

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS VIA ESPECTROFOMETRIA: VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS MÉTODOS EXISTENTES**Dimas A. M. Zaia***

Departamento de Química - CCE - Universidade Estadual de Londrina - 86051-970 - Londrina - PR

Cássia Thais B. V. Zaia

Departamento de Ciências Fisiológicas - CCB - Universidade Estadual de Londrina - 86051-970 - Londrina - PR

Jaim Lichtig

Instituto de Química - Universidade de São Paulo - 05599-970 - São Paulo - SP

Recebido em 23/7/97; aceito em 19/6/98

DETERMINATION OF TOTAL PROTEIN BY SPECTROPHOTOMETRY: ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF PROPOSED METHODS. Spectrophotometric determination of total protein is used in several areas such as clinical analysis, food science and technology, biochemistry, protein chemistry, physiology. Five spectrophotometric methods are mostly used: biuret, Lowry, Bradford, Smith and UV absorption. In this review a general overview of these methods is presented (interferences, applications); other methodologies are also discussed.

Keywords: protein; spectrophotometry; protein analysis.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de metodologias e estudos comparativos de metodologias espectrofotométricas para a determinação de proteínas totais sempre foram de grande interesse para profissionais, tanto ligados à indústria de alimentos, laboratórios de análises clínicas, como para pesquisadores de diversas áreas. Apesar de os profissionais serem de diferentes áreas e, portanto, com objetivos diferentes, observamos que os questionamentos são sempre os mesmos: Quais são os principais interferentes no método que estou usando? Qual é o método mais adequado para meu caso? Qual é o princípio envolvido no método que estou usando?

Esta revisão, portanto, tem por objetivo abordar diversos aspectos dos métodos espectrofotométricos utilizados para a determinação de proteínas totais em diferentes meios.

As proteínas desempenham papéis extremamente importantes, na maioria dos processos biológicos, atuando como enzimas, hormônios, neurotransmissores, transportadores através das membranas celulares e outros^{1,2}.

O desenvolvimento de metodologias para determinar proteínas tem, cada vez mais, se tornado de fundamental relevância em várias áreas do conhecimento, como por exemplo, em análises clínicas¹, favorecendo o diagnóstico de certas doenças correlacionadas com a alteração da quantidade de proteínas nos fluidos biológicos; em nutrição animal³, ressaltando o aproveitamento racional de nutrientes; em problemas relacionados à nutrição humana^{4,5}, como obesidade, anorexia nervosa, desnutrição, devendo as dietas apresentar teor balanceado de proteínas; em tecnologia e ciências de alimentos⁶, objetivando o aproveitamento racional da matéria prima e o melhoramento dos produtos novos e já existentes; em ecologia⁷, relacionando o comportamento alimentar com a quantidade de proteína ingerida dos alimentos, favorecendo o entendimento dos vários aspectos da vida dos animais silvestres; e na área de química de proteínas objetivando purificar novas proteínas e enzimas⁸.

Estas são apenas algumas das mais importantes aplicações analíticas para metodologias de determinação de proteínas totais; obviamente, existem muitas outras de grande relevância.

Os métodos para a determinação da concentração de proteínas totais são muito variados, no entanto, as metodologias mais

utilizadas são as espectrofotométricas no ultra-violeta e no visível (UV-Vis).

MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS MAIS UTILIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Muitos métodos espectrofotométricos, ao longo dos anos, têm sido propostos para a determinação de proteínas totais, mas não existe uma metodologia considerada de uso universal para todos os meios. Os métodos geralmente mais utilizados são o do biureto⁹, de Lowry¹⁰, do "Coomassie brilliant blue" BG-250 ou reagente de Bradford¹¹, do BCA ou reagente de Smith¹², e de absorção de proteínas no ultravioleta¹³. A seguir serão discutidas as vantagens e desvantagens destas cinco metodologias.

O MÉTODO DE BIURETO**Princípio**

As origens do método do biureto podem ser traçadas desde a proposta inicial de Autenrieth, em 1915; posteriormente diversos autores propuseram modificações do mesmo, sendo, atualmente, a proposta metodológica de Gornall e cols⁹, a mais utilizada.

O método se baseia na reação do reativo do biureto, que é constituído de uma mistura de cobre e hidróxido de sódio com um complexante que estabiliza o cobre em solução, sendo o tartarato de sódio o recomendado por Gornall e cols⁹. O cobre, em meio alcalino, reage com proteínas formando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica. O produto de reação apresenta duas bandas de absorção, uma em 270 nm e outra em 540 nm. Apesar da banda na região de 270 nm aumentar em seis vezes a sensibilidade do método do biureto¹⁴, a banda na região de 540 nm é a mais utilizada para fins analíticos, porque diversas substâncias, normalmente presentes na maioria dos meios analisados, absorvem na região de 270 nm causando muita interferência no método.

