

## VALIDAÇÃO DO MÉTODO MODIFICADO DE LOWRY PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

*Flávia Regina dos Santos<sup>1</sup>, Walisson Junio Martins da Silva<sup>2</sup>, José Paschoal Batistuti<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Estudante de Pós Graduação (Mestrado) do Programa de Alimentos e Nutrição da UNESP, Araraquara, Brasil, [flavinhard@gmail.com](mailto:flavinhard@gmail.com)

<sup>2</sup> Estudante de Pós Graduação (Mestrado) do Programa de Alimentos e Nutrição da UNESP, Araraquara, Brasil, [afaos10@hotmail.com](mailto:afaos10@hotmail.com)

<sup>3</sup> Professor Assistente Doutor da UNESP, Araraquara, Brasil, [batistut@fcfar.unesp.br](mailto:batistut@fcfar.unesp.br)

**Resumo:** Método de Lowry, muito utilizado para determinação de proteínas foi modificado. Em virtude das modificações introduzidas foi necessário realizar a validação do método, avaliando os parâmetros propostos pela ICH (1995). Resultados experimentais permitiram estabelecer se o método é linear em todo intervalo experimental proposto, faixa linear de trabalho, repetitividade e outros parâmetros que serão avaliados.

**Palavras chave:** proteína, validação, espectrofotometria, método de Lowry.

### 1. INTRODUÇÃO

As proteínas são de fundamental importância nos processos biológicos atuando como enzimas, hormônios, neurotransmissores, transportadores através de membranas entre outros, pois são essenciais sob os aspectos da estrutura e função celular. Tem se tornado cada vez mais relevante o estudo de metodologias para determinar proteínas em várias áreas como em tecnologia e ciência de alimentos, laboratórios de análises clínicas, nutrição animal e humana [1]. A quantificação de proteínas é importante e comum a muitas aplicações na pesquisa bioquímica geral e em práticas de laboratório clínico. Nos últimos 20 anos houve um aumento de números de ensaios para determinar a concentração de proteínas [2]. Antes de iniciar qualquer tipo de análise de proteínas, o método utilizado deve ser validado, pois a validação de métodos é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica [3].

A validação é um processo dinâmico e constante que começa na fase de seleção, desenvolvimento e otimização do método e na qualificação dos instrumentos, materiais e analistas continuando na fase de experimentos [4;3] Um processo de validação bem definido e documentado oferece as agências reguladoras evidências de que o método é adequado. Para atingir esse reconhecimento a nível internacional, requisitos legais de certificação e credenciamento devem ser observados [3].

Os métodos mais utilizados para quantificar proteínas são Biureto, Bradford, BCA, Kjeldahl e de Lowry e os métodos que tem sido descritos na literatura para quantificar proteínas são baseados em espectrofotometria, nefelometria e, recentemente, HPLC [2].

As características investigadas no processo de validação a fim de demonstrar o desempenho do método são: Linearidade, Faixa linear de trabalho, Limite de detecção, Limite de quantificação, Precisão, Exatidão, Precisão intermediária, Robustez, Especificidade, Incerteza de medição e Recuperação [5].

O método de Lowry foi proposto primeiramente por Wu em 1922 sendo o mais utilizado para a determinação de proteínas [6]. Este método é altamente sensível, apresenta uma melhor exatidão em relação a outros métodos, consome uma menor quantidade de amostras e dependendo do caso está menos suscetível a alguns tipos de interferentes [1]. Apesar dessas vantagens, o método apresenta longo tempo de análise, possui absorvidade específica altamente variável para diferentes proteínas e segue a lei de Lambert-Beer apenas numa pequena faixa de concentração de proteínas [6]. Devido aos interferentes e a incerteza do método em relação aos parâmetros analisados, este trabalho teve o propósito de realizar a validação do método de Lowry quanto aos parâmetros linearidade, repetitividade e faixa linear de trabalho, pois o objetivo da validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida [7].

### 2. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.1. Materiais

A proteína utilizada em todo o experimento foi a albumina bovina sérica – BSA (SigmaAldrich).

#### 2.2. Métodos

A curva padrão e os parâmetros da validação foram determinados pelo método descrito por LOWRY [6].

A massa utilizada de BSA foi de 50 mg dissolvida em 250 mL de NaOH 0,1 N. Foram feitas diluições de modo que a concentração dos dez pontos variassem de 10 µg a 100 µg, o volume foi completado com NaOH 0,1 N para 1,0 mL. Adicionou-se 2,0 mL em cada tubo do reagente formado pela mistura de 50 mL de solução Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 2% em NaOH 0,1 N com 1,0 mL da solução de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O a 0,5% e citrato de sódio 1%. Após essa adição os tubos ficaram em repouso por 10 minutos e então se adicionou 0,2 mL do reagente Folin Ciocalteau 1:1 em água destilada. Terminada a adição, os tubos foram agitados em vortex e foram deixados em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente para posterior leitura a 750 nm.

