

# Interferência do pH, concentração de BSA e de tampão fosfato sobre a resposta na determinação de proteína total pelo método do Biureto

João Baptista Severo Junior

Graduando do Departamento de Engenharia Química – UFS.  
São Cristóvão – SE [Brasil]  
jb\_ufs@yahoo.com.br

Euzébio Clei de Oliveira Correia

Graduando do Departamento de Engenharia Química – UFS.  
São Cristóvão – SE [Brasil]  
euzebio.correia@yahoo.com.br

Roberto Rodrigues de Souza

Professor do Departamento de Engenharia Química – UFS.  
São Cristóvão – SE [Brasil]  
rrsouza@ufs.br

José Carlos Curvelo Santana

Pós Doutorando do Departamento  
de Engenharia de Sistemas Químicos,  
Faculdade de Engenharia Química – Unicamp.  
Campinas – SP [Brasil]  
jccurvelo@yahoo.com.br

Elias Basile Tambourgi

Professor do Departamento de  
Engenharia de Sistemas Químicos,  
Faculdade de Engenharia Química – Unicamp.  
Campinas – SP [Brasil]  
eliastam@feq.unicamp.br

Neste trabalho, teve-se como objetivo minimizar o efeito de interferência provocado pelo pH, das concentrações de albumina de soro bovino (BSA) e do tampão fosfato sobre a concentração de proteínas totais determinada pelo método do Biureto, usando um modelo estatístico obtido por metodologia de análise de superfície de resposta (RSM). Os resultados mostraram que os efeitos dos fatores estudados são muito significantes e que, para reduzi-los, é necessário usar o tampão fosfato com pH 7 e concentração de 0,01 mol/L. Ademais, a concentração da proteína não deve superar ao 3 g/L.

**Palavras-chave:** Interferências. Método do biureto. Otimização. Proteínas. Tampão fosfato.



## 1 Introdução

As proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes nas células e constituem 50% ou mais de seu peso seco. São encontradas em todas as partes de todas as células, uma vez que são fundamentais sob todos os aspectos da estrutura e função celular. Existem diversas espécies de proteínas, com funções biológicas diferentes.

O desenvolvimento de metodologias para determinar proteínas tem sido de fundamental relevância em várias áreas do conhecimento, tais como em análises clínicas, favorecendo o diagnóstico de certas doenças correlacionadas à alteração da quantidade de proteínas nos fluidos biológicos; em tecnologia e ciência de alimentos, objetivando o aproveitamento racional da matéria-prima, e na melhora de produtos novos e já existentes na área de biotecnologia para purificar novas proteínas (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

Para muitos tipos de análise química, a elaboração de uma metodologia analítica deve ser feita com base em procedimentos de repostas geradas pela avaliação de quantidades conhecidas dos constituintes (chamados “padrão”), de forma que essas respostas possam ser interpretadas. Para isso, normalmente é feita uma curva de calibração ou curva analítica, que mostra a resposta de um método analítico como uma função da quantidade da amostra-padrão a ser medida (HARRIS, 2001).

Os métodos para a determinação da concentração de proteínas totais são muito variados; no entanto, a metodologia mais usada é a espectrofotométrica no ultravioleta e no visível (UV-vis) (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998). A espectrofotometria é um método analítico baseado na absorção de luz por moléculas que passam para um estado excitado. Quando a luz é absorvida por uma amostra, a energia radiante do feixe de luz diminui, sendo a absorbância de luz diretamente

proporcional à concentração das espécies absorventes de luz na amostra (HARRIS, 2001; ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

Muitos métodos espectrofotométricos, ao longo dos anos, têm sido propostos para a determinação de proteínas totais, mas não existe nenhuma metodologia considerada de uso universal para todos os meios. Um dos métodos mais utilizados é o do biureto, que se baseia na reação do reativo do biureto, constituído de uma mistura de cobre e hidróxido de sódio com um complexante que estabiliza esse metal em solução, sendo o tartarato de sódio recomendado por Gornall Bardawill e David (1951). O cobre, em meio alcalino, reage com proteínas, formando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica. O produto da reação apresenta duas bandas de absorção, uma em 270 nm e outra em 540 nm. Apesar de a banda, na região de 270 nm, aumentar seis vezes a sensibilidade do método, na região de 540 nm, é a mais utilizada para fins analíticos, porque diversas substâncias, normalmente presentes nos meios analisados, absorvem na região de 270 nm, causando muita interferência na resposta espectral do método (ITZHAKI; GILL, 1964).

