



# TÉCNICAS DE BIOQUÍMICA

aulas teóricas

Noções básicas para a extração,  
separação, identificação e  
quantificação de biomoléculas

# Amostragem

A boa análise começa e depende de uma boa amostragem.

Não é possível analisar todos os componentes de um dado lote de alimentos para avaliar a sua qualidade ou outros parâmetros, é selecionada uma parte do todo e considera-se que esta porção é representativa da totalidade do produto.

A obtenção de uma porção, ou amostra, representativa do todo, é designada por amostragem e a quantidade total da qual foi retirada a amostra é designada por população.

Os dois objetivos principais da amostragem são o cálculo do valor médio de uma característica e determinar se esse valor médio respeita as especificações definidas no plano de amostragem.

Seguir guias, como o *Official Methods of Analysis* da AOAC International



## População homogénea

Uniforme e idêntica em todas as circunstâncias.

Uma amostra pode ser retirada aleatoriamente, sendo os dados obtidos sempre representativos do todo.



## População heterogénea

A maioria das populações, tendo a amostragem que ter tal facto em consideração.



TERRENO OU LAB

Amostragem

Preservação/pré  
-tratamento

Conservação

Transporte

LAB

Receção

Armazenament  
o

Preparação

Análise

Tratamento de  
dados e  
Resultados

Boletim/  
Relatório



# Representatividade

A amostra deve ser retirada de diversos locais numa população.

Para líquidos deve agitar-se antes de retirar a amostra. Para sólidos, devem retirar-se amostras de vários pontos.

O tamanho ótimo de uma amostra, para obter representatividade, pode ser determinado através de análise estatística, usando o teste de t. O tamanho da amostra depende da exatidão requerida.

Se o tamanho de partícula da amostra for demasiado grande para a análise pretendida, ele terá de ser reduzido.

Muitas amostras requerem trituração para assegurar uma análise mais rigorosa.

Muitos alimentos contêm enzimas, as quais podem causar degradação dos componentes a analisar. Por esse motivo, a atividade enzimática deve ser eliminada ou controlada antes da análise, através de métodos selecionados de acordo com as características do alimento.

Os alimentos com teor elevado de gordura apresentam maiores dificuldades para preparação de amostras. A sua trituração é difícil, requerendo frequentemente prévia congelação e os lípidos insaturados são sensíveis à oxidação, necessitando armazenamento em vácuo ou sob atmosfera de azoto. Poderão ser-lhes adicionados antioxidantes, desde que não interfiram com a análise.



# Técnicas de quantificação de **PROTEÍNAS**



# Método de Kjeldahl

Determinação do teor de azoto orgânico total de um alimento.

O método de Kjeldahl tem sofrido modificações que permitem um aumento da sua eficácia e também uma automação ou semi-automação das medidas e também a sua utilização para medir teores na ordem dos  $\mu\text{g}$ .

## FASES:

### Digestão:

Os compostos orgânicos são **digeridos com ácido sulfúrico**, na presença de **catalisadores**.

O azoto orgânico total é convertido em sulfato de amónio.



## Neutralização:

Depois de diluir o material digerido com água, adiciona-se tiosulfato de sódio em meio básico, para neutralizar o ácido sulfúrico.



A amónia formada é destilada numa solução de ácido bórico, contendo indicadores.



## Titulação:

O ião borato (quantidade proporcional à de azoto) é titulado com uma solução padrão de HCl, permitindo calcular o número de moles de N na amostra, o qual é igual ao número de moles de  $\text{NH}_3$ , que por sua vez é igual ao de HCl.



Deve ser feito um branco para subtrair o teor de azoto dos reagentes daquele da amostra.

## Tratamento dos resultados:

$$\%N = N \text{ HCl} \frac{\text{Vol. ácido corrigido}}{\text{peso da amostra (g)}} \times \frac{14 \text{ g N}}{\text{mol}} \times 100$$

N HCl é a concentração de HCl em mol.L<sup>-1</sup>, o volume de ácido corrigido corresponde ao volume de HCl gasto para titular a amostra menos o gasto para titular o branco.

14 é a massa atômica do azoto.

Utiliza-se um fator de correção para converter a percentagem de azoto em percentagem de proteína. Como a maioria das proteínas contém 16% de azoto, normalmente esse fator é de 6.25 (100/16=6.25).

### Alimento

Ovos ou carne

Lacticínios

Trigo

Outros cereais e oleaginosas

Amêndoas

Amendoins

Coco

### Factor

6.25

6.38

5.70

6.25

5.18

5.46

5.30



# Método de Dumas

As amostras são pesadas e introduzidas num reator de combustão.

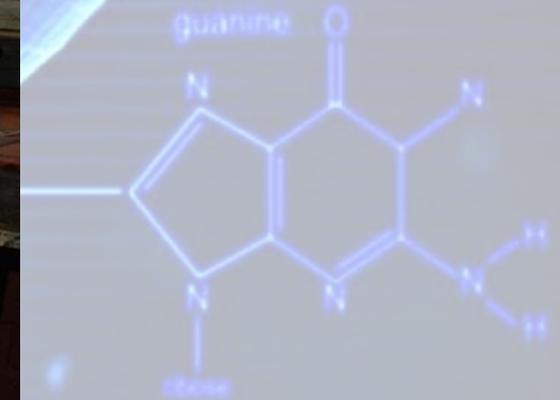
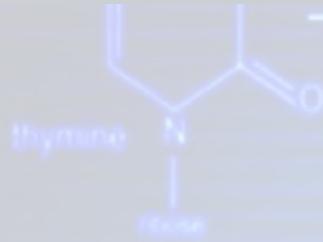
O azoto libertado é medido num cromatógrafo gasoso.



# Espectroscopia no infravermelho

Os grupos funcionais numa amostra absorvem radiação a diferentes frequências.

Nas proteínas utilizam-se as bandas de absorção características das ligações peptídicas (6.47  $\mu\text{m}$ , 3300-3500 nm, 2080-2220 nm e 1560-1670 nm), permitindo calcular a concentração proteica.



