

**Pergunta 1**

Respondida

Nota: 10,00

**Teste Pratico Janeiro 2021,****Bioquímica geral B. Engenharia Química.****Notas**

Resolva o problema de forma clara e concisa.

Se tem dúvidas deixe-as por escrito no texto. Não apresente riscos nem resolva o problema de forma confusa.

Identifique todas as folhas com o seu nome e número de aluno

Numere todas as folhas.

Tire fotos da resolução e envie-a por e-mail e por whatsapp (os dois).

Não serão aceites resoluções enviadas após o término do teste.

Para efeitos de cálculo utilize três casas decimais.

Indique de forma clara a resposta às seguintes questões:

1.- Equação da reta utilizada e respetivo  $R^2$ .

2- Qual a concentração de Citocromo C na amostra de 250 microL.

3.- Qual o valor calculado do Coeficiente de absorvidade do Citocromo C a 550 nm.

**Problema**

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  $\lambda_{\text{max}}$ =680 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 preparada uma reta de calibração utilizando uma solução mãe de BSA de concentração 0,86 mg/g e de densidade 1,05 g/ml, com os volumes indicados na tabela seguinte:

Ensaio	Volume padrão (mL)	Volume H <sub>2</sub> O (mL)	Absorvância
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, perfazendo sempre um volume final de 1500 mL (microL).

250 mL (microL) de uma amostra e Citocromo C foi levada a um volume total final de 1550 microL 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; 0,845; 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

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

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 da desta proteína. O peso molecular do Citocromo C é 13000 Da.

Abs 550 nm: 0,621; 0,663; 0,645; 0,644,

Indique de forma clara a resposta às seguintes questões:

1.- Equação da reta utilizada e respetivo  $R^2$ .

2- Qual a concentração de Citocromo C na amostra de 250 microL.

3.- Qual o valor calculado do Coeficiente de absortividade do Citocromo C a 550 nm.

1-

$Abs = 4,76812 * [BSA]f + 0,03618$

$r = 0,959189$

2- 0,9898



1.jpeg



2.jpeg



3.jpeg

**Iniciada** sábado, 16 janeiro 2021, 12:51

**Estado** Terminada

**Terminada em** sábado, 16 janeiro 2021, 13:43

**Tempo gasto** 51 minutos 30 segundos

**Nota** 10,00 num máximo de 10,00 (100%)

**Pergunta 1**

Correta

Nota: 1,00 em 1,00

Um columna 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. As moléculas que não ficam retidas são logo excluídas no volume total de:

1.- 5 ml

2.- 5,20 ml

3.- 5,45 ml

4.- 5,70 ml

5.- 5,85 ml.

Selecione uma opção de resposta:

- ☐ 3
- ☐ 2
- ☒ 4 ✓
- ☐ 5
- ☐ 1

**Pergunta 2**

Correta

Nota: 1,00 em 1,00

**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 grãos da resina.
- 5.- corresponder ao volume total da coluna que não é utilizado na separação.

Selecione uma ou mais opções de resposta:

- ☐ 1
- ☒ 2 ✓
- ☐ 3
- ☐ 5
- ☒ 4 ✓

**Pergunta 3**

Correta

Nota: 1,00 em 1,00

Assinale as verdadeiras. Na prática de permuta iónica:

1 O citocromo C tem um  $pI$  de 9.6 e a catálase bovina de 5.42. Sendo que a solução de eluição tem  $pH$  de 5.3 e a coluna é aniónica, a proteína retida foi o citocromo.

2 O citocromo C tem um  $pI$  de 9.6 e a catálase bovina de 5.42. Sendo que a solução de eluição tem  $pH$  de 5.3 e a coluna é aniónica, a primeira proteína eluída foi o citocromo.

3 O citocromo C tem um  $pI$  de 9.6 e a catálase bovina de 5.42. Sendo que a solução de eluição tem  $pH$  de 5.3 e a coluna é aniónica, a primeira proteína eluída foi a catálase bovina.

4 O citocromo C tem um  $pI$  de 9.6 e a catálase bovina de 5.42. Sendo que a solução de eluição tem  $pH$  de 5.3 e a coluna é aniónica, a última proteína eluída foi a catálase bovina.

Selecione uma ou mais opções de resposta:

- ☒ 4 ✓
- ☐ 3
- ☒ 2 ✓
- ☐ 1

**Pergunta 4**

Correta

Nota: 1,00 em 1,00

**Na 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.

Selecione uma opção de resposta:

- ☒ 4 ✓
- ☐ 2
- ☐ 3
- ☐ 1

**Pergunta 5**

Correta

Nota: 1,00 em 1,00

Assinale as verdadeiras.

