

## DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PROTEÍNAS DA CLARA DO OVO

A detecção e quantificação de uma proteína através de espectrofotometria se baseia nas propriedades de absorção de luz: 1) da ligação peptídica ; 2) de grupos presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos que a constituem ; 3) de produtos coloridos resultantes de reações entre a proteína e compostos químicos específicos

Método	"princípio"	interferentes	observação
Biureto	Complexo entre $\text{Cu}^{2+}$ e ligação peptídica absorve em 540nm	Sulfato de amônio, lipídeos, amido, lactose, aminoácidos livres (His, Ser, Thr)	Baixa sensibilidade (mg)
Bradford	Complexo entre o corante Comassie Blue G-250 e cadeias laterais de Lys, Arg, Tyr, e Trp absorve em 595 nm	Uréia (> 45g/L), detergentes (Triton X-100 e SDS) e lipídeos	"Boa" sensibilidade ( $\mu\text{g}$ ) Rápida execução (min)
Absorbância UV	Cadeias laterais de Trp, Phe e Tyr absorvem em 280nm	Aminoácidos livres (Trp, Phe e Tyr)	"Boa" sensibilidade ( $\mu\text{g}$ ) Rápida execução (min) É preciso conhecer a composição de aminoácidos da proteína para calcular $\epsilon$ (coeficiente de extinção molar) Ideal para proteínas purificadas

Referência: Zaia *et al.*, 1998. Química Nova 21(6), 787 - 793

### Objetivos:

Determinar o teor de proteínas numa amostra de clara de ovo

### Materiais:

- Espectrofotômetro;
- Soluções-padrão de proteína conhecida (BSA - soro albumina bovina)
- Balão de 10 ml;
- Pipetas de 5 ml , 2 ml e 1 ml;
- Proveta de 25 ml;
- Tubos de ensaio (10);
- Grade para tubos.

### Reagentes:

Solução padrão de BSA (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ );

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.

### Procedimento:

- Ligue o espectrofotômetro segundo as instruções constantes do aparelho.
- 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.

**Tabela 1: curva padrão de proteína**

Tubo	BSA (mg/l)	Água	BSA - Proteína padrão (ml)	Reagente de Bradford	Leitura de Abs 595 nm	Massa de proteína (mg)
1 (branco)	-	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	300	-	0,5 ml	5 ml		

- Em seguida use a amostra de clara de ovo que foi fornecida. Essa será a amostra 1. Essa amostra foi previamente diluída em 100 vezes.
- Dilua 5 ml da amostra 1 para um volume final de 10 ml, em balão volumétrico. Essa será a amostra 2.
- Colocar 1 ml da amostra 1 em um balão volumétrico de 5 ml e agitar (essa será a amostra 3).
- Colocar 1 ml da amostra 1 em um balão volumétrico de 10 ml e agitar (essa será a amostra 4).
- Retirar 0,5 ml de cada uma das amostras e adicionar 5 ml do reagente de Bradford, Deixar em repouso por 5 minutos e Fazer a leitura a 595 nm, usando o tubo 1 (branco) para zerar o aparelho. Determine a absorbância das amostras usando a curva padrão.

### Resultados e discussão

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

**Tabela 2: Dosagem de proteína nas amostras:**

amostra	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Reagente de Bradford	A595 nm	Concentração (mg/ml)
1	0,5 ml				5 ml		
2		0,5 ml			5 ml		
3			0,5 ml		5 ml		
4				0,5 ml	5 ml		

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