

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA  
NUTRIÇÃO E METABOLISMO – 2021

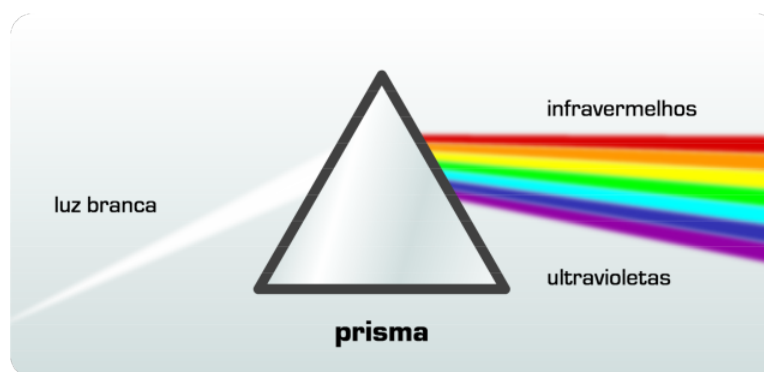
**Prática on-line 1 – Dosagem de Proteínas e Aminoácidos**

Nesta atividade, iremos aprender a quantificar proteínas e aminoácidos a partir de 2 métodos: Biureto e Ácido Trinitrobenzenosulfônico (TNBS).

**O que é espectrofotometria?**

Sabe-se que as cores que somos capazes de ver (cores do espectro visível) são originadas através da emissão de radiações em diferentes comprimentos de onda, entre 400 e 750 nm, e acima (infravermelho) ou abaixo (ultravioleta) desses valores nossos olhos não são capazes de detectar. Para entender como as cores são originadas dentro do espectro visível precisamos entender um pouco sobre como é a interação da luz branca com diferentes materiais.

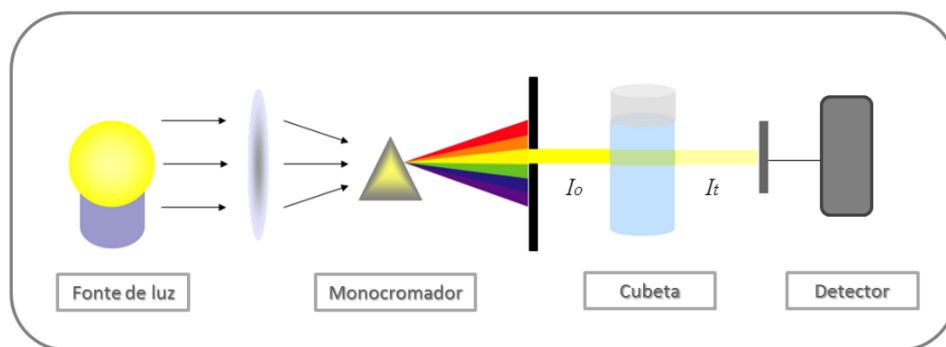
Como exemplo, a figura a seguir representa a luz branca **incidindo** no prisma e **refletindo** diferentes cores em diferentes comprimentos de onda. **Prisma**, é definido em óptica, como sendo um conjunto de três meios **homogêneos**: ar, vidro e ar, o que propicia a visualização de todas as cores do espectro visível (Figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática da incidência da luz branca no prisma.

O que aconteceria se em vez de algo homogêneo, tivéssemos algo **heterogêneo**, como por exemplo, uma amostra contendo proteínas/aminoácidos? Em vez de termos o prisma, como apresentado anteriormente, no que a luz incidiria na solução? A solução é transparente ou colorida? É possível relacionar luz, comprimento de onda, cor e concentração de uma determinada solução?

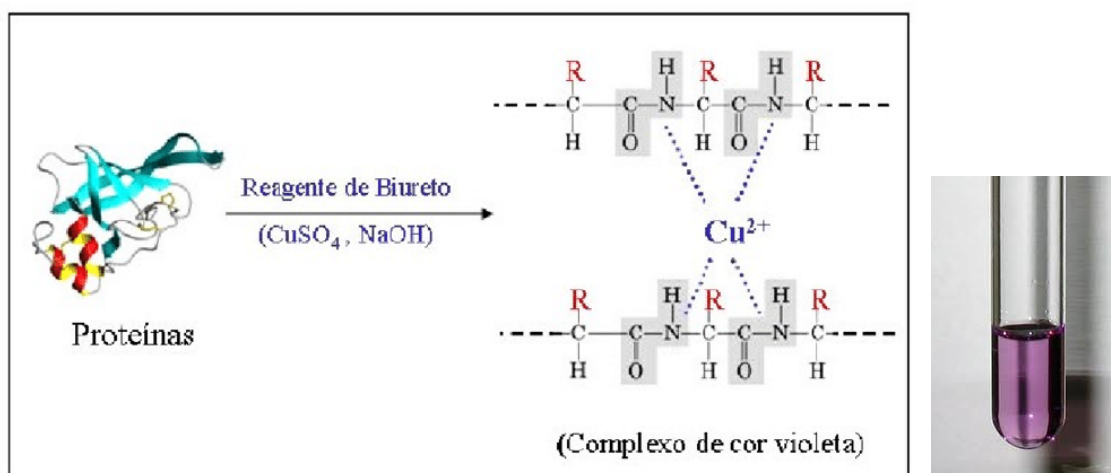
Todos estes questionamentos foram essenciais para o desenvolvimento da técnica que hoje conhecemos como **ESPECTROFOTOMETRIA**. Para realizar a prática seria necessário um **Espectrofotômetro**. Um vídeo demonstrando como o equipamento funciona está disponível no e-Moodle, mas abaixo encontra-se um esquema prático (Figura 2).



