

Grupo X

Nome 1:

n°USP 1:

Nome 2:

n°USP 2:

Nome 3:

n°USP 3:

QBQ 1453 – Bioquímica Experimental

Prática X – Nome da prática

Data do experimento

1. Objetivo (claro e sucinto)

Exemplo: Quantificar o conteúdo total de proteínas no lisado de *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Procedimento experimental (Descrever a estratégia experimental. Não repetir exatamente o roteiro. Máximo 1 página.)

Exemplo: Para realizar a dosagem de proteínas presentes no lisado de *S. cerevisiae* foi utilizado o método de Bradford. Para tanto, construiu-se uma curva padrão com albumina de soro bovino (**Tabela 1**). A absorbância do complexo entre o reagente de Bradford e proteínas foi medida em 595 nm.

Tabela 1. Proporções de albumina e do reagente de Bradford para a construção da curva padrão

| Tubos | Albumina 0,2 g.L ⁻¹ | Água (µL) | Reagente de Bradford (mL) |
|--------|-----------------------------------|--------------|------------------------------|
| Branco | 0 | 100 | 1,0 |
| 1 | 10 | 90 | 1,0 |
| 2 | 20 | 80 | 1,0 |
| 3 | 30 | 70 | 1,0 |
| 4 | 40 | 60 | 1,0 |
| 5 | 50 | 50 | 1,0 |
| 6 | 60 | 40 | 1,0 |
| 7 | 70 | 30 | 1,0 |
| 8 | 80 | 20 | 1,0 |

Além disso, diluiu-se o lisado 100X para então prosseguir com a dosagem de proteínas em 100 (A1), 50 (A2), 30 (A3) e 20 (A4) µL da amostra de lisado

com adequação do volume final para 100 µl. Para tanto utilizou-se 1,0 mL do reagente de Bradford.

3. Resultados e Discussão

(Esta é a parte mais importante do relatório. Utilize tabelas e gráficos para expor os resultados. Discuta e analise criticamente os dados obtidos e dificuldades observadas. Discuta os conceitos teóricos envolvidos de modo a explicar os dados experimentais. Máximo 3 páginas)

Primeiramente foi feita a curva padrão da absorbância do reagente de Bradford em função da concentração de albumina (**Tabela 2**).

Tabela 2. Dados de absorbância do Reagente de Bradford no lisado 1000X

| Massa de albumina (ug) | Absorbância 595 nm |
|-------------------------------|---------------------------|
| 2,0 | 0,052 |
| 4,0 | 0,098 |
| 5,0 | 0,125 |
| 8,0 | 0,210 |
| 10,0 | 0,245 |
| 12,0 | 0,303 |
| 14,0 | 0,365 |
| 16,0 | 0,390 |

Esses dados foram plotados no gráfico representado na Figura 1 e foi feita a regressão linear desses pontos para se obter uma equação de reta que correlacione a absorbância medida pelo espectrofotômetro e a concentração de albumina. O coeficiente linear dessa equação apesar de diferente de zero apresenta um valor baixo. A equação obtida é a seguinte:

$$\text{Absorbância} = 0,025 * (\text{massa de albumina}) + 0,0018 \quad (\text{Eq.1})$$

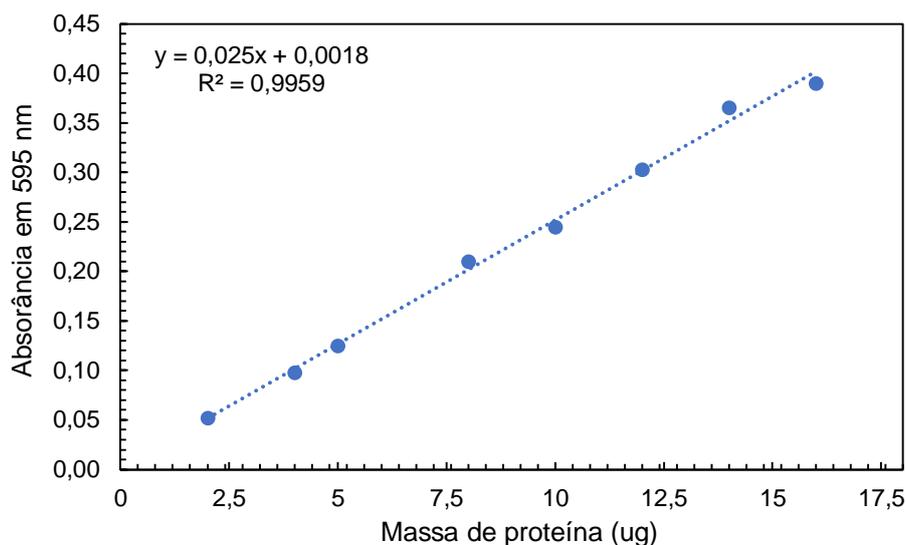


Figura 1. Curva de absorvância do reagente de Bradford em função da massa de albumina (microgramas) seguindo os dados da tabela 2.

Em seguida, foram medidas as absorvâncias das amostras A1, A2, A3 e A4, e seus valores foram substituídos na equação 1 para encontrar a massa correspondente, que foi multiplicada pelo fator de diluição para encontrar a massa total de proteínas (Tabela 3).

Tabela 3. Dados de absorvância das amostras A1, A2, A3 e A4 seguido de suas respectivas concentrações de proteína

| Amostra | Absorvância média | Massa de proteína (ug) | Fator de diluição | Massa total de proteína (g) |
|----------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| A1 | 0,302 | 12,01 | 1000 | 12,01 |
| A2 | 0,148 | 5,85 | 2000 | 11,70 |
| A3 | 0,085 | 3,33 | 3333 | 11,10 |
| A4 | 0,062 | 2,41 | 5000 | 12,05 |

Observa-se que a quantidade total de proteínas presentes no lisado é de 11,72, resultado obtido através da média de A1, A2, A3 e A4. Entretanto, observando a absorvância média, as amostras A1, A2 e A4 apresentam valores mais próximos à média quando comparado com A3. Essa discrepância, por sua vez, pode estar relacionada à maior incerteza associada à pipetagem de volumes pequenos bem como, no caso de A1, à proximidade ao primeiro ponto da reta da curva padrão podendo estar condicionada ao limite de detecção da técnica.

Dessa maneira, considerando apenas a média entre A1, A2 e A4 obtém-se uma média de 11,92.

4. Conclusão (Máximo de 2 parágrafos. Conclusão não é resumo.)

A partir do ensaio de quantificação de proteínas pelo reagente de Bradford e do lisado, as amostras de modo geral convergiram para um mesmo valor de massa proteica. Mostra-se importante compreender esse fator para que em práticas seguintes de medida de atividade enzimática se possa determinar o conteúdo proteico da amostra e dessa forma estimar a atividade específica da α -glicosidase.