os meios são utilizados com relativa frequência (um ou mais litros por semana), pois agilizam os trabalhos. O volume e a concentração de cada solução dependerão da demanda do laboratório. Assim, quando o consumo é baixo, diminui-se a concentração e/ou o volume das soluções estoque para que a solução não permaneça armazenada por longo período. Quando somente uma pequena quantidade de meio é necessária, ou quando o meio é utilizado com pouca frequência, é recomendado pesar e dissolver diretamente os reagentes para cada preparo.

As soluções estoque que compõem o meio MS (principalmente macro e micronutrientes) denominam-se A, B, C, D, E e F. O processo de pesagem dos elementos básicos dessas soluções é realizado uma única vez para a preparação escalonada de dezenas de litros, seguindo as concentrações indicadas na tabela 1.

Tabela 1: Componentes de cada uma das soluções estoque do Meio MS com as respectivas quantidades para as concentrações de 10 e 100 X.

Solução	Componentes	Sol. estoque conc. 100 X (mg L ⁻¹)	Sol. estoque conc. 10 X (mg L ⁻¹)
A	NH ₄ NO ₃	165000	16500
B	KNO ₃	190000	19000
C	H ₃ BO ₃	620	62
	KH ₂ PO ₄	17000	1700
	KI	83	8,3
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25	2,5
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,5	1,25
D	CaCl ₂ ·2H ₂ O	44000	4400
E	MgSO ₄ ·7H ₂ O	37000	3700
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	2230	223
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	860	86
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,5	1,25
F	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	3720	372
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2780	278

Passos a serem seguidos para o preparo das soluções estoque do Meio MS – volume de um litro:

1. Para a diluição dos componentes, deve ser utilizada água destilada.
2. Os reagentes devem apresentar a máxima pureza possível.
3. A quantidade de cada componente para o preparo de um litro de solução estoque depende da concentração a ser escolhida e deve ser seguida conforme indicação na tabela 1.
4. Quando a solução estoque contém Fe, alguns passos devem ser seguidos a fim de evitar a formação de precipitados na solução:

- O $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ deve ser dissolvido em água deionizada a 50% do volume final da solução, deixando agitar por 10 minutos.

- Posteriormente, a mistura deve ser aquecida até 50 a 70 °C, devendo ser acrescentado, lentamente o $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, mantendo agitação.

Após a completa dissolução dos cristais, completa-se a solução para o volume final preestabelecido.

Para melhor conservação da solução de Fe, deve-se envolver o frasco com papel alumínio evitando, assim, a entrada de luz. O mesmo deve acontecer com a solução de vitaminas.

5. Logo após a dissolução, as soluções estoque devem ser armazenadas em refrigerador (entre 1 e 5 °C), retirando-as somente momentos antes da preparação do meio.

6. Quando preparadas e armazenadas de forma adequada, as soluções podem permanecer até seis meses sem que seja comprometida a qualidade do meio. No entanto, há possibilidade de proliferação de microrganismos nas soluções, o que pode ser observado pela presença de colônias, visíveis através da parede do frasco.

Dica: a sacarose e o ágar devem ser dissolvidos somente no momento da preparação do meio e não devem ser acrescentados às soluções estoque. Além da sacarose e do ágar, recomenda-se que vitaminas, aminoácidos e mio-inositol não sejam armazenados em forma de solução, e sim pesados no momento da preparação do meio.

9.2 PREPARO DO MEIO DE CULTURA MS (MURASHIGE E SKOOG)

Dentre os vários tipos de meio de cultura que existem, o meio MS, proposto por Murashige e Skoog (1962) é o mais utilizado. Para o seu preparo, é necessário adquirir os componentes listados na tabela 2. A quantidade necessária de cada um dos componentes para o preparo de um litro de meio também é indicada na tabela 2.

Existe a opção da aquisição de fornecedores de produtos químicos, o meio MS como pré-misturas, em quantidades suficientes para preparar vários litros de meio. Possibilita economia com mão de obra e com local para armazenamento de reagentes e soluções. No entanto, não é possível modificar a proporção dos seus componentes.

Recomenda-se que:

O meio de cultura seja preparado, preferencialmente, alguns dias antes da incubação.

Quando preparado o meio de cultura, as plantas matrizes a serem utilizadas para a obtenção dos explantes já tenham sido selecionadas, pois o meio não pode ficar armazenado por muito tempo.

Tabela 2: Componentes do meio de cultura MS (Murashige e Skoog) com a respectiva quantidade para o preparo de um litro de meio.

Componentes		MS (mg L ⁻¹)
Macronutrientes		
CaCl ₂ . 2H ₂ O	Cloreto de cálcio dihidratado	440
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio	170
KNO ₃	Nitrato de potássio	1900
MgSO ₄ . 7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado	370
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amônia	1650
Micronutrientes		
CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloreto de cobalto hexahidratado	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0,025
H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6,2
KI	Iodeto de potássio	0,83
MnSO ₄ 4H ₂ O	Sulfato de manganês tetra hidratado	22,3
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sódio dihidratado	0,25
ZnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de zinco tetra hidratado	8,6
FeEDTA:		
Fe(SO ₄).7H ₂ O	Sulfato ferroso heptahidratado	27,8

Componentes		MS (mg L ⁻¹)
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	Ácido etilendiaminotetraacético, sal dissódico dihidratado	37,3
Componentes Orgânicos:		
Ácido nicotínico		0,5
Glicina		2,0
Mio-inositol		100
Piridoxina.HCl		0,5
Tiamina.HCl		0,1
Sacarose (g/l)		30

Cada laboratório deve optar em preparar o meio de cultura com o uso de soluções estoque ou não. **Quando não são preparadas soluções estoque** para o preparo do meio, ou seja, quando parte-se diretamente dos sais, devem ser seguidos os passos descritos a seguir:

1. Pesam-se todos os componentes, de acordo com a receita (Tabela 2) e a quantidade de meio a ser preparada.

2. Logo em seguida, todos os componentes devem ser dissolvidos em água deionizada. Importante que seja utilizado algum recipiente com volume preciso (como provetas ou balões volumétricos).

3. Concluída a dissolução de todos os produtos químicos e a sacarose, acrescenta-se o ágar e corrige-se o pH.

Dica: O ajuste do pH pode ser realizado com solução 0,5 mol de ácido clorídrico (HCl) quando este estiver muito alto e precisa ser reduzido. Quando ocorrer o inverso, ou seja, o pH estiver muito baixo, o ajuste deve ser realizado com hidróxido de sódio (NaOH), na mesma concentração.

A forma mais rápida e prática para o preparo do meio de cultura é através da utilização das soluções estoques (conforme detalhado no item acima). Neste caso procede-se da seguinte forma:

1. Pipetar as alíquotas de cada uma das soluções, de acordo com a concentração e a quantidade de meio a ser preparada. Por exemplo, se a definição é o preparo de um litro de meio, devem ser pipetados 100 mL da solução estoque A na concentração 10 X ou de 10 mL quando a concentração da solução for 100 X.

2. Então deve ser acrescentado o mio-inositol, o carvão e a caseína (opcionais) e a sacarose, mantendo em agitação no agitador magnético.

3. Depois de misturadas todas as soluções estoque, o mio-inositol, o carvão, a caseína e a sacarose, acrescenta-se água deionizada para completar o volume final previamente definido e corrige-se o pH (recomenda-se que seja 5,8).

4. Para finalizar, independente do método seguido (com uso de solução estoque ou não), deve ser acrescentado o ágar.

5. A solução deve ser aquecida até a total dissolução (recomenda-se utilizar chapa aquecedora ou forno de micro-ondas) onde o meio atinja 90 a 95 °C.

6. Tão logo alcance esta temperatura, distribui-se todo o volume nos frascos de cultivo (tubos de ensaio, por exemplo), fechando-os com tampa autoclavável ou papel alumínio. É recomendado que seja distribuída a mesma quantidade de meio em cada frasco.

7. Embora tenha sido aquecido, o meio ainda necessita ser autoclavado por 15 minutos a 121 °C.

Este procedimento deve ser realizado tão logo o meio seja distribuído nos frascos. Em casos excepcionais, pode-se autoclavar no dia seguinte ao prepare; no entanto, isso deve ser evitado, pois colônias de contaminação em desenvolvimento podem liberar toxinas, além de consumir parte dos compostos.

8. Depois de esterilizados, os meios estão prontos para a incubação dos explantes (segmentos nodais, sementes, embriões zigóticos, meristemas e outros). Contudo, se necessário, os meios podem ficar armazenados por uma a duas semanas em local com temperatura amena, limpo e sem luz.

Referência:

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

9.3 OBTENÇÃO E DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES

Terminado o preparo do meio de cultura, é preciso iniciar o processo de desinfestação dos tecidos vegetais a serem incubados. Isso porque as plantas em desenvolvimento estão em contato com inúmeros microrganismos. A maioria deles se desenvolve na superfície de ramos, folhas e demais tecidos sem lhes causar qualquer alteração. Contudo, ao estabelecer um tecido vegetal *in vitro*, as condições ambientais de elevada umidade, nutrientes disponíveis e alta concentração de açúcar propicia o crescimento destes microrganismos superando e, na maioria das vezes, impedindo a regeneração e desenvolvimento do explante. Por essa razão, o cultivo de tecidos vegetais *in vitro* deve ser feito em condições de máxima assepsia possível.

Em função disso, recomenda-se que:

A planta matriz, cujas condições de cultivo estão descritas no item 5, deve ser cultivada com excelentes condições fitossanitárias para que os explantes fornecidos conttenham o mínimo de propágulos de microrganismos;

Sejam utilizadas substâncias como o etanol e compostos a base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e de cálcio para a desinfestação dos explantes que serão incubados. Estas substâncias possuem ação germicida e são as mais utilizadas nos processos de desinfestação.

Observações:

a. A dificuldade maior nesta etapa da cultura de tecidos vegetais reside em obter tecido descontaminado sem conduzi-lo à morte quando isolado.

b. São determinantes os pré-tratamentos aplicados na planta matriz para o sucesso dessa etapa do trabalho, principalmente no que se refere aos microrganismos endógenos. Assim, uma das medidas que pode ser adotada para reduzir os riscos de contaminação é a aplicação de fungicidas por alguns dias antes da obtenção dos explantes.

c. Problemas crônicos de contaminação podem ser amenizados adicionando-se fungicidas e/ou bactericidas ao meio de cultivo. Porém, esta prática nem sempre dá bons resultados, principalmente quando não são adotados critérios técnicos para a escolha dos antibióticos, em função do tipo de organismo a ser controlado. Manejos adequados durante o tratamento da planta matriz oferecem melhores resultados e diminuem o risco ao manipulador.

d. A desinfestação apenas permite a limpeza superficial do explante, sem eliminar patógenos que estejam localizados internamente aos tecidos.

e. A limpeza do ambiente e dos materiais é muito importante para viabilizar uma desinfestação mais eficiente.

Para a desinfestação dos explantes a serem incubados devem ser seguidos os procedimentos listados a seguir:

1. Coleta dos ramos da planta matriz e remoção de parte das folhas. Para a coleta, devem ser utilizados, preferencialmente, tesoura esterilizada.

2. No caso da utilização de segmentos nodais ($\pm 1,0$ cm), os ramos podem ser padronizados em $\pm 5,0$ cm. Estes devem conter ao menos uma gema.

Dica: é importante que os ramos apresentem tamanho maior ao explante que será incubado para evitar danos aos tecidos com os tratamentos de desinfestação. Depois de desinfestados, no momento da incubação, as extremidades do segmento devem ser eliminadas, deixando-o no tamanho adequado. Quando forem incubados meristemas, os procedimentos são semelhantes, ou seja, devem ser mantidos ramos maiores, as folhas maiores também devem ser removidas, no entanto, a remoção total das folhas que envolvem o meristema deve ser realizada somente depois dos procedimentos de desinfestação e no momento da incubação.

3. Os ramos devem ser submetidos à lavagem em água corrente por cerca de 20 minutos para promover a limpeza superficial.

Dica: o tempo de lavagem pode ser diferenciado dependendo de cada espécie, ou mesmo do tipo de material a ser incubado (segmentos nodais, sementes, embriões ou meristemas).

4. Após, procede-se a retirada de parte das folhas e do caule, que não serão utilizados como explantes, reduzindo assim a quantidade de inóculos.

Recomendações:

1. Antes de iniciar os procedimentos de incubação, a capela de fluxo laminar deve ser previamente limpa com álcool etílico 70%.

2. Todo o material (pinças, bisturis, placas de petri) a ser utilizado no procedimento de incubação deve ser previamente autoclavado.

3. Quando os materiais forem distribuídos na câmara de fluxo de ar, estes devem receber jatos de álcool etílico (70%). Então, a luz ultravioleta é mantida ligada por 20 minutos, período em que ninguém deve permanecer na sala de assepsia.

4. A seguir, em capela de fluxo laminar, os ramos restantes são imersos em diferentes concentrações de substâncias (Tabela 3) que podem contribuir para a desinfestação.

A seguir, na câmara de fluxo laminar, os ramos são imersos nas soluções de desinfestação, (Tabela 3), conforme o protocolo a ser seguido. De maneira geral, como procedimento padrão, recomenda-se iniciar pela imersão em álcool etílico que, além da ação germicida, é surfactante e, quando aplicado inicialmente, facilita ação dos outros produtos. Graduações de etanol superiores a 80% podem desidratar os tecidos com facilidade, portanto, a concentração recomendada é 70%.

5. Assim, a primeira imersão deve ser em solução contendo álcool etílico, sendo a concentração e o tempo definidos conforme a sensibilidade dos tecidos da planta. Em média, para a maioria dos tecidos, este tempo pode variar de um a dois minutos.

Dica: tecidos tenros, que oxidam facilmente, são mergulhados em etanol 50 a 70% por alguns segundos. Excepcionalmente, em se tratando de sementes, cujo tegumento será removido após a desinfestação, pode-se manter em etanol 80% por mais tempo (5 a 10 minutos).

Tabela 3: Substâncias desinfestantes comumente usadas em cultivo de tecidos de plantas com a respectiva concentração a ser utilizada e tempo mínimo e máximo de exposição.

Desinfestante	Concentração (%)	Tempo de exposição (minutos)
Hipoclorito de cálcio	9-10	5-30
Hipoclorito de sódio	0,5-5	5-30
Água oxigenada	3-12	5-15
Álcool etílico	70-95	1-15
Nitrato de prata	1	5-30
Cloreto de mercúrio	0,1-1	2-10

6. Como procedimento padrão na maioria dos laboratórios, após o tratamento com etanol, os tecidos vegetais são mergulhados em solução de hipoclorito de sódio ou cálcio com 1,0 a 2,5% de cloro ativo.

Dicas:

- O hipoclorito de sódio é facilmente encontrado em formulações comerciais de água sanitária.

- As concentrações mais comuns variam de 0,5 a 2,0% de cloro ativo e o tratamento dura até 50 minutos, no caso de tecido lignificado, embora o tempo mais utilizado para imersão em hipoclorito seja de 10 a 15 minutos

- O hipoclorito de cálcio apresenta a vantagem de ser menos tóxico para os tecidos que o sódio.

7. É importante que sejam adicionados à solução de hipoclorito, algumas gotas de detergente concentrado. Com isso, diminui-se a tensão superficial do tecido. Esta medida aumenta a penetração do cloro e, conseqüentemente a eliminação de propágulos de microrganismos. O mais utilizado é o Tween 20, sendo necessárias apenas 4 a 10 gotas por litro de solução.

8. Após o tratamento completo de desinfestação, ainda na capela de fluxo laminar, os tecidos devem ser lavados em água autoclavada e destilada por três a cinco vezes. Desta forma, elimina-se a maior parte do resíduo do cloro, pois a manutenção do mesmo, junto ao explante, pode impedir a regeneração.

Observações:

a. Em geral, utilizam-se concentrações bastante elevadas das substâncias para desinfestação, o que implica em curto tempo de tratamento. Pode-se, entretanto, trabalhar com concentrações mais baixas, devendo-se, por isso, aumentar o período de exposição.

b. Considerando a sensibilidade do tecido a ser desinfestado, manipula-se a concentração da solução e tempo de exposição de maneira inversamente proporcional.

c. Explantes cobertos de tricomas ou estruturas equivalentes requerem tratamentos mais intensivos. Tecidos muito tenros e explantes de pequeno tamanho devem ser desinfestados com maior cuidado.

d. Os cloretos de mercúrio e benzacônio são possibilidades de desinfestação. O cloreto de mercúrio é bastante tóxico e utilizado em concentrações inferiores aos hipocloritos. O cloreto de benzacônio é pouco tóxico aos tecidos e pode ser utilizado em concentrações e tempos semelhantes aos hipocloritos.

e. Com todos esses cuidados, ainda podem permanecer propágulos de microrganismos viáveis, o que será percebido com alguns dias de incubação. Em geral, a contaminação por fungos manifesta-se nos primeiros dias após o estabelecimento. Contaminações bacterianas, entretanto, surgem mais tardiamente, em cerca de uma a três semanas após. Contudo, em alguns casos, principalmente em tecidos de plantas lenhosas, colônias bacterianas surgem após 30 a 40 dias desde a incubação.

9.4 ESTABELECIMENTO DOS EXPLANTES E CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO

O isolamento dos explantes deve ser realizado com a máxima higiene e desinfestação, conforme descrito acima, tanto do ambiente, como dos tecidos. Esta operação é realizada em câmara de fluxo de ar laminar estéril. A forma como o explante é manipulado determina o sucesso da regeneração do tecido, especialmente quando se trabalha com meristemas ou outros explantes de pequeno tamanho. Recomenda-se que sejam tomados os seguintes procedimentos:

1. Os explantes já desinfestados são acondicionados em placa de petri. Com o uso de bisturi novo, as suas extremidades devem ser removidas até tamanho adequado, que pode variar com o tipo de explante e a espécie a ser propagada. Este procedimento permite a retirada das porções do tecido que foi lesionado ou oxidado durante o processo de desinfestação.

2. A seguir, com o uso de pinça de comprimento compatível com o frasco, deve ser realizada a incubação do(s) explante(s) no frasco com o meio de cultivo.

Dica: é de extrema importância que as pinças e os bisturis utilizados sejam flambados ou esterilizados em esterilizadores infravermelho, conforme descrito acima a cada explante incubado. Esta medida evita que a presença de patógenos em determinado explante seja disseminado para outros.

3. Terminada a incubação, o frasco deve ser fechado com papel alumínio e papel pardo ou com tampa autoclavável.

Observação: Quando forem utilizados frascos maiores (vidros de 200 mL, por exemplo) há uma quantidade mínima de explante a ser inoculada por frasco de meio, pois a densidade afeta a diferenciação de células na morfogênese ou proliferação de brotos. Quanto menor o tamanho de um explante ou o número de explantes em uma determinada quantidade de meio, maior deve ser a disponibilidade de nutrientes aos tecidos cultivados. Por outro lado, um alto volume de meio por explante pode não resultar na melhor taxa de propagação.

Para o estabelecimento dos explantes devem ser tomados alguns cuidados especiais:

1. Os materiais utilizados (pinças, agulhas histológicas, cabos de bisturi, placas de petri, entre outros) para o estabelecimento dos explantes devem ser autoclavados previamente.

2. Os utensílios metálicos utilizados durante a manipulação e corte dos tecidos devem ser mergulhados em etanol 96%, e flambados periodicamente durante o processamento do material. Esta operação impede que a contaminação presente em uma porção do tecido seja disseminada para os demais explantes isolados durante a preparação e a incubação.

Dependendo da disponibilidade no laboratório, ao invés de flambar, devem ser utilizados esterilizadores infravermelhos. Estes têm a vantagem de diminuir os riscos de acidentes aos usuários.

3. Os cortes nos tecidos deverão ser executados com bisturis novos, bem afiados. Assim, o isolamento do explante ocorre sem injúrias excessivas.

Observação: Em geral, há um tamanho ótimo de explantes para iniciar uma cultura de tecidos. Explantes muito pequenos não sobrevivem bem em cultura. Porém, explantes grandes podem ser difíceis de descontaminar e de manipular.

4. Explantes muito pequenos, como ápices caulinares, embriões, etc, são isolados com o auxílio de estereomicroscópios. A manipulação desse equipamento deverá ser feita no interior da câmara de fluxo estéril, a qual deverá passar por uma prévia desinfestação, visando-se com isso evitar a introdução de inóculos e, conseqüentemente, a contaminação dos explantes.

5. Como forma de auxiliar na manutenção da assepsia do laboratório, algumas regras devem ser respeitadas. A principal delas é a restrita utilização dos equipamentos e utensílios do laboratório, ou seja, todo material utilizado para os trabalhos com cultivo de tecidos, não deve ser manipulado para outras finalidades.

6. Outra prática que favorece a manutenção da assepsia é o uso obrigatório de aventais limpos, os quais não devem ser retirados do laboratório. Em algumas situações, em que a casa de vegetação é próxima ao laboratório, recomenda-se o uso de aventais específicos para cada ambiente.

7. Durante dias chuvosos ou com elevada umidade relativa no ar, os riscos de introdução de microrganismos no laboratório são potencializados. Uma forma de evitá-los é restringir ao máximo a circulação de pessoas no laboratório durante esses períodos, principalmente naqueles laboratórios abertos à visitação.

8. Quando terminada a incubação, os explantes devem ser mantidos em salas de crescimento (Figura 2) onde devem prevalecer a condições descritas a seguir.



Figura 2: A. Explante com brotação na sala de crescimento. Este foi incubado em meio MS com adição de carvão ativado (Imagem: Maíra Filter). B. Plantas em cultivo *in vitro* em sala de crescimento (Imagem: CSFior).

8.1. A temperatura média das salas de crescimento é de 25°C. As plantas tropicais e subtropicais tendem a ser cultivadas em temperaturas levemente mais altas do que espécies temperadas (média de 27°C). Quando uma variação diurna-noturna é desejada, normalmente, adota-se 25 °C durante o dia e 20 °C à noite, ou 28 °C/24 °C.

8.2. Em geral, para indução de parte aérea a região do azul do espectro é crítica e a luz vermelha não apresenta efeitos. As lâmpadas recomendadas para iluminação das culturas *in vitro* são do tipo fluorescentes brancas fria, Plantilux® ou com emissões balanceadas nas regiões do azul (430 nm) e vermelho (660 nm). Assim, em cultivo de tecidos, quando se objetiva a multiplicação de plantas, as lâmpadas devem conter emissões nesses espectros.

8.3. As condições de incubação podem variar muito. Escuro total ou intensidades de luz reduzidas são úteis nos primeiros dias após o isolamento para reduzir a oxidação fenólica. O início da cultura no escuro também é indicado para evitar estresse em alguns explantes, como meristemas de rizomas, bulbos e raízes.

8.4. A luz de baixa irradiação na cultura de tecidos vegetais é utilizada pelas seguintes razões:

- a) o fornecimento de altos níveis de luz artificial é caro e gera calor não desejado;
- b) as culturas em ambientes lacrados tornam-se superaquecidas em altas irradiações devido ao efeito estufa;

c) a tecnologia de cultivo de tecidos vegetais evoluiu usando tecidos não autotróficos supridos com carboidrato.

8.5. Em geral, 16 horas de fotoperíodo tem mostrado ser satisfatório para várias espécies de plantas, utilizando-se lâmpadas fluorescentes branco fria, com intensidade luminosa de 1000 a 2000 lux.

Observações:

a. Para ótimo crescimento e desenvolvimento dos explantes *in vitro*, as exigências em fotoperíodo das culturas devem ser satisfeitas. O início de determinado processo morfo genético só se manifesta quando as culturas estão expostas a um adequado comprimento do dia.

b. O fotoperíodo influencia as plantas de duas maneiras: uma pela regulação da quantidade de energia radiante captada e através de um mecanismo controlador, pelo qual as plantas são capazes de reconhecer mudanças no ambiente. Outra, pela duração do dia, que pode influenciar níveis de reguladores do crescimento naturais dentro de tecidos de plantas cultivadas.

c. Uma boa aeração parece ser necessária para cultivo *in vitro*. As plantas produzem oxigênio, gás carbônico, etileno, aldeído e outros compostos voláteis. Na natureza, estes compostos são dissipados na atmosfera. Em cultivo de tecidos, esses gases podem ficar retidos no frasco, alterando o desenvolvimento das plantas. A acumulação de CO₂ em altas concentrações conduz à anaerobiose, fermentação e produção de álcoois. Em alguns casos, altas concentrações de gás carbônico induzem distúrbios no crescimento e desenvolvimento da planta *in vitro*.

9.5 MANUTENÇÃO DAS PLANTAS MATRIZES

Os resultados obtidos no cultivo *in vitro* podem ser influenciados pela forma em que as plantas matrizes são tratadas e pelo ambiente em que elas crescem. Sabe-se que o melhor explante é proveniente de plantas sadias e vigorosas que são mantidas em estado ativo de crescimento, sem estresse.

Há vários aspectos relacionados com a planta matriz que podem influenciar para o sucesso no cultivo *in vitro*, sendo os principais:

1. Adequada nutrição mineral da planta matriz, o que deve ser feito de acordo com a exigência de cada espécie e estágio vegetativo.
2. Plantas matrizes com pragas ou doenças devem ser rejeitadas, pois os patógenos que as infectam são capazes de causar a morte da cultura *in vitro*.
3. Recomenda-se que as plantas matrizes sejam mantidas em salas de crescimento sob condições controladas. Assim, as brotações para a obtenção dos explantes são mais uniformes e com menos possibilidades de estarem contaminadas por patógenos. Plantas que crescem no campo estão sujeitas a altas taxas de contaminação.

Observações:

a. Em geral, a infecção da planta matriz reduz o número e tamanho das brotações. A produção de brotações axilares e o número de plantas finalmente estabelecidas tendem a ser menores em cultivos infectados.

b. Algumas associações patógeno-hospedeiro não apresentam sintomas em casa de vegetação ou no campo, mas podem resultar em pobre crescimento *in vitro*.

c. Espécies herbáceas são facilmente desinfestadas. Já com espécies lenhosas têm sido experimentadas dificuldades.

4. A melhor época para realizar a coleta dos explantes é, usualmente, quando as plantas matrizes estão produzindo novas e vigorosas brotações (ou seja, em regiões de clima temperado, na primavera e início do verão), mas muitas exceções têm sido observadas;

5. Pode-se induzir o crescimento de brotações juvenis (Figura 2) realizando podas drásticas das plantas matrizes. Quando for iniciado o cultivo de brotações, pode ser também vantajoso podar as plantas para obter uma boa quantidade de novas brotações contendo gemas jovens, menores e menos contaminadas. Esta medida é importante porque os explantes retirados de órgãos recentemente formados são mais capazes de gerar o crescimento e a organogênese *in vitro*;



Figura 2: Brotação juvenil emitida após poda drástica em *Rubus idaeus L.* cultivado em casa de vegetação (Imagem: CSFior).

6. Reguladores de crescimento, como giberelinas e citocininas, podem ser aplicados nas plantas matrizes intactas antes da retirada dos explantes. Estes, com frequência induzem algum grau de rejuvenescimento em plantas lenhosas, facilitando a cultura *in vitro* e induzindo, com frequência, a quebra de dormência de gemas axilares e aumentando o número de brotos dos quais os explantes podem ser tirados. O uso das citocininas em plantas matrizes pode aumentar o número de gemas, propiciando mais brotos para retirada de explantes. A dosagem ótima de reguladores de crescimento para induzir morfogênese frequentemente varia de acordo com o tamanho e o tipo de explante de uma única planta.

CAPÍTULO 10

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

Adriana Ambrosini da Silveira, Camille Eichelberger Granada

As bactérias do solo que estabelecem associação benéfica com as plantas são comumente denominadas PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), as quais são naturalmente encontradas na rizosfera – porção de solo intimamente associado às raízes. As PGPRs podem estabelecer relações do tipo endofítica (entre as células do tecido radicular), associativa (na superfície radicular ou muito próxima a ela) ou simbiótica (através da formação de nódulos fixadores de nitrogênio (N) nas raízes). Diferentes protocolos são indicados para o isolamento específico de endofíticos, associativos e simbióticos, assim como diferentes meios de cultura e procedimentos são requeridos para a obtenção de determinados grupos de bactérias, como as formadoras de endósporos de resistência ao estresse. Além disso, os meios de cultura também podem ser usados na busca por determinadas atividades. Os meios de cultura sem adição de N favorecem a obtenção de diazotróficos (fixadores de N atmosférico - N_2), mas não a garantem. A verificação da presença da atividade de fixação de N deverá ser realizada por outros métodos, como por exemplo, o ensaio de redução de acetileno *in vitro* e dosagem da atividade da enzima responsável pelo processo de fixação, a nitrogenase.

A seleção de diazotróficos é um dos procedimentos de isolamento de PGPRs mais utilizados devido à importância do N para a produtividade agrícola. Entretanto, diversas outras características de promoção de crescimento vegetal podem ser analisadas entre os isolados, como a produção de fito-hormônios e a solubilização de minerais importantes como fósforo e ferro. Uma mesma PGPR pode apresentar uma ou mais dessas características, mas o número ou o tipo de característica não assegura que o isolado seja uma “boa” PGPR. A identificação dos isolados é etapa fundamental e o sequenciamento do gene 16S rRNA auxilia na definição de gêneros e até mesmo espécies, principalmente quando em conjunto com outras características como morfologia e coloração da colônia, reação de Gram, capacidade de esporulação, entre outros. Contudo, devido à complexidade da interação entre bactérias e plantas, experimentos de inoculação em câmaras de crescimento (ou casas de vegetação) e ensaios a campo são indispensáveis para avaliação da efetiva promoção de crescimento vegetal por um isolado bacteriano.

10.1 ISOLAMENTO DE DIAZOTRÓFICOS ENDOFÍTICOS DE RAIZ

O processo de isolamento de bactérias endofíticas envolve a desinfestação das raízes para que o maior número possível de bactérias aderidas à superfície radicular seja eliminado. Suspensões contendo raízes picotadas são posteriormente inoculadas em meios de cultura sem N para a obtenção de diazotróficos. Esse procedimento pode ser aplicado aos mais variados tipos de plantas, mas alterações no volume das soluções de lavagem podem ser necessárias conforme variações no tamanho e morfologia de diferentes raízes vegetais.

Método baseado em Döbereiner et al. (Embrapa, 1995)

1. Lavar as raízes em água corrente para máxima retirada de solo rizosférico.

Dica: após a coleta do material vegetal, o mesmo deve ser mantido em geladeira por um período máximo de 48 horas até o processo de isolamento.

2. Transferir o material para um recipiente limpo (béquer de 1 L), adicionar 500 ml de álcool 70% e manter as raízes submersas por 1 minuto, com agitação manual.