**Figura 2.** Representação esquemática do funcionamento do espectrofotômetro.

Precisamos inicialmente de uma fonte de luz. O equipamento, como demonstrado no vídeo, permite que um comprimento de onda específico seja selecionado (por exemplo, 540 nm que utilizaremos na prática). Selecionado o comprimento de onda, a luz incide no monocromador, que irá selecionar a cor correspondente ao comprimento de onda selecionado, passando pela amostra e finalmente, chegando ao detector. A leitura neste caso pode ser realizada em valores de Absorbância (Abs) ou porcentagem de transmitância (%T)

Assim como toda técnica apresenta limitações, na espectrofotometria não é diferente. Para conseguirmos quantificar uma determinada amostra, precisamos que a solução seja **COLORIDA**. Desta forma, a técnica se enquadra nos **MÉTODOS COLORIMÉTRICOS ou FOTOMÉTRICOS**. Nosso intuito na prática é quantificar proteínas, mais especificamente, a proteínas do leite. Para que seja possível, um reagente colorimétrico é utilizado: **Reagente de Biureto**, o qual resulta numa solução de coloração violeta na presença de proteína (Figura 3). Outras metodologias foram desenvolvidas com o mesmo propósito, usando diferentes reagentes (ex: TNBS).



**Figura 3.** Representação esquemática da reação com Reagente de Biureto na presença de proteínas em solução.

Uma solução que apresenta coloração roxa ou violeta, como é o caso da coloração da amostra na presença de proteínas, absorve radiações cujos comprimentos de onda estão dentro da região visível do espectro. Assim, uma solução violeta é violeta por absorver as radiações do espectro visível que não estão no comprimento de onda correspondente ao violeta. Assim, pode-se dizer que as cores que vemos em um determinado meio é complementar à luz absorvida.

Agora, como relacionar a cor com a massa (ou concentração) de proteína em uma amostra?

Para solucionar esta questão, a **Lei de Lambert-Beer** pode ser utilizada. Assim, temos que a concentração de uma substância é diretamente proporcional a quantidade de luz absorvida e inversamente proporcional ao logarítmico da luz transmitida (Equação 1).

$$A = abc = \log \log \frac{100}{\%T} \quad \text{(Equação 1)}$$

A= absorvância (Abs)

a = absortividade molar ou absorvância específica ou coeficiente de extinção molar – tudo dependendo de b e c unitários

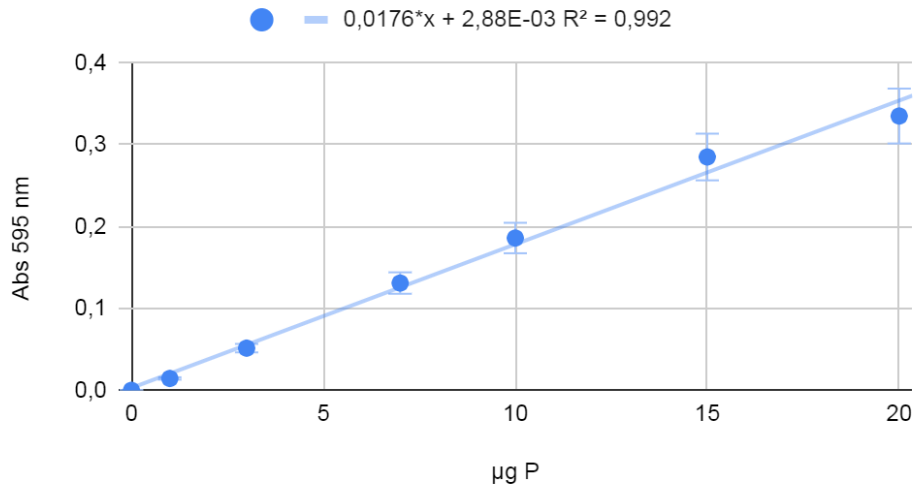
b = trajeto luminoso em centímetro (geralmente 1 cm – espessura da cubeta)

c = concentração da substância que se deseja (mg/mL)

T = transmitância (%)

Uma metodologia alternativa para se determinar a concentração ou quantidade de proteínas em uma amostra é através de uma **Curva Padrão** (Figura 4). Geralmente, em Bioquímica, a Albumina de Soro Bovina (BSA) é utilizada. Trata-se de uma proteína que, por

ser extremamente conhecida e caracterizada, pode ser utilizada como padrão. Assim, ao utilizarmos o BSA como padrão de massa proteica, podemos relacionar com a massa e/ou concentração de proteínas na amostra de interesse.



**Figura 4.** Curva Padrão BSA.

No gráfico acima temos representado no eixo x a massa de proteína em microgramas e no eixo y os valores de absorbância em 595 nm. A equação da reta foi determinada (Equação 2):

$$y = 0,0176x + 0,00288 \text{ (Equação 2)}$$

Se a leitura de absorbância da amostra foi 0,202, podemos chegar à conclusão de que, primeiramente, o valor obtido está dentro da curva, indicando que o método é eficaz no ensaio realizado e que a massa de proteína na amostra é 11,31 µg. Agora, para determinar a concentração de proteína na amostra de interesse deve-se considerar o volume final da solução preparada, assim como as diluições que acontecem durante o processo. A concentração de proteína pode ser dada em **mg/mL** ou **molaridade**.