Aplicações

O método de biureto tem sido aplicado para determinar a

concentração de proteínas totais em diversos meios, sendo eles: soro ou plasma sanguíneo^{15,16,18,19}, líquido cérebro espinal (líquor)^{20,21}, urina²²⁻²⁴, alimentos²⁵⁻²⁹, saliva³⁰, fibrinogênio³¹ e tecido animal³². O método de biureto tem sido, também, utilizado em análise por injeção em fluxo¹⁹, assim como em alguns métodos cinéticos^{21,33}. Apesar de ser rápido, utilizar reagentes de baixo custo e não apresentar grande variação da absorvidade específica para diferentes proteínas^{9,20,21,30}, este método não é muito sensível, como foi destacado por diversos autores^{20,24,30}, colocando-o em grande desvantagem, em relação a outras metodologias, e por isto tem sido, ao longo dos anos, substituído por métodos mais sensíveis. Mesmo assim, o método de biureto continua sendo recomendado para a determinação da concentração de proteínas totais em plasma sanguíneo pela Associação Americana de Análises Clínicas e por diversos autores^{15,16,34}, bem como para a determinação de proteínas totais em saliva³⁰ e leite²⁹, quando comparado com outros métodos.

Interferentes

Verifica-se que o método de biureto está sujeito à interferência de substâncias que possam reagir com os íons cobre (II). Na tabela 1 estão listados alguns interferentes; os métodos para sua eliminação variam conforme o caso, como discutido nas referências citadas nessa tabela, no entanto, recomendamos a precipitação das proteínas com ácido tricloroacético e posterior solubilização para determinação das mesmas.

O MÉTODO DE LOWRY

Princípio

O método que atualmente conhecemos como de Lowry e cols.¹⁰, para a determinação de proteínas totais, foi originalmente proposto por Wu³⁵, em 1922, sendo esta a metodologia mais utilizada para a determinação de proteínas. O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima em 750 nm.

Chou e Goldstein³⁶ e Legler e cols.³⁷ estudaram extensivamente o mecanismo de redução do reagente de Folin-Ciocalteu por proteínas, peptídeos ou aminoácidos. Estes autores^{36,37} sugerem que esta redução ocorra diretamente através das cadeias

laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina), que contribuem com quatro elétrons, ou através da retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas.

Aplicações

A principal vantagem do método de Lowry é a sua alta sensibilidade e, por isto, tem sido utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais em diversos meios, sendo eles: líquido^{20,38}, plasma sanguíneo^{34,39,40}, saliva humana³⁰, tecido animal^{32,41-43}, plantas⁴⁴⁻⁴⁶, suco biliar⁴⁷, membranas⁴⁸⁻⁵⁰, leite humano^{28,51} e produtos alimentícios⁵². Sargent⁵³ propôs uma modificação no método de Lowry que possibilitou o aumento da sensibilidade em cinquenta vezes. Tal modificação está baseada no fato de que o verde de malaquita reage com o azul de molibdato produzido no método de Lowry e o produto desta reação absorve fortemente em 690 nm aumentando a sensibilidade do método de Lowry.

Devido ao seu extenso uso, o método de Lowry e cols.¹⁰ tem sido utilizado em diversos tipos de equipamentos automatizados^{43,54-57}.

Em estudos comparativos de métodos, alguns autores recomendam a utilização da metodologia proposta por Lowry e cols.¹⁰ para determinar proteínas totais em líquido³⁸, tecido animal⁴¹ e tecido vegetal⁴⁵. Os autores^{38,41,45}, de maneira geral, recomendam o método de Lowry, pois no estudo comparativo de metodologias o mesmo mostrou-se mais sensível, com melhor exatidão, menor consumo de amostra e, dependendo do caso, menos suscetível a alguns tipos de interferentes.

Interferentes

Apesar do método de Lowry e cols.¹⁰ apresentar uma grande sensibilidade para proteínas, o mesmo possui algumas desvantagens, tais como: estar sujeito a muitos interferentes, apresentar longo tempo de análise, possuir absorvidade específica altamente variável para diferentes proteínas, e seguir a Lei de Beer-Lambert apenas numa pequena faixa de concentração de proteínas.

Várias modificações no método de Lowry têm sido propostas para resolver os problemas acima citados. Para aumentar a velocidade da reação, Shakir e cols.⁵⁸ recomendam aquecer a amostra, por 3 minutos, a 37°C, após a adição de sulfato de cobre alcalino, e por mais três minutos, após a adição do

Tabela 1. Algumas substâncias que interferem na determinação de proteínas totais pelo método de biureto⁹.

Interferentes	Comentários	Referências
Bilirrubina	Absorve em 540 nm, sério interferente acima de 70 mg/L.	9, 20, 21
Amônio	Sulfato de amônio usado como precipitante de proteínas; em meio alcalino amônia complexa cobre.	9
Lipídios	Provoca turbidez nas amostras, com conseqüente aumento da absorção das mesmas.	32
Hemoglobina	Aumenta a absorção das amostras.	9, 21
Dextran-40 e 70	Causa turbidez nas amostras, em meio alcalino com tartarato, devido à formação de um complexo insolúvel entre o dextran e cobre.	16-18
Peptídeos e aminoácidos livres (His, Ser, Thr)	Reagem com cobre, sendo interferentes em métodos baseados em cinética de reação.	33
Melanina	Provoca falso positivo	72
Tampão tris-HCl e glicose	Reage com o cobre presente no reativo de biureto.	33
Lactose	Provoca falso positivo	29
Amido	Provoca falso positivo	26

reagente de Folin-Ciocalteu. Larson e cols.⁵⁹ recomendam a adição de tri-1,4-dimercaptobutanodiol, 3 minutos após a adição do reagente Folin-Ciocalteu, com o objetivo de aumentar a velocidade de reação e eliminar a etapa de 30 minutos de espera. Alam⁶⁰ propõe um rígido controle do pH para diminuir o tempo de análise, estabilizar o produto formado e uniformizar as absorvidades específicas das diferentes proteínas.