- 1.- Na cromatografia de exclusão molecular – filtração em gel - a fase estacionaria é um liquido.
- 2.- Em cromatografia de exclusão molecular as moléculas excluídas têm um volume de retenção igual ao volume morto.
- 3.- Em cromatografia de exclusão molecular o volume total da coluna e  $\pi \cdot r^2 \cdot h$ .
- 4.- Em cromatografia de exclusão molecular a maior massa maior volume de eluição.
- 5.- Na pratica de cromatografia de exclusão molecular o ditionito captura eletrões.

Selecione uma opção de resposta:

- ☐ 4
- ☒ 2 ✓
- ☐ 5
- ☐ 1
- ☐ 3



**Pergunta 6**

Correta

Nota: 1,00 em 1,00

**Cromatografia de exclusão molecular.**

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

1.-  $V_e$

2.-  $V_0$

3.-  $V_t$

4.-  $V_v$

Selecione uma opção de resposta:

- ☐ 4
- ☐ 3
- ☒ 2 ✓
- ☐ 1

**Pergunta 7**

Correta

Nota: 1,00 em 1,00

Assinale as verdadeiras.

Na figura em anexo:

1  $V_0$  para 25 nm de tamanho de poro é aproximadamente 5 mL (primeiro ponto)

2  $V_0$  para 25 nm de tamanho de poro é aproximadamente 11.5 (último ponto)

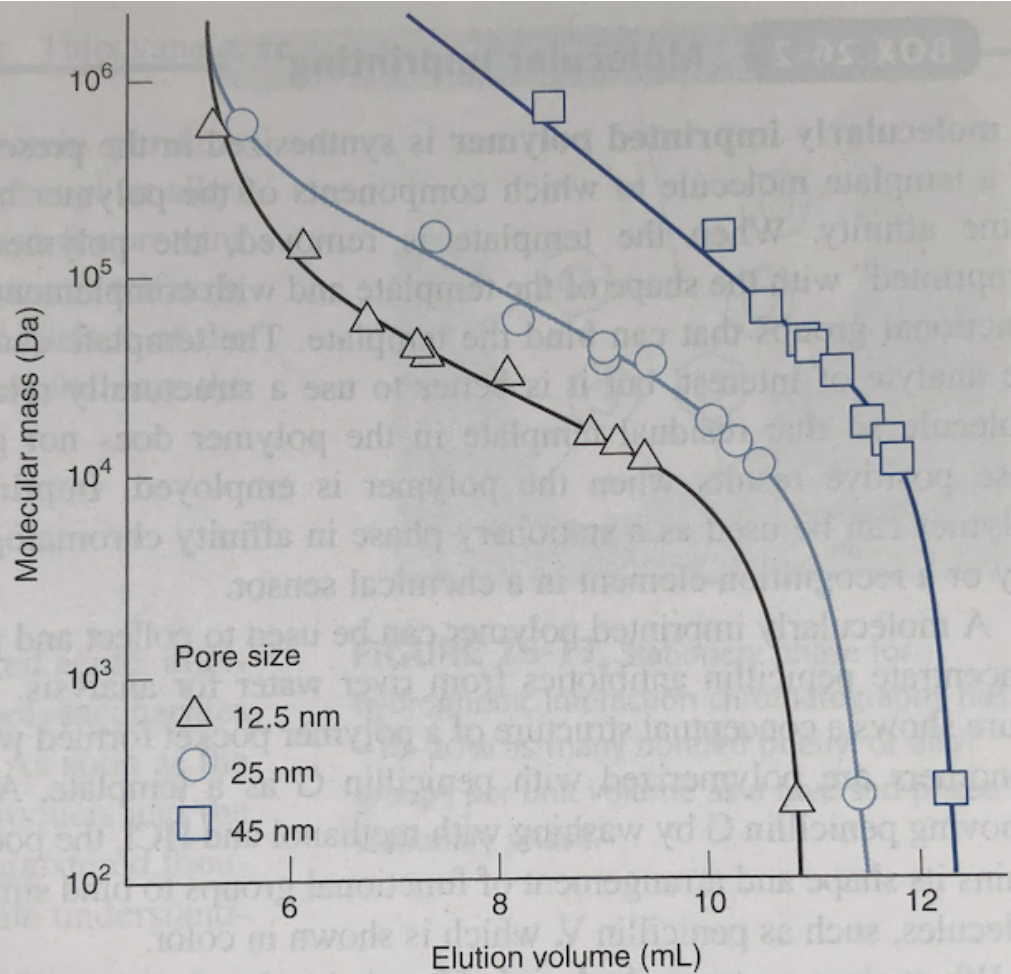
3  $V_0+V_i$  para 25 nm de tamanho de poro é aproximadamente 11 ml (penúltimo ponto)