Em razão de o método do biureto ser um dos mais empregados para determinar a concentração de proteína total, apresentando análise por comparação de padrões, qualquer comportamento da amostra que seja diferente das soluções de referência pode produzir interferências que, posteriormente, levarão a erros nos valores das amostras analisadas (GONÇALVES, 1996). Logo, neste trabalho, objetivou-se minimizar o efeito de interferência provocado pelo pH, concentração de tampão fosfato e do soro de albumina bovina (BSA) sobre a concentração de proteína total determinada pelo método do biureto, para aplicações posteriores em análise de alimentos, por meio de uma otimização pela Metodologia de Análise de Superfície de Resposta (RSM).

## 2 Metodologia

### 2.1 Preparo de soluções

Foram preparadas soluções tampões fosfato seguindo a metodologia descrita por Morita e Assumpção (1995). Para isso, prepararam-se soluções-padrão de ácido fosfórico, fosfato monobásico de potássio e fosfato dibásico potássio, e misturou-se tudo em um béquer, contendo um eletrodo de prata cloreto de prata, para medir o pH do meio até atingir o pH desejado.

As soluções-padrão de soro de albumina bovina (BSA) e a solução de biureto bem como suas curvas analíticas foram feitas segundo a metodologia descrita por Zancan (1999).

### 2.2 Modelagem da interferência

Neste item, avaliou-se o efeito da interferência provocado pelo pH, concentração do tampão fosfato ( $C_T$ ) e do soro de albumina bovina ( $C_{BSA}$ ) sobre a resposta, que, nesse caso, é o erro relativo à curva analítico-padrão, solução de BSA em água (Y). Para isso, elaborou-se um planejamento fatorial do tipo  $2^3$  (Tabela 2). Os cálculos matriciais para a obtenção das estimativas dos parâmetros dos modelos foram feitos pelo método de mínimos quadrados, a avaliação do ajuste desses modelos foi realizada pela metodologia de análise da variância (ANOVA), e a otimização, pela metodologia de análise de superfície de resposta (RSM), todos descritos em Barros Neto, Scarminio e Bruns. (1995 e 2001). As variáveis codificadas utilizadas nesse planejamento fatorial foram as seguintes:

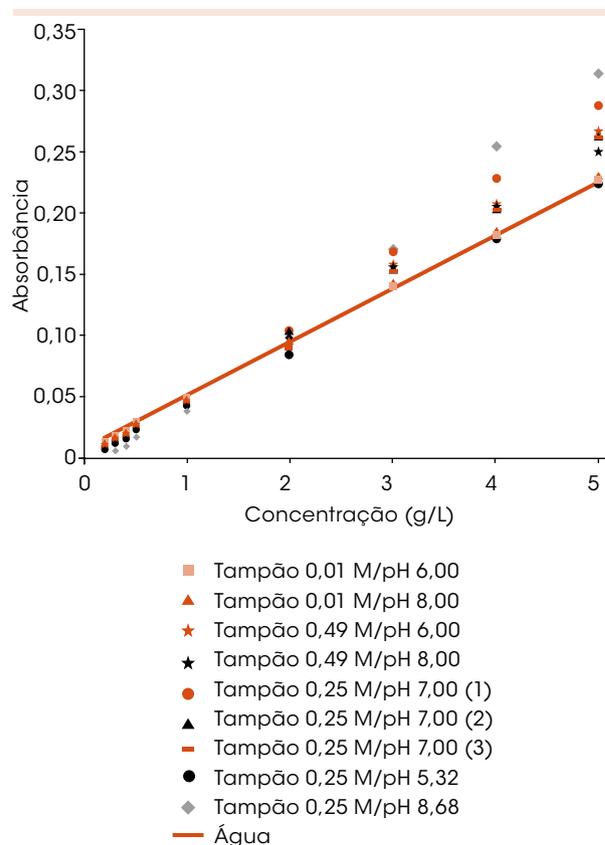
$$x_1 = \frac{C_T - 0,25}{0,24} \quad (1)$$

