

Departamento de Zoologia Médica e Parasitologia  
Diretor: Prof. Dr. Z. Vaz

## SÔBRE A DETERMINAÇÃO FOTOMÉTRICA DAS PROTEÍNAS DO SÔRO, OU DO PLASMA, POR MEIO DA REAÇÃO DO BIURETO (\*)

Rubens Salomé Pereira

Docente-livre da Universidade de São Paulo

A determinação da proteína total dos líquidos biológicos se faz, por via de regra, por meio da dosagem do azoto protéico pelo método de KJELDAHL e ulterior multiplicação do valor achado pelo fator 6.25. O aproveitamento de uma das reações coloridas das substâncias protéicas para fins de análise quantitativa, porém, simplificaria notavelmente o problema desde que, bem estabelecido, o processo permitisse a obtenção de resultados seguros. Para tanto, porém, a reação da ninhidrina, apesar da sua sensibilidade, não seria aconselhável, pois êsse reagente reage também com corpos que nenhum parentesco apresentam com as proteínas. A de MILLON se deve aos grupos fenólicos que se encontram na molécula protéica, como o da tirosina, v.g., de sorte que, sôbre não ser de ordem absolutamente geral, apresenta a desvantagem de dar coloração com corpos que não se situam no quadro dos proteicos. Além disso, a lei de LAMBERT-BEER não é obedecida e numerosas dificuldades se apresentam, que tornam muito delicada a aplicação do reativo de MILLON à análise quantitativa das proteínas. Considerações semelhantes se poderiam fazer com referência à reação xantoprotéica, à de ADAMKIEWICZ, à de MOLISCH, por ex.. Muito mais geral e mais característica é a chamada "reação do biureto" que se deve, provavelmente, aos grupos peptídicos, ou a êstes juntamente com complexos que encerrem o radical  $NH_2$ , o que é particularmente importante para a caracterização das substâncias protéicas e de seus derivados polipeptídicos. Foi essa, aliás, a escolhida por RIEGLER (1), por AUTENRIETH e MINK (2), por AUTENRIETH (3), para determinar colorimetricamente as proteínas do sôro sanguíneo, as da urina e as do líquido ascítico. Objeção séria ao emprêgo do método proposto, porém, era a dificuldade de se conseguir soluto padrão conveniente, e a solução sugerida por HILLER, Mc. INTOSH e VAN SLYKE foi criticada por FINE (4) que usou, para fins de comparação, sôro sangui-

---

(\*) Trabalho realizado com o auxílio dos "Fundos Universitários de Pesquisas", da Universidade de São Paulo.

neo diluído de modo a conter 0.24% de proteína medida por meio da dosagem do azoto protéico pelo método de KJELDAHL.

AUTENRIETH (3) acha que iguais quantidades de albumina e de globulina do sôro sanguíneo dão iguais intensidades de coloração, ao passo que FINE (4) encontra leve diferença a favor da última, tão pequena, porém, que praticamente se situa dentro dos êrros de medida. LIEBEN e JESSERER (5) concluíram das pesquisas, que realizaram, serem, sob certas condições bem definidas, a força da côr e o tom desta as mesmas para iguais concentrações de proteína, independentemente da grandeza molecular e dos amino-ácidos presentes. ROBINSON e HOGDEN (6) acham que a densidade ótica, a 560 m $\mu$  da côr dada pela reação do biureto é praticamente a mesma, desde que as concentrações de proteína sejam iguais, no caso dos protéicos totais e da albumina do sôro; dos da urina, em casos patológicos; dos do líquido ascítico; dos do sôro do sangue do homem, do cão e do coelho.

As vantagens apresentadas pela reação do biureto levaram-nos a estudar a sua aplicação à dosagem das proteínas por meio do fotômetro gradual de Zeiss-Pulfrich.

