

ALGUMAS PRÁTICAS DE BIOQUÍMICA NO CURSO DE AGRONOMIA (PARTE I)

Bruno Marcos Nunes Cosmo¹

Tatiani Mayara Galeriani²

Resumo

Dentro do curso de Agronomia em diversas Universidades já houveram ou ainda ocorrem práticas na disciplina de bioquímica, umas das disciplinas base para as disciplinas específicas do curso que iram trabalhar com o metabolismo e as reações fisiológicas das plantas ou afins. Nesse contexto o seguinte trabalho que é a Parte I de um conjunto de três trabalhos traz quatro das práticas que podem ser realizadas na disciplina de bioquímica, dentro do curso de Agronomia.

Palavras Chave: Agronomia, bioquímica, práticas.

Abstract

Within the Agronomy course in various universities there have been or still occur practice in biochemistry discipline, one of the disciplines base for the specific course subjects that iram work with the metabolism and physiological reactions of plants or the like. In this context the following work is Part I of a set of three works has four practices that can be performed in biochemistry discipline within the Agronomy course.

Keywords: agronomy, biochemistry, practices.

¹ Graduando no curso de Agronomia na Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

² Graduanda no curso de Agronomia na Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

PRÁTICA 01: PH E TAMPÕES

Introdução

O pH é a escala que mede o potencial hidrogeniônico, índice que indica a acidez, neutralidade e alcalinidade das substâncias. Nos sistemas biológicos, o pH tem grande importância. Moléculas biológicas (exemplo: proteínas e ácidos nucleicos), têm grupos funcionais como: carboxílico e amino, que sofrem reações ácido - básico. Muitas propriedades dessas moléculas variam conforme o pH das soluções onde estão imersas (VOET; VOET, 2006, p. 44). Outro aspecto do pH são as soluções tampões, descritas a seguir:

Solução tampão é uma solução que resiste a adição de ácidos ou bases, eles tem grande importância nos sistemas biológicos. "A adição de uma gota de 0,01 mL de HCl 1 M a 1 L de água pura muda o pH da água, de 7 para 5, o que representa um aumento de 100 vezes na H^+ ." (VOET; VOET; PRATT, 2008, p. 35). Geralmente, essa mudança seria intolerável para vários sistemas biológicos, já que pequenas mudanças no pH, afetam as funções e estruturas das moléculas, por isso é importante a manutenção de um pH constante para os sistemas vivos (VOET; VOET; PRATT, 2008, p. 35).

"Líquidos biológicos, intracelulares e extracelulares, são altamente tamponados. Por exemplo, o pH do sangue em indivíduos saudáveis e rigorosamente controla em 7,4." (VOET; VOET; PRATT, 2014, p. 36). Outro exemplo é o próprio solo.

Indicadores como o indicador universal, promovem as mudanças de coloração das substâncias conforme o pH varia. O indicador universal é obtido através da mistura de vários indicadores, por exemplo, laranja e vermelho de metila, fenolftaleína e álcool etílico (PETKOWICZ, 2007, p. 22).

Os objetivos da aula prática foram, determinar o pH de soluções, através de uma escala de variação de cores conforme o pH (métodos colorimétricos) e relacionar os conhecimentos adquiridos sobre sistemas tampões que tenham importância biológica.

Material e Métodos

Utilizou - se vários materiais para os experimentos, que serão descritos a seguir. Indicadores de pH (indicador universal) que mede o pH através da mudança de coloração (método colorimétricos). Soluções tampões (com pHs entre 3 a 10), que mantém o pH constante, mesmo com adição de ácidos ou bases. Substâncias como Hidróxido de sódio (0,1 mol/L) e Ácido clorídrico (0,1 mol/L) para tentar promover a mudança do pH da solução tampão. Além de água destilada, conta gotas, pipetas volumétricas de 2 ml e 10 ml e o pipetador, tubos de ensaio, estante para tubos de ensaio, erlenmeyer.

