

# BG.b Teste 2021 Resolução

Felipe B. Pinto 61387 - MIEQB

31 de maio de 2022

## Conteúdo

Questão 1 . . . . .	2	Questão 5 Permuta Iônica .	7
Questão 1 Cromatografia de exclusão molecular . . . .	4	Questão 6 . . . . .	8
Questão 2 . . . . .	5	Questão 7 . . . . .	8
Questão 3 Cromatografia em Gel . . . . .	5	Questão 8 . . . . .	10
Questão 4 Cromatografia de Exclusão molecular . . . .	6	Questão 9 . . . . .	11
		Questão 10 . . . . .	12

## Grupo 1 – Problemas

### Questão 1

A purificação e caracterização de proteínas envolve necessariamente a determinação da quantidade total de proteína presente numa dada amostra. Apesar de existirem vários métodos muito rigorosos para efetuar essa quantificação, eles não são geralmente utilizados no trabalho de rotina num laboratório de bioquímica, devido à sua complexidade, exigência e custo. Em procedimentos de rotina utilizam-se métodos colorimétricos ou espectrofotométricos que, apesar de não serem tão rigorosos, fornecem bons resultados se forem aplicados corretamente. Métodos semelhantes podem ser utilizados para a quantificação direta de proteína em géis de poliacrilamida. A escolha do método mais adequado em cada caso depende da natureza da proteína, da presença de outros componentes na amostra e da rapidez, exatidão e sensibilidade desejadas.

Este método baseia-se no método de Biureto, mas apresenta uma sensibilidade cerca de 100 vezes superior devido à utilização do reagente de Folin-Ciocalteu. A reação colorimétrica anterior produz  $\text{Cu}^+$  que neste caso é acoplada à redução de fosfomolibdato e fosfotungstato pelos resíduos de tirosina, triptofano e cisteína presentes na proteína formando-se um complexo de cor azul intensa (Comprimento de onda  $\text{max } \lambda = 680 \text{ nm}$ ). A cor desenvolvida por mg de proteína depende da natureza específica da proteína. Deste modo, obtêm-se melhores resultados se a proteína utilizada como padrão na curva de calibração for semelhante à proteína a quantificar. Este método é muito mais sensível do que o anterior, mas é mais demorado, a cor é instável e depende da composição em tirosina e triptofano da proteína. Compostos mercapto e  $\text{NH}_4^+$  interferem com a reação.

Foi preparado uma reta de calibração utilizando uma solução mãe de BSA de concentração  $0.86 \text{ g mL}^{-1}$ , com os volumes indicados na tabela seguinte

Ensaio	Vol. Padrão / mL	Vol. H <sub>2</sub> O/mL	Abs
1	0	400	0.080
2	80	320	0.340
3	160	240	0.536
4	240	160	0.982
5	320	80	1.004
6	400	0	1.200

A cada dos ensaios da tabela anterior foram adicionados os reagentes necessários para o desenvolvimento de cor característico do ensaio de Lowry, prefazendo sempre um volume final de 1500 mL

250 mL de uma amostra de Citocromo C foi levada a um volume total final de 1550 mL incluindo os reagentes necessários para o desenvolvimento de cor característico do ensaio de Lowry

As absorvâncias medidas para as 4 replicas da amostra de citocromo C foram as seguintes (com o branco já descontado)

1	0.771	0.762	0.785	0.773	0.555
2	0.823	0.854	0.698	0.855	0.833
3	0.772	0.801	0.812	0.830	0.820
4	0.250	0.240	0.265	0.230	0.230

#### Abs 550 nm

- 0.621
- 0.633
- 0.645
- 0.644

## Q1.1)

Equação da reta utilizada e Respetivo  $R^2$

RS

- $Abs = 4.76812 [BSA]_f + 0.03618$
- $R^2 = 0.959189$

## Q1.2)

Aplicando o teste Q de Dixon para descartar outliers a 99%, calcule a concentração de Citocromo C na amostra original de 250 mL

## Q1.3)

Sabendo que a amostra de Citocromo C reduzida com ditionito de sódio deu as seguintes absorvâncias a 550 nm, (branco já descontado) determine o coeficiente de absortividade desta proteína. O peso molecular do Citocromo C é 13000 Da.