A modificação do método está na proporção do reagente a base de carbonato de sódio e sulfato de cobre em que, no método original, adiciona-se 5,0 mL e não 2,0 mL como o proposto neste trabalho, assim como o reagente Folin Ciocalteu que no método original é adicionado 0,5 mL e no trabalho proposto foi utilizado 0,2 mL.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Linearidade

A curva analítica de linearidade foi ensaiada com 10 repetições para cada concentração de proteína no intervalo previamente testado. A Figura 1 mostra a curva analítica obtida, e a Figura 2 mostra qual a linearidade encontrada.

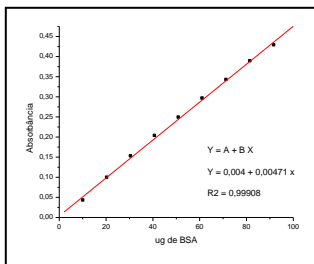


Figura 1 – Curva analítica de linearidade (Absorbância x ug de BSA).

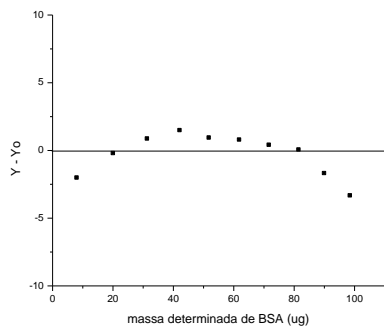


Figura 2 – Linearidade demonstrada pelo método.

#### 3.2. Repetitividade

A repetitividade de um método demonstra sua precisão e foi determinada através de 10 repetições de uma mesma massa.

Para tanto foi ensaiada uma massa correspondente a 51 ug de BSA.

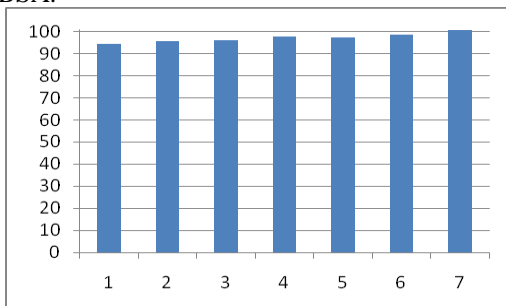


Figura 3 – Repetitividade do ensaio. Número de repetições=7

#### 3.3. Faixa Linear de Trabalho

O intervalo linear de trabalho da curva de calibração deriva do estudo de linearidade do método e foi determinada matematicamente pela relação  $S/X \times 100$ , sendo S = desvio-padrão, X= média e a massa determinada de proteína.

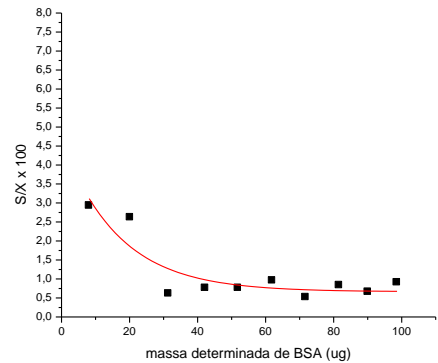


Figura 4 - Faixa linear de trabalho ( $S/X \times 100$ ) x massa determinada de BSA (ug).

### 4. CONCLUSÕES

Os resultados experimentais obtidos mostram que: o método não linear em toda a sua faixa experimental, o seu limite de quantificação inferior, com precisão inferior a 1% é de 30 ug. O método apresenta boa precisão.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. *Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes*. Química Nova, v. 21, n. 6, p. 787 – 793, 1998.
- [2] OKUTUCU, B. et al. *Comparison of Five methods for determination of total plasma protein concentration*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, v. 70, p. 709 – 711, 2007.
- [3] BARROS, C. B. *Validação de Métodos Analíticos*. Biológico, v. 64, n. 2, p. 175 – 177, 2002.
- [4] RIBANI, M. et al. *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771 – 780, 2004.
- [5] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). *Validation of analytical procedures: definitions and terminology, Q2A (CPMP/ICH/381/95)*, 1995.
- [6] LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. *Protein measurement with the Folin-Phenol reagent*. The Journal of Biological Chemistry, v. 193, p. 265 – 276, 1951.
- [7] AGÊNCIA NACIONAL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Resolução RE nº899 de 29 de maio de 2003*.