#### MÉTODO

Soluções necessárias:

- a) Cl Na a 9<sup>0</sup>/<sub>00</sub>
- b) CCl<sub>3</sub>COOH a 10%
- c) Na OH 0.75 N
- d) SO<sub>4</sub>Cu, 5 aq. a 20%

Num tubo de centrifugação graduado à altura de 1.5 — 2.5 — 5 — 7.5 — 10 e 15 cm<sup>3</sup> põem-se 0.5 cm<sup>3</sup> de (a) e 0.03 — 0.3 cm<sup>3</sup> do sôro que se vai analisar. Lava-se repetidamente a pipeta com a solução de ClNa que se encontra no tubo e em seguida dilui-se, por meio de (a), de sorte que a diluição final seja de uma parte de sôro para 25 de volume total. Ajunta-se, então, igual quantidade de (b). O desproteinizante deve ser posto às gôtas, e a mistura deve fazer-se cautelosa e completamente; para tanto, faz-se o tubo rolar entre as palmas das mãos. Deixa-se êste em repouso durante cêrca de 40 minutos, e centrifuga-se energicamente por espaço de um quarto de hora, à velocidade de 2500 - 3000 r.p.m.; o coágulo se separa inteiramente e o líquido sobrenadante é perfeitamente incolor e límpido. Decanta-se êste e inverte-se o tubo sôbre uma fôlha de papel filtro, para bem escorrer o resto do líquido. Enxuga-se a boca do tubo e ajuntam-se algumas gôtas do reativo (c). Com o auxílio dum bastonete fino, de vidro, ou dum tubo estirado à maneira de pipeta de

Pasteur e fechado na extremidade aguda, mistura-se o conteúdo do tubo, de sorte a formar-se uma pasta; adiciona-se certa quantidade de (c) e agita-se bem, usando-se um dos agitadores descritos, até que o precipitado se dissolva perfeitamente e que não haja grúmulo algum. Lava-se o bastonete com algumas gôtas do solvente e por meio dêste dilui-se convenientemente a solução do protéico. Adiciona-se, então, o reativo (d), na proporção de 0.25 cm<sup>3</sup> dêste para o volume total de 10 cm<sup>3</sup> e, por meio do reagente (c), perfaz-se exatamente o volume final escolhido. Arrolha-se o tubo e agita-se energicamente durante cêrca de 1 minuto para que a côr se desenvolva. Deixa-se em repouso por espaço de 10 - 30 minutos e centrifuga-se durante 10 minutos, à velocidade de 2500 - 3000 r.p.m.. Ao mesmo tempo, e sob iguais condições, faz-se um branco, que servirá de líquido de compensação. Por meio de pipeta de ponta fina, cuidadosamente, para não disturbar o precipitado, transfere-se a solução colorida para uma cuba de espessura apropriada e determina-se a extinção dada pelo fotômetro de Pulfrich, interpondo-se o filtro S — 55.

ESCOLHA DO FILTRO E INFLUÊNCIA DO BRANCO. Uma solução corada, obtida de acôrdo com a técnica descrita, tendo sido usado sôro de sangue de cavalo, revelou, ao determinar-se a transparência dada pela interposição de vários filtros S, e tendo-se usado a água como líquido de compensação, as extinções que se vêm no quadro seguinte:

QUADRO I

Transparência dada pela mesma solução corada, em várias regiões do espectro. Compensação: água destilada.

Filtro	D	k	Filtro	D	k	Filtro	D	k
S-43	48	0.319	S-53	21	0.678	S-61	34	0.469
S-45	48	0.319	S-55	19.8	0.703	S-66	56	0.252
S-47	45	0.347	S-57	21	0.678	S-72	85	0.071
S-50	33	0.482	S-59	23	0.638	S-75	90	0.046

A substituição da água destilada pelo "branco", empregado agora como líquido de compensação, determinou as modificações seguintes:

QUADRO II

Transparência dada pela mesma solução corada, em várias regiões do espectro. Compensação: "branco".

Filtro	D	k	Filtro	D	k	Filtro	D	k
S-43	50	0.301	S-53	23	0.638	S-61	37	0.432
S-45	50	0.301	S-55	22	0.658	S-66	52	0.284
S-47	47	0.328	S-57	24	0.620	S-72	88	0.056
S-50	35	0.456	S-59	25	0.602	S-75	90	0.046

A medida da absorção do “branco”, feita pelo emprêgo dos vários filtros S, em cubas de 30 mm de espessura e em relação à água destilada, revelou o que se vê em seguida:

### QUADRO III

Transparência dada pelo “branco”, em várias regiões do espectro.

