

Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Viseu

CTeSP Análises Laboratoriais - 2017/2018



QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS NUMA AMOSTRA VEGETAL

TÉCNICAS DE BIOQUÍMICA

13 de novembro de 2017

Raquel Pereira 16367
Cláudia Ribeiro 16363
Francisco Carvalho 16364

Índice

Objetivo	2
Introdução	3
Material e Reagentes	6
Extração	6
Quantificação.....	6
Fracionamento e Visualização	7
Diagrama de Blocos.....	8
Cálculos Preliminares	9
1. Solução Tampão de Citrato de Sódio (pH = 3)	9
2. Solução de Albumina (1mg/mL).....	10
Resultados	11
Extração e Quantificação.....	11
Fracionamento e Visualização	13
Discussão	14
Extração e Quantificação.....	14
Fracionamento e Visualização	16
Conclusão	19
Bibliografia	20
Anexos	23
Anexo I: Interferentes do Método de Bradford	23

Objetivo

O objetivo desta atividade laboratorial é extrair as proteínas da planta do cardo (*Cynara cardunculus*), doseá-las colorimetricamente e analisar a sua composição.

Introdução

A bioquímica é a área que estuda as interações que ocorrem nos organismos vivos, isto é, o conjunto de reações químicas que permitem a sua sobrevivência, crescimento e reprodução. Assim, um dos seus objetivos é analisar a estrutura, a organização e as atividades das biomoléculas - moléculas responsáveis pela execução das reações necessárias à vida -, com o intuito de perceber quais os aspetos indispensáveis na manutenção da vida. (Motta, 2013)

O seu estudo é muito amplo e, como tal, para além de nos elucidar quanto ao papel das biomoléculas na manutenção da vida, contribui também na evolução de diversas áreas como a indústria, a agricultura e a medicina. (Marques, 2017)

Uma vez que a bioquímica está em constante interação com outras áreas científicas, a sua evolução também depende delas. Apesar da existência de estudos em química biológica desde a primeira metade do século XIX, foi a partir da segunda metade do século XX, que os estudos em bioquímica avançaram significativamente, de forma cada vez mais acentuada. O que se deve ao crescente desenvolvimento de dispositivos tecnológicos, que facilitam os estudos, bem como a sua explicação e apresentação. (Desconhecido, 2017)

Também o crécimo de conhecimento acerca das propriedades das biomoléculas, bem como, as vantagens do seu uso, tem suscitado o interesse e, conseqüentemente, diversos trabalhos de pesquisa, quanto às suas utilizações nas mais diversas áreas.

De entre as diversas áreas da bioquímica, evidencia-se a alimentar. A bioquímica alimentar tem como objetivo o estudo da composição dos alimentos e das reações que alteram as suas constituições. (Filho, 2010)

Desde plantações, armazenamento, maturação ou processamento de alimentos, desenvolvimento de produtos de alimentares, preparação e/ou cozinhar, e finalmente, a ingestão de alimentos são todos processos que envolvem alterações bioquímicas.

Assim, uma das suas aplicações é na indústria alimentar, na qual a bioquímica, com o estudo e análise da composição química dos alimentos e da funcionalidade dos nutrientes dos mesmos, procura promover a qualidade dos alimentos e a redução de

custos, aproveitando os desperdícios, prolongando o prazo de validade dos alimentos e garantindo alta qualidade nutricional. Assegurando a saúde a nível alimentar, respeitando o meio ambiente. (Teixeira, 2017)

Deste modo, as biomoléculas assumem um papel muito importante na nossa alimentação, destacando-se as proteínas, uma vez que estão presentes em quase todos os todos os processos biológicos.

