

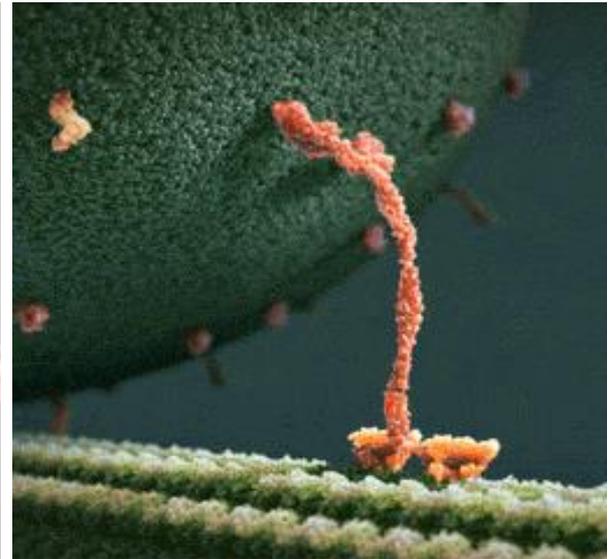
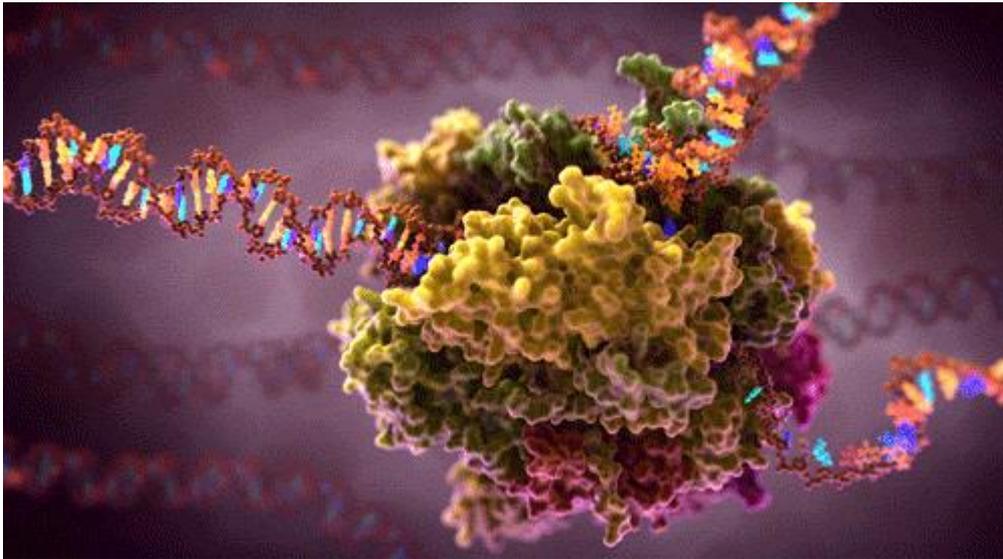
BASES TEÓRICAS DA DOSAGEM DE BIOMOLÉCULAS



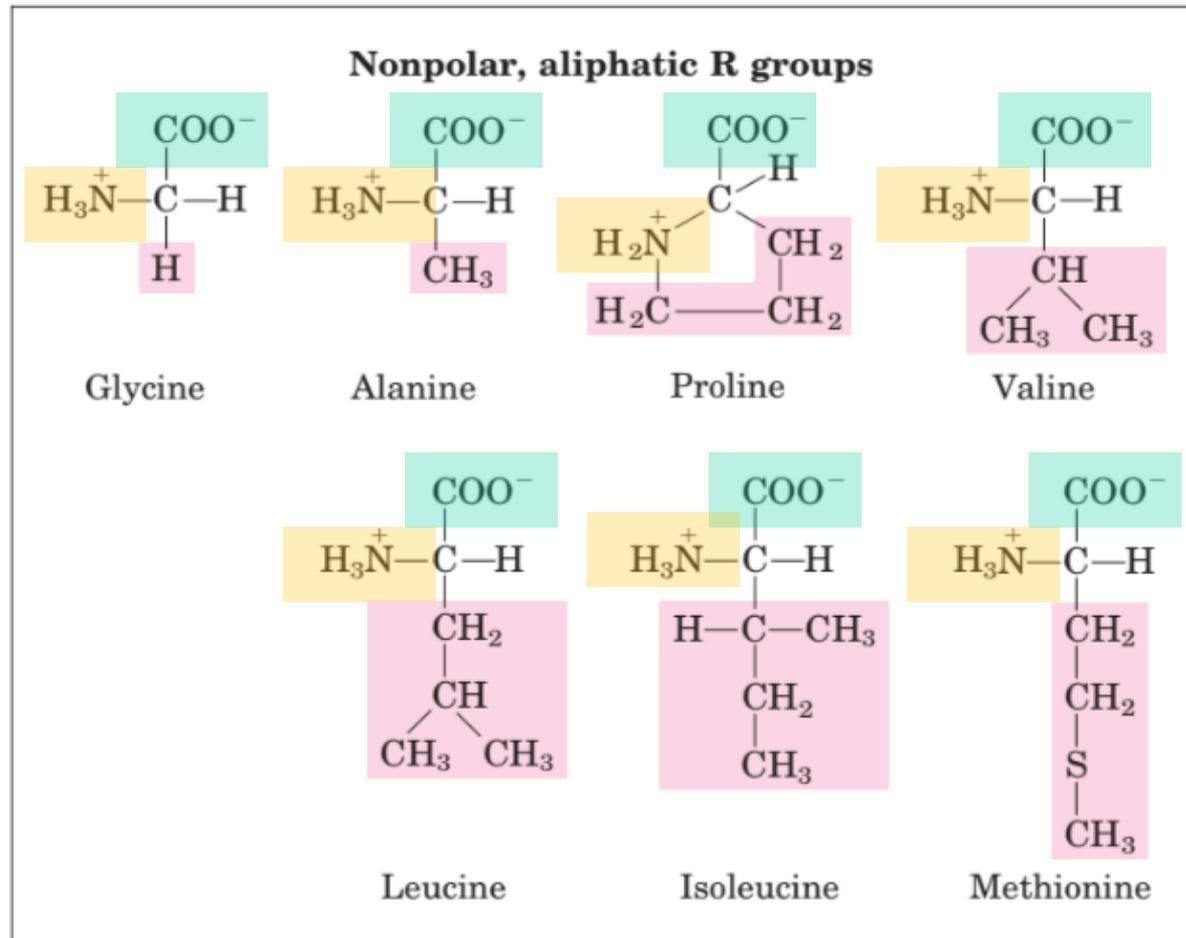
Qual é o frasco que contém a solução mais concentrada?
Como medir ?

PROTEÍNAS

São as biomoléculas com a maior diversidade de estrutura e função, e são o componente mais abundante das células.