4  $V_0+V_i$  para 25 nm de tamanho de poro é aproximadamente 11.5 (último ponto)

5  $V_0+V_i$  para 12.5 nm de tamanho de poro é aproximadamente 11 ml (último ponto)

6 O volume de eluição para uma proteína de 10.000 Da é aproximadamente 11 ml na coluna de 12,5 nm.

Ref. Quantitative chemical analysis. Harris. 9 edição



**FIGURE 26-15** Molecular mass calibration graph for hydrophilic silica molecular exclusion columns (30 × 0.78 cm) of different pore size. Calibration based on biomolecules ranging from thyroglobin (660 000 Da) to glycine tetramer (246 Da). [Data from Tosoh Bioscience, Stuttgart, Germany.]

Selecione uma ou mais opções de resposta:

- ☐ 6
- ☒ 1 ✓
- ☐ 4
- ☐ 2
- ☒ 3 ✓
- ☐ 5

**Pergunta 8**

Correta

Nota: 1,00 em 1,00

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 1:	proteína com 25kDa e ponto isoelétrico de 6,3
Proteína 2:	proteína com 27kDa e ponto isoelétrico de 4,2
Proteína 3:	proteína com 105kDa e ponto isoelétrico de 7,7
Proteína 4:	proteína com 70kDa e ponto isoelétrico de 9,8

Visando purificar a proteína de interesse farmacológico (Proteína 2), você realizou uma cromatografia de gel filtração. Após acompanhar o perfil de eluição desta cromatografia, você identificou uma sequência de picos, que foram coletados e analisados. Com base nos seus conhecimentos sobre separação de proteínas, assinale a alternativa que melhor corresponde ao i.) número de picos indificados na análise do cromatograma desta cromatografia; ii.) qual seria o pico que conteria a proteína de interesse; iii) e, 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.

- A  
Cromatograma com dois picos; segundo pico na ordem de eluição conteria a proteína de interesse; uma cromatografia de permuta iônica poderia ser utilizada para isolar a proteína de interesse.
- B  
Cromatograma com três picos; terceiro pico na ordem de eluição conteria a proteína de interesse; uma cromatografia de permuta iônica poderia ser utilizada para isolar a proteína de interesse.
- C  
Cromatograma com quatro picos; terceiro pico na ordem de eluição conteria a proteína de interesse; não seria necessária purificação adicional pois a proteína estaria isolada nesta fração.
- D  
Cromatograma com quatro picos; terceiro pico na ordem de eluição conteria a proteína de interesse; seria necessária uma etapa de purificação adicional por meio de uma coluna de troca iônica.
- E  
Cromatograma com três picos; o segundo pico na ordem de eluição conteria a proteína de interesse; uma cromatografia de permuta iônica poderia ser utilizada para isolar a proteína de interesse.

Selecione uma ou mais opções de resposta:

- ☐ A
- ☐ C
- ☐ D
- ☒ B ✓
- ☐ E

**Pergunta 9**

Correta

Nota: 1,00 em 1,00

Um columna 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:

1.-11 ml

2.- 11,20 ml

3.- 11,35 ml

4.- 11,50 ml

5.- 11,85 ml.

Selecione uma opção de resposta:

☐

2

☐

1

☐

5

☒

4

☐

3

**Pergunta 10**

Correta

Nota: 1,00 em 1,00

Assinale as verdadeiras. Na cromatografia de permuta iónica,

Se uma proteína com  $pI$  7 fica retida numa coluna de permuta catiónica para a poder eluir precisa de:

- 1.- Introduzir um solução eluente a pH 7
- 2.- Introduzir uma solução eluente a pH 4
- 3.- Introduzir uma solução eluente a pH 10
- 4.- Aumentar a força iónica da solução eluente.

Selecione uma ou mais opções de resposta:

- ☐ 2
- ☐ 1
- ☒ 3 ✓
- ☒ 4 ✓

◀ Teste pratico janeiro 2021 (i)-Joel

Ir para...



Teste pratico janeiro 2021-(II)-Joel ►