

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO

Objetivos:

Fornecer métodos operacionais para a determinação de proteínas
Determinar o teor de proteínas numa amostra de clara de ovo

Materiais:

- a) Espectrofotômetro;
- b) Soluções-padrão de proteína conhecida (BSA - soro albumina bovina)
- c) Balão de 50 ml e 100 ml;
- d) Pipetas de 5 ml (4);
- e) Pipetas de 2 ml (2);
- f) Proveta de 25 ml;
- g) Tubos de ensaio (10);
- h) Grade para tubos.

Reagentes:

Solução padrão de BSA (50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/m, 200 µg/m, 300 µg/m);
Reagente de Bradford (1976) – fornecido pronto para uso. Abaixo está a receita do preparo do reagente:

1.1.1. Preparo do Reagente de Bradford

O reagente foi preparado pela dissolução completa de 100 mg de Azul de Coomassie G-250 (Biochemical) em 50 mL de metanol 95 %. A seguir, foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85 %. O frasco foi fechado e mantido em repouso no escuro, por 24 h. O volume da solução foi ajustado para 1 L com água deionizada e deixado em repouso por mais 24 h, no escuro. Então, a solução foi filtrada por 2 vezes, até obter uma coloração de chá, e armazenada em geladeira, em vidro âmbar envolto em papel alumínio.

Para a padronização do reagente, foi construída a curva padrão com solução de albumina de soro bovina (Merck), nas concentrações de 50; 100; 150; 200 e 300 µg/mL.

Procedimento:

- a) Ligue o espectrofotômetro segundo as instruções constantes do aparelho.
- b) Ajuste o aparelho para o comprimento de onda de 595 nm
Ajuste o aparelho para A=0 (zero). Prepare as soluções de albumina e adicione o reagente de Bradford em tubos de ensaio conforme descrito na tabela 1. Deixar em repouso por 5 minutos. Fazer a leitura a 595 nm, usando o tubo 1 (branco) para zerar o aparelho.
- c) Determine os valores das absorbâncias das soluções-padrão de BSA.

Tabela 1: Comprimentos de onda (λ) recomendados: 595 nm

Tubo	BSA (mg/l)	Água	BSA - Proteína padrão (ml)	Reagente de Bradford	Leitura de Abs 595 nm
1	-	0,5 ml		5 ml	
2	50	-	0,5 ml	5 ml	
3	100	-	0,5 ml	5 ml	
4	200	-	0,5 ml	5 ml	
5	400	-	0,5 ml	5 ml	

- d) Em seguida use a amostra de clara de ovo que foi fornecida. Essa será a amostra 1.
- e) Dilua 0,5 ml da amostra 1 para um volume final de 50 ml, em balão volumétrico. Essa será a amostra 2.
- f) Adicionar o reagente de Bradford conforme tabela 2. Deixar em repouso por 5 minutos
- g) Fazer a leitura a 595 nm, usando o tubo 1 (branco) para zerar o aparelho. Determine a absorbância das amostras usando a curva padrão.
- h) Se necessário diluir a albumina de ovo no balão de 100 ml, colocando 1 ml amostra 1. Depois de agitar retire 25 ml em uma proveta e dilua para um volume de 50 ml no balão (amostra 3).

Tabela 2: Dosagem das amostras:

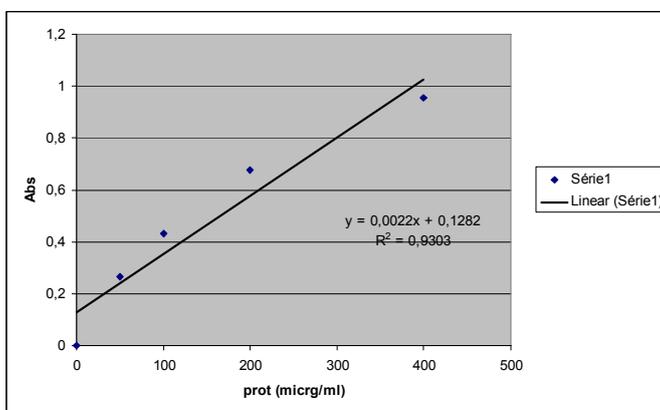
Tubo	Água	Proteína padrão	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Reagente de Bradford
1	0,5 ml					5 ml
2			0,5 ml			5 ml
3				0,5 ml		5 ml
4					0,5 ml	

Resultados e discussão

- A) Anote no quadro a seguir os valores das absorbâncias de seus padrões:

Padrões/amostra	Concentração	Abs
Água	0	
1	50	
2	100	
3	150	
4	200	
5	300	
Amostra1		
Amostra2		

- B) Construa um gráfico relacionando a concentração molar das soluções padrão com os respectivos valores de absorbância e determine a equação de regressão da reta obtida, conforme o exemplo abaixo:



- C) Calcule por meio do gráfico e da equação a concentração da amostra desconhecida.
D) Por que se deve usar um definido comprimento de onda e não apenas luz branca numa análise deste tipo?

Método de determinação de proteínas no ultravioleta.

Determine as relações das absorbâncias a 280 e 260 nm (A_{280}/A_{260}) para a solução diluída de BSA 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e para as amostras 1 e 2.

Concentração de proteínas (mg/ml) – $F \times 1/d \times A_{280}$

D= espessura da cubeta

F = A_{280}/A_{260}

Construa um quadro comparativo dos teores de proteína obtido pelos diferentes métodos, tentando racionalizar os resultados.