Quanto a metodologia, primeiramente, fizemos a escala padrão, com a marcação de 8 tubos de ensaio com pH de 3 a 10. Nesses 8 tubos foram colocados 1 mL de solução tampão de pH entre 3 a 10, adicionamos também 5 gotas do indicador universal e por último adicionando 9 mL de água destilada. Estes tubos servirão de escala para indicar o pH nos experimentos I e II, por meio da coloração.

O experimento I, consistiu em preparar quatro tubos de ensaio com: Tubo 1: 5 gotas de indicador mais 10 mL de água destilada; Tubo 2: 5 gotas de indicador, mais 1 mL de tampão (pH 7), mais 9 mL de água destilada; Tubo 3: 5 gotas de indicador, mais 10 mL de água destilada; Tubo 4: 5 gotas de indicador, mais 1 mL de tampão (pH 7), mais 9 mL de água destilada. Depois de preparados, foi observado e determinado o pH por meio da escala padrão.

O experimento II, consistiu em utilizar os tubos do experimento I é adicionar mais alguns elementos as soluções obtidas anteriormente, então temos: Tubo 1: Adicionamos 1 gota de NaOH 0,1 mol/ L; Tubo 2: Adicionamos 1 gota de NaOH 0,1 mol/ L; Tubo 3: Adicionar 2 gotas de HCl 0,1 mol/ L; Tubo 4: Adicionar 2 gotas de HCl 0,1 mol/ L.

Depois de determinar o pH de todos os tubos, procedemos da seguinte forma: No tubo 1 durante 15 segundos foi soprado o ar expirado e no tubo 2 por 60 segundos fez - se a mesma operação, afim observar a mudança de

coloração. No tubo 4 foi adicionado gota a gota de HCl até que a coloração fosse a mesma do tubo 3.

Resultados e discussão

Tabela I. Escala padrão:

pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
Vermelho	Salmão	Laranja	Amarelo	Verde	Verde Azulado	Azul Fraco	Roxo

Tabela II. Experimentos:

Experimentos	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
I	pH 7	pH 7	pH 7	pH 7
II	pH 9,5	pH 7	pH 4	pH 7
Obs:	Soprar 15 segundos	Soprar 60 segundos	-----	Adição de 36 gotas de HCL
Resultado:	pH 7,5	pH 7	pH 4	pH 4

Na tabela I, a coloração variou conforme o pH.

No experimento I, todos os tubos apesar de haverem 2 tipos de mistura, apresentaram pH 7 (cor verde), a diferença é que o tubo 2 e 4 continham solução tampão.

No experimento II, o tubo 1 mudou de coloração pela injeção de CO₂, quanto mais CO₂ fosse injetado, mais ácida ficaria a solução (formação de Ácido Carbônico). No tubo 2 como havia solução tampão mesmo soprando por 60 segundos não houve mudança de pH, caso fosse injetada uma alta quantidade de CO₂, poderíamos romper a solução tampão. No tubo 3 não foi feita operação nenhuma. E no tubo 4 adicionou - se HCl até que o pH fosse igual ao do tubo 3 (36 gotas), combatendo a solução tampão.

Considerações finais

Constatou - se que a cada variação de pH a coloração dos tubos era diferente, é que com o uso das soluções tampão era preciso uma adição muito maior de substâncias para mudar o pH da solução.

No tubo 4 era esperada a coloração do tubo 3 com a adição de 16 a 18 gotas de HCl, mas foram preciso 36 gotas para atingir o resultado esperado, isso pode ter acontecido por uma adição maior talvez de solução tampão.

Referências bibliográficas

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica (A vida em nível molecular)**. 2ª ed. Porto Alegre. Artmed, 2008. 1264 p.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica (A vida em nível molecular)**. 4ª ED. Porto Alegre. Artmed, 2014. 1168 p.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3ª ed. Porto Alegre. Artmed, 2006. 1616 p.

PETKOWICZ, C. L. O. et al. **Bioquímica (aulas praticas)**. 7ª ed. Curitiba. UFPR, 2007. 188 p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5ª ed. Porto Alegre. Artmed, 2011. 1274 p.

