

AULA PRÁTICA 1

Fazer uma introdução, na forma de redação falando sobre as funções biológicas das proteínas, seus constituintes e sua estrutura tridimensional. Nesse texto explique ainda como os aminoácidos estão classificados, o que é uma ligação peptídica e quais as forças que mantêm cada nível estrutural de uma proteína.

Aula prática:

Essa aula terá duas partes. Na primeira parte será fornecido aos grupos 2 soluções desconhecidas (solução 1 e 2) que deverão ser submetidas a 2 reações características das proteínas e aminoácidos. Ao final dessa parte o aluno deverá sugerir os componentes das soluções desconhecidas (aminoácidos ou proteínas) e realizar a segunda parte da aula (dosagem de proteína) utilizando somente a solução proteica identificada.

Em primeiro lugar coloque aproximadamente 200 ml de água em um becker de 1000ml e coloque para ferver em um bico de Bunsen. Execute agora as reações abaixo com a solução 1 e 2.

Parte 1 – Identificação de aminoácidos e proteínas

1. Colocar 2 mL de cada uma das soluções em diferentes tubos de ensaio marcados de 1 e 2, em um terceiro tubo colocar 2 ml de água. Aquecer os tubos em banho-maria de água fervente por 5 minutos. Observar o resultado e anotar o que ocorreu.
2. Colocar 2 mL de cada uma das soluções em diferentes tubos de ensaio marcados de 1 e 2, em um terceiro tubo colocar 2 ml de água. Adicionar a cada tubo 5 gotas da solução de NaOH 2,5N e, depois, cuidadosamente, gota a gota, a solução de sulfato cúprico, agitando o tubo após a adição de cada gota, até que a solução tome cor violeta. Anote quais os tubos deram reação positiva (violeta) para essa reação (Reação de Biureto).
3. Colocar 5 mL de cada uma das soluções em diferentes tubos de ensaio marcados de 1 e 2, em um terceiro tubo colocar 5 ml de água. Adicionar nos tubos 0,5 mL da solução de ninidrina e ferver por 2 minutos em banho fervente. Se o teste for positivo, desenvolver-se-á uma cor violeta (Reação de Ninidrina)

Resultados e Discussão: Descrever os resultados em uma tabela e determinar qual é a solução de proteína justificando sua resposta considerando o princípio de cada reação utilizada.

Parte 2 – Dosagem de proteínas (BIURETO) Sensibilidade: 1 a 10 mg/mL

A. SOLUÇÕES

b) Reagente de Macrobiureto

- 2,5g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 500 mL de água destilada
- 50 mL de NH_4OH concentrado ($\pm 15 \text{ M}$)
- 180 g de NaOH em xarope frio
- esfriar e completar o volume para 1000 mL com H_2O destilada

- b) Solução de soroalbumina – reta padrão
 Solução aquosa com 10 mg/mL de soroalbumina bovina fração V.

B. PROCEDIMENTO

Montar o seguinte protocolo em tubos numerados de 1 a 8.

Tubo	H ₂ O (mL)	Soroalbumina		Reagente (mL)	Absorbância (540 nm)
		mL	mg		
1	1,0	0	0	4	zero
2	0,9	0,1	1	4	
3	0,8	0,2	2	4	
4	0,6	0,4	4	4	
5	0,4	0,6	6	4	
6	0,2	0,8	8	4	
7	-	1,0	10	4	
8	0,5	0,5mL Solução proteína*		4	

*Solução de proteína determinada na parte 1 da aula pratica.

Esperar 15 minutos a temperatura ambiente e ler a absorbância a 540 nm.

C. ANÁLISE DOS RESULTADOS

a) Solução Gráfica

Utilização papel milimetrado, colocar na forma de gráfico os dados de quantidade de proteína (mg) na abcissa e da absorbância a 540 nm na ordenada. Através do gráfico determinar a concentração de proteína na solução desconhecida.

b) Solução Matemática

Utilizando os valores do teor de proteína padrão e os valores da absorbância, determine a equação da reta que melhor represente os resultados obtidos usando o método de ajuste de dados dos quadrados mínimos.

Reta: $y = ax + b$, onde:

$$a = \frac{\sum(x) \sum(y) - n \sum(xy)}{(\sum x)^2 - n \sum(x^2)}$$

$$b = \frac{\sum(x) \sum(xy) - \sum(x^2) \sum(y)}{(\sum x)^2 - n \sum(x^2)}$$

A partir da equação da reta, determine a concentração da proteína na solução desconhecida (mg/mL).

