



APLICAÇÃO DO MÉTODO DE BRADFORD EM MICROPLACAS PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS EM SOBRENADANTE DE MINHOCAS *eisenia foetida*

¹Amanda de Oliveira Caldeira, ²Josiane Rios, ³Sandro Tuerlinckx

As proteínas são polímeros cujas unidades constituintes fundamentais são os aminoácidos. A determinação da concentração proteica frequentemente é necessária em trabalhos de bioquímica. Vários métodos estão disponíveis para a determinação de proteínas em amostras biológicas; cada um com características próprias e necessidade de adequação para um determinado propósito. As razões para realizar um ensaio de proteína são diversas, como durante uma purificação proteica, ensaios de atividade enzimática, nas comparações de amostras em um gel de SDS-PAGE ou usando anticorpo para um western blot. O reagente de Bradford pode ser usado para determinar a concentração de proteínas em solução. O procedimento baseia-se na formação de um complexo entre o corante azul brilhante de Coomassie G-250 e as proteínas da amostra. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante da forma aniônica (vermelha) para a forma catiônica (azul), que absorve fortemente em 595 nm. A taxa de absorção é proporcional à quantidade de proteína presente no ensaio e pode ser determinada usando-se espectrofotômetros ou adaptados a leitoras de microplacas. O objetivo deste trabalho foi utilizar o método de Bradford para quantificar proteínas de minhocas *Eisenia foetida* por intermédio de uma leitora de microplacas. Inicialmente, foi construído uma curva de calibração com ovoalbumina *Grade II* – Sigma. Para tal, foram preparadas seis diluições com as concentrações finais de 2,0 mg mL⁻¹, 1,0 mg mL⁻¹, 0,5 mg mL⁻¹, 0,25 mg mL⁻¹, 0,1 mg mL⁻¹ e 0,05 mg mL⁻¹. Em microplacas à parte, foram separados 10 µL de cada concentração final e adicionados a 200 µL de Reagente de Bradford formando amostras finais para a leitura. As amostras de *Eisenia foetida* utilizadas foram homogeneizados diluídos na proporção de 10 vezes, obtidos por maceração em tampão Tris-HCl 0,05M e pH 7,5. As amostras foram medidas em leitora de microplacas *Anthos 2010*, com comprimento de onda em 620nm, luz visível, usando água para o Branco. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O ensaio foi reprodutivo e rápido com o processo de ligação completado em cinco minutos e manteve boa estabilidade da coloração por 1 hora, não caracterizando problemas quanto ao intervalo de tempo para a realização das medidas. Todos os resultados obtidos foram plotados em um gráfico com as médias, traçados em Microsoft Office Excel 2010, que também foi utilizado na aplicação das equações da reta e no cálculo

¹ Discente do Curso de Fisioterapia da Urcamp

² Discente do Curso de Nutrição da Urcamp

³ Prof. Doutor do Centro de Ciências da Saúde da Urcamp

do valor do coeficiente de correlação de Pearson (R^2 ou r). Com os valores de R^2 da equação da reta obtida, foi possível determinar a concentração de proteínas provenientes em amostras obtidas dos homogeneizados de minhocas *Eisenia foetida*. Sabendo dos valores da média, as concentrações utilizadas e a curva padrão de ovoalbumina, os cálculos foram feitos com a equação: $y = 0,036x + 0,0186$; em que, y = Absorbância; x = Concentração da amostra. Com esses dados, foi possível determinar que as concentrações encontradas para proteínas de *Eisenia foetida* foram de $2,54 \pm 0,28 \text{ mg mL}^{-1}$.

Palavras chave: bioquímica; ensaio; padronização.