

Análise de Proteínas



Prof. Eduardo Purgatto

Depto. de Alimentos e
Nutrição Experimental
FCF – USP

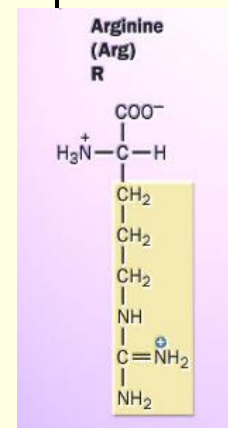
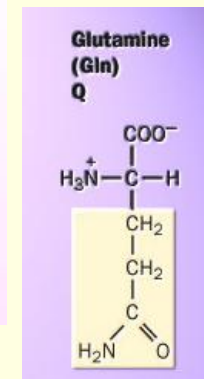
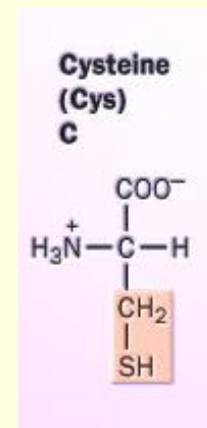
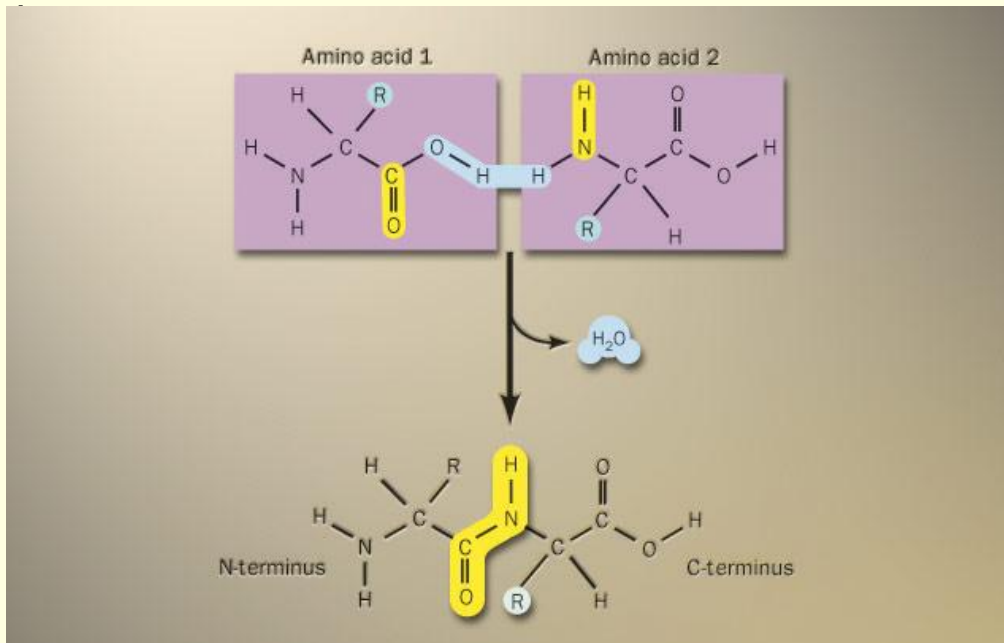
Curso de Graduação