Hartree⁶¹ fez várias modificações no método de Lowry melhorando a faixa de linearidade e uniformizando as absorvidades específicas para algumas proteínas; estas modificações⁶¹ são as mais utilizadas, apesar de tornar o método de Lowry mais trabalhoso no preparo dos reagentes.

Stauffer⁶² recomenda a construção do gráfico de log Abs versus log microgramas de proteína e Hess e cols.⁶³ recomendam o uso de alta concentração do reagente Folin-Ciocalteu. Tais procedimentos, segundo estes autores, diminuam o tempo de análise, uniformizam as absorvidades específicas para algumas proteínas e/ou aumentam a faixa de linearidade do método de Lowry e cols.¹⁰.

Diversas substâncias interferentes no método de Lowry são citadas na literatura; estas normalmente causam aumento na absorbância do branco, diminuição da absorvidade específica ou formação de algum tipo de precipitado. Os interferentes mais comuns estão listados na tabela 2, tendo-se ainda, como fonte de consulta, uma lista preparada por Bensadoun e Weinstein⁶⁴.

Para a eliminação da maioria dos interferentes citados na tabela 2, sugere-se a precipitação das proteínas utilizando-se: ácido tricloroacético e co-precipitantes^{42,64,65}, misturas de metanol-clorofórmio-água⁴⁸ ou hexano-isopropanol⁴⁹. Se o interferente for composto de enxofre, como mercaptanas, por exemplo, aconselha-se o uso de iodo acetato⁶⁶ ou a secagem a vácuo da amostra⁶⁷, se for lipídeo ou melanina sugere-se a adição de detergentes^{41,68,69}. Verifica-se que a reação de Lowry é fotossensível⁷⁰ recomendando-se exposição uniforme de luz aos tubos.

Apesar de todos os esforços para melhorar o método de Lowry, isto é, diminuir o tempo requerido para a análise, aumentar a faixa de linearidade para a lei de Beer e tornar mais

homogênea as absorvidades específicas para diferentes proteínas, o mesmo continua moroso e sujeito a inúmeros interferentes e, nos últimos anos, está sendo substituído por outros métodos, tais como, o método de Bradford e o método de Smith ou do BCA.

O MÉTODO DE BRADFORD

Princípio

O método de Bradford¹¹ é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de "Coomassie brilliant blue" BG-250.

Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm⁷⁶.

Aplicações

O método de Bradford¹¹, é mais rápido e sensível que o de Lowry e cols.¹⁰ e tem sido utilizado para a determinação de proteínas totais em diversos meios: plasma ou soro sanguíneo^{34,39}, líqüor^{20,77-81}, saliva humana³⁰, produtos alimentícios⁸², leite humano^{28,29,83}, tecidos de plantas^{44,45}, suspensões de células⁸⁴⁻⁸⁶, avidina e estreptavidina⁸⁷, urina^{22,24,79,88-90} e detergentes⁹¹.

Alguns autores recomendam o método de Bradford para a determinação de proteínas totais em leite humano⁸³, líqüor⁸⁰ e urina²⁴. No entanto, com relação à urina, diversos autores destacam dois fatores contra a utilização desta metodologia, sendo um deles a dependência entre o número de diluições da amostra e o resultado da concentração de proteína obtido e, o outro, a presença de proteínas de baixo peso molecular, subestimando a concentração de proteínas totais na urina, principalmente, de pacientes com proteinúria^{22,88-90,92-96}.

Tabela 2. Algumas substâncias que interferem na determinação de proteínas totais pelo método de Lowry e cols.¹⁰.

Interferentes	Comentários	Referências
Compostos fenólicos	Reagem com o reativo de Folin-Ciocalteu resultando em falso positivo.	10, 44, 57, 73
Lipídios	Provocam turbidez das amostras.	10, 41, 48, 49, 69, 71
Detergentes	Provocam a formação de precipitado.	41, 48, 49, 57, 61, 65
Ácido úrico	Reage com o reativo de Folin-Ciocalteu resultando em falso positivo.	10, 73
Guanina e xantina	Reagem com o reativo de Folin-Ciocalteu resultando em falso positivo.	10, 73
Sulfato de amônio	Diminui a absorvidade devido à alteração do pH da amostra.	10, 57
Melanina	Reage com o reativo de Folin-Ciocalteu resultando em falso positivo.	68, 72
Bilirrubina	Aumenta a absorção da amostra.	20
4-metilumbeliferona	Reage com o reativo de Folin-Ciocalteu resultando em falso positivo.	47
Mercaptanas e cisteína	Reagem com o reativo de Folin-Ciocalteu resultando em falso positivo.	48, 49, 66, 67, 73
Tampão tris-HCl	Reage com o reativo de Folin-Ciocalteu resultando em falso positivo.	57, 73
Açúcares	Reagem com o reativo de Folin-Ciocalteu resultando em falso positivo.	57, 61, 73-75
RNA	Aumenta a absorção das amostras	65, 73

Algumas metodologias utilizando equipamentos automatizados^{80,97-101} estão tornando este método mais rápido.