$$x_2 = pH - 7,0 \quad (2)$$

$$x_3 = C_{BSA} - 2,0 \quad (3)$$

## 2 Resultados e discussão

As curvas analíticas, obtidas por regressão linear (absorbância *versus* concentração da solução-padrão), são mostradas na Figura 1, em que é possível perceber a influência do pH e da concentração do tampão por meio das curvas analíticas para os experimentos mostrados na Tabela 1, quando comparados com a curva analítica-padrão (“controle”), solução de BSA em água deionizada. Como foi possível observar na Figura 1, todas as curvas apresentaram boa linearidade e todos os coeficientes de correlação de equação da reta estão próximos de 1,0 (valor tido como ótimo), conforme mostra a Tabela 1. Isso possibilita uma boa quantificação dos analitos pelo mé-



**Figura 1: Curvas analíticas do método de biureto para todas as condições experimentais, comparando-as com a curva “controle”, feita com água deionizada**

Fonte: Os autores.



do de biureto (GONÇALVES, 1996; HARRIS, 2001). A curva analítica para a água apresentou um coeficiente de correlação 0,999 e teve como equação da reta  $y = 0,0437x + 0,0062$ .

**Tabela 1: Características das curvas analíticas**

Conc. tampão (mol/L)	pH	Equação da reta	Coefficientes de correlação (r)
0,01	6,00	$0,0452x - 0,0003$	0,9993
0,01	8,00	$0,0436x + 0,0075$	0,9991
0,49	6,00	$0,0525x - 0,0005$	0,9995
0,49	8,00	$0,0511x - 0,0029$	0,9986
0,25	7,00	$0,0579x - 0,0014$	0,9990
0,25	7,00	$0,0536x - 0,0029$	0,9994
0,25	7,00	$0,0521x + 0,0008$	0,9993
0,25	5,32	$0,0452x - 0,0033$	0,9996
0,25	8,68	$0,0658x - 0,0185$	0,9980

Fonte: Os autores.

Para melhor compreensão das respostas dos experimentos, foi feito um planejamento experimental do tipo  $2^3$ , como mostrado na Tabela 2. Nela, constam os erros relativos à curva analítica-padrão, resposta  $Y_{exp}$ , obtida para cada ensaio. Esses dados serviram de base para regressão pelo método dos mínimos quadrados e obtenção dos modelos, bem como sua posterior avaliação pela metodologia ANOVA, como será visto a seguir.

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram a análise estatística da validade do modelo quadrático, utilizando a metodologia da análise de variância, descrita por Barros Neto Scarminio e Brums (1995 e 2001), para a obtenção do modelo empírico que descreve o comportamento do sistema em estudo. Nessa tabela, encontram-se os valores de análise da variância e da máxima explicáveis, e a correlação múltipla ( $R^2$ ). Quanto mais próximos de 100 estiverem os valores da variância e da máxima explicáveis, e a correlação múltipla próxima de 1,0, menor

**Tabela 2: Matriz de planejamento experimental**

Ensaio	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Conc. de tampão (mol/L)	pH	Conc. de BSA (g/L)	$Y_{exp}$	$Y_{calc}$
1	-1	-1	-1	0,01	6,00	1,00	6,167	5,258
2	-1	1	-1	0,01	8,00	1,00	4,587	4,768
3	-1	-1	1	0,01	6,00	3,00	4,204	4,452
4	-1	1	1	0,01	8,00	3,00	2,064	2,544
5	1	-1	-1	0,49	6,00	1,00	9,524	9,755
6	1	1	-1	0,49	8,00	1,00	7,436	7,900
7	1	-1	1	0,49	6,00	3,00	9,841	8,949
8	1	1	1	0,49	8,00	3,00	5,479	5,677
9	0	0	0	0,25	7,00	2,00	12,435	10,828
10	0	0	0	0,25	7,00	2,00	10,541	10,828
11	0	0	0	0,25	7,00	2,00	8,637	10,828
12	0	-1,68	0	0,25	5,32	2,00	12,058	12,408
13	0	1,68	0	0,25	8,68	2,00	10,470	9,248
14	0	0	-1,68	0,25	7,00	0,32	22,056	22,076
15	0	0	1,68	0,25	7,00	3,68	19,550	19,531

Fonte: Os autores.