A estrutura das proteínas é formada por aminoácidos. Os aminoácidos são moléculas que contêm um átomo de hidrogénio, um grupo radical variável em cada aminoácido, um grupo amina e um grupo carboxílico. Ligam-se através de ligações peptídicas, uma vez que têm a possibilidade de ligação entre o grupo carboxílico de um aminoácido com o grupo amina de outro. (Silva and SILVA, 2010)

Para além da função enzimática que garante os processos químicos, as proteínas desempenham outras funções, tais como, estruturais, estabilizante e importantes para o metabolismo energético. (Desconhecido, 2017)

Devido à funcionalidade das proteínas, isto é, a capacidade que têm de afetar os sistemas alimentares, durante o seu processamento, armazenamento, preparação e consumo, podem ser utilizadas pelas suas propriedades de coesão e adesão como espessante, coagulante, gelificante e emulsionante em produtos de padaria, pastelaria, queijo, entre outros. Como exemplo, a proteína do ovo, do leite e de cereais. (Desconhecido, 2017)

Neste seguimento, a planta cardo tem sido tradicionalmente usado no fabrico do queijo em Portugal, embora nos últimos anos tenha adquirido uma maior importância pelas indústrias de queijo no que diz respeito às suas propriedades coagulantes. Para além da indústria de queijo, tem sido aplicado também para fins terapêuticos. (Desconhecido, 2017)

As suas propriedades coagulantes devem-se às proteinases aspárticas, isto é, um grupo de enzimas bem definido e amplamente distribuído na natureza, denominadas cardosinas.

De entre as proteinases aspárticas identificadas até então, as cardosinas A e B são das que se encontram melhor caracterizadas, tanto molecularmente como

bioquimicamente. Apesar disto, apresentam uma localização diferencial nas flores de cardo, uma vez que a cardosina A encontra-se acumulada no vacúolo e a B secretada, o que as considerou um bom modelo para estudo de trânsito intracelular. (Abreu, 2009)

Assim, a planta cardo e as enzimas presentes nela têm estado no centro de muitos estudos e trabalhos de pesquisa.

Material e Reagentes

Extração

Água destilada;

Tampão de citrato de sódio 100 mM (pH = 3,0);

HCl 2,5M;

Filtros 0,2 µm;

Eppendorfs;

Centrifugadora.

Quantificação

Água destilada;

Albumina 1 mg/mL;

Extrato de proteínas (cardo);

Reagente de Bradford (ácido fosfórico 85%, Coomassie Blue G, metanol);

Cuvetes;

Pipetas;

Pompetes;

Ponteiras;

Suporte para tubos;

Tubos de ensaio;

Espectrofotômetro;

Vórtice.

Fracionamento e Visualização

Tampão de amostra ou solução desnaturante

Água desionizada;
8M Ureia;
100 mL de Tris;
200 mL de Glicina;
10% Glicerol;
2% SDS (Dodecil Sulfato de Sódio);
0,008% Azul de bromofenol;
2% (v/v) β -mercaptoetanol (adicionar no momento de uso).

Tampão de corrida (1x)

3,03 g Tris;
14,4 g Glicina;
1,0 g SDS;
100 mL Água desionizada.

Acrilamida: Bisacrilamida 40%

38,93 g Acrilamida;
1,067 g N'N'bis metilenoacrilamida;
100 ml Água desionizada.

Tris

1,5 M Tris (acertar valor de pH com HCl) pH 8,8;
0,625 M Tris (acertar valor de pH com HCl) pH 6,8.