Dica: caso as raízes utilizadas sejam de grande porte, como exemplo do girassol, recomenda-se cortar pedaços menores para uma adequada desinfecção.

3. Descartar todo volume de álcool 70%, adicionar 500 ml de hipoclorito diluído em água destilada estéril (1:1) e manter as raízes submersas por 1 minuto, com agitação manual.

4. Descartar todo volume de hipoclorito, adicionar 500 ml de água destilada estéril e manter as raízes submersas por 1 minuto, com agitação manual.

5. Enxaguar as raízes em água destilada estéril por mais quatro vezes, com troca de água a cada nova lavagem.

6. Transferir as raízes para uma placa de Petri de vidro, ou material similar, e picotá-las com bisturi (placa de Petri e bisturi deverão ser previamente esterilizados).

7. Para o preparo das suspensões iniciais, pesar 10 g de raízes picotadas e adicionar a um frasco do tipo erlemeyer (de 200 ml) contendo 90 ml de solução salina estéril (NaCl 0,85%). Realizar o procedimento em triplicata e manter os frascos sob agitação constante por 12 horas a 28°C.

8. Aliquotar 1 ml da suspensão inicial (10^0) em um tubo de ensaio contendo 9 ml de solução salina estéril (NaCl 0,85%) para o preparo da diluição 10^{-1} . Agitar fortemente a solução resultante e repetir o procedimento até a obtenção da diluição 10^{-3} , conforme abaixo:

10^0 : suspensão inicial

10^{-1} : 1ml de suspensão inicial + 9ml de solução salina.

10^{-2} : 1ml da diluição 10^{-1} + 9ml de solução salina.

10^{-3} : 1ml da diluição 10^{-2} + 9ml de solução salina.

9. Em triplicata (ou mais repetições, se desejável), inocular 100 μ L de cada uma das suspensões 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em diferentes frascos de vidro (de 10 ml) contendo 4 ml de meio de cultura semi-sólido sem N (LGI, LGI-P e/ou Nfb, conforme descrito abaixo), e incubar em estufa a 28 °C por 1 semana, ou até formar película de crescimento bacteriano.

Dica: para inoculação dos 100 μ L das suspensões bacterianas, imergir a ponteira até o fundo do frasco para que os isolados encontrem a concentração ideal de oxigênio para seu crescimento.

Meio de cultura	Reagentes	Quantidade
LGI semi-sólido sem Nitrogênio	KH_2PO_4	0,6 g
	Sacarose	5 g
	K_2HPO_4	0,2 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
	$\text{Na}_2\text{Mo}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,002 g
	Solução de vitaminas *	1 mL
	FeEDTA **	4 mL
	Azul de bromotimol (0,5%) ***	5 mL
	Água destilada	Completar volume para 1 L
Ágar puro	1,8 g	

- pH ajustado para 6,0 - 6,2 com ácido sulfúrico (H_2SO_4).

- para o preparo do “meio LGI sólido com N”, adicionar também 0,01 g/L de extrato de levedura e 15 g de ágar bacteriológico, ao invés de ágar puro.

* Solução de vitaminas: biotina 10% e piridoxol-HC 20%, em água destilada; armazenar em geladeira.

** FeEDTA: dissolver separadamente 5 g de FeSO_4 e 6 g de Na_2EDTA em aproximadamente 30 ml de água destilada cada solução; juntar as duas soluções e completar o volume para 1 L; manter em vidraria escura ou envolto em papel alumínio e armazenar em geladeira.

*** azul de bromotimol (0,5%): adicionar 0,5 g de azul de bromotimol ($\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$) a 100 ml de KOH 0,2 N; manter em vidraria escura ou envolto em papel alumínio e armazenar em geladeira.

Meio de cultura	Reagentes	Para 1L
LGI-P semi-sólido sem Nitrogênio	KH_2PO_4	0,6 g
	Sacarose	100 g
	K_2HPO_4	0,2 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
	$\text{NaMo}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,002 g
	Azul de bromotimol (0,5%) *	2,5 mL
	Água destilada	Completar volume para 1 L
	Ágar puro	1,8 g

- pH ajustado para 5,5 com ácido acético glacial (CH_3COOH).

- para o preparo do “meio LGI-P sólido com N”, adicionar também 0,01 g/L de extrato de levedura e 15 g de ágar bacteriológico, ao invés de ágar puro.

* conforme protocolo do “meio LGI semissólido sem N”, descrito nesse capítulo.

Meio de Cultura	Reagentes	Para 1L
Nfb semissólido sem Nitrogênio	Ácido málico	5 g
	K_2HPO_4	0,5 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
	NaCl	0,1g
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
	Azul de bromotimol (0,5%) *	2 mL
	FeEDTA *	4 mL
	Solução de vitaminas *	1 mL
	KOH	4,5 g
	Solução de micronutrientes **	2 mL
Água destilada	Completar volume para 1 L	
Ágar puro	1,8 g	

- pH ajustado para 6,5 - 6,8 com NaOH.

- para o preparo do “meio Nfb sólido com N”, adicionar também 0,02 g/L de extrato de levedura e 15 g de ágar bacteriológico, ao invés de ágar puro.

* conforme protocolo do “meio LGI semi-sólido sem N”, descrito nesse capítulo.

** Solução de micronutrientes para o meio Nfb

Reagentes	Para 100 mL
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,004 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,12 g
H ₃ BO ₃	0,14 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,117 g

10. Após 1 semana, reinocular todas as amostras para novos frascos de vidro contendo os meios de cultura correspondentes e manter na estufa à 28 °C por mais 7 dias.

11. Para o isolamento de colônias, realizar um estriamento em placas de Petry contendo meio de cultura com N (LGI, LGI-P e/ou Nfb, conforme descrito acima), correspondente ao do frasco de vidro, e incubar em estufa à 28 °C por 1 ou 2 dias, ou até obter colônias isoladas.

12. Inocular diferentes colônias em tubos de ensaio contendo 3 ml de meio King-B líquido. Manter os tubos sob agitação constante à 28 °C por 24 a 48 h, ou até turvar.

Dica: a escolha de uma ou mais colônias por placa é opcional, mas se dá preferência ao isolamento de colônias morfológicamente diferentes, ou com distintas colorações.

Meio de Cultura	Reagentes	Para 1 L
King-B	Glicerol	15 g
	Peptona	20 g
	K ₂ HPO ₄	1,15 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,50 g
	Triptofano	0,50 g
	Água destilada	Completar volume para 1 L

13. Realizar a coloração de Gram com cada uma das amostras cultivadas em tubos de ensaio, para avaliação da pureza do inóculo.

14. Aliquotar 1,2 mL do caldo bacteriano e 300 µl de glicerol puro estéril em tubos criogênicos de 2 mL, a fim de se obter o estoque do isolado em glicerol 20%.

Dica: é importante que o tubo criogênico seja levemente agitado para uma mistura homogênea. Mantenha os tubos por pelo menos 6 horas a temperatura ambiente antes de estocá-lo à -20 °C. Se possível, armazene os tubos criogênicos a -80 °C.

Referência:

DÖBEREINER, J., BALDANI V.L.D., BALDANI J.I. 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília Embrapa-SPI, 60 p.

10.2 ISOLAMENTO DE DIAZOTRÓFICOS DE SOLO RIZOSFÉRICO

O processo de isolamento de bactérias associativas envolve a coleta de solo rizosférico, aquele que está intimamente aderido às raízes. Posteriormente, as suspensões são inoculadas em meios de cultura apropriados ao objetivo do estudo, e o processo de isolamento pode ser aplicado a solos de qualquer procedência.

Método baseado em Döbereiner et al. (Embrapa, 1995)

1. Coletar o solo rizosférico.

2. Para o preparo das suspensões iniciais, pesar 10 g de solo rizosférico e adicionar a um frasco do tipo erlemeyer (de 200 ml) contendo 90 ml de solução salina estéril (NaCl 0,85%). Realizar o procedimento em triplicata e manter os frascos sob agitação constante por 12 horas à 30°C.

3. Os demais passos são os mesmos descritos nos itens 8 a 14 do “10.1 Protocolo de isolamento de diazotróficos endofíticos de raiz”, descrito anteriormente.

Referências:

DÖBEREINER J., BALDANI V.L.D., BALDANI J.I. 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília Embrapa-SPI, 60 p.

10.3 ISOLAMENTO DE DIAZOTRÓFICOS FORMADORES DE ENDÓSPOROS DE SOLO RIZOSFÉRICO

O processo envolve a eliminação das células vegetativas presentes na rizosfera, o que favorece o posterior isolamento de bactérias anaeróbias facultativas e formadoras de endósporos de resistência ao estresse. A utilização do meio Tiamina-biotina (TB) sem N favorece a obtenção de diazotróficos dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*, Gram-positivos comumente isolados da rizosfera de plantas. Porém, isolados de outros gêneros como, por exemplo, *Clostridium* e *Brevibacillus*, também podem ocorrer, mas geralmente em baixo número.

Método baseado em Seldin et al. (1983)

1. Após a obtenção do solo rizosférico e preparo das suspensões em solução salina (NaCl 0,85%) (ver “10.2 Protocolo de isolamento de diazotróficos de solo rizosférico”, descrito anteriormente), incubar as suspensões 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} à 80 °C por 15 minutos.

Dica: as mesmas suspensões utilizadas para o isolamento de bactérias de solo rizosférico poderão ser usadas nesse procedimento, mesmo após um longo período de tempo (até 3 meses), se armazenadas em geladeira.

2. Em triplicata (ou mais repetições, se desejável), inocular 100 µL de cada uma das suspensões 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em placas de Petri contendo meio TB sem N (conforme abaixo).

Dica: para a obtenção de um maior número de isolados recomenda-se a inoculação de pelo menos cinco placas de cada tipo de solo rizosférico, mas esse é um número aleatório que deverá ser inicialmente pensado pelo pesquisador.

Meio de Cultura	Reagentes	Para 1L
Tiamina-biotina (TB) sem Nitrogênio	Glicose	5 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,04 g
	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,005 g
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,15 g
	K ₂ HPO ₄	0,8 g
	Solução de tiamina (0,5 mg/ml)	2 ml
	Solução de biotina (0,5 mg/ml)	2 ml
	Tioglicolato de sódio	0,5 g
	Solução de micronutriente de Jurgensen	1 ml
	*	
	Água destilada	completar volume para 1 L
	Ágar puro	15 g

Solução de micronutriente de Jurgensen *

Reagentes	Para 100 mL
H ₃ BO ₃	0,286 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,181 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,022 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,008 g

3. Organizar as placas em uma jarra de anaerobiose e incubar à 28 °C por 1 semana.

4. Para o isolamento de colônias, realizar um estriamento em placas de Petri contendo o mesmo meio TB sem N e incubar novamente a 28 °C por 1 semana em jarra de anaerobiose.

Dica: a escolha de uma única colônia por placa é opcional, pois se dá preferência ao isolamento de colônias morfológicamente diferentes, ou com distintas colorações.

5. Inocular diferentes colônias em tubos de ensaio contendo 3 ml de meio King-B líquido (ver “Protocolo de isolamento de diazotróficos endofíticos de raiz”, descrito nesse capítulo). Manter os tubos sob agitação constante à 28 °C por 24 a 48 h, ou até turvar.

6. Realizar a coloração de Gram com cada uma das amostras cultivadas em tubos de ensaio, para avaliação da pureza do inóculo.

7. Aliquotar 1,2 mL do caldo bacteriano e 300 µl de glicerol puro estéril em tubos criogênicos de 2 mL, a fim de se obter o estoque do isolado em glicerol 20%.

Dica: é importante que o tubo criogênico seja levemente agitado para uma mistura homogênea. Mantenha os tubos por, pelo menos, 6 horas a temperatura ambiente antes de estocá-lo à -20 °C. Se possível, armazene os tubos criogênicos à -80 °C.

Referências:

SELDIN L., van Elsas J.D., PENIDO E.G.C. 1983. *Bacillus* nitrogens fixers from Brazilian soils. Plant Soil 70:243-255.

10.4 ISOLAMENTO DE RIZÓBIOS

As bactérias isoladas de nódulos radiculares de leguminosas são popularmente conhecidas como rizóbios. Os rizóbios fixam o nitrogênio atmosférico quando em associação com leguminosas, podendo suprir todo o nitrogênio necessário para o pleno desenvolvimento da planta em associação. Os gêneros bacterianos de rizóbios mais conhecidos são: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*.

Método baseado em Somasegaram & Hoben (1985).

1. Retirar os nódulos das raízes da leguminosa estudada.
2. Desinfestar os nódulos obtidos por imersão em álcool 70% e solução de hipoclorito (2%) por 1 minuto cada. Após este procedimento, lavar os nódulos com água destilada esterilizada (cinco vezes).
3. Em um microtubo, macerar o nódulo desinfestado em 500 µL de solução salina (NaCl 0,85%).
4. Inocular aproximadamente 20 µL da suspensão obtida anteriormente em meio ágar Levedura Manitol (Vincent, 1970) usando a técnica de purificação para obtenção de colônias isoladas.

Meio de cultura	Componentes	Quantidade
Levedura Manitol	Manitol	10 g
	K ₂ HPO ₄	0,5 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
	NaCl	0,1 g
	Extrato de levedura	0,4 g
	Corante vermelho congo	25 mg*
	Ágar	12 g
	Água destilada	Completar o volume para 1L

* Usar 10mL de uma solução de vermelho congo 2,5g · L⁻¹. Ajustar o pH do meio de cultura para 6,8 antes de esterilizar.

5. Incubar a placa em estufa 28°C por um período de 2 a 10 dias.

Dica: as bactérias do gênero *Rhizobium* demoram de dois a três dias para o aparecimento de colônias em meio Levedura Manitol. Os isolados de *Bradyrhizobium* demoram de 6-10 dias. Os gêneros *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* possuem tempo de crescimento intermediário.

6. As colônias características devem ser inoculadas em meio Levedura Manitol líquido à 28°C até que a solução fique turva (usar o mesmo meio descrito anteriormente sem adição de ágar e o corante Vermelho Congo).

Dica: serão consideradas características as colônias com bordas lisas, que não absorverem corante, possuírem coloração leitosa e aspecto gomoso.

7. Em um tubo estéril adicionar 1mL da cultura bacteriana crescida em meio líquido juntamente com 800-1000 µL de glicerol estéril. Agitar suavemente a solução resultante até que esta fique homogênea.

8. Deixar a solução a temperatura ambiente por 2-5 horas agitando suavemente a cada 30 minutos.

9. Estocar a solução à -20°C.

Dica: quando for necessário trabalhar com o isolado bacteriano que está preservado em glicerol, inocular 20 µL do estoque em meio de cultura apropriado.

Referências

SOMASEGARAM P, HOBEN MJ. **Methods in legume-rhizobium technology**. NIFTAL, Hawaii, p 367. 1985.

10.5 IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO E ESPÉCIE BACTERIANA

Atualmente, somente o isolamento e os testes bioquímicos não são o suficiente para a identificação bacteriana. Para confirmação do gênero e espécie da bactéria estudada, devemos caracterizar o gene 16S rDNA (codifica a subunidade menor do ribossomo bacteriano) por técnicas de biologia molecular. Este protocolo descreve dois oligonucleotídeos iniciadores e as reações de PCR para caracterização do gene 16S rDNA em bactérias.

1. Extrair o DNA do isolado bacteriano conforme descrito no protocolo de “extração de DNA de um isolado bacteriano” descrito no capítulo 2: Extração e quantificação de ácidos nucleicos e proteínas.

2. Utilizar 50-100 ng de DNA para reação de PCR com seguintes oligonucleotídeos iniciadores:

Para amplificar um fragmento de aproximadamente 450 pares de bases da região V6 do gene 16S rDNA, usar os oligonucleotídeos iniciadores:

Nome	Sequência	Posição
U968 For	5' AAC GCG AAG AAC CTT AC 3'	968-985
L1401 Rev	5' CGG TGT GTA CAA GAC CC 3'	1401-1418

Condições da PCR

94 °C 5 min; 30 ciclos de 94 °C 45 seg, 52 °C 45 seg, 72 °C 45 seg; e 72 °C 10 min

Dica: pelo alto nível de conservação do gene 16S rDNA em bactérias, estes oligonucleotídeos iniciadores amplificam o gene em qualquer espécie bacteriana.

Dica: como esta reação amplifica somente um porção do gene 16S rDNA, por esta metodologia podemos identificar somente o gênero bacteriano.

Para amplificar o gene 16S rDNA completo, usar os oligonucleotídeos iniciadores:

Nome	Sequência	Posição
pA	5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'	8-28
1542R	5' AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC 3'	1525-1542

Condições da PCR

94 °C 5 min; 30 ciclos de 94 °C 45 seg, 55 °C 45 seg, 72 °C 1 min; e 72 °C 5 min

Dica: pelo alto nível de conservação do gene 16S rDNA em bactérias, estes oligonucleotídeos iniciadores amplificam o gene em qualquer espécie bacteriana.

Dica: como esta reação amplifica o gene 16S rDNA completo, por esta metodologia podemos identificar o gênero e a espécie bacteriana.

3. O fragmento do DNA obtido pelos PCRs descritos acima deve ser sequenciado.

4. A sequência obtida deve ser comparada com as sequências do banco de dados GenBank pelo software BlastN (disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) ou ez-taxon (disponível em <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>).

Referências:

FELSKE A, RHEIMS H, WOKERINK A, STACKEBRANDT E, AKKERMANS DL.

Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grasslands soils. Microbiol 143:2983–2989. 1997.

BROSIUS J, PALMER ML, KENNEDY PJ and NOLLER HF (1978). **Complete nucleotide sequence of a 16s ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*.** Proc Natl Acad Sci USA 75:4801-4805.

STACKEBRANDT, E., LIESACK, W. **Nucleic acids and classification**, p.151–194. In M. Goodfellow and A. O'Donnell (ed.), Handbook of new bacterial systematics. Academic Press, London. 1993.

EDWARDS U, ROGALL T, BLOCKERL H, EMDE M, BOTTGER EC,. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Research 17(19):7843-7853. 1989.

10.6 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS

Compostos indólicos semelhantes ao ácido indol-acético são de fundamental importância para o crescimento e desenvolvimento da planta. Hormônios vegetais pertencentes a este grupo aumentam a taxa de formação de raízes; controlam o processo de crescimento vegetativo, tropismo, florescência e frutificação das plantas; afetam a biossíntese de vários metabólitos e aumentam a resistência da planta a fatores de estresse.

Método baseado em Glickmann e Dessaux (1995)

1. Inocular o isolado bacteriano a ser testado em meio KingB modificado líquido por 72 horas à 28 °C.

Meio	Composição	Quantidade
KingB	Glicerol	15 g
	Peptona	20 g
	K ₂ HPO ₄	1,15 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,50 g
	Triptofano	0,5 g
	Água destilada	Completar o volume para 1L

O pH deve ser ajustado para 6,8 antes de esterilizar.

2. Após o crescimento da cultura bacteriana, aliquotar 1 mL da suspensão bacteriana em um microtubo e centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos.

3. Retirar o sobrenadante e adicionar 1 volume de reagente de Salkowsky

Solução	Composição	Quantidade
Salkowsky	FeCl ₃	2,4 g
	H ₂ SO ₄	84,2 mL
	Água destilada	Completar o volume para 200 mL

Dicas: dissolver o FeCl₃ em aproximadamente 80 mL de água destilada. Ir adicionando o H₂SO₄ aos poucos na solução. Completar o volume para 200 mL com água destilada.

4. Manter as amostras por 30 minutos no escuro.

Dica: transcorrido os 30 minutos, as soluções que adquirirem a coloração rosada são consideradas produtoras de compostos indólicos.

5. Fazer a leitura da absorbância em espectrofotômetro 520nm.

Dica: para transformar os dados obtidos na absorbância para $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ deve ser elaborada uma curva com concentrações conhecidas de algum composto do grupo indol (exemplo: ácido indol-acético, ácido indol-butírico e etc).

Referência:

GLICKMANN E., DESSAUX Y.: A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Appl Environ Microbiol 61(2):793-796. 1995.

10.7 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO

O fósforo é um dos macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Este elemento é um dos mais abundantes no solo. Entretanto, uma quantidade muito baixa deste elemento está complexada de uma maneira solúvel e disponível para as plantas. A habilidade de solubilizar fosfato é frequentemente encontrada em microrganismos que, por meio da liberação de fosfatases e/ou acidificação do solo, solubilizam fosfato mineral insolúvel e liberam íons solúveis que podem ser captados pelas plantas.

Método baseado em Sylvester-Bradley et al. (1982)

1. Crescer o isolado bacteriano em um meio de cultura apropriado para seu pleno desenvolvimento.

2. Preparar a solução 1, solução 2 e meio GL.

Meio de Cultura	Componente	Quantidade
Solução 1	K_2HPO_4	5 g
	Água destilada	50 mL de água destilada
Solução 2	$CaCl_2$	10 g
	Água destilada	100 mL de água destilada
Meio GL	Glicose	10 g
	Extrato de levedura	2 g
	Ágar	15 g
	Água destilada	Completar para 1L

O pH do meio GL deve ser ajustado para 6,8. As soluções 1 e 2 e o meio GL devem ser autoclavadas separadamente.

3. Antes de verter o meio de cultura GL em placas de Petri, misturar a este as soluções 1 e 2 e homogeneizar a solução resultante.

Dica: a solução resultante deve apresentar um fino precipitado esbranquiçado ($Ca_3(PO_4)_2$). Este precipitado deve ser homogeneizado, juntamente com o meio antes de ser vertido.

4. Inocular 20 μ L da cultura bacteriana previamente crescida em meio líquido ao meio sólido obtido.

5. Esperar a gota secar e incubar à 28°C por 3-5 dias.

6. A formação de um halo de solubilização claro entorno da colônia bacteriana é indicativo que este isolado solubilizou o fosfato precipitado.

Referência:

SYLVESTER-BRADLEY R., ASAKAWA N., LA TORRACA S., MAGALHÃES FMM., OLIVEIRA L., PEREIRA RM.: Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. Acta Amazon 12:15–22.1982.

10.8 PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS BACTERIANOS

Sideróforos não ligantes de ferro com importante função na promoção de crescimento vegetal e na supressão de doenças fúngicas. Estas moléculas se ligam ao ferro insolúvel do solo (que não pode ser absorvido pelas plantas) tornando-o disponível para absorção da microbiota e das plantas. Além do Ferro, os sideróforos bacterianos podem se ligar a metais como cromo (Cr), chumbo (Pb), alumínio (Al), cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn) sendo de essencial importância na biorremediação de solos contaminados.

Método baseado em Schwyn & Neilands (1987)

1. Crescer o isolado bacteriano a ser testado no meio de cultura líquido mais apropriado para seu pleno desenvolvimento.

2. Preparar o meio de cultura ágar KingB diluído.

Meio de Cultura	Componente	Quantidade
Ágar King B	Glicerol	3 g
	Peptona	4 g
	K_2HPO_4	0,23 g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3 g
	Ágar	15 g
	Água destilada	Completar o volume para 1L

Ajustar o pH para 6,8. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.

3. Preparar o corante CAS.

Corante	Composição	Quantidade
CAS - Chrome	Solução 1	7,5 mL
AzuroL S	Solução 2	37,5 mL
	Solução 3	30 mL
	Solução 4	Completar o volume

Autoclavar um erlenmeyer de 500mL com 100mL de água ultrapura.

Adicionar lentamente o volume das Sol 1 e Sol 2.

Acrescentar o volume da Sol 3.

Completar o volume com a Sol.4.

Dica: realizar todos procedimentos com água ultrapura e vidrarias estéreis e dentro do fluxo, sempre que possível.

SOLUÇÃO 1

Composição	Quantidade	Concentração final
$FeCl_3 \cdot 6 H_2O$	13,5 mg	1 mM
HCl	41 mL	10 mM

Proteger da luz. Volume final 50 mL

SOLUÇÃO 2

Composição	Quantidade	Concentração final
CAS	121 mg	2 mM
Água ultrapura estéril	Completar o volume para 100 mL	

Proteger da luz

SOLUÇÃO 3

Composição	Quantidade	Concentração final
CTAB (HDTMA)	364,45 mg	10 mM
Água ultrapura estéril	Completar o volume para 100 mL	
Proteger da luz		

SOLUÇÃO 4

Composição	Diluir em 20mL	Diluir em 100mL
Piperazina anidra	4,307 g	21,535 g
HCl 12M (puro = 37%)	6,25 mL	~ 31,25 mL
Volume da Solução Final	100 mL	500 mL

Adicionar HCl aos poucos até pH 5,6. Esta solução deve ser preparada na hora.

4. Após esterilizar o meio ágar King B, esperar a temperatura baixar um pouco e adicionar aproximadamente 20% do volume do meio de corante CAS ao meio.

5. Verter a mistura resultante em placas de Petri estéreis.

Dica: o meio de cultura deverá ter a coloração azul escuro. Caso o meio fique com outra coloração você deve ter errado o pH do meio ou vertido o corante, quando o meio ainda estava muito quente.

6. Inocular uma gota de aproximadamente 20 µL da cultura bacteriana crescida no meio líquido na placa de Petri preparada anteriormente.

7. Incubar a 28°C por 2-3 dias.

8. O aparecimento de um halo cor laranja em torno da colônia bacteriana é indicativo de produção de sideróforos.

Referência:

SCHWYN B & NEILANDS JB.: **Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores.** Anal Biochem 160: 47-56. 1987.

10.9 ATIVIDADE DA ENZIMA ACC DEAMINASE

O ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) é o precursor da síntese de etileno em plantas superiores, fito-hormônio que tem sua síntese aumentada sob diversas situações de estresse. Bactérias que possuem atividade de ACC deaminase podem contribuir para a redução dos níveis de etileno na rizosfera por meio do sequestro e clivagem de ACC a ácido α -cetobutirato e amônia. Um *screening* da atividade de ACC deaminase pode ser avaliada em meio mínimo contendo ACC como recurso de N, por meio da comparação de desenvolvimento e tamanho da colônia bacteriana na presença (meio DF salts sem N e contendo ACC) ou ausência (meio DF salts sem N) de N.

Método baseado em Penrose & Glick (2003)

1. Para o preparo do meio de cultura DF salts sem N (Dworkin & Foster, 1958), dissolver os reagentes em aproximadamente 700 ml de água destilada, conforme a tabela abaixo:

Meio de cultura	Reagentes	Para 1 L
DF salts sem Nitrogênio	KH_2PO_4	4 g
	Na_2HPO_4	6 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
	Glicose	2 g
	Ácido glucônico	2 g
	Ácido cítrico	2 g
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^*$	100 μL
	Solução de elementos-traço **	100 μL
Água destilada	Completar volume para 1L	

* Solução de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,1 g em 10 mL de água; manter em vidraria escura ou envolto em papel alumínio e armazenar em geladeira.

** Solução de elementos-traço:

Reagentes	Volume - 100 mL
H_3BO_3	0,01 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,01119 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1246 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,07822 g

2. Regular o pH para 7,2 com KOH 5M, completar o volume para 1 L com água destilada e adicionar 10 g de ágar puro.

3. Após solidificado em placa de Petri, espalhar 50 μL de ACC 0,5 M sobre o meio.

Dica: só descongelar a ACC no momento de uso e não mantê-la fora do gelo por tempo maior que o necessário.

4. Inocular pela técnica da gota 2 μL de um caldo bacteriano recentemente cultivado e incubar as placas à 28 °C por cerca de 5 dias, acompanhando o desenvolvimento da colônia diariamente.

5. Como controle negativo de crescimento são utilizadas placas de Petri sem adição de ACC, contendo apenas o meio de cultura DF salts sem N.

Dica: é importante destacar que mesmo no meio sem N e ACC (controle negativo) poderá haver crescimento bacteriano, mas em menor grau e tamanho de colônia quando comparado ao meio contendo ACC. A diferença de crescimento é o indicativo da atividade da enzima. A quantificação de α -cetobutirato fornece maior precisão da atividade enzimática e pode ser avaliada por ensaios espectrofotométricos (PENROSE & GLICK, 2003).

Referências:

DRORKIN, M. & FOSTER, J.: Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. J Bacteriol 75:592-601. 1958.

PENROSE, D.M. & GLICK, B.R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiol Planta 118:10-15. 2003.

CAPÍTULO 11

ANÁLISES BÁSICAS DE BIOINFORMÁTICA

Felipe Klein Ricachenevsky, Walter Orlando Beys da Silva

11.1 DESENHO DE INICIADORES (*PRIMERS*) PARA PCR UTILIZANDO SOFTWARES ONLINE

O desenho ou projeto de *primers* tem por função permitir a detecção, clonagem ou sequenciamento de fragmentos específicos de DNA.

Uso do software Oligo Perfect Designer, da Invitrogen/Life Technologies[®], para projetar primers:

1. Acessar o site <http://tools.lifetechnologies.com/content.cfm?pageid=9716>.

2. Colar a sequência de DNA para a qual se deseja projetar *primers* na caixa adequada (*Target sequence*).

3. Selecionar a aplicação desejada para o *primer* (*PCR: Cloning* para clonagem; *PCR: Detection* para detecção; e *Sequencing* para sequenciamento). Preencher as caixas opcionais, informando o nome da sequência e o nome do pesquisador, caso necessário.

Clicar em “Submit”.

Dica: a seleção de uma aplicação não necessariamente restringe o uso do *primer* projetado àquela aplicação. A seleção é importante somente para que o programa permita ao usuário informar as características típicas para cada tipo de PCR. Por exemplo: caso a aplicação selecionada seja *PCR: Cloning*, a próxima página do programa exigirá que o usuário informe o fragmento exato a ser amplificado, indicando o nucleotídeo de início e de término. Já em *PCR: Detection*, o programa pede apenas o tamanho do fragmento a ser detectado e qual região da sequência deve ser considerada, permitindo ao programa a busca pelos melhores pares de *primers* dentro dessa região.

4. Para *primers* visando à clonagem (opção *PCR: Cloning*), definir a região a ser clonada. Lembrar que, neste caso, os *primers* começarão e terminarão exatamente nos nucleotídeos definidos. Para *primers* visando a detecção (opção *PCR: Detection*), definir tanto a região a ser analisada em busca de *primers* quanto o tamanho do fragmento a ser amplificado. Lembrar que, neste caso, o programa buscará *primers* que estejam dentro dos parâmetros definidos, podendo haver variação do nucleotídeo de início e de término.

Para *primers* para sequenciamento (opção *Sequencing*), definir a região a ser sequenciada (*Sequencing Region*), a sequência inicial para anelamento do primeiro *primer* (*Primer Position: Lead*) e o número de nucleotídeos de intervalo entre cada *primer* (*Spacing*). Lembrar que, neste caso, serão gerados *primers* em intervalos regulares.

