

# 1. Introdução

As proteínas são polímeros de aminoácidos unidos por ligações, denominadas ligações peptídicas, uma ligação peptídica é a união do grupo amina ( $-NH_2$ ) de um aminoácido com o grupo carboxila ( $-COOH$ ) de outro aminoácido, através da formação de uma amida. Além disso, os diferentes grupamentos "R" encontrados nos aminoácidos influenciam na estrutura, na funcionalidade e nas propriedades das proteínas individuais.

A maioria das proteínas encontradas nos seres vivos é formada por L-aminoácidos. Os D-aminoácidos aparecem somente em certos antibióticos peptídicos e em peptídeos componentes da parede de algumas bactérias. Apesar de muitas proteínas conterem outras substâncias, além dos aminoácidos, a estrutura tridimensional e muitas das propriedades biológicas das proteínas são determinadas, em grande parte, pelos tipos de aminoácidos presentes em sua molécula, a ordem em que eles estão unidos entre si, na formação da cadeia polipeptídica e, ainda, pela inter-relação espacial de um aminoácido com o outro. Em soluções aquosas de pH neutro, os aminoácidos podem existir em duas formas. Uma pequena fração pode encontrar numa forma electricamente neutra, ou seja, com o grupo amina desprotonado ( $-NH_2$ ) e o grupo carboxila protonado ( $-COOH$ ). A maioria estará, no entanto, numa forma ionizada, em que o grupo amina se encontra protonado ( $-NH_3^+$ ) e o ácido carboxílico desprotonado a carboxilato ( $-COO^-$ ), denominando-se esta forma de zwitteriônica (do alemão *zwitter*, que significa "híbrido"). Um zwitterión é uma molécula globalmente neutra em termos de carga elétrica, mas possui cargas locais devido à presença de grupos ionizados.

O ponto isoelétrico (pI) de uma molécula é o pH ao qual essa molécula é eletricamente neutra. Este conceito é aplicado particularmente a aminoácidos e proteínas. O ponto isoelétrico não é o pH em que todos os grupos básicos estão desprotonados e os ácidos protonados, mas o pH em que a carga líquida da molécula é igual a zero. Em um pH abaixo do valor de pI, os aminoácidos e proteínas apresentam carga líquida positiva. Em um valor de pH acima do pI, os aminoácidos e proteínas encontram-se com carga líquida negativa.

As proteínas exercem uma grande variedade de funções na célula, estas podem ser divididas em dois grandes grupos:

Dinâmicas - Transporte, defesa, catálise de reações, controle do metabolismo e contração, por exemplo;

Estruturais - Proteínas como o colágeno e elastina, por exemplo, que promovem a sustentação estrutural da célula e dos tecidos.

Podem ser estruturalmente classificadas em fibrosas ou globulares. As proteínas que apresentam uma ou mais cadeias polipeptídicas formando estruturas compactas, mais ou menos esféricas e que geralmente são solúveis denominam-se proteínas globulares. As proteínas globulares possuem estrutura espacial mais complexa, são mais ou menos esféricas. São geralmente solúveis nos solventes aquosos e os seus pesos moleculares situam-se entre 10.000 e vários milhões. Nesta categoria situam-se as proteínas ativas como as enzimas, transportadores como a hemoglobina, etc. As proteínas fibrosas possuem forma alongada, geralmente insolúveis em meio aquoso e desempenham um papel basicamente estrutural nos sistemas biológicos. Ao contrário das globulares, são formadas pela repetição de módulos, o que possibilita a construção de grandes estruturas, com organização que origina fibras. Ao descrever a estrutura de uma proteína é conveniente considerar a sua complexidade através de suas estruturas:

Estrutura primária - É a seqüência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica, específica para cada proteína.

Estrutura secundária - Descreve a formação de estruturas regulares pela cadeia polipeptídica. Pode ser  $\alpha$ -hélice ou folha  $\beta$ .

.

Estrutura terciária - É a forma tridimensional como a proteína se "enrola". Descreve o dobramento final da cadeia polipeptídica por interação de regiões com estrutura regular.