Interferentes

Apesar do método de Bradford¹¹ ser mais rápido, sensível e estar sujeito a um número bem menor de interferentes que o método de Lowry e cols.¹⁰, o mesmo apresenta algumas desvantagens, tais como a variação da absorvidade específica para diferentes proteínas, devido à baixa solubilidade^{75,102} ou baixo peso molecular das mesmas^{22,88-90}, e fornecimento de resultados nem sempre reproduzíveis devido ao grau de pureza do corante BG-250 que varia conforme a procedência, sendo recomendável a padronização das condições de reação para cada lote de corante adquirido.

Para tentar tornar mais uniforme a absorvidade específica de diferentes proteínas, algumas alternativas foram sugeridas: aumentar a concentração do corante¹⁰³; aumentar a solubilização das proteínas que vão reagir com o corante, usando detergentes^{24,79,84,86,104-106}, hidróxido de sódio^{84,107} ou fenol¹⁰⁸; ou aquecer com uréia e 2-mercaptoetanol¹⁰⁹. Entretanto, no caso de amostras com proteínas de baixo peso molecular, não recomendamos a utilização deste método.

A falta de linearidade na lei de Beer-Lambert^{11,107,110} tem sido, também, observada devido a uma variação do pH quando da adição da amostra ao reagente BG-250.

Existem poucas substâncias, citadas na literatura, que são interferentes no método de Bradford. Estes interferentes normalmente reagem com as proteínas impedindo a reação com o corante BG-250 ou reagem com o corante causando aumento na absorbância. A tabela 3 mostra os interferentes mais comuns ao método de Bradford¹¹. Os métodos de eliminação destes interferentes variam conforme o caso, como discutido nas referências citadas nessa tabela, no entanto, recomendamos a precipitação das proteínas com ácido tricloroacético.

O MÉTODO DE SMITH OU BCA

Princípio

O método proposto por Smith e cols.¹², também conhecido por método do ácido bincinonico (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'-

biquinolina), se baseia na reação de cobre (II) com proteínas, em meio alcalino, produzindo cobre (I) e formando um complexo com o BCA, que absorve fortemente na região de 560 nm.

No entanto, Legler e cols.³⁷, estudando o papel catalisador do cobre, em meio alcalino, na reação entre proteínas e o reativo de Folin-Ciocalteu, detectaram formação de um intermediário de cobre (III) com peptídeos, porém não detectaram cobre (I), como estabelecido por Smith e cols.¹², devendo, portanto, ser este mecanismo melhor estudado para se estabelecer qual ou quais intermediários de cobre são formados.

Aplicações

Este método tem a vantagem de ser mais simples no preparo dos reagentes, tão sensível quanto o método de Lowry e cols.¹⁰ e relativamente rápido, sendo aplicado na determinação da concentração de proteínas totais em saliva³⁰, proteínas celulares^{41,113}, interferons⁷⁵, leite humano²⁸ e determinação de grupos funcionais¹¹⁴.

O método de Smith e cols.¹² tem sido recomendado em estudos de comparação de metodologias para a determinação de proteínas totais em leite humano²⁸ e células¹¹³. Esta metodologia também tem sido adaptada para a determinação de proteínas totais utilizando-se equipamentos automatizados^{115,116}.

Interferentes

O método de Smith e cols.¹² possui algumas desvantagens, como a dependência da temperatura de incubação das amostras^{12,115}, a variação da absorvidade específica para diferentes proteínas^{30,75,115} e a variação da absorbância com o tempo. Recomendamos, portanto, um rígido controle no tempo de leitura das amostras, após a incubação das mesmas.

Os interferentes, em potencial, do método de Smith e cols.¹² são aquelas substâncias que reagem com os íons cobre (reações de óxido-redução, formação de complexos, precipitação) ou com o reativo de BCA. A tabela 4 mostra os interferentes mais comuns no método de Smith e cols.¹². Os métodos de eliminação destes interferentes variam conforme o caso, como discutido nas referências citadas nessa tabela; em muitas situações recomendamos a precipitação das proteínas com ácido tricloroacético.

Tabela 3. Algumas substâncias que interferem na determinação de proteínas totais pelo método de Bradford¹¹.

Interferentes	Comentários	Referências
Tolbutamida	Provoca falso positivo.	89
Uréia	Fornecer resultado falso positivo, acima de 45 g/L.	89, 107, 109
Cloreto de sódio e de potássio	Fornecem resultado falso negativo, acima de 1 M	85, 89, 107
Detergentes (Triton X-100, SDS, Tween-20)	A larga banda de absorção em 650 nm, devido a reação entre o corante e os detergentes, interfere na banda em 595 nm, resultando em falso positivo.	11, 76, 84-86, 91, 104, 107
Ciclodextrinas	Formam um complexo de inclusão com o corante BG-250, resultando em falso positivo.	74
Polifenóis e polifenóis oxidases	Reagem com as proteínas impedindo a formação do complexo das mesmas com o corante BG-250.	11, 44, 45, 111
2-mercaptoetanol + guanadina	Diminuem a absorção da amostra.	11, 109
Glicerol	Provoca falso positivo.	11, 85, 107
Lipídios	Causam turbidez na amostra.	85
Clorpromazina	Provoca falso positivo.	112
Fluoreto	Diminui a absorção da amostra.	78

Tabela 4. Algumas substâncias que interferem na determinação de proteínas totais pelo método de Smith e cols.¹².