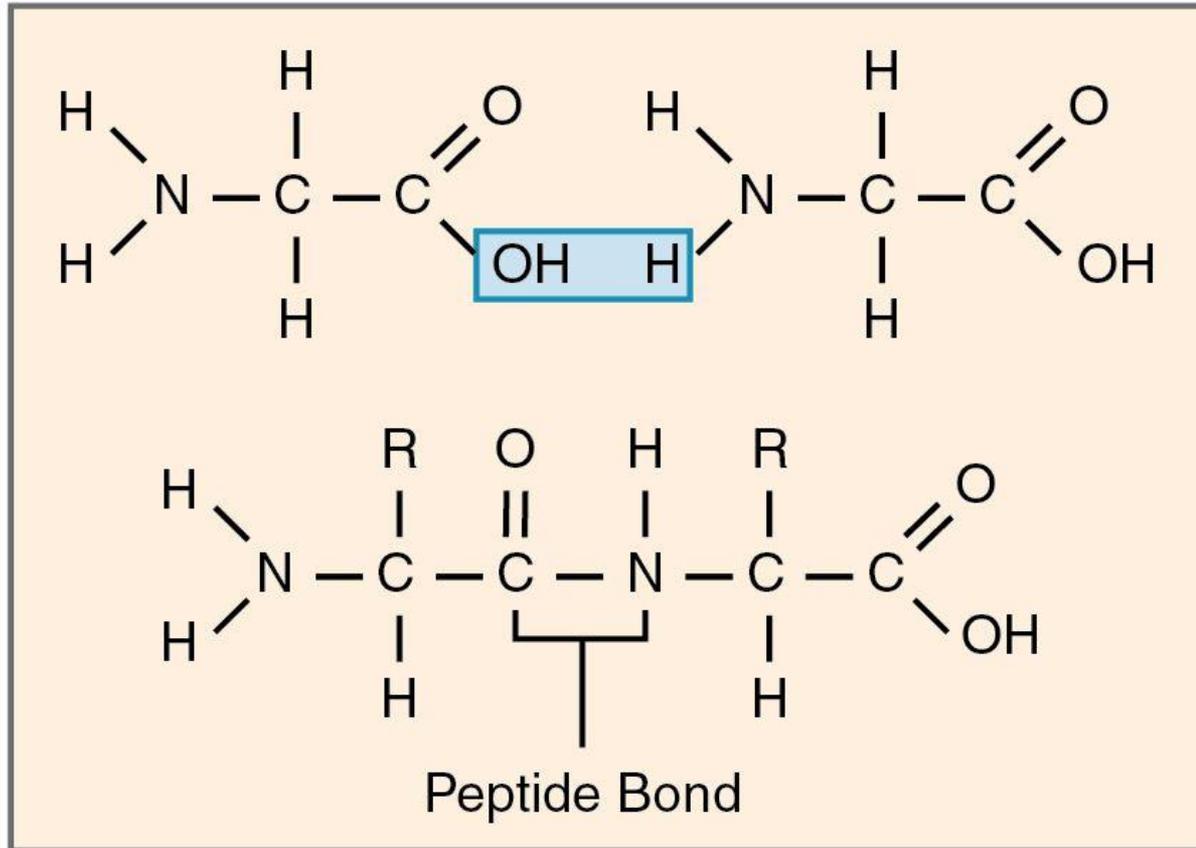


AMINOÁCIDOS



DETECÇÃO E DOSAGEM DE PROTEÍNAS

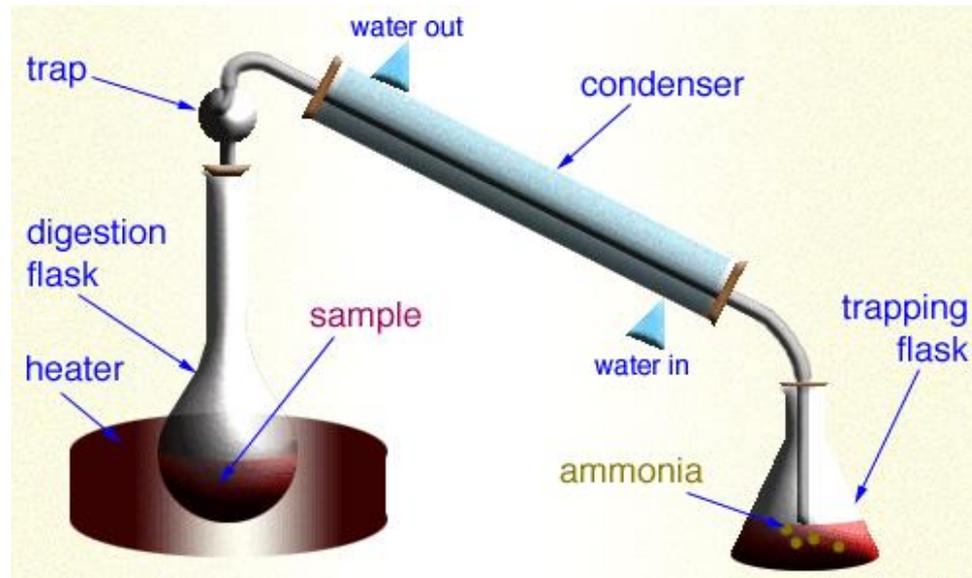
Proteínas: heteropolímeros de aminoácidos unidos por ligações peptídicas.



1. Método Kjeldahl



Desvantagens: quantidade, erro, quantifica indiretamente a quantidade de proteína, de acordo com a quantidade de Nitrogênio na amostra.