Estrutura quaternária - Descreve a associação de duas ou mais cadeias polipeptídicas de estrutura terciária.

## 2. Objetivos

Esta prática teve como objetivos caracterizar a presença de material biológico em proteínas através de testes que reconheçam a presença de amins primárias presentes em solução (reação da ninhidrina); a presença de peptídeos com mais de três resíduos de aminoácidos (reação do biureto); a presença de arginina na cadeia peptídica (reação de sakaguchi); a presença de aminoácidos sulfurados (reação para aminoácidos sulfurados). Procurou-se também na realização da prática reconhecer as proteínas como moléculas eletricamente carregadas, avaliando a influência do pH sobre tais cargas bem como os grupamentos e fatores ligados a solubilidade das proteínas em água.

## 3. Parte Experimental

**Reação do Biureto:** Esta reação é utilizada para verificar a presença de peptídios com 3 ou mais resíduos de aminoácidos. As proteínas ou peptídeos, quando tratados por uma solução diluída de sulfato de cobre em meio alcalino, apresentam uma coloração púrpura característica. Foi pipetado em um tubo de ensaio 1 ml de solução da clara de ovo. Adicionou-se 5 gotas de NaOH 2,5 N e algumas gotas de sulfato de cobre 1%. O mesmo procedimento foi realizado com uma solução de água destilada no lugar da solução de proteínas.

**Reação da Ninhidrina:** Esta reação é utilizada para verificar a presença de amins em solução, dando positivo para proteínas, peptídeos, aminoácidos, amins primárias e amônia. Foram pipetados 2 ml da solução de ninhidrina (0,1% de ninhidrina em tampão fosfato, pH 7,0) em um tubo de ensaio. Adicionou-se, então, 5 gotas da solução de proteínas e a solução foi fervida durante 2 minutos. O mesmo procedimento foi realizado com solução de água destilada no lugar da solução de proteínas.

**Reação de Sakaguchi:** Esta reação é utilizada para verificar a presença da arginina em solução. Foi pipetado 1 ml da solução de proteína em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou se 10 gotas de NaOH 2,5 N, algumas gotas da solução de alfa-naftol (0,4% em etanol) e 1 ml de

hipoclorito de sódio 0,5%. O procedimento foi repetido com uma solução de água destilada no lugar da solução de proteínas.

**Reação para aminoácidos sulfurados:** Esta reação é utilizada para verificar a presença de aminoácidos sulfurados em solução. Foi pipetado em um tubo de ensaio 1 ml da solução de proteína. Em seguida, adicionou-se 2 ml de NaOH 2,5 N e a solução foi fervida durante um minuto. Juntou-se, então, 5 gotas de acetato de chumbo e a solução durante 5 minutos. O mesmo procedimento foi realizado com uma solução de água destilada no lugar da solução de proteína.

**Precipitação de proteínas por adição de sais neutros (efeito da força iônica):** Este procedimento é realizado para se verificar a influência da concentração de sais neutros sobre a solubilidade da proteína. Foram pipetados em um tubo de ensaio 2 ml da solução de proteínas. Adicionou-se, então, 2 ml de solução de sulfato de amônio (0,77 g/ ml), deixando escorrer pelas paredes. O mesmo procedimento foi repetido usando NaCl ao invés de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

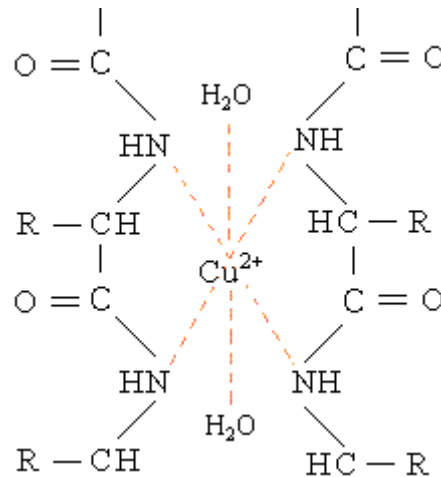
**Precipitação por sais de metais pesados e por ácidos fortes:** Este procedimento é realizado para verificar a influência de sais de metais pesados e de ácidos fortes sobre a solubilidade da proteína, bem como a influência do pH sobre a carga líquida da molécula polipeptídica. Foi pipetado em um tubo de ensaio 1 ml da solução de proteínas. Em seguida adicionou-se 0,5 ml da solução de acetato de chumbo a 20% e 5 ml de água destilada. O procedimento anterior foi repetido substituindo a solução de acetato de chumbo por ácido tricloroacético a 10%.