Disciplina de
Bromatologia Básica

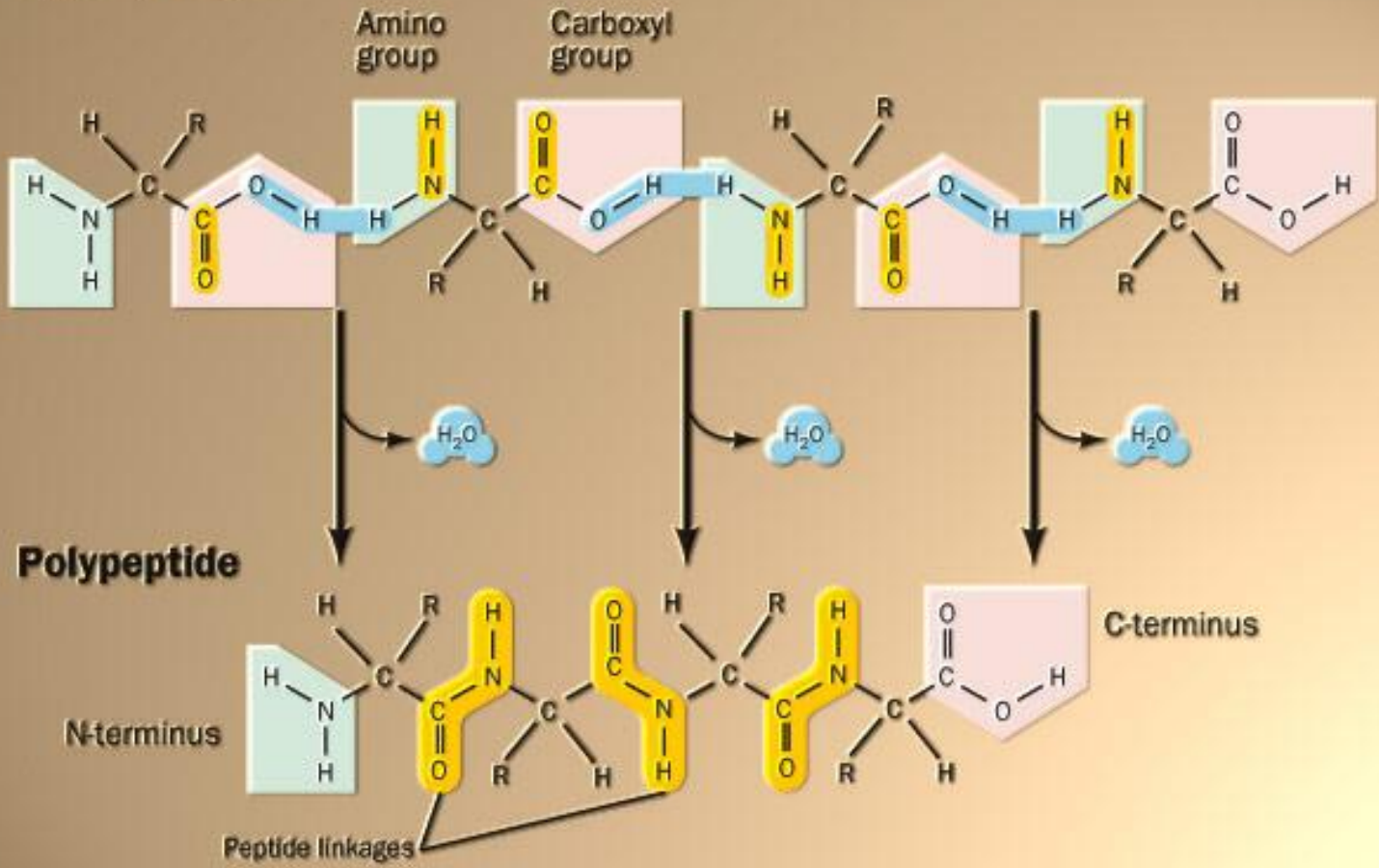
2016

Proteínas

Macromoléculas compostas de AMINOÁCIDOS unidos por ligações covalentes denominadas LIGAÇÕES PEPTÍDICAS



4 Amino acids

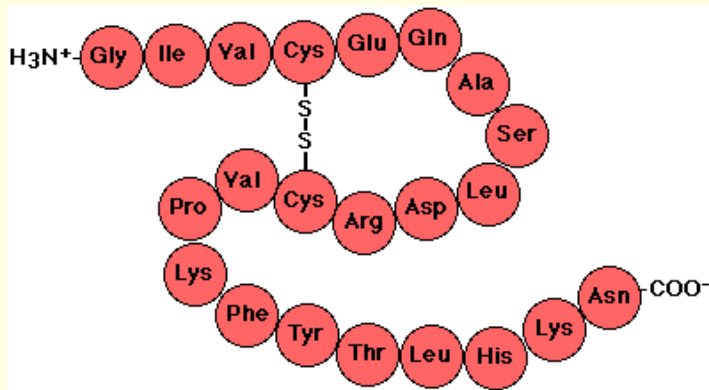


Polypeptide

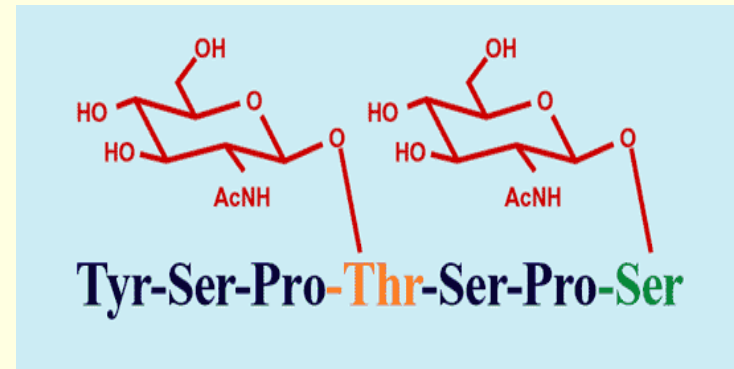
Classificação

Composição:

Simples (apenas AAs)