PRÁTICA 02: DETERMINAÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE CORANTES E CONSTRUÇÃO DE CURVA PADRÃO

Introdução

Os fotcolorímetros são os aparelhos que realizam as medidas da concentração de soluções por meio da intensidade da luz absorvida ou transmitida por elas, eles são constituídos por: fonte luminosa, filtro de luz, diafragma ajustável, cuba para solução em análise, célula fotoelétrica que recebe a luz transmitida pela solução e um dispositivo para medir a resposta mesma. A leitura da absorbância ou da transmitância é feita diretamente na escala de um galvanômetro. Antes de efetuar leituras, deve-se acertar-se o ponteiro do galvanômetro em 0 de A ou 100% de T, utilizando uma prova em branco, (geralmente água destilada) (UFPR, 1993, p. 36).

A luz é uma reação eletromagnética, e essa é a parte do espectro que podemos ver, por exemplo, um prisma atravessado por um feixe de luz branca (solar) decompõe as cores do arco-íris, denominadas cores do espectro visível. A luz solar emite radiação com comprimentos de ondas que vão desde o ultravioleta, passando pelo visível (400 a 700 nm), até o infravermelho. Também temos outras radiações como os raios-X mais energéticos que a ultravioleta e mais penetrante (MELCHIADES; BOSCHI, 1999, p.12).

O DNS - ácido di-nitro salicílico (coloração amarela), é um método de determinação de glicose em amostras líquidas, baseado na leitura da absorbância a 540nm do complexo formado pela glicose com o DNS. Esse complexo dá à solução um tom tão vermelho quando maior for a quantidade de glicose (BIAZUS; SOUZA; SANTANA, 2007, p. 156). Para prepara-lo dissolver 10,6 g de ácido 3,5 dinitrossalicílico e 19,8 g de NaOH em 1416 mL de água destilada. Em seguida adicionar 7,6 mL de fenol e 8,3 g de metabissulfito de sódio (MALDONADE; CARVALHO; FERREIRA, 2013, p. 2).

O objetivo da aula foi definir o comprimento de onda onde acontece a absorção máxima do espectro da oxidação da glicose, entender por que isso acontece e construir uma curva padrão.

Material e Métodos

Na aula de hoje utilizamos materiais como a solução de glicose 10 $\mu\text{mol/L}$, reagente DNS para corar a glicose e permitir observar a sua absorção. O espectrofotômetro para fazer a medida dessa absorção. Além de materiais como pipetas volumétricas de 1 mL, pipetador, tubos de ensaio para colocar a mistura, estante para estes tubos, erlenmeyer. Agitador magnético com aquecimento para aquecer os tubos de ensaio com a mistura, béquer que foi posto encima do agitador para colocar os tubos e água destilada.

A metodologia da aula começou com o preparo de 6 tubos de ensaio com concentrações diferentes de glicose. Como mostrados na tabela.

Tabela 01. Soluções com concentrações diferentes de Glicose

Tubos	Preparo (1 mL de reagente DNS em todos)
Tubo B	0 mL da solução de glicose mais 1 mL de água destilada
Tubo 1	0,2 mL da solução de glicose mais 0,8 mL de água destilada
Tubo 2	0,4 mL da solução de glicose mais 0,6 mL de água destilada
Tubo 3	0,6 mL da solução de glicose mais 0,4 mL de água destilada
Tubo 4	0,8 mL da solução de glicose mais 0,2 mL de água destilada
Tubo 5	1 mL da solução de glicose mais 0 mL de água destilada

Depois de preparados os tubos foram levados para banho Maria no agitador por cerca de 5 minutos. Depois os tubos 2 e 4 foram usados para determinar a absorbância de cada um no espectrofotômetro, em diferentes comprimentos de onda e determinar o comprimento com máxima absorção.