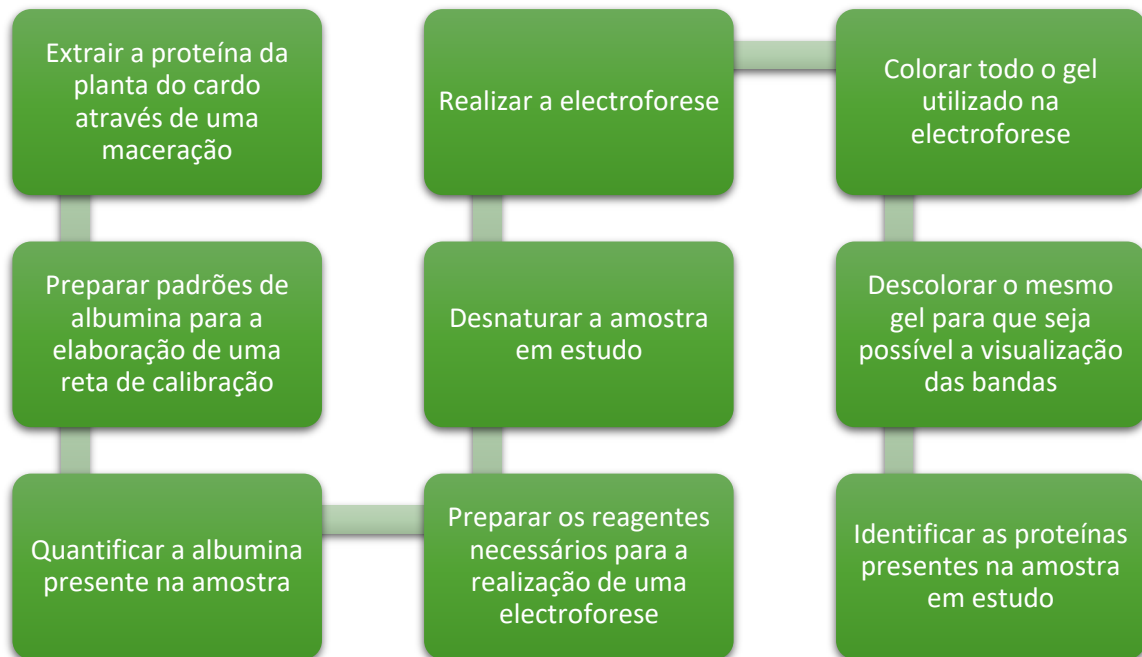
Solução de coloração/corante

0,4% de Coomassie Brilliant Blue (m/v);
50% de Etanol (v/v);
10% de Ácido acético (v/v);
Água destilada.

Solução de descoloração/descorante

25% de Etanol (v/v);
5% de Ácido acético (v/v).

Diagrama de Blocos



Cálculos Preliminares

1. Solução Tampão de Citrato de Sódio (pH = 3)

$$[\text{Citrato de Sódio}] = 0,1\text{M}$$

$$V = 25 \text{ mL}$$

$$\text{pKa}_1 = 3,15$$

$$\text{pKa}_2 = 4,77$$

$$\text{pKa}_3 = 6,40$$

$$3 = 3,15 + \log_{10} \frac{0,1}{x} \leftrightarrow \log_{10} \frac{0,1}{x} = 3 - 3,15 \leftrightarrow \log_{10} 0,1 - \log_{10} x = -0,15 \leftrightarrow$$

$$\leftrightarrow \log_{10} x = -(-0,15 + 1) \leftrightarrow x = 10^{-0,85} \leftrightarrow$$

$$\leftrightarrow x = 0,14\text{M}$$

$$[\text{Ácido Cítrico}] = 0,14\text{M}$$

$$C = \frac{n}{V} \leftrightarrow 0,14 = \frac{n}{25 \times 10^{-3}} \leftrightarrow n = 0,0035 \text{ mol de ácido cítrico}$$

$$n = \frac{m}{MM} \leftrightarrow 0,0035 = \frac{m}{210,44} \leftrightarrow m = 0,735\text{g de ácido cítrico}$$

$$[\text{Citrato de Sódio}] = 0,1\text{M}$$

$$C = \frac{n}{V} \leftrightarrow 0,10 = \frac{n}{25 \times 10^{-3}} \leftrightarrow n = 0,0025 \text{ mol de citrato de sódio}$$

$$n = \frac{m}{MM} \leftrightarrow 0,0025 = \frac{m}{294,10} \leftrightarrow m = 0,735\text{g de citrato de sódio}$$

2. Solução de Albumina (1mg/mL)

V = 10 mL

$$C = \frac{m}{V} \leftrightarrow 1 = \frac{m}{10} \leftrightarrow m = 10 \text{ mg} = 0,01 \text{ g de albumina}$$

Resultados

Extração e Quantificação

- $m_{\text{cardo}} = 1,000\text{g}$
- **pH solução tampão = 3,88**

Tabela 1: Absorvância de todos os padrões preparados num comprimento de onda de 595 nm.