Espessura da cuba: — 30 mm.

Compensação: — água destilada.

Filtro	D	k	Filtro	D	k	Filtro	D	k
S-43	89	0.017	S-53	76	0.040	S-61	63	0.067
S-45	89	0.017	S-55	72	0.048	S-66	63	0.067
S-47	88	0.019	S-57	67	0.058	S-72	72	0.048
S-50	84	0.025	S-59	66	0.060	S-75	74	0.044

Esses resultados mostram que o filtro S-55 é o indicado para a determinação da transparência no caso da côr dada pela reação do biureto e que, para fins de compensação, o “branco” é o líquido que se deve empregar.

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO E DA QUANTIDADE DOS REAGENTES (c) e (d) — FINE (4) usa 1 cm<sup>3</sup> de NaOH a 30%, dilui até 9 cm<sup>3</sup> por meio de água destilada e ajunta 1 cm<sup>3</sup> de SO<sub>4</sub>Cu,5aq. a 5%, o que corresponde à concentração de 3% para o NaOH e ao volume de 2.5 cm<sup>3</sup> duma solução de SO<sub>4</sub>Cu,5aq. a 20% para o volume final de 100 cm<sup>3</sup>. LIEBEN e JESSERER (5) empregam também NaOH a 3% e observam que a quantidade de SO<sub>4</sub>Cu,5aq. a 20% adicionada não deve ser inferior a 2 cm<sup>3</sup> per 100 cm<sup>3</sup>. Eles notam que o uso de porções consideravelmente maiores da solução especificada, de sulfato cúprico, não produz alterações na intensidade da côr obtida pelo emprêgo de solutos protéicos de igual concentração. ROBINSON e HOGDEN (6) verificaram que quantidades de SO<sub>4</sub>Cu,5aq. a 20% variantes entre 1.25 e 2.5 cm<sup>3</sup> per 100 cm<sup>3</sup> da solução corada, não exerciam influência sôbre os resultados, mas que êstes não eram tão seguros quando, em vez de 2.5 cm<sup>3</sup> de SO<sub>4</sub>Cu,5aq. a 20% se usavam 25 cm<sup>3</sup> do mesmo sal a 2%. Eles observaram, além disso, que a quantidade de Cu (OH)<sub>2</sub> presente no soluto corado era maior quando se usava o SO<sub>4</sub>Cu,5aq. a 2% e que também maiores eram as variações dos resultados. Concluíram daí, então, que a precipitação do cobre em estado mais disperso determina certo arrastamento da proteína e que esta, no decorrer do tempo, se redissolve pelo menos em parte.

LIEBEN e JESSERER (5) notaram que iguais concentrações de substâncias protéicas dão solutos igualmente corados e que, nas condições das suas experiências, as quantidades de cobre presentes nos líquidos coloridos eram muito próximas umas das outras, variando entre limites relativamente estreitos: de 0.057% a 0.062% de metal para 0.5% de matéria protéica. Para as várias proteínas experimentadas a média encontrada foi 0.059% e as percentagens assim se distribuíram: — fibrina — 0.062%; caseína — 0.058%; gelatina — 0.057%; albumina do ovo — 0.060%; edestina (ROCHE) — 0.059%; zeína — 0.059%; peptona de Witte — 0.059%; desaminocaseína — 0.058%, etc. Êsses pesquisadores verificaram que quantidades variáveis de proteína, e constantes de  $SO_4Cu, 5aq.$  a 20%, determinavam variações proporcionais na intensidade da côr obtida, ao passo que as mesmas percentagens de matéria protéicas tratadas por quantidades variáveis do reagente citado, mostravam colorações de igual fôrça. Eles acham que a côr dada pela reação do biureto apresenta dois componentes: um, azul e outro, vermelho. Êste se destrói pela acidificação, e àquele só aparece depois de ajuntar-se determinada quantidade da solução de sulfato cúprico pois, desde que a adição dêste seja em quantidade inferior ao mínimo necessário para o desenvolvimento do componente azul, só o vermelho existe. A relação entre êles depende da quantidade de cobre presente e do pH da solução. Nestas condições, a estabilidade do complexo cupro-protéico é, de certo modo, variável dependente da concentração do alcali. Mas, como o notaram ROBINSON e HOGDEN (6), à medida que esta aumenta, o componente azul também se intensifica. Como, além disso, o enfraquecimento relativamente excessivo da concentração do  $NaOH$  — ao abaixar-se a 1.5%, v. g. — tende a provocar diminuição do valor do azoto protéico, e como o uso desnecessário de altas concentrações de ácidos ou de bases deve, por via de regra, ser evitado, a concentração do  $NaOH$  no soluto corado deve manter-se aproximadamente a 3%, suficiente para o pleno e regular desenvolvimento da côr, para evitar excesso do componente azul e para manter a solução colorida independente de eventuais alterações do pH.