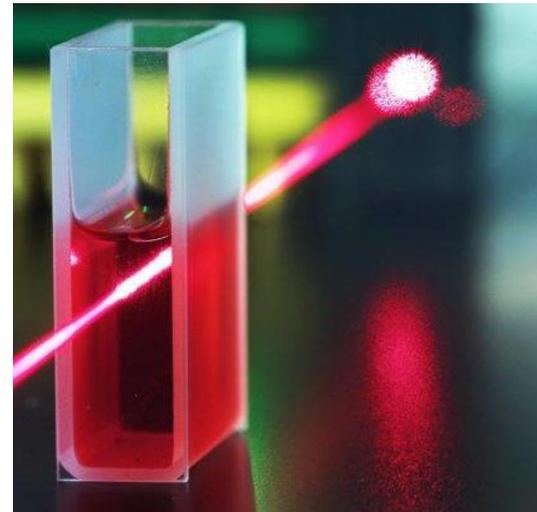
LEI LAMBERT BEER

Absorbância

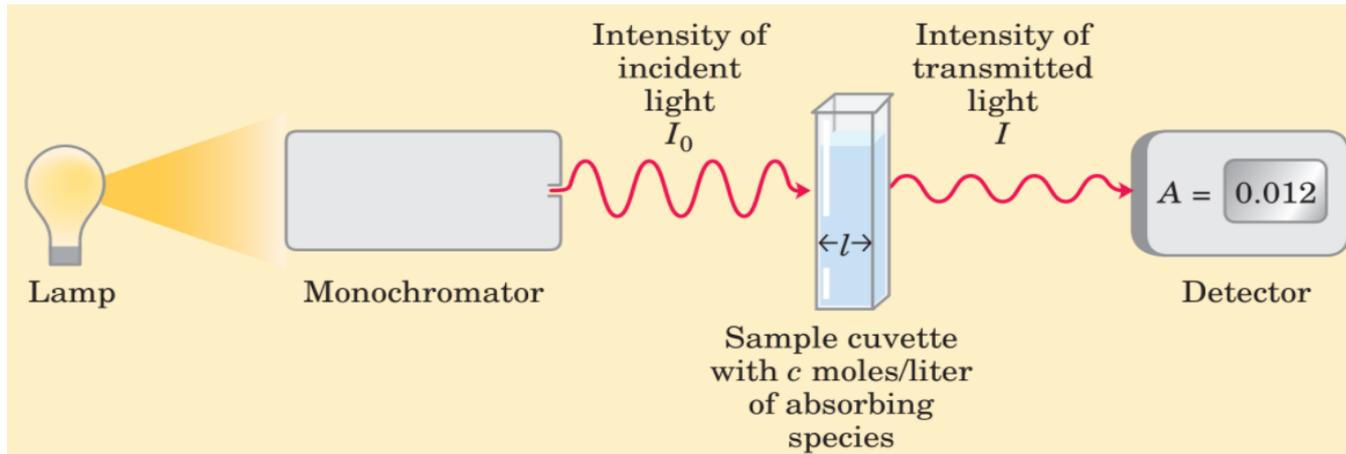
$$A = \epsilon \cdot C \cdot L$$

cm⁻¹

Coeficiente de absorvidade molar
M⁻¹ cm⁻¹



O ESPECTROFOTOMETRO



Tipos de dosagem de proteínas através de espectrofotometria

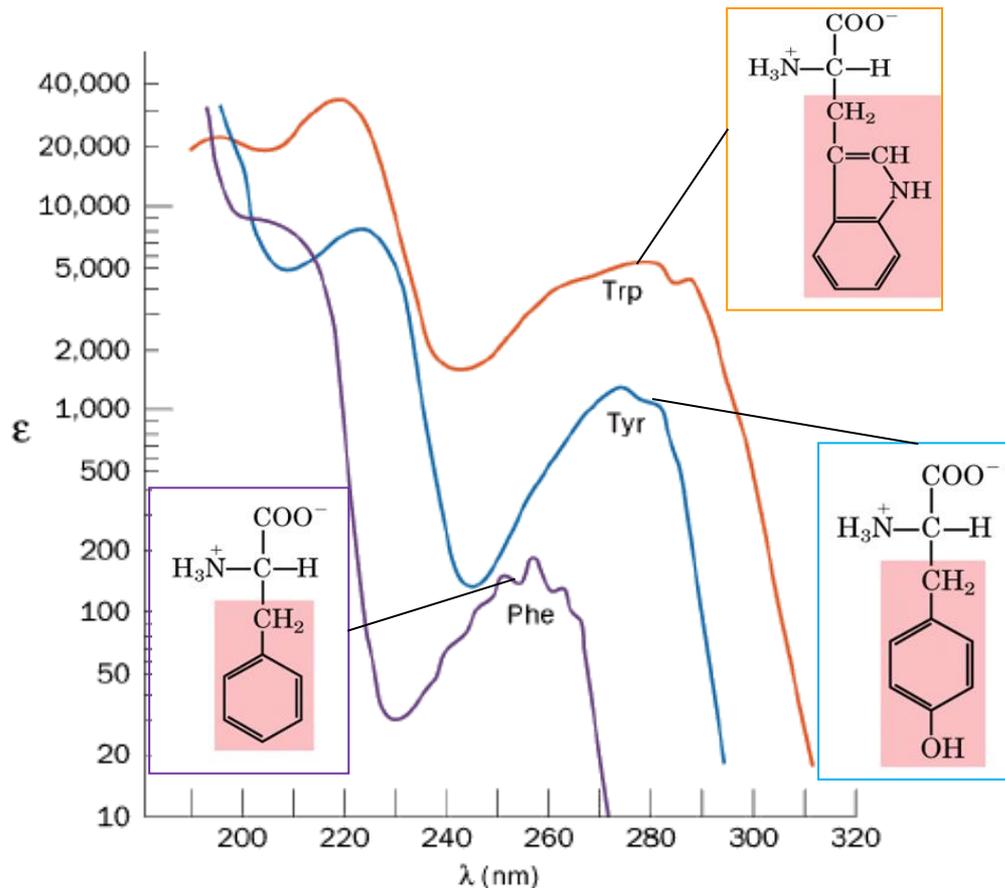
**da ligação
peptídica (210-
220 nm)**

**de grupos
presentes nas
cadeias
laterais dos
aminoácidos
que a
constituem
(aromáticos, p.
ex., a ~ 280
nm)**

**de produtos
coloridos
resultantes
de reações
entre a
proteína e
compostos
químicos
específicos
(400-700 nm)**

2. Absorção de luz UV

Cadeias laterais contendo aromáticos absorvem luz em λ 280nm. A absorbância de uma proteína dependerá do seu conteúdo de Tyr, Phe e Trp, sem modificar quimicamente a amostra.



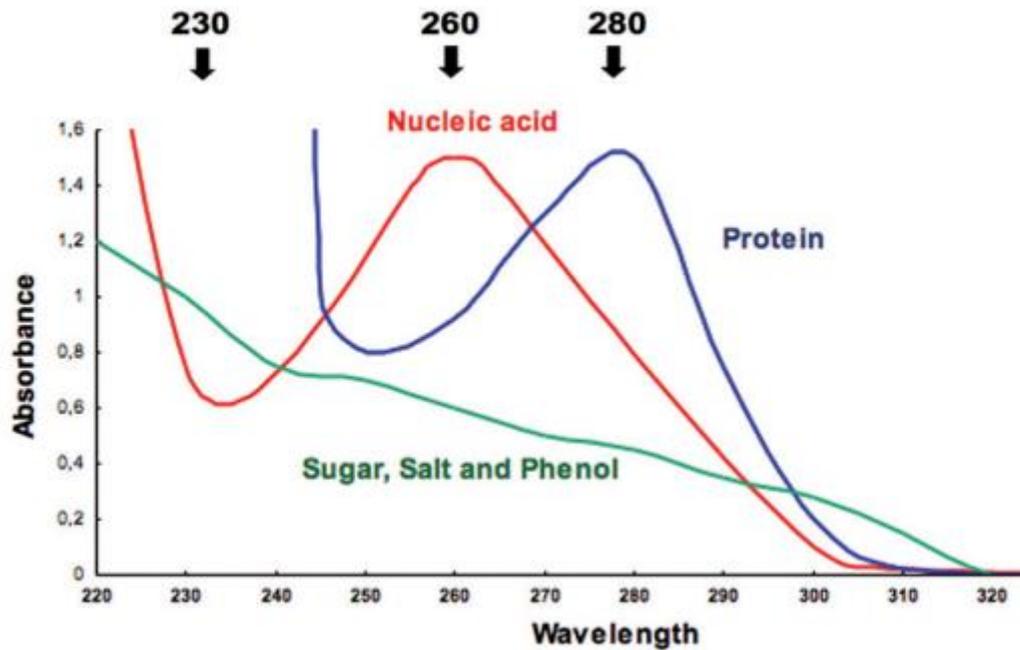
Desvantagem:

Para a quantificação de uma proteína sem o uso de referências é necessário conhecer a sua sequência de aminoácidos (calcular o ϵ).

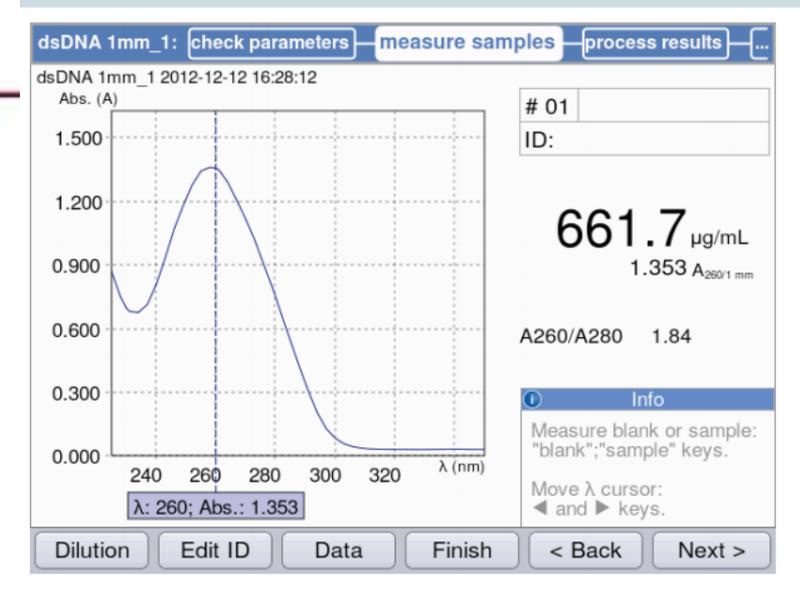
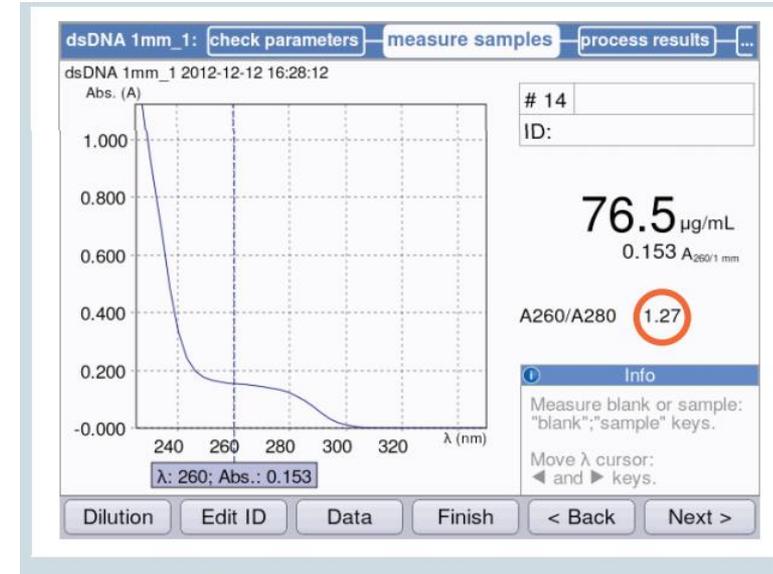
Compostos que absorvem em λ 280 nm interferem.

A diferença de conteúdo de aminoácidos aromáticos entre o padrão e a amostra pode introduzir erros na quantificação.