Clicar em “Submit”.

Dica: inicialmente, não alterar os outros parâmetros. Caso o programa não encontre *primers* dentro dos parâmetros iniciais (mensagem “No primers could be found within your specified parameters. Please loosen your parameters and try again”), tente aumentar a T_m (*Primer T_m (°C)*) máxima e diminuir a mínima (por exemplo, para 65 e 55, respectivamente). Também pode ser necessário indicar outra região da sequência para ser analisada.

5. Analisar os resultados. O programa indica a porcentagem de GC (%GC), se o *primer* é direto ou reverso (*Strand*), tamanho (*Size*) e T_m (T_m °C). Clicar em “Highlight Target Sequence” para ver onde os *primers* anelam na sequência-alvo.

Dica: *primers* ideais tem em torno de 50% de GC, tamanho de 20 pares de bases e T_m em torno de 60 °C.

11.2 VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DOS PRIMERS PROJETADOS

Apesar de robustos, os programas para projetar *primers* muitas vezes podem fornecer *primers* não-ideais, que podem prejudicar o seu uso na bancada. Assim, é interessante usar softwares complementares para analisar a possibilidade de amplificação inespecífica, e formação de homo e heterodímeros. O primeiro software é o Primer-BLAST do NCBI, que permite verificar se os *primers* projetados são complementares a outras sequências que não as que se deseja amplificar. O segundo é o website da IDT (*Integrated DNA Technologies*), que permite verificar se cada *primer* projetado anela em si mesmo ou no outro *primer* que compõe o par.

Verificação de inespecificidade dos *primers* usando a ferramenta *Primer-BLAST* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI):

1. Acessar o site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. No canto direito da página, encontrar e clicar na opção “BLAST”.

2. Na página seguinte, encontrar dentre as opções de “*Specialized BLAST*” o link para “*Primer-BLAST*”.

Dica: para acessar o site mais facilmente, basta digitar “*ncbi primer blast*” no Google.

3. Na página do Primer-BLAST, colar a sequência dos *primers* projetados anteriormente nas respectivas caixas. Elas são as primeiras na seção “*Primer Parameters*”.

4. Na seção “*Primer Pair Specificity Checking Parameters*”, selecionar o tipo de base de dados (*Database*). Caso esteja analisando uma sequência expressa, selecionar as base de dados de RNA (*Refseq RNA* ou *Refseq mRNA*). Caso esteja analisando uma sequência de DNA genômico, selecionar as bases de dados de genoma (*Genome*).

Dica: caso queira incluir o maior número de sequências possível, tanto genômicas quanto expressas, selecionar a base de dados “*nr*”. Ela refere-se à “*non-redundant*” (não-redundante), ou seja, inclui todas as sequências presentes no banco que não sejam repetidas.

5. Informar qual o organismo para o qual os *primers* foram desenhados (*Organism*). Devido à grande demanda de uso para sequências derivadas de humano, o padrão da página é manter o organismo como “*Homo sapiens*”. Caso esteja analisando *primers* para sequências de humanos, portanto, não é necessário mudar. No caso de outro organismos, digitar.

Dica: quando começar a digitar o nome do organismo, uma lista com opções aparecerá, facilitando encontrar o nome que se deseja e evitando erros de digitação.

6. Clicar em “*Get Primers*”.

7. Na página contendo o resultado, verificar “*Products on target templates*”. Para cada possível sequência amplificada, é mostrado o número de acesso da mesma, o tamanho do produto em pares de bases, e a complementariedade entre os *primers* (parte superior) e a sequência-alvo (parte inferior). São mostrados, na parte inferior, apenas os nucleotídeos que não são complementares à sequência dos *primers*. Para aqueles que são complementares, há um ponto. Em geral, o primeiro resultado é referente à sequência para a qual os *primers* foram projetados. Verifique as sequências seguintes, a fim de identificar aquelas que possivelmente possuem complementariedade com os *primers* e que poderiam gerar bandas inespecíficas em uma PCR.

Dica: algumas vezes, há mais de um registro (número de acesso) para uma mesma sequência. Nestes casos, os resultados mostrarão duas ou mais sequências com complementariedade perfeita, induzindo o usuário a pensar que os *primers* não serão específicos e anelam igualmente em ambas. Observe o tamanho do produto amplificado (*product length*); se for o mesmo para todas as sequências, é provável que sejam apenas registros independentes da mesma sequência.

Dica 2: ao verificar se há complementariedade dos *primers* com outros produtos, é importante observar se essa complementariedade é extensa o suficiente para que o mesmo seja amplificado em uma PCR. Embora não haja como prever *in silico*, cuidar principalmente se a complementariedade ocorre nos nucleotídeos mais a 3' do *primer* (região de reconhecimento da DNA Polimerase) e se o produto a ser gerado é de tamanho compatível com a reação (por exemplo, produtos de 10.000 pares de bases não seriam problemáticos em uma PCR cujo produto que se deseja amplificar tenha de 100 a 200 pares de bases).

Verificação da possibilidade de formação de homodímeros e heterodímeros entre primers usando a ferramenta *OligoAnalyzer* da IDT (*Integrated DNA Technologies*):

1. Acessar o site <https://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.

Dica: para encontrar diretamente o site, digitar “oligoanalyzer IDT” no Google.

2. Colar a sequência do *primer* a ser analisado na janela apropriada (*Sequence*).

3. Clicar em “*Hairpin*”. Esta opção analisará a possibilidade de formação de pareamentos intra-cadeia na sequência do *primer*, o que pode impedir o seu anelamento com a sequência-alvo.

4. Analisar os resultados na seção “*Structures*”. Verificar a temperatura em que cada pareamento intra-cadeia ocorre (T_m °C).

Dica: os pareamentos intra-cadeia que podem tornar um *primer* problemático são aqueles que ocorrem próximos a temperaturas utilizadas na PCR. Aqueles que ocorrem em temperaturas muito baixas não são relevantes.

5. Clicar em “*Self-dimer*”. Esta opção analisará a possibilidade de formação de pareamentos entre duas moléculas do mesmo *primer*, o que pode impedir o seu anelamento com a sequência-alvo.

6. Analisar os resultados na seção “*Homo-dimer analysis*”. Verificar pareamentos que contenham mais do que quatro pares de base consecutivos pareados entre duas moléculas do mesmo *primer*.

Dica: pareamentos relevantes são representados por linhas contínuas, e o número de pares de bases pareadas é mostrado para cada possibilidade (*Base pairs*).

7. Clicar em “*Hetero-dimer*”. Colar a sequência do segundo *primer* a ser utilizado na PCR na caixa “*Secondary sequence*”. Esta opção analisará a possibilidade de formação de pareamentos entre as duas moléculas de *primer*, o que pode impedir o seu anelamento com a sequência-alvo. Clicar em “*Calculate*”.

8. Analisar os resultados na seção “*Hetero-dimer analysis*”. Verificar pareamentos que contenham mais do que quatro pares de base consecutivos pareados entre as moléculas dos dois *primers*.

Dica: pareamentos relevantes são representados por linhas contínuas, e o número de pares de bases pareadas é mostrado para cada possibilidade (*Base pairs*).

11.3 PREPARAÇÃO DE ARQUIVO CONTENDO SEQUÊNCIA NO FORMATO FASTA

O arquivo FASTA é um formato simples de armazenar sequências múltiplas, e que permite aos programas de análise reconhecer cada fragmento de sequência a ser analisado.

Preparando um arquivo no formato FASTA:

Cada sequência deve ser precedida por um identificador. Em um processador de texto (Microsoft Word, Bloco de Notas, Pages), coloque o sinal de ">", seguido de um nome, código ou número. Após, pressione em "enter" para iniciar um novo parágrafo. Os programas que leem arquivos FASTA considerarão quaisquer caracteres entre o sinal de ">" e o "enter" como o identificador da sequência.

Dica: quando estiver trabalhando com genes cujos *loci* são conhecidos, é interessante usá-los como identificadores, para evitar confusão, o que é mais provável se nomes como "sequencia1" ou "geneA" for utilizado.

Copie e cole a sequência referente ao identificador no novo parágrafo. A sequência pode ser de nucleotídeos (e portanto conter os caracteres A, T, C e G) ou de proteínas (e portanto conter caracteres referentes ao código IUPAC de uma letra para amino ácidos - <http://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html>).

Esta é a "cara" que o texto do arquivo deve ter:

> Identificador

```
TAGCTACGTACGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATAGCTAGCTACGTAC
GATCGATCGACGATCGATCGATCGATTATATATGATCGATATAGTAGCTAGCAT
CGATCGATTAGTAGCATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGTACGATC
GATCGATCGATCGATCGATATATATTAG
```

> Identificador2

```
MERFVQFLRRGNGLMAASLAAGSCAEEVAKAEGAGCRDDAAALRLKGVAMATILVA
GVVGVGLPLAGRKRRALRTDSAAFVAAKAFAAGVILATGFVHMLHDAEHALSSPCLPAHPW
RSFPFPGFVAMSAALATLVLDLFLATRFYEGKHRAETERVKAAAAAALAASSASDDDDITVVT
VTEDDNDNKAPLLQ
```

Dica: apesar de poder salvar como arquivo do próprio processador de texto, o ideal é converter o arquivo em .txt, por este ser mais leve (especialmente trabalhando com várias sequências em um mesmo arquivo) e por permitir o acesso de uma gama maior de programas. Outra possibilidade é salvar as sequências FASTA em uma planilha do Excel. Para isso, é necessário retirar todos os espaços entre os caracteres que compõem a sequência. No Excel, uma célula conterá o sinal de ">" e o identificador, e a célula abaixo conterá a sequência, já sem espaços. Esta maneira facilita o armazenamento, devido ao menor tamanho do arquivo.

11.4 OBTENÇÃO DE SEQUÊNCIAS REVERSO-COMPLEMENTAR

As sequências de nucleotídeos são escritas normalmente no sentido 5' para 3', e representam uma dupla-fita de DNA, para a qual apenas uma das fitas é escrita. Dependendo da necessidade, muitas vezes é interessante obter a sequência da fita oposta, que é reversa (ou seja, orientada de 3' para 5' em relação à fita para a qual se conhece as sequências) e complementar (baseada no pareamento de bases A-T e C-G) à que se está utilizando.

Sequência reverso-complementar:

Acesse o site abaixo:

(http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html).

Dica: para encontrar diretamente o site, digitar “reverse complement” no Google.

Na janela, cole a sequência para o qual deseja gerar a sequência reverso-complementar. Clique em “Submit”.

Dica: caso deseje gerar apenas a sequência reversa, ou apenas a sequência complementar, modifique a opção selecionada no menu abaixo da janela para “reverse” ou “complement”. A opção-padrão será sempre “reverse-complement”.

A sequência reverso-complementar será gerada em uma nova janela.

11.5 BUSCA DE SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIAS UTILIZANDO UM BANCO DE DADOS DE SEQUÊNCIAS E AS FERRAMENTAS BLAST (BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL)

Sequências de nucleotídeos e amino ácidos apresentam similaridade com outras sequências, principalmente quando estas são relacionadas evolutivamente. Por exemplo, sequências de genes que são parte de uma mesma família gênica apresentam regiões parecidas, em diferentes graus. A ferramenta BLAST permite identificar as regiões de uma sequência de interesse (*query*) que se pareça com outras presentes em bancos de dados, como o *GenBank*. Isto pode ser feito tanto com sequências de nucleotídeos quanto de proteína. O BLAST se baseia no chamado alinhamento local, que permite alinhar porções de uma sequência de interesse com outras, sem necessariamente comparar todos os nucleotídeos/amino ácidos presentes nas mesmas. Portanto, o alinhamento local alinha pedaços similares de sequência e mostra o quão parecidos estes fragmentos são, mas não obrigatoriamente mostra o quão similar as duas sequências completas são.

Busca por similaridade em banco de dados de nucleotídeo utilizando sequência nucleotídica como *query* – BLASTn (nucleotídeos X nucleotídeos):

O BLASTn é utilizado quando se quer encontrar sequências de nucleotídeos em um banco de dados que apresentem similaridade com uma sequência de interesse também de nucleotídeos.

1. Acessar o site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. No canto direito da página, encontrar e clicar na opção “BLAST”.
2. Na página seguinte, clique na opção “*nucleotide blast*”, na seção “*Basic BLAST*”.
3. Na caixa “*Enter query sequence*”, cole a sequência de nucleotídeos que deseja alinhar com o banco de dados.
4. No menu “*Database*”, selecione o conjunto de dados contra o qual a sequência de interesse será alinhada. Caso queira buscar em todo o banco de dados do GenBank, selecione “*Nucleotide collection*”.

Dica: se o objetivo for buscar sequências derivadas de mRNA (sequências expressas), selecionar dentre os conjuntos de dados aqueles que correspondem a este tipo de dado (*Reference RNA sequences*). Se o objetivo for buscar sequências genômicas, selecionar aqueles que correspondem a sequências derivadas de DNA genômico (*Reference genomic sequences*).

5. Na caixa “*Organism*”, é possível restringir as buscas para apenas aquelas que são derivadas de um organismo específico. Também é possível excluir apenas essa espécie, clicando no botão “*Exclude*”; e adicionar mais organismos para restringir ou excluir os mesmos das buscas (botão “+”).
6. Clique em “BLAST”. O resultado pode demorar alguns minutos.
7. Analisar os resultados. Na seção “*Graphic Summary*”, é possível ver uma representação gráfica dos resultados. O tamanho das barras coloridas indica a extensão do alinhamento da sequência de interesse (*query*) com diferentes sequências do banco de dados. Já as cores indicam o quão similares elas são. Arrastando o *mouse* por cima das barras, a caixa acima da representação gráfica mostrará o nome da sequência com a qual a sequência *query* apresenta similaridade.
8. Na seção “*Descriptions*”, são mostradas as sequências que apresentam similaridade, e os dados que quantificam essa similaridade. Dentre eles, é importante observar os seguintes: “*Query coverage*” (indica qual porcentagem da sequência de interesse é “coberta” pelo alinhamento com cada sequência do banco – lembre-se que, por se tratar de um alinhamento local, muitas vezes apenas uma região de ambas as sequências serão alinhadas); “*E value*” (indica a probabilidade de

encontrar aquele alinhamento de maneira aleatória – ou seja, quanto **menor** o valor, **maior** é a confiança, sendo o “*E value*” = 0 o mais confiável); e “*Identity*” (indica quantos nucleotídeos idênticos são encontrados apenas na região que foi alinhada).

Dica: dependendo do tipo de alinhamento feito, um “*E value*” aceitável pode variar. Por exemplo, se estamos alinhando sequências de um organismo que apresenta grande número de sequências depositadas no banco, como humanos, camundongo, mosca-da-fruta ou arroz, esperamos encontrar “*E value*” baixos, próximo a zero. Já no caso de buscarmos sequências obtidas a partir de um organismo que não possui muitas sequências no banco, em geral iremos encontrar sequências de outros organismos que apresentam similaridade, mas não são idênticas. Portanto, nesse caso, esperamos “*E value*” mais alto ($1e^{-10}$, por exemplo).

9. Na seção “*Alignments*”, é possível ver os alinhamentos propriamente ditos.

Dica: para acessar as sequências encontradas (para copiá-las e arquivá-las em formato FASTA, por exemplo), basta clicar no número de acesso das mesmas nesta seção. Uma nova janela/aba será aberta, mostrando a sequência e todas as informações associadas a ela.

Busca por similaridade em banco de dados de proteínas utilizando sequência proteica como query – BLASTp (proteína X proteínas):

O BLASTp é utilizado quando se quer encontrar sequências de proteínas em um banco de dados que apresentem similaridade com uma sequência de interesse também de proteína.

1. Acessar o site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. No canto direito da página, encontrar e clicar na opção “BLAST”.

2. Na página seguinte, clique na opção “*protein blast*”, na seção “*Basic BLAST*”.

3. Na caixa “*Enter query sequence*”, cole a sequência da proteína que deseja alinhar com o banco de dados.

4. No menu “*Database*”, selecione o conjunto de dados contra o qual a sequência de interesse será alinhada. Caso queira buscar em todo o banco de dados do GenBank, selecione “*Non-redundant protein sequences*”.

5. Na caixa “*Organism*”, é possível restringir as buscas para apenas aquelas que são derivadas de um organismo específico. Também é possível excluir apenas essa espécie, clicando no botão “*Exclude*”, assim como adicionar mais organismos para restringir ou excluir os mesmos das buscas (botão “+”).

6. Clique em “BLAST”. O resultado pode demorar alguns minutos.

7. Analisar os resultados. Na seção “*Graphic Summary*”, é possível ver uma representação gráfica dos resultados. O tamanho das barras coloridas indica a extensão do alinhamento da sequência de interesse (*query*) com diferentes sequências do banco de dados. Já as cores indicam o quão similares elas são. Arrastando o mouse por cima das barras, a caixa acima da representação gráfica mostrará o nome da sequência com a qual a sequência *query* apresenta similaridade.

8. Na seção “*Descriptions*”, são mostradas as sequências que apresentam similaridade, e os dados que quantificam essa similaridade. Dentre eles, é importante observar os seguintes: “*Query coverage*” (indica qual porcentagem da sequência de interesse é “coberta” pelo alinhamento com cada sequência do banco – lembre-se que, por se tratar de um alinhamento local, muitas vezes apenas uma região de ambas as sequências serão alinhadas); “*E value*” (indica a probabilidade de encontrar aquele alinhamento de maneira aleatória – ou seja, quanto **menor** o valor, **maior** é a confiança, sendo o “*E value*” = 0 o mais confiável); e “*Identity*” (indica quantos amino ácidos idênticos são encontrados apenas na região que foi alinhada).

Dica: dependendo do tipo de alinhamento feito, um “*E value*” aceitável pode variar. Por exemplo, se estamos alinhando sequências de um organismo que apresenta grande número de sequências depositadas no banco, como humanos, camundongo, mosca-da-fruta ou arroz, esperamos encontrar “*E value*” baixos, próximo a zero. Já no caso de buscarmos sequências obtidas a partir de um organismo que não possui muitas sequências no banco, em geral iremos encontrar sequências de outros organismos que apresentam similaridade, mas não são idênticas. Portanto, nesse caso, esperamos “*E value*” mais alto ($1e^{-10}$, por exemplo).

9. Na seção “Alignments”, é possível ver os alinhamentos propriamente ditos.

Dica: para acessar as sequências encontradas (para copiá-las e arquivá-las em formato FASTA, por exemplo), basta clicar no número de acesso das mesmas nesta seção. Uma nova janela/aba será aberta, mostrando a sequência e todas as informações associadas a ela.

Busca por similaridade em banco de dados de proteínas utilizando sequência de nucleotídeos como *query* – BLASTx (nucleotídeos traduzidos X proteínas):

O BLASTx é utilizado quando se quer encontrar sequências de proteínas em um banco de dados que apresentem similaridade com uma sequência de interesse de nucleotídeos. Para isso, o BLAST traduz a sequência de interesse nas seis fases de leitura possíveis (três da fita senso, e três da fita antissenso), gerando seis sequências de proteínas que são então comparadas com o banco de dados de proteína.

1. Acessar o site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. No canto direito da página, encontrar e clicar na opção “BLAST”.

2. Na página seguinte, clique na opção “blastx”, na seção “Basic BLAST”.

3. Na caixa “Enter query sequence”, cole a sequência de nucleotídeos que deseja alinhar com o banco de dados.

4. No menu “Database”, selecione o conjunto de dados contra o qual a sequência de interesse será alinhada. Caso queira buscar em todo o banco de dados do GenBank, selecione “Non-redundant protein sequences”.

5. Na caixa “Organism”, é possível restringir as buscas para apenas aquelas que são derivadas de um organismo específico. Também é possível excluir apenas essa espécie, clicando no botão “Exclude”, assim como adicionar mais organismos para restringir ou excluir os mesmos das buscas (botão “+”).

6. Clique em “BLAST”. O resultado pode demorar alguns minutos.

7. Analisar os resultados. Na seção “Graphic Summary”, é possível ver uma representação gráfica dos resultados. O tamanho das barras coloridas indica a extensão do alinhamento da sequência de interesse (*query*) com diferentes sequências do banco de dados. Já as cores indicam o quão similares elas são. Arrastando o mouse por cima das barras, a caixa acima da representação gráfica mostrará o nome da sequência com a qual a sequência *query* apresenta similaridade.

8. Na seção “Descriptions”, são mostradas as sequências que apresentam similaridade, e os dados que quantificam essa similaridade. Dentre eles, é importante observar os seguintes: “Query coverage” (indica qual porcentagem da sequência de interesse é “coberta” pelo alinhamento com cada sequência do banco – lembre-se que, por se tratar de um alinhamento local, muitas vezes apenas uma região de ambas as sequências serão alinhadas); “*E value*” (indica a probabilidade de encontrar aquele alinhamento de maneira aleatória – ou seja, quanto **menor** o valor, **maior** é a confiança, sendo o “*E value*” = 0 o mais confiável); e “Identity” (indica quantos amino ácidos idênticos são encontrados apenas na região que foi alinhada).

Dica: dependendo do tipo de alinhamento feito, um “*E value*” aceitável pode variar. Por exemplo, se estamos alinhando sequências de um organismo que apresenta grande número de sequências depositadas no banco, como humanos, camundongo, mosca-da-fruta ou arroz, esperamos encontrar “*E value*” baixos, próximo a zero. Já no caso de buscarmos sequências, obtidas a partir de um organismo que não possui muitas sequências no banco, em geral iremos encontrar sequências de outros organismos que apresentam similaridade, mas não são idênticas. Portanto, nesse caso, esperamos “*E value*” mais alto ($1e^{-10}$, por exemplo).

9. Na seção “*Alignments*”, é possível ver os alinhamentos propriamente ditos.

Dica: para acessar as sequências encontradas (para copiá-las e arquivá-las em formato FASTA, por exemplo), basta clicar no número de acesso das mesmas nesta seção. Uma nova janela/aba será aberta, mostrando a sequência e todas as informações associadas a ela.

Dica 2: observar no cabeçalho de cada alinhamento qual a fase de leitura da sequência de interesse, a qual foi alinhada com a sequência de proteína do banco, em “*Frame*”. Valores +1, +2 e +3 indicam fases de leitura da fita senso; -1, -2 e -3 indicam fases de leitura da fita antissenso.

Busca por similaridade em banco de dados de nucleotídeos traduzidos para proteína utilizando sequência de proteína como *query* – tBLASTn (proteína X nucleotídeos traduzidos):

O tBLASTn é utilizado quando se quer encontrar sequências de nucleotídeo em um banco de dados que apresentem similaridade com uma sequência de interesse de proteína. Para isso, o BLAST traduz todas as sequências de nucleotídeos do banco nas seis fases de leitura possíveis (três da fita senso, e três da fita antissenso), gerando seis sequências de proteínas para cada uma, que são então comparadas com a sequência de interesse de proteína.

1. Acessar o site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. No canto direito da página, encontrar e clicar na opção “BLAST”.

2. Na página seguinte, clique na opção “*tblastn*”, na seção “*Basic BLAST*”.

3. Na caixa “*Enter query sequence*”, cole a sequência de proteína que deseja alinhar com o banco de dados.

4. No menu “*Database*”, selecione o conjunto de dados contra o qual a sequência de interesse será alinhada. Caso queira buscar em todo o banco de dados do GenBank, selecione “*Nucleotide collection*”.

5. Na caixa “*Organism*”, é possível restringir as buscas para apenas aquelas que são derivadas de um organismo específico. Também é possível excluir apenas essa espécie, clicando no botão “*Exclude*”, assim como adicionar mais organismos para restringir ou excluir os mesmos das buscas (botão “+”).

6. Clique em “BLAST”. O resultado pode demorar alguns minutos.

7. Analisar os resultados. Na seção “*Graphic Summary*”, é possível ver uma representação gráfica dos resultados. O tamanho das barras coloridas indica a extensão do alinhamento da sequência de interesse (*query*) com diferentes sequências do banco de dados. Já as cores indicam o quão similares elas são. Arrastando o mouse por cima das barras, a caixa acima da representação gráfica mostrará o nome da sequência com a qual a sequência *query* apresenta similaridade.

8. Na seção “*Descriptions*”, são mostradas as sequências que apresentam similaridade, e os dados que quantificam essa similaridade. Dentre eles, é importante observar os seguintes: “*Query coverage*” (indica qual porcentagem da sequência de interesse é “coberta” pelo alinhamento com cada sequência do banco – lembre-se que, por se tratar de um alinhamento local, muitas vezes apenas uma região de ambas as sequências serão alinhadas); “*E value*” (indica a probabilidade de encontrar aquele alinhamento de maneira aleatória – ou seja, quanto **menor** o valor, **maior** é

a confiança, sendo o “*E value*” = 0 o mais confiável); e “*Identity*” (indica quantos amino ácidos idênticos são encontrados apenas na região que foi alinhada).

Dica: dependendo do tipo de alinhamento feito, um “*E value*” aceitável pode variar. Por exemplo, se estamos alinhando sequências de um organismo que apresenta grande número de sequências depositadas no banco, como humanos, camundongo, mosca-da-fruta ou arroz, esperamos encontrar “*E value*” baixos, próximo a zero. Já no caso de buscarmos sequências obtidas a partir de um organismo que não possui muitas sequências no banco, em geral iremos encontrar sequências de outros organismos que apresentam similaridade, mas não são idênticas. Portanto, nesse caso, esperamos “*E value*” mais alto ($1e^{-10}$, por exemplo).

9. Na seção “*Alignments*”, é possível ver os alinhamentos propriamente ditos.

Dica: para acessar as sequências encontradas (para copiá-las e arquivá-las em formato FASTA, por exemplo), basta clicar no número de acesso das mesmas nesta seção. Uma nova janela/aba será aberta, mostrando a sequência e todas as informações associadas a ela.

Dica 2: observar no cabeçalho de cada alinhamento qual a fase de leitura da sequência do banco, a qual foi alinhada com a sequência de interesse, em “*Frame*”. Valores +1, +2 e +3 indicam fases de leitura da fita senso; -1, -2 e -3 indicam fases de leitura da fita anti-senso.

Busca por similaridade em banco de dados de nucleotídeos traduzidos para proteína utilizando sequência de nucleotídeos traduzidos para proteína como *query* – tBLASTx (nucleotídeos traduzidos X nucleotídeos traduzidos):

O tBLASTx é utilizado quando se quer comparar sequências de nucleotídeos com o banco de nucleotídeos, porém, tanto o banco de dados quanto a sequência de interesse são traduzidos em todas as seis fases de leitura possíveis. Trata-se do modo mais abrangente de procurar por sequências similares, porém, o que mais consome tempo de computação. Para isso, o BLAST traduz todas as sequências de nucleotídeos do banco nas seis fases de leitura possíveis (três da fita senso, e três da fita antissenso), gerando seis sequências de proteínas para cada, que são então comparadas com as seis sequências geradas da mesma forma para a sequência de interesse de proteína.

1. Acessar o site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. No canto direito da página, encontrar e clicar na opção “BLAST”.

2. Na página seguinte, clique na opção “*tblastx*”, na seção “*Basic BLAST*”.

3. Na caixa “*Enter query sequence*”, cole a sequência de proteína que deseja alinhar com o banco de dados.

4. No menu “*Database*”, selecione o conjunto de dados contra o qual a sequência de interesse será alinhada. Caso queira buscar em todo o banco de dados do GenBank, selecione “*Nucleotide collection*”.

5. Na caixa “*Organism*”, é possível restringir as buscas para apenas aquelas que são derivadas de um organismo específico. Também é possível excluir apenas essa espécie, clicando no botão “*Exclude*”, assim como adicionar mais organismos para restringir ou excluir os mesmos das buscas (botão “+”).

6. Clique em “BLAST”. O resultado pode demorar alguns minutos.

7. Analisar os resultados. Na seção “*Graphic Summary*”, é possível ver uma representação gráfica dos resultados. O tamanho das barras coloridas indica a extensão do alinhamento da sequência de interesse (*query*) com diferentes sequências do banco de dados. Já as cores indicam o quão similares elas são. Arrastando o mouse por cima das barras, a caixa acima da representação gráfica mostrará o nome da sequência com a qual a sequência *query* apresenta similaridade.

8. Na seção “*Descriptions*”, são mostradas as sequências que apresentam similaridade, e os dados que quantificam essa similaridade. Dentre eles, é importante observar os seguintes: “*Query*

coverage” (indica qual porcentagem da sequência de interesse é “coberta” pelo alinhamento com cada sequência do banco – lembre-se que, por se tratar de um alinhamento local, muitas vezes apenas uma região de ambas as sequências serão alinhadas); “*E value*” (indica a probabilidade de encontrar aquele alinhamento de maneira aleatória – ou seja, quanto **menor** o valor, **maior** é a confiança, sendo o “*E value*” = 0 o mais confiável); e “*Identity*” (indica quantos amino ácidos idênticos são encontrados apenas na região que foi alinhada).

Dica: dependendo do tipo de alinhamento feito, um “*E value*” aceitável pode variar. Por exemplo, se estamos alinhando sequências de um organismo que apresenta grande número de sequências depositadas no banco, como humanos, camundongo, mosca-da-fruta ou arroz, esperamos encontrar “*E value*” baixos, próximo a zero. Já no caso de buscarmos sequências obtidas a partir de um organismo que não possui muitas sequências no banco, em geral iremos encontrar sequências de outros organismos que apresentam similaridade, mas não são idênticas. Portanto, nesse caso, esperamos “*E value*” mais alto ($1e^{-10}$, por exemplo).

9. Na seção “*Alignments*”, é possível ver os alinhamentos propriamente ditos.

Dica: para acessar as sequências encontradas (para copiá-las e arquivá-las em formato FASTA, por exemplo), basta clicar no número de acesso das mesmas nesta seção. Uma nova janela/aba será aberta, mostrando a sequência e todas as informações associadas a ela.

Dica 2: observar no cabeçalho de cada alinhamento qual a fase de leitura da sequência do banco a qual foi alinhada com a sequência de interesse, em “*Frame*”. Valores +1, +2 e +3 indicam fases de leitura da fita senso; -1, -2 e -3 indicam fases de leitura da fita anti-senso. Um segundo valor indica também a fase de leitura da sequência de interesse que foi usada no alinhamento.