Conjugadas com compostos não-AA

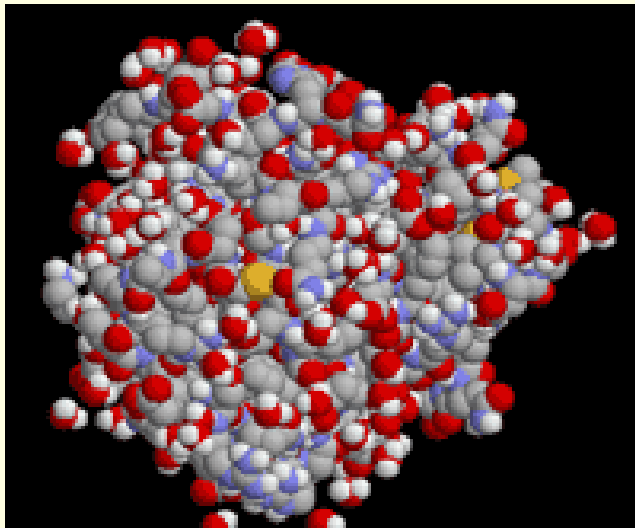


Glicoproteínas,

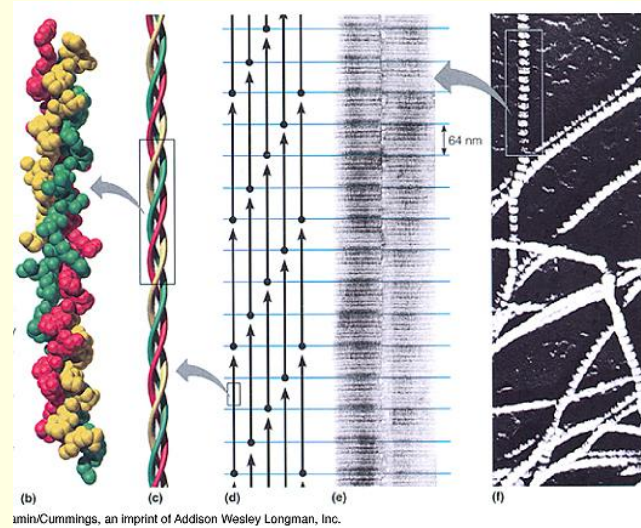
Lipoproteínas, fosfoproteínas, etc.

Classificação

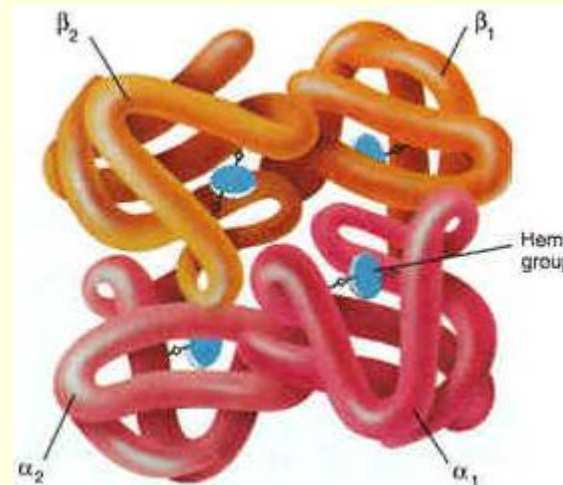
Estrutura



Globulares (ex. albuminas, mioglobina)



Fibrosas (ex. colágeno)



Conjugadas (ex. Hemoglobina)

Classificação

Função biológica

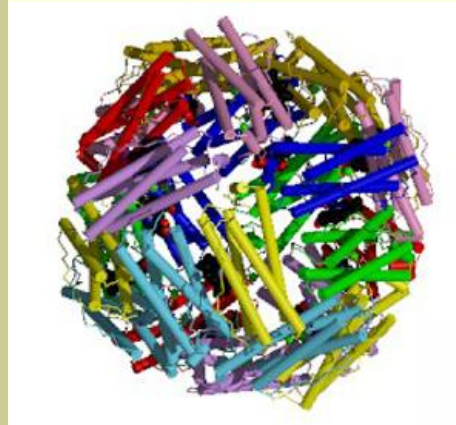
- Elementos estruturais (colágeno) e sistemas contráteis;
- Armazenamento (ferritina);
- Veículos de transporte (hemoglobina);
- Hormônios;
- Enzimática;
- Nutricional;
- Agentes protetores (imunoglobulina);

Entre outras...