**Tabela 3: Análise da variância do modelo estatístico**

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$F_{calc}$	$F_{tab}$
Regressão	403,944	7	57,706		
Resíduos	11,340	7	1,620	35,622	3,79
Falta de ajuste	4,126	5	0,825		
Erro puro	7,213	2	3,607	0,229	19,25
Total	415,291	14			
% de variância explicada =				97,27	
% máxima variância explicável =				98,26	
Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) =				0,9727	

Fonte: Os autores.

será a quantidade de erros acumulada no modelo. Percebe-se que os valores encontrados para os dois parâmetros se enquadram no esperado. Então, por seu conceito, pode-se afirmar que o modelo apresenta baixos erros decorrentes da regressão (variâncias e  $R^2$ ).

As duas colunas finais da Tabela 3 registram os testes F. A primeira apresenta o valor calculado após o ajuste do modelo, e a segun-

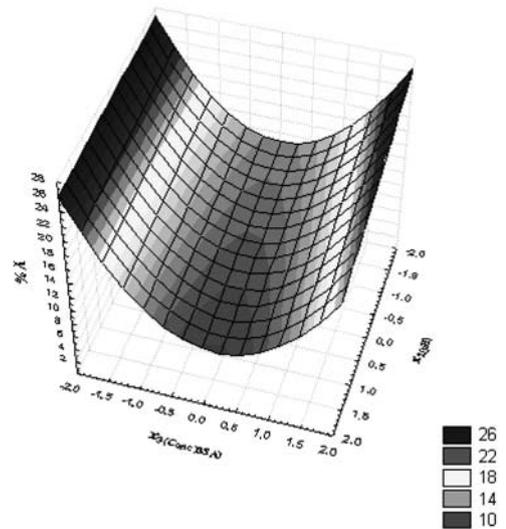
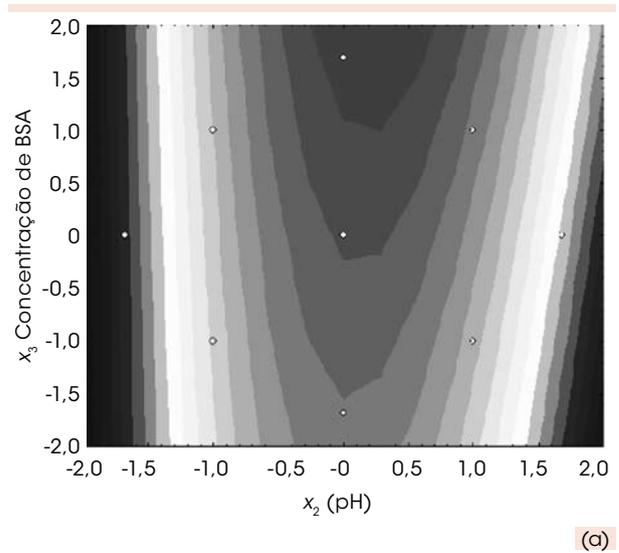
da, dados que constam da literatura (BARROS NETO et al., 2001). A divisão entre os dois primeiros valores de cada ( $F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}}$ ), de acordo com Barros Neto et al. (1995 e 2001), indica que o modelo é significativo, ou seja, os dados preditos se aproximam dos experimentais. Já a divisão entre os dois segundos valores, em que o  $F_{\text{tab}}$  é denominador ( $F_{\text{tab}}/F_{\text{calc}}$ ), indica que os dados estão ajustados e descrevem bem a superfície de resposta. Para a validação do primeiro teste, é necessário que o valor do  $F_{\text{calc}}$  (calculado) seja, no mínimo, quatro vezes maior que o do  $F_{\text{tab}}$  (tabelado), mostrando, assim, que o modelo é significativo, uma vez que o  $F_{\text{calc}}$  foi aproximadamente nove vezes maior que o  $F_{\text{tab}}$ . No caso do segundo teste, a validade é inversa, ou seja,  $F_{\text{calc}}$  precisa ser, no mínimo, quatro vezes menor que  $F_{\text{tab}}$ . Observa-se que o  $F_{\text{calc}}$  chegou a ser aproximadamente 84 vezes menor que o  $F_{\text{tab}}$ ; isso significa que os dados conseguem descrever bem a superfície de resposta (BARROS NETO; SCARMINO; BRUNS, 1995 e 2001).