11.6 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E PROTEÍNAS (ALINHAMENTO GLOBAL)

Sequências de nucleotídeos e amino ácidos apresentam similaridade com outras sequências, principalmente quando estas são relacionadas evolutivamente. Por exemplo, sequências de genes que são parte de uma mesma família gênica apresentam regiões parecidas, em diferentes graus. Diferente do alinhamento local, que permite encontrar regiões de similaridade entre duas sequências, o alinhamento global visa a obter o melhor alinhamento possível para duas ou mais sequências, considerando a extensão total das mesmas. Assim, o alinhamento global permite observar o quão parecidas duas sequências completas são. É importante salientar que esse tipo de método resultará em um alinhamento mesmo que as sequências escolhidas sejam pouco similares. Portanto, é interessante ter conhecimento das mesmas *a priori*, sabendo que se tratam de sequências de genes ou proteínas similares, aumentando assim as chances de se obter resultados informativos. Existem diversos *softwares* para alinhamentos globais; um dos mais utilizados é o ClustalW.

Alinhamentos globais utilizando a ferramenta ClustalW:

1. Acessar o site <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

2. Na caixa localizada na seção “STEP 1 - Enter your input sequences”, cole as sequências a serem alinhadas.

Dica: utilize sequências no formato FASTA, que serão automaticamente reconhecidas.

3. Selecionar a opção “PROTEINS” para alinhamento de proteínas, e “DNA” para alinhamento de nucleotídeos.

4. Na seção “STEP 2 - Set your Pairwise Alignment Options”, selecione entre as opções “slow” e “fast”. Estas opções se referem ao tempo que o alinhamento levará para ser realizado.

Dica: apesar de ser mais rápida, a opção “fast” pode ser menos eficiente em alinhar sequências menos similares, ou contendo regiões bastante diferentes. Já a opção “slow”, embora mais lenta, pode mostrar resultados mais próximos do ótimo. Na maioria dos casos, no entanto, a diferença é quase negligenciável.

5. Clique em “Submit”.

6. Analise os resultados. As sequências estarão alinhadas logo abaixo, e os identificadores de cada uma serão mostrados no canto direito do alinhamento.

Dica: é possível ver o alinhamento em cores diferentes, facilitando a visualização de regiões conservadas. Clicar em “Show Colors”.

Alinhamentos globais utilizando a ferramenta DiAlign:

1. Acessar o site <http://www.genomatix.de/cgi-bin/dialign/dialign.pl>.

2. Na primeira caixa na seção “Sequence Input”, cole as sequências a serem alinhadas.

Dica: utilize sequências no formato FASTA, que serão automaticamente reconhecidas.

3. Na seção “Sequence type” selecione o tipo de alinhamento entre “DNA sequence” e “Protein sequence”.

4. Clique em “Load sequences for DiAlign”.

5. A próxima página permite ao usuário decidir alguns parâmetros do alinhamento e também do resultado (*output*). Após decidir quais parâmetros serão utilizados (ou mantê-los), clique em “Start Alignment”.

Dica: um dos parâmetros do resultado que é interessante ser alterado é a caixa *“Do not show non-aligned blocks”*. Ao clicá-la, o alinhamento mostrará também as regiões que não foram alinhadas entre as sequências utilizadas.

Dica 2: para decidir qual a melhor maneira de visualizar um resultado em particular, é importante testar e conhecer as opções de *“output”*. Teste diferentes combinações.

6. Analisar o resultado. Verificar a seção *“Aligned sequences”*, que mostra quais sequências foram alinhadas, cada uma identificada de maneira independente e mostrando o tamanho da mesmas (em pares de bases ou número de amino ácidos). As identificações são derivadas do identificador do formato FASTA.

7. Observar o alinhamento propriamente dito, na seção *“Alignment”*. Na seção seguinte, *“Pairwise similarities”*, as sequências são comparadas uma a uma, mostrando valores de similaridade e identidade.

Dica: similaridade e identidade são dois termos utilizados para expressar o quanto duas sequências são parecidas. Em se tratando de sequências de DNA, os termos são usados de maneira equivalente. Já para alinhamentos entre sequências de amino ácidos, o termo identidade se refere ao número de resíduos iguais entre as duas sequências; já o termo similaridade se refere também aos resíduos idênticos, mas inclui ainda as posições do alinhamento as quais, embora contenham amino ácidos diferentes, estes apresentam a mesma característica de polaridade da cadeia lateral. Portanto, a similaridade entre duas sequências é sempre maior ou igual à identidade.

11.7 LOCALIZAÇÃO DE DOMÍNIOS CONSERVADOS EM SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS

Embora proteínas diferentes tenham sequências distintas, estas sequências podem conter padrões, grupos de amino ácidos que são conservados ao longo da evolução, e que em geral cumprem funções similares. Estes conjuntos de amino ácidos são chamados de domínios proteicos, e podem ser facilmente detectados por ferramentas computacionais. Existem diversas bases de dados sobre domínios conservados de proteínas. Esse tipo de análise permite inferir, ainda que de maneira indireta, a função de uma determinada sequência de proteína, baseado apenas na presença de domínios conservados.

Análise de domínios conservados utilizando InterProScan:

O *InterProScan* integra diferentes bases de dados de domínios conservados, fazendo a busca simultânea em todos eles.

1. Acessar o site <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>.

Dica: para encontrar diretamente o site do *InterProScan*, digite “*interproscan*” no Google.

2. Na caixa localizada na seção “*STEP 1 - Enter your input sequences*”, colar a sequência a ser alinhada.

3. Clicar em “*Submit*”.

4. Analisar o resultado. A representação gráfica mostra a sequência de interesse (*query*) como uma linha pontilhada na parte superior, e os diferentes domínios encontrados dispostos abaixo. As caixas coloridas representam os domínios, e a sua localização é mostrada ao longo da sequência de interesse. Observe que os domínios podem apresentar um código, localizado à esquerda do domínio. Clicando neste código, é possível acessar informações específicas sobre o domínio.

Dica: alguns domínios podem conter entradas em mais de uma base de dados, e por isso podem aparecer mais de uma vez. Observar sempre a ocorrência de domínios na mesma região da sequência de interesse.

11.8 PREDIÇÃO DE DOMÍNIOS TRANSMEMBRANA A PARTIR DE SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS

Estas ferramentas têm por finalidade prever a presença de domínios transmembrana ao longo de uma cadeia polipeptídica, a partir de sua sequência.

Predição de domínios transmembrana utilizando Phobius:

1. Acessar o site <http://phobius.sbc.su.se/>.

Dica: para encontrar diretamente, digite “phobius” no Google.

2. Na caixa, colar a sequência a ser analisada.

3. Clicar em “Submit query”.

4. Analisar o resultado. O *Phobius* mostra inicialmente quais domínios transmembrana foram preditos para a sequência de interesse, e qual a extensão dos mesmos (indicando resíduos de início e término para cada um). Observar a presença de peptídeo-sinal (identificado por “*SIGNAL*”), alças (identificadas por “*TOPO_DOM*”) e domínios transmembrana (identificados por “*TRANSMEM*”). Os amino ácidos de início e término são indicados. Na parte inferior, é mostrada a representação gráfica do resultado. No eixo X, é mostrado o número do resíduo; e no eixo Y, qual a probabilidade de cada resíduo fazer parte do domínio em questão. Observar a linha vermelha (indica a probabilidade de presença de um peptídeo-sinal), e as linhas verde e azul (indicam amino ácidos ao longo da sequência com maior probabilidade de estarem voltados para o citoplasma ou para o meio extracelular, respectivamente). As regiões com domínios transmembrana preditos são mostradas em cinza.

Predição de domínios transmembrana utilizando TMHMM:

1. Acessar o site <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>.

Dica: para encontrar diretamente, digite “tmhmm” no Google.

2. Na caixa “Submission”, colar a sequência a ser analisada.

3. Clicar em “Submit”.

4. Analisar o resultado. O TMHMM mostra quais domínios transmembrana foram preditos para a sequência de interesse, e qual a extensão dos mesmos (indicando resíduos de início e término para cada um). Observar a presença de alças (identificadas por “*inside*” ou “*outside*”, indicando a orientação da alça em relação à membrana plasmática) e domínios transmembrana (identificados por “*TMhelix*”). Os amino ácidos de início e término são indicados. Na parte inferior, é mostrada a representação gráfica do resultado. No eixo X, é mostrado o número do resíduo; e no eixo Y, a probabilidade de cada resíduo fazer parte do domínio em questão. Observar a linha vermelha (indica a probabilidade de presença de domínio transmembrana), e as linhas azul e rosa (indicam amino ácidos ao longo da sequência com maior probabilidade de estarem voltados para o citoplasma ou para o meio extracelular, respectivamente). As regiões com domínios transmembrana preditos são mostradas em vermelho. Há também uma representação utilizando caixas para indicar a localização dos domínios transmembrana, ao longo da sequência, na parte superior do gráfico.

11.9 PREDIÇÃO DE LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR, PRESENÇA DE PEPTÍDEO DE DIRECIONAMENTO N-TERMINAL E DE SINAL DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR, A PARTIR DE SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS

Estas ferramentas permitem prever, utilizando características da própria sequência de proteína, qual a provável localização subcelular do polipeptídeo maduro (mitocôndria, cloroplasto, membrana plasmática, etc). Alguns deles, ou ferramentas específicas para este fim, permitem também prever a presença de sequências N-terminais e de sinal de localização nuclear, envolvidos no direcionamento de proteínas para diferentes organelas ou compartimentos subcelulares e para o núcleo, respectivamente. Estes programas não são 100% acurados, e portanto, é interessante analisar as sequências em mais de um deles, focando em resultados concordantes.

Predição de localização subcelular utilizando PSORT:

A primeira versão do PSORT permite a análise de sequências oriundas de plantas, animais, levedura, bactérias gram-negativas e bactérias gram-positivas.

1. Acessar o site <http://psort.hgc.jp/form.html>.

Dica: para encontrar diretamente, digite “psort” no Google. Ao entrar na página, busque e clique em “PSORT Prediction”.

2. Escolher a origem da sequência entre “Gram-positive bacterium”, “Gram-negative bacterium”, “yeast”, “animal” e “plant”.

3. Colar a sequência na caixa “Enter your Amino Acid sequence below (by copy & paste)”.

4. Clique em “Submit”

5. Analisar os resultados. O PSORT utiliza várias informações para chegar ao resultado mostrado no final da página. São indicados valores para cada possível localização subcelular. Aquelas com valores mais altos são as mais prováveis. Notar que não se trata de valores de probabilidade.

Predição de localização subcelular utilizando PSORTII:

Esta versão do PSORT permite a análise de sequências oriundas de animais e levedura.

1. Acessar o site <http://psort.hgc.jp/form2.html>.

Dica: para encontrar diretamente, digite “psort” no Google. Ao entrar na página, busque e clique em “PSORTII Prediction”.

2. Colar a sequência na caixa “Enter your AMINO ACID SEQUENCE”.

3. Clique em “Submit”.

4. Analisar os resultados. O PSORTII utiliza várias informações para chegar ao resultado mostrado no final da página. São indicados valores para cada possível localização subcelular, mostrados em porcentagem.

Predição de localização subcelular utilizando WolfPSORT:

O WolfPSORT é a versão mais atual do PSORT, e permite a análise de sequências oriundas de animais, plantas e fungos.

1. Acessar o site <http://wolffpsort.org/>.

Dica: para encontrar diretamente, digite “psort” no Google. Ao entrar na página, busque e clique em “*WolfPSORT Prediction*”.

2. Escolher a origem da sequência entre “*animal*”, “*plant*” e “*fungi*”.

3. Colar a sequência na caixa “*Enter multifasta format protein sequence(s) here*”.

Dica: o *WolfPSORT* permite a análise de mais de uma sequências simultaneamente, caso queira analisar múltiplas sequências (colá-las na caixa em formato FASTA).

4. Clique em “*Submit Query*”.

5. Analisar os resultados. O *WolfPSORT* utiliza várias informações para chegar ao resultado final. São indicados valores para cada possível localização subcelular. Os maiores valores são os mais prováveis. Notar que os valores não são valores de probabilidade.

Predição de sequências N-terminais de direcionamento utilizando iPSORT:

O iPSORT permite a predição de sequências de direcionamento localizadas na região N-terminal das proteínas analisadas. Dentre eles, destacam-se os peptídeos-sinal, envolvidos no direcionamento de proteínas para a via de secreção; peptídeos de direcionamento para a mitocôndria e peptídeos de direcionamento para o cloroplasto.

1. Acessar o site <http://wolffpsort.org/>.

Dica: para encontrar diretamente, digite “psort” no Google. Ao entrar na página, busque e clique em “*iPSORT Prediction*”.

2. Colar a sequência na caixa abaixo de “*iPSORT Prediction*”.

3. Selecionar a origem da sequência entre “*Plant Protein*” e “*Non-plant Protein*”

4. Clique em “*Submit*”.

5. Analisar os resultados. O *iPSORT* compara a sequência N-terminal da sequência submetida com as de proteínas sabidamente contendo sinais N-terminais de direcionamento. Três “perguntas” serão “respondidas” nos resultados: se a sequência possui em peptídeo-sinal (SP), se possui um peptídeo de direcionamento mitocondrial e se possui um peptídeo de direcionamento de cloroplasto. Respostas “*Yes*” ou “*No*” indicarão a presença e o tipo de sequência de direcionamento na proteína analisada.

Predição de direcionamento subcelular utilizando TargetP:

A ferramenta TargetP permite a predição de direcionamento de proteínas para a via de secreção, para mitocôndrias e para cloroplastos.

1. Acessar o site <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>.

Dica: para encontrar diretamente, digite “targetp” no Google.

2. Colar a sequência na caixa “SUBMISSION”.

3. Selecionar a origem da sequência entre “Non-plant” e “Plant”

4. Selecionar ou não a opção “Perform cleavage site predictions”. Esta opção permite a predição do local de clivagem, no caso de a proteína analisada apresentar peptídeo de direcionamento N-terminal.

Dica: analisar a sequência, tanto utilizando quanto não utilizando esta opção, e comparar os resultados.

5. Selecionar os “cutoffs”. Na opção “no cutoffs”, a opção que apresentar maior valor será a selecionada (*winner takes it all*). Nas opções “specificity >0.95” e “specificity >0.90”, é possível definir a estringência da análise, sendo a primeira mais estringente para definir como aceitável a predição. A quarta opção permite ao usuário definir os próprios valores para a estringência (*cutoffs*).

Dica: analisar a sequência utilizando diferentes opções, e comparar os resultados.

6. Clicar em “Submit”

7. Analisar os resultados. Os mesmos serão apresentados em uma tabela contendo o nome da sequência, o tamanho da mesma e os valores para cada predição (mTP = *mitochondrial transit peptide*, peptídeo de trânsito mitocondrial), (cTP = *chloroplast transit peptide*, peptídeo de trânsito de cloroplasto), peptídeo-sinal (SP, *signal-peptide*) e outras (*other*). É indicada, de acordo com os valores de estringência definidos na página anterior, qual é a predição final do programa, na coluna “Loc”. Também é mostrado o valor de confiabilidade da predição (RC = *reliability class*), que vai de 1 a 5, sendo 1 a mais confiável e 5 a menos.

Predição de sinal de localização nuclear utilizando SeqNLS:

A ferramenta SeqNLS permite a predição de sequência de localização nuclear, indicando que a proteína deve se localizar no núcleo.

1. Acessar o site <http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS>.

Dica: para encontrar diretamente, digite “seqnls” no Google.

2. Colar a sequência na caixa para submissão.

3. Selecionar a estringência. Considere que o padrão já está marcado (0.86).

4. Clique em “Predict”.

5. Analisar os resultados. Em “Prediction result”, o identificador e a própria sequência são mostrados. Regiões contendo prováveis sinais de localização nuclear são mostrados em cores, e o valor de confiabilidade da predição segue a escala mostrada na tabela “Definition of different colors in predictions”. Na sequência, o provável NLS é sublinhado. Uma segunda tabela “The predicted NLS” mostra o nome da sequência submetida, os resíduos de amino ácidos que fazem parte do NLS e sua posição relativa na sequência, e o valor de confiabilidade da predição.

11.10 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA REGIÃO PROMOTORA DE GENES ORIUNDOS DE GENOMAS DE PLANTAS

A identificação da região promotora de um gene requer a análise prévia da sequência do gene em questão. Para definir qual é a região promotora, em geral difícil de ser determinada com precisão (ou seja, saber exatamente qual o nucleotídeo de início e qual o nucleotídeo de término), é importante conhecer ao menos o início da região codificante, marcada pelo primeiro ATG. Também é relevante identificar o sítio de início de transcrição propriamente dito, localizado no início da região 5' não-traduzida. A partir desses nucleotídeos, é possível isolar a sequência do promotor, normalmente compreendida entre os nucleotídeos +1 (considerando o primeiro a ser transcrito) e -2000 (pode haver variação, sendo utilizado desde -1000 até -2500). A análise do promotor depende do conhecimento da sequência e, portanto, é facilitada para plantas cujo genoma já foi sequenciado. De posse da sequência do promotor, a análise é feita em bases de dados que reconhecem sítios de ligação de fatores de transcrição. Estes sítios podem ser bastante específicos ou apresentar regiões variáveis.

Análise da região promotora de genes de plantas utilizando *Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements* (PLACE):

1. Acessar o site <https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?sid=&lang=en&pj=640&action=page&page=newplace>.

Dica: o PLACE foi recentemente refeito e este é o novo site. Digitando “place promoter analysis” no Google, o site acessado será o da versão anterior. Deste, é possível encontrar a versão mais nova clicando em “NewPLACE”, logo abaixo do título “Important Note”.

2. Copiar e colar a sequência do promotor a ser analisado na caixa.

3. Clicar em “Submit Query”

4. Analisar os resultados. O PLACE mostrará a sequência completa que foi analisada. Logo abaixo, a sequência será novamente mostrada em conjuntos de 50 nucleotídeos. Abaixo de cada trecho do promotor, serão indicadas as posições relativas de diferentes sítios regulatórios. São mostradas a fita na qual a sequência ocorre (“+” = fita senso, “-” = fita antissenso), o nome do sítio regulatório, a posição (nucleotídeo de início do sítio, considerando a sequência analisada), e a sequência-consenso do mesmo, de acordo com o banco. O mesmo resultado é mostrado mais abaixo em formato de tabela, listando os nomes dos motivos encontrados, posições relativas, fita em que ocorrem e sequência-consenso.

Dica: o PLACE apresenta apenas sítios regulatórios descritos na literatura. Para acessar as informações originalmente depositadas no banco, basta clicar nos códigos de cada um, que aparecem no formato “S000001”. Os sítios são mostrados tanto abaixo do promotor quanto na tabela. Ao clicar, o usuário é direcionado a uma página específica, onde há uma breve explicação da função do sítio regulatório e referências que suportam a função do mesmo.

Análise da região promotora de genes de plantas utilizando PlantCARE (*Cis-Acting Regulatory Element*):

1. Acessar o site <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>.

Dica: para encontrar diretamente, digite “plantcare” no Google.

2. No canto esquerdo superior, clique no ícone “Search for CARE”.

3. Copiar e colar a sequência do promotor a ser analisado na caixa apropriada.

4. Clicar em “Submit Query”

5. Analisar os resultados. O PlantCARE mostrará a sequência completa que foi analisada, mostrando ambas as fitas (senso e antissenso). Abaixo, todos os sítios regulatórios estarão listados. Para mostrar quais posições apresentam determinado sítios, clicar no “+” no lado esquerdo de cada um. A posição dos sítios na sequência do promotor será destaca em cores. Caso haja mais de um sítio no mesmo promotor, todas as sequências regulatórias serão destacadas.

Análise da região promotora de genes de plantas utilizando PlantPAN (*Promoter Analysis Navigator*):

1. Acessar o site <http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/>.

Dica: para encontrar diretamente, digite “plantpan” no Google.

2. Na parte superior, clique no ícone “*Promoter Analysis*”.

3. Copiar e colar a sequência do promotor a ser analisado na caixa “*Please Input The Promoter Sequence in FASTA Format*”.

4. Na seção “*Please Select What You Want To Analyze*”, é possível selecionar alguns parâmetros da análise. Clicando na opção “*Transcription Factor Binding Sites*”, serão buscados sítios regulatórios na sequência do promotor. É necessário também escolher qual a espécie de planta que está sendo analisada, clicando na mesma logo abaixo. Clicando na opção “*Tandem Repeat*”, repetições *in tandem* serão identificadas, caso estejam presentes. Estas repetições, embora muitas vezes ainda não descritas, podem conter sítios regulatórios. Clicando na opção “*CpNpG*”, sítios contendo uma citosina, seguido de qualquer nucleotídeo, seguido de guanina, serão identificados. Estes sítios são comumente metilados em promotores, podendo levar à diminuição da taxa de transcrição a partir do promotor. Clicando em “*miRNA target Site*”, serão identificados sítios de complementariedade com microRNAs conhecidos. Estes pequenos RNAs têm papel importante na regulação gênica.

5. Analisar os resultados. Para cada opção de análise selecionada na página anterior, é mostrada uma figura contendo uma representação da sequência submetida, na parte superior, e a posição relativa de cada sítio encontrado, logo abaixo. Para cada sítio/repetição/CpNpGp/sítio de ligação de miRNA, uma linha contínua é mostrada, e uma caixa colorida é mostrada para cada sítio encontrado. Colorações diferentes são dadas para sítios encontrados na fita senso ou antissenso. Caso haja um número grande de sítios, haverá uma barra de rolagem no canto direito. Clicando no nome dos elementos regulatórios, é possível acessar detalhes do mesmo. Na parte superior de cada seção, há um link para uma tabela listando todos os elementos (*View in Table*), na qual é indicada a posição, fita, sequência, espécie onde o mesmo foi descrito e a fonte (bancos de dados de análise de promotor).

11.11 PREDIÇÃO DE SECREÇÃO E LOCALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS

Estas ferramentas têm por finalidade prever, baseado em similaridade de sequências conservadas, se uma proteína é secretada e o tipo de rota utilizada para secreção da mesma, bem como indicar uma possível localização direcionada para a secreção.

Predição de proteínas com ancoramento GPI (glicosilfosfatidilinositol):

GPI é um glicolípido que pode ser adicionado à proteína, considerado uma modificação pós-traducional. Proteínas com ancoramento GPI contêm peptídeo sinal. O ancoramento GPI faz com que a proteína fique ligada à face externa da membrana celular, podendo ser clivada por fosfolipases e, portanto, secretada para o meio extracelular. A presença de GPI é um dos possíveis indícios de secreção. Outras ferramentas podem ser aplicadas para a predição de outros sinais clássicos de secreção.

1. Acessar o site <http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/index.htm>
2. Clicar em “*Prediction*”
3. Colar a sequência a ser analisada em formato fasta, ou submeter o arquivo com todas as sequências a serem analisadas, clicando no link “*Escolher arquivo*”.
4. Clicar em “*Display*”.
5. Analisar o resultado. Uma tabela será gerada com o número de proteínas com a probabilidade de conter GPI: Altamente provável, provável, fracamente provável e sem ancoramento GPI.

O resultado deve ser apresentado desta maneira, e o critério de exclusão (considerar que altamente provável e provável ou somente altamente provável é considerado positivo - potencialmente secretado) é determinado pelo analista.

Predição de secreção de proteínas com peptídeo sinal:

Esta ferramenta prediz a presença e localização de sítios de peptídeo sinal em proteínas de diferentes organismos.

1. Acessar o site <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
2. Na caixa “*Submission*”, colar a sequência em formato fasta a ser analisada, ou submeter o arquivo com todas as sequências a serem analisadas, clicando no link “*Escolher arquivo*”.
3. Escolher o grupo taxonômico entre Eukaryotes e Gram-negative ou Gram-positive Bacteria.

Dica: pode-se selecionar o tipo de análise a ser feita (alterando o valor de *D-cutoff*), e como os resultados serão mostrados (com ou sem gráfico, simples ou estendido). Isto é definido pelo analista.

Dica: cada parâmetro de análise e visualização dos resultados é autoexplicativo, bastando clicar em “*Explain*”.

4. Clicar em “*Submit*”.
5. Analisar o resultado: Observar na tabela o “*signal peptide*”: se YES – contém peptídeo sinal e, portanto, pode ser secretada; se NO, sem peptídeo sinal.

Dica: ao final da análise encontra-se “*Explain the output*”. Clicando, abre-se uma nova aba com a explicação detalhada dos resultados obtidos.

Predição de rota não clássica de secreção de proteínas:

1. Acessar o site <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>
2. Na caixa "Submission", colar a sequência em formato fasta a ser analisada, ou submeter o arquivo com todas as sequências a serem analisadas, clicando no link "Escolher arquivo".
3. Selecionar o grupo taxonômico do organismo ao qual as sequências pertencem: Bacteria – Gram positiva ou negativa ou Mamífero.
4. Clicar em "Submit".
5. Analisar o resultado. Valores de SecP ou NN-score acima de 0,5 indicam possível secreção.

Dica: algumas proteínas com peptídeo sinal (rota clássica de secreção) podem ser positivas neste programa. Para confirmar a rota, pode-se fazer a busca no programa SignalP.

Dica: o critério de utilizar o valor de 0,5 ou superior como sendo positivo é definido pelo analista.

Exemplo:

# Name	NN-score	Odds	Weighted	Warning
#	<u>by prior</u>			
FGF1_HUMAN	0.847	4.267	0.009	-
FGF4_HUMAN	0.945	6.804	0.014	signal peptide predicted by SignalP
ATRX_HUMAN	0.093	0.205	0.000	-

CAPÍTULO 12

CRIAÇÃO E APLICAÇÃO DE ÁCAROS PARA CONTROLE BIOLÓGICO

Guilherme Liberato da Silva, Matheus dos Santos Rocha, Noeli Juarez Ferla

12.1 CRIAÇÃO E APLICAÇÃO DE ÁCAROS PARA CONTROLE BIOLÓGICO

Este protocolo tem o objetivo de apresentar aspectos gerais acerca da criação massal e uso de ácaros predadores no controle biológico de ácaros praga no campo.

SALA DE SEMEADURA DE FEIJÃO

Etapas de produção do feijoeiro

1. O substrato será disponibilizado em bandeja plástica de 45cm x 30cm x 8 cm;
2. Cada bandeja plástica receberá 20 sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (Figura 1.A);
3. As bandejas com feijão deverão ser mantidas em sala climatizada a 26 ± 1 °C, 70 ± 5 % UR e fotofase de 12 horas;
4. Diariamente serão acrescidos 350 ml de água ao substrato.

SALA DE ÁCAROS FITÓFAGOS

Criação estoque de ácaros fitófagos:

1. Coleta dos ácaros fitófago-alvo no campo;
2. Triagem utilizando microscópio ótico e montagem de lâminas em meio de Hoyer para a identificação sob microscópio estereoscópio com contraste de fases.
3. Após a confirmação de identificação da espécie-alvo, os ácaros serão introduzidos nas bandejas com feijão (Figura 1.B);
4. Manter em sala climatizada a 26 ± 1 °C, 80 ± 10 % UR e fotofase de 12 horas;
5. Adição diária de 350 ml de água ao substrato;
6. Obter contaminação de aproximadamente 30 espécimes/planta.

SALA DE ÁCAROS PREDADORES

Criação estoque de ácaros predadores:

1. Coleta do ácaro predador-alvo no campo;
2. Triagem utilizando microscópio ótico e montagem de lâminas em meio de Hoyer para a identificação sob microscópio estereoscópio com contraste de fases.
3. Após a confirmação de identificação da espécie-alvo, os ácaros serão introduzidos nas bandejas de feijão contaminado com aproximadamente 30 ácaros fitófagos/planta (Figura 1.C);
4. Manter em sala climatizada a 26 ± 1 °C, 80 ± 10 % UR e fotofase de 12 horas;
5. Adição diária de 350 ml de água ao substrato.

Ressalta-se que:

“Não deve haver contato entre as criações estoque de ácaros fitófagos e predadores e, de preferência, devem ser mantidas em ambientes separados. Também devem ser manipuladas por indivíduos diferentes para evitar contaminações”.

Liberação inundativa em campo

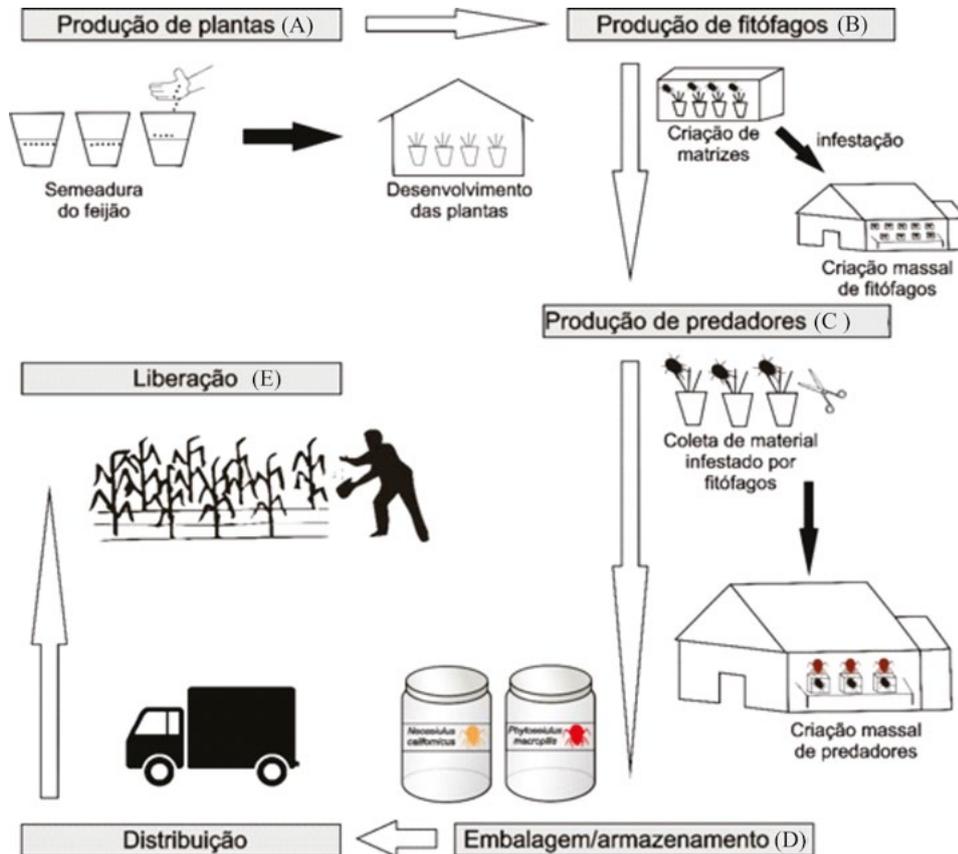
1. Para acondicionar ácaros predadores, será necessário manter casca de arroz moída no fundo do recipiente.

2. Cerca de 200 indivíduos serão retirados da criação estoque e acondicionados no recipiente (8cm altura x 5cm diâmetro) (Figura 1.D).