Compare o resultado observado entre as duas formas de análise de dados e discuta sobre elas.

AJUSTE DE DADOS EXPERIMENTAIS PELO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS PARA FUNÇÕES LINEARES

O cálculo do valor de x através de retas traçadas pelos pontos obtidos experimentalmente pode nos levar a erros consideráveis, como resultados da posição subjetiva da reta através dos pontos. Uma função linear está menos sujeita a erros do que uma função não linear. Nesta, os valores experimentais podem diferir de uma certa porcentagem do valor real quando se utiliza os mesmos dados.

Os erros na representação gráfica se eliminam quando se utiliza o método dos quadrados mínimos, que é um processo mais seguro para se obter a função diretamente dos dados experimentais. No método dos quadrados mínimos se escolhe os coeficientes a e b de uma equação de reta $y = ax + b$, de maneira que a soma dos desvios ao quadrado seja mínima. O desvio S definido por:

$$ax + b - y = S$$

onde a equação exata da reta é:

$$ax + b - y = 0$$

Utilizando estes conceitos, os coeficientes a e b podem ser calculados pelos dados experimentais da seguinte forma:

$$a = \frac{\Sigma(x) \Sigma(y) - n \Sigma(xy)}{(\Sigma x)^2 - n \Sigma(x^2)}$$

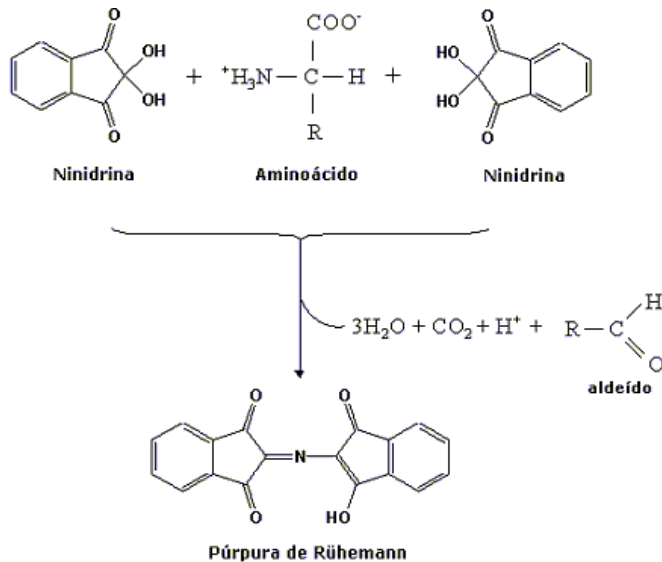
$$b = \frac{\Sigma(x) \Sigma(xy) - \Sigma(x^2) \Sigma(y)}{(\Sigma x)^2 - n \Sigma(x^2)}$$

Para esse tipo de problema, uma tabulação especial dos dados facilitará a resolução. Os resultados experimentais obtidos, assim como os termos calculados, estão na tabela seguinte:

x	Y	x ²	xy
Σx	Σy	Σx^2	Σxy

Reações Colorimétricas para proteínas

Reação de ninidrina - A ninidrina (2,2-diidroxi-hidrindeno-1,3-diona) é um produto químico utilizado para a detecção de aminas primárias, particularmente de aminoácidos. Ao reagir com essas aminas livres, uma cor azul escura ou roxa, conhecida como púrpura de Ruhemann é produzida.



Reação de Biureto - O reagente de biureto é um reagente analítico feito de hidróxido de potássio (ou de sódio) e sulfato de cobre (II) ($CuSO_4$), junto com tartarato de sódio e potássio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$). Este reagente de coloração azul torna-se violeta na presença de proteínas e peptídeos com três ou mais resíduos de aminoácidos. A reação é também positiva para as substâncias que contém 2 grupos carbamínicos ($-CO-NH_2$) ligados diretamente ou através de um único átomo de carbono ou nitrogênio. O hidróxido de potássio ou sódio não participa na reação, mas meramente provê um meio alcalino no qual a reação ocorre.

O reagente é comumente usado em um ensaio colorimétrico para a determinação de concentração de proteínas—tal como a espectroscopia UV/visível no comprimento de onda de 540 nm (para a detecção do íon Cu^{2+}).