# Método do Biureto

As substâncias contendo ligações peptídicas reagem com iões  $\text{Cu}^{2+}$  em meio básico.

O reagente do biureto (inclui sulfato de cobre, NaOH e tartarato de sódio e potássio, usado para estabilizar os iões  $\text{Cu}^{2+}$  em meio básico).

A absorvância da cor produzida (após estabilização durante 15-30 minutos) pode ser medida a 540 nm e a sua intensidade é proporcional à concentração de proteínas na amostra.



À direita água com reagente do biureto. À esquerda alteração de cor produzida quando se adiciona o reagente a uma proteína.

# Técnicas de separação de **PROTEÍNAS**

A maioria das técnicas utilizadas para separação de proteínas explora as **diferenças em tamanho, solubilidade e carga**, as características de adsorção e a **afinidade biológica** para outras moléculas.

A separação por precipitação explora as diferenças de solubilidade das proteínas, atendendo ao tipo e carga dos aminoácidos componentes.

As proteínas podem ser seletivamente precipitadas alterando o pH, força iónica, constante dielétrica, ou temperatura.



# Cromatografia de adsorção

Tem por base a diferente afinidade das proteínas para a fase estacionária ou para o eluente. As cromatografias de afinidade e de permuta iónica usam esta propriedade para separar proteínas.

## Cromatografia de permuta iónica

É a técnica de separação de proteínas mais utilizada, sendo usadas sobretudo resinas aniónicas (com carga positiva). A proteína de interesse é adsorvida à resina sob condições tampão (força iónica e pH) que maximizem a afinidade da proteína para a resina. As restantes proteínas, tendo cargas diferentes, não são adsorvidas. As proteínas que ficam ligadas à resina são depois eluídas por alteração gradual do pH ou da força iónica do eluente.



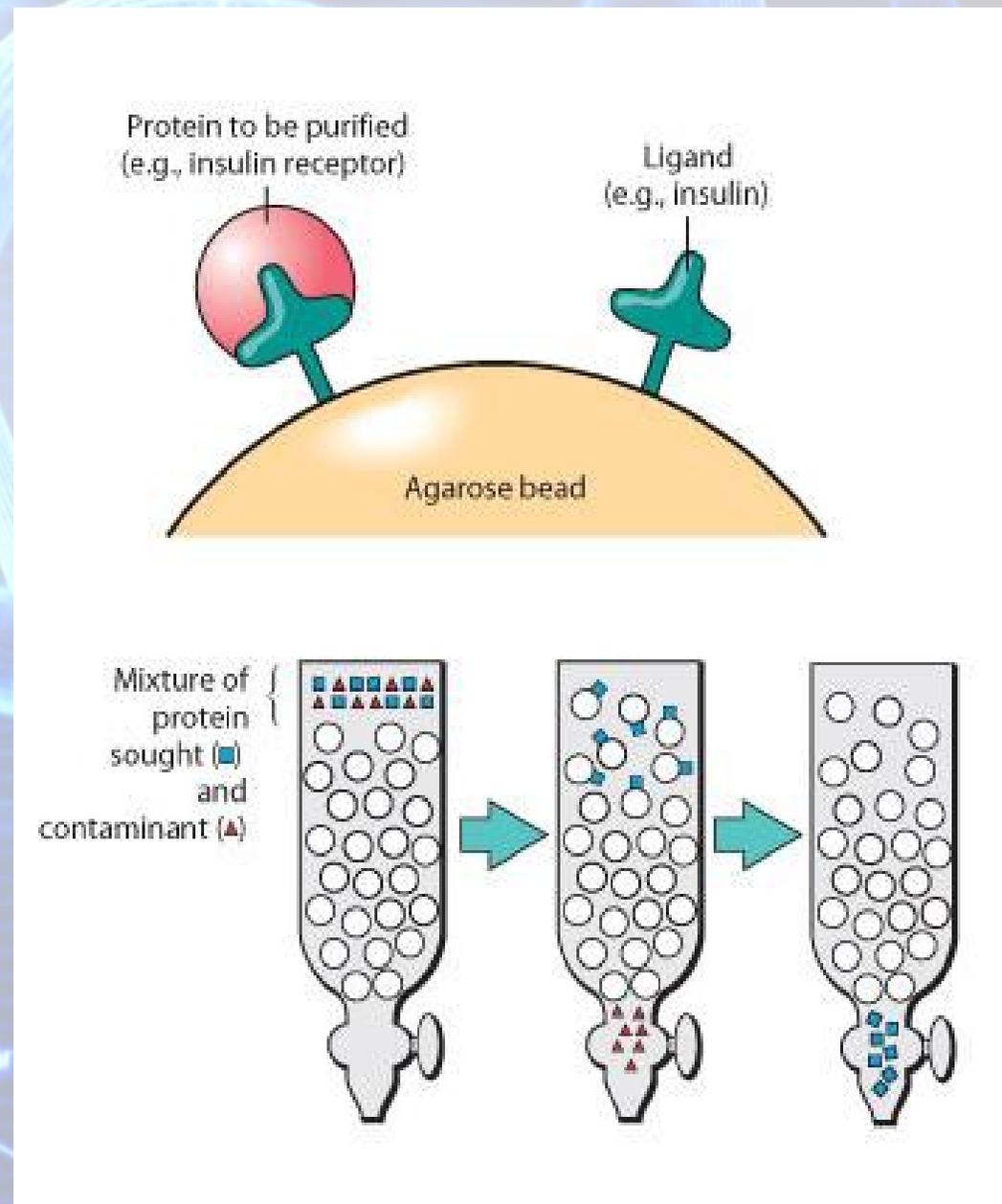
# Cromatografia de afinidade

Separação numa fase estacionária contendo um ligando (inibidores enzimáticos, substratos enzimáticos, coenzimas, anticorpos e alguns pigmentos) covalentemente ligado ao suporte sólido.

