

Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Bacharelado em Física Médica



Experimento 6

ESPECTROFOTOMETRIA E DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Introdução

A espectrofotometria é um método instrumental de análise de soluções que permite determinar sua concentração em função de uma de suas propriedades, a absorção de luz. É um dos métodos mais versáteis e mais largamente utilizados em bioquímica e possui vantagens definitivas: é um método não destrutivo e que oferece seletividade, uma vez que cada composto tem um espectro característico; pode-se, assim, ter meios de determinar a concentração de um único composto numa solução, sem interferência dos demais, o que é de grande valia, por exemplo, para monitorar a concentração de uma determinada espécie numa mistura de reação; é, ainda, um método que permite determinações de alta precisão num curto espaço de tempo.

Conceitos Básicos

As moléculas existem em diferentes estados estáveis que correspondem a quantidades definidas de energia. A energia de uma molécula é devida a diversos tipos de movimentos: deslocamentos eletrônicos, vibração de átomos, rotação e translação da molécula. Nas transições de um estado a outro, as energias absorvidas ou liberadas variam de uma maneira quantizada (não existem estados com teor de energia intermediário).

As diferenças entre os níveis energéticos não são constantes:

$$E_{\text{eletrônicos}} > E_{\text{vibracionais}} > E_{\text{rotacionais}}$$

Quando uma molécula passa de um nível energético E1 a um outro E2, ela absorve ou libera radiação eletromagnética, de acordo com a equação:

$$E = E_2 - E_1 = hf = hc/\lambda \quad (1)$$

Onde:

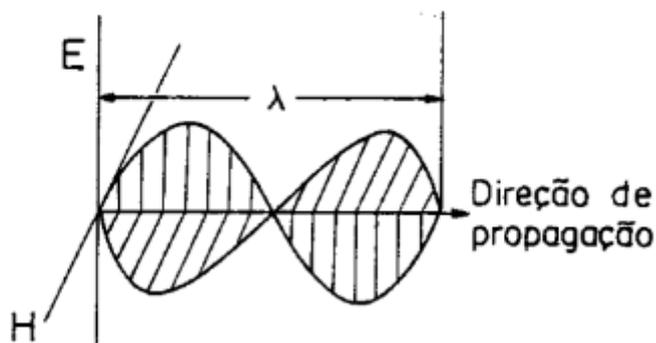
h = constante de Planck

f = frequência da radiação emitida ou absorvida

c = velocidade da luz no vácuo

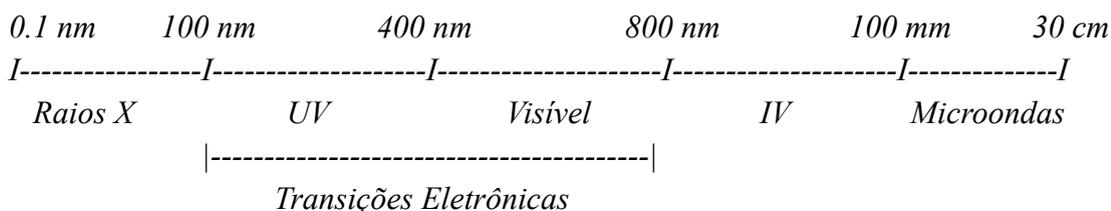
λ = comprimento de onda da radiação

Uma onda luminosa é constituída por um campo magnético e um elétrico oscilantes, perpendiculares entre si e à direção de propagação da onda, conforme ilustra a figura abaixo:

