

LABORATÓRIO VIRTUAL DE ESPECTROFOTOMETRIA

<http://biomodel.uah.es/lab/abs/ensayo.htm>

Objetivo: Determinar a concentração de proteína de diferentes amostras pelo método colorimétrico de Lowry.

Materiais:

1. Duas amostras nas quais a concentração de proteína deve ser determinada;
2. Solução padrão de albumina sérica bovina, 2 g/L (BSA, *bovine serum albumin*);
3. Reagente C: preparado pela mistura dos reagentes A, B1 e B2 nas proporções 100:1:1 (volume:volume:volume):
 - 3.1. Reagente A: 2% Na₂CO₃ em 0,1 M NaOH;
 - 3.2. Reagente B1: 1% CuSO₄ 5H₂O (ou seja, 1 g/100 mL);
 - 3.3. Reagente B2: tartarato de sódio-potássio a 2% (2 g/100 mL);
4. Reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:4 em água (componente principal: ácido fosfomolibdotúngstico).

Passos:

1. Conecte o espectrofotômetro e defina o comprimento de onda para 580 nm;
2. Usando as micropipetas de volume variável P200 e P1000, prepare as misturas descritas na tabela para cada tubo de ensaio: (volume total de 400 µL);

Tubo	Função	BSA (2 g/L)	Amostra problema	Água
0	Branco	0		400 µL
1	Diluições do padrão BSA para construir a curva de calibração	30 µL		370 µL
2		60 µL		340 µL
3		90 µL		310 µL
4		120 µL		280 µL
5		150 µL		250 µL
6	Concentrações desconhecidas das amostras problema A e B		120 µL de amostra A	280 µL
7			200 µL de amostra A	200 µL
8			120 µL de amostra B	280 µL
9			200 µL de amostra B	200 µL

3. Quando todos estiverem completos, adicione 2 mL de **reagente C** a cada um dos tubos e  que a primeira reação se desenvolva (tempo virtual de 10 min);
4. Adicione 200 µL do **reagente Folin** a cada um dos tubos e  que a segunda reação se desenvolva (tempo virtual de 15 min);
5. Use a pipeta Pasteur (conta-gotas) para transferir o conteúdo do tubo nº 0 (branco) para a cubeta do espectrofotômetro. Coloque a cubeta no espectrofotômetro e pressione o botão "A = 0" (Absorbância 0). Retire a cubeta e esvazie-o;
6. Usando a pipeta Pasteur, transfira o conteúdo do tubo nº 1 para a cubeta, coloque-o no espectrofotômetro e registre o valor de absorbância em seu caderno de laboratório. Você pode pressionar o botão  para registrar a leitura de absorbância na tela inferior;
7. Repita o procedimento para o resto dos tubos até;
8. Construa uma tabela com a concentração de proteínas na mistura em cada tubo (tubos 1 a 5) e o respectivo valor de absorbância. Você pode pressionar o botão  para copiar a lista de valores de absorbância.

Outras instruções gerais:

- As micropipetas são utilizadas para retirar o líquido dos frascos de reagentes e transferi-lo para os tubos de ensaio (preparando assim as misturas de reação). A pipeta Pasteur (contagotas) é utilizada para retirar todo o líquido dos tubos e transferi-lo para a cubeta do espectrofotômetro;
- Selecione a micropipeta que deseja utilizar clicando sobre ela (a que estiver atualmente selecionada terá o indicador aceso em laranja ; a outra terá em cinza ). Se você pressionar a pipeta Pasteur, ambas as micropipetas serão desativadas;
- As pipetas não devem ser arrastadas, mas devemos clicar no destino para o qual queremos que sejam movidas (frasco de reagente, tubo de ensaio, cubeta ou caixa de lixo);
- Pressionar um dos frascos de reagente abrirá sua tampa e a micropipeta selecionada se moverá e coletará daquele reagente;
- Ao clicar em um dos tubos de ensaio: se uma das micropipetas for selecionada e carregada com a amostra, ela será adicionada ao tubo; se a pipeta Pasteur for selecionada, ela aspirará o conteúdo do tubo.
- Para adicionar uma amostra contida na pipeta Pasteur à cubeta do espectrofotômetro, clique na cubeta. Procedimento geral:
 1. Ajuste o volume da pipeta, pressionando na metade esquerda ou direita da roda, ou digitando no dial;
 2. Selecione a micropipeta clicando nela;
 3. Clique em uma das garrafas para carregar a micropipeta nela;
 4. Clique em um dos tubos para despejar o conteúdo da micropipeta nele;
 5. Prepare misturas de multi-reagentes, seguindo este procedimento, em todos os tubos;
 6. Clique na pipeta Pasteur para selecioná-la;
 7. Clique em um tubo para coletar seu conteúdo com a pipeta Pasteur;
 8. Pressione a cubeta para despejar a amostra nela.
- Para ligar e desligar o espectrofotômetro, pressione o botão ;
- Para acessar o compartimento da cubeta, pressione a trava  ou a própria tampa;
- Para inserir uma cubeta no espectrofotômetro e removê-la, clique em uma das setas  (atenção, a tampa do compartimento deve estar aberta);
- Botão e ação do ícone:
 -  Registra a medição no display externo;
 -  Limpa todas as informações exibidas na tela;
 -  Foto captura os dados exibidos na tela para que possam ser copiados para transferência para uma planilha ou documento;
 -  Simboliza o recipiente de resíduos líquidos; pressioná-lo esvaziará a cubeta selecionado;
 -  Simboliza o recipiente de resíduos sólidos; pressionando-o descarta a ponta da micropipeta ou a pipeta Pasteur (tenham ou não líquido);
- A pipeta Pasteur dispensa alíquotas de 2 mL. A cubeta tem capacidade para 3 mL; se você passar desse limite, ele vai derramar (a cubeta será esvaziada para continuar). Para poder medir no espectrofotômetro, a cubeta deve conter pelo menos 2 mL de amostra. A leitura da absorbância indica ##### quando não é possível medir: se a tampa do compartimento está aberta ou se o volume na cubeta é insuficiente.