A proteína é eluída sob condições tampão (pH, força iónica, temperatura e concentração proteica) que maximizem a ligação da proteína ao ligando.

As restantes proteínas e outras moléculas que não se ligam ao ligando são eluídas.

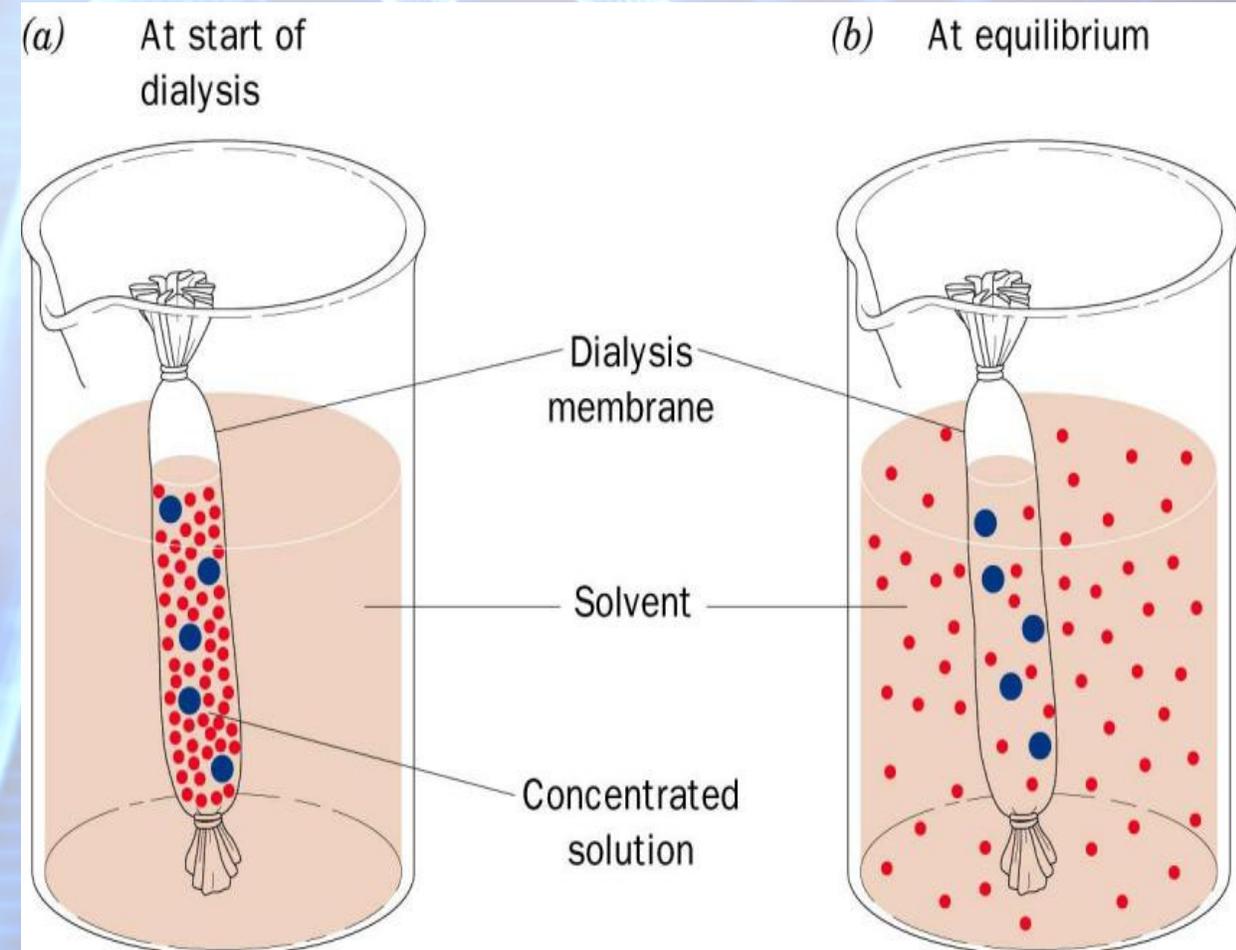
No final, a proteína ligada será eluída da coluna alterando as condições de pH, temperatura ou concentração do sal ou do ligando no tampão usado como eluente.



# Diálise

São utilizadas membranas semipermeáveis, as quais apenas permitem a passagem de pequenas moléculas. Coloca-se uma solução contendo a proteína num tubo de diálise, o qual é colocado num grande volume de água ou de tampão, sob agitação suave. Os solutos de baixo peso molecular saem para fora do tubo, enquanto o tampão entra. Este método é simples mas demorado (12 h ou mais).

Um processo alternativo e mais rápido passa pela utilização de membranas de ultrafiltração, estando a sua utilização quase restrita a laboratórios de investigação.



