

ANÁLISES QUÍMICAS

Sulfidrila Livres e Totais



Espectrofotômetro UV-Vis
Centrífuga
Thermoshaker



Tampão Trizma-Glicina

Cada amostra requer 20,0 mL de solução

Para 250 mL de solução →

2,60 g de Trizma

1,69 g de Glicina

0,37 g de EDTA Sal Dissódico

Tampão Trizma-Glicina com Ureia

Cada amostra requer 10,0 mL de solução

Para 100 mL de solução →

60 mL de Tampão Trizma-Glicina

48,05 g de Ureia

Fazer a mistura e completar com o tampão até completar 100 mL

Solução DTNB (Ácido 5,5'-Ditiobio(2-NitroBenzóico))

Cada amostra requer 0,040 mL de solução

Para 5 mL de solução →

0,020 g de DTNB

5 mL de Tampão Trizma-Glicina (sem Ureia)

Guardar a solução de DTNB no escuro – embrulhar o balão volumétrico em papel-alumínio.



Preparação

Em um Tubo Falcon de 15 mL:

Pesar 0,020 g de Proteína

Adicionar 10 mL de Tampão



Em um segundo Tubo Falcon de 15 mL:
Pesar 0,020 g de Proteína
Adicionar 10 mL de Tampão com Ureia

Agitar os tubos por 30 min em Thermoshaker a 25 °C e 600 rpm



Reação

Adicionar 0,020 mL (20 µL) de Solução DTNB em cada um dos tubos

Agitar em Vortex por 15 segundos

Deixar reagir em Thermoshaker a 25 °C e 600 rpm por 30 min **no escuro**



Centrifugação

Se aparecer um precipitado:

Centrifugar por 10 min a 5000 rpm



Leitura

Após a centrifugação, coletar o sobrenadante.

Ler no Espectrofotômetro a 412 nm

Obs: Para Sulfidrilas Livres, usar Tampão sem ureia como Branco
Para Sulfidrilas Totais, usar Tampão com ureia como Branco



Cálculo

Sulfidrila Livre (Realizada com o Tampão sem Ureia)

$$C_{SH\ Livre} \left(\frac{\mu mol}{g} \right) = \frac{Abs}{13600 \times C_{Prot}}$$

Abs = Absorbância (obtida com o tampão sem ureia)

C_{Prot} = Concentração de proteína (0,000002 g/L)

Sulfidrila Total (Realizada com o Tampão com Ureia)

$$C_{SH\ Total} \left(\frac{\mu mol}{g} \right) = \frac{Abs}{13600 \times C_{Prot}} - C_{SH\ Livre}$$

Abs = Absorbância (obtida com o tampão com ureia)

C_{Prot} = Concentração de proteína (0,000002 g/L)





Este método baseia-se em uma reação colorimétrica em que o DTNB reage com os grupos sulfidril livres (R-SH), liberando um produto de cor amarela intensa: o íon 2-nitro-5-tiobenzoato.

Quando o tampão sem ureia é usado, o DTNB reage apenas com os grupos sulfidril expostos na superfície da proteína e acessíveis ao solvente. Quando o tampão com ureia é usado, a ureia atua como agente desnaturante, quebra a proteína, expondo os grupos tióis. Desta forma, o DTNB reage com todos os grupos sulfidril.

Em alguns casos a Ureia sozinha não consegue expor os grupos sulfidril, e nestes casos deve-se incluir uma etapa de redução (reação com DL-Ditritreitol) e de dessalinização do excesso de DL-Ditritreitol em leito de Sephadex-G25.



(Ellman, 1959)

Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)