Depois de determinado, era hora de realizar a medida nos demais tubos, utilizando o tubo B como branco para calibrar o aparelho em uma transmitância de 100 % e absorvância em 0. Depois de feitas as medidas as mesmas foram organizadas em tabelas, para posterior cálculo da concentração de glicose e quantidade de glicose de cada uma, e com esses dados por fim construir a curva padrão.

Resultados e discussão

Tabela 02. Determinação do comprimento de onda com melhor absorção

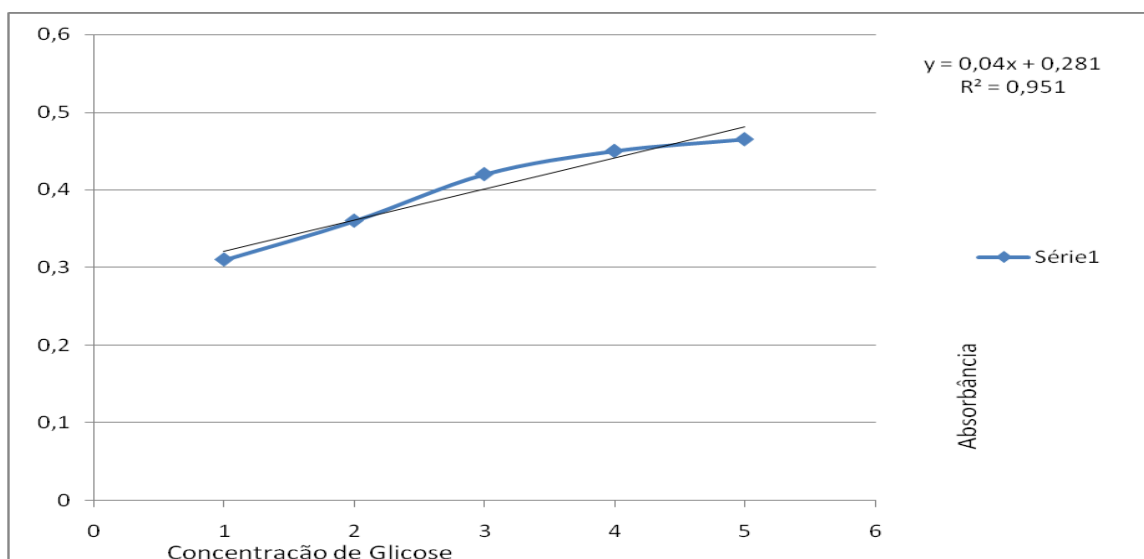
Comprimento de onda nm	420	470	520	570	630	680
Tubo 2	0	0,06	0,30	0,33	0,11	0,05
Tubo 4	0	0,06	0,32	0,44	0,23	0,11

Como mostrado o comprimento de onda com a máxima absorção é 570 nm.

Tabela 03. Concentração e quantidade de glicose e absorvância.

Tubos	Concentração de glicose $\mu\text{mols/mL}$	Quantidade de glicose μmoles	Absorvância 570 nm
B	0	0	0
1	1	2	0,31
2	2	4	0,36
3	3	6	0,42
4	4	8	0,45
5	5	10	0,465

Gráfico 01. Curva padrão.



Quanto mais o R^2 se aproxima de 1 mais preciso é o gráfico, o nosso resultado foi de 0,951, possivelmente ele não foi melhor por algum erro ou no momento da pipetagem de alguma das substâncias ou no momento da medida, poderia haver resíduos nos tubos que foram medidos.

Considerações finais

Com este experimento é possível ver que usando o indicador DNS, quanto mais uma solução que possua glicose tender para o vermelho, maior é a concentração da mesma na solução. E que conseqüentemente quanto maior a concentração também temos valores maiores de absorção.

Referências bibliográficas

Universidade Federal do Paraná - UFPR. **Bioquímica: aulas práticas**. 3ª ed. Curitiba. UFPR, 1993. 116 p.

MALDONADE, I. R.; CARVALHO. P. G, B.; FERREIRA, N. A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS**. Comunicado Técnico. 2013. 4 p. Disponível em <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes2013/cot_85.pdf> Acessado em 01 de Setembro de 2014.