Interferentes	Comentários	Referências
Açúcares em geral	Provocam parcial redução do cobre (II) resultando em falso positivo.	12, 74, 75, 113, 116, 117
EDTA	Complexa íons cobre (II).	12
Lipídios	Reação entre BCA e lipídios resulta em falso positivo	41, 71
Sulfato de amônio	Resulta falso negativo.	12, 117
Mercaptoetanol e dithiothreitol	Provocam redução do cobre (II) resultando em falso positivo.	117
Peróxido de hidrogênio	Reação entre BCA e peróxido de hidrogênio resulta em falso positivo.	118
Vitamina C e paracetamol	Provocam redução do cobre (II) resultando em falso positivo.	112
Clorpromazina	Provoca turbidez na amostra.	112
Penicilinas	Provocam falso positivo.	112

MÉTODO DE ABSORÇÃO NO ULTRA-VIOLETA

Princípio

Este método é baseado no fato de que as proteínas mostram absorção na região de 280 nm e na região abaixo de 220 nm, sendo a primeira devido a diversos aminoácidos (fenilalanina, cisteína, cistina, metionina, triptofano, histidina e tirosina), e a segunda devido à ligação peptídica¹³. No entanto, em 280 nm, em pH neutro, somente os aminoácidos triptofano, tirosina e cistina possuem uma absorvidade molar significativamente grande^{119,120}.

Aplicações

O método tem sido muito utilizado durante os procedimentos de purificação e separação de proteínas¹³ para a quantificação das mesmas. Suas principais vantagens são as de não destruir a amostra e de ser rápido; na literatura raramente são descritas outras aplicações além desta. O principal motivo desta limitação é que, em amostras complexas, diversas substâncias absorvem no ultra-violeta tornando os resultados pouco confiáveis.

Interferentes

Este método está sujeito a muitos interferentes, sendo que qualquer substância que apresente uma banda de absorção na região de leitura é um interferente em potencial. Este fato fez com que esta metodologia fosse utilizada somente em processos de purificação de proteínas, onde uma avaliação semi-quantitativa é suficiente, na maioria dos casos.

Os métodos discutidos acima são os mais utilizados, porém, como estão sujeitos a limitações, a todo o momento continuam aparecendo, na literatura, modificações das metodologias já existentes, além de propostas de novas metodologias, que serão discutidas a seguir.

NOVOS MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Zaia e cols.¹²¹⁻¹²⁴ propuseram uma metodologia básica utilizando p-benzoquinona (PBQ), para a determinação de proteínas em diversos meios. O método se baseia no fato de que o produto de reação entre PBQ e proteínas absorve em 350 nm. Esta metodologia mostrou-se 10 vezes mais sensível que o método de biureto¹²⁴, de menor custo que o de Lowry e cols.¹²³, e mais rápida que os métodos de Lowry e Kjeldahl^{122,123}. Zaia e cols.¹²¹ propuseram, ainda, uma metodologia inédita que

possibilita, em uma única análise, determinar simultaneamente proteínas e aminoácidos, pois o produto de reação PBQ/proteína absorve em 350 nm e o produto de reação PBQ/aminoácidos absorve em 480 nm. Uma outra quinona, o cloranil, foi utilizada por Rahim e Al-Ghabsha¹²⁵, para a determinação de proteínas totais.

Krystal e cols.^{126,127} propuseram uma metodologia que é 100 vezes mais sensível que o método de Bradford¹¹. Este método está baseado no fato de que prata amoniacal liga-se a proteínas e o produto de reação absorve fortemente em 420 nm.

Stoscheck¹²⁸ propôs uma metodologia que é 25 vezes mais sensível que o método de Bradford¹¹ e 50 vezes mais sensível que o de Lowry¹⁰. Neste método, o ouro coloidal, na presença de proteínas, desloca o seu máximo de absorção de 535 para 595 nm. Segundo a autora o método está sujeito a poucos interferentes.

Estas metodologias que utilizam ouro coloidal ou prata amoniacal, possuem um inconveniente óbvio que é a utilização de reagentes caros; no entanto, Krystal e cols.¹²⁶ afirmam que o custo de 10 análises em triplicata é menor que dois centavos de dolar.

Soedjak¹²⁹ propôs uma metodologia em que o eritrosin B reage com proteína formado um cromóforo que absorve fortemente em 545 nm. A sensibilidade desta metodologia está entre 2 e 14 µg/mL de proteína, que é a mesma sensibilidade do método proposto por Zaia e cols.¹²¹.

O método da ninhidrina¹³⁰ tem sido utilizado para a determinação de proteínas totais^{30,44,75}. Nesta metodologia, as proteínas são submetidas à hidrólise ácida, sendo os aminoácidos liberados determinados com ninhidrina. A desvantagem desta metodologia é o tempo gasto na hidrólise ácida, nos métodos comumente utilizados.

CONCLUSÃO

Diversos fatores devem ser analisados antes da escolha de uma metodologia para a determinação de proteínas totais, porém, um deles é essencial: o conhecimento, o mais preciso possível, da natureza dos constituintes da amostra e de suas concentrações aproximadas. Isto facilitará a identificação dos possíveis interferentes e conseqüentemente ajudará na escolha do método mais apropriado para cada situação.

Outros fatores, também importantes, são a sensibilidade necessária, que é dependente da concentração de proteína na amostra e do volume de amostra disponível; a rapidez e o custo da metodologia; e, não menos importante, o grau de confiabilidade nos resultados obtidos devido aos interferentes no método escolhido.

