

ANÁLISES QUÍMICAS

Hidrofobicidade em Proteínas



Espectrofotômetro + Cubeta de Acrílico
Vortex (Agitador de Tubos)
Centrífuga



Solução de Azul de Bromofenol - BPB (0.10 g/L)
Cada amostra requer 1.0 mL de solução
Para 50 mL de solução → 0.10 g de BPB
15 mL de Etanol
2.5 mL de Ácido Acético Glacial
82.5 mL de Água Destilada



Preparação das Amostras

Em um Eppendorf:
Pesar 0.020 g de Proteína
Adicionar 200 μ L de Água Destilada
Adicionar 1800 μ L da Solução de BPB

Agitar em Vórtex por 30 segundo



Incubação

Colocar no Thermoshaker (15 min, 600 rpm, Temp Ambiente)

Após o período de incubação:
Centrifugar por 15 min a 6000 rpm



Leitura

Ler absorbância em espectrofotômetro usando cubeta de acrílico
Branco = Água Destilada
Controle = Mistura de 100 μ L de Água Destilada + 900 μ L de Solução de BPB
Amostra = Fase sobrenadante (filtrado)



Leitura a 610 nm



Cálculo

Utilizar a curva de calibração para calcular.

Concentração Total de BPB → Obtida com a absorbância da solução de BPB

Concentração Livre → Obtida com a absorbância da amostra

Concentração Ligada = Concentração Total – Concentração Livre

Massa Ligada = Concentração Ligada * 0.10 g/L

Índice de Hidrofobicidade: $H = \text{Massa Ligada} / \text{Massa de Proteína}$



Observações

Leituras entre 0,200 a 2,200 são desejáveis



Curva de Calibração

Fazer curva com pelo menos 5 pontos.

Ler absorbância em espectrofotômetro usando cubeta de acrílico

Para cada leitura use um tubo de ensaio

Adicionar x mL de solução de BPB

Adicionar y mL de água destilada

Em que: $x = 0,200; 0,400; 0,600; 0,800 \text{ e } 0,900 \text{ mL}$

$y = 0,800; 0,600; 0,400; 0,200 \text{ e } 0,100 \text{ mL}$

Fazer a Leitura em 610 nm

Fazer gráfico Abs x Conc.BPB

Os pontos da curva serão relativas às concentrações de

$C = 0.022; 0.044; 0.067; 0.089 \text{ e } 0.100 \text{ g/L}$





Referência

(Bertsch et al., 2003)

Bertsch, M., Mayburd, A. L., & Kassner, R. J. (2003). The identification of hydrophobic sites on the surface of proteins using absorption difference spectroscopy of bromophenol blue. *Analytical Biochemistry*, 313(2), 187–195.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00590-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00590-0)