3. Os recipientes com ácaros predadores serão transportados em caixas de isopor com Gelox® para diminuir a atividade metabólica.

4. Na cultura-alvo a liberação inundativa dos ácaros predadores será feita com a distribuição da casca de arroz nos focos de infestação dos ácaros fitófagos (Figura 1.E).

Figura 1 A-E. Representação esquemática do processo de produção e distribuição de ácaros predadores do projeto de controle biológico de ácaros fitófagos.



CAPÍTULO 13

CÉLULAS FÚNGICAS: PRODUÇÃO, CONTAGEM E VIABILIDADE APLICADAS AO CONTROLE BIOLÓGICO

Lucélia Santi, Markus Berger Oliveira, Walter Orlando Beys da Silva

13.1 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Conídios (ou esporos assexuados) de fungos filamentosos representam a forma mais comum de reprodução assexuada dos fungos, e são muito importantes para a dispersão destes organismos na natureza. Os conídios são células haploides, geneticamente semelhantes aos progenitores, sendo capazes de gerar um novo organismo ao encontrarem condições ambientais favoráveis. A produção de conídios pode ser feita em placas de Petri, normalmente utilizando um meio sintético, ou em substratos mais simples e comuns, como grãos tais como arroz. No último caso, a produção é considerada de larga escala, pois é um método simples e de alto rendimento.

As metodologias apresentadas aqui foram baseadas principalmente para dois fungos amplamente utilizados para controle biológico: *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. Entretanto, os métodos podem ser também aplicados para outros fungos.

a. Em placas de petri

1. Preparar placas contendo o meio escolhido. Para muitos fungos pode-se utilizar o meio BDA (batata-dextrose-ágar), por ser fácil de preparar e conter todos os compostos essenciais para o crescimento fúngico. É um meio de cultura barato e fácil de ser encontrado comercialmente.

2. Fazer o inóculo estriado do fungo utilizando uma alça de platina, preenchendo toda a placa.

3. Manter as placas em estufa à 28°C ou a temperatura desejada até a total esporulação.

4. As placas podem ser utilizadas para a suspensão de esporos, conforme será visto a seguir.

Meio BDA

300 g	Batata (descascadas e picadas)*
10 g	Glicose
18 g	Ágar
1 L	H ₂ O destilada

*ferver a batata com um pouco de água destilada em micro-ondas (10 minutos). Filtrar a água do cozimento, para ser usada no meio, e adicionar os outros ingredientes. Ajustar o volume para 1 L. Esterilizar por autoclavagem (15 minutos à 121°C).

Referências

FRAZZON, A. P.; SILVA, Vaz Junior da; MASUDA, A.; SCHRANK, A; VAIINSTEIN, MH.: In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**. 94(1-2): 117-125. 2000.

b. em arroz – produção em grande escala:

1. Preparar sacos de polipropileno contendo 100 g de arroz branco e 30 mL de uma solução de 0,5% peptona (0,5 g peptona em 100 mL de água destilada). Fechar os sacos com barbante – não apertar muito para permitir a entrada do vapor esterilizante. Esterilizar por autoclavagem (15 minutos, 1 atm, 121°C). Após autoclavagem, apertar o barbante para manter o material estéril.

Dica: o arroz autoclavado pode ficar com grumos, que devem ser desmanchados manualmente (com o saco fechado) antes do inóculo, para facilitar a disseminação do fungo.

2. Em cada saco de arroz esterilizado, adicionar 1 mL de suspensão de conídios na concentração de 10⁶ conídios/mL e misturar bem manualmente.

3. Manter os sacos de arroz em estufa por 28°C por 14 dias. Dependendo do fungo, este tempo pode ser menor ou maior e render mais ou menos conídios.

Dica: semanalmente, observar os sacos inoculados e agitar manualmente o arroz para dispersão dos esporos e melhora no rendimento.

4. Após esporulação do fungo de forma satisfatória, misturar manualmente o arroz para melhorar a liberação dos conídios. Pode-se utilizar uma espátula estéril para misturar o arroz.

5. Colocar o arroz em uma peneira e esfregar com uma espátula estéril para liberação dos esporos.

Dica: preparar um becker grande estéril e colocar sob a peneira para coleta dos esporos. Por ser muito leve, a formação de poeira de esporos é fácil; portanto, o ato de peneirar deve ser feito cuidadosamente para evitar a perda de material.

6. Estes esporos podem ser utilizados de duas formas:

6.1. **secos:** devem ser armazenados em falcons de 50 mL na geladeira, mantendo uma viabilidade alta por normalmente até 1 mês (dependendo do fungo ou isolado).

6.2. **em suspensão:** utilizando uma solução de Tween 80 0,01%, somente água ou outra formulação específica. Podem ser armazenados na geladeira e mantém, normalmente, alta viabilidade por até 1 semana, dependendo do fungo ou isolado.

Dica: o preparo da suspensão pode ser feita diretamente a partir do esporo produzido em placa ou nos sacos de arroz adicionando a água ou solução sem a peneiragem dos esporos.

Dica: sempre antes de utilizar os esporos, independente se forem secos ou em suspensão, deve-se testar sua esterilidade por meio de cultura por 16 horas em meio Luria-Bertani (LB).

Meio LB (Luria-Bertani)

10 g	Peptona
5 g	Extrato de levedura
10 g	NaCl
1 L	H ₂ O destilada

Autoclavar 15 minutos à 121°C

Referências:

BEYS DA SILVA, W.O., SANTI, L., BERGER M., PINTO, A.F.M., GUIMARÃES, J.A., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H.: Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, 44: 829–834. 2009.

SANTI, L.; SILVA, L.A.D.; BEYS DA SILVA, W.O.; CORREA, A.P.F.; RANGEL, D.E.N.; CARLINI, C.R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H.: Virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using soybean oil formulation for control of the cotton stainer bug, *Dysdercus peruvianus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 27:2297–2303. 2011.

13.2 PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE CONÍDIOS (ESPOROS) DE FUNGOS FILAMENTOSOS

O processo de preparo de suspensão de conídios (ou esporos) de fungos filamentosos consiste em liberar os esporos dos fungos cultivados em placas de petri ou outro substrato para posterior cultivo ou inóculo do microrganismo. Desta forma, os experimentos são padronizados pelo número de conídios a ser adicionado.

1. Despejar 3 mL de solução de Tween 80 0,01% sobre a placa de petri contendo o cultivo do fungo filamentoso esporulado.

2. Esfregar com alça de vidro cuidadosamente para liberar os esporos.

3. Transferir o líquido para um tubo do tipo falcon estéril (de 15 ou 50 mL, dependendo da centrífuga a ser utilizada).

4. Centrifugar (5.000 rpm / 10 minutos) e descartar o sobrenadante.

Lavar os esporos com água destilada estéril.

Centrifugar (5.000 rpm / 10 minutos) e descartar o sobrenadante.

Ressuspender a suspensão com água destilada estéril

Testar a esterilidade – adicionar a um tubo de vidro contendo 3 mL de meio LB estéril 10 µL da suspensão de esporos.

Os tubos com meio LB devem ser mantidos por 16 horas sob agitação (180 rpm) à 37°C. Se, após este período, não houver turbidez no tubo, a suspensão não está contaminada e poderá ser utilizada.

Dica: a suspensão de esporos pode ser mantida na geladeira por até sete dias com viabilidade alta, dependendo do fungo ou isolado.

Tween 80 0,01*

1,0 mL	Tween 80
100 mL	H ₂ O destilada

*autoclavar 15 minutos à 121°C

13.3 CONTAGEM DA SUSPENSÃO DE CONÍDIOS OU LEVEDURAS

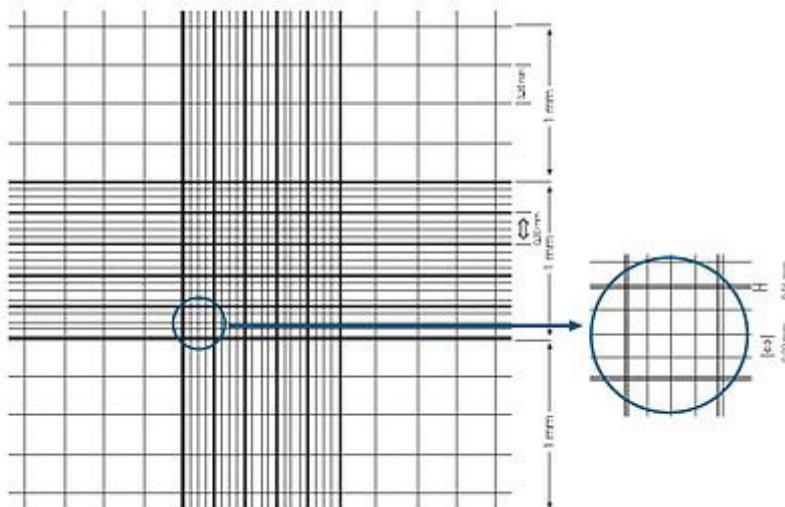
A contagem de uma suspensão de esporos ou leveduras baseia-se no número de células visualizadas em câmara de Neubauer. É importante lembrar que esta contagem não diferencia células viáveis de não viáveis.

Em um tubo *ependorf* (1,5 mL) adicionar 990 μL de água e 10 μL da suspensão de esporos e agitar por alguns segundos em vortex.

Importante lembrar que, para manter a esterilidade da suspensão, a mesma deverá ser sempre manipulada em capela de fluxo laminar ou próxima a um bico de Bunsen, para manter a esterilidade do ambiente de manipulação.

Colocar 10 μL desta mistura em uma câmara de Neubauer e cobrir com uma lamínula.

Para câmaras com 25 quadrados: contar os cinco quadrados das pontas, mais o central (ver figura abaixo):



Cálculo da concentração: número de células contadas \times 5 (para fechar os 25 quadrados) \times 10^4 (fator da câmara de Neubauer) \times 10^2 (diluição realizada dos esporos) \rightarrow o valor é dado em células/mL.

13.4 TESTE DE VIABILIDADE DA SUSPENSÃO DE CONÍDIOS

A viabilidade de uma suspensão de esporos é fundamental para o sucesso do cultivo ou outro tipo de teste, como, por exemplo, bioensaio. O ideal é que uma suspensão tenha uma viabilidade maior ou igual a 80%.

Dica: o teste de viabilidade pode ser realizado logo após a suspensão de esporos ficar pronta, uma vez que o tempo para avaliação da viabilidade é próximo ao tempo para teste de esterilidade.

Em uma placa de petri contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar), adicionar 0,1 mL da suspensão de esporos e espalhar com o auxílio de uma alça de vidro, previamente esterilizada e fria.

Incubar a placa em estufa de 24 a 72 horas, dependendo do fungo ou isolado, à 28°C.

Realizar a contagem dos esporos ou conídios germinados a partir das Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) visualizadas.

13.5 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE DE CONÍDIOS FÚNGICOS

Conídios apresentam diversas proteínas em sua superfície, que podem ser separadas sem necessariamente causar a ruptura celular. Estas proteínas são importantes para estudos de interação das células fúngicas com seus hospedeiros, caracterização enzimática ou proteômica, por exemplo.

1. Os conídios podem estar secos ou úmidos (como após a centrifugação de uma suspensão como descrito acima).

2. Adicionar às células o tampão de extração (Tris-HCl pH 8,0 contendo 0,25% de Triton X-100) na proporção de 1:2,5 (1 g de célula para 2,5 mL tampão).

3. Agitar em vortex por 5 minutos.

4. Centrifugar o material por 15 minutos a 13.000 rpm.

5. Filtrar o sobrenadante em filtro de poro 0,22 μm .

6. Aliquotar (em *eppendorfs* de 1,5 mL e falcons de 15 mL) e armazenar à -20 °C.

Dica: antes da filtração em poro 0,22 μm , filtrar em papel filtro comum, que facilita a última etapa e economiza o filtro mais caro.

Referências

BEYS DA SILVA, W.O.; SANTI, L.; BERGER M.; PINTO, A.F.M.; GUIMARÃES, J.A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H.: Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, 44: 829–834. 2009.

CAPÍTULO 14

MODELOS BIOLÓGICOS PRÉ-CLÍNICOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE SUBSTÂNCIAS FARMACOLOGICAMENTE ATIVAS

Jorge Almeida Guimarães, Lucélia Santi, Markus Berger Oliveira, Walter Orlando Beys da Silva

Os modelos biológicos têm papel fundamental, tanto na etapa de pesquisa básica quanto nas etapas de desenvolvimento pré-clínico, para novos medicamentos e substâncias farmacologicamente ativas. Nesses casos, modelos que utilizam organismos vivos para mimetizar uma determinada fisiopatologia são imprescindíveis para o seguimento de uma série de etapas, entre elas: A seleção do alvo molecular; o desenvolvimento de ensaios farmacológicos específicos que permitam aferir a atividade sobre o alvo selecionado; o desenho molecular racional de ligantes para o alvo eleito; testes de segurança e eficácia; e ensaios de toxicologia. Neste capítulo, apresentaremos alguns protocolos de modelos biológicos *in vivo* clássicos úteis tanto para o estudo do mecanismo de ação de novas substâncias e/ ou extratos quanto para a investigação da fisiopatologia de doenças. Ênfase será dada aos modelos de doenças tromboembólicas e inflamatórias.

14.1 MODELO DE TROMBOSE VENOSA LOCAL

Neste protocolo o processo de trombose venosa é induzido localmente na veia cava inferior de ratos por uma combinação de estase mecânica e estímulo pró-coagulante. A formação de trombo é induzida tanto pelo estreitamento da veia cava (estase) quanto pela injeção de um agente que dispara a cascata de coagulação sanguínea (tromboplastina). As principais aplicações são para a avaliação dos efeitos anticoagulantes e antitrombóticos de diferentes fármacos, extratos ou compostos isolados de plantas, ou ainda para estudar o papel de diferentes proteínas, células, plaquetas e outros mediadores do processo de hemostasia.

Animais

São utilizados ratos adultos machos da linhagem Wistar (200-250 g), mantidos em biotério específico, com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 22 ± 2 °C e umidade de 60 - 80 %, com livre acesso à água e à ração. Pelo menos dois dias antes dos experimentos, transferir os animais para o biotério do setor onde os procedimentos serão realizados para adaptação. Todos os experimentos com animais devem seguir obrigatoriamente as atribuições e competências definidas na Lei 11.794/08 e em resoluções do Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA). Antes da realização de qualquer procedimento, o protocolo - incluindo a identificação das substâncias ou extratos a serem testados e suas doses -, devem ser submetidos à análise da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da instituição. Os métodos de anestesia e eutanásia sugeridos aqui estão de acordo com o *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (edição revisada em 1996 -<http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>).

Materiais

- Mesa cirúrgica;
- Seringa descartável para insulina com agulha 1 mL (13 X 0,45 mm - 26 G^{1/2});
- Fio cirúrgico de Nylon monofilamento 4-0 (45 cm) 3/8, estéril, não absorvível sem agulha;
- Algodão e gaze;
- Material cirúrgico (pinça simples reta, pinça simples curva, pinça dente-de-rato, pinças hemostáticas e tesoura reta);
- Placas de petri e papel filtro;
- Lâmina de aço para realizar tricotomia ou raspador elétrico;
- Cronômetro;
- Estufa à 60 °C;
- Balança analítica;
- Tampão fosfato (PBS);
- Álcool iodado 1%;
- Tromboplastina;
- Xilazina e Ketamina.

Procedimentos

1. Pesar o animal;
2. Preparar na mesma seringa e administrar por via intraperitoneal (i.p.) a mistura de Xilazina (10 mg/kg) + Ketamina (75 mg/kg). Esta dose mantém um bom plano anestésico por 30-45 minutos. Após este tempo, suplementar com 1/3 da dose de Ketamina;
3. Dispor o animal na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, prendendo patas e cabeça;
4. Realizar a tricotomia de toda a região abdominal e antisepsia com algodão embebido em álcool iodado 1%;
5. Proceder a incisão do abdome, afastar a parede antero-lateral com as pinças hemostáticas e rebater o intestino grosso para o lado direito do animal, a fim de expor a veia cava inferior. Manter a região do intestino permanentemente hidratada com gaze embebida em PBS (37 °C) durante todo o procedimento;
6. Localizar a veia cava inferior próximo às veias renais e, com o auxílio das pinças retas e dente-de-rato, dissecá-la cuidadosamente até a região de confluência das veias ilíacas comuns, isolando-a do tecido conjuntivo adjacente e da aorta abdominal;
7. Com o auxílio da pinça simples curva, passar os fios de nylon 4-0 pelas tributárias de maior calibre e pela veia renal esquerda deixando nós frouxos, sem que haja obstrução do fluxo sanguíneo, para posterior ligadura;
8. Com o auxílio da pinça simples curva passar um fio de nylon 4-0 na extremidade cranial (ou superior da veia cava), imediatamente abaixo da veia renal direita, e outro fio na extremidade caudal (ou inferior da veia cava) próximo à região de confluência das veias ilíacas comuns. Manter os nós frouxos, sem que haja obstrução do fluxo sanguíneo, para posterior ligadura;
9. Administrar a substância a ser testada ou PBS (no caso dos animais do grupo controle) por via intravenosa, diretamente na veia cava inferior próximo às ilíacas. O volume máximo a ser injetado deve ser de 0,5 mL diluídos em PBS (37 °C);
10. Cronometrar 5 minutos;
11. Administrar a solução de tromboplastina (3 mg/kg em volume máximo de 0,5 mL) diretamente na veia cava inferior próximo às ilíacas e ligar a extremidade cranial (logo abaixo da veia renal direita);
12. Cronometrar 20 minutos;
13. Ligar os demais pontos, incluindo a veia renal esquerda, as tributárias de maior calibre e a extremidade caudal da veia cava inferior;
14. Dissecar cuidadosamente o segmento da veia cava ligado contendo o trombo. Começar a dissecação pela extremidade superior e, após retirá-lo completamente, lavar o segmento com PBS (37 °C);
15. Cortar um dos nós do segmento extraído e retirar o trombo formado;
16. Lavar o trombo com PBS 37 °C, secar em papel filtro e pesar o trombo úmido em balança analítica;
17. Manter o trombo em estufa à 60 °C por 1 hora;
18. Pesar o trombo seco em balança analítica.

Análise dos Resultados

Os resultados são expressos pela razão entre a massa do trombo seco e a massa do animal (geralmente mg de trombo/g de rato) e representados em um gráfico versus a dose da substância testada. No caso de uma substância antitrombótica, antiplaquetária ou de um inibidor da coagulação, espera-se que essa razão diminua conforme há um aumento de dose. Um número de 8-10 animais por grupo a ser testado é recomendado para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

Referências:

DAHMER, T.; BERGER, M.; BARLETTE, AG.; RECK, J. Jr.; SEGALIN, J.; VERZA, S.; ORTEGA, GG.; GNOATTO, SC.; GUIMARÃES, J.A.; VERLI, H.; GOSMANN, G.: Antithrombotic effect of chikusetsusaponin IVa isolated from *Ilex paraguariensis* (Maté). **J Med Food**. 2012, 15(12):1073-80.

RECK, J. Jr.; BERGER, M.; MARKS F.S.; ZINGALI, R.B.; CANAL, C. W.;; FERREIRA, C. A.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C.: Pharmacological action of tick saliva upon haemostasis and the neutralization ability of sera from repeatedly infested hosts. **Parasitology**. 2009, 136(11):1339-49.

VOGEL, G. M.; MEULEMAN, D. G.; BOURGONDIEN, F. G.; HOBBELEN, P. M.: Comparison of two experimental thrombosis models in rats effects of four glycosaminoglycans. **Thromb Res** 1989; 54: 399–410.

14.2 MODELO DE TROMBOSE VENOSA PROFUNDA

Neste protocolo o processo de trombose venosa é induzido sistemicamente na veia cava inferior de ratos ou camundongos por estase mecânica. O trombo é formado pela completa obstrução de parte da veia cava inferior o que acaba por disparar o processo de coagulação naturalmente por lesão endotelial e inflamação da parede do vaso. As principais aplicações são para a avaliação dos efeitos anticoagulantes e antitrombóticos de diferentes fármacos, extratos ou compostos isolados de plantas, ou ainda para estudar o papel de diferentes proteínas, células, plaquetas e também a contribuição de mediadores inflamatórios e quimiocinas para o processo de hemostasia. Modelo de escolha para o estudo da interação entre o processo inflamatório na parede do vaso e a formação de um trombo venoso oclusivo.

Animais

São utilizados ratos (200-250 g) ou camundongos (25-30 g) adultos machos mantidos em biotério específico, com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 22 ± 2 °C e umidade de 60 - 80 %, com livre acesso a água e ração. Pelo menos dois dias antes dos experimentos, transferir os animais para o biotério do setor onde os procedimentos serão realizados para adaptação. Todos os experimentos com animais devem seguir obrigatoriamente as atribuições e as competências definidas na Lei 11.794/08 e em resoluções do Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA). Antes da realização de qualquer procedimento o protocolo, incluindo a identificação das substâncias ou extratos a serem testados e suas doses, devem ser submetidos à análise da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da instituição. Os métodos de anestesia e eutanásia sugeridos aqui estão de acordo com o *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (edição revisada em 1996 -<http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>).

Materiais

- Mesa cirúrgica;
- Manta de aquecimento;
- Seringa descartável para insulina com agulha 1 mL (13 X 0,45 mm - 26 G^{1/2});
- Fio cirúrgico de Nylon monofilamento 4-0 (45 cm) 3/8, estéril, não absorvível com e sem agulha;
- Algodão e gaze;
- Material cirúrgico (pinça simples reta, pinça simples curva, pinça dente-de-rato, pinças hemostáticas e tesoura reta);
- Placas de petri e papel filtro;
- Lâmina de aço para realizar tricotomia ou raspador elétrico;
- Estufa à 60 °C;
- Balança analítica;
- Tampão fosfato (PBS);
- Álcool iodado 1%;
- Lidocaína;
- Xilazina e Ketamina.

Procedimentos

1. Pesar o animal;
2. Preparar na mesma seringa e administrar por via intraperitoneal (i.p.) a mistura de Xilazina (10 mg/kg) + Ketamina (75 mg/kg). Esta dose mantém um bom plano anestésico por 30-45 minutos. Após este tempo, suplementar com 1/3 da dose de Ketamina;
3. Dispor o animal na mesa cirúrgica aquecida à 37 °C em decúbito dorsal, prendendo patas e cabeça (importante manter a temperatura de 37-38 °C durante todo o procedimento);
4. Realizar a tricotomia de toda a região abdominal e antisepsia com algodão embebido em álcool iodado 1%;
5. Proceder a incisão do abdome (incisão de aproximadamente 2 cm), afastar a parede antero-lateral com as pinças hemostáticas e rebater o intestino grosso para o lado direito do animal, a fim de expor a veia cava inferior. Manter a região do intestino permanentemente hidratada com gaze embebida em PBS (37 °C) durante todo o procedimento;
6. Localizar a veia cava inferior próximo às veias renais e com o auxílio das pinças retas e dente-de-rato dissecá-la cuidadosamente somente na região entre as veias renais esquerda e direita, isolando-a do tecido conjuntivo adjacente e da aorta abdominal.
Dica: esta etapa deve ser realizada com cuidado especial no caso de camundongos devido à fragilidade dos tecidos. Recomenda-se o uso de uma lupa cirúrgica para facilitar a visualização das estruturas e evitar lesão na cava e aorta;
7. Com o auxílio da pinça simples curva passar os fios de nylon 4-0 e imediatamente ligar as tributárias de maior calibre e outros pequenos vasos que são ramificações da cava inferior principalmente no segmento entre as veias renais e a bifurcação da veia íliaca;
8. Com o auxílio da pinça simples curva passar um fio de nylon 4-0 e imediatamente ligar a veia cava inferior logo abaixo das veias renais;
9. Cuidadosamente acondicionar novamente o intestino na cavidade abdominal e suturar em dois planos (parede abdominal e pele);
10. Administrar lidocaína 4 mg/kg (0,4 mL/kg de uma solução à 1 %) diretamente no local da sutura;
11. Manter os animais na manta de aquecimento à 37 °C até a completa recuperação da anestesia;
12. Após diferentes tempos da indução da estase (após a ligação da veia cava) os animais são novamente anestesiados seguindo o esquema acima e uma nova incisão na parede abdominal é realizada;
14. Dissecar cuidadosamente o segmento da veia cava ligado contendo o trombo (abaixo das veias renais). Começar a dissecação pela extremidade superior e, após retirá-lo completamente, lavar o segmento com PBS (37 °C);
15. Cortar o nó do segmento extraído e retirar o trombo formado;
16. Lavar o trombo com PBS 37 °C, secar em papel filtro e pesar o trombo úmido em balança analítica;
17. Manter o trombo em estufa à 60 °C por 1 hora;
18. Pesar o trombo seco em balança analítica.

Dicas: 1. Usando este modelo, a substância a ser testada pode ser administrada como pré-tratamento (antes da indução da estase) ou pós-tratamento (após a indução da estase) por via oral, intraperitoneal, subcutânea ou intravenosa. Se a via de escolha for a intravenosa, recomenda-se administrar pela veia caudal;

2. O trombo pode ser retirado em diferentes tempos após a indução da estase variando de 24 horas até 21 dias dependendo do tipo de substância a ser testada. Normalmente a massa do trombo aumenta com o tempo entre o primeiro e o quarto dia devido ao intenso processo inflamatório e ativação da coagulação e, posteriormente, diminui a partir do quarto dia dependendo da resolução do processo inflamatório e ativação da fibrinólise.

Análise dos Resultados

Os resultados são expressos pela razão entre a massa do trombo seco e a massa do animal (geralmente mg de trombo/g de rato) e representados em um gráfico versus a dose da substância testada. No caso de uma substância antitrombótica, antiplaquetária ou de um inibidor da coagulação espera-se que essa razão diminua conforme há um aumento de dose. Um número de 8-10 animais por grupo a ser testado é recomendado para garantir a reprodutibilidade dos resultados. Além da massa do trombo outros parâmetros podem ser analisados como contagem de células inflamatórias na parede do vaso, histologia, quantificação da deposição de proteínas e fibrose na parede do vaso, morfologia e morfometria do coágulo, análise da expressão de genes de interesse nas células vasculares, e ensaios de atividade enzimática no plasma.

Referências

- Diaz JA, Ballard-Lipka NE, Farris DM, Hawley AE, Wroblewski SK, Myers DD, Henke PK, Lawrence DA, Wakefield TW. Impaired fibrinolytic system in ApoE gene-deleted mice with hyperlipidemia augments deep vein thrombosis. **J Vasc Surg.** 2012;55(3):815-22.
- Shuster KA, Wroblewski SK, Hawley AE, Lucchesi BR, Sorenson DR, Bergin IL, Sigler RE, Guire KE, Nowland MH, Wakefield TW, Myers DD Jr. Prothrombotic effects of thrombolytic therapy in a rat (*Rattus norvegicus*) model of venous thrombolysis. **Comp Med.** 2013; 63(3):244-51.
- Wroblewski SK, Farris DM, Diaz JA, Myers DD Jr, Wakefield TW. Mouse complete stasis model of inferior vena cava thrombosis. **J Vis Exp.** 2011; 15;(52).

14.3 MODELO DE HEMORRAGIA

Neste protocolo a hemorragia é induzida pelo corte da cauda de ratos ou camundongos e o tempo de sangramento é registrado. As principais aplicações são para a avaliação da segurança de substâncias e/ou extratos com reconhecida atividade anticoagulante e/ou antitrombótica.

Animais

São utilizados ratos (200-250 g) ou camundongos (25-30 g) adultos machos mantidos em biotério específico, com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 22 ± 2 °C e umidade de 60 - 80 %, com livre acesso a água e ração. Pelo menos dois dias antes dos experimentos, transferir os animais para o biotério do setor onde os procedimentos serão realizados para adaptação. Todos os experimentos com animais devem seguir obrigatoriamente as atribuições e competências definidas na Lei 11.794/08 e em resoluções do Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA). Antes da realização de qualquer procedimento o protocolo, incluindo a identificação das substâncias ou extratos a serem testados e suas doses, devem ser submetidos à análise da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da instituição. Os métodos de anestesia e eutanásia sugeridos aqui estão de acordo com o *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (edição revisada em 1996 -<http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>).

Materiais

- Mesa cirúrgica;
- Seringa descartável para insulina com agulha 1 mL (13 X 0,45 mm - 26 G^{1/2});
- Lâmina de bisturi n° 20;
- Cronômetro;
- Papel filtro;
- Água destilada;
- PBS;
- Álcool iodado 1%;
- Heparina;
- Xilazina e Ketamina.

Procedimentos

1. Pesar o animal;
2. Preparar na mesma seringa e administrar por via intraperitoneal (i.p.) a mistura de Xilazina (10 mg/kg) + Ketamina (75 mg/kg). Esta dose mantém um bom plano anestésico por 30-45 minutos. Após este tempo, suplementar com 1/3 da dose de Ketamina;
3. Dispor o animal na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, prendendo patas e cabeça;
4. Realizar a antisepsia da cauda com álcool iodado 1% e administrar a substância a ser testada, PBS ou heparina (50 µg/kg) por via intravenosa na veia caudal;
5. Após 5 minutos, com a lâmina de bisturi, realizar uma incisão a distância de aproximadamente 3 mm da ponta da cauda;
6. Cronometrar o tempo de parada do sangramento;
7. Após o experimento sacrificar os animais por aprofundamento da anestesia.

Análise dos Resultados

Os resultados são expressos como tempo de sangramento e comparados com os tempos dos animais controles tratados com PBS ou heparina;

Espera-se que substâncias com atividade anticoagulante e/ou antitrombótica prolonguem o tempo de sangramento. No entanto, esse tempo não deve ser superior ao tempo de sangramento induzido pela droga controle (heparina). Caso seja superior, a substância teste possui um risco potencial de ser hemorrágica.

Referências:

Dahmer T, Berger M, Barlette AG, Reck J Jr, Segalin J, Verza S, Ortega GG, Gnoatto SC, Guimarães JA, Verli H, Gosmann G. Antithrombotic effect of chikusetsusaponin IVa isolated from *Ilex paraguariensis* (Maté). **J Med Food**. 2012, 15(12):1073-80.

Mendes-Silva W, Assafim M, Ruta B, Monteiro RQ, Guimarães JA, Zingali RB. Antithrombotic effect of Glycyrrhizin, a plant-derived thrombin inhibitor. **Thromb Res**. 2003;112(1-2):93-8.

14.4 MODELO DE ASMA ALÉRGICA

Neste protocolo a inflamação pulmonar alérgica é induzida por ovalbumina em camundongos. As principais aplicações são para a avaliação dos efeitos anti-inflamatórios e imunorregulatórios de diferentes substâncias, como drogas sintéticas e produtos naturais (extratos ou compostos isolados de plantas), ou ainda, para estudar o papel de células inflamatórias, proteínas, quimiocinas e citocinas no pulmão.