Temos observado que muitas vezes a escolha de uma metodologia para a determinação de proteínas totais é feita com base na popularidade de um determinado método e isto acontece em parte devido à falta de trabalhos de comparação de metodologias. Portanto, acreditamos que muitos trabalhos deste tipo devam ainda ser desenvolvidos principalmente nas áreas de análises clínicas, ciências e tecnologia de alimentos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todas as pessoas que, durante estes anos, compartilharam sua experiência analítica, assim como dispenderam parte de seu tempo em discussões dos problemas de análises de proteínas. CTBVZ agradece ao CNPq pela bolsa de pesquisador.

REFERÊNCIAS

- Ganong, W. F.; *Review of Medical Physiology*; 17ª edição, Prentice-Hall Inc.; San Francisco, 1995.
- Darnell, J.; Lodish, H.; Baltimore, D.; *Molecular Cell Biology*; Scientific American Books; New York, 1990.
- McDonald, P.; Edwards, R. A.; Greenhalgh, J. F. D.; *Animal Nutrition*; Longman Scientific & Technical; Hong Kong 1987.
- National Academy of Sciences-National Research Council; *Recommended Dietary Allowances*; Publ. 0-309-02216-9; Washington 1974.
- King, B. M.; *Neurosc. Biobehav. Rev.* **1988**, *12*, 29.
- Fennema, O. R.; *Principles of Food Science*; Marcel Dekker Inc.; New York 1976.
- Robbins, C.; *Wildlife Feeding and Nutrition*; Academic Press; New York 1983.
- Heftmann, E.; *Chromatography: A laboratory handbook of chromatographic and electrophoretic methods*; Van Nostrand Reinhold Company; New York 1975.
- Gornall, A. G.; Bardawill, C. J.; David, M. M.; *J. Biol. Chem.* **1949**, *177*, 751.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265.
- Bradford, M. M.; *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C.; *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76.
- Stoscheck, C. M.; In *Methods in Enzymology*; Deutscher, M. P., Ed.; Academic Press Inc.; New York, 1990.
- Itzhaki, R. F.; Gill, D. M.; *Anal. Biochem.* **1964**, *9*, 401.
- Doumas, B. T.; Bayse, D. B.; Borner, K.; Carter, R. J.; *Clin. Chem.* **1981**, *27*, 1651.
- Flack, C. P.; Woollen, J. W.; *Clin. Chem.* **1984**, *30*, 559.
- Barnes, D. B.; Pierce, G. F.; Lichti, D.; Landt, M.; Koenig, J.; Chan, K. M.; *Clin. Chem.* **1985**, *31*, 2018.
- Sykes, E.; Grzych, C.; Epstein, E.; Kiechle, F. L.; *Clin. Chem.* **1987**, *33*, 1073.
- Shideler, C. E.; Stewart, K. K.; Crump, J.; Wills, M. R.; Savory, J.; Renoe, B. W.; *Clin. Chem.* **1980**, *26*, 1454.
- Hische, E. A. H.; Van der Helm, H. J.; Van Meejen, M. Th.; Blanken, H. I. G.; *Clin. Chem.* **1982**, *28*, 1236.
- Finley, P. R.; Williams, R. J.; *Clin. Chem.* **1983**, *29*, 126.
- Goren, M. P.; Li, J. T. L.; *Clin. Chem.* **1986**, *32*, 386.
- Morozova, N. A.; Baryshnikova, T. A.; *Lab. Delo* **1991**, *40*, 23.
- Macart, M.; Gerbaut, L.; *Clin. Chim. Acta* **1984**, *141*, 77.
- Reichardt, W.; Eckert, B.; *Nahrung* **1991**, *35*, 731.
- Mitsunaga, T.; Ando, H.; *Kinki-Daigaku-Nogakubu-Kyo* **1990**, *23*, 63.
- Ramachandran, M.; Grover, A.; Banerjee, B. D.; Hussain, Q. Z.; *J. Food Sci. Technol.* **1984**, *21*, 99.
- Keller, R. P.; Neville, M. C.; *Clin. Chem.* **1986**, *32*, 120.
- Verheul, F. E. A. M.; Cornelissen, P. J. H. C.; *Clin. Chem.* **1986**, *32*, 2003.
- Jenzano, J. W.; Hogan, S. L.; Noyes, C. M.; Featherstone, G. L.; Lundblad, R. L.; *Anal. Biochem.* **1986**, *159*, 370.