**Precipitação por ação do calor (desnaturação):** Este procedimento é realizado para verificar o efeito do aquecimento (desnaturação) sobre a estrutura tridimensional da proteína e sua solubilidade em água. Foram pipetados 5 ml da solução de proteínas em um tubo de ensaio. Em seguida, o tubo foi colocado em banho-maria fervente por 5 minutos.

**Precipitação das proteínas por solventes orgânicos:** Este procedimento é realizado para verificar a solubilidade de proteínas em solventes orgânicos. Foram pipetados em dois tubos de ensaio 2 ml da solução de proteínas em cada. Em seguida, adicionou-se 4 ml de etanol gelado a cada tubo e agitou-se. Em um dos tubos, foi colocado uma pequena quantidade de NaCl, sob agitação.

## 4. Resultados e Discussão

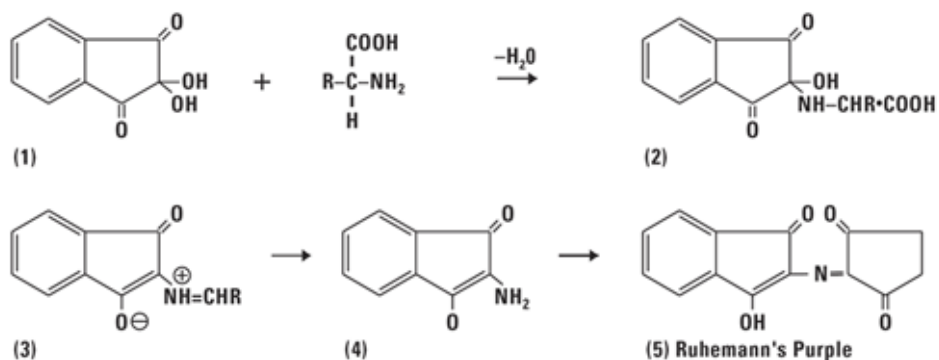
**Na reação do biureto**, o NaOH, presente em solução, conduz a cadeia peptídica a um desarranjo em sua estrutura tridimensional. Os íons  $\text{Cu}^{2+}$  presentes em solução, originados do sulfato de cobre, formam um complexo com os aminoácidos, estabelecendo interações com os átomos de nitrogênio da cadeia peptídica. Esse complexo formado confere uma coloração púrpura característica a solução.



Esta reação é positiva para proteínas e peptídeos com três ou mais resíduos de aminoácidos. A reação também é positiva para substâncias que contenham dois grupos carbamínicos ( $-\text{OC}-\text{NH}_2-$ ) ligados diretamente ou através de um único átomo de carbono ou nitrogênio. A solução da clara de ovo, quando submetida à reação do biureto, apresentou coloração púrpura, indicando a provável presença de peptídeos em solução. A solução de água destilada submetida ao mesmo procedimento apresentou coloração azul clara, provavelmente devido à alcalinização do sulfato de cobre.