Animais

São utilizados camundongos (25-30 g) adultos machos mantidos em biotério específico, com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 22 ± 2 °C e umidade de 60 - 80 %, com livre acesso a água e ração. Pelo menos dois dias antes dos experimentos transferir os animais para o biotério do setor onde os procedimentos serão realizados para adaptação. Todos os experimentos com animais devem seguir obrigatoriamente as atribuições e competências definidas na Lei 11.794/08 e em resoluções do Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA). Antes da realização de qualquer procedimento o protocolo, incluindo a identificação das substâncias ou extratos a serem testados e suas doses, devem ser submetidos à análise da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da instituição. Os métodos de anestesia e eutanásia sugeridos aqui estão de acordo com o *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (edição revisada em 1996 -<http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>).

Materiais

- Mesa cirúrgica;
- Seringa descartável para insulina com agulha 1 mL (13 X 0,45 mm - 26 G^{1/2});
- Material cirúrgico (pinça simples reta, pinça dente-de-rato, pinças hemostáticas e tesoura reta);
- Lâmina de aço para realizar tricotomia ou raspador elétrico;
- Cateter intravascular periférico (20 G) ou cânula PE-50 conectada a uma seringa de 1 mL;
- Pinça histológica (ponta fina);
- Pipeta automática;
- PBS;
- Heparina (20 UI/mL);
- Hidróxido de Alumínio;
- Isoflurano;
- Pentobarbital sódico;
- Ovalbumina.

Procedimentos

1. Anestésiar os animais levemente com isoflurano e realizar a 1º imunização (dia zero) pela injeção subcutânea (s.c.) de uma suspensão contendo 4 µg de ovalbumina e 1,6 mg de hidróxido de alumínio em PBS (volume máximo de 0,2 mL). Os animais controle devem ser injetados com PBS (0,2 mL) por via s.c.;

2. No 7º dia após a 1º imunização (dia zero), realizar a 2º imunização seguindo o mesmo esquema anterior;

3. No 14º dia (1º desafio) após a primeira imunização (dia zero), anestesiá-los levemente os animais com isoflurano e administrar via intranasal (i.n) 50 µL de uma solução contendo 10 µg de ovalbumina em PBS. Aos animais controle administrar 50 µL de PBS (i.n).

Dica: aplicar a ovalbumina ou PBS com o auxílio de uma pipeta diretamente ao focinho dos animais enquanto estiverem ofegantes;

4. Repetir o procedimento anterior no 21º dia (2º desafio) após a primeira imunização (dia zero);

5. Após 24 h do 2º desafio sacrificar os animais pela injeção i.p de pentobarbital sódico (50 mg/kg);

6. Dispor o animal na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, prendendo patas e cabeça;

7. Proceder a tricotomia da região do pescoço e tórax, realizar uma incisão na região do pescoço (1 cm abaixo do focinho) e expor a traqueia. Dissecar cuidadosamente a região da traqueia separando-a do tecido conjuntivo subjacente, glândulas e músculo;

8. Após a completa dissecação e exposição da traqueia, inserir a pinça histológica na região abaixo da traqueia no sentido do lado esquerdo para o direito do animal, a fim de dar suporte para a inserção do cateter;

9. Introduzir o cateter intravascular 20 G ou a cânula PE-50 na porção superior da traqueia. Se for utilizado o cateter, retirar a agulha e, em seguida, retirar também a pinça histológica abaixo da traqueia;

10. Realizar a lavagem bronco-alveolar. Para isso, conectar uma seringa de insulina (1 mL) no cateter ou cânula e injetar de 0,3 - 0,4 mL de heparina (20 UI/mL) diluída em PBS. O líquido injetado deve ser coletado novamente e o procedimento deve ser repetido por mais duas vezes totalizando um volume coletado de lavado bronco-alveolar de 1 mL.

Dica: trocar a seringa a cada grupo experimental e manter o lavado coletado no gelo;

11. Após a coleta do lavado bronco-alveolar, dissecar a região dos pulmões, removê-los e lavá-los com PBS. Parte do tecido pulmonar deve ser congelado imediatamente em nitrogênio líquido e reservado para posterior análise de mediadores inflamatórios. Outra parte do tecido deve ser armazenada em formaldeído tamponado 10 % para análise histológica.

Análise dos Resultados

Neste protocolo, os resultados podem ser expressos de uma série de maneiras diferentes dependendo do direcionamento das análises. Normalmente, o grau de inflamação pulmonar é determinado pela contagem total e diferencial de células inflamatórias presentes no lavado bronco-alveolar. A análise dessas células também pode ser feita diretamente no tecido pulmonar por histologia. Além disso, citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e a atividade de algumas enzimas podem ser dosadas tanto no lavado bronco-alveolar quanto no tecido pulmonar.

Referências:

RUSSO M, NAHORI MA, LEFORT J, GOMES E, DE CASTRO KELLER A, RODRIGUEZ D, RIBEIRO OG, ADRIOUCH S, GALLOIS V, DE FARIA AM, VARGAFTIG BB. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24(5):518-26.

14.5 MODELO DE PERMEABILIDADE VASCULAR

Neste protocolo as alterações da permeabilidade vascular podem ser quantificadas pelo extravasamento vascular de um marcador (o corante azul de evans) que liga-se à albumina plasmática. Pela ação de um estímulo vasodilatador ou pró-inflamatório o corante pode ser detectado no tecido. As principais aplicações são para a avaliação dos efeitos anti-inflamatórios e anti-edematogênicos de diferentes substâncias, como drogas sintéticas e produtos naturais (extratos ou compostos isolados de plantas), ou ainda, para estudar o papel de células inflamatórias, peptídeos vasoativos, substâncias vasodilatadoras, quimiocinas e citocinas.

Animais

São utilizados ratos adultos machos (200-250 g) mantidos em biotério específico, com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 22 ± 2 °C e umidade de 60 - 80 %, com livre acesso à água e à ração. Pelo menos dois dias antes dos experimentos, transferir os animais para o biotério do setor onde os procedimentos serão realizados para adaptação. Todos os experimentos com animais devem seguir obrigatoriamente as atribuições e competências definidas na Lei 11.794/08 e em resoluções do Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA). Antes da realização de qualquer procedimento, o protocolo - incluindo a identificação das substâncias ou extratos a serem testados e suas doses -, devem ser submetidos à análise da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da instituição. Os métodos de anestesia e eutanásia sugeridos aqui estão de acordo com o *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (edição revisada em 1996 -<http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>).

Materiais

- Mesa cirúrgica;
- Seringa descartável para insulina com agulha 1 mL (13 X 0,45 mm - 26 G^{1/2});
- Material cirúrgico (pinça simples reta, pinça dente-de-rato, pinças hemostáticas e tesoura reta);
- Lâmina de aço para realizar tricotomia ou raspador elétrico;
- PBS;
- Azul de Evans (C₃₄H₂₄N₆Na₄O₁₄S₄);
- Bradicininina;
- Histamina;
- Formamida;
- Estufa 40 °C;
- Xilazina e Ketamina;

Procedimentos

1. Preparar na mesma seringa e administrar por via intraperitoneal (i.p.) a mistura de Xilazina (10 mg/kg) + Ketamina (75 mg/kg). Esta dose mantém um bom plano anestésico por 30-45 minutos. Após este tempo, suplementar com 1/3 da dose de Ketamina;
2. Dispor o animal na mesa cirúrgica em decúbito ventral, prendendo patas e cabeça;
3. Injetar por via intravenosa na veia caudal 50 mg/kg de Azul de Evans diluído em PBS (volume máximo de 0,5 mL);

4. Realizar a tricotomia de toda a região dorsal do animal e dividir o dorso em aproximadamente 10 - 12 quadrantes.

Dica: os pelos devem ser retirados completamente para facilitar a marcação e posterior injeção intradérmica (i.d.);

5. Em cada quadrante injetar via i.d. (volume máximo de 0,1 mL): PBS (controle negativo), 3 nmols de bradicinina (controle positivo), 30 pmols de histamina (controle positivo) e diferentes doses da substância a ser testada.

Dica: outras substâncias podem ser usadas como controle positivo dependendo do mecanismo que se deseja explorar. Alternativamente, a substância-teste também pode ser coadministrada com bradicinina ou histamina para explorar a sua capacidade de inibir o extravasamento causado por essas drogas vasoativas;

6. Após 30 minutos sacrificar os animais por aumento da dose de anestésico;

7. Dissecar cuidadosamente toda a região subcutânea do dorso do animal e remover a pele;

8. Separar cada quadrante em tubos previamente identificados contendo 2,5 mL de formamida 1:1;

9. Extrair o azul de evans extravasado para o tecido incubando os tubos à 40 °C por 48 horas;

10. Separar a formamida de cada um dos tubos e dosar o azul de evans extraído em espectrofotômetro a 600 nm;

11. Calcular a quantidade de azul de evans presente em cada tubo, utilizando uma curva padrão feita previamente com concentrações conhecidas do corante.

Análise dos Resultados

Os resultados são expressos como quantidade de azul de evans (μg) extraída por quadrante de pele. A quantidade de azul de evans extraída na presença da substância a ser testada deve ser comparada com aquela extraída na presença de uma droga controle que induza o aumento de permeabilidade vascular (no caso sugerimos bradicinina ou histamina). O modelo oferece a vantagem de que diferentes doses podem ser testadas em um único animal.

Referências:

RATTMANN YD, PEREIRA CR, CURY Y, GREMSKI W, MARQUES MC, DA SILVA-SANTOS JE. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. **Toxicon** 2008; 1;51(3):363-72.

14.6 MODELO DE GASTRITE

Neste protocolo, a inflamação no estômago (úlcera gástrica) é induzida em ratos pelo tratamento com etanol/HCl. As principais aplicações são para a avaliação dos efeitos anti-inflamatórios e imunorregulatórios de diferentes substâncias, como drogas sintéticas e produtos naturais (extratos ou compostos isolados de plantas), ou ainda, para estudar o papel de células inflamatórias, proteínas, quimiocinas e citocinas no processo de inflamação gástrica.

Animais

São utilizados ratos adultos machos (200-250 g) mantidos em biotério específico, com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 22 ± 2 °C e umidade de 60 - 80 %, com livre acesso à água e à ração. Pelo menos dois dias antes dos experimentos, transferir os animais para o biotério do setor onde os procedimentos serão realizados para adaptação. Todos os experimentos com animais devem seguir obrigatoriamente as atribuições e competências definidas na Lei 11.794/08 e em resoluções do Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA). Antes da realização de qualquer procedimento o protocolo, incluindo a identificação das substâncias ou extratos a serem testados e suas doses, devem ser submetidos à análise da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da instituição. Os métodos de anestesia e eutanásia sugeridos aqui estão de acordo com o *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (edição revisada em 1996 -<http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>).

Materiais

- Mesa cirúrgica;
- Seringa descartável para insulina com agulha 1 mL (13 X 0,45 mm - 26 G^{1/2});
- Fio cirúrgico de Nylon monofilamento 4-0 (45 cm) 3/8, estéril, não absorvível sem agulha;
- Material cirúrgico (pinça simples reta, pinça dente-de-rato, pinças hemostáticas e tesoura reta);
- Cânula de gavagem para ratos;
- Fita para medição de pH;
- Lâmina de aço para realizar tricotomia ou raspador elétrico;
- PBS;
- Etanol 80 %;
- HCl 5 %;
- Pantoprazol;
- Pentobarbital sódico;

Procedimentos

1. Pesar os animais, identificá-los e dividi-los em grupos de, no máximo, 4 indivíduos por caixa;
2. Vinte e quatro horas antes da realização do experimento, retirar a ração dos animais, mantendo-os em jejum de alimentos sólidos com acesso somente à água;
3. Com o auxílio da cânula de gavagem, injetar nos animais por via oral a substância a ser testada ou o controle positivo - pantoprazol 40 mg/kg;

4. Após 1 hora, também com o auxílio da cânula de gavagem, administrar 5 mL/kg da mistura ulcerogênica (80 % etanol + 5 % HCl);
5. Após 4 horas da administração da mistura ulcerogênica sacrificar os animais pela injeção i.p de pentobarbital sódico (50 mg/kg);
6. Dispor o animal na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, prendendo patas e cabeça;
7. Realizar a tricotomia da região abdominal;
8. Realizar uma incisão na região do abdome (abaixo da apófise xifóide) de 3-4 cm, expor o estômago (sem cortá-lo) e ligar o esôfago e o piloro com o auxílio dos fios de nylon 4-0, a fim de que o conteúdo gástrico não se perca;
9. Remover o estômago cortando na extremidade anterior dos nós do esôfago e piloro;
10. Remover o nó do piloro, recolher o conteúdo gástrico em um recipiente e medir o pH com o auxílio das fitas de medição;
11. Remover o nó do esôfago e abrir o estômago ao longo da grande curvatura para a contagem das lesões gástricas;
12. Lavar o estômago com PBS e observá-lo para a presença de hiperemia, hemorragia, número e tamanho das úlceras. Alternativamente, as úlceras poderão ser medidas com o auxílio de um paquímetro para quantificar o tamanho da área lesionada. Nesses casos, lesões de nível 1 correspondem a úlceras de 1 mm, lesões de nível 2 a úlceras de 2 mm e lesões de nível 3 a úlceras de 3 mm (Szeleny & Thiemer, 1978);
13. Congelar imediatamente parte do tecido de cada estômago em nitrogênio líquido para análise posterior de citocinas, quimiocinas e outros marcadores moleculares de lesão. Outra parte dos tecidos devem ser reservadas em formaldeído tamponado 10 % para análise histológica.

Análise dos Resultados

Neste protocolo, os resultados podem ser expressos de uma série de maneiras diferentes, dependendo do direcionamento das análises. Normalmente, o grau de inflamação gástrica e gravidade da doença desenvolvida é determinado pela avaliação do estado geral dos animais, aparência morfológica macroscópica do estômago, pH do conteúdo gástrico, tamanho das úlceras desenvolvidas e alterações histológicas associadas à inflamação. Além disso, citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e a atividade de algumas enzimas podem ser dosadas no tecido gástrico.

Referências

- HAULE EE, MOSHI MJ, NONDO RS, MWANGOMO DT, MAHUNNAH RL. A study of antimicrobial activity, acute toxicity and cytoprotective effect of a polyherbal extract in a rat ethanol-HCl gastric ulcer model. **BMC Res Notes**. 2012; 2;5:546.
- MOSHI MJ, NONDO RS, HAULE EE, MAHUNNAH RL, KIDUKULI AW. Antimicrobial activity, acute toxicity and cytoprotective effect of *Crassocephalum vitellinum* (Benth.) S. Moore extract in a rat ethanol-HCl gastric ulcer model. **BMC Res Notes**. 2014; 19;7(1):91.
- SZELENYI I, THIEMER K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. **Arch Toxicol**. 1978; 13;41(1):99-105.

14.7 MODELO DE COLITE

Neste protocolo, a inflamação no cólon (colite ulcerativa ou doença de Crohn) é induzida em ratos ou camundongos pelo tratamento com dextran sulfato de sódio (DSS). As principais aplicações são para a avaliação dos efeitos anti-inflamatórios e imunorregulatórios de diferentes substâncias, como drogas sintéticas e produtos naturais (extratos ou compostos isolados de plantas), ou ainda, para estudar o papel de células inflamatórias, proteínas, quimiocinas e citocinas no processo de inflamação colônica. O modelo também é bastante útil para o estudo de doenças extraintestinais, comumente associadas à doença de Crohn, como: insuficiência renal, trombose e inflamação pulmonar.

Animais

São utilizados ratos (200-250 g) ou camundongos (25-30 g) adultos machos mantidos em biotério específico, com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 22 ± 2 °C e umidade de 60 - 80 %, com livre acesso a água e ração. Pelo menos dois dias antes dos experimentos, transferir os animais para o biotério do setor onde os procedimentos serão realizados para adaptação. Todos os experimentos com animais devem seguir obrigatoriamente as atribuições e competências definidas na Lei 11.794/08 e em resoluções do Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA). Antes da realização de qualquer procedimento o protocolo, incluindo a identificação das substâncias ou extratos a serem testados e suas doses, devem ser submetidos à análise da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da instituição. Os métodos de anestesia e eutanásia sugeridos aqui estão de acordo com o *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (edição revisada em 1996 -<http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>).

Materiais

- Mesa cirúrgica;
- Seringa descartável para insulina com agulha 1 mL (13 X 0,45 mm - 26 G^{1/2});
- Material cirúrgico (pinça simples reta, pinça dente-de-rato, pinças hemostáticas e tesoura reta);
- Lâmina de aço para realizar tricotomia ou raspador elétrico;
- Balança analítica;
- PBS;
- Dextran sulfato de sódio (DSS);
- Pentobarbital sódico;

Procedimentos

1. Pesar os animais, identificá-los e dividi-los em grupos de, no máximo, 4 indivíduos por caixa;
2. Iniciar o tratamento com DSS 3,5 % diluído diretamente na água de beber dos animais (dia zero).

Dica: os animais controle permanecem tendo acesso à água normal;

3. Manter o tratamento com DSS 3,5 % por 8 dias.

Dica: os animais devem ser observados, trocados e pesados diariamente durante o tratamento;

4. No dia 6 de indução da colite, administrar o tratamento com a substância a ser testada pela via de escolha.

Dica: o esquema de tratamento com a substância-teste pode variar de acordo com o caso. Aqui sugerimos um pós-tratamento de dose única. No entanto, podem ser administradas doses seguidas a partir do 6º dia até o fim do experimento. Alternativamente, pode-se optar por um esquema de pré-tratamento administrando a substância-teste dias antes da indução da colite com DSS;

5. No dia 8, interromper o tratamento com DSS, substituindo-o por água;
6. No dia 10 sacrificar os animais pela injeção i.p de pentobarbital sódico (50 mg/kg);
7. Dispor o animal na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, prendendo patas e cabeça;
8. Realizar a tricotomia da região abdominal;
9. Realizar uma incisão na região mediana do abdome (5-6 cm), dissecar e remover o cólon desde o cecum até o reto (para retirar o reto sem rompê-lo, é necessário cortar o osso que o protege na porção final do cólon).

Dica: adicionalmente, o baço, linfonodos, mesentério e sangue podem ser coletados para análises posteriores;

10. As fezes presentes nos cólons removidos devem ser retiradas, as estruturas lavadas com PBS e o excesso de tecido conjuntivo adjacente também deve ser removido;
11. Pesar os cólons limpos, medir o comprimento de cada estrutura e avaliar os danos macroscópicos, dando atenção particular à presença de hiperemia, lesões hemorrágicas, úlceras e espessamento ou estreitamento da parede do cólon.

Dica: a severidade do dano ao cólon pode ser avaliada pela atribuição de um *score* de dano que varia de acordo com o grau da lesão (exemplos de grade de avaliação de danos podem ser encontradas em Morris *et al.*, 1989 ou McCafferty *et al.*, 1999).

12. Congelar imediatamente parte do tecido de cada cólon em nitrogênio líquido para análise posterior de citocinas, quimiocinas e outros marcadores moleculares de lesão. Outra parte dos tecidos deve ser reservada em formaldeído tamponado 10 % para análise histológica.

Análise dos Resultados

Neste protocolo, os resultados podem ser expressos de uma série de maneiras diferentes, dependendo do direcionamento das análises. Normalmente, o grau de inflamação colônica e gravidade da doença desenvolvida é determinado pela avaliação do estado geral dos animais, perda de peso, índice de mortalidade, scores macroscópicos de lesão no cólon e alterações histológicas associadas à inflamação. Além disso, citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e a atividade de algumas enzimas podem ser dosadas no tecido colônico.

Referências:

- BENTO AF, LEITE DF, MARCON R, CLAUDINO RF, DUTRA RC, COLA M, MARTINI AC, CALIXTO JB. Evaluation of chemical mediators and cellular response during acute and chronic gut inflammatory response induced by dextran sodium sulfate in mice. **Biochem Pharmacol.** 2012 Dec 1;84(11):1459-69.
- MCCAFFERTY DM, MIAMPAMBA M, SIHOTA E, SHARKEY KA, KUBES P. Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. **Gut** 1999;45(6):864-73.
- MORRIS GP, BECK PL, HERRIDGE MS, DEPEW WT, SZEWCZUK MR, WALLACE JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology** 1989;96(3):795-803.
- YOSHIDA H, RUSSELL J, GRANGER DN. Thrombin mediates the extraintestinal thrombosis associated with experimental colitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 2008; 295(5):G904-8.
- YOSHIDA H, RUSSELL J, SENCHENKOVA EY, ALMEIDA PAULA LD, GRANGER DN. Interleukin-1beta mediates the extra-intestinal thrombosis associated with experimental colitis. **Am J Pathol.** 2010;177(6):2774-81.

CAPÍTULO 15

QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Jorge Almeida Guimarães, Lucélia Santi, Markus Berger Oliveira, Walter Orlando Beys da Silva

Enzimas são proteínas com atividade catalítica, ou seja, capazes de catalisar uma reação química. As enzimas possuem a capacidade de converter uma substância (substrato) em outra (produto). Muitas enzimas são consideradas extremamente específicas, sendo capazes de agir sobre um único tipo de substrato. Para se quantificar uma determinada enzima, é necessário utilizar o substrato específico para esta. Para dosagem da atividade enzimática, os métodos mais amplamente aplicados baseiam-se, principalmente, na liberação de cor (colorimétrico), de fluorescência (fluorescente) ou de luz (quimioluminescente) após a conversão do substrato em produto. A seguir, veremos alguns protocolos para a quantificação de atividades enzimáticas comuns presentes em amostras biológicas diversas.

15.1 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA: AZOCASEÍNA

Este método baseia-se na determinação da atividade proteolítica por meio da quantificação do grupamento azo liberado pela hidrólise do substrato cromogênico azocaseína. A azocaseína é um derivado da caseína, ao qual foi adicionado um grupo sulfonilamida, que tem coloração alaranjada. A digestão de uma solução de azocaseína por enzimas proteolíticas resulta na formação de componentes coloridos solúveis em ácido tricloroacético.

1. Procedimento

Preparo das Soluções

1.1. Preparar uma solução tampão de Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, pela dissolução de 0,605 g de Tris em 80 mL de água destilada. Ajustar o pH com HCl 5 M e completar o volume para 100 mL com água destilada;

1.2. Preparar uma solução de HCl 5M pela adição lenta de 41,8 mL de HCl P.A (ácido clorídrico fumegante) em 58,2 mL de água destilada;

1.3. Preparar uma solução de azocaseína 2%. Para tanto, dissolver 2 g de azocaseína em 100 mL de água destilada. Estocar a 4°C por no máximo uma semana.

1.4. Preparar uma solução de TCA 20%. Para tanto, dissolver 20 g de TCA em 100 mL de água destilada e estocar a 4°C.

Método do ensaio

1.5. Em um tubo de 2mL, adicionar 200 µL de tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0 e 100 µL de azocaseína 2%.

Dica: para cada amostra, deverá ser feito um tubo considerado o branco da amostra. Para isso, adicionar a um dos tubos 800µL de solução de TCA 20% antes de iniciar o ensaio;

1.6. Incubar os tubos em banho-maria a 40°C até atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente 5 minutos).

Dica: a amostra a ser dosada deve ser também acondicionada previamente em banho-maria a 40 °C, para atingir o equilíbrio térmico antes de ser adicionada ao sistema de reação;

1.7. Adicionar 100 µL da amostra a ser testada nos tubos contendo o substrato e incubar por 15 minutos;

1.8. Após os 15 minutos, adicionar 800 µL de TCA 20% a fim de parar a reação;

1.9. Centrifugar os tubos a 10.000 rpm por 5 minutos;

1.10. Medir a absorbância do sobrenadante em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 440 nm.

Dica: se a amostra for muito concentrada (valor de absorbância normalmente maior que 0,9 ou acima do limite máximo de leitura recomendado do espectrofotômetro utilizado), diluir a amostra com tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8,0).

2. Análise dos resultados

2.1. O valor de absorbância das amostras deverá ser multiplicado por 40. Se feita diluição da amostra, este valor deverá ser multiplicado também pelo fator de diluição utilizado.

2.2. O resultado deste ensaio é definido como Unidades arbitrárias uma vez que o mecanismo de proteólise sobre o substrato pode ocorrer em outros pontos além do ponto de liberação do grupo azo, que resulta na formação de cor. Este substrato utilizando uma proteína complexada com o

grupamento azo é um dos ensaios para dosagem de atividade proteolítica mais aplicados e pode ser realizado com outras proteínas ao invés de caseína, como colágeno e queratina, por exemplo.

Referências:

Sangorrín, M.P.; Folco, E.J.; Martone, C.M.; Sánchez, J.J 2001. Purification and characterization of a proteinase inhibitor from white croaker skeletal muscle (*Micropogon opercularis*). International Journal of Biochemistry and Cell Biology 33:691-699.

15.2 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA: TRIPSINA

A tripsina é uma serino-proteinase que possui importantes funções fisiológicas e fisiopatológicas. É fundamental para o processo digestivo, diferenciação e migração celular e também está relacionada a uma série de doenças como pancreatite, inflamação e reações alérgicas. Neste protocolo apresentamos um ensaio clássico para a medida da atividade desta enzima. As principais aplicações são para estudar a atividade inibitória de diferentes fármacos inibidores de proteases, extratos ou compostos isolados de plantas. Por utilizar volumes pequenos de reagentes e ser realizado em microplacas, o protocolo é bastante útil no *screening* de inibidores de proteases, possibilitando o teste de diferentes amostras em um só ensaio e com economia de reagentes. O ensaio utiliza um substrato específico para tripsina associado a um grupamento cromógeno (p-nitroanilina). A reação acontece quando a tripsina reconhece o substrato, cliva entre a arginina e o grupamento cromógeno, e libera a p-nitroanilina, que é um produto de cor amarela. A atividade da tripsina é proporcional à quantidade de p-nitroanilina liberada, e pode ser facilmente medida por espectrofotometria.

1. Procedimento

Curva Padrão de p-Nitroanilina

1.1. Pesar a p-nitroanilina em balança analítica, e preparar de 2 a 5 mL de uma solução à 0,14 mM.

Dica: Preparar a solução de p-nitroanilina no tampão utilizado para o ensaio (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4). Para facilitar a dissolução, pode-se adicionar um pouco de etanol absoluto, mas sem exceder o volume final. As diluições devem ser feitas diretamente no tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4;

1.2. Pipetar a solução de p-nitroanilina e tampão em uma microplaca de 96 poços de fundo chato, conforme as quantidades indicadas na tabela 1:

Tabela 1: Curva padrão de p-nitroanilina

Poço	Tampão (µL)	p-nitroanilina (µL)	p-nitroanilina (nmol/ poço)	[p-nitroanilina] final (µM)
1A	100	--	0	0
1B	97	3	0,36	4,2
1C	95	5	0,72	7,2
1D	90	10	1,44	14,0
1E	80	20	2,88	28,0
1F	70	30	4,32	42,0
1G	60	40	5,76	56,0
1H	50	50	7,2	70,0
2A	--	100	14,4	140,0

Dica: cada ponto da curva deve ser pipetado em triplicata na placa. O volume final de cada poço deve ser de 100 µL.

1.3. Medir a absorbância em espectrofotômetro de microplacas à 405 nm;

1.4. Construir um gráfico de regressão linear simples colocando os valores das médias aritméticas das leituras de cada ponto nas ordenadas (eixo y) e os valores de quantidade de p-nitroanilina (nmol/poço) ou a concentração de p-nitroanilina (µM) nas abscissas (eixo x);

1.5. Obter a equação da reta na forma de: $y = ax + b$. Reservar a equação para calcular os valores de atividade enzimática posteriormente.

Dica: para a curva ser considerada satisfatória, o valor de R deve ser maior ou igual a 0,95.

Ensaio de Atividade Enzimática da Tripsina

1.6. Preparar uma solução estoque de 5 mg/mL de tripsina.

Dica: dissolver a tripsina em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, aliquotar em tubos de 1 ou 0,5 mL e manter congelado à -20 °C;

1.7. Preparar uma solução de trabalho de tripsina na concentração de 0,1 mg/mL.

Dica: diluir a partir da solução estoque usando o tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 e aliquotar em tubos de 1 ou 0,5 mL. Até o momento do ensaio manter no gelo (4 °C). Após o ensaio manter congelado à -20 °C;

1.8. Preparar 10 mL de uma solução do substrato BAPNA (Hidrocloreto de N α -Benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida) à 10 mM.

Dica: Dissolver o BAPNA em uma solução contendo 9 partes de DMSO para 1 parte de água miliQ. Aliquotar o substrato em tubos de 0,5 mL e manter congelado à -20 °C;

1.9. Pipetar os reagentes na microplaca de 96 poços de fundo chato, conforme o esquema sugerido na tabela 2:

Tabela 2: Protocolo do ensaio de tripsina

Poço	Identificação da amostra		Tampão (μ L)	Tripsina (0,1 mg/mL)		Substrato (BAPNA 10 mM, μ L)
	μ L	μ g/poço		μ L	μ g/poço	
1A	--	--	90	--	--	10
1B	--	--	80	10	1	10
1C	X ^a	X ^a	X ^a	10	1	10

^aAs quantidades e o número de amostras a serem testadas devem ser definidas previamente e dependem de cada experimento.

Dicas: O volume final de cada poço deve ser de 100 μ L;

O volume de substrato e tripsina são fixos. O volume de amostra pode variar. Utilizar o tampão tris-HCl 20 mM, pH 7,4 para completar o volume final de cada poço para 100 μ L;

Correr cada uma das amostras em triplicata;

Os reagentes devem ser adicionados na seguinte ordem: 1°. Amostra; 2°. Tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4; 3° tripsina; e, 4° substrato;

Incubar a amostra + tampão + tripsina por 10 minutos à 37 °C antes da adição do substrato.

1.10. Ler a absorbância em espectrofotômetro de microplacas à 405 nm no tempo inicial - A1 (logo após a adição do substrato). Incubar a placa à 37 °C e após 20 minutos de reação repetir a leitura no mesmo comprimento de onda - A2 (tempo final).