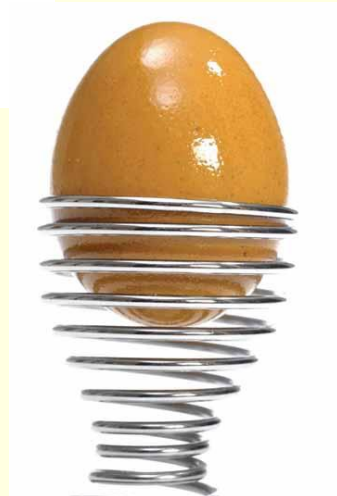
Classificação

Solubilidade

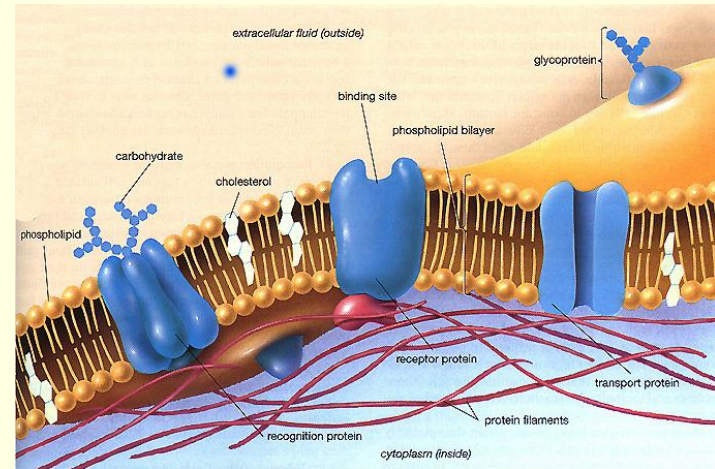
Hidrofilicas



Conalbumina



Hidrofóbicas



Proteínas de membranas

Conteúdo em alimentos

- **Muito variável**
- **Alimentos de origem animal e leguminosas são ótimas fontes de proteínas**



Análise de proteínas

- Os princípios básicos incluem:

- **Determinação de nitrogênio orgânico (Kjeldahl)**
- Presença de ligações peptídicas (Biureto)
- Absorção no UV (devido a Trp e Tyr)
- Presença de grupos amino livres (Ninhidrina – Arg e Lys)
- Capacidade de ligação de corantes (Bradford)
- Presença de AAs aromáticos (Fluorescência - Phe e Trp)

Método de Kjeldahl

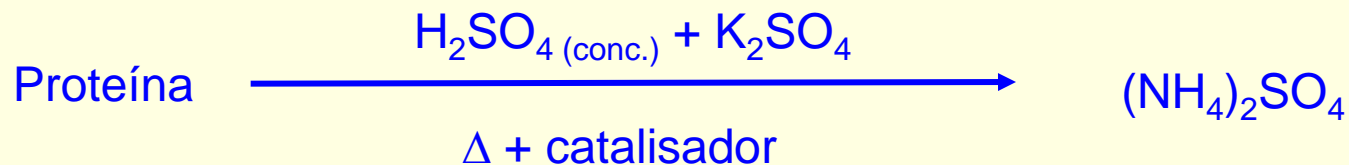


Johann Kjeldahl
(1849-1900)

Desenvolveu em 1883 o processo básico para determinação de nitrogênio orgânico total. Os passos incluem:

- Digestão: H_2SO_4 (conc.) a 350-400°C + catalisador
- Neutralização e Destilação
- Titulação
- Conversão do teor de N total para teor de proteína

Método de Kjeldahl



K_2SO_4 : Aumenta o Ponto de Ebulição do H_2SO_4 (de 337 para mais de 400°C)



Digestão mais eficiente

CuSO_4 : Catalisador. Acelera o processo de oxidação da matéria orgânica



Amostra ANTES da digestão

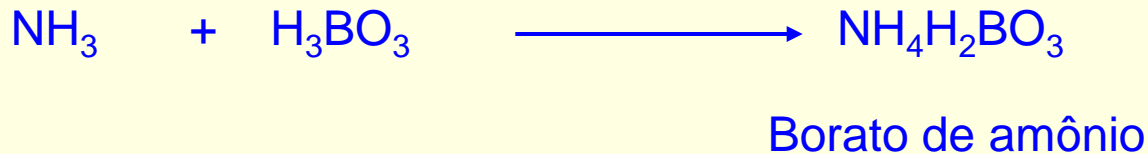
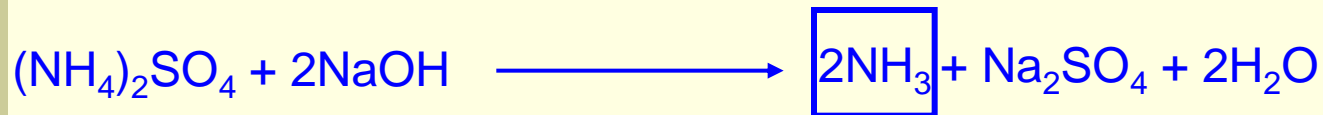