BIAZUS, J.P.M.; SOUZA, R.; SANTANA, J.C.C. **Desenvolvimento de kits para análise de níveis de glicemia em pacientes com suspeita de diabete *mellitus***. Vol. 5, nº 1. Exacta. São Paulo. 2007. 155-161 p. Disponível em <http://www.uninove.br/PDFs/Publicacoes/exacta/exactav5n1/exacta_v5n1_3n33.pdf> Acessado em 02 de Setembro de 2014.

MELCHIADES, F.G; BOSCHI, A. O. **Cores e Tonalidades em Revestimento Cerâmicos**. São Carlos – SP. 1999, p. 11 - 18. Disponível em <http://www.ceramicaindustrial.org.br/pdf/v04n16/v4n16_2.pdf> Acessado em 02 de Setembro de 2014.

PRÁTICA 03: PROTEÍNAS: REAÇÕES DE CARACTERIZAÇÃO E PRECIPITAÇÃO

Introdução

Nos procedimentos de precipitação de proteínas por adição de sais neutros, deve - se verificar a concentração deste sal na solubilidade da proteína, a exemplo o de sal neutro temos o NaCl. A adição dos sais aumenta a força iônica do sistema. Os íons carregados da dissociação do sal passa a interagir com as moléculas proteicas, diminuindo a interação entre as moléculas da proteína. Assim aumentando a solubilidade da proteína em meio aquoso, o nome desse fenômeno é salting-in (NORONHA, 2010, p. 4).

Em altas força iônicas, conseguidas pela adição de grandes quantidades de um sal muito solúvel (por exemplo, sulfato de amônio) a um solução de proteína, pode ocorrer a remoção da água de hidratação das moléculas, o que leva á predominância da interação proteína - proteína, resultando em precipitação, efeito chamado salting - out (UFPR, 1993, p. 32).

A precipitação de proteínas pela alta concentração de sais é um processo muito importante para a separação de misturas complexas de proteínas, uma vez que a concentração de sal necessária para precipitação é diferente para cada tipo de proteína (RAIMUNDO JUNIOR, 2005, p. 1).

O objetivo da aula foi determinar se havia presença de proteínas ou não nas soluções, por meio de reações de coloração, precipitação e desnaturação das proteínas e também por meio do efeito da adição de sais sobre a solubilidade das proteínas.

Material e Métodos

Na aula prática de hoje utilizamos materiais como as pipetas volumétricas (1, 2 e 5 mL), pipetador, conta - gota, tubo de ensaio, estante, aquecedor, erlenmeyer, água destilada, proteína a 10%, ninhidrina que serve para corar átomos (aminoácidos) livres ela precisa que os mesmo não estejam em ligação para serem corados (coloração violeta), o biureto é outro corante que ao contrario do anterior, precisa das ligações peptídicas (são estas que ele colore de lilás). Os outros materiais foram ácido tricloroacético 10%, acetato de chumbo 5 %, álcool etílico (etanol), NaCl 1mol/L, solução contendo precipitação esbranquiçada de proteína e sulfato de amônio.

A metodologia iniciou-se com preparo de alguns tubos de ensaio contendo reação de coloração, reação de precipitação e efeitos da adição de sais sobre a solubilidade da proteína. O experimento I (reação de coloração), foram preparados três tubos de ensaio. Conforme mostrado na tabela 01.

Tabela 01. Reações de coloração

Tubos	Mistura
1	2 mL de ninhidrina mais 5 gotas de proteína a 10 % *
2	1 mL de proteína a 10 % mais 1 mL do reativo biureto
3	1 mL de água destilada mais 1 mL do reativo biureto

* Levar a banho Maria e ferver por 5 minutos.

No experimento II (reação de precipitação), foram preparados 4 tubos contendo proteína e outros reagentes. Tubo 4 com temperatura elevada, tubo 5 com ácido forte, tubo 6 com sal de metal pesado, e tubo 7 com solvente orgânico. Conforme a tabela a seguir.