À medida que cresce a concentração do  $NaOH$ , a extinção se engrandece, sendo mantidas constantes as quantidades de proteína e as de  $SO_4Cu$ , o que, sem dúvida, se deve ao  $Cu(OH)_2$  em solução. Com efeito, a maior parte do cobre ajuntado à solução alcalina do protéico, se precipita imediatamente sob forma de  $Cu(OH)_2$ ; êste, porém, em presença de grande excesso de alcali forte —  $NaOH$  ou  $KOH$  — se dissolve, e isso se dá em função da concentração do precipitante, e dá líquido de côr azul, ou suspensão coloidal, de sorte que o

emprego de *NaOH* desnecessariamente muito concentrado, resulta em aumento do componente azul, o que se verifica pelas medidas da transparência feitas em zonas convenientes do espectro, como com os filtros S-55 e S-61. Isso se confirma pelas extinções dadas pelos “brancos” nas mesmas zonas.

O uso de soluções de *SO<sub>4</sub>Cu, 5aq.* mais diluídas do que a de concentração de 20%, embora se mantenha constante a quantidade de cobre ajuntada, por meio de adição de volumes correspondentemente maiores, dos solutos mais fracos, determina certa tendência para o enfraquecimento da extinção da solução corada, na reação do biureto, o que se deve, provavelmente, a certo arrastamento da proteína pelo cobre, que em estado de maior dispersão se precipita, se bem que o protéico arrastado tenda a redissolver-se progressivamente. Introduce-se assim, porém, um fator de incerteza, que deve ser evitado. Além disso, o emprego de soluções mais diluídas — a 5%, v. g. — de *SO<sub>4</sub>Cu, 5aq.* origina certo aumento da quantidade de *Cu(OH)<sub>2</sub>* em solução e as conseqüentes alterações da transparência. Os quadros seguintes documentam as afirmativas feitas.

#### QUADRO IV

Influência da concentração do *NaOH* e do *SO<sub>4</sub>Cu, 5aq.* sobre a extinção.  
Leituras feitas com os filtros S-55 e S-61.  
Compensação: — água destilada.  
As quantidades de proteína foram as mesmas em todos os casos.

NaOH g %	Quantidade de SO <sub>4</sub> Cu, 5aq. a 5% ajuntada cm <sup>3</sup>	Quantidade de SO <sub>4</sub> Cu, 5aq. a 20% ajuntada cm <sup>3</sup>	Volume total da solução corada cm <sup>3</sup>	Filtro S-55		Filtro S-61	
				D	k	D	k
1.5	1.0	—	10	39.6	0.402	52.5	0.280
1.5	—	0.25	10	38	0.420	51	0.292
3.0	1.0	—	10	36	0.444	45,5	0.342
3.0	—	0.25	10	35	0.456	48	0.319
6.0	1.0	—	10	29	0.538	35	0.456
6.0	—	0.25	10	27	0.569	37.6	0.425
10.0	1.0	—	10	24	0.620	24.4	0.613
10.0	—	0,25	10	22.4	0.650	28	0.552



## QUADRO V

Influência da concentração do *NaOH* e do *SO, Cu, 5aq.* sôbre a extinção.  
Leituras feitas com os filtros S-55 e 61.