Amostra DEPOIS da digestão



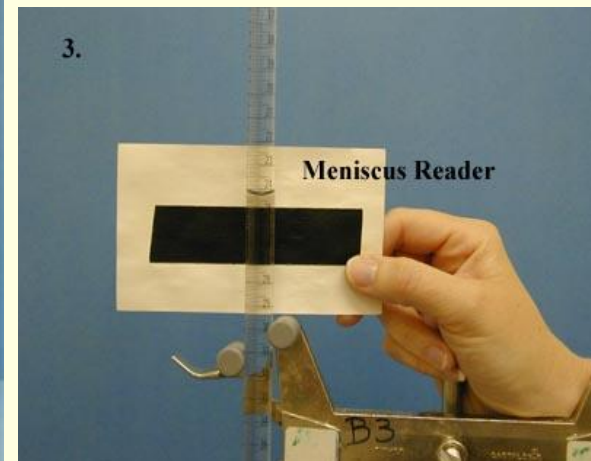
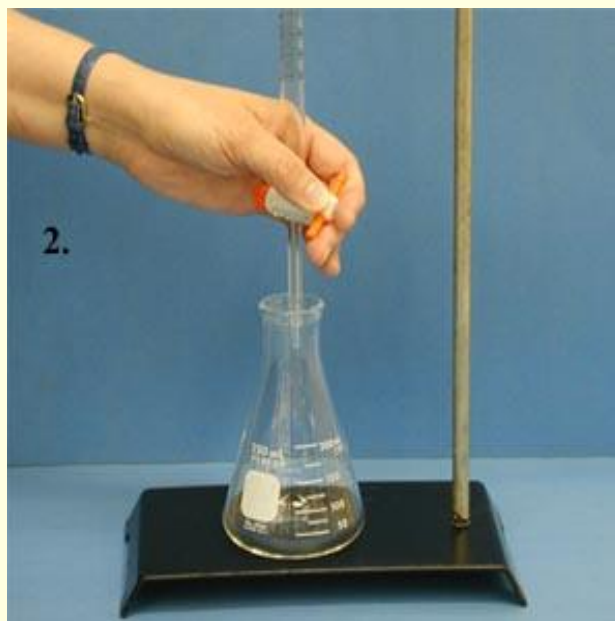
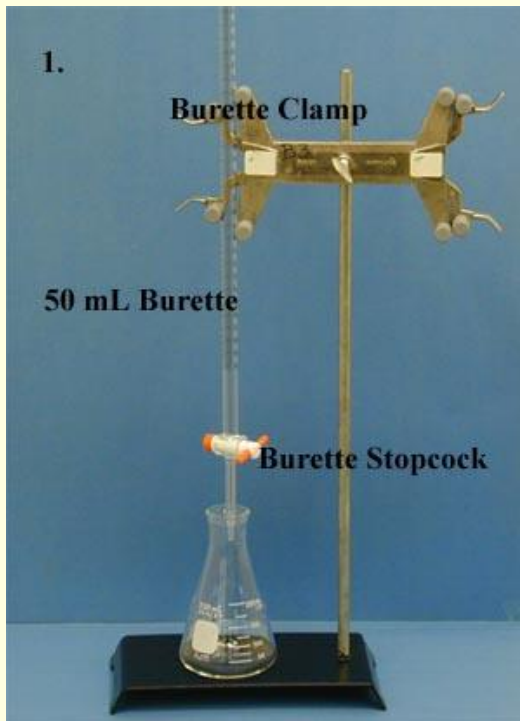
Método de Kjeldahl