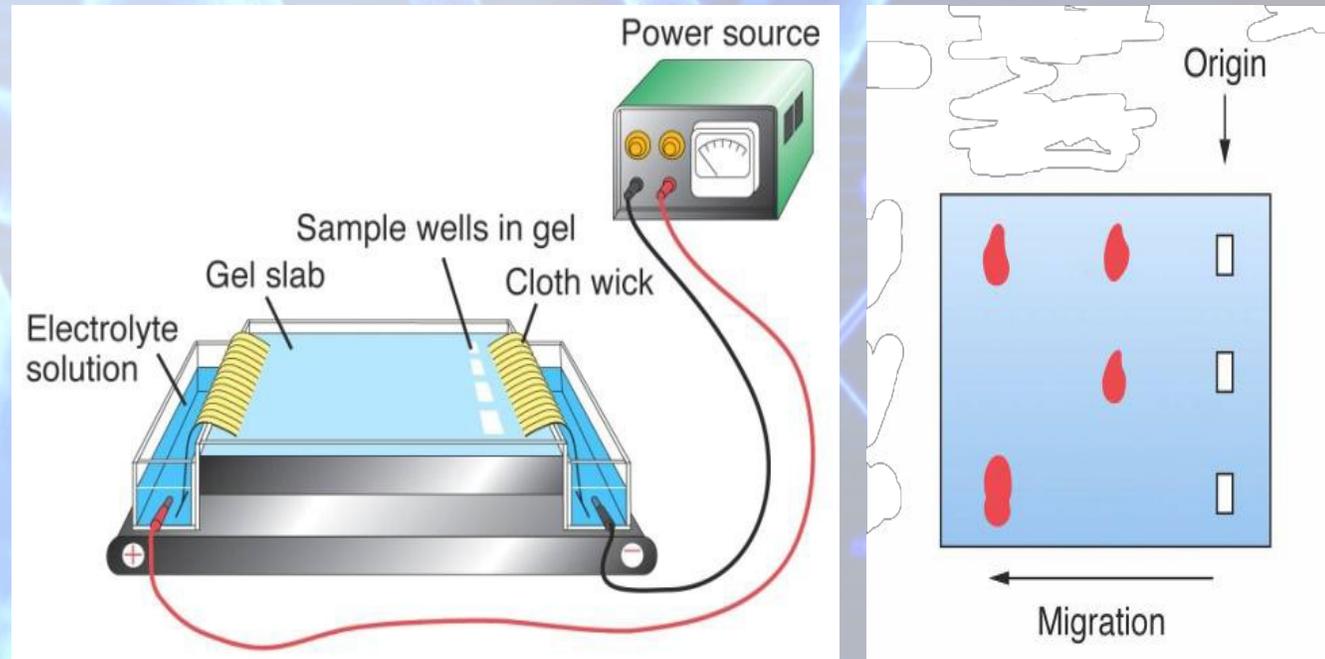
# Eletroforese

Permite separar proteínas a partir de uma mistura complexa, por migração diferencial destas através de uma matriz sólida, à qual é aplicado um campo elétrico.

A técnica mais utilizada para separar proteínas é a eletroforese de zona e os géis de poliacrilamida, as matrizes mais utilizadas.

A separação depende da fricção da proteína na matriz e da sua carga.

$$\text{Mobilidade} = \frac{\text{tensão aplicada} \times \text{carga da molécula}}{\text{fricção da molécula}}$$



# Electroforese

Uma proteína apresenta carga negativa se o pH da solução for superior ao seu  $pI$  e carga positiva se o pH for inferior ao seu  $pI$ .

A dimensão da carga e a tensão aplicada determinarão a extensão da migração da proteína num campo elétrico.

Quanto mais alta a tensão aplicada e mais forte a carga da proteína, maior a migração.

A migração também depende do tamanho e forma da molécula, ou seja do raio de Stokes da proteína. Um aumento do raio de Stokes origina um aumento da fricção e uma redução da mobilidade. Deste modo, as proteínas mais pequenas tendem a migrar mais rapidamente. Finalmente, uma redução no tamanho do poro do gel provoca uma redução na mobilidade.

# Eletroforese não desnaturante

As proteínas são separadas na sua forma nativa com base na carga, tamanho e forma da molécula.

Na eletroforese com desnaturação (ou SDS-PAGE), utiliza-se um gel de poliacrilamida e um detergente aniónico (dodecil sulfato de sódio - SDS) para separar proteínas com base no seu tamanho. As proteínas, depois de reagir com um agente redutor (adicionado em conjunto com o detergente), ligam-se ao SDS e adquirem carga negativa, sendo depois separadas em função do seu tamanho.

Adiciona-se habitualmente um corante (azul de bromofenol) à solução contendo a proteína. Sendo uma molécula pequena, o corante migra à frente das proteínas e permite seguir o andamento da migração.

Após concluída esta, o gel é corado de maneira a permitir a visualização das bandas das proteínas. A mobilidade relativa de cada proteína é calculada por comparação com a do corante.