Padrão	$V_{\text{albumina}} (\mu\text{L})$	$m_{\text{albumina}} (\text{mg})$	Absorvância (595 nm)
1	10	0,01	0,15
2	20	0,02	0,30
3	30	0,03	0,40
4	40	0,04	0,50

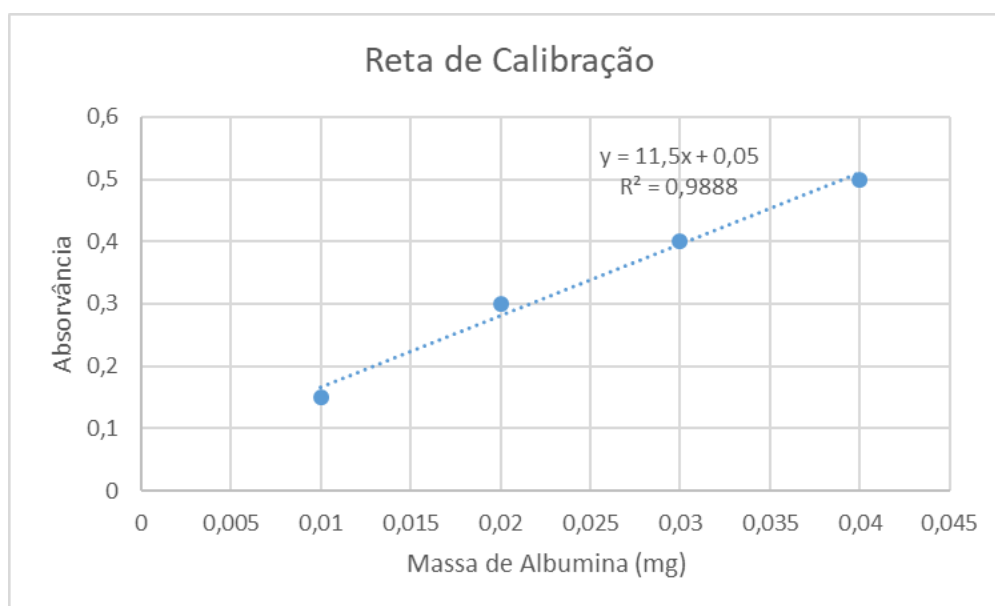


Figura 1: Absorvância corrigida das soluções padrão de albumina em função da massa de albumina presente nas mesmas. Apresentação da reta de calibração.

Tabela 2: Absorvância da amostra num comprimento de onda de 595 nm e massa (mg) de albumina presente na mesma.

	Absorvância (595 nm)	m_{albumina} (mg)	\bar{x} m_{albumina} (mg)
Diluição 5x	0,910	0,375	0,378
Diluição 10x	0,490	0,380	

Massa de albumina na amostra:

- **Diluição 5x**

$$y = 11,5x + 0,05 \leftrightarrow 0,910 = 11,5x + 0,05 \leftrightarrow x = 0,075 \text{ mg}$$