Neutralização e Destilação



Método de Kjeldahl

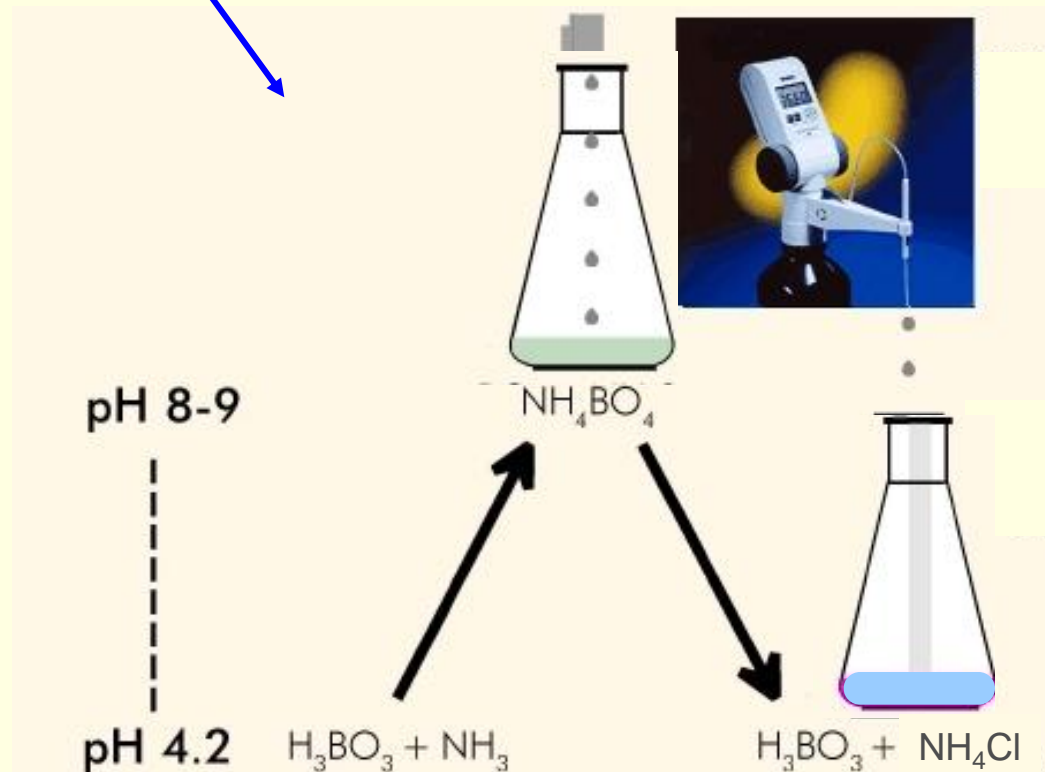
Titulação



Método de Kjeldahl

Até que ponto o ácido é adicionado à amostra?

Até o PONTO DE VIRAGEM



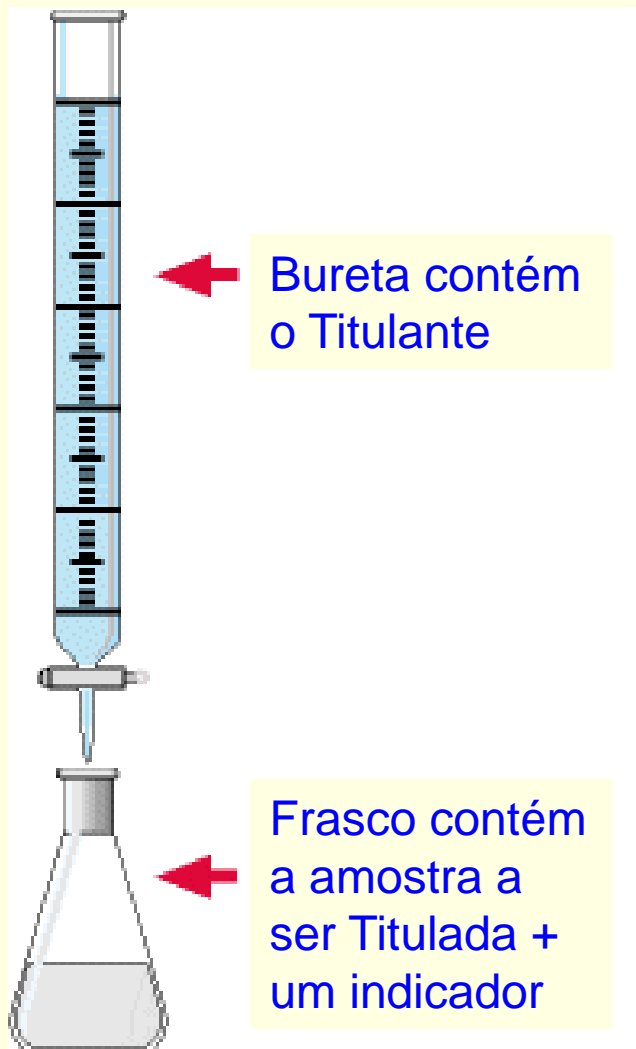
Volumetria

Baseado na equivalência entre o conteúdo de N na amostra e o HCl usado na TITULAÇÃO



- Técnica analítica utilizada para determinar a concentração de um determinado reagente
- Também chamada de Análise Volumétrica