Tabela 02. Reações de precipitação.

Tubos	Mistura
4	2 mL de proteína a 10 % *
5	1 mL de proteína a 10 % mais ácido tricloroacético 10%
6	1 mL de proteína a 10 % mais 1 mL de acetato de chumbo 5%
7	1 mL de proteína a 10 % mais 3 mL de álcool etílico

* Aquecer em banho Maria fervente (3 minutos)

No experimento III, foram preparados dois tubos. Conforme a tabela.

Tabela 03. Efeito da adição de sais sobre a solubilidade da proteína

Tubos	Mistura
8	2 mL de solução contendo precipitado esbranquiçado de proteína mais NaCl 1 mol/L gota a gota, até o precipitado redissolver
9	2 mL da solução do tubo 8 mais aproximadamente 4 mL de solução saturada de sulfato de amônio. Observar.
Obs:	Depois adicionar 4 a 6 mL de água destilada (no tubo 9). Observar.

Resultados e discussão

Tabela 04. Resultados de todos os experimentos.

Tubos	Resultados
1	Violeta
2	Lilás
3	Transparente
4	Branco leitoso (Desnaturação da proteína)
5	Branco leitoso (Precipitação da proteína)
6	Branco leitoso (Desnaturação e precipitação)
7	Branco leitoso (Precipitação) Depois de algum tempo, separa em 2 fases
8	Transparente (Solúvel)

9	Esbranquiçado (Precipitou)
Obs.:	Transparente (Solúvel novamente)

O experimento I, no tubo 1 quando fervemos a proteína a banho Maria, quebramos a mesma e deixamos seus aminoácidos livres e assim a ninhidrina pode corar os mesmos, a proteína perde a função biológica. No tubo 2 como a proteína é mantida intacta o biureto é capaz de corar as ligações peptídicas. No tubo 3, como a água não tem proteínas, o tubo permanece transparente, com uma leve azulagem, mas do próprio corante, sem ser coloração de proteína.

O tubo 4 pertence ao experimento II, ocorre a desnaturação da proteína, sua conformação é modificada e essa modificação é irreversível. O tubo 5 o ácido muda a configuração da proteína, pela perda das pontes de Hidrogênio, mas essa mudança é reversível. O tubo 6 como o chumbo é um metal pesado, ele se liga as proteínas e esta ligação é metálica e permanente, formando sais, assim a proteína se desnatura e precipita. O tubo 7, o álcool desidrata a proteína e precipita a mesma, o que significa que o processo é reversível, durante a aula mesmo notava -se que a solução se separa em duas fases uma leitosa e uma transparente.

No experimento III, o tubo 8 foram adicionadas 6 gotas de NaCl para redissolver a proteína, como dito na introdução baixas quantidades de sais neutros aumentam a solubilidade das proteínas em meio aquoso. No tubo 9, usamos a solução do tubo 8 e adicionamos o sulfato de amônio, o qual aumentou muito a concentração de sais, e que conseqüentemente faz a proteína precipitar já que aumenta a interação proteína-proteína. Quando adicionamos mais água a este tubo, reduzimos essa interação e diminuimos novamente a concentração de sais e com isso aumentamos novamente a solubilidade da proteína.

Considerações finais

Conforme podemos perceber as proteínas mudam sua coloração, precipitação ou desnaturação conforme a adição de diferentes reagentes. E os sais também podem interferir na solubilidade das proteínas, claro que quantidades diferentes de sais são necessários para ter os mesmos efeitos em diferentes proteínas. No tubo 8 adicionamos 6 gotas de NaCl, mas esta quantidade poderia ser maior ou menor dependendo da concentração de proteína que houvesse na amostra que utilizamos.

Referências bibliográficas

NORONHA, V. **Relatório bioquímica - proteínas, caracterização**. Curso de biotecnologia - UFC. 2010. 12 p. Disponível em <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABr8IAL/relatorio-bioquimica-proteinas-caracterizacao>> Acessado em 07 de Setembro de 2014.