Dica: se o experimento estiver sendo realizado em um espectrofotômetro capaz de realizar leituras cinéticas, selecionar o modo cinético em 405 nm e realizar leituras sequenciais de 10 em 10 segundos até o tempo final de 20 minutos. Durante todo o tempo da leitura a placa deve permanecer à 37 °C;

1.11. Calcular a média aritmética de cada uma das amostras e subtrair a absorbância final da inicial (A2-A1);

1.12. Os valores de A2-A1 correspondem à p-nitroanilina liberada durante a reação. Calcular a quantidade de p-nitroanilina presente em cada poço, utilizando a equação da reta obtida pela curva padrão de p-nitroanilina. Seguir o exemplo abaixo:

$$A2-A1 = 0,03$$

$$\text{Curva padrão: } y = 0,001 + 0,028X$$

$$\frac{0,03 - 0,001}{0,028} = X \qquad X = 1,036 \text{ nmol de p-nitroanilina}/100 \mu\text{L}$$

Ou seja, considerando esse exemplo hipotético, a quantidade de p-nitroanilina liberada pela tripsina por poço (volume de 100 μL) foi de 1,036 nmols. Agora esse valor pode ser convertido e expresso em unidades de atividade enzimática (nmol de produto formado/minuto/ mL):

$$\frac{1,036 \text{ nmol}}{0,1 \times 20} = 0,52 \text{ nmols}/\text{min}/\text{mL}$$

Este valor significa que a tripsina presente no poço foi capaz de gerar 0,52 nmols de p-nitroanilina por minuto e por mL de reação.

2. Análise dos Resultados

2.1. Após realizados todos os cálculos conforme indicado acima, os resultados são expressos pelos valores de atividade enzimática residual. Ou seja, pela quantidade de p-nitroanilina gerada por unidade de tempo e por volume de reação. Na presença de um inibidor de serino-proteinases, a quantidade de p-nitroanilina diminui e, conseqüentemente, diminui a atividade enzimática residual.

Referências

- BATISTA IF, OLIVA ML, ARAUJO MS, SAMPAIO MU, RICHARDSON M, FRITZ H, SAMPAIO CA. Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. **Phytochemistry** 1996;41(4):1017-22.
- OLIVA ML, MENDES CR, JULIANO MA, CHAGAS JR, ROSA JC, GREENE LJ, SAMPAIO MU, SAMPAIO CA. Characterization of a tissue kallikrein inhibitor isolated from *Bauhinia bauhinioides* seeds: inhibition of the hydrolysis of kininogen related substrates. **Immunopharmacology** 1999;45(1-3):163-9.
- SANTI L, BEYS DA SILVA WO, BERGER M, GUIMARÃES JA, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon** 2010, 1;55(4):874-80.

15.3 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA: TROMBINA + SUBSTRATO SINTÉTICO

A trombina é uma serino-proteinase que possui papel fundamental no processo de coagulação sanguínea e agregação plaquetária. Na cascata de coagulação sanguínea, a trombina cliva diretamente o fibrinogênio formando a rede de fibrina, ativa o fator V, proteína C, proteína S e, por clivar os receptores ativados por proteases (PAR), induz agregação plaquetária, além de possuir efeito pró-inflamatório. Além disso, desequilíbrios nos processos endógenos que controlam o balanço entre ativação e inibição de trombina estão associados a uma série de patologias; entre elas, destacam-se: as doenças tromboembólicas, doenças cardiovasculares e renais, acidente vascular cerebral, isquemias, sepse, coagulação intravascular disseminada e até mesmo câncer. Neste protocolo, apresentamos um ensaio clássico para a medida da atividade desta enzima bastante semelhante ao descrito anteriormente para a tripsina. As principais aplicações são para estudar a atividade inibitória de diferentes fármacos inibidores de proteases e na pesquisa da atividade anticoagulante de extratos ou compostos isolados de plantas.

Por utilizar volumes pequenos de reagentes e ser realizado em microplacas, o protocolo é bastante útil no *screening* de anticoagulantes, possibilitando o teste de diferentes amostras em um só ensaio e com economia de reagentes. O ensaio utiliza um substrato sintético cromogênico específico, que se liga diretamente ao sítio ativo da trombina, sendo, portanto, ideal para a pesquisa de inibidores de sítio ativo e não de exosítio (ver protocolo trombina + fibrinogênio). A reação acontece de maneira semelhante à descrita para tripsina, pela liberação de p-nitroanilina, que pode ser dosada por espectrofotometria.

1. Procedimento

Curva Padrão de p-Nitroanilina

1.1. Construir uma curva padrão de p-nitroanilina, conforme descrito no protocolo para tripsina.

Ensaio de Atividade Enzimática da Trombina

1.2. Preparar uma solução estoque de 0,3 mg/mL de trombina.

Dica: dissolver a trombina em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, aliquotar em tubos de 1 ou 0,5 mL e manter congelado à -20 °C;

1.3. Preparar um solução de trabalho de trombina na concentração de 0,02 mg/mL.

Dica: diluir a partir da solução estoque usando o tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 e aliquotar em volumes pequenos em tubos de 0,5 mL. Até o momento do ensaio manter no gelo (4 °C). Após o ensaio manter congelado à -20 °C;

1.4. Preparar 10 mL de uma solução do substrato S2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNa) à 2 mM.

Dica: dissolver o S2238 em água miliQ. Aliquotar o substrato em tubos de 0,5 mL e manter congelado à -20 °C;

1.5. Pipetar os reagentes na microplaca de 96 poços, conforme o esquema sugerido na tabela 3:

Tabela 3: Protocolo do ensaio de trombina + substrato sintético

Poço	Identificação da amostra		Tampão (µL)	Trombina (0,02 mg/mL)		Substrato (S2238 2 mM, µL)
	µL	µg/poço		µL	µg/poço	
1A	--	--	90	--	--	10
1B	--	--	80	10	0,2	10

1C	X ^a	X ^a	X ^a	10	0,2	10
----	----------------	----------------	----------------	----	-----	----

*As quantidades e o número de amostras a serem testadas devem ser definidas previamente e dependem de cada experimento.

Dicas: O volume final de cada poço deve ser de 100 µL;

O volume de substrato e trombina são fixos. O volume de amostra pode variar. Utilizar o tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 para completar o volume final de cada poço para 100 µL;

Correr cada uma das amostras em triplicata;

Os reagentes devem ser adicionados na seguinte ordem: 1° Amostra; 2° Tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4; 3° trombina e 4°, substrato;

Incubar a amostra + tampão + trombina por 10 minutos à 37 °C antes da adição do substrato.

1.6. Ler a absorbância em espectrofotômetro de microplacas à 405 nm no tempo inicial - A1 (logo após a adição do substrato). Incubar a placa à 37 °C e após 30 minutos de reação repetir a leitura no mesmo comprimento de onda - A2 (tempo final).

Dica: se o experimento estiver sendo realizado em um espectrofotômetro capaz de realizar leituras cinéticas, selecionar o modo cinético em 405 nm e realizar leituras sequenciais de 10 em 10 segundos até o tempo final de 30 minutos. Durante todo o tempo da leitura, a placa deve permanecer à 37 °C;

1.7. Calcular a média aritmética de cada uma das amostras e subtrair a absorbância final da inicial (A2-A1);

1.8. Os valores de A2-A1 correspondem a p-nitroanilina liberada durante a reação. Calcular a quantidade de p-nitroanilina presente em cada poço utilizando a equação da reta obtida pela curva padrão de p-nitroanilina, seguindo o mesmo exemplo descrito anteriormente para tripsina e expressar o resultado final como quantidade de produto formado/ minuto/ volume de reação (nmol /minuto/ mL).

2. Análise dos Resultados

2.1. Após realizados todos os cálculos conforme indicado acima, os resultados são expressos pelos valores de atividade enzimática residual. Ou seja, pela quantidade de p-nitroanilina gerada por unidade de tempo e por volume de reação. Na presença de um inibidor de trombina a quantidade de p-nitroanilina diminui e, conseqüentemente, diminui a atividade enzimática residual.

Referências:

BERGER M, RECK J JR, TERRA RM, PINTO AF, TERMIGNONI C, GUIMARÃES JA: *Lonomia obliqua* caterpillar envenomation causes platelet hypoaggregation and blood incoagulability in rats. **Toxicon** 2010; 55:33–44.

FRANCISCHETTI IM, MONTEIRO RQ, GUIMARÃES JA: Identification of glycyrrhizin as a thrombin inhibitor. **Biochem Biophys Res Commun** 1997; 235:259–263.

MOZZICAFREDDO M, CUCCIOLONI M, ELEUTERI AM, FIORETTI E, ANGELETTI M. Flavonoids inhibit the amidolytic activity of human thrombin. **Biochimie**. 2006 Sep; 88(9):1297-306.

15.4 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA: TROMBINA + FIBRINOGENO

O protocolo apresentado a seguir, assim como o anterior, é útil na pesquisa de anticoagulantes inibidores de trombina. A diferença é que este protocolo utiliza o fibrinogênio como substrato para a trombina. O fibrinogênio é o substrato macromolecular natural da trombina. Diferentemente do substrato sintético cromogênico, que possui menor massa molecular e especificidade direta para o sítio ativo, a clivagem do fibrinogênio é dependente da ligação deste no exosítio-1 da trombina. Portanto, o uso do fibrinogênio como substrato tem principal aplicação no estudo do mecanismo molecular de inibição e na busca por inibidores específicos de exosítio-1. A reação acontece pela clivagem do fibrinogênio pela trombina com a formação do coágulo de fibrina. Como a fibrina é um produto insolúvel, a sua formação no meio de reação pode ser facilmente medida pelo aumento da turbidez.

1. Procedimento

1.1. Pesar, em balança analítica, exatamente 0,005 g de fibrinogênio;

1.2. Manter o fibrinogênio pesado, o tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 e uma solução de BSA 1 mg/mL à 37 °C antes de dissolver o fibrinogênio;

1.3. Estando todas as soluções à 37 °C, adicionar ao fibrinogênio 994 µL do tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 e 6 µL de albumina 1 mg/mL;

1.4. Agitar levemente e manter a solução em banho-maria à 37 °C - até a completa dissolução do fibrinogênio;

1.5. Após a dissolução, a solução de fibrinogênio é instável e não deve sofrer mudanças bruscas de temperatura.

Dica: a solução de fibrinogênio não deve ser reutilizada;

1.6. Preparar uma solução estoque de 0,3 mg/mL de trombina.

Dica: dissolver a trombina em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, aliquotar em tubos de 1 ou 0,5 mL e manter congelado à -20 °C;

1.7. Preparar uma solução de trabalho de trombina na concentração de 0,02 mg/mL.

Dica: diluir a partir da solução estoque usando o tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 e aliquotar em volumes pequenos em tubos de 0,5 mL. Até o momento do ensaio, manter no gelo (4 °C). Após o ensaio, manter congelado à -20 °C;

1.8. Pipetar os reagentes na microplaca de 96 poços conforme o esquema sugerido na tabela 4:

Tabela 4: Protocolo do ensaio de trombina + fibrinogênio

Poço	Identificação da amostra		Tampão (µL)	Trombina (0,02 mg/mL)		Substrato (Fibrinogênio 5 mg/mL, µL)
	µL	µg/poço		µL	µg/poço	
1A	--	--	60	--	--	40
1B	--	--	50	10	0,2	40
1C	X ^a	X ^a	X ^a	10	0,2	40

^aAs quantidades e o número de amostras a serem testadas devem ser definidas previamente, e dependem de cada experimento.

Dicas: O volume final de cada poço deve ser de 100 µL;

O volume de substrato e trombina são fixos. O volume de amostra pode variar. Utilizar o tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 para completar o volume final de cada poço para 100 µL;

Correr cada uma das amostras em triplicata;

Os reagentes devem ser adicionados na seguinte ordem: 1º Amostra; 2º Tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4; 3º trombina e 4º substrato;

Incubar a amostra + tampão + trombina por 10 minutos à 37 °C antes da adição do substrato.

1.9. Ler a absorbância em espectrofotômetro de microplacas à 650 nm no tempo inicial - A1 (logo após a adição do substrato). Incubar a placa à 37 °C e após 30 minutos de reação repetir a leitura no mesmo comprimento de onda - A2 (tempo final).

Dica: se o experimento estiver sendo realizado em um espectrofotômetro capaz de realizar leituras cinéticas, selecionar o modo cinético em 650 nm e realizar leituras sequenciais de 14 em 14 segundos até o tempo final de 30 minutos. Durante todo o tempo da leitura a placa deve permanecer à 37 °C;

1.10. Calcular a média aritmética de cada uma das amostras e subtrair a absorbância final da inicial (A2-A1);

1.11. Os valores de A2-A1 correspondem a fibrina formada durante a reação. Os resultados podem ser expressos como unidades arbitrárias de absorbância por tempo de reação (OD/min). Para tanto, basta calcular a razão entre os valores de A2-A1 e o tempo total do ensaio (30 minutos).

2. Análise dos Resultados

2.1. Os resultados podem ser apresentados como atividade residual de trombina em OD/min (conforme indicado acima) ou também como percentual de inibição de trombina. Nesse último caso, considera-se como 100 % a atividade da trombina na ausência da amostra testada e calcula-se o percentual de inibição comparando a atividade da trombina na presença da amostra contendo o inibidor. Obviamente, na presença de um inibidor de trombina a quantidade de fibrina formada diminui, diminui também a turbidez do meio de reação e atividade enzimática residual e aumenta o percentual de inibição.

Referências:

BERGER M, RECK J JR, TERRA RM, PINTO AF, TERMIGNONI C, GUIMARÃES JA: *Lonomia obliqua* caterpillar envenomation causes platelet hypoaggregation and blood incoagulability in rats. **Toxicon** 2010;55:33–44.

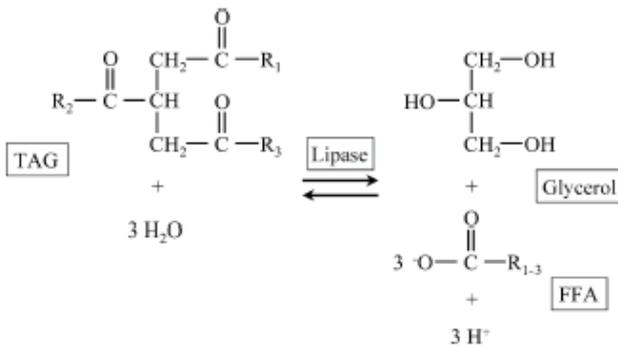
FRANCISCHETTI IM, MONTEIRO RQ, GUIMARÃES JA: Identification of glycyrrhizin as a thrombin inhibitor. **Biochem Biophys Res Commun** 1997;235:259–263

RIBEIRO JM, SCHNEIDER M, GUIMARÃES JA. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Biochem J**. 1995 15;308 (Pt 1):243-9.

15.5 ATIVIDADE LIPOLÍTICA, LIPASE: TITULAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

Lipases são enzimas que hidrolisam lipídeos, principalmente triglicerídeos. Este método se baseia na neutralização dos ácidos graxos liberados pela reação de hidrólise da trioleína (ou óleo de oliva, rico em trioleína) catalisada por estas enzimas (Figura 1).

Figura 1. Reação de hidrólise de triglicerídeos.



1. Procedimento

Preparo das soluções

1.1. Preparar uma solução tampão de Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. Para tanto, dissolver 0,605 g de Tris em 80 mL de água destilada, ajustar o pH com HCl 5 M e completar o volume para 100 mL com água destilada;

1.2. Preparar uma solução de HCl 5M pela adição lenta de 41,8 mL de HCl P.A. (ácido clorídrico fumegante) em 58,2 mL de água destilada;

1.3. Preparar uma solução de fenolftaleína 1 %, dissolvendo 1 g de fenolftaleína em 60 mL de etanol e completando o volume com água destilada até 100 mL;

1.4. Preparar uma solução de hidróxido de sódio 0,05 M (NaOH). Para tanto, dissolver 0,2 g de NaOH em água destilada e completar o volume para 100mL;

1.5. Preparar uma solução de álcool polivinílico 2%, pela dissolução de 2 g de álcool polivinílico em 100 mL de água destilada;

1.6. Preparar uma mistura de 50 mL de etanol + 50 mL de acetona, homogeneizar e manter a temperatura ambiente (solução de parada da titulação).

Método do ensaio

1.7. Em um erlenmeyer de 250 mL, adicionar 2,5 mL de tampão TRIS-HCl 0,05M pH 8,0, 1 mL de trioleína (pode ser usado óleo de oliva) e 2 mL de álcool polivinílico 2 %;

1.8. Incubar em agitador orbital (shaker) à 37 °C, 150 rpm por 1 min para atingir o equilíbrio térmico.

Dica: a amostra também deve estar no equilíbrio térmico antes de ser adicionada ao sistema de reação;

1.9. Adicionar 1 mL da amostra a ser testada.

Dica: para o frasco a ser lido como branco, adiciona-se 1 mL de água ou tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 8,0 ao invés da amostra;

1.10. Incubar por 30 minutos, 150 rpm à 37°C;

- 1.11. Parar a reação adicionando 10 mL da solução de parada;
- 1.12. Adicionar 1 mL fenolftaleína (indicador de pH);
- 1.13. Titular o ácido graxo liberado com o auxílio de uma bureta graduada e calibrada contendo 0,05 M NaOH até obter o primeiro tom de coloração rósea.

Dicas: os frascos deverão ser agitados manualmente enquanto o NaOH é gotejado.

Anotar o volume de NaOH adicionado no primeiro surgimento da cor rósea significativa (toda solução deverá ficar rósea mesmo que brevemente), uma vez que a coloração tende a desaparecer.

Análise dos Resultados

- 2.1. Uma unidade lipolítica é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácidos graxos por minuto, sob as condições descritas acima.
- 2.2. Cálculo:

$$U = \frac{(V-V_0) * 50 * fd}{30}$$

Dicas: É muito importante agitar fortemente, pois a cor tende a surgir no microambiente onde for gotejada a base, e a quantificação correta (momento de parar de adicionar a base) é baseada na cor rosa formada na solução, e não em uma parte da mesma. Pode ser usado qualquer óleo ou gordura como substrato, mas a trioléína (ou óleo de oliva em sua substituição) é considerada um padrão para quantificação de lipases verdadeiras.

Referências:

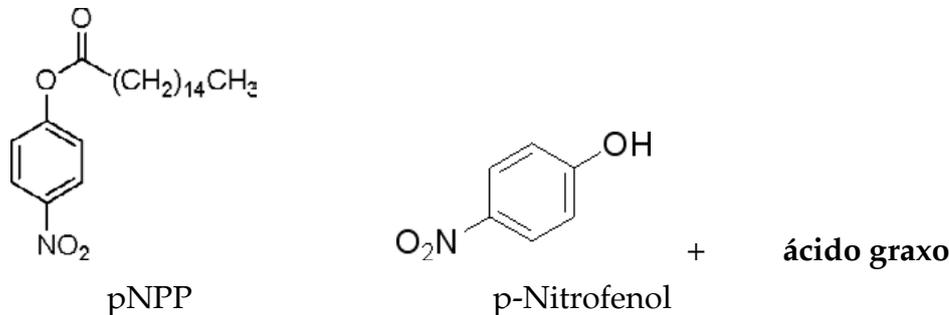
BEYS DA SILVA, W. O., SANTI, L., BERGER, M., PINTO, A.F.M., GUIMARÃES, J.A., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2009) Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry** 44: 829–834

SANTI L, BEYS DA SILVA WO, BERGER M, GUIMARÃES JA, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon** 2010, 1;55(4):874-80.

15.6 ATIVIDADE LIPOLÍTICA, LIPASE: P-NITROFENIL-PALMITATO

Este método baseia-se na hidrólise do substrato cromogênico p-nitrofenil-palmitato (pNPP) pela lipase com consequente liberação do composto de coloração amarela p-nitrofenol, conforme demonstrado na figura 2.

Figura 2. Reação de hidrólise do substrato pNPP com liberação do composto de coloração amarela p-nitrofenol.



1. Procedimento

Preparo das soluções

1.1. Preparar uma solução tampão de TRIS-HCl 0,05 M, pH 8,0, pela dissolução de 0,605 g de TRIS em 80 mL de água destilada. Ajustar o pH com HCl 5 M e completar o volume para 100 mL com água destilada;

1.2. Solução 1: Preparar uma solução a 3 mg/mL do substrato pNPP. Dissolver o pNPP em isopropanol, incubar à 37°C até a completa dissolução, antes do uso, e estocar à -20°C. Estabilidade no freezer: de 1 mês ou até 2 incubações à 37°C

1.3. Solução 2: Em 450 mL de Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 adicionar 0,5 g de goma arábica e 2 g de Triton X-100. Dissolver e estocar na geladeira. Estabilidade: de 3 semanas.

1.4. Emulsão: Equilibrar as soluções 1 e 2 em banho-maria à 37°C por cerca de 10 minutos, gotear vagarosamente a solução 1 na Solução 2 sob forte agitação, na proporção de 1:9 (a cada 9 mL da Solução 2 adicionar 1 mL da Solução 1).

Dicas: utilizar um agitador magnético para preparar a emulsão. Esta emulsão deve ser preparada sempre no momento do ensaio, não podendo ser armazenada para uso posterior.

Curva Padrão de p-Nitrofenol

1.5. Pesar o p-nitrofenol em balança analítica e preparar de 2 a 5 mL de uma solução a 0,14 mM.

Dica: Preparar a solução de p-nitrofenol no tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 porque a cor somente é gerada em pH alcalino. Para facilitar a dissolução pode-se adicionar um pouco de etanol absoluto, mas sem exceder o volume final. As diluições devem ser feitas diretamente no tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0;

1.6. Pipetar a solução de p-nitrofenol e tampão em uma microplaca de 96 poços de fundo chato, conforme as quantidades indicadas na tabela 5.

Tabela 5: Curva Padrão de p-Nitrofenol

Poço	Tampão (μL)	p-nitrofenol (μL)	p-nitrofenol (nmol/ poço)	[p-nitrofenol] final (μM)
1A	100	--	0	0
1B	97	3	0,36	4,2
1C	95	5	0,72	7,2
1D	90	10	1,44	14,0
1E	80	20	2,88	28,0
1F	70	30	4,32	42,0
1G	60	40	5,76	56,0
1H	50	50	7,2	70,0
2A	--	100	14,4	140,0

Dica: Cada ponto da curva deve ser pipetado em triplicata na placa. O volume final de cada poço deve ser de 100 μL .

1.7. Medir a absorbância em espectrofotômetro de microplacas à 410 nm;

1.8. Construir um gráfico de regressão linear simples, colocando os valores das médias aritméticas das leituras de cada ponto nas ordenadas (eixo y), e os valores de quantidade de p-nitrofenol (nmol/poço) ou a concentração de p-nitrofenol (μM) nas abscissas (eixo x);

1.9. Obter a equação da reta na forma de: $y = ax + b$. Reservar a equação para calcular os valores de atividade enzimática posteriormente.

Método do ensaio

1.10. Adicionar 10 μL da amostra a ser testada em uma microplaca de 96 poços de fundo chato;

1.11. Adicionar 90 μL da emulsão (previamente equilibrada à 37°C por 5 minutos, assim como a amostra);

Dica: é importante ressaltar que tanto a emulsão de substrato quanto a amostra devem estar previamente equilibradas na temperatura do ensaio, para evitar interferência na leitura, visto que o substrato é insolúvel e está na forma de emulsão.

1.12. Medir a absorbância em espectrofotômetro de microplacas a 410 nm no tempo inicial - A1 (logo após a adição da emulsão). Incubar a placa à 37 °C e, após 30 minutos de reação, repetir a leitura no mesmo comprimento de onda - A2 (tempo final);

Dica: agitar rapidamente a placa antes da primeira e última leitura.

1.13. Calcular a média aritmética de cada uma das amostras e subtrair a absorbância final da inicial (A2-A1);

1.14. Os valores de A2-A1 correspondem ao p-nitrofenol liberado durante a reação. Calcular a quantidade de p-nitrofenol presente em cada poço utilizando a equação da reta obtida pela curva padrão de p-nitrofenol;

2. Análise dos Resultados

2.1. Os resultados são expressos como atividade de lipase por meio da quantidade de p-nitrofenol liberada por minuto por volume de reação ($\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}/$). Seguir o mesmo método de cálculo ao descrito anteriormente para a atividade de tripsina (ver exemplo acima).

Dica: existem outros substratos do tipo p-nitrofenil-ésteres que podem ser utilizados praticamente da mesma maneira. O substrato sintético para lipase mais utilizado é o p-nitrofenil-palmitato.

Referências:

SILVA WOB, MITIDIERI S, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. (2005). Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry** 40: 321–326.

BEYS DA SILVA, W. O., SANTI, L., BERGER, M., PINTO, A.F.M., GUIMARÃES, J.A., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2009) Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry** 44: 829–834.

15.7 ATIVIDADE AMIOLÍTICA

Este método baseia-se na determinação da atividade amilolítica pela quantificação dos açúcares redutores, liberados pela reação de hidrólise do amido catalisada por amilases.

1. Procedimentos

Preparo das soluções

1.1. Preparar uma solução de ácido cítrico 0,05 M. Dissolver 1,05 g de ácido cítrico em 100 mL de água destilada;

1.2. Preparar uma solução de fosfato de sódio dibásico (NaH_2PO_4) 0,05 M. Para isso, dissolver 1,38 g de fosfato de sódio em 100 mL de água destilada;

1.3. Preparar uma solução tampão de citrato-fosfato 0,05 M, pH 6,0. Em uma proveta de 50 mL, adicionar 13,4 mL de ácido cítrico 0,05 M e completar o volume com fosfato de sódio dibásico 0,05M. Corrigir o pH com uma solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) 1:1 (v/v) e estocar a solução à 4°C;

1.4. Preparar uma solução de amido solúvel 1%. Para isso, dissolver 1 g de amido em 100 mL de água destilada, aquecer até a fervura, esfriar e completar o volume novamente para 100 mL. Estocar à 4°C por no máximo uma semana;

1.5. Preparar uma solução padrão de glicose 1 %, pela dissolução de 1 g de glicose em 100 mL de água destilada;

1.6. Preparar uma solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para isso, adicionar à 236 mL de água destilada os seguintes reagentes: 3 g de hidróxido de sódio, 51 g de tartarato de sódio e potássio, 1,38 g de metabissulfito de sódio, 0,63 g de fenol e 1,77 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico.

Curva Padrão de Glicose

1.7. Construir uma curva padrão de glicose conforme indicado na tabela 6.

Tabela 6. Curva padrão de glicose.

Tubo N°	Solução de glicose 1% (μL)	Volume de água (μL)	Conc. final de glicose (μmol)
0	0	300	0
1	20	280	1,112
2	40	260	2,224
3	60	240	3,336
4	80	220	4,448
5	100	200	5,560
6	120	180	6,672
7	140	160	7,784

1.8. Adicionar 300 μL de tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 6,0 e incubar em banho-maria à 40 °C por 30 minutos;

1.9. Adicionar 1,5 mL de reagente DNS;

1.10. Em seguida ferver por 5 minutos em banho-maria;

1.11. Adicionar 17,9 mL de água destilada;

1.12. Resfriar em temperatura ambiente e medir a absorbância em espectrofotômetro a 550 nm;

1.13. Colocar os dados em uma curva de quantidade de glicose (mmol) X absorbância. Utilizar o primeiro ponto como zero.

Dicas: A concentração de açúcares redutores será expressa em mmol de glicose.

A faixa de concentração da curva de calibração poderá variar para se ajustar às concentrações encontradas nas amostras analisadas.

Ensaio de Atividade Amilolítica

1.14. Em um tubo de ensaio de cerca de 25 mL com tampa, adicionar 200 µL de tampão citrato-fosfato 0,05 M e 300 µL de solução de amido solúvel 1%;

1.15. Incubar em banho-maria à 40 °C e deixar atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente de 1 a 2 minutos);

1.16. Adicionar 100 µL da amostra a ser testada e deixar no banho por 30 minutos na mesma temperatura. Essa sequência deve ser seguida para os tubos seguintes em intervalos de tempo previamente estipulados (15 a 30 segundos);

1.17. Parar a reação adicionando 1,5 mL de reagente DNS, observando os intervalos estipulados (15 a 30 segundos) para que o tempo de reação (30 minutos) seja o mesmo em todos os tubos;

1.18. Em seguida ferver por 5 minutos em banho-maria e adicionar 17,9 mL de água destilada;

1.19. Resfriar e medir a absorbância em espectrofotômetro a 550 nm;

1.20. Determinar a concentração de açúcares redutores utilizando a curva de calibração de glicose. **Dica:** Se necessário, realizar diluição da amostra em tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 6,0.

2. Análise dos Resultados

2.1. Com o auxílio da curva padrão (equação da reta do tipo $y = Ax + b$), determinar a quantidade (mmol) de açúcares redutores liberada na presença das amostras;

2.2. Converter a quantidade de glicose calculada anteriormente em atividade amilolítica, usando a fórmula abaixo. Cálculo do resultado:

$$\text{Atividade amilolítica (U.mL}^{-1}\text{.min}^{-1}) = \frac{\text{AR} * 10 * fd}{30}$$

Onde AR = concentração de açúcares redutores na amostra (mmol), determinada por meio da curva de calibração de glicose.

fd = fator de diluição da amostra, quando houver.

Uma unidade de Atividade Amilolítica é definida como a quantidade de enzima que libera 1 mmol de açúcares redutores por mL de amostra por minuto, sob condições padrões aqui descritas.

Referências:

MILLER, G.L. Use of dinitosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v.31, p. 426-428, 1959.

15.8 ATIVIDADE CELULÁSICA

Celulases são enzimas que catalisam a hidrólise de celulose, biomassa mais abundante no planeta. Devido à estrutura complexa da celulose, diferentes celulases são necessárias para degradar completamente o polímero e liberar glicose. O ensaio de celulase pode ser feito com substratos mais complexos, como bagaço de cana-de-açúcar e outras biomassas vegetais e papel, onde são requeridas diferentes tipos de celulases, ou com substratos mais específicos, identificando apenas um tipo de celulase. Este protocolo descreve, portanto, o ensaio utilizando papel filtro, onde é possível a detecção de atividade celulásica resultante de diferentes enzimas celulolíticas.

1. Procedimento

Preparo das soluções

1.1. Preparar uma solução de ácido cítrico 0,05 M. Dissolver 1,05 g de ácido cítrico em 100 mL de água destilada;

1.2. Preparar uma solução de fosfato de sódio dibásico (NaH_2PO_4) 0,05 M. Para isso, dissolver 1,38 g de fosfato de sódio em 100 mL de água destilada;

1.3. Preparar uma solução tampão de citrato-fosfato 0,05 M, pH 6,0. Em uma proveta de 50 mL, adicionar 13,4 mL de ácido cítrico 0,05 M e completar o volume com fosfato de sódio dibásico 0,05M. Corrigir o pH com uma solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) 1:1 (v/v) e estocar a solução à 4°C;

1.4. Preparar uma solução padrão de glicose 5 mg/mL em água destilada;

1.5. Preparar uma solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para isso, adicionar a 236 mL de água destilada os seguintes reagentes: 3 g de hidróxido de sódio, 51 g de tartarato de sódio e potássio, 1,38 g de metabissulfato de sódio, 0,63 g de fenol e 1,77 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico.