2. Absorção de luz UV

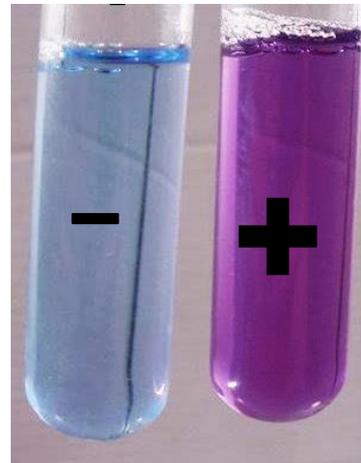
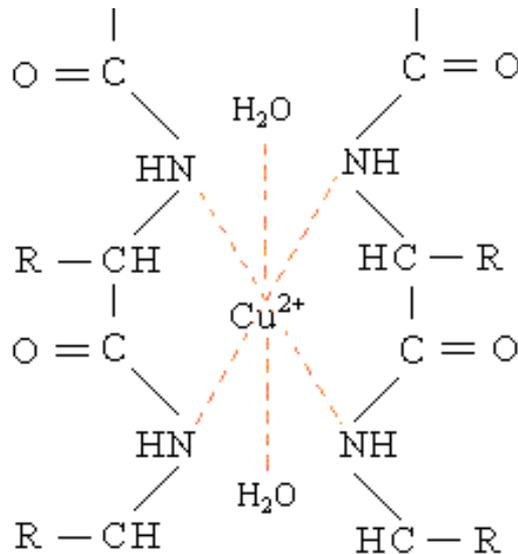


$$A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,0$$



3. Reação de Biureto

Baseia-se em uma reação entre CuSO_4 e os grupos amino da proteína em meio alcalino. É um método específico para proteínas. O produto desta reação (um cátion Cu^{2+} coordenado com 4 grupos amino) absorve em λ 540nm.

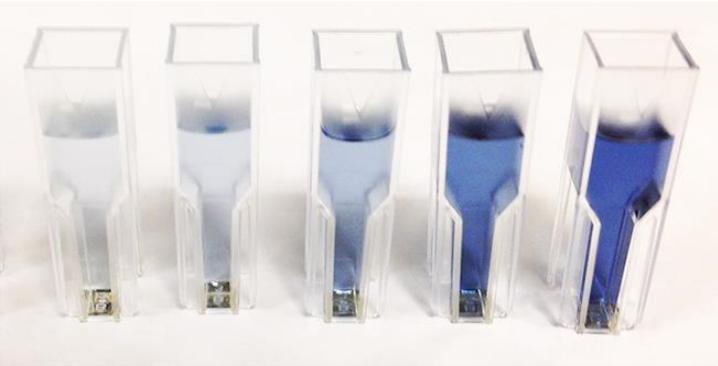


Desvantagens: a) baixa sensibilidade (> 1 mg prot.)
b) somente para proteínas simples

4. Reagente de Folin-Ciocalteu – Método de Lowry

Após a reação do Biureto, o complexo formado e as Cys, Tyr e Trp, sofrem uma reação de oxido-redução com o Reagente de Folin (mistura de ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico).
Sensibilidade 0.01 – 1 mg / mL.

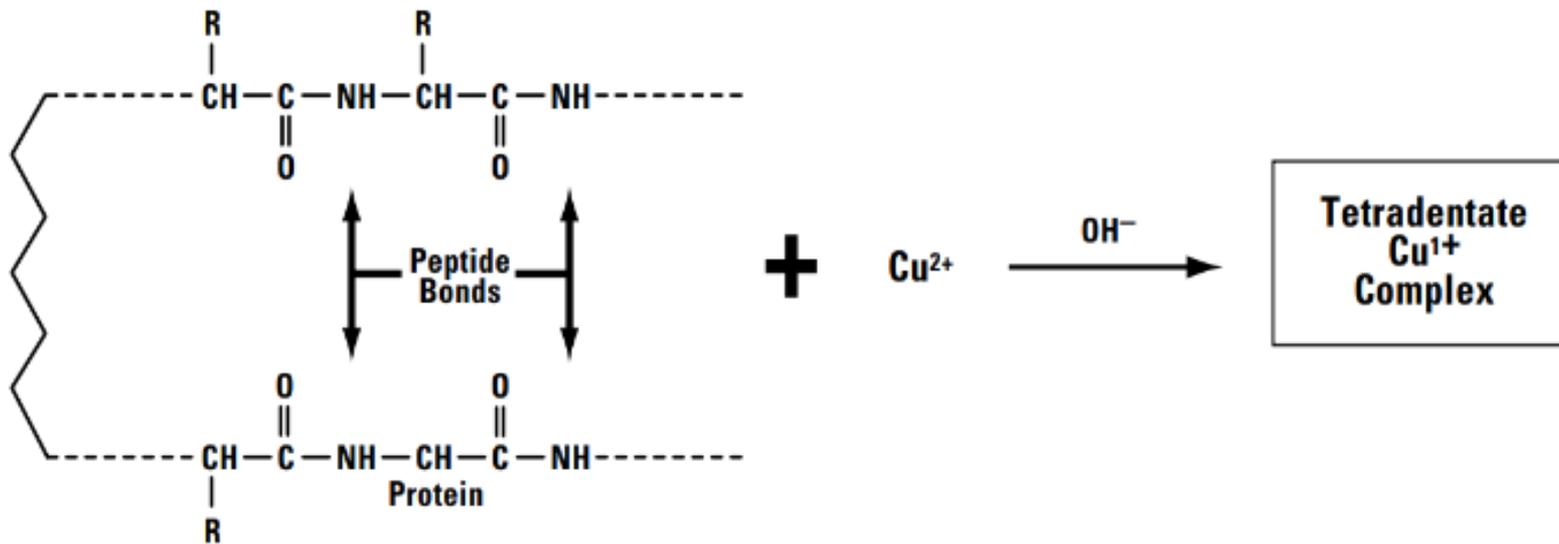
A presença do complexo tetradente reduz uma (reagente de Folin) formando tungstato e **molibdato**, os quais absorvem em λ 720 – 750nm.



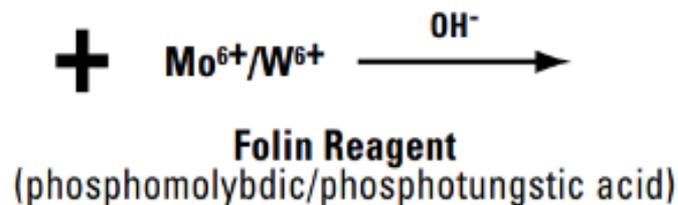
Desvantagem:

- 1) a quantidade de produto colorido formado é fortemente dependente da quantidade de Asn, Trp e His presentes na proteína.
- 2) apresenta um grande número de interferentes (fenóis, p.ex.)

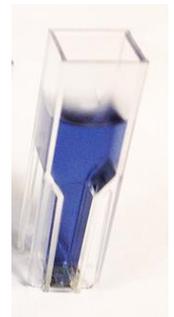
4. Reagente de Folin-Ciocalteu – Método de Lowry