Universidade Federal do Paraná - UFPR. **Bioquímica: aulas práticas**. 3ª ed. Curitiba. UFPR, 1993. 116 p.

RAIMUNDO JUNIOR. **Aula 06 – Solubilidade de Proteínas**. Goiás. pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2005. 2 p. Disponível em <<http://professor.ucg.br/siteDocente/admin/arquivosUpload/15531/material/Roteiro%2005%20Solubilidade%20de%20proteinas.pdf>> Acessado em 08 de Setembro de 2014.

PRÁTICA 04: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Introdução

As proteínas desempenham papéis extremamente importantes, na maioria dos processos biológicos, atuando como enzimas, hormônios, neurotransmissores, transportadores através das membranas celulares e outros, assim é preciso que se desenvolvam metodologias para determinar sua concentração visto que estas tem grande relevância em diversas áreas como no diagnóstico de certas doenças correlacionadas com a alteração da quantidade de proteínas nos fluidos biológicos, em nutrição animal, nutrição humana (dentro disso problemas como obesidade, anorexia, desnutrição entre outros), sem falar em outras áreas que determinar a concentração de proteína de uma solução se torna importante (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998, p. 787).

Os teores de proteína encontrados no leite podem variar de espécie para espécie ou até dentro da mesma espécie, podemos exemplificar que o leite de vaca tem cerca de 3,5 % de proteína, o leite humano 1,6%; de cabra 4,3 %, de porca 5,9%, de ovelhas 6,5 %, e o leite de cachorra 7,1 % (SGARBIERI, 2005, p.44). Na constituição do leite há três proteínas importantes: caseína (85% da proteína do leite bovino e 25% do humano), a lacto albumina e a lacto globulina (UFPR, 2005, p. 83).

O objetivo desta prática é reconhecer a importância que métodos espectrofotométricos tem para determinar a concentração de diferentes compostos (no caso concentração de proteína), realizar a construção da curva de calibração e determinar a concentração de proteínas, utilizando cálculos de diluição partindo de uma concentração conhecida para calcular uma desconhecida.

Material e Métodos

Na aula prática de hoje utilizamos materiais como as pipetas volumétricas (1, 2 e 5 mL), pipetador, tubo de ensaio, estante, erlenmeyer, água destilada, o biureto um corante que cora as ligações peptídicas (lilás). Os outros materiais foram o espectrofotômetro e solução padrão de proteína 5 mg/mL.

A metodologia iniciou-se com a preparação da curva de calibração, por um dos grupos (Experimento I). Os passos para a montagem da curva foram, preparar uma bateria de 6 tubos de ensaio, com os reagentes mostrados na tabela 01.

Tabela 01. Curva de Calibração

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
Reagentes (mL)						
Solução padrão de proteína (5mg/mL)	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Água destilada	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,0
Reagente do Biureto	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

Em seguida os tubos foram agitados e deixados em repouso por cerca de 10 minutos. Depois utilizamos o tubo 1 para calibrar espectrofotômetro: 0 de absorbância em 520 nm. Depois disso foram determinadas as absorbâncias das soluções dos tubos 2 até o 6. E por fim, traçar o gráfico dos mesmos.

Os demais grupos prepararam tubos para a determinação da concentração de proteína em amostra problema (Experimento II). Os passos para a montagem desse experimento foram preparar 4 tubos de ensaio, identificados como A, B, C e D, com os reagentes mostrados na tabela 2.

Tabela 02. Determinação da concentração de proteína em amostra - problema.

	Tubo A	Tubo B	Tubo C	Tubo D
Reagentes (mL)				
Amostra	0,0	1,0	0,5	0,4
Água destilada	1,0	0,0	0,5	0,6
Reagente do Biureto	5,0	5,0	5,0	5,0

Em seguida, como no experimento I, agitar e deixar os tubos 10 minutos em repouso. Determinar a absorbância das soluções desconhecidas, utilizando o tubo A para calibrar o espectrofotômetro (100% de transmitância em 520 nm). Por fim, determinar a concentração de proteína (mg/mL) a partir do gráfico do experimento I.