## Grupo 2

### Questão 1 Cromatografia de exclusão molecular

O volume morto ou “void volume” é representada por:

- |          |          |
|----------|----------|
| 1. $V_e$ | 3. $V_t$ |
| 2. $V_0$ | 4. $V_v$ |

RS:  $V_0$

## Questão 2

Uma coluna de poestireno tem um diâmetro de 7.8 mm e uma largura de 30 cm. As Partículas ocupam 20% da coluna. O volume exterior as partículas do gel é o 40% da coluna. As moléculas que não ficam retidas são logo excluídas no volume total de:

$$V_0 = 30 \text{ cm} * \pi ((7.8/2) \text{ cm})^2 * 40\% \cong 5.73 \text{ mL}$$

## Questão 3 Cromatografia em Gel

O ditionito de sódio

1. Oxida ao  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  que fica na coluna com cor amarelo
2. Oxida a proteína hemoglobina, que muda de castanho a purpura e a vermelho
3. Reduz ao  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  que fica na coluna com cor amarelo
4. Reduz a proteína hemoglobina, que muda de castanho a purpura e a vermelho.

Ditionito é um agente redutor

**RS** 4

## Questão 4 Cromatografia de Exclusão molecular

Assinale as verdadeiras

O volume morto ou void volume corresponde a:

1. O volume de eluição da amostra
2. O volume no qual são eluídas as proteínas totalmente excluídas dos poros das resinas
3. Corresponde ao volume interno dos grãos de resina
4. Corresponde ao volume externo aos grão da resina
5. Corresponde ao volume total da coluna que não é utilizado na separação

Volume morto corresponde ao volume que é primeiramente eluído

Selecione uma ou mais opções de resposta:

**RS:** 4

## Questão 5 Permuta Iônica

Assinale as verdadeiras. Na prática de permuta iônica

O citocromo C tem um pI de 9.6 e a catalase bovina de 5.42. Sendo que a solução de eluição tem um pH de 5.3 e a coluna é aniônica

1. A proteína retida foi o citocromo
2. A primeira proteína eluída foi o citocromo
3. A primeira proteína eluída foi a catalase bovina
4. A última proteína eluída foi a catalase bovina

coluna aniônica retém cargas negativas.

(i) **Citocromo C**

$$pI_{citC} > pH \implies Carga_{citC} = +$$

(ii) **Catalase Bovina**

$$pI_{cat} \approx pH \implies Carga_{cat} \approx +$$

Selecione uma ou mais opções de resposta

**RS:** 4 e 2

## Ponto de Inversão

valor de pH limite em que a proteína varia sua carga iônica.

pH < pI Proteína fica protonada, positiva

pH > pI Proteína fica desprotonada, negativa

## Questão 6

Uma coluna de poliestireno tem um diâmetro de 7.8 mm e uma largura de 30 cm. As partículas ocupam 20% da coluna. O volume exterior as partículas de gel é o 40% da coluna. Os poros são o 40% do volume. As moléculas mais pequenas podem-se separar no volume total de:

$$V_t = V_o + V_i = \pi ((7.8/2) \text{ mm})^2 * 30 \text{ cm}(40\% + 40\%) \cong 1.15 \times 10^{-5} \text{ L}$$

## Questão 7

Encarregado de realizar a purificação de uma proteína de interesse farmacológico, você chegou a um protocolo de purificação que resulta em uma mistura de quatro proteínas, com as seguintes características:

Proteína	Peso/kDa	pI
1	25	6.3
2	27	4.2
3	105	7.7
4	70	9.8

Visando purificar a proteína de interesse farmacológico (Proteína 2), você realizou cromatografia de gel filtração. Após acompanhar o perfil de eluição desta cromatografia, você indentificou uma sequencia de picos, que foram coletados e analisados. Com base nos seus conhecimentos sobre a separação de proteínas, assinale a alternativa que melhor corresponde ao

- Número de picos identificados na análise do cromatograma desta cromatografia
- Qual seria o pico que conteria a proteína de interesse



- iii) no caso de existir a necessidade de passos adicionais em seu protocolo de purificação. Assinale a alternativa que indica uma opção viável de método subsequente a ser utilizado para o isolamento da proteína 2