Tetradentate Cu^{1+} Complex



$A_{\text{max}} = 750\text{nm}$



5. Método de BCA (bicinchonic acid)

Começa com a formação do complexo entre o cátion Cu^{+2} e a proteína,

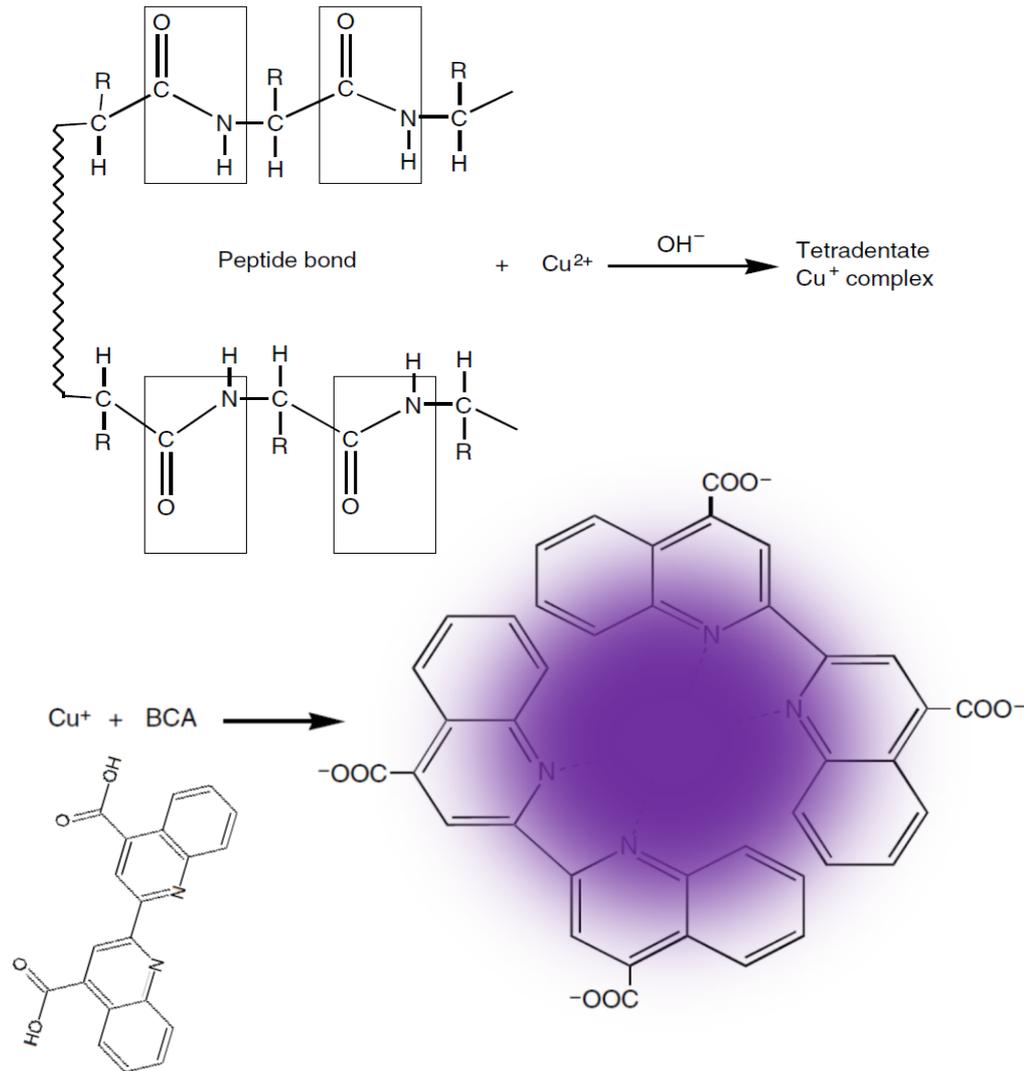
Esse complexo cuproso reage com o BCA (2 moléculas por íon cuproso) o qual pela sua vez forma uma **cor violeta** que pode ser medida a λ 562 nm

sensibilidade 0.5 $\mu\text{g/mL}$.

Desvantagens:

alguns compostos como fructose e lactose podem interferir na leitura.

A coloração não se mantém estável por muito tempo.



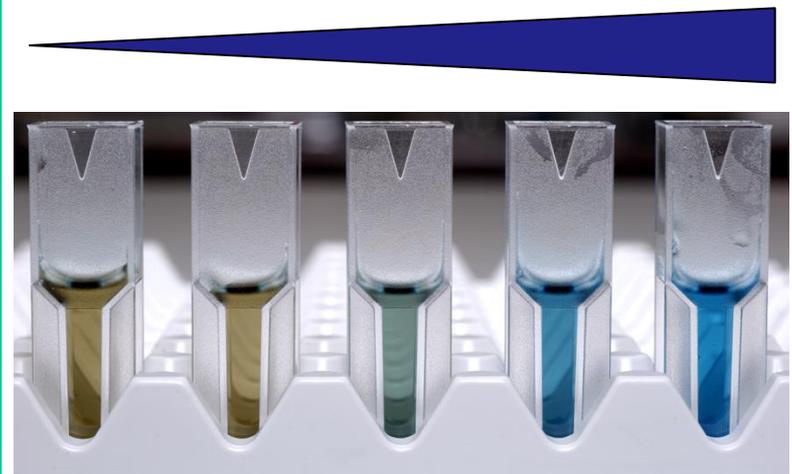
6. Reagente de Bradford (Comassie Brilliant Blue G-250)

Este corante forma complexos com proteínas por meio de interações iônicas com aminoácidos básicos e interações de van der Waals. A formação do complexo proteína-CBBG altera o espectro de absorção do corante, mudando o seu máximo de absorção de λ 465 nm para 595 nm. $< 5 \mu\text{g/mL}$.

Desvantagens:

a) o corante não liga igualmente em todas as proteínas.

b) lipídeos, fenóis, polissacarídeos e glicerol interferem neste método.

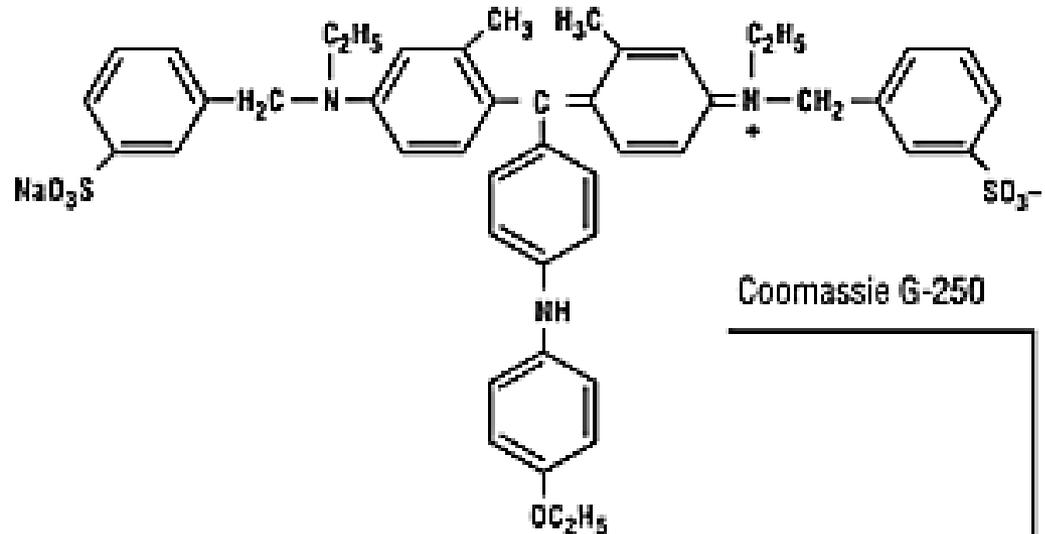


6. Reagente de Bradford (Comassie Brilliant Blue G-250)

PROTEIN

Basic and Aromatic
Side Chains

+



Coomassie G-250

465 nm



A_{max} = 595 nm

Protein-Dye Complex

E SE A PROTEÍNA TAMBÉM FOR ENZIMA?

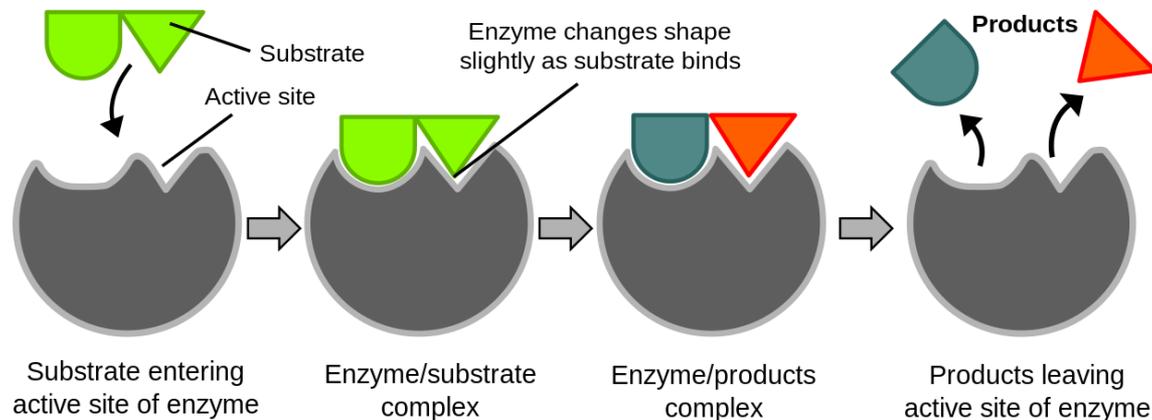
Enzimas são catalisadores biológicos.