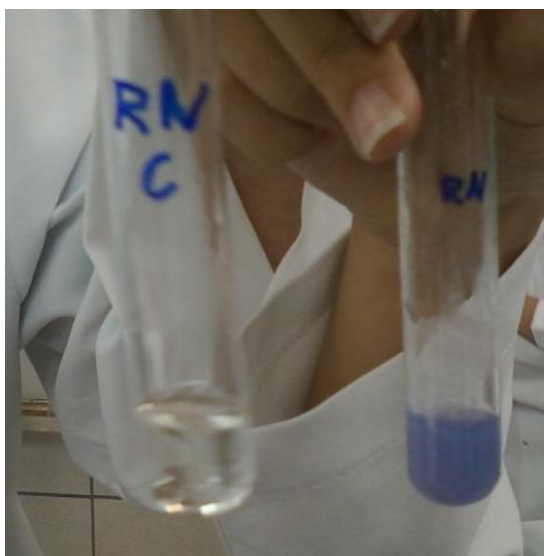


**Na reação da ninhidrina**, o aquecimento da solução de proteínas desestabelece a estrutura tridimensional do peptídeo. A ninhidrina, então, reage com o grupamento amina (sendo positiva para proteínas, peptídeos, aminoácidos, aminas primárias e amônia) presente nos aminoácidos, formando como produto final um complexo de coloração azul-violeta. Com a prolina e a hidroxiprolina, que são iminoácidos, forma-se um produto de coloração amarelada.

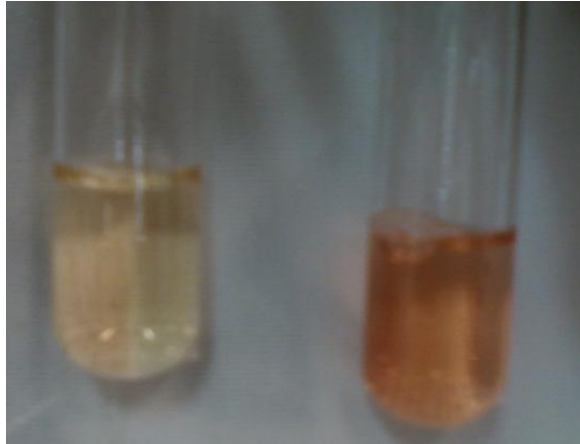


- (1) Ninhidrina reacciona con el Aminoácido
- (2) Se forma un primer intermedio
- (3) El Intermedio decarboxila y desidrata para dar un ión dipolar
- (4) El ión dipolar hidroliza dando la amina
- (5) La amina condensa con otra molécula de ninhidrina para dar el Púrpura de Ruhemann

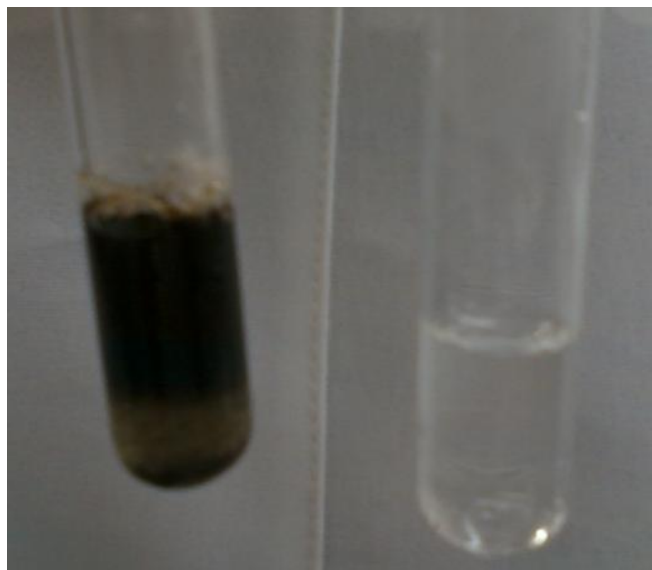
O tubo de ensaio com solução de proteínas apresentou coloração azulada, a solução com água destilada no lugar da solução de proteínas não apresentou alteração de coloração.



**Na reação de Sakaguchi**, o grupamento guanidina presente na arginina reage em meio alcalino com o alfa-naftol e hipoclorito, resultando em um produto de coloração avermelhada. O tubo de ensaio com a solução de proteínas apresentou coloração avermelhada, indicando a presença de arginina no peptídeo, enquanto o tubo de ensaio com a solução de água destilada no lugar da solução de proteínas apresentou uma coloração amarelada.



**Na reação para aminoácidos sulfurados**, o aquecimento de proteínas em meio alcalino resulta na liberação de enxofre da cisteína e da cistina, sob a forma de sulfato. O sulfato é evidenciado pela adição de acetato de chumbo, dando precipitado castanho ou preto de sulfeto de chumbo. A solução com proteínas apresentou coloração escura, o mesmo não pode ser observado na solução controle, com água destilada no lugar da solução de proteínas.