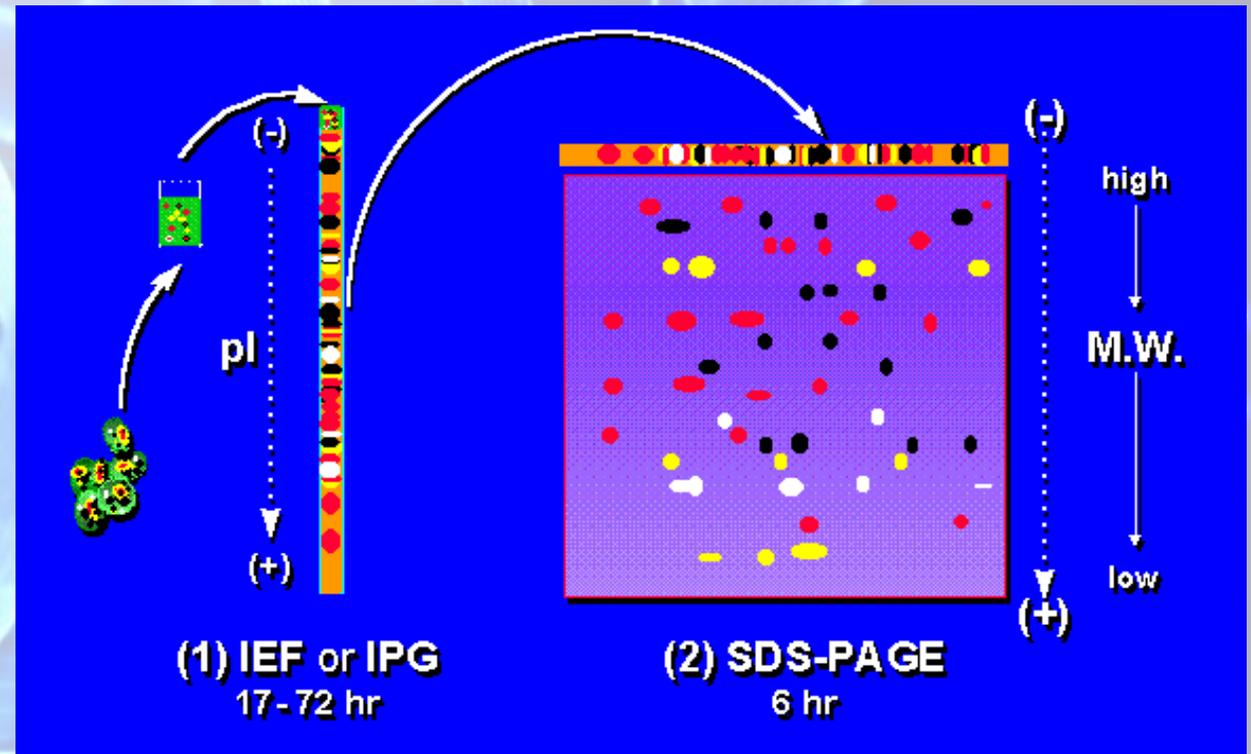
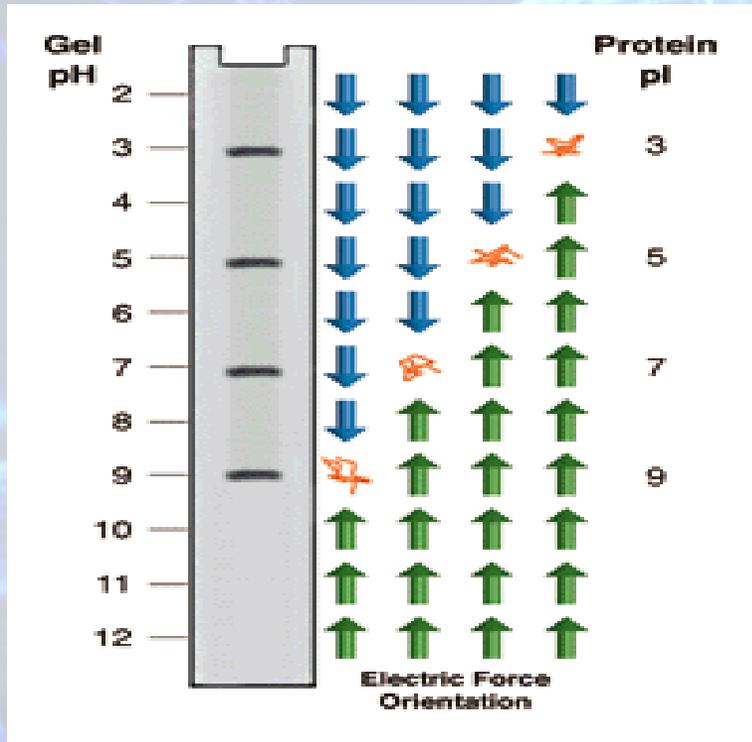
$$R_m = \text{distância percorrida pela proteína} / \text{distância percorrida pelo corante}$$

O peso molecular pode ser determinado por esta via, relacionando o  $R_m$  de uma proteína com os  $R_m$  de proteínas padrão, de PM conhecido. Traça-se um gráfico dos logaritmos dos PM dos padrões em função dos seus  $R_m$  e usa-se esse gráfico para extrapolar os PM das proteínas desconhecidas.



A focagem isoelétrica é uma modificação da electroforese em que as proteínas são separadas, de acordo com a sua carga, num campo eléctrico aplicado a um gel, no qual se produziu um gradiente de pH. As proteínas migram para o local em que o pH do gel iguala o seu pI. Esta é uma das técnicas de separação de proteínas com melhor resolução.

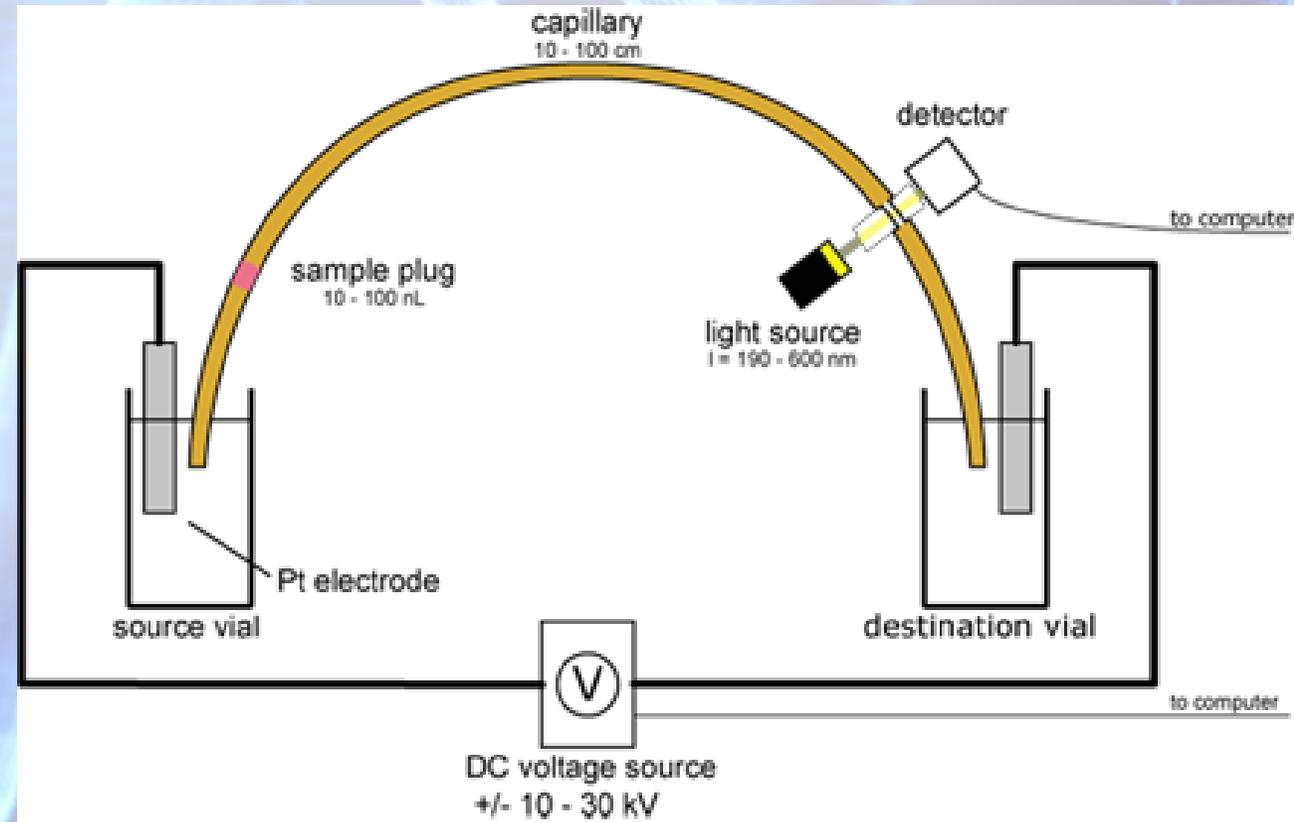
A focagem isoelétrica e o SDS-PAGE podem ser combinados na eletroforese em duas dimensões, muito útil para separar misturas muito complexas de proteínas. As proteínas são primeiro separadas por focagem isoelétrica, com base na sua carga, sendo depois separadas por SDS-PAGE, segundo os seus tamanho e forma.