	Picos	Pico da proteína	Paço extra
A	2	2o	Cromatografia de permuta iônica
B	3	3o	Cromatografia de permuta iônica
C	4	3o	Etapa de purificação adicional
D	4	3o	Coluna de troca iônica
E	4	2o	Cromatografia de permuta iônica

**(i) Resposta**

- Cromatografia de gel separa por peso molecular como existem apenas duas proteínas com peso molecular próximo vamos observar 3 picos
- Cromatografia de gel de filtração atrasa proteínas com menor peso molecular deixando a 1 e 2 por ultimo
- As proteínas 1 e 2 possuem grande diferença no ponto isoelétrico podendo ser assim separadas por cromatografia ionica

**RS B**

## Questão 8

Assinale as verdadeiras

1. Na cromatografia de exclusão molecular – filtração em gel 00 a fase estacionária é um líquido
2. Em cromatografia de exclusão molecular as moléculas excluídas tem um volume de retenção igual ao volume morto
3. Em cromatografia de exclusão molecular o volume total da coluna é  $\pi r h$
4. Em cromatografia de Exclusão molecular a maior massa maior volume de eluição.
5. Na pratica de cromatografia de exclusão molecular o ditioníto captura elétrões

### Resolução

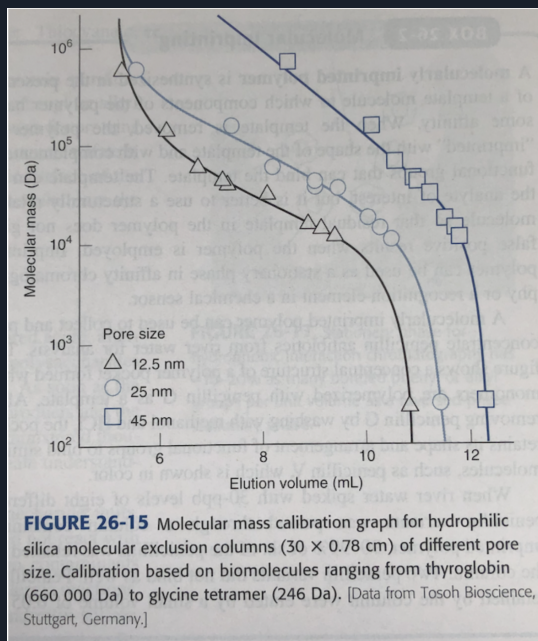
1. A fase estacionária da cromatografia em gel é o gel
2. As moleculas excluidas são as maiores que não penetram no interior do gel, ocupando apenas o volume morto.
3. O volume total da couna de cromatografia de exclusão molecular equivale a todo o volume exceto o ocupado pelo gel  $Vol_t = Vol_i + Vol_0$
4. O ditioníto é um agente redutor

**RS** B

## Questão 9

Assinale as verdadeiras.

Na figura em anexo:



Selecione uma ou mais opções de resposta

	Vol. de eluição	Tam. poro	Volume	ponto
1	$V_0$	25 nm	5 mL	Primeiro
2	$V_0$	25 nm	11.5 mL	Ultimo
3	$V_0 + V_i$	25 nm	11 mL	penultimo
4	$V_0 + V_i$	25 nm	11.5 mL	Ultimo
5	$V_0 + V_i$	12.5 nm	11 mL	Ultimo
6	10.000 Da	12.5 nm	11 mL	

### Resolução

- Ultimo ponto são resíduos, podem ser excluídos
- Primeiro ponto para 25 nm corresponde a volume de eluição  $\approx 5$  mL
- Penultimo ponto para 25 nm corresponde  $\approx 11$  mL

**RS** 1 e 3

## Questão 10

Assinale as verdadeiras. Na cromatografia de permuta iônica  
Se uma proteína com  $pI = 7$  fica retida numa coluna de permuta catiónica para a poder eluir precisa de:

1. Introduzir uma solução eluente a pH 7
2. Introduzir uma solução eluente a pH 4
3. Introduzir uma solução eluente a pH 10
4. Almentar a força iônica da solução eluente

Proteína ficar retida na coluna catiônica significa que possui carga positiva, para poder eluir precisa reduzir, inserindo ela num ambiente com pH básico acima de seu pI garante que ela se reduza, eluindo-a

**RS** 3