- Tzvetanova, E. M.; Gotzev, R. K.; *Clin. Chem.* **1988**, *34*, 430.
- Beyer, R. E.; *Anal. Biochem.* **1983**, *129*, 483.
- Kanaya, K. I.; Hiromi, K.; *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 1885.
- Hunn, J. B.; Greer, I. E.; *J. Fish Biol.* **1990**, *36*, 617.
- Wu, H.; *J. Biol. Chem.* **1922**, *51*, 33.
- Chou, S. C.; Goldstein, A.; *Biochem. J.* **1960**, *75*, 109.
- Legler, G.; Müller-Platz, C. M.; Mentges-Hettkamp, M.; Pflieger, G.; Jülich, E.; *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 278.
- Vermes, L. M. S.; Ferri, R. G.; Marlet, J. M.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **1977**, *37*, 11.
- Nishi, H. H.; Kestner, J.; Elin, R. J.; *Clin. Chem.* **1985**, *31*, 95.
- Schlabach, T. D.; *Anal. Biochem.* **1984**, *139*, 309.
- Upreti, G. C.; Ratcliff, R. A.; Riches, P. C.; *Anal. Biochem.* **1988**, *168*, 421.
- Retz, K. C.; Steele, W. J.; *Anal. Biochem.* **1977**, *79*, 457.
- Harrington, C. R.; *Anal. Biochem.* **1990**, *186*, 285.
- Marks, D. L.; Buchsbaum, R.; Swain, T.; *Anal. Biochem.* **1985**, *147*, 136.
- Mattoo, R. L.; Ishaq, M.; Saleemuddin, M.; *Anal. Biochem.* **1987**, *163*, 376.
- Eze, J. M. O.; Dumbroff, E. B.; *Can. J. Bot.* **1982**, *60*, 1046.
- Marinelli, R. A.; Luquita, M. G.; Garay, E. A. R.; *Clin. Chem.* **1987**, *33*, 1475.
- Wessel, D.; Flügge, U.; *Anal. Biochem.* **1984**, *138*, 141.
- Rodríguez-Vico, F.; Martínez-Cayuela, M.; García-Peregrín, E.; Ramírez, H.; *Anal. Biochem.* **1989**, *183*, 275.
- i, T. H.; *Anal. Biochem.* **1973**, *52*, 517.
- Patton, S.; Huston, G. E.; *Nutr. Rep. Int.* **1984**, *30*, 1401.
- Sebecic, B.; *Nahrung* **1987**, *31*, 817.
- Sargent, M. G.; *Anal. Biochem.* **1987**, *163*, 476.
- Oosta, G. M.; Mathewson, N. S.; Catravas, G. N.; *Anal. Biochem.* **1978**, *89*, 31.
- Lüdi, H.; Bärtschi, A.; *Anal. Chim. Acta* **1989**, *217*, 359.
- Clifton, P. M.; Chang, L.; Mackinnon, A. M.; *Anal. Biochem.* **1988**, *172*, 165.
- Fryer, H. J. L.; Davis, G. E.; Manthorpe, M.; Varon, S.; *Anal. Biochem.* **1986**, *153*, 262.
- Shakir, F. K.; Audilet, D.; Drake III, A. J.; Shakir, K. M. M.; *Anal. Biochem.* **1994**, *216*, 232.
- Larson, E.; Howlett, B.; Jagendorf, A.; *Anal. Biochem.* **1986**, *155*, 243.
- Alam, A.; *Anal. Biochem.* **1992**, *203*, 121.
- Hartree, E. F.; *Anal. Biochem.* **1972**, *48*, 422.
- Stauffer, C. E.; *Anal. Biochem.* **1975**, *69*, 646.
- Hess, H. H.; Lees M. B.; Derr, J. E.; *Anal. Biochem.* **1978**, *85*, 295.
- Bensadoun, A.; Weinstein, D.; *Anal. Biochem.* **1976**, *70*, 241.
- Polacheck, I.; Cabib, E.; *Anal. Biochem.* **1981**, *117*, 311.
- Ross, E.; Schatz, G.; *Anal. Biochem.* **1973**, *54*, 304.
- Makkar, H. P. S.; Sharma, O. P.; Negi, S. S.; *Anal. Biochem.* **1980**, *104*, 124.
- Vedralová, E.; Borovansky, J.; Duchoň, J.; *J. Biochem. Biophys. Meth.* **1987**, *14*, 343.
- Kashyap, M. L.; Hynd, B. A.; Robinson, K.; *J. Lipid Res.* **1980**, *21*, 491.
- Dawson, J. M.; Heatlie, P. L.; *Anal. Biochem.* **1984**, *140*, 391.
- Kessler, R. J.; Fanestil, D. D.; *Anal. Biochem.* **1986**, *159*, 138.
- Borovansky, J.; Melezínek, I.; Budesínská, A.; *Anal. Biochem.* **1986**, *159*, 249.
- Higuchi, M.; Yoshida, F.; *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 1669.