# Eletroforese capilar

Tem os mesmos princípios que a eletroforese convencional, quando aplicada à separação de proteínas. A principal diferença é a utilização de um tubo capilar no lugar de um gel. O principal fator de separação é o fluxo electro osmótico gerado no interior do tubo.

O sistema é composto por um tubo capilar, dois reservatórios com tampões, uma fonte elétrica e um detetor. As proteínas, depois de separadas são analisadas por detetores de absorção eletrónica (os mais comuns), fluorescência ou condutividade elétrica, semelhantes aos utilizados em HPLC.



# Análise de aminoácidos

É usada para determinar quantitativamente a composição em aminoácidos de uma proteína. A proteína é primeiro hidrolisada para libertar os aminoácidos, os quais são depois separados por métodos cromatográficos e quantificados. As técnicas cromatográficas usadas são a permuta iónica, RP-HPLC e GC.

A hidrólise é habitualmente feita na presença de HCl 6N durante 24 h, mas como os aminoácidos não têm um comportamento homogéneo nestas condições, é necessário proceder a alguns procedimentos especiais para prevenir a ocorrência de erros na determinação.



# Técnicas de extração de LÍPIDOS

O teor lipídico total de um alimento é usualmente determinado a partir de métodos de extração com solventes orgânicos.

A polaridade dos solventes influencia a solubilidade dos lípidos e a sua quantificação.

O solvente deve ter um ponto de ebulição baixo, não deixar resíduos, não ser higroscópico e não ser inflamável nem tóxico, tanto no estado líquido como no gasoso.

e.g. éter etílico, éter de petróleo, hexano e pentano.

Há outros métodos baseados nas propriedades químicas e físicas para determinar o teor de gordura nos alimentos.



# Preparação da amostra

Para minimizar reações químicas como a oxidação, a preparação da amostra, deve ser realizada numa atmosfera inerte de azoto e baixa temperatura.

É comum também a remoção da água, a redução do tamanho de partícula e a separação dos lípidos ligados a proteínas e/ou hidratos de carbono (usual em muitos alimentos como a carne, o pão, a farinha ou os lacticínios).

Antes da extração, deve ser realizada uma hidrólise ácida (e.g. HCl), de modo a quebrar ligações covalentes e iónicas.

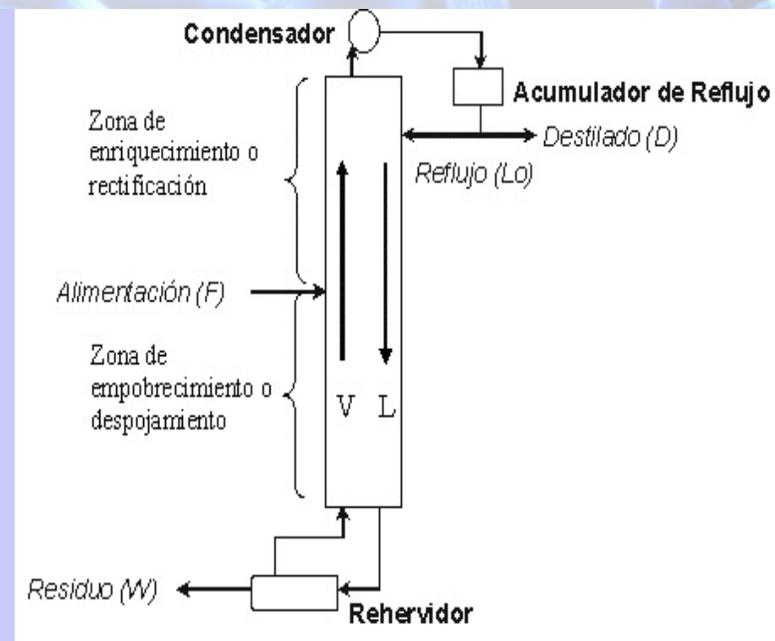


# Método de Goldfish

Processo de extração contínua por solvente. Um solvente quente flui continuamente sobre a amostra contida num recipiente de cerâmica.

O teor de gordura é obtido a partir da perda de peso da amostra ou por pesagem da gordura removida.

Um método contínuo é mais rápido e eficaz que um semi-contínuo, mas pode resultar numa extração incompleta.