A Equação 4 descreve o modelo para obtenção das condições ótimas que minimizam o efeito dos interferentes, avaliando a influência da concentração do tampão ( $x_1$ ), do pH ( $x_2$ ) e da concentração de BSA ( $x_3$ ) sobre o erro relativo à curva analítica-padrão.

$$Y = 10,8282 + 1,9074x_1 - 0,9406x_2 - 0,7575x_3 - 0,3412x_1x_2 + \dots \\ \dots - 0,3542x_2x_3 - 8,1996x_1^2 + 3,5342x_3^2 \quad (4)$$

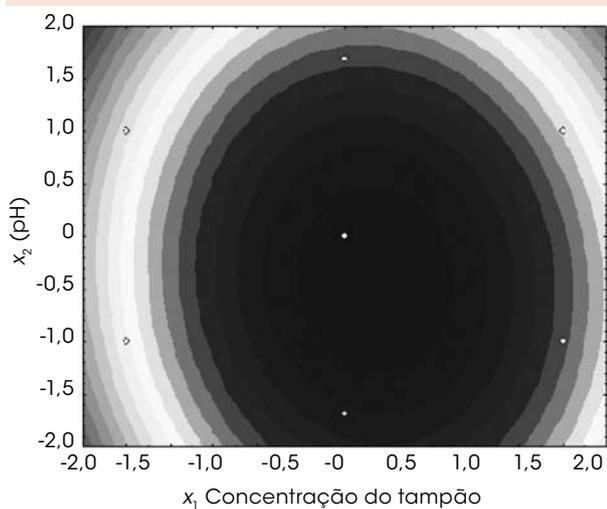
A partir da equação 4 foi possível obter as Figuras 2, 3 e 4 que representam as superfícies de resposta em 2D e 3D. Nessas figuras, percebe-se que o erro relativo diminui à medida que os valores de pH e concentração de BSA tendem a valores centrais e extremos da concentração de tampão fosfato. A otimização RSM determinada

pela análise das figuras indicou que, para reduzir os efeitos de interferência dos fatores usados, deve-se analisar as proteínas usando o método do biureto na região compreendida entre o pH 7,0, 3,0 g/L (BSA) e 0,01 mol/L de concentração de tampão fosfato, havendo, com isso, menor gasto de reagente para o caso estudado.

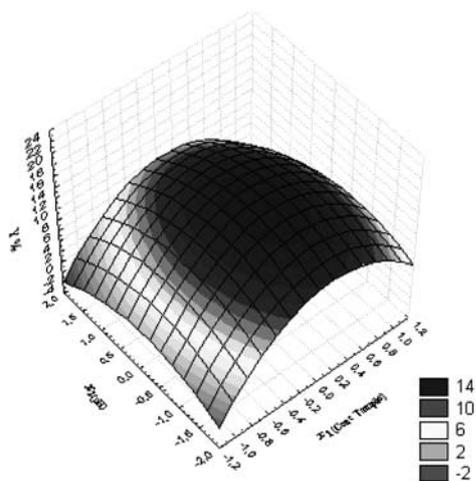


**Figura 2: Curvas de níveis (a) e superfície de resposta (b) que descrevem o efeito da interferência do pH e da concentração de BSA sobre a curva analítica-padrão**

Fonte: Os autores.



(a)



(b)

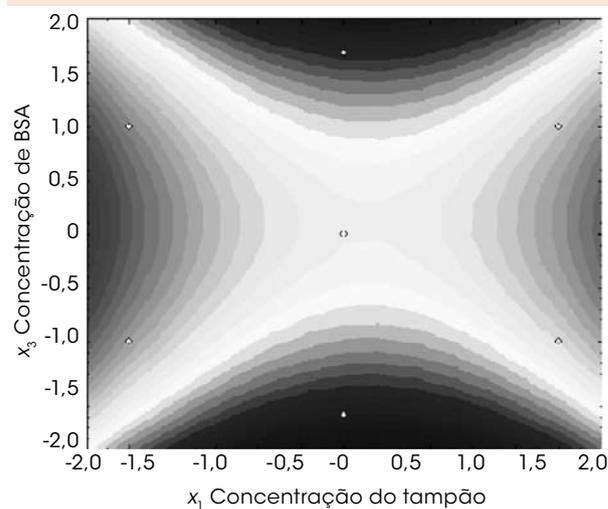
**Figura 3: Curvas de níveis (a) e superfície de resposta (b) que descrevem o efeito da interferência do pH e da concentração do tampão sobre a curva analítica-padrão**

Fonte: Os autores.

