**Experimento 2 - Espectrofotometria: Conceitos e Aplicação**

Objetivo

Nesses experimentos determinaremos a concentração de uma solução de albumina pela formação de complexos com Cu2+ presentes no reagente de biureto e que absorvem luz com comprimento de onda máximo em 550 nm (método do Biureto).

**Pré-Relatório**

**Parte 1.2:**

1. Separar três tubos de ensaio e numerar de 1 à 3;
2. No tubo de ensaio de número 1, preparar o “branco” com uma solução de água+biureto (1,5 mL de água destilada + 1,5 mL de Biureto );
3. No tubo de ensaio número 2, preparar uma solução de BSA + biureto, colocando 0,5 mL de solução de BSA no tubo e acrescentar 1 mL de água destilada. Após agitação, adicionar 1,5 mL do reagente de Biureto e tornar a agitar.
4. Em um tubo de ensaio (ou num béquer), preparar uma solução de 200ul de BSA e 1000uL de H2O;
5. Após isso, pipetar 0,5mL de solução de BSA diluído (passo 4) no tubo de ensaio 3 e adicionar mais 1 mL de H2O e ***1,5 mL do reagente de Biureto e tornar a agitar.***
6. Após 5 minutos, fazer a aquisição do espectro de absorção no visível dessa solução, usando como “zero” a solução do passo número 2;

**Relatório**

Todo o procedimento foi feito de acordo com o pré-relatório descrito anteriormente; Todos os resultados foram observados e registrados em fotos e nos cadernos de cada integrante, sendo que a absorbância de cada composto foi:

* BSA (concentrado) + biureto: 1---- AU (“estourou” a curva);
* BSA (diluído) + biureto: 337 AU;

Fotos dos tubos de ensaio 1, 2 e 3:



**Questões**

1) Calcule a concentração da solução-problema de BSA.

C = A / (a \* L)

Onde: A → absorbância (A) → 337

C = Concentração → x

L = Caminho óptico (diâmetro interno) da cubeta (l) → 1 cm

a = → 15.100 M-1.cm-1

Logo, temos :

C = 337 / 15.100 (M1 \* cm1 \* cm-1) →

C = 0.02231788079 \*6 M

C = 0,13390728474 M

2) Na figura abaixo, à esquerda observa-se o gráfico da absorbância em função do comprimento de onda de várias concentrações de albumina, e à direita da mesma figura, está plotado o gráfico semelhante correspondente a albumina + biureto. Em que se baseia o Método do Biureto para a dosagem de proteína e porque é utilizada uma banda de absorção diferente em ambos os métodos?

O método de Biureto serve para “elevar” a faixa do espectro eletromagnético onde uma dada molécula tem um pico de absorbância. Em outras palavras, método de biureto faz com que seja possível medir a absorbância de uma solução dentro da faixa do visível do espectro eletromagnético. Isso é possível pois a solução de Biureto cria um cromóforo na molécula de proteína, fazendo com que ele absorva luz com comprimento de onda de 550nm (visível). Este método se baseia em adicionar a solução da proteína à uma solução de Cobre e Hidróxido de sódio e um estabilizante (normalmente o tartarato de sódio). A diferença da banda de absorção de ambos os métodos se dá, justamente, porque o método de Biureto faz com que os novos cromóforos da proteína (que foram gerados pelo reagente adicionado) absorvam luz numa banda de 550nm. O primeiro método não tem nenhum reagente e é mais preciso, logo consegue medir a absorbância da proteína na faixa em que os cromóforos dela absorvem luz (fora do espectro eletromagnético).

3) Relacione as vantagens e desvantagens do método do biureto em relação a outros métodos para dosagem de proteínas. Utilize o artigo “Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes”.

O método de Biureto não é muito sensível, algo esperado, já que a absorbância medida não é a dos cromóforos das moléculas da proteína em si, mas sim dos novos cromóforos formados pelo cobre na molécula da proteína. Porém este método é rápido e utiliza reagentes de baixo custo (cobre e hidróxido de sódio), além de quê ele não interfere muito na absortividade específica de cada proteína (vale ressaltar que, apesar de não interferir muito,o biureto continua interferindo e, se for necessário medir a absorbância de uma proteína com alto grau de precisão, este método pode não ser útil).

**Questões da Sala:**

1. O que é um espectro de varredura? Pra que serve?

É a região do espectro eletromagnético na qual dada substância tem um pico de absorção de luz. O Espectro de varredura serve para informar a Absorbância de luz de uma substância, o que é útil para determinar a concentração da solução desta substância;

1. O que é um padrão de calibração? Pra que serve?

Na leitura do espectro de varredura de uma substância (albumina, no nosso caso), usando o método de biureto, teremos tanto a absorbância da albumina quanto a absorbância do biureto (“corante” usado para realizar a leitura na faixa espectral do visível, ou seja, entre 380nm e 780nm). Neste caso, é necessário descontar a absorbância da concentração de biureto utilizada como corante. Este processo é chamado de “padrão de calibração” ou “leitura do branco”.

Bibiliografia:

*ANÁLISE INSTRUMENTAL ESPECTROFOTOMETRIA. Rio de Janeiro - RJ, CEFET Química-RJ, Apostila de espectrofotometria molecular* - Disponível em: <<http://www.ifrj.edu.br/webfm_send/547>>. Acesso em 14 de Out. de 2016

ZAIA, Dimas; ZAIA, Cássia; LICHTIG, Jaim; “*Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes*”, Química Nova, 1998. - Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v21n6/2914>>. Acesso em 14 de Out. de 2016.