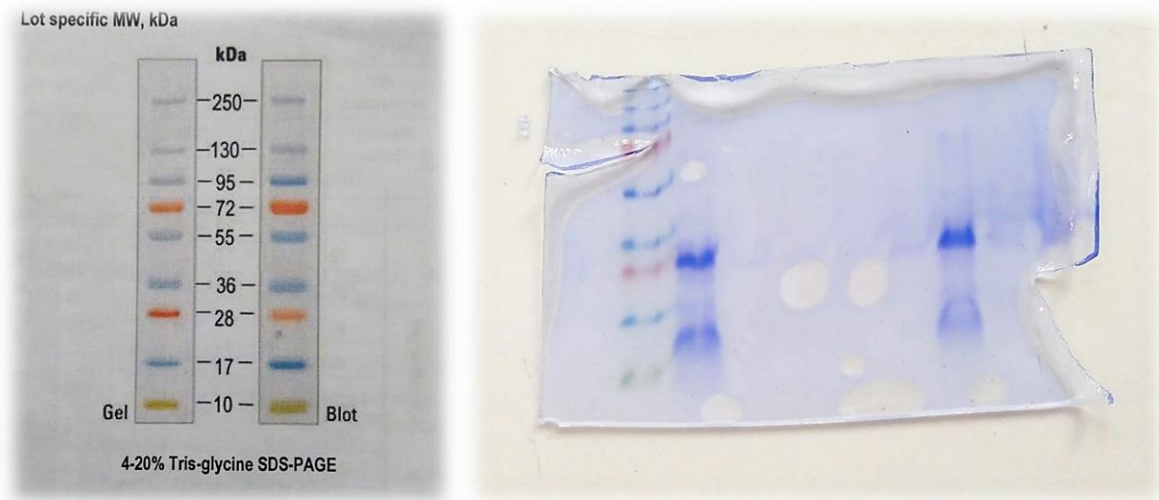
$$m_{\text{albumina}} = 0,075 \times 5 = 0,375 \text{ mg}$$

- **Diluição 10x**

$$y = 11,5x + 0,05 \leftrightarrow 0,490 = 11,5x + 0,05 \leftrightarrow x = 0,038 \text{ mg}$$

$$m_{\text{albumina}} = 0,038 \times 10 = 0,380 \text{ mg}$$

Fracionamento e Visualização



Figuras 2 e 3: Bandas das proteínas presentes no padrão e nas amostras analisadas no gel após a eletroforese.

Discussão

Extração e Quantificação

O processo de extração das proteínas envolve processos físicos, tais como a maceração ou a trituração da amostra, os quais fazem com que haja uma quebra nas células e, conseqüentemente, a libertação das proteínas. Sendo assim, foi macerada 1,000 g de cardo com a ajuda de um almofariz, com o



Figura 4: Processo de maceração

objetivo de libertar a albumina (Figura 4). Neste processo, são também adicionados solventes/extratantes para que as proteínas sejam transferidas para o estado líquido. Neste caso, foi adicionado um tampão de citrato de sódio, com pH=3,88, com o objetivo de proporcionar um maior rendimento na extração das proteínas. De seguida, foi realizada uma filtração com o objetivo de eliminar os contaminantes da amostra.

Após a realização da extração, realizou-se a quantificação das proteínas na amostra em estudo. Fazem parte dos métodos colorimétricos de quantificação de proteínas o teste Biureto, o Lowry test e o método de Bradford. Contudo, o peso seco e a espectrofotometria também podem ser utilizados para o mesmo efeito. Neste caso, foi utilizado o método colorimétrico de Bradford.

Este método assenta na interação do corante “Coomassie brilliant blue” com as macromoléculas das proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas.

Devido ao pH da reação, a interação da proteína de elevado peso molecular com o corante provoca uma alteração no equilíbrio do corante, levando-o à forma aniónica onde este tem uma grande absorção num comprimento de onda de 595 nm.

O método de Bradford, é mais rápido e rigoroso que o de Lowry, e tem sido utilizado para a determinação de proteínas totais em diversos meios como plasma ou soro sanguíneo, saliva humana, produtos alimentícios, tecidos de plantas, suspensões de células, avidina e estreptavidina e detergentes.

Apesar do método utilizado ser bastante rigoroso e apresentar resultados mais rapidamente que outros métodos, este apresenta também algumas desvantagens em que é necessária uma atenção especial.

Devida à baixa solubilidade e baixo peso molecular das proteínas, o método de Bradford apresenta uma diferente variação de absorvidade para diferentes proteínas. O nível de pureza do corante utilizado também pode ser um obstáculo na variação da absorvidade deste método sendo, por isso, recomendável a padronização do corante utilizado.