Compensação: — "branco".

As quantidades de proteínas — as mesmas em todos os casos — foram idênticas às do quadro IV.

NaOH gr%	Quantidade de SO <sub>4</sub> Cu, 5aq. a 5% ajuntada cm <sup>3</sup>	Quantidade de SO <sub>4</sub> Cu, 5aq. a 20% ajuntada cm <sup>3</sup>	Volume total da solução corada cm <sup>3</sup>	Filtro S-55		Filtro S-61	
				k	k	D	D
1.5	1.0	—	10	38.6	0.413	53.5	0.272
1.5	—	0.25	10	38	0.420	53	0.276
3.0	1.0	—	10	36	0.444	51	0.292
3.0	—	0.25	10	36	0.444	50	0.301
6.0	1.0	—	10	37	0.432	51	0.292
6.0	—	0.25	10	31	0.509	43	0.367
10.0	1.0	—	10	39	0.409	53.5	0.272
10.0	—	0.25	10	30	0.523	39	0.409

## QUADRO VI

Influência da concentração do *NaOH* e do *SO, Cu, 5aq.* sôbre a extinção dada  
pelo "branco".

Leituras feitas com os filtros S-55 e S-61.

Compensação: — água destilada.

NaOH gr%	Quantidade de SO <sub>4</sub> Cu, 5aq. a 5% ajuntada cm <sup>3</sup>	Quantidade de SO <sub>4</sub> Cu, 5aq. a 20% ajuntada cm <sup>3</sup>	Volume total do "branco" cm <sup>3</sup>	Filtro S-55			Filtro S-61		
				D	E	k	D	E	k
1.5	1.0	—	10	93	0.032	0.011	88	0.056	0.019
1.5	—	0.25	10	97	0.013	0.004	88	0.056	0.019
3.0	1.0	—	10	67	0.174	0.058	62	0.208	0.069
3.0	—	0.25	10	90	0.046	0.015	82	0.086	0.029
6.0	1.0	—	10	50	0.301	0.100	38	0.420	0.140
6.0	—	0.25	10	65	0.187	0.062	54	0.268	0.089
10.0	1.0	—	10	20.4	0.690	0.230	10.5	0.979	0.326
10.0	—	0.25	10	42	0.377	0.126	28.6	0.544	0.181

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE REPOUSO, APÓS A ADIÇÃO DOS REAGENTES E A AGITAÇÃO, SÔBRE A TRANSFERÊNCIA. ROBINSON e HOGDEN (<sup>7</sup>) recomendam que se deixe o tubo, depois de se terem adicionado os reagentes e de se haver agitado o mesmo durante 1 minuto, em repouso por espaço de 10 minutos pelo menos, e que se centrifugue em seguida. Há, porém, a possibilidade de espera muito longa dar origem a alterações capazes de influir sôbre a côr. Com efeito, em contacto com

excesso de  $NaOH$ , ou de  $KOH$ , o  $Cu(OH)_2$  perde, ao cabo de certo tempo, e mais rapidamente à ebulição, grande parte da sua água e se transforma em óxido cúprico de que a côr azul carregada bem o diferencia da azul-clara apresentada pelo  $Cu(OH)_2$ . Para o verificar, fizemos as experiências que se resumem no quadro seguinte:

#### QUADRO VII

Influência do tempo de repouso da solução corada, mantida em contacto com o excesso de cobre precipitado, sobre a transparência.

Leituras feitas com o filtro S-55.

Compensação: — "branco".

As quantidades de proteína foram as mesmas em todos os casos.

Tempo de repouso minutos	Volume da solução corada $cm^3$	D	k
10	10	34.4	0.463
15	10	34	0.469
20	10	34	0.469
30	10	34	0.469
40	10	35	0.456
50	10	36	0.444
60	10	36	0.444
90	10	36	0.444

Se bem que as diferenças não sejam de monta, pelo menos dentro do espaço de tempo assinalado, achamos conveniente não prolongar o tempo de repouso além de meia hora, e por isso aconselhamos que se faça a centrifugação depois de 10 - 30 minutos de descanso, especialmente se levarmos em consideração o fato de, dadas as circunstâncias, repouso por tempo muito longo não apresentar vantagem alguma e servir, apenas, para prolongar o trabalho.