Peso da gordura = (proveta + gordura) - proveta

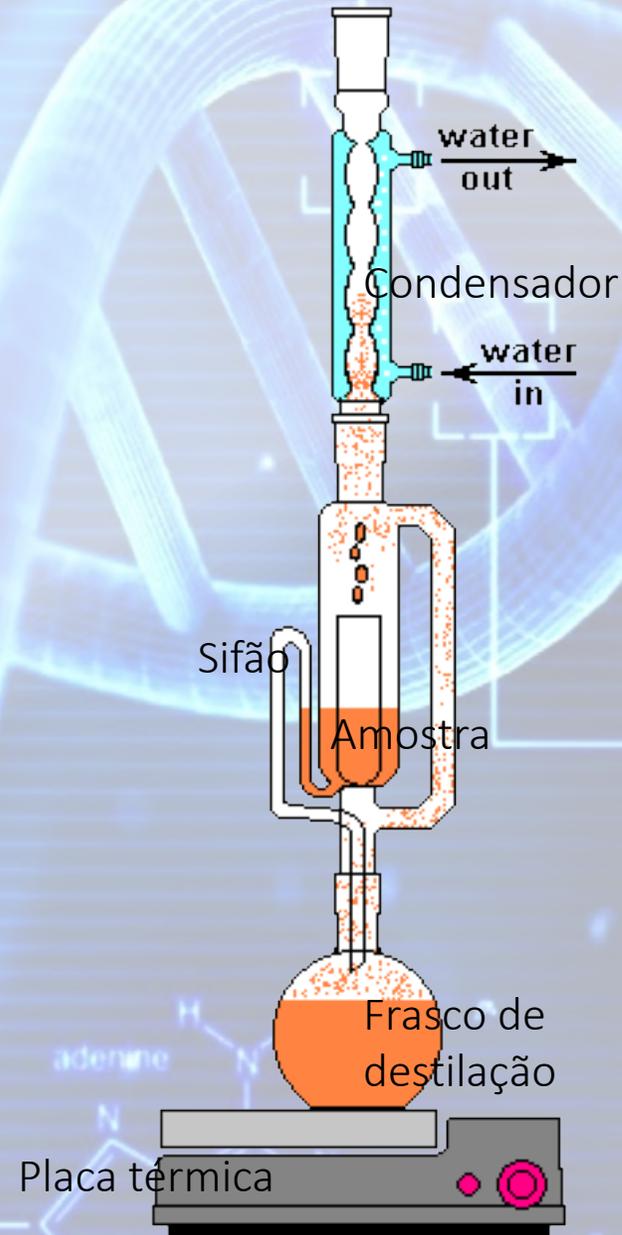
$$\% \text{Gordura} = \frac{\text{gordura na amostra/g}}{\text{amostra seca/g}} \times 100$$

# Método de Soxhlet

Processo de extração semicontínua.

O solvente acumula-se no recipiente de extração durante 5 a 10 minutos, envolvendo completamente a amostra. Depois é recirculado para o balão de aquecimento.

Mais lento que o método de Goldfish, mas permite uma extração mais completa da gordura.



# Método de Mojonnier

Processo descontínuo.

A extração é realizada com uma mistura de éter etílico e éter de petróleo num balão de Mojonnier.

A gordura extraída é seca até terem peso constante e exprime-se em percentagem por peso.

Tem a vantagem de não exigir remoção prévia de humidade da amostra.



$$\% \text{Gordura} = \frac{[(\text{peso prato} + \text{gordura}) - \text{peso prato}] - \text{peso médio do resíduo do branco}}{\text{peso amostra}} \times 100$$

# Índice de refração

É característico para cada tipo de gordura.

Os valores variam com o grau e tipo de insaturação e teor de gordura.

A gordura é extraída com um solvente (bromonaftaleno), e o índice de refração do solvente é comparado com os índices de refração da solução com a gordura extraída e da gordura.

$$\%Gordura = \frac{Vd (n_1 - n_2)}{W (n_2 - n_1)} \times 100$$

V = volume de bromonaftaleno

d = densidade da gordura

n = índice de refração da gordura

$n_1$  = índice de refração do bromonaftaleno,

$n_2$  = índice de refração da solução extraída

W = peso da amostra.

# Métodos experimentais

## Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

Rápido e exato, que permite um elevado grau de automação. Na quantificação e caracterização de lípidos em alimentos usa-se o NMR de baixa resolução, em que se obtém informação sobre a intensidade do sinal e tempo de relaxação da amostra sujeita ao campo magnético aplicado.

## Absorção de raios X

A absorção de raios X é maior em carne magra do que em carne gorda. A quantificação é feita por comparação com curva padrão obtida a partir de uma extração com solvente.

## Medição da constante dielétrica

Tem por base o princípio de que a constante dielétrica varia com o teor de óleo. Os valores medidos são comparados com os obtidos a partir de uma curva de calibração, preparada a partir de uma extração com solventes.



## Espectroscopia de infravermelho

Técnica não destrutiva, podendo ser aplicada no processamento dos alimentos.

As gorduras originam uma absorção a  $5.73 \mu\text{m}$ , cuja intensidade é proporcional à concentração de gorduras na amostra.

## Ultrassons

Os vários componentes possuem diferentes propriedades acústicas.

As medidas são efetuadas a partir de modelos empíricos ou teóricos.

## Densidade

O teor de óleo nas oleaginosas pode ser determinado a partir da medida da densidade das sementes e estabelecendo uma correlação entre esse valor e o medido para o teor de gordura através de um método de extração por solventes.



# Técnicas de caracterização dos LÍPIDOS

## Refratometria

O índice de refração, para além de permitir uma análise qualitativa, devido a possuir um valor específico para cada substância, é proporcional à saturação do ácido gordo, podendo ser usado para medir o grau de saturação.

## Ponto de fusão

Existem diversos métodos que permitem medir o ponto de fusão de uma gordura, para determinação da sua composição, sendo todos eles relativamente pouco rigorosos.



## Índice de saponificação

Mede a quantidade de base necessária para saponificar uma determinada quantidade de óleo ou gordura.

A gordura é tratada com uma base degradando-a em glicerol e ácidos gordos.

O índice de saponificação é expresso como a quantidade de KOH necessária para saponificar 1 g de amostra.

Este índice é uma medida do peso molecular médio dos triacilgliceróis presentes na amostra.

Se este valor médio for dividido por 3, dá um peso molecular médio aproximado para os ácidos gordos presentes.