Na tentativa de contornar esta complicação, medidas como o aumento da concentração do corante e o aumento da solubilização das proteínas que reagem com o corante (utilizando detergentes, hidróxido de sódio, fenol, entre outros) devem ser tomadas.

Existem ainda algumas substâncias que podem reagir com as proteínas impedindo a interação das mesmas com o corante ou reagindo com o corante promovendo a alteração da absorvância. Nesses casos é recomendável a precipitação das proteínas com ácido tricloroacético. As substâncias interferentes podem ser consultadas na tabela 3 (Anexo I).

Por fim, procedeu-se à preparação de padrões de albumina (Tabela 1) e à elaboração de uma reta de calibração (Figura 1) que relaciona a absorvância dos padrões com a massa de albumina existente nos mesmos.

Com a absorvância da amostra (Tabela 2) e através da equação da reta de calibração ($y = 11,5x + 0,05$), determinou-se a massa de albumina na amostra, sendo esta 0,378 mg.

Fracionamento e Visualização

Antes da realização do fracionamento e da visualização, é necessário purificar as proteínas em estudo.

As proteínas podem ser estudadas no seu estado nativo, que é o mais estável e que contem a energia livre mais baixa possível. Contudo, as proteínas nativas são muito complexas, uma vez que a sua estrutura nativa é o resultado líquido de várias interações atrativas e repulsivas que emanam forças intramoleculares variadas, bem como da interação de vários grupos proteicos com a água como solvente circundante.

Assim, estas também podem ser estudadas no seu estado desnaturado. Para ocorrer a desnaturação, ou seja, ocorrer uma modificação na conformação (estrutura secundária, terciária ou quaternária) das proteínas sem haver um rompimento das ligações peptídicas envolvidas na estrutura primária, é necessário ocorrer uma mudança no ambiente ao qual a proteína está sujeita, o que forçará a molécula a assumir uma nova estrutura de equilíbrio.

As estruturas são mantidas por interações fracas e, por isso, são facilmente quebradas quando expostas a calor, ácidos, sais ou álcool, perdendo assim a sua estrutura tridimensional e tornando-se mais simples de estudar.

Neste caso, as proteínas foram analisadas na sua forma desnaturada (Figura 5), uma vez que, durante a desnaturação, perderam características, como a sua carga e conformação, mantendo apenas a característica diferenciadora: o seu tamanho.

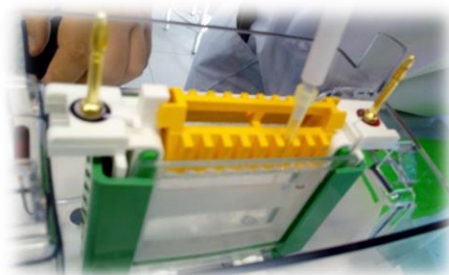


Figura 5: Introdução da amostra desnaturada nos poços.

Assim, neste processo, é utilizada uma solução desnaturante que contem ureia, que se liga aos locais hidrofóbicos, levando à diminuição das ligações hidrofóbicas com a água e, conseqüentemente, ao aumento da solubilidade, água desionizada, tris (tampão utilizado para que ocorra a lise celular, ou seja, a rotura das células), glicina (aminoácido simples, apolar, que promove a repulsão do grupo ionizável carboxílico), glicerol, que também influencia a solubilidade, detergente (SDS), que é o principal agente de desnaturação, fazendo com que a cadeia

polar do detergente se ligue às proteínas, dando origem a uma carga fortemente negativa, azul de bromofenol (necessário para identificar a migração) e mercaptoetanol (substância que provoca a redução das ligações de dissulfato, ajudando a eliminar a estrutura terciária da proteína).

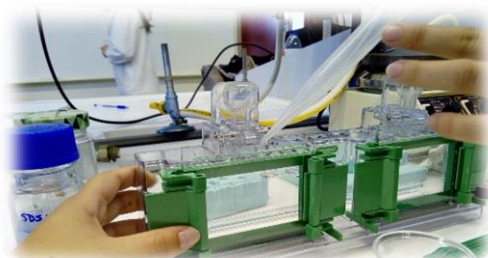


Figura 6: Preparação do gel.