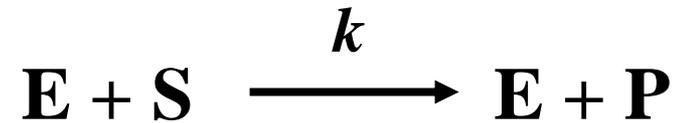
Apresentam especificidade em relação aos produtos e reagentes



A presença de uma enzima específica pode ser detectada através da ocorrência da reação

(formação do produto a partir de substrato específico)



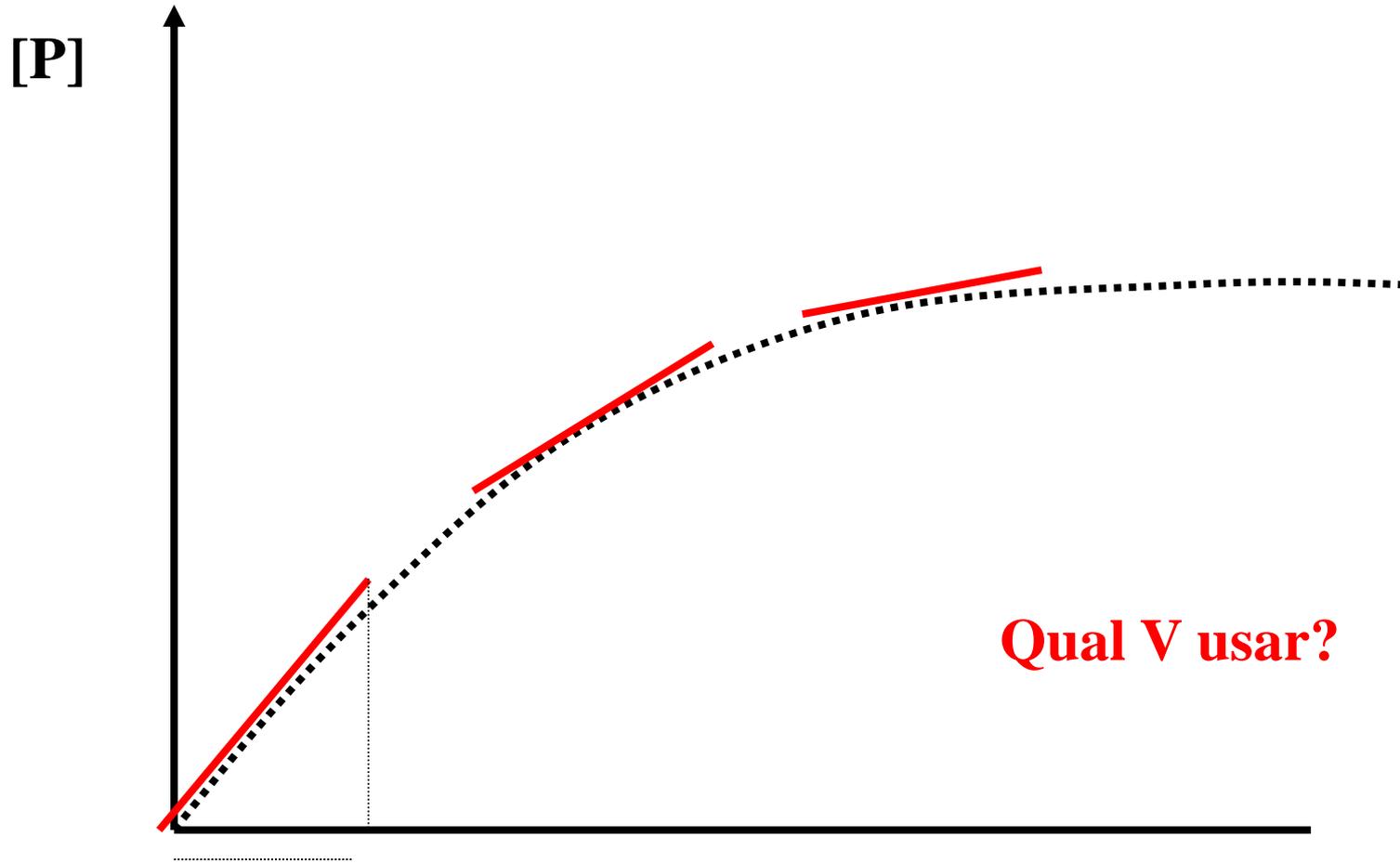


Como quantificar a enzima?

$$v = k [E] [S]$$

Assim, se [S] ~ constante, a velocidade é diretamente proporcional a concentração de enzima

$$V = \Delta[P]/\Delta t$$

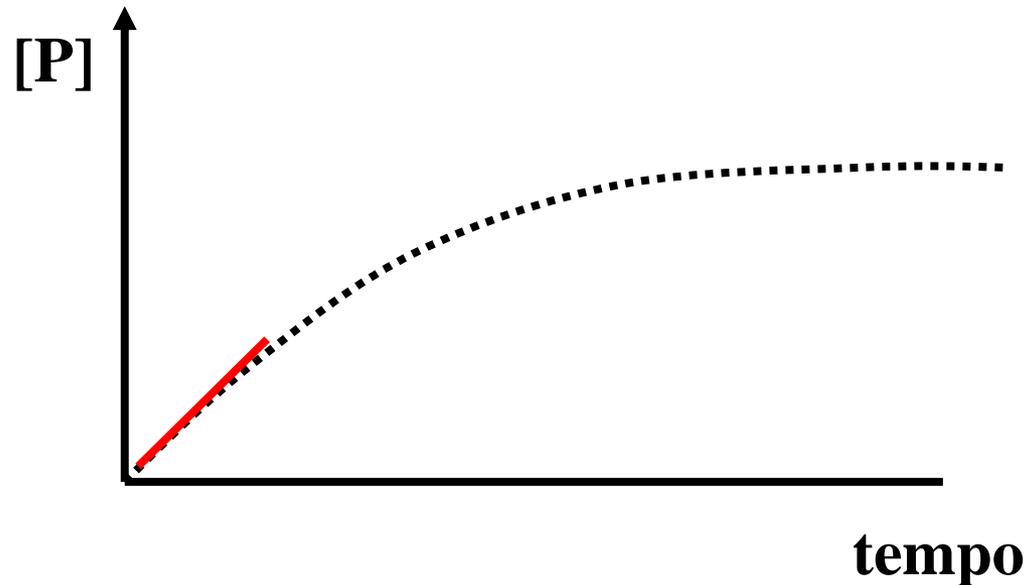


inclinação = $\Delta y/\Delta x$

tempo

$$v = k [E] [S]$$

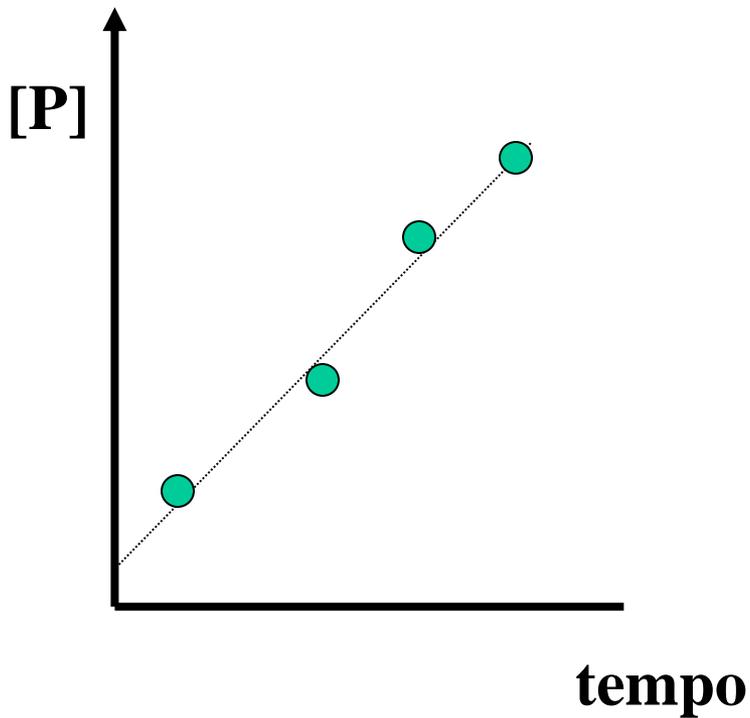
Assim, se [S] ~ constante (igual à inicial; muito S e pouca E saturada), a **velocidade é diretamente proporcional a concentração de enzima**