**No procedimento de precipitação de proteínas por adição de sais neutros (efeito da força iônica)**, deve-se verificar o efeito da concentração destes sais na solubilidade da proteína. Quando sais neutros são adicionados ao sistema ocorre um aumento da força iônica do sistema. Os íons carregados provenientes da dissociação dos sais passam a interagir com as moléculas protéicas, diminuindo a interação entre as próprias moléculas da proteína. Deste modo, temos um aumento na solubilidade da proteína em meio aquoso. A esse fenômeno dá-se o nome de *salting-in*. Este efeito, porém, não se estende infinitamente. Em condições de elevada força iônica, as moléculas de água apresentam maior tendência de solvatação de partículas (nesse caso, os íons). As moléculas de água, desse modo, interagem mais com os íons, desfazendo suas interações com a estrutura protéica. Como conseqüência, temos: maiores interações proteína-proteína, resultando na diminuição da solubilidade em meio aquoso. A esse fenômeno dá-se o nome de *salting-out*.

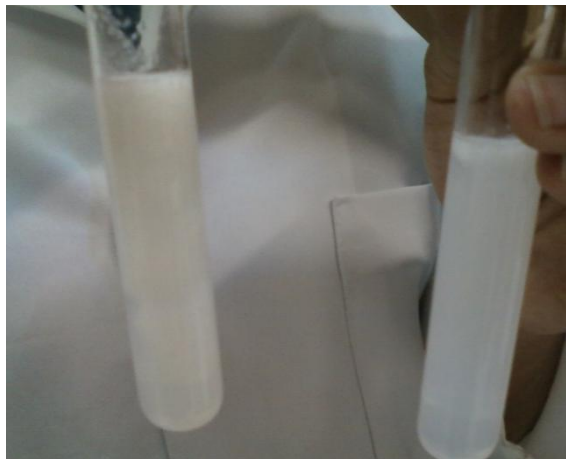
As fotos abaixo mostram a adição de sal em soluções protéicas. A foto da esquerda representa a adição de sulfato de amônio em solução de proteínas. Este sal possui baixa força iônica e provoca um aumento da solubilidade da proteína. A foto da direita representa a adição de cloreto de sódio à solução de proteínas. Este sal possui uma alta força iônica, acarretando precipitação da proteína.



**No procedimento de precipitação por sais de metais pesados e por ácidos fortes**, deve-se verificar o efeito destas substâncias sobre a solubilidade da proteína. Os cátions de metais pesados como  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  formam precipitados insolúveis de proteínas, denominados de acordo com o elemento formador (exemplo:



proteinato de mercúrio, proteinato de chumbo, etc.). Essa precipitação é mais intensa quando o pH está acima do ponto isoelétrico (pI). Isso porque, acima do pI, a carga líquida sobre a proteína é negativa, favorecendo a interação com os cátions provenientes do sal. Quando a proteína está abaixo do seu pI, a carga líquida total da molécula é positiva. Isso facilita a interação da molécula com os ânions provenientes de ácidos como o tunguístico, o fosfotunguístico e pícrico. Nas duas situações o precipitado pode ser resolubilizado através de alterações do pH. Verifica-se que na adição de sais de metais pesados como de ácidos orgânicos fortes ocorreram precipitação.