Para além da desnaturação da amostra, é também necessário, para a realização da eletroforese, um tampão de corrida, corrente elétrica e uma solução de suporte/gel de acrilamida (Figura 6).

A solução tampão é o meio de passagem da corrente elétrica e tem de ter um pH específico, de modo a que o pH seja diferente do ponto isoelétrico da proteína, evitando, assim, que esta fique sem carga.

Já o gel tem de ser inerte, ou seja, não pode interferir com as características da proteína, apenas deve permitir a sua separação em diferentes tamanhos (caraterística diferenciadora). Assim, este gel tem uma malha com poros, o que faz com que as proteínas maiores fiquem retidas na parte superior do gel e as menores na parte inferior.

Após ser realizada a eletroforese (Figura 7), procede-se à coloração do gel para uma melhor visualização das bandas. Ao adicionar o corante, todo o gel irá ficar azul, sendo assim impossível distinguir as bandas em questão. Para isso, é necessário fazer uma descoloração do gel e assim, apenas as bandas ficam coradas.

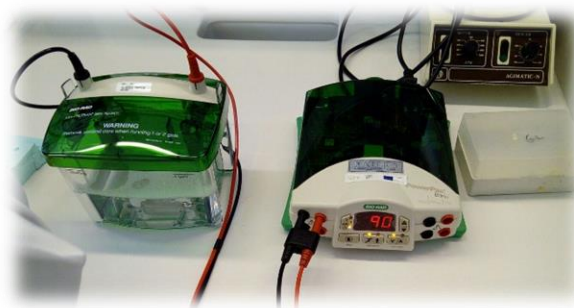


Figura 7: Processo de eletroforese.

Por fim, realiza-se a visualização das bandas utilizando o sistema EZ GEL DOC (Figura 3), com o objetivo de comparar as bandas obtidas na amostra com as bandas existentes no padrão utilizado (Figura 2). Após esta comparação, é possível definir quais as proteínas existentes, bem como o seu peso molecular. Neste caso, foram observadas na parte

superior do gel cardosinas A, com peso molecular de 28kDa, e cardosinas B na parte inferior, com peso molecular entre os 10 e 17kDa.

Por outro lado, Veríssimo *et al.* (1996), que distinguiam as cardosinas A e B através da sua mobilidade relativa em géis de SDS-PAGE, obtiveram massas moleculares aparentes de 31kDa para a cardosina A e de 14kDa para a cardosina B.

Posto isto, conclui-se que os pesos moleculares obtidos nesta atividade experimental encontram-se de acordo com valores obtidos noutros estudos semelhantes.

Conclusão

Com esta atividade laboratorial, concluiu-se que a quantidade de proteínas presentes em 1,000 g de planta de cardo (*Cynara cardunculus*) é de 0,018 mg.

Através da visualização das bandas, concluiu-se também que as proteínas presentes na mesma planta são a cardosina A, com um peso molecular de 28kDa, e a cardosina B, com um peso molecular entre 10 e 17 kDa.

Bibliografia

ABREU, SUSANA - Obtenção e caracterização de linhas celulares de BY-2 a expressar cardosinas. Universidade do Minho, 2009. [Consult. 10 nov. 2017]. Disponível em WWW:<URL: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/10763>>

Crexi, V. (n.d.). PROTEÍNAS;

Desconhecido – Bioquímica. [Em linha]. 1. ed. 2017 Observatório Juventude C&T. 1 p. [Consult. 10 nov. 2017]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.juventudect.fiocruz.br/bioquimica>>.

Desconhecido – Proteínas. [Em linha]. 1. ed. Nutribrinca - nutrição na escola, 2017. 2-6 p. [Consult. 10 nov. 2017]. Disponível em WWW:<URL:http://www.esb.ucp.pt/nutribrinca/docs/Unidade_2.2_guia_proteinas.pdf>.