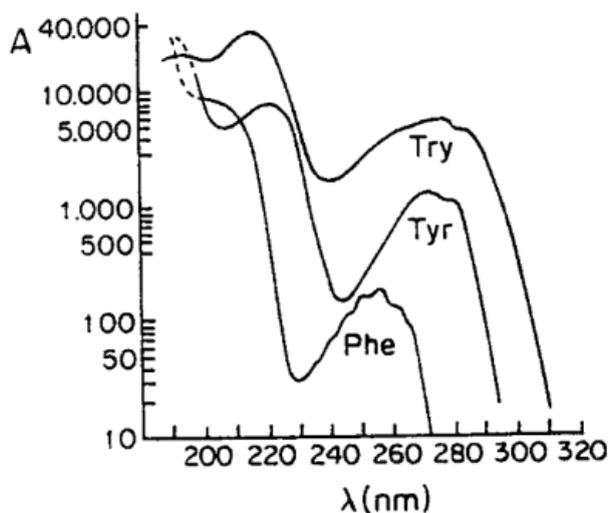


A luz interage com a matéria primariamente através do campo elétrico; porém, nessas interações ela atua como se fosse composta de pequenos corpúsculos energéticos denominados fótons ou quanta de luz. A absorção de luz ocorre quando a energia do fóton (h) corresponde à diferença entre dois níveis energéticos numa molécula.

A separação de um fluxo de radiações eletromagnéticas nos diferentes comprimentos de onda (ou frequências) que o compõem dá origem a um espectro, semelhante ao que ocorre com a luz solar branca quando da formação de um arco-íris. O espectro eletromagnético, do qual a luz visível é apenas uma pequena parte, pode ser dividido em 5 grandes regiões, conforme mostra a figura:

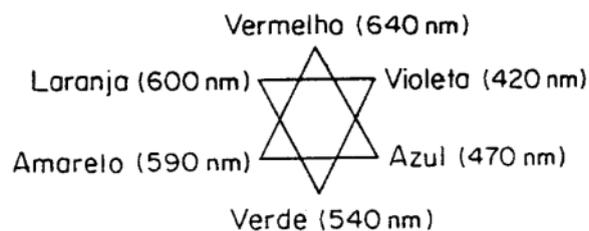


As radiações de uso mais frequente em bioquímica estão nas regiões do ultravioleta e visível. O espectro de um determinado composto pode ser de emissão ou de absorção. Os espectros de emissão podem ser obtidos submetendo-se a amostra a uma chama ou arco voltáico. Estes espectros aparecem como um conjunto de bandas ou linhas brilhantes em um fundo escuro. Já os espectros de absorção são obtidos interpondo-se a amostra em questão no trajeto da luz proveniente de uma fonte luminosa. Desse modo, obtém-se um espectro colorido, contínuo, interrompido por bandas escuras que representam as radiações absorvidas pela amostra. Um espectro de absorção pode ser representado graficamente colocando-se a quantidade de luz absorvida em função do comprimento de onda da radiação. A figura abaixo corresponde aos espectros de absorção dos aminoácidos Tirosina, Triptofano e Fenilalanina, os quais, devido à presença de grupamentos aromáticos em sua estrutura, são responsáveis pelas propriedades de absorção das proteínas na região do ultravioleta.



Devido à natureza das moléculas que constituem os organismos vivos, os processos fotobiológicos mais importantes ocorrem na região da luz visível. Na fotossíntese, por exemplo, a energia necessária para reduzir um mol de gás carbônico à glicose, da ordem de 120 Kcal, é proporcionada por uma radiação cujo comprimento de onda é 680 nm; a visão é o resultado da isomerização do retineno pela ação da luz visível (380-800 nm), que desencadeia a excitação nervosa.

A cor dos corpos ou substâncias é devida à recepção, na retina do globo ocular, das radiações da luz solar branca que estes não absorveram. Desse modo, a cor vermelha de uma solução é devida ao fato de que a substância presente absorve todas as radiações do espectro visível exceto aquelas correspondentes à cor vermelha. Geralmente, o comprimento de onda ou cor que uma substância mais absorve corresponde à cor complementar à que ela apresenta, de acordo com o seguinte diagrama:



Desse modo, se uma solução é vermelha, a cor que absorve com mais intensidade é o verde; se é amarela, absorve o violeta, e assim por diante. Como regra geral, quando se deseja medir a concentração de uma solução usando-se métodos espectrofotométricos deve-se escolher a cor, correspondente a um comprimento de onda, que a substância em questão absorve com maior intensidade.

