



PRÁTICA – CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS PROTEÍNAS

Nome: _____ Data: _____

Disciplina: _____ Curso: _____

- Além das medidas de biossegurança que você já sabe, você deverá ter cautela com o manuseio das soluções de ácido forte e com a água fervente do banho-maria.

- As soluções de ácido forte ou aquelas que liberarem vapores devem ser manuseadas na capela de exaustão de gases.

FIQUE ATENTO

OBS.: Este roteiro foi construído a partir de adaptação da prática disponibilizada por Kátia A. F. D. Souza e Valdir A. Neves, como citado nas referências bibliográficas.

I. OBJETIVOS:

- Reconhecer as proteínas como moléculas eletricamente carregadas.
- Reconhecer os grupamentos responsáveis pela solubilidade das proteínas em água.
- Identificar os agentes que podem alterar essa solubilidade.

II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

A solubilidade das proteínas em meio aquoso deve-se, em grande parte, à distribuição das cargas elétricas ao longo da molécula. Nesse sentido, se a interação proteína-proteína é grande e a interação proteína - água é pequena, a proteína tenderá a ser insolúvel. Uma das maneiras de promover a precipitação de uma proteína é atingir seu ponto isoelétrico. Porém, existem outros fatores que influem de maneira importante nessa propriedade física das proteínas, como a ação de ácidos, bases, sais e solventes orgânicos. Além disso, podemos incluir a temperatura como um agente que pode ser utilizado para diminuir a solubilidade de uma proteína.

II.A – Precipitação de proteínas por adição de sais neutros (efeito da força iônica)

Quando adicionamos sais neutros a uma solução, ocorre um aumento da força iônica (aumento da concentração de íons) do sistema. Assim, quando adicionamos pequenas quantidades de sal a uma solução contendo proteínas, as cargas provenientes da dissociação do sal passam a interagir com as moléculas proteicas, diminuindo a interação entre elas. Consequentemente, temos um aumento da solubilidade da proteína no meio aquoso. A esse fenômeno dá-se o nome de "salting-in".

Em condições de elevada força iônica, decorrente da adição de grandes quantidades de sal, temos o efeito contrário. A água, que apresenta um grande poder de solvatação, passa a interagir com as duas espécies: as proteínas e os íons provenientes da dissociação do sal. Porém, a água apresenta maior tendência de solvatação de partículas menores (nesse caso, os íons). As moléculas de água, ocupadas em sua interação com os íons, deixam a estrutura protéica. Como consequência, temos maior interação proteína-proteína, diminuição da solubilidade em meio aquoso e, conseqüentemente, precipitação da proteína. A esse fenômeno de insolubilização da proteína em decorrência de um considerável aumento da força iônica do meio dá-se o nome de "salting-out".

Este é um processo importante para separação de proteínas uma vez que a concentração de sal necessária para precipitação é diferente para cada proteína.

II.B – Precipitação por sais de metais pesados e por ácidos fortes

Os cátions de metais pesados como Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , dentre outros, formam precipitados insolúveis de proteínas. Essa precipitação é mais intensa quando o pH está acima do ponto isoelétrico (pI). Isso porque, acima do pI, a carga líquida da proteína é negativa, favorecendo a interação com os cátions provenientes do sal.

A precipitação abaixo do ponto isoelétrico através da adição de ácidos fortes. Comparando com o mecanismo anterior: 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 pírico.

Nas duas situações o precipitado pode ser ressolubilizado através de alterações do pH.

II.C – Precipitação por ação do calor (desnaturação)

As proteínas possuem uma estrutura tridimensional (conformação nativa) bem definida, da qual dependem fundamentalmente suas propriedades físico-químicas e biológicas. Essa estrutura é relativamente sensível à ação do calor, que causa desorganização das cadeias polipeptídicas, com conseqüente alteração conformacional. Esse fenômeno recebe o nome de desnaturação, e altera as estruturas quaternária, terciária e secundária da proteína sem afetar sua estrutura primária.

A desnaturação promove alterações que diminuem a solubilidade da proteína, levando à sua precipitação.

II.D – Precipitação das proteínas por solventes orgânicos

A solubilidade das proteínas em solventes orgânicos é menor do que em água. Isso acontece porque a água apresenta constante dielétrica bastante elevada. Essa grandeza mede a capacidade de interação do solvente com o soluto, o que difere para cada solvente.

Por exemplo, numa solução contendo somente água e moléculas proteicas temos as seguintes interações: interação água-proteína e interação proteína-proteína. Nesse caso, o primeiro tipo de interação prevalecerá sobre o segundo porque a água possui grande capacidade de separação das partículas do soluto (constante dielétrica elevada). Para os solventes orgânicos, a constante dielétrica é bem inferior à da água e, assim, a interação proteína-proteína se sobressai e, conseqüentemente, a proteína precipita.

III. PROCEDIMENTO

AMOSTRA:

- Solução de clara de ovo (1 volume de clara + 4 volumes de NaCl 1%).

a) PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ADIÇÃO DE SAIS NEUTROS

- Em um tubo de ensaio, colocar 2 ml da solução de proteínas;
- Adicionar, deixando escorrer pelas paredes do tubo, 2 ml da solução de sulfato de amônio;
- Observe.
- Misture o conteúdo do tubo (por inversão) e anote os resultados.
- O que você observou?

b) PRECIPITAÇÃO POR SAIS DE METAIS PESADOS E POR ÁCIDOS FORTES

b.1) Precipitação por sais de metais pesados

- Em um tubo de ensaio, colocar 1 ml da solução de proteínas;
- Adicionar 0,5 ml da solução de sulfato de cobre 5%;
- Adicionar 5 ml de água destilada;
- Observe e interprete os resultados.

b.2) Precipitação por ácidos

- Em um tubo de ensaio, colocar 1 ml da solução de proteínas;
- Leve a estante com o tubo para a capela de exaustão de gases e continue o procedimento:
- Adicionar 0,5 ml de ácido nítrico concentrado;
- Adicionar 5 ml de água destilada;
- Observe e interprete os resultados.

c) PRECIPITAÇÃO POR AÇÃO DO CALOR (DESNATURAÇÃO)

- Colocar 3 ml da solução de proteínas em um tubo de ensaio; -
- Deixar o tubo em banho-maria fervente por 5 minutos;
- Retire o tubo do banho, observe e anote os resultados.

d) PRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR SOLVENTES ORGÂNICOS

- Tome dois tubos de ensaio e coloque, em cada um, 2 ml da solução de proteínas;
- Adicionar 4 ml de etanol gelado a cada tubo;
- Agite;
- Em um dos tubos, coloque uma pequena quantidade de NaCl sólido, sob agitação;
- Observe e responda: qual o efeito do álcool sobre a proteína na presença e na ausência do eletrólito?
- Adicione 6 ml de água destilada e observe.
- Repita as etapas anteriores substituindo o etanol pela acetona;
- Compare os resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SOUZA, K. A. F. D.; NEVES, V. A. Propriedades gerais das proteínas. Disponível em:
http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_proteinas/precipitacao_proteinas.htm