Desconhecido - TITULO [Em linha]. 1. ed. EDITOR , 2017. [Consult. 10 nov. 2017]. Disponível em WWW:<URL:<https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/629/18/4%C2%BA%20Cap%C3%ADtulo%20II-%20def..pdf>>

FILHO, PAULO - Introdução à Bioquímica de Alimentos [Em linha]. 1. ed. 16-21 p. [Consult. 10 nov. 2017]. Disponível em WWW:<URL:<http://slideplayer.com.br/slide/355552/>>.

MARQUES, MARA - Bioquímica [Em linha]. 1. ed. 1 p. [Consult. 10 nov. 2017]. Disponível em WWW:<URL:<http://know.net/ciencterravida/biologia/bioquimica/>>.

MARTINS, S. - Expressão de cardosinas A e B em linhas transgênicas de Arabidopsis thaliana – caracterização fenotípica e imunolocalização em flores. [Em linha]. 1. ed. Braga, Portugal: Sara Manuela Carneiro Martins, 2011 [Consult. 9 nov. 2017]. Disponível em WWW:<URL:<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/15292/1/Tese.pdf>>

MOTTA, VALTER - Introdução à Bioquímica [Em linha]. 1. ed. AutoLab: Análises Clínicas - Bioquímica Básica, 2013 [Consult. 10 nov. 2017]. Disponível em WWW:<URL:<https://pt.slideshare.net/LeandroCarrera/livro-introducao-bioquimica-basica>>.

SILVA, R, e SOUZA, C. Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de Piper tuberculatum. [Em linha]. 1. ed. [Consult. 7 nov. 2017]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.scielo.br/pdf/aa/v39n2/v39n2a02.pdf>>

SILVA, SANDRO; SILVA, CARLOS - Técnico em Alimentos [Em linha]. 1. ed. Escola Técnica Aberta do Brasil: Bioquímica, 2010. 15-49 p. [Consult. 10 nov. 2017]. Disponível em WWW:<URL:<http://pronatec.ifpr.edu.br/wp-content/uploads/2013/06/Bioquimica.pdf>>.

TEIXEIRA, MARIA - Bioquímica de Alimentos [Em linha]. 1. ed. mgt - NUTRI, 2017. 1 p. [Consult. 10 nov. 2017]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.mgtnutri.com.br/category/artigos/os-alimentos/bioquimica-de-alimentos/>>.

VERÍSSIMO, P., FARO, C., MOIR, A.J., LIN, Y., TANG, J., PIRES, E.V. - Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. Eur. J. Biochem. 235:762-768. 1996

ZAIA, D., ZAIA, C. e LICHTIG, J. - Determinação de Proteínas totais via Espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. [Em linha]. 1. ed. 1998 [Consult. 4 nov. 2017]. Disponível em WWW:<URL: <https://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/427823/LOT2007/metododedetprot.pdf>>

Anexos

Anexo I: Interferentes do Método de Bradford

Tabela 3: Substâncias interferentes no Método de Bradford.

Substância	Ação
Tolbutamida	Provoca falso positivo.
Uréia	Fornecer resultado falso positivo, acima de 45 g/L
Cloreto de Sódio e de Potássio	Fornecem resultado falso negativo, acima de 1 M
Detergentes (Triton X100, SDS, Tween-20)	A larga banda de absorção em 650 nm, devido a reação entre o corante e os detergentes, interfere na banda em 595 nm, resultando em falso positivo
Ciclodextrinas	Formam um complexo de inclusão com o corante <i>Comassie Brilliant Blue</i>
Polifenóis e Polifenóis Oxidases	Reagem com as proteínas impedindo a formação do complexo das mesmas com o corante <i>Comassie Brilliant Blue</i>
2-mercaptoetano + Guanadina	Diminuem a absorção da amostra
Glicerol	Provoca falso positivo.
Lipídios	Causam turbidez na amostra.
Cloropromazina	Provoca falso positivo.
Fluoreto	Diminui a absorção da amostra