

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

Dosagem de Proteínas e Aminoácidos

**Material:** Solução de albumina bovina (BSA) de 0,2 a 2,0 mg/mL;  
Solução de Glicina 2.0 mg/mL;  
Reagente para Biureto;  
Reagente trinitrobenzeno (TNBS) 0,1%;  
Leite em pó reconstituído e diluído

**Procedimento:**

**(A)** Dosagem de proteína do leite. Pipetar em duplicata, em tubos de ensaio devidamente identificados, as soluções indicadas na tabela. Agitar e deixar reagir por 20 min. Tomar leituras de  $A_{540nm}$  no espectrofotômetro. Fazer curva padrão e dosar leite e glicina.

Tubo N°	0,5 mL (BSA)	Reagente de Biureto	$A_{540nm}$
0	0	1,0 mL	
1	0,2 mg/L	1,0 mL	
2	0,5 mg/L	1,0 mL	
3	0,8 mg/L	1,0 mL	
4	1,0 mg/L	1,0 mL	
5	1,5 mg/L	1,0 mL	
6	2,0 mg/L	1,0 mL	
7	Leite	1,0 mL	
8	Glicina	1,0 mL	

**(B)** Reação de proteínas e aminoácidos com TNBS. Em tubos de ensaio identificados como "C" (controle), BSA e Gly, pipetar respectivamente 0,01 mL de H<sub>2</sub>O, BSA 2.0 mg/mL e Gly 2.0 mg/mL. Em cada tubo adicionar 1.0 mL de H<sub>2</sub>O, duas gotas de TNBS. Agitar e observar. Repetir estas reações substituindo o tampão Borato por tampão Acetato de Sódio pH= 4.5.

**Discussão:** (a) O que é a Lei Lambert-Beer e por que as leituras da reação da proteína com reativo de Biureto foram tomadas em 540nm? (b) Observar a curva padrão de BSA e comentar sobre possíveis erros (sistemáticos ou aleatórios) cometidos em sua preparação (c) Comentar sobre a sensibilidade, precisão e acuracidade deste método de dosagem de proteínas. (d) O que é Biureto e qual o fundamento do método? A glicina reagiu? (e) Qual a concentração de proteína no leite em pó reconstituído de acordo com a embalagem? (f) Por que o TNBS reagiu apenas em meio alcalino? (g) Por que a glicina apresentou reação mais intensa que a albumina se ambas estavam presentes na mesma quantidade, em mg?