Volumetria



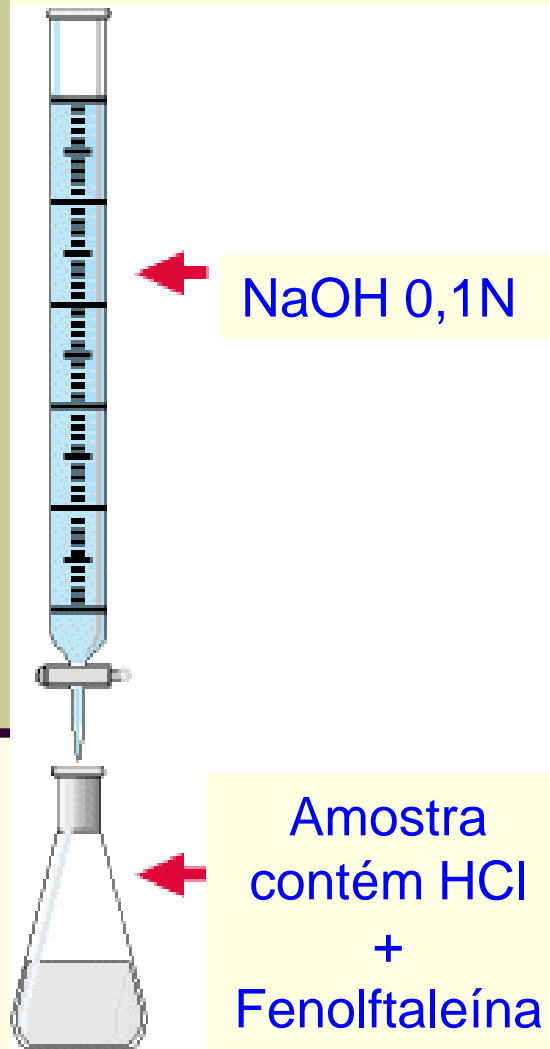
Bureta contém o Titulante

Frasco contém a amostra a ser Titulada + um indicador

Titulante = Solução padrão de um reagente de Concentração conhecida

Indicador = Substância que sofre mudança de cor quando é atingido o PONTO DE EQUIVALÊNCIA entre o Titulante e a Amostra

Volumetria



1º passo: Despejar lentamente o conteúdo da bureta sobre a amostra agitando esta última constantemente.

2º passo: Quando ocorrer a mudança de incolor para rosa claro, a titulação terá atingido o ponto de equivalência entre a base e o ácido



3º passo: Anotar o volume de Titulante gasto e calcular a concentração do Titulado.

$$N_{\text{titulante}} \times V_{\text{titulante}} = N_{\text{titulado}} \times V_{\text{titulado}}$$

$$0,1 \times 10 \text{ ml} = N_{\text{titulado}} \times 20 \text{ ml}$$

$$N_{\text{titulado}} = 0,05 \text{ N}$$

Método de Kjeldahl

1 Eq HCl _____ 1 Eq Nitrogênio

1N (1Eq/1000 mL) _____ 14 g Nitrogênio

1N (1mL) _____ 0,014g Nitrogênio

0,1N (1mL) _____ 0,0014g Nitrogênio

Logo:

1mL (0,1N) _____ 0,0014g Nitrogênio

Vol. de HCl _____ Xg Nitrogênio

Método de Kjeldahl

A maioria dos alimentos (*) possui em média 16% de nitrogênio, portanto:

16g N _____ 100g proteínas

1g N _____ Xg

$$Xg = 100/16 = \mathbf{6,25}$$

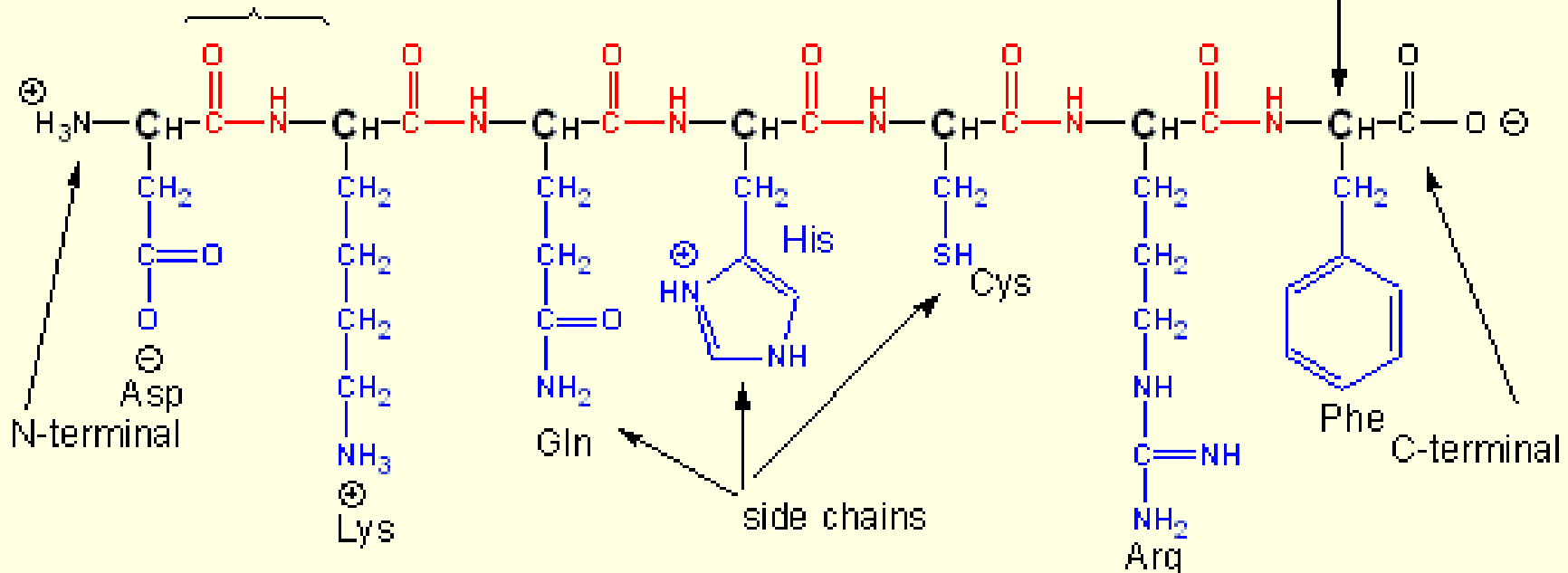
O teor de proteína bruta de um alimento é obtido pela multiplicação do teor de N - total pelo fator de conversão (6,25).



Add the BUCHI Kjeldahl Tablets and the corresponding volume of sulfuric acid

sequence: Asp-Lys-Gln-His-Cys-Arg-Phe or: DKQHCRF

amide, peptide bond



Método de Kjeldahl

O conteúdo de proteína para alimentos específicos pode utilizar fatores específicos:

	% de N na proteína	Fator
Ovo ou carne	16,0	6,25
Leite	15,7	6,38
Trigo	18,76	5,33
Milho	17,70	5,65
Aveia	18,66	5,36
Soja	18,12	5,52
Arroz	19,34	5,17

Método de Kjeldahl

Vantagens

- Aplicável a todos os tipos de alimentos
- Relativamente simples
- Não é caro
- Preciso. Trata-se de um método oficial para a determinação de proteínas
- Vem sendo modificado para análise de microgramas de proteína (micro Kjeldhal)

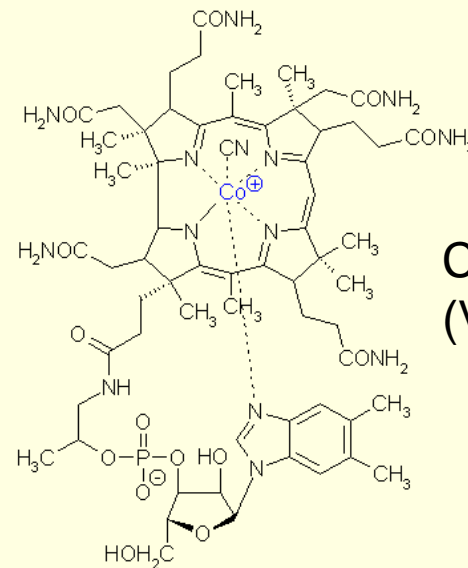
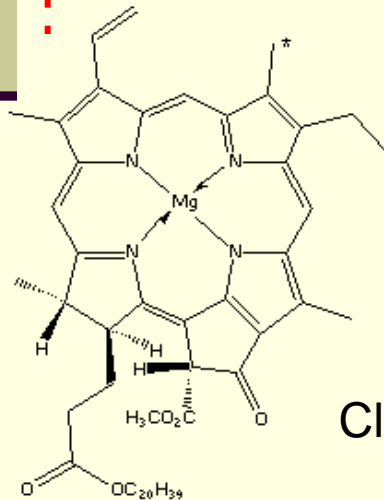
Desvantagens

- Mede Nitrogênio orgânico total, não apenas nitrogênio de proteínas**
- Demorado
- Utiliza reagentes corrosivos.

Método de Kjeldahl

Outras possíveis fontes de N na amostra:

- Amino ácidos livres
- Pequenos peptídeos
- Ácidos nucleicos
- Amino açúcares
- Porfirinas
- Algumas Vitaminas
- Alcalóides
- Uréia
- Íons Amônio



Método de Kjeldahl

1. Digestão: H_2SO_4 (conc.) a 350-400°C + catalisador
2. Neutralização e Destilação
3. Titulação
4. Conversão do teor de N total para teor de proteína