74. Xu, P. P.; Troupe, C. M.; Sharma, A.; *Microchem. J.* **1994**, *49*, 85.
75. Fountoulakis, M.; Juranville, J. F.; Manneberg, M.; *J. Biochem. Biophys. Meth.* **1992**, *24*, 265.
76. Compton, S. J.; Jones, C. G.; *Anal. Biochem.* **1985**, *151*, 369.
77. Macart, M.; Gerbaut, L.; *Clin. Chim. Acta* **1982**, *122*, 93.
78. Cheung, C. K.; Chan, K. W.; Chan, A. Y. W.; *Clin. Chem.* **1990**, *36*, 2011.
79. Macart, M.; Gerbaut, L.; *Clin. Chem.* **1988**, *34*, 998.
80. Huang, C. M.; *Clin. Chem.* **1988**, *34*, 980.
81. Stahl, M.; *Clin. Chem.* **1984**, *30*, 1878.
82. Richard, J. P.; Paquin, P.; *Milchwissenschaft* **1990**, *45*, 92.
83. Bergqvist, Y.; Karlsson, L.; Fohlln, L.; *Clin. Chem.* **1989**, *35*, 2127.
84. Gogstad, G. O.; Krutnes, M. B.; *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 355.
85. Pande, S. V.; Murthy, M. S. R.; *Anal. Biochem.* **1994**, *220*, 424.
86. Fanger, B. O.; *Anal. Biochem.* **1987**, *162*, 11.
87. Sharma, H. K.; Tihon, C.; *Anal. Biochem.* **1988**, *170*, 135.
88. Shiba, K. S.; Kanamori, K.; Harada, T.; Nakao, M.; Nakajima, K.; Kodaira, T.; Nakagawa, H.; *Clin. Chem.* **1985**, *31*, 1215.
89. Lott, J. A.; Stephan, V. A.; Pritchard Jr., K. A.; *Clin. Chem.* **1983**, *29*, 1946.
90. Wimsatt, D. K.; Lott, J. A.; *Clin. Chem.* **1987**, *33*, 2100.
91. Rosenthal, K. S.; Koussale, F.; *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 1115.
92. Goren, M. P.; Wright, R. K.; Li, J. T. L.; *Clin. Chem.* **1985**, *31*, 1771.
93. Dilena, B. A.; Penberthy, L. A.; *Clin. Chem.* **1984**, *30*, 1589.
94. Heick, H. M. C.; Mohammed, A.; *Clin. Chem.* **1984**, *30*, 1104.
95. Shahangian, S.; Brown, P. I.; Ash, K. O.; *Clin. Chem.* **1983**, *29*, 1452.
96. Heick, H. M. C.; Mohammed, A.; Charbonneau, F.; *Clin. Chem.* **1983**, *29*, 1863.
97. Gillery, P.; Locre, F.; Malgras, A.; Borel, J. P.; *Clin. Chem.* **1985**, *31*, 1092.
98. Korenaga, T.; Zhou, X.; Izawa, M.; Takahashi, T.; Moriwake, T.; *Anal. Chimica Acta* **1992**, *261*, 67.
99. Joern, W. A.; Schmoele, L.; *Clin. Chem.* **1981**, *27*, 1305.
100. Redinbaugh, M. G.; Campbell, W. H.; *Anal. Biochem.* **1985**, *147*, 144.
101. Kanaya, K. I.; Hiromi, K.; *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 2615.
102. Marshall, T.; Williams, K. M.; *Anal. Biochem.* **1992**, *204*, 107.
103. Read, S. M.; Northcote, D. H.; *Anal. Biochem.* **1981**, *116*, 53.
104. Friedenauer, S.; Berlet, H. H.; *Anal. Biochem.* **1989**, *178*, 263.
105. Duhamel, R. C.; Meezan, E.; Brendel, K.; *J. Biochem. Biophys. Meth.* **1981**, *5*, 67.
106. Löffler, B. M.; Kunze, H.; *Anal. Biochem.* **1989**, *177*, 100.
107. Stoscheck, C. M.; *Anal. Biochem.* **1990**, *184*, 111.
108. Marshall, T.; Williams, K. M.; *J. Biochem. Biophys. Meth.* **1986**, *13*, 145.
109. Gotham, S. M.; Fryer, P. J.; Paterson, W. R.; *Anal. Biochem.* **1988**, *173*, 353.
110. Splittgerber, A. G.; Sohl, J.; *Anal. Biochem.* **1989**, *179*, 198.
111. Godshall, M. A.; *J. Food Sci.* **1983**, *48*, 1346.
112. Marshall, T.; Williams, K. M.; *Anal. Biochem.* **1991**, *198*, 352.
113. Goldschmidt, R. C.; Kimelberg, H. K.; *Anal. Biochem.* **1989**, *177*, 41.
114. Tyllianakis, P. E.; Kakabakos, S. E.; Evangelatos, G. P.; Ithakissios, D. S.; *Anal. Biochem.* **1994**, *219*, 335.
115. Davis, L. C.; Radke, G. A.; *Anal. Biochem.* **1987**, *161*, 152.
116. Redinbaugh, M. G.; Turley, R. B.; *Anal. Biochem.* **1986**, *153*, 267.
117. Brown, R. E.; Jarvis, K. L.; Hyland, K. J.; *Anal. Biochem.* **1989**, *180*, 136.
118. Baker, W. L.; *Anal. Biochem.* **1991**, *192*, 212.
119. Groves, W. F.; Davis Jr., F. C.; Sells, B. H.; *Anal. Biochem.* **1968**, *22*, 195.
120. Pace, C. N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimley, G.; Gray, T.; *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2411.
121. Zaia, D. A. M.; Barreto, W. J.; Santos, N. J.; Endo, A. S.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, *277*, 89.
122. Barreto, W. J.; de Aquino, M.; Zaia, D. A. M.; *Anal. Letters* **1990**, *23*, 1279.
123. Zaia, D. A. M.; Rockenbach, S. R.; Obara, M. M.; Barreto, W. J.; Arizawa, S.; Curi, R.; Lichtig, J.; *Anal. Letters* **1992**, *25*, 1225.
124. Zaia, D. A. M.; Obara, M. M.; Rockenbach, S. R.; Barreto, W. J.; Gaziri, L. C. J.; Zaia, C. T. B.; Lichtig, J.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1992**, *25*, 549.
125. Rahim, S. A.; Al-Ghabsha, T. S.; *Egypt J. Chem.* **1977**, *20*, 627.
126. Krystal, G.; Macdonald, C.; Munt, B.; Ashwell, S.; *Anal. Biochem.* **1985**, *148*, 451.
127. Krystal, G.; *Anal. Biochem.* **1987**, *167*, 86.
128. Stoscheck, C. M.; *Anal. Biochem.* **1987**, *160*, 301.
129. Soedjak, H. S.; *Anal. Biochem.* **1994**, *220*, 142.
130. Moore, S.; *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 6281.