A Lei de Lambert-Beer

Quando a luz atravessa uma solução, parte dela pode ser absorvida e, neste caso, a luz transmitida terá menor intensidade. Lambert e Beer demonstraram que a relação entre a intensidade da luz incidente, I_0 , e a intensidade da luz transmitida, I , por um meio transparente de espessura b e concentração c é dada por:

$$A = \log I_0/I = a.b.c$$

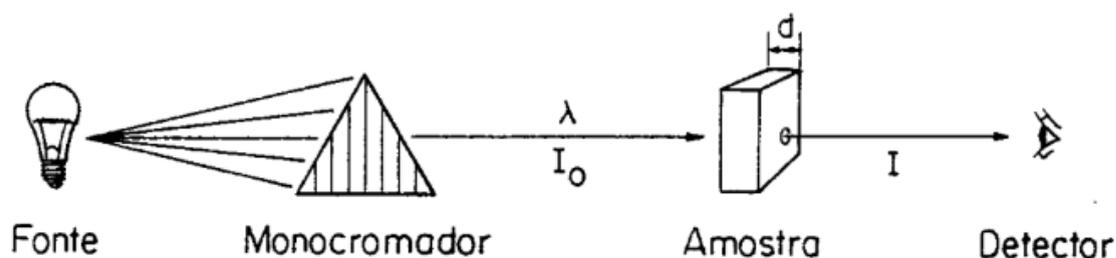
Onde a é um coeficiente de proporcionalidade denominado coeficiente de extinção, o qual é característico da espécie absorvente e varia com o comprimento de onda e o solvente empregado; A é a absorvância da solução e I_0/I é a transmitância da solução. Quando a concentração é dada em moles/litro, o coeficiente de extinção é denominado coeficiente de extinção molar (aM ou ϵ) e quando a concentração é dada em gramas/litro, é denominado coeficiente de extinção específico (a_s).

Algumas considerações sobre a Lei de Beer-Lambert:

1. A lei é válida para as soluções diluídas, uma vez que em soluções concentradas podem ocorrer interações entre as moléculas do soluto, acarretando desvios na relação linear entre a absorvância e a concentração. Além disso, concentrações elevadas podem provocar variações no índice de refração, o que também provocará desvios da lei.
2. A associação, a dissociação ou a reação entre as espécies absorventes e o solvente podem provocar desvios na lei.
3. A instrumentação utilizada pode ser um fator de desvio da lei, uma vez que certos aparelhos não fornecem um feixe de luz monocromática.
4. Vários parâmetros podem influir no espectro de absorção de uma substância. Entre eles tem-se: natureza do solvente, pH da solução, temperatura, força iônica da solução e/ou presença de contaminantes.
5. Se em uma solução existem vários compostos que absorvem luz e não interagem entre si, a absorvância total da solução é dada pela somatória das absorvâncias de cada um deles:

$$A = a_1 \cdot b \cdot c_1 + a_2 \cdot b \cdot c_2 + \dots + a_n \cdot b \cdot c_n$$

Espectrofotômetro é o equipamento empregado para medir a absorção de luz em função do comprimento de onda. É constituído por 4 partes básicas: uma fonte de luz (lâmpada de Tungstênio ou Deutério), um monocromador (prisma ou rede de difração), uma célula para conter a amostra (cubeta) e um detector. A figura a seguir é a representação esquemática de um espectrofotômetro:



