

Área: Ciências Biológicas Subárea: Bioquímica

COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE BRADFORD E LOWRY MODIFICADO À LUZ DA QUÍMICA VERDE

SANTOS, Karine Vitória¹; LIMA, Anderson Maciel²; SILVA, Pricila Gomes da^{1,3}; SOUZA, Matheus Farias^{1,2}; SOUZA, Alecsandra Oliveira de⁴; KAYANO, Anderson Makoto^{2,5}; MACEDO, Jamile Mariano^{2,4}

¹Universidade Federal de Rondônia (UNIR)

²Laboratório de Biotecnologia de proteínas e compostos bioativos (LABIOPROT),
Fundação Oswaldo Cruz, Rondônia

³Centro de estudos em biomoléculas aplicadas à saúde (CEBio)

⁴Instituto Federal de Rondônia (IFRO)

⁵Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM/SESAU)

Introdução: Ensaios para quantificação de proteínas são fundamentais na rotina dos laboratórios para determinar com precisão a concentração de proteínas em uma amostra. Essa dosagem de proteínas é comumente empregada em laboratórios de controle de qualidade como também em laboratórios de pesquisa. Das técnicas utilizadas, as principais são Lowry modificado e Bradford. Partindo do princípio de que a melhor técnica não deve ser somente a de melhor exequibilidade, este trabalho propõe avaliar a relação custo x benefício, sensibilidade e qual técnica está atrelada aos princípios da Química verde, a fim de definir qual a técnica mais indicada para implantação na rotina de um laboratório. A Química Verde apresenta doze princípios (Prevenção, Economia atômica, Síntese de produtos menos perigosos, Desenho de produtos seguros, Solventes e Auxiliares mais Seguros, Busca pela Eficiência de Energia, Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima, Evitar a Formação de Derivados, Catálise, Desenho para a Degradação, Análise em Tempo Real para a Prevenção da Poluição e Química Intrinsecamente Segura para a Prevenção de Acidentes). Quanto mais princípios a técnica empregada atender, mais sustentável ela se torna. O local onde foram realizados os ensaios foi na Plataforma do Centro de Biomoléculas Aplicadas à Saúde (CEBIO), especificamente no Laboratório de Biotecnologia de Proteínas da Amazônia (LABIOPROT). O CEBIO é uma plataforma composta por quatro laboratórios de pesquisa que desenvolvem pesquisa nas áreas da Bioquímica, Fitoquímica, Bioinformática e Proteômica. Para a plataforma, são fundamentais os ensaios de dosagem de proteínas. **Objetivos:** Dessa forma, o presente trabalho visou avaliar qual o melhor ensaio para quantificação de proteínas, adotados no CEBIO/LABIOPROT, à luz da Química