Quanto menor o índice de saponificação, maior a cadeia dos ácidos gordos.

## Índice de acidez

As medidas de acidez das gorduras geralmente refletem a quantidade de ácidos gordos hidrolisados dos triacilgliceróis. A percentagem em peso de um dado ácido gordo designa-se ácido gordo livre (FFA – *free fatty acid*) e o índice de acidez define-se como a quantidade de KOH necessária para neutralizar os ácidos livres presentes em 1 g de óleo ou gordura.

# Índice de iodo

Medida do grau de insaturação.

Quantidade (em peso) de iodo absorvida por 100 g de amostra.

Quanto maior a insaturação, mais iodo é absorvido, ou seja quanto maior o índice de iodo, maior o grau de insaturação.

1. Uma amostra de gordura/óleo é dissolvida num solvente.
2. Adição de uma quantidade conhecida de iodo ou outro halogéneo, ocorrendo uma adição às ligações duplas.



3. Adição uma solução de iodeto de potássio para reduzir o excesso de ICl e produzir iodo livre.



4. Titulação do iodo livre uma solução padrão de tiosulfato de sódio, usando amido como indicador, o qual muda de azul para incolor.



## Percentagem de gorduras sólidas

Determinada por NMR. A proporção de gorduras sólidas em alimentos (margarinas, cremes para barrar, ...) tem importância no que se relaciona com as suas propriedades funcionais, tais como a textura.

## Rancidez

As gorduras podem sofrer processos de degradação, originando a produção de sabores e aromas indesejados, globalmente designados por ranço. A rancidez das gorduras pode provir da lipólise (rancidez hidrolítica) ou da oxidação lipídica (rancidez oxidativa).

## Lipólise

Hidrólise dos triacilgliceróis. Quando os ácidos gordos que os compõem possuem cadeias curtas, a lipólise resulta na formação de compostos voláteis, frequentemente caracterizados por aromas desagradáveis.

## A oxidação lipídica (ou autooxidação)

Ocorre através de um mecanismo com radicais livres, o qual origina a produção de hidroperóxidos, que por sua vez sofrem degradação com produção de diversos produtos, incluindo aldeídos, cetonas, ácidos orgânicos e hidrocarbonetos.



Índice de peróxidos

Índice de p-anisidina

Índice tototox

Compostos orgânicos voláteis (VOCs)

Ensaio do ácido tiobarbitúrico (TBA)

Perfil em ácidos gordos

Para quantificar **colesterol** num alimento, é necessário saponificar os lípidos extraídos da amostra. O colesterol, que fica na fração não saponificada, é extraído e derivatizado para formar éteres trimetilsililados, que serão analisados por GC.



# Técnicas extração dos HIDRATOS DE CARBONO

Para analisar os hidratos de carbono na maioria dos alimentos, efetua-se um primeiro passo de secagem (pode servir para determinar o teor de humidade).

Após secagem, a amostra é finamente triturada e faz-se a extração dos lípidos por Soxhlet.

A extração da fração lipídica facilita a mais completa extração de hidratos de carbono.

Os produtos alimentares contêm frequentemente substâncias que interferem com as medidas de mono e oligossacáridos presentes. Por essa razão, a amostra, depois de seca e sujeita à extração da fração lipídica, é extraída a quente com 80% de etanol, na presença de carbonato de cálcio para neutralizar alguma acidez.

Os hidratos de carbono são solúveis em solventes polares, mas outros componentes dos alimentos (polissacáridos, proteínas, ...) são insolúveis em etanol quente a 80%.

O extrato ainda conterà outras substâncias, para além dos hidratos de carbono. Como estes são neutros e aquelas possuem carga, os contaminantes podem ser removidos por técnicas de permuta iónica.

A solução etanólica contendo o extrato é sujeita a secagem e o resíduo resultante é dissolvido num volume conhecido de água, para posterior análise.

## Determinação do teor total de hidratos de carbono (condensação com o fenol)

Tira partido da reação característica dos hidratos de carbono com ácidos fortes.

A condensação com o fenol em meio de ácido sulfúrico (método do fenol/ácido sulfúrico) é um método é simples, rápido, sensível, rigoroso e específico para hidratos de carbono. Prepara-se uma solução com os hidratos de carbono a determinar e um branco com água. Adiciona-se uma solução aquosa de fenol, mistura-se e adiciona-se ácido sulfúrico. A solução fica com uma cor amarelo--alaranjada e a sua absorvância é medida a 490 nm.

## HPLC

Método mais eficaz para a análise de oligo e monossacáridos, podendo também ser usado para análise de polissacáridos, após hidrólise destes.

## Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa permite a análise quantitativa e qualitativa de hidratos de carbono, com a limitação de que estes têm que sofrer uma derivatização (em dois passos) para serem convertidos em compostos voláteis.

A deteção é habitualmente efetuada por detetores de ionização de chama (FID).

## Métodos enzimáticos

Método mais eficaz para a análise de oligo e monossacáridos, podendo também ser usado para análise de polissacáridos, após hidrólise destes.

### Exemplo

Para determinar o amido total, uma amostra é finamente triturada, colocada num tubo de ensaio e é-lhe adicionado etanol a 80%. Adiciona-se DMSO e agita-se vigorosamente. Aquece-se em água a ferver, retira-se do banho e adiciona-se uma solução de  $\alpha$ -amilase. Agita-se bem e volta a colocar-

-se no banho de água. Ao fim de 5 minutos, o tubo é levado a 50 °C, adiciona-se tampão de acetato de sódio (pH 4.5) e amiloglucosidase. Agita-se e incuba-se a 50 °C. De seguida, o conteúdo do tubo é transferido para um balão volumétrico, ajustando-se o volume com água destilada. Após agitação vigorosa, retiram-se alíquotas, adiciona-se uma mistura de glucose oxidase/peroxidase (reagente GOPOD) e incuba-se a 50 °C. Finalmente, mede-se a absorvância da amostra contra um branco do reagente GOPOD.