Curva Padrão de Glicose

1.6. Construir uma curva padrão de glicose conforme indicado na tabela 7. Pipetar os volumes indicados em tubos de ensaio de 25 mL;

Tabela 7. Curva padrão de glicose.

Glicose 5 mg/ mL (mL)	Tampão citrato (mL)	Glicose (mg/mL)	Glicose (μmol)
0	0.5	0	0
0.05	0.45	0.5	1.38
0.1	0.4	1	2.77
0.15	0.35	1.5	4.16
0.2	0.3	2	5.49
0.25	0.25	2.5	6.86
0.3	0.2	3	8.23
0.35	0.15	3.5	9.6
0.4	0.1	4	10.97
0.45	0.05	4.5	12.34
0.5	0	5	13.71

1.7. Incubar os tubos à 50 °C por 1 hora;

1.8. Adicionar 3 mL da solução de DNS, ferver por 5 minutos, adicionar 20 mL de água destilada e homogeneizar;

1.9. Resfriar em temperatura ambiente e determinar a absorbância em espectrofotômetro a 540 nm;

1.10. Colocar os dados em uma curva de quantidade de glicose (mmol) X absorvância. Utilizar o primeiro ponto como zero.

Dicas: a concentração de açúcares redutores será expressa em mmol de glicose. A faixa de concentração da curva de calibração poderá variar para se ajustar as concentrações encontradas nas amostras analisadas.

Ensaio de Atividade Celulásica

1.11. Utilizando tubos de ensaio de 25 mL, adicionar 1 mL de tampão citrato, 0,5 mL da amostra a ser testada e uma tira de papel Whatman n.1 (1 x 6 cm).

Dicas: preparar também dois tubos adicionais: Tubo B1 (branco da amostra) - adicionar 1 mL de tampão citrato + 0,5 mL de amostra. Tubo B2 (branco total) - adicionar 1,5 mL de tampão citrato + uma tira de papel Whatman n.1 (1 x 6 cm)

1.12. Incubar os tubos à 50 °C por 1 hora;

1.13. Adicionar 3 mL da solução de DNS, ferver por 5 minutos, adicionar 20 mL de água destilada e homogeneizar;

1.14. Resfriar em temperatura ambiente e determinar a absorvância em espectrofotômetro a 540 nm;

1.15. Determinar a concentração de glicose liberada utilizando a curva de calibração de glicose.

Dica: Se necessário, realizar diluição da amostra em tampão citrato.

2. Análise dos Resultados

2.1. Com o auxílio da curva padrão (equação da reta do tipo $y = Ax + b$), determinar a quantidade (mmol) de glicose liberada na presença das amostras;

2.2. Converter a quantidade de glicose calculada anteriormente em atividade celulásica, usando a fórmula abaixo. Cálculo do resultado:

$$\text{Atividade celulásica (U= } \mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}) \text{ à } \frac{AR \cdot 2 \cdot fd}{60}$$

Onde: AR = concentração de açúcares redutores (glicose) na amostra (mmol), determinada através da curva de calibração de glicose.

fd = fator de diluição, quando houver

Uma unidade (U) de atividade celulásica foi definida como 1 μmol de glicose liberada por mL por min, sendo expressa em FPU (*filter paper unit* ou unidade de papel filtro).

Referências:

GHOSE, 1987. Measurement of cellulase activities. IUPAC - Pure and Applied Chemistry, 59: 257-268

CAPÍTULO 16

DETECÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA ATRAVÉS DE GÉIS DE ATIVIDADE/ZIMOGRAMAS

Jorge Almeida Guimarães, Lucélia Santi, Markus Berger Oliveira, Walter Orlando Beys da Silva

Diversas metodologias são conhecidas e empregadas para os zimogramas, podendo ser totalmente nativos (sem causar nenhum dano estrutural às proteínas/enzimas) ou pouco desnaturantes (com renaturação posterior da proteína a ser analisada). Tudo depende do tipo de enzima a ser analisada. Na maioria das vezes, algum substrato para a enzima é adicionado diretamente no gel ou em um tampão de renaturação. Os géis de atividade ou zimogramas são uma forma fácil de avaliar o tipo de proteína presente em uma amostra, bem como identificando sua massa molecular, normalmente, na forma nativa.

16.1 GEL DE ATIVIDADE (ZIMOGRAMA) PARA DETECÇÃO DE QUITINASES (ST LEGER ET AL. 1993)

Quitinases são enzimas que catalizam a hidrólise de quitina, polímero formado pelo açúcar N-acetil-glicosamina (NaG), presente em exoesqueleto de insetos e crustáceos. Este gel é considerado não desnaturante, embora utilize SDS em sua composição. O SDS é removido posteriormente e a enzima, recuperando sua forma nativa, pode agir em seu substrato (adicionado à matriz de poliacrilamida).

1. Montagem do gel

1.1 Muito parecida com o gel SDS-PAGE, descrito no capítulo 6.

1.2 No caso deste gel, é adicionado glicol-quitina como substrato para a enzima.

Running 12,5%

H ₂ O destilada	3,05 mL
1,5M tris HCl pH 8,8	2,5 mL
SDS 10%	100 µL
Glicol quitina 1%	100 µL
Acrilamida/bis-acrilamida (30/0,8%)	4,2 mL
TEMED	5 µL
Persulfato de amônio (APS) 10%	50 µL

Stacking 4%

H ₂ O destilada	3,05 mL
0,5M tris HCl pH 6,8	1,25 mL
SDS 10%	50 µL
Acrilamida/bis-acrilamida (30/0,8%)	660 µL
TEMED	5 µL
Persulfato de amônio (APS) 10%	25 µL

2. Preparação da amostra:

2.1 O volume de amostra a ser carregado no gel é de aproximadamente 20µL, sendo 10 µL de amostra e 10 µL de tampão de amostra.

2.2 Manter os *ependorfs* à 100°C por 3 minutos (ou 95°C por 10 minutos)

2.3 Deixar esfriar a temperatura ambiente

2.4 Centrifugar as amostras por 3 minutos a 12.000 rpm

2.5 Aplicar no gel

3. Separação da amostra (eletroforese)

3.1 Idem ao gel SDS-PAGE

3.2 O gel deverá ser migrado a uma voltagem de 150 volts (por aproximadamente 1 hora e 30 minutos à 2 horas).

Tampão de amostra

H ₂ O destilada	3,8 mL
0,5M tris HCl pH 6,8	1 mL
SDS 10%	1,6 mL
Glicerol	0,8 mL
Azul de bromofenol 1%	0,4 mL

Tampão de corrida 5X*

Tris	15 g
Glicina	72 g
SDS	5 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1 L

*diluir para 1X na hora do uso com água destilada. Manter na geladeira. Pode ser utilizado até 4 vezes.

4. Detecção de quitinases

4.1 Após a eletroforese, remover o gel da cuba e acondicionar em um recipiente

4.2 Incubar o gel com 100 mL tampão acetato 100mM pH 5,3 com Triton X-100 1% (1 mL/99 mL tampão acetato) por 20 horas à 30°C, com agitação.

4.3 Corar o gel com solução de calcofluor White M2R 0,01% em 0,5M tris-HCl pH 8,9 por 10 minutos.

4.4 Descorar com água destilada (3 x 10 minutos) e avaliar se necessita mais

4.5 Visualizar em aparelho com luz ultravioleta (UV)

Tampão acetato 100 mM pH 5.3

0,2 M ácido acético	8,8 mL
0,2 M acetato de sódio	41,2 mL
H ₂ O destilada q.s.p.	50 mL

Ácido acético 0,2 M

ácido acético	1,15 mL
H ₂ O destilada q.s.p.	10 mL

5. Glicol-quitina (Trudel & Asselin, 1989)

5.1 Em um graal de porcelana macerar 1 g de glicol-quitosan com o auxílio de nitrogênio líquido

5.2 Adicionar 100 mL de ácido acético 10% (v/v) e incubar por 16 horas a temperatura ambiente.

5.3 Após esse período, adicionar vagarosamente 30 mL de metanol e filtrar a solução obtida a vácuo em papel Whatman nº1. Fazer isso em capela de exaustão.

5.4 Adicionar ao filtrado 7,5 mL de anidrido acético, sob agitação, e deixar solidificar por 30 minutos a temperatura ambiente.

5.5 Quebrar o gel obtido em pedaços e colocar 1 volume de metanol. Triturar em liquidificador durante 4 minutos.

5.6 Lavar a suspensão com metanol e centrifugar a 12.000 rpm por 15 minutos.

5.7 Lavar diversas vezes com água destilada até a neutralização do pH.

5.8 Ressuspender o sedimento em 1 volume de água destilada e estocar à -20°C. Esta é uma solução estoque de 1%.

Referências:

ST LEGER, R.J.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. 1993. Entomopathogenic Isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Aspergillus flavus* Produce Multiple Extracellular Chitinase Isozymes. *Journal of Invertebrate Pathology* 61:81-84.

TRUDEL, J.; ASSELIN, A. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 178:362-366. Trudel, J.; Asselin, A. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 178:362-366.

16.2 GEL DE ATIVIDADE (ZIMOGRAMA) PARA DETECÇÃO DE PROTEASES (MODIFICADO DE ST LEGER ET AL. 1993)

Proteases são enzimas que hidrolisam proteínas. Diversas classes de proteases podem ser encontradas, dependendo de suas características. Portanto, diversos protocolos são descritos para zimogramas de proteases. Este protocolo, assim como o protocolo para quitinases, utiliza SDS em sua composição que, posteriormente, deverá ser removido para que a enzima recupere sua forma nativa e possa hidrolisar o substrato.

1. Montagem do gel

Running 12%

H ₂ O destilada	2,35 mL
1,5M tris HCl pH 8,8	2,5 mL
SDS 10%	100 µL
Gelatina 1%	1 mL
Acrilamida / bis-acrilamida (30/0,8%)	4 mL
TEMED	5 µL
Persulfato de amônio (APS) 10%	50 µL

Stacking 4%

H ₂ O destilada	3,05 mL
0,5M tris HCl pH 6,8	1,25 mL
SDS 10%	50 µL
Acrilamida / bis-acrilamida (30/0,8%)	660 µL
TEMED	5 µL
Persulfato de amônio (APS) 10%	25 µL

2. Preparação da amostra:

2.1 O volume de amostra a ser carregado no gel é de aproximadamente 20 µL, sendo 10 µL de amostra e 10 µL de tampão de amostra.

2.2 Manter os *ependorfs* à 100°C por 3 minutos (ou 95°C por 10 minutos)

2.3 Deixar esfriar a temperatura ambiente

2.4 Centrifugar as amostras por 3 minutos a 12.000 rpm

2.5 Aplicar no gel

2.6 Separação da amostra (eletroforese)

2.7 Idem ao gel SDS-PAGE

2.8 O gel deverá ser corrido a uma voltagem de 150 volts por aproximadamente 2 horas.

Tampão de amostra

H ₂ O destilada	3,8 mL
0,5M tris HCl pH 6,8	1 mL
SDS 10%	1,6 mL
Glicerol	0,8 mL
Azul de bromofenol 1%	0,4 mL

Tampão de corrida 5X*

Tris	15 g
Glicina	72 g
SDS	5 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1 L

*diluir para 1X na hora do uso com água destilada. Manter na geladeira. Pode ser utilizado até 4 vezes.

3. Detecção de proteases

3.1 Após a eletroforese, remover o gel da cuba e acondicionar em um recipiente.

3.2 Incubar o gel com 100 mL tampão tris 50 mM pH 8,0 com Triton X-100 2,5% (2,5 mL/97,5 mL tampão tris) por 16 horas a 37°C, com agitação.

3.3 Corar o gel com solução de comassie R250 0.1% em 50% metanol.

Dica: abrir o metanol em capela de exaustão.

Referências:

ST LEGER, R.J.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. 1993. Entomopathogenic Isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Aspergillus flavus* Produce Multiple Extracellular Chitinase Isozymes. *Journal of Invertebrate Pathology* 61:81-84.

16.3 GEL DE ATIVIDADE (ZIMOGRAMA) PARA DETECÇÃO DE LIPASES E ESTERASES (TEO ET AL. 2003)

Lipases e esterases são enzimas lipolíticas que hidrolisam a ligação éster de lipídeos. Triglicerídeos são considerados o substrato clássico destas enzimas, porém, substratos lineares formados a partir de álcool e ácido graxo ligados por uma ligação éster também são alvo. Desta maneira, existem substratos sintéticos lineares cromogênicos e fluorogênicos, que são empregados com sucesso para detecção e análise de lipases e esterases. O gel utilizado no zimograma de descrito a seguir é considerado nativo, pois não utiliza nenhum interferente que possa modificar a conformação nativa da enzima.

1. Preparação do gel

1.1 Idem ao gel SDS-PAGE, com modificações na composição, conforme segue:

Running 10%

H ₂ O destilada	4 mL
0,5 M tris HCl pH 8,8	2,5 mL
Acrilamida / bis-acrilamida (30/0,8%)	3,35 mL
TEMED	5 µL
Persulfato de amônio (APS) 10%	50 µL

Stacking 4%

H ₂ O destilada	3,1 mL
0,5 M tris HCl pH 6,8	1,25 mL
Acrilamida / bis-acrilamida (30/0,8%)	660 µL
TEMED	5 µL
Persulfato de amônio (APS) 10%	25 µL

2. Preparação da amostra:

2.1 O volume de amostra a ser carregado no gel é de aproximadamente 20 µL, sendo 10 µL de amostra e 10 µL de tampão de amostra.

2.2 Não ferver as amostras. Preparar em *ependorfs* e aplicar diretamente no gel.

2.3 Separação da amostra (eletroforese):

2.4 Idem ao gel SDS-PAGE.

2.5 O gel deverá ser corrido a uma voltagem de 150 volts até chegar ao final.

3. Detecção de lipases/esterases:

3.1 Após a eletroforese, remover o gel da cuba e acondicionar em um recipiente.

3.2 Incubar o gel com 100 mL tampão tris 50 mM pH 8,0 com Triton X-100 2% (2 mL/98 mL tampão tris) e 10 µM metilumbeliferil (MUF)-butirato por 15 minutos à 37°C.

3.3 Visualizar as bandas de atividade em luz ultravioleta (UV)

Dica 1: a fluorescência emitida não é definitiva e vai perdendo a intensidade com o passar do tempo, portanto o registro das bandas de atividade deve ser realizado rapidamente.

Dica 2: o substrato empregado, MUF-butirato, contém uma cadeia de ácido graxo de 4 carbonos, por isso, este substrato pode ser alvo tanto de esterases (que atuam sobre substratos com cadeia de até 10 carbonos) quanto de lipases (que atuam sobre substratos com cadeia de ácido graxo maior ou menor de 10 carbonos).

Tampão de amostra

H ₂ O destilada	3,8 mL
0,5 M tris HCl pH 6,8	1 mL
Glicerol	0,8 mL
Azul de bromofenol 1%	0,4 mL

Tampão de corrida 1X

Tris	1,8 g
Glicina	8,64 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1 L

Referência:

TEO, J.W.P.; ZHANG, L-H.; POH, C.L. 2003. Cloning and characterization of a novel lipase from *Vibrio harveyi* strain AP6. Gene 312:181-188.

16.4 GEL DE ATIVIDADE (ZIMOGRAMA) PARA DETECÇÃO DE CATALASES (ZIMMERMANN ET AL. 2006)

Catalases são enzimas importantes para todas as células vivas, pois catalizam a decomposição de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. São enzimas antioxidantes, protegendo as células contra danos oxidativos.

1. Preparação do gel

Running 7%

H ₂ O destilada	4,85 mL
1,5 M Tris HCl pH 8,8	2,5 mL
Acrilamida / bis-acrilamida (30/0,8%)	2,5 mL
TEMED	5 µL
Persulfato de amônio (APS) 10%	50 µL

Stacking 4%

H ₂ O destilada	3,1 mL
0,5M tris HCl pH 6,8	1,25 mL
Acrilamida / bis-acrilamida (30/0,8%)	660 µL
TEMED	5 µL
Persulfato de amônio (APS) 10%	25 µL

2. Preparação da amostra:

2.1 O volume de amostra a ser carregado no gel é de aproximadamente 20 µL, sendo 10 µL de amostra e 10 µL de tampão de amostra.

2.2 Não ferver as amostras. Preparar em *ependorfs* e aplicar diretamente no gel.

2.3 Separação das amostras:

2.4 O gel deverá ser corrido a uma voltagem de 70 a 80 volts por 16 horas na geladeira.

2.5 Detecção de catalases:

2.6 Após eletroforese, remover o gel da cuba e colocar em um recipiente limpo.

2.7 Incubar o gel com 100 mL de 0.01% peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 5 minutos (33 µL solução a 30% em 100 mL de água destilada).

2.8 Revelar com 1% cloreto de ferro (FeCl₂) + 1% ferricianida de potássio (K₃Fe(CN)₆) por 5 minutos.

2.9 Lavar com água e observar as bandas.

Tampão de amostra

H ₂ O destilada	3,8 mL
0,5 M tris HCl pH 6,8	1 mL
Glicerol	0,8 mL
Azul de bromofenol 1%	0,4 mL

Tampão de corrida 1X

Tris	1,8 g
Glicina	8,64 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1 L

Referência:

ZIMMERMANN, P.; HEINLEIN, C.; ORENDI, G.; ZENTGRAF, U. 2006. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Cell and Environment*, 29:1049-1060.

16.5 GEL DE ATIVIDADE (ZIMOGRAMA) PARA DETECÇÃO DE SUPERÓXIDO DISMUTASES

Superóxido dismutases (SOD) são enzimas conhecidas como antioxidantes, importantes para a defesa de células expostas a oxigênio. As enzimas SOD são consideradas metaloenzimas, pois necessitam de metais cofatores para sua atividade. Com a metodologia descrita a seguir, pode-se identificar três tipos diferentes SOD: Mn-SOD (mitocondrial), CuZn-SOD (mais comum e abundante em eucariontos) e Fe-SOD (encontrada em muitas bactérias e plastídeos de plantas).

1. Preparação do gel:

Running

H ₂ O destilada	5,6 mL
1,5 M Tris HCl pH 8,8	3 mL
Acrilamida / bis-acrilamida (30/0,8%)	3,4 mL
TEMED	5 µL
Persulfato de amônio (APS) 10%	50 µL

Stacking 4%

H ₂ O destilada	1,5 mL
0,5 M Tris HCl pH 6,8	750 µL
Acrilamida / bis-acrilamida (30/0,8%)	750 µL
TEMED	5 µL
Persulfato de amônio (APS) 10%	25 µL

2. Preparação da amostra:

2.1 O volume de amostra a ser carregado no gel é de aproximadamente 20 µL, sendo 10 µL de amostra e 10 µL de tampão de amostra.

2.2 Não ferver as amostras. Preparar em *ependorfs* e aplicar diretamente no gel.

Dica: para cada amostra, deve-se preparar três *ependorfs*. Cada uma será tratada de forma diferente, para avaliar o tipo de SOD presente na amostra.

Tampão de amostra

H ₂ O destilada	3,8 mL
0,5 M Tris HCl pH 6,8	1 mL
Glicerol	0,8 mL
Azul de bromofenol 1%	0,4 mL

Tampão de corrida 1X

Tris	1,8 g
Glicina	8,64 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1 L

2. Separação das amostras:

2.1 O gel deverá ser corrido a uma voltagem de 150 volts.

3. Detecção de SODs:

3.1 Após eletroforese, remover o gel da cuba e colocar sobre uma placa de vidro limpa com álcool.

3.2 Cortar o gel, separando cada amostra, e colocar cada uma das tiras em placas de petri para coloração ou revelação.

3.3 Uma das fatias do gel deverá ser tratada anteriormente à coloração:

Para Fe-SOD – antes de corar o gel, tratar por 1h com a seguinte solução:

Água oxigenada 33% (H ₂ O ₂)	230 µL	20 mM
Cianeto de potássio (KCN)	200 µL	1 mM
0.5 M Fosfato de potássio monobásico (K ₂ HPO ₄) pH 7.8	20 µL	50 mM
EDTA 0,1M q.s.p.	100 mL	

3.4 Todas as fatias de gel deverão passar pelo processo de coloração e revelação com as seguintes soluções:

4. Solução de coloração SODs

Nitroblue tetrazolium (NBT) 2,45 mM	5 mg
H ₂ O destilada q.s.p.	50 mL

- Manter o gel por 20 minutos

- Lavar com água destilada

4.1 Para CuZn-SOD – adicionar 10mM cianeto de potássio (KCN) na solução reveladora:

Dica: preparar a solução de revelação e dividir em dois frascos. Em 50 mL adicionar KCN (0,037 g) para a identificação de CuZn-SOD.

5. Solução de revelação*

Fosfato de potássio monobásico (K ₂ HPO ₄)	0,627 g
Riboflavina (2,6 µM) – 55 mg/mL água	3 µL
TEMED 928 mM)	0,325 mL
H ₂ O destilada q.s.p.	100 mL

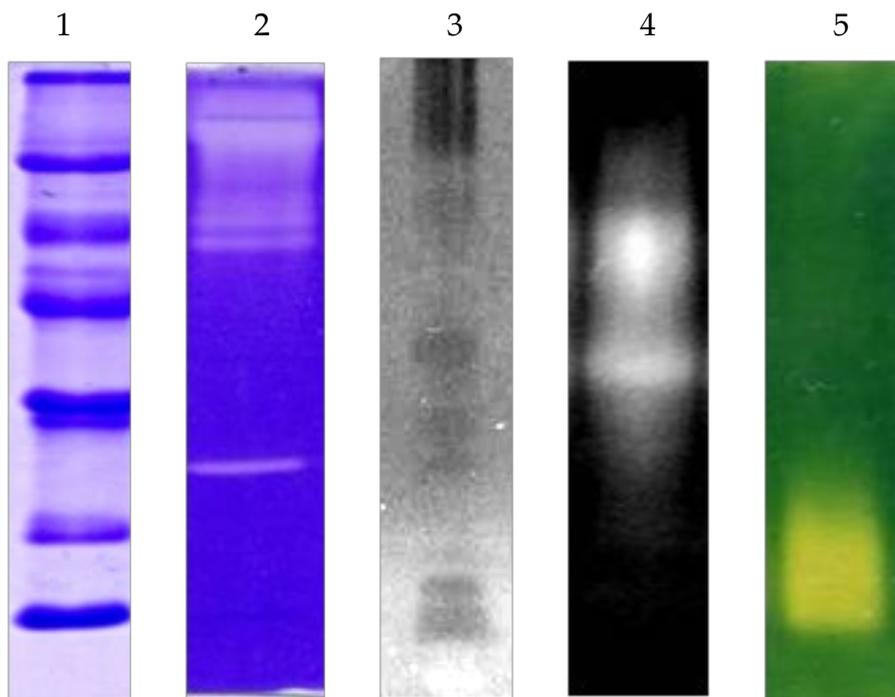
*Ajustar o pH com ácido fosfórico (H₃PO₄).

5.1 Após o tratamento com solução de coloração e revelação, expor o gel à luz branca forte até surgirem as bandas.

- Para Mn-SOD – esta enzima não é inibida.

Apêndice:

Exemplos de coloração e detecção de géis de proteína



1- SDS-PAGE corado com Comassie Blue

2- Protease

3- Quitinase

4- Lipase

5- Catalase

Referências:

SANTI L, BEYS DA SILVA WO, BERGER M, GUIMARÃES JA, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon* 2010, 1;55(4):874-80.

CAPÍTULO 17

GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS EM LABORATÓRIOS DE BIOTECNOLOGIA

Cátia Viviane Gonçalves

Laboratórios de pesquisas geram uma gama de resíduos durante os processos desenvolvidos em suas dependências, os quais possuem características intrínsecas referentes à sua forma de geração. A quantidade de resíduos produzida neste segmento poderia ser considerada insignificante quando comparada às atividades industriais. Todavia, sob o ponto de vista ambiental, podem representar um problema expressivo, principalmente por não possuírem técnicas padronizadas para o seu tratamento em função da variabilidade de sua composição.

Para que o gerenciamento de resíduos perigosos advindos de laboratórios seja realizado de maneira ambientalmente correta, medidas técnicas e administrativas devem ser implantadas, envolvendo desde a prevenção até o controle efetivo da sua geração e disposição final. Dessa forma, a eficiência de qualquer programa de gerenciamento de resíduos laboratoriais, está diretamente relacionada à adoção de uma regra bastante simples, a corresponsabilidade.

A adequada separação é uma atitude que pode reduzir a quantidade de resíduos perigosos, podendo, inclusive, ser considerada um processo de minimização. Se existe uma separação dos resíduos por classes ou tipos, é possível tratá-los através de reações entre si. Ressalta-se que a segregação dos resíduos é realizada por meio de classes de incompatibilidade definidas pela NBR 12235/1992, que propõe quais os resíduos que devem ser armazenados separadamente.

Na escala de prioridades, o tratamento é a penúltima prática a ser realizada, podendo este ser químico, físico, biológico ou térmico. O objetivo do tratamento é o de eliminar ou reduzir o potencial de periculosidade do resíduo. Devido à diversidade de resíduos perigosos e às mais variadas faixas de concentração de seus constituintes, não existe regra geral para a escolha do tratamento adequado.

17.1 BROMETO DE ETÍDIO

Eliminação de Resíduos

Quando em embalagem fechada, colocar todo o material em um recipiente rotulado e separado para eliminação por incineração. No momento da incineração, o material deve ser dissolvido ou misturado com um solvente combustível e queimado em um forno equipado com filtros adequados. Quando em pequenas quantidades, o brometo de etídio, que é normalmente utilizado em soluções aquosas muito diluídas, pode ser convertido em um produto fisiologicamente inativo.

Técnica para Descontaminação de Brometo de Etídio (Método de Lunn e Sansone)

Precauções:

1. Usar óculos, luvas nitrílicas e vestuário de proteção.
2. Trabalhar em capela de exaustão.

Procedimento:

1. Em 100 mL de água destilada adicionar 100 µL de brometo de etídio a 1 mg/mL, formando uma solução com concentração 1 µg/mL.
2. Adicionar 5 mL de ácido hipofosforoso e 12 mL de nitrito de sódio a 0,5 M.
3. Manter a solução em repouso por 20 horas.
4. Passado o repouso, medir o pH da solução, ajustando-a para 6-8 com hidróxido de sódio (NaOH).
5. Expor a solução descontaminada à luz UV. Caso o brometo de etídio esteja totalmente inativo, não irá produzir fluorescência, podendo, então, ser descartado sem causar danos ao ambiente. Caso haja fluorescência, encaminhar para incineração.

Técnica para Descontaminação de Brometo de Etídio (Método de Armour)

Precauções:

1. Usar óculos, luvas nitrílicas e vestuário de proteção.
2. Trabalhar na capela de exaustão.

Procedimento:

1. Em 100 mL de água destilada adicionar 100 µL de brometo de etídio a 1 mg/mL, formando uma solução com concentração 1 µg/mL.
2. Adicionar 300 mL de hipoclorito de sódio a 2,5% (na solução preparada).
3. Manter sob agitação leve por quatro horas em temperatura ambiente.
4. Manter a solução em repouso por três dias.
5. Passado o repouso, medir o pH da solução, ajustando-a para 6-8 com hidróxido de sódio (NaOH).
6. Expor a solução descontaminada à luz UV. Caso o brometo de etídio esteja totalmente inativo, este não produzirá fluorescência, podendo, então, ser descartado sem causar danos ao ambiente. Caso haja fluorescência, encaminhar para incineração.

Referências:

KAUFMAN, J. A. Waste Disposal in Academic Institutions. Chelsea: Lewis Publishers, 1990.

LUNN, G.; SANSONE, E. B. Ethidium Bromide: destruction and decontamination of solutions. Analytical Biochemistry, London, 162: 453-458, 1987.

17.2 ACRILAMIDA

Eliminação de Resíduos

Para grandes volumes, encaminhar para ser queimado em um incinerador químico com pós queimador e lavador de gases. Quando em pequenas quantidades e em solução, a acrilamida pode ser hidrolisada, neutralizada e descartada.

Técnica para Descontaminação de Acrilamida em solução

Precauções:

1. Usar óculos, luvas nitrílicas e vestuário de proteção.
2. Trabalhar em capela de exaustão (há liberação de amônia).

Procedimento:

1. Em um béquer de 1000 L, acrescentar 500 mL da solução contendo acrilamida e hidrolizar com NaOH.
2. Neutralizar a solução (obter pH entre 5-7).
3. Deixar a solução em repouso por 1 hora e, após ser diluída no mesmo volume de água, pode ser descartada sem causar danos ao ambiente.

Referências:

ARMOUR, M.A. Hazardous Laboratory Chemicals Disposal Guide. Lewis Publishers. 3ª ed., 2003.

17.3 FENOL

Eliminação de Resíduos

Quando em embalagem fechada, colocar todo o material em um recipiente rotulado e separado para eliminação por incineração. Quando em pequenas quantidades, o fenol pode ser degradado através da reação de Fenton.

Técnica para Descontaminação de Fenol

Precauções:

1. Usar óculos, luvas butílicas e vestuário de proteção.
2. Trabalhar em capela de exaustão.

Procedimento:

1. Em um balão de fundo redondo de 300 mL de três bocas - equipado com um agitador, um funil de adição, e termômetro – preparar uma solução de 4,7 g (0,05 mol) de fenol em 75 mL de água destilada.
2. Dissolver 2,35 g de sulfato ferroso heptahidratado (0,0085 mol) na mistura.
3. Ajustar o pH para 5-6 com ácido sulfúrico diluído.
4. Adicionar, lentamente, peróxido de hidrogênio (41 mL, 0,4 mol) gota a gota. A agitação deve ocorrer durante a adição e mantida por 1 hora.

CUIDADO: A ordem é importante se o H_2O_2 e o $FESO_4$ forem pré-misturados ocorre uma explosão violenta.

4. Manter a temperatura entre 50-60°C, ajustando a velocidade de adição ou utilizando banho de gelo. Manter a agitação por mais 2 horas até a temperatura cair para 25°C.

5. Deixar a solução em repouso por 12 horas e então, pode ser descartado sem causar danos ao ambiente.

Referências:

ARMOUR, M.A. Hazardous Laboratory Chemicals Disposal Guide. Lewis Publishers. 3ª ed., 2003.



UNIVATES

R. Avelino Tallini, 171 | Bairro Universitário | Lajeado | RS | Brasil
CEP 95900.000 | Cx. Postal 155 | Fone: (51) 3714.7000
www.univates.br | 0800 7 07 08 09