verde. **Material e métodos:** Foram selecionados os métodos de Lowry modificado e Bradford. Os ensaios foram reproduzidos em triplicata. Cada ensaio apresentou uma cobertura para o mínimo de cinco pontos para concentração mínima e máxima de uma amostra de proteína, além do branco. Os valores das concentrações obtidas foram exportados para o Excel® de modo a elaborar a curva de calibração por regressão linear, com valor de r^2 mínimo de 0,996. Todas as leituras foram realizadas em espectrofotômetro Eon Biotek® em absorvância específica para cada método. Os reagentes e suas respectivas concentrações dentro de cada protocolo foram avaliados e estratificados segundo a ordem: Volume de cada reagente em triplicata; Toxicidade dos reagentes; Reprodutibilidade do ensaio; Capacidade de realizar o ensaio em microescala. Ao final, as informações foram avaliadas conforme o software GRAPHPAD® e assim, estabelecido o método com melhor custo-benefício para se empregar na rotina do laboratório. Como padrão, foi utilizada a albumina de soro bovino (BSA) da Sigma-Aldrich. Para elaboração da curva de calibração foram preparadas diferentes concentrações de Albumina do Soro bovino (BSA) a partir da solução-estoque de 1,4 mg/ml. Esta solução foi diluída para as seguintes concentrações: 1,0 mg/ml; 0,75 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml e 0,0625 mg/ml. Foram pipetados volumes em triplicata de BSA e água em placas de 96 poços junto aos reagentes. Foram pipetados 5 μ l do BSA das diferentes concentrações preparadas. Foram adicionados 250 μ l do reagente de Bradford (Sigma-Aldrich®). A placa foi incubada ao abrigo da luz por 15 minutos e posteriormente, monitorada no leitor de placas, no software GEN5® a 595 nm a 27 °C. Para o método de Lowry modificado foram empregadas as mesmas condições, com variação na leitura, que foi realizada a 750 nm. **Resultados e discussão:** No método de Lowry utilizou-se o kit DC Protein da marca Biorad que foi cotado pela empresa Síntese Biotecnologia no valor de \$2.894,21. O Kit possui volume total de 2,25 litros incluindo o padrão BSA. São utilizados 225 μ L (Reagente A + Reagente B) totalizando 675 μ L por triplicata, tendo o custo de R\$ 0,87. Já o Kit de Bradford possui um frasco com volume total de 500 ml e foi cotado pelo site da Prolab a um valor de R\$493,23. O custo foi calculado por duplicata devido ter sido este o ensaio feito pelo pesquisador. O volume de reagente utilizado por duplicata equivale a 5ml tendo o custo de R\$ 4,93. O ensaio de Bradford por sua vez apresentou um custo maior, mesmo seu kit apresentando o valor mais acessível de mercado, comparado aos outros dois métodos. Isso se deve ao volume de reagente utilizado. Esse método, porém, é o mais sensível e com menos interferentes. O período de análise também é o menor, dentre os três

métodos. O método de Lowry (DC Protein) possui o kit com valor mais elevado, porém com o volume de reagente maior. Dessa maneira o custo se torna menor por triplicata. DC Protein possui o segundo menor tempo de incubação e volume reduzido utilizado por triplicata. Segundo a literatura a desvantagem se encontra no fato de o método estar sujeito a muitos interferentes, possuir absorvidade específica altamente variável para diferentes proteínas, e seguir a Lei de Beer-Lambert apenas numa pequena faixa de concentração de proteínas. Avaliando o princípio 1 na química verde, pode-se definir que a redução de resíduos se deu através da redução do uso de reagentes submetendo-os a escala micro, portanto as técnicas Lowry modificado e Bradford possuem essa capacidade de realizar os testes em microescala. No quesito toxicológico a técnica Lowry modificado é mais satisfatória por apresentar baixo grau de toxicidade no meio ambiente. Analisando o princípio 6 que trata da eficiência energética, o ensaio de Bradford e Lowry modificado são mais categóricos, pois a incubação da amostra é feita em temperatura ambiente por um curto período. Assim como diz o princípio 10 e 12, os reagentes utilizados não possuem poder de bioacumulação como também oferece pouco risco operacional. A técnica Lowry modificado é mais econômica visto a quantidade de testes a serem realizados por custo agregado de acordo com cotação enviada pelo fornecedor. Os achados indicam que as técnicas apresentaram um bom coeficiente de regressão para as curvas, sendo o Lowry modificado com 0,9968; Bradford correspondente a 0,9975 e por fim BCA, com 0,9997. A técnica de Lowry modificado apresentou menor toxicidade e não possui poder de bioacumulação como também não possui toxicidade aquática, possui menor tempo na realização e incubação da amostra, e baixo custo por triplicata. **Conclusão:** Com base nos princípios da toxicidade, eficiência energética, redução de resíduos e economicidade, a técnica de Lowry modificado apresentou melhor custo-benefício à luz da Química verde.

Agradecimentos: IFRO, LABIOPROT, CEBio, UNIR, FIOCRUZ RONDÔNIA.

Palavras-Chave: Proteínas, dosagem, Química verde, Bradford, Lowry modificado.

E-mail: k.v.santos27@gmail.com (orientanda)

Jamile.macedo@ifro.edu.br (orientadora)