



CTeSP, ANÁLISES LABORATORIAIS

Técnicas de Bioquímica



Componente Prática



CTeSP, ANÁLISES LABORATORIAIS

Técnicas de Bioquímica

QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NUMA AMOSTRA VEGETAL

Palavras chave (Caderno Laboratório): Caracterização das proteínas; metodologias de quantificação

INTRODUÇÃO

Proteínas são heteropolímeros formados por unidades menores chamadas aminoácidos. Os aminoácidos (a.a.) estão ligados em sequência formando uma cadeia polipeptídica, esta cadeia é a base da proteína e é chamada de estrutura primária.

As proteínas são extremamente importantes na nutrição porque fornecem aminoácidos essenciais ao organismo. Os aminoácidos são chamados essenciais, pois o organismo não é capaz de sintetizá-los, na digestão há a quebra da cadeia de proteínas e os aminoácidos livres são absorvidos e usados na síntese de novas proteínas. São aminoácidos essenciais: valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano, treonina, lisina, arginina, histidina.

No processamento de alimentos as proteínas também apresentam propriedades importantes como a capacidade de gelificação (gelatina), capacidade de emulsificação (proteína da gema do ovo), capacidade de retenção de água (proteína da soja).

Este protocolo está dividido em várias etapas: digestão, destilação e titulação.

1. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Objetivo – Quantificar as proteínas de tecidos vegetais

REAGENTES/MATERIAIS/EQUIPAMENTOS

Material	Reagente
Balança analítica	Ácido sulfúrico
Tubos de digestão Kjeldahl	Reagente alcalino
Sistema de digestão	Solução absorvente
	Mistura de indicadores
	Substância de calibração

Mistura catalisadora

Misturar completamente 350g de K_2SO_4 e 40g de $CuSO_4$.

Reagente alcalino – 40%

Dissolver 400g de NaOH em 1000 ml de água

Solução indicadora de ácido bórico a **4%**

dissolver 40g de H_3BO_3 em 1000ml água destilada. Preparar mensalmente.

Indicador misto: O indicador misto é uma solução de vermelho de metilo e de verde de bromocresol (0,1 g de vermelho de metilo e 0,5 g de verde de bromocresol em 100 mL de álcool etílico a 96%/0,1g de azul de metileno em 50 mL de etanol, o pH da solução é acertado a 4,5).

PROCEDIMENTO DE QUANTIFICAÇÃO

A) Procedimento para a digestão das amostras:

- 1.º Pesar 5 g de amostra húmida para um tubo Kjeldahl de 250 ml,
- 2.º Adicionar ácido sulfúrico concentrado até o ácido estiver totalmente misturado com a amostra (20 ml);
- 3.º Deixar a mistura durante a noite;
- 4.º Adicionar 2 gr da mistura catalisadora, juntamente com um anti-bumping, agitar bem;
- 5.º Inserir os tubos no digestor e ligar o aparelho até uma temperatura de 150°C durante 30 min. Subir até atingir os 350°C.
- 8.º Ferver suavemente durante 2 horas até que o ácido sulfurico tenha condensado cerca de 1/3 ;
- 9.º Assegurar que a solução não exceda os 400 °C.
- 10º Após a digestão passar o digerido para um balão de 100ml e perfazer com água destilada

B) Procedimento de destilação e determinação do azoto amoniacal:

- 1.º Ligar o destilador e proceder a uma destilação inicial, usando água para o aquecimento do sistema;
- 2.º Colocar o tubo Kjeldahl com 20 ml de amostra digerida, no sistema de destilação Kjeldahl e adicionar 30 ml de reagente alcalino (controlo => incolor – preto-azul);
- 3.º Colocar num erlenmeyer 50 ml de solução indicadora de ácido bórico a 4% e adicionar 2 gotas de indicador
- 4.º Realizar o branco por substituição da amostra e o padrão (sulfato de amónio – $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 = 1,888\text{g N/l}$);
- 5.º Proceder à destilação até recolher > 150 ml e posterior titulação

C) Procedimento de titulação:

- Titular com ácido clorídrico=0.1 N
Ponto de viragem – verde para roxo pálido

Notas:

Se desperdícios no frasco por digerir => arrastar com água destilada colocar a 150°C e depois 2h a 350 °C

Se cristalizar – aquecer num bico de bunsen

A expressão para calcular o azoto é:

$$\% \text{ Azoto} = ((v1-v0) \times C(\text{HCl}) \times 1,4)/m$$

v1 – volume gasto na titulação da amostra

v0 – volume gasto na titulação do branco

C(HCl) – concentração da solução de HCl

m – massa de amostra

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Azoto} \times 6,25$$

6,25 é o coeficiente proteico

BIBLIOGRAFIA

Berg, J.M. , Tymoczko, J.L., & Stryer, L. (2006). Biochemistry (6ª ed.). Ed. Freeman-A. Marcel Dekker, Inc., cop.

Campos, L.S.. Manual de bioquímica. Europa América, [S.d.]

Clark, J.M., Switzer, R.L. (1977). Experimental biochemistry. New York : W. H. Freeman and Company

Conn, E.E....[et al.] (1987). Outlines of biochemistry 5/E. New York : John Wiley & Sons, cop

Nelson, D.L., & Cox, M.M. (2008). Lehninger Principles of Biochemistry (5ª ed.). Ed. Worth Publishers.