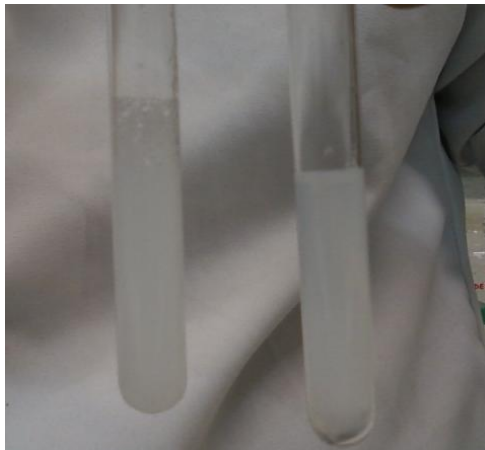
**No procedimento de precipitação de proteínas por ação do calor**, o calor fornecido a proteína provoca desestabilização das interações fracas (pontes de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, interações de Van der Waals, etc.) acarretando em um desarranjo da conformação tridimensional desta estrutura. Esse fenômeno recebe o nome de desnaturação e altera as estruturas secundária, terciária e quaternária das proteínas, não afetando suas estruturas primárias (pontes dissulfeto e ligações covalentes não são afetadas). A desnaturação promove alterações na solubilidade da proteína, levando à sua precipitação. Com o aquecimento da solução de proteínas, verificou-se precipitação.



**No procedimento de precipitação das proteínas por solventes orgânicos**, a solubilidade das proteínas em solventes orgânicos é menor do que em água. Isso acontece porque a capacidade de interação com as partículas de soluto é diferente para cada solvente. A grandeza que mede a capacidade de interação do solvente com o soluto é denominada constante dielétrica. A água apresenta constante dielétrica bastante elevada (aproximadamente 80). Numa solução contendo, exclusivamente, água e moléculas protéicas temos: interação água - proteína e interação proteína-proteína. Nesse caso, podemos afirmar com certeza que o primeiro tipo de interação prevalecerá sobre o segundo porque a água possui grande capacidade de separação das partículas do soluto (constante dielétrica elevada).

Os solventes orgânicos apresentam valor de constante dielétrica bem inferior à da água, a interação proteína-proteína "vence" o poder de solvatação da água (interação água-proteína). A proteína precipita. A precipitação por solventes orgânicos depende muito da temperatura. Os solventes orgânicos, quando utilizados a temperaturas baixas, são bastante úteis na separação de misturas de proteínas. A temperaturas mais elevadas esses solventes podem levar à desnaturação por rompimento das pontes de hidrogênio e estabelecimento de interações apolares, importantes na manutenção da conformação protéica.

Comparando-se os tubos podemos observar que onde houve a adição de NaCl, houve maior precipitação. A adição de NaCl tornou a precipitação maior por causa do efeito de *salting-out* no meio, já que o solvente tenderá a solubilizar primeiro o NaCl, tornando as interações proteína-proteína mais intensas havendo maior quantidade de proteína precipitada.



## 5. Conclusão

A partir dos resultados observados, conclui-se que é possível determinar a presença de proteínas em solução com o auxílio de algumas reações químicas conhecidas, bem como a natureza de alguns aminoácidos presentes nestas proteínas. É possível identificar as proteínas como moléculas carregadas e reconhecer os fatores ligados a solubilidade das proteínas em água.

## 6. Referências Bibliográficas

- a) SOLOMONS, T.W.G. Fundamentals of Organic Chemistry. 4ª edição.
- b) NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger Princípios de Bioquímica. 3ª edição. São Paulo, 2002.
- c) <http://www.scribd.com/doc/29031871/PROTEINAS-Reacoes-de-coloracao-e-precipitacao> Acessado em 20 de Novembro de 2010, às 18:30.
- d) [http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas\\_proteinas/reacoes\\_coradasdois3.htm](http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_proteinas/reacoes_coradasdois3.htm) Acessado em 21 de Novembro de 2010, às 20:51.
- e) [http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas\\_proteinas/precipitacao\\_proteinas.htm](http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_proteinas/precipitacao_proteinas.htm) Acessado em 22 de Novembro, às 21:05.
- f) <http://www.ebah.com.br/relatorio-bioquimica-experimental-i-proteinas-docx-a79091.html> Acessado em 29 de Novembro, às 20:55.
- g) [http://www.eng.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/trabalhos\\_pos2003/const\\_microorg/proteinas.htm](http://www.eng.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_microorg/proteinas.htm) Acessado em 29 de Novembro, às 20:55.
- h) <http://pt.wikibooks.org/wiki/Bioqu%C3%ADmica/Amino%C3%A1cidos> Acessado em 29 de Novembro, às