Se menos de 5% de S for consumido, podemos assumir $v \sim \text{constante}$ (v_0)

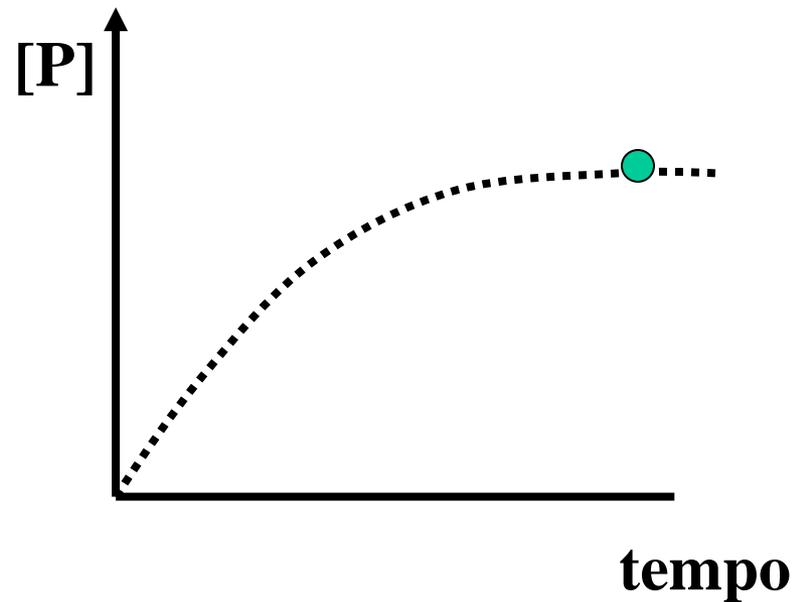
Medida de velocidade inicial

Construir uma curva de $[P]$ x tempo e verificar se é linear.



vários tempos

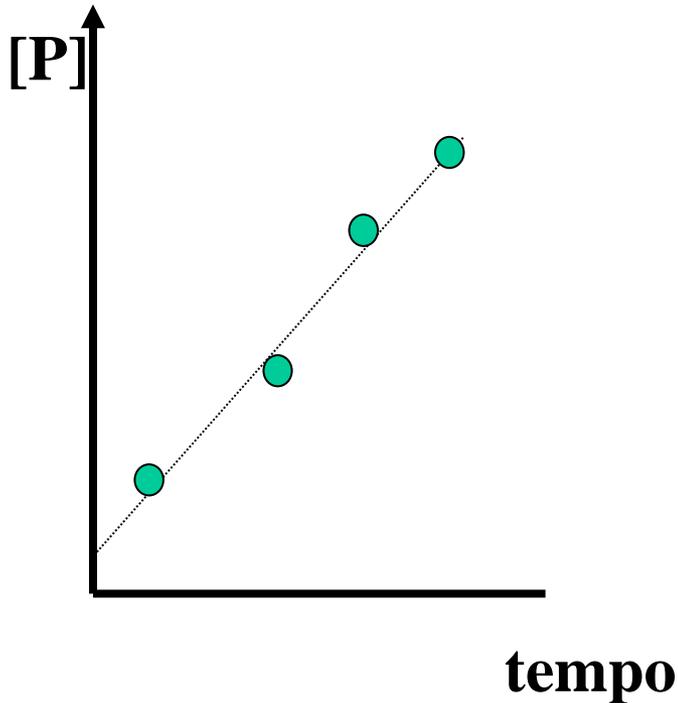
x



1 único tempo

$$y = mx + b$$

$m = \textit{inclinação} = \textit{velocidade média}$



$$y = mx + b$$

$m = \textit{inclinação} = \textit{produto}$
 $\textit{produzido/tempo} = \textit{Velocidade}$
 $\textit{inicial} = \textbf{Unidade enzimática.}$

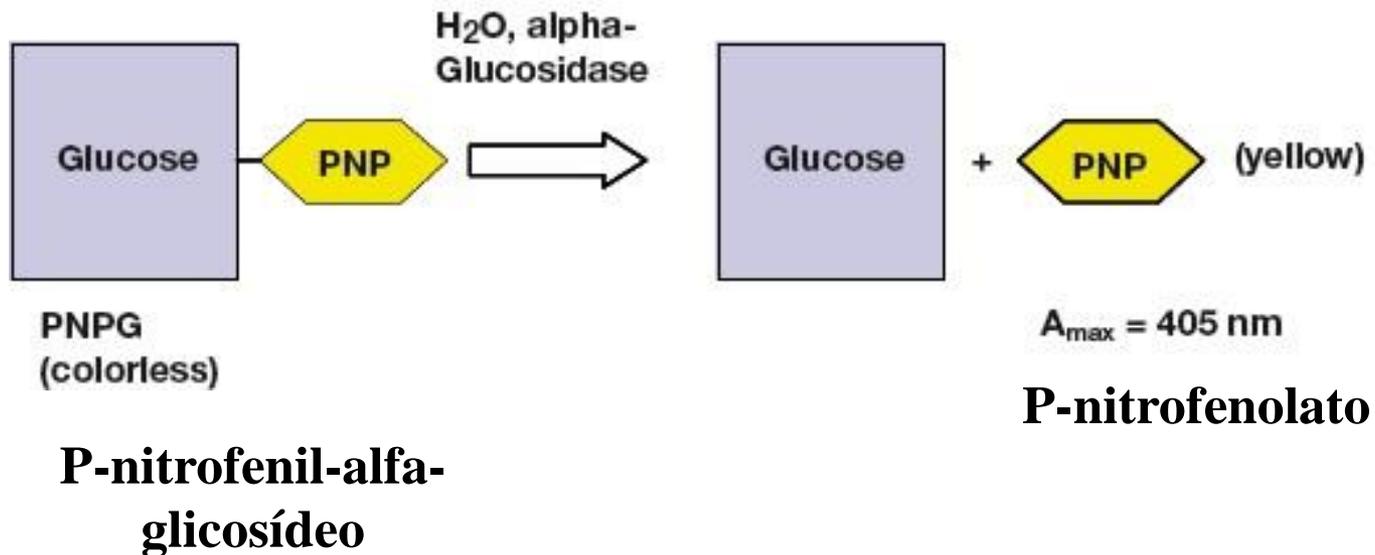
1 U de atividade enzimática
corresponde a formação de 1
micromol de produto/min

$$1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol P} / \text{min}$$

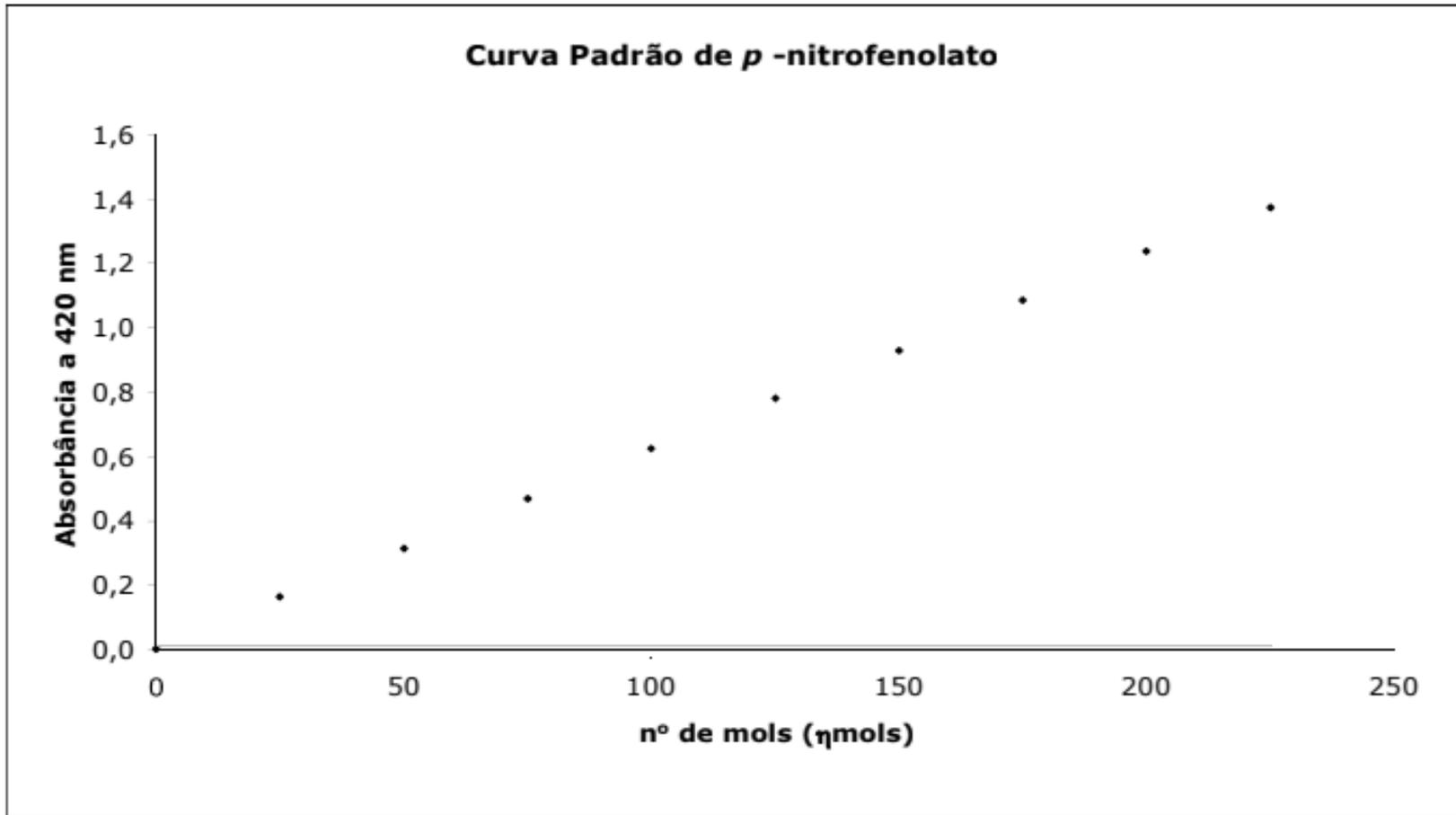
Determinação da Atividade Enzimática do lisado