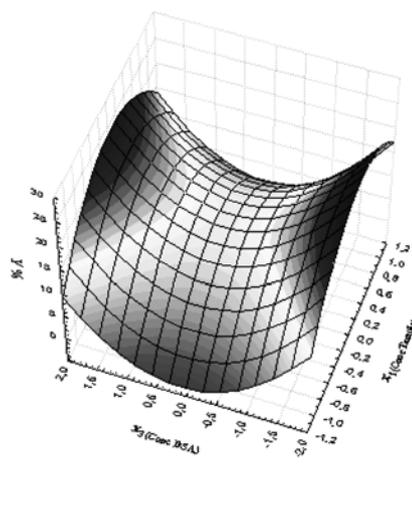
### 3 Considerações finais

Os estudos mostrados ao longo deste trabalho, para minimizar os efeitos dos interferentes na determinação de proteína total pelo método do biureto, permitiram as seguintes conclusões:

– As curvas analíticas apresentaram desvios em ambos os lados da curva-padrão. A análise



(a)



(b)

**Figura 4: Curvas de níveis (a) e superfície de resposta (b) que descrevem o efeito da interferência da concentração de BSA e da concentração do tampão sobre a curva analítica-padrão**

Fonte: Os autores.

ANOVA apresentou, como modelo mais ajustado, o quadrático, e a análise RSM registrou, como melhor região para determinar a concentração de proteína total, aquela que tendia para os valores centrais de pH, concentração de BSA e extremos da concentração de tampão fosfato.

– Comprovou-se que essa interferência é significativa e que se deve usar, como faixa de con-

centração dos reagentes e pH para reduzir esse efeito, a região compreendida entre o pH 7,0, 3,0 g/L (BSA) e 0,01 mol/L de concentração de tampão fosfato, havendo, com isso, um menor gasto de reagente para o caso estudado.

### Interference of the pH, BSA and of phosphate buffer concentration on the response in the total protein determination by the biuret method

In this work, the aim was to minimize the interference effect provoked by pH and the bovine serum albumin (BSA) and the phosphate buffer concentration on the total protein concentration determined by the biuret method, using a statistical model, established by response surface methodology (RSM). Results showed that the factors effects on protein concentration analysis were very significant and, in order to reduce these effects, it is necessary to use 0.01 M phosphate buffer at pH 7 and the protein concentration must be inferior, at 3 g/L.

**Key words:** Biuret method. Interferences. Optimization. Phosphate buffer. Proteins.

## Referências

- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Planejamento e otimização de experimentos*, 1ª edição, Editora da Unicamp, Campinas, 1995.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, 1. ed. Editora da Unicamp, Campinas, 2001.
- GONÇALVES, M. L. S. S.; *Métodos instrumentais para análises de soluções. Análise quantitativa*. 3. ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1996.
- GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-271, 1951.
- HARRIS, D. C.; *Análise química quantitativa*, 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.
- ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal. Biochem.* v. 9, p. 401-410, 1964.
- MORITA, T.; Assumpção, R. M. V.; *Manual de soluções, reagentes e solventes*. 2. ed. São Paulo: Edgar Blücher, 1995.
- ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Quim. Nova*, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.
- ZANCAN, G. T.; *Bioquímica. Aulas práticas*. 6. ed. Curitiba: EDUFPR, 1999.

Recebido em 30 ago. 2006 / aprovado em 24 out. 2007

#### Para referenciar este texto

SEVERO JUNIOR, J. B. et al. Interferência do pH, concentração de BSA e de tampão fosfato sobre a resposta na determinação de proteína total pelo método do Biureto. *Exacta*, São Paulo, v. 5, n. 2, p. 335-341, jul./dez. 2007.