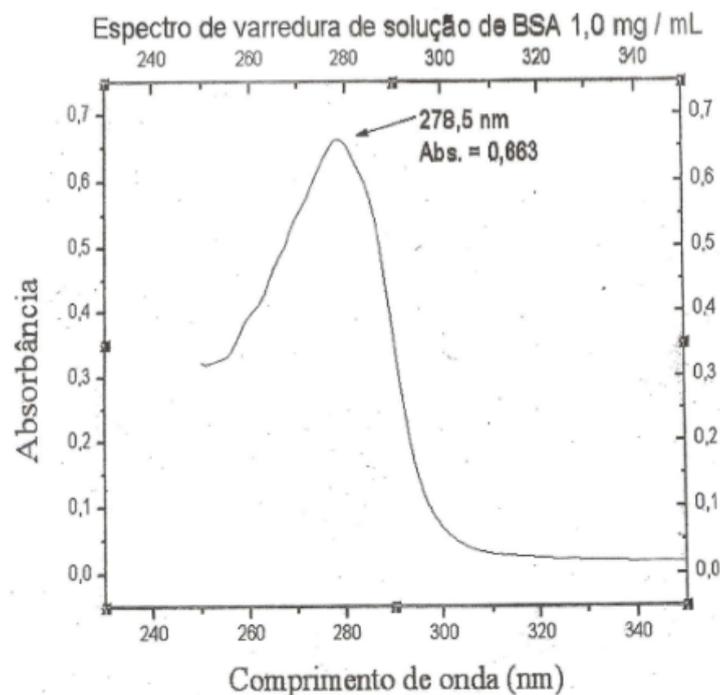
Os espectrofotômetros, por possuírem duas fontes de luz, podem ser utilizados para medidas de absorção de luz tanto na região do ultravioleta (lâmpada de Deutério) quanto do visível (Tungstênio).

Procedimento Experimental

Métodos de dosagem de proteínas

D1) Espectro de absorção da albumina do soro bovino

O espectro de absorção de uma solução 1 mg.mL⁻¹ de albumina bovina (BSA) será traçado automaticamente, na faixa de 220-320 nm, utilizando um espectrofotômetro. A partir do espectro, determine o coeficiente de extinção molar dessa proteína, sabendo que o peso molecular do BSA é 66.000 Da. Faça essa determinação durante a confecção do relatório.



D2) Determinação da concentração de proteína em uma amostra.

Será empregado o método de dosagem de proteína descrito por Read & Northcote (Analytical Biochemistry, 1981, 116:53 e Methods in Enzymology, 1983,91: 119). Cada grupo deverá traçar uma curva padrão, contendo pelo menos 5 pontos experimentais, empregando uma solução padrão de BSA 0,1 mg/mL. As concentrações de proteína utilizadas para a curva padrão deverão estar na faixa de 1 a 20 g/mL. Simultaneamente, cada grupo determinará a concentração de proteína numa amostra de BSA de concentração desconhecida, fornecida pelo professor.

Para realizar a dosagem, prepare pelo menos 5 soluções de BSA com concentrações entre 2 e 20 g/mL e volume total de 1,0 mL, em 5 tubos de ensaio (Peça a ajuda do monitor quando for utilizar as pipetas automáticas).

Prepare também um Branco, utilizando 1,0 mL de água destilada em lugar da solução de proteína. Inclua ainda na sua bateria de tubos de ensaio um tubo contendo 1 mL de uma solução de BSA de concentração desconhecida (fornecida pelo monitor). O procedimento a seguir será feito com todos os tubos preparados. Adicione (e agite em seguida) a cada tubo de ensaio 1,5 mL do Reagente de Coomassie Blue pronto para uso (ver composição abaixo), agite e deixe a mistura em repouso à temperatura ambiente por 10 min. Finalmente, faça a leitura da absorvância em 595 nm, usando como branco o tubo 6 (ver tabela abaixo). As leituras deverão ser efetuadas em até cerca de 30 minutos após a preparação das misturas; caso contrário ocorrerá precipitação do reagente nos tubos, invalidando as dosagens. A tabela abaixo apresenta um protocolo típico para esta dosagem de proteína:

Tubo	Proteína no tubo (µg)	Solução estoque BSA (µL)	Água (µL)	Reagente (mL)	A ₅₉₅
1	2			1,5	
2					
3					
4					
5	20				
6	0	-----	1000	1,5	Branco
7	Desconhecida			1,5	

Questões:

ATENÇÃO: Você receberá o Reagente de Coomassie Blue pronto para o uso. A solução estoque do corante (descrita na preparação) permanecerá em poder do técnico responsável. Caso necessite um volume maior do reagente pronto, solicite ao técnico ou ao monitor.

1. Qual a concentração da amostra desconhecida que foi fornecida para seu grupo? Não se esqueça de informar o número dessa amostra no relatório.
2. Quais os princípios do método de dosagem de proteínas proposto por Read & Northcote?