α - Glicosidase

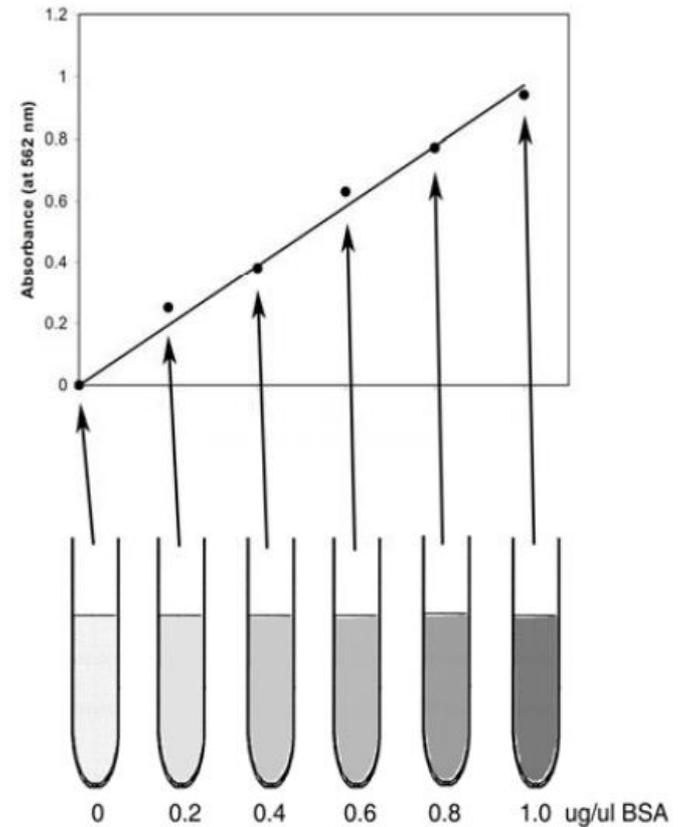
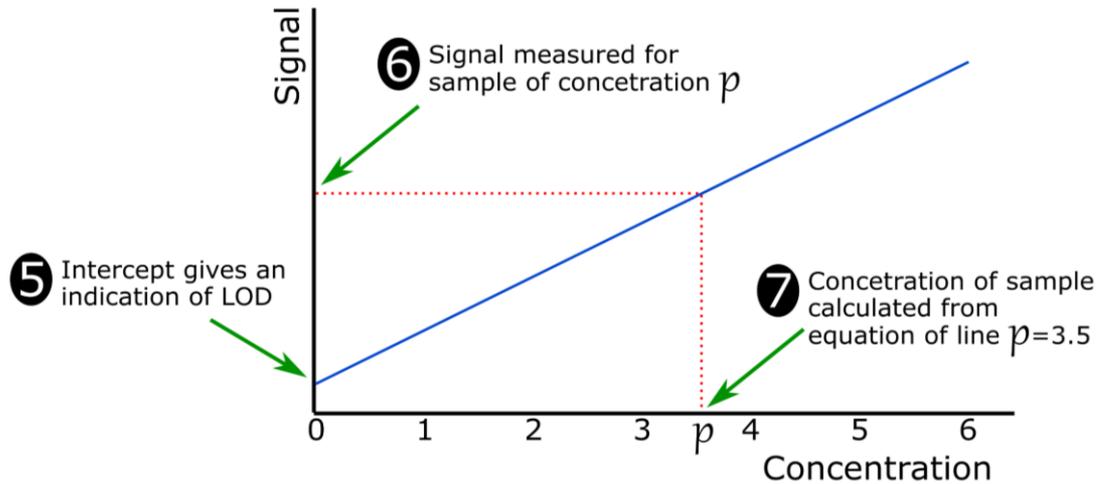
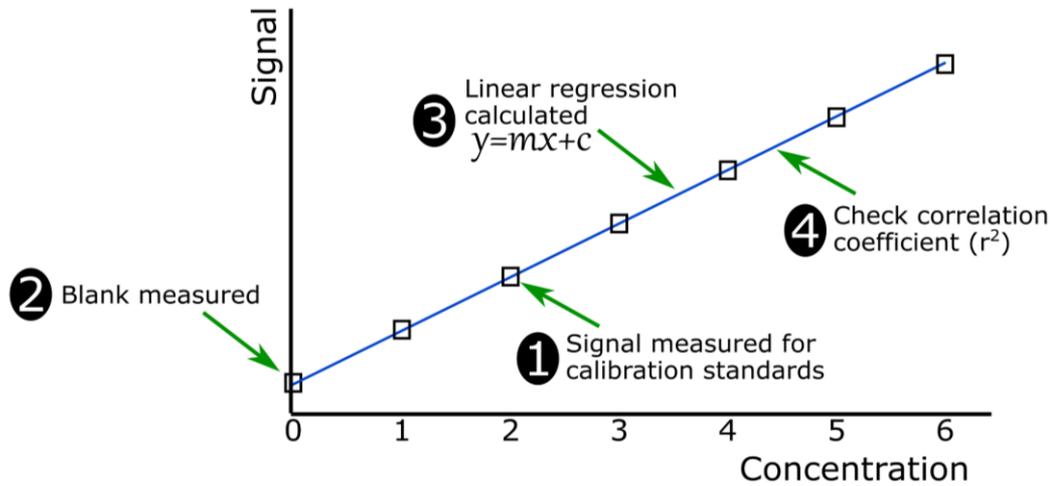
Hidrolise das ligações glicosídicas em açúcares complexos



Curva padrão p-nitrofenolato para determinar a atividade da α - Glicosidase



Curva padrão ou curva de calibração



Referências

Proteins – Structure and Molecular Properties, Thomas E. Creighton, Segunda edição – 1993 -Capítulo 1

M. M. Bradford (1976). Anal. Biochemistry 72, 248 – 254 ([Comassie Blue](#))

G. L. Peterson (1979). Anal. Biochemistry 100, 201 – 220 ([Reagente de Folin](#))

S.C. Gill e P.H. von Hippel (1989). Anal. Biochemistry 182, 319 – 326. ([Absorção na região de luz UV](#))

H. Ahmed (2005). Principles and reactions of protein extraction, purification and characterization ([todos os métodos](#))

Lehninger principles of biochemistry. 3rd. ed. New York: Worth Publishers, 2000. 1152p. il.

Livro de bioquímica básica (Anita Marzzoco e Bayardo B. Torres).