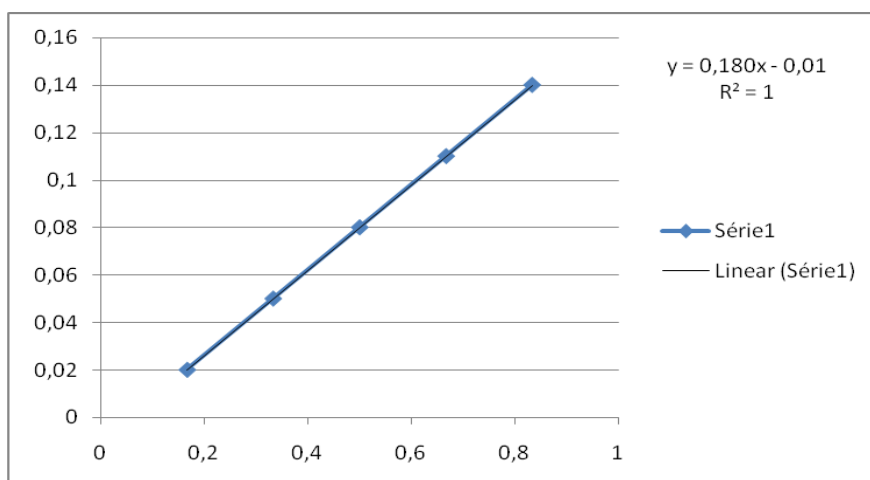
Resultados e discussão

Tabela 03. Curva de Calibração

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
Concentração de proteína $\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$	0	0,167	0,333	0,500	0,667	0,833
Absorbância (520nm)	0	0,02	0,05	0,08	0,11	0,14

A tabela 03, mostra os resultados da curva de calibração e para melhor compreendê-la, apresentamos os mesmos resultados, mas na forma de gráfico (gráfico 01).

Gráfico 01. Curva de Calibração.



A partir da curva de calibração e da equação da reta, se torna possível definir a concentração de glicose da amostra-problema. Pois partimos de uma concentração conhecida para uma concentração desconhecida, mas que a partir de agora passa a poder ser calculada, através da curva de calibração. A concentração de proteína da amostra-problema é indicada na tabela 04.

Tabela 04. Concentração de proteína em amostra - problema.

Amostra	A	B	C	D
Absorbância (520nm)	0	0,58	0,57	0,56
Concentração de proteína mg.mL ⁻¹	0	3,167	3,111	3,056

Considerações finais

Conforme pode - se perceber, medir a concentração das proteínas vem se tornando algo de interesse em varias áreas, pode - se perceber também que partindo de uma concentração conhecida de proteína e usando cálculos matemáticos. A concentração que obtivemos na amostra-problema se aproxima muito a concentração de proteína do leite, talvez alguma alteração explique essa pequena diferença na concentração.

Referências bibliográficas

Universidade Federal do Paraná - UFPR. **Bioquímica: aulas práticas**. 6ª ed. Curitiba. UFPR, 2005. 178 p.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. **DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS VIA ESPECTROFOMETRIA: VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS MÉTODOS EXISTENTES**. QUÍMICA NOVA, 21(6) (1998). 787 - 793 P. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v21n6/2914>> Acessado em 15 de Setembro de 2014.

SGARBIERI, V. C. **Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite**. Brazilian. Journal. Food Technol., v.8, n.1, p. 43-56, jan./mar., 2005. Disponível em <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0CDsQFjAD&url=http%3A%2F%2Fmoodle.stoa.usp.br%2Fmod%2Fresource%2Fview.php%3Fid%3D38848&ei=jGQaVOn4KZCSyATlw4J4&usg=AFQjCNHNOGolfIZMzMkJI3wmqy6AKK3NmW&sig2=pp0-KwTGsPe5y6m93_9liA&bvm=bv.75097201,bs.1,d.eXY> Acessado em 15 de Setembro de 2014.