**ESTABILIDADE DA CÔR.** A côr dada pela reação do biureto é estável, e leituras feitas com soluções centrifugadas e mantidas separadas do excesso de cobre precipitado, revelaram que não há alteração na transparência mesmo após 60 horas, contadas a partir da agitação.

**INFLUÊNCIA DO VOLUME DA SOLUÇÃO CORADA SOBRE A EXTINÇÃO.** Os resultados analíticos, mantidas as condições estabelecidas pelo presente método, não se alteram pela mudança do volume final do soluto corado, como o demonstram as experiências que se resumem a seguir e nas quais se manteve constante a quantidade de proteína.



## QUADRO VIII

Influência do volume final do soluto colorido sôbre a extinção.  
As quantidades de proteína foram as mesmas em todos os casos.  
Compensação: — "branco".

NaOH g %	Quantidade de SO <sub>4</sub> Cu, 5aq. a 20% ajuntada cm <sup>3</sup>	Volume final da solução corada cm <sup>3</sup>	Espessura da cuba usada	D	E	k
3%	0.06	2.5	5	55	0.260	0.520
3%	0.12	5	10	55		0.260
3%	0.18	7.5	20	45	0.347	0.174
3%	0.24	10	30	41	0.387	0.129

E', pois, possível variarem-se os volumes finais das soluções coloridas e conservarem-se constantes os resultados. Esse fato dá maior elasticidade ao método e permite que se usem quantidades de sôro entre limites mais amplos do que os assinalados anteriormente. Isso, em certos casos, poderá ser fator de importância.

A LEI DE LAMBERT-BEER. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE NUMÉRICO. A intensidade da côr dada pela reação do biureto, de acôrdo com o presente método e dentro dos limites de concentração protéica permitidos por êle, é determinada pela quantidade de proteína presente na solução que se analisa. A relação entre êsses dois fatores — densidade ótica e percentagem de protéicos — é que permite o emprêgo da referida reação para fins quantitativos sem que haja necessidade de recorrer à construção de curvas empíricas, o que torna o trabalho mais simples e mais cômodo.

O gráfico obtido pela colocação em sistema de coordenadas, dos valores da proteína e do coeficiente de extinção revela a existência duma reta, o que torna possível estabelecer-se uma equação para o cálculo da percentagem da substância protéica.

No caso de a lei de LAMBERT-BEER ser válida, a relação  $\frac{c}{k}$  é uma constante, e a determinação do coeficiente numérico permite calcular-se a concentração desconhecida pela simples multiplicação dessa constante pelo coeficiente de extinção dado pelo soluto que se analisa.

O quadro seguinte mostra que a lei de LAMBERT-BEER se aplica ao presente caso.

Dum sôro de sangue de cavalo, convenientemente diluído em *CuNa* a 9‰, tomaram-se várias partes alíquotas e nestas se determinou o azoto protéico após desproteinização pelo ácido tricloracético. A média de seis determinações foi 1.206% o que corresponde a 7.538% de matéria protéica.

## QUADRO IX

Relação entre concentração de proteína —  $c$  — e coeficiente de extinção —  $k$  —  
Azoto proteico determinado pelo método de KJELDAHL — 1.206%.

Quantidade de proteínas per 100 cm <sup>3</sup> g	Espessura da cuba usada mms	D	E	k	$\frac{c}{k}$
0.0188	30	66	0.181	0.060	0.313
0.0376	30	42.5	0.372	0.124	0.303
0.0564	30	28	0.552	0.184	0.307
0.0752	30	18	0.745	0.248	0.303
0.0940	20	25	0.602	0.301	0.312
0.1128	10	44		0.357	0.317
0.1316	10	38		0.420	0.313
0.1504	10	32.4		0.490	0.307
0.1692	10	28		0.552	0.307
0.1880	10	25		0.602	0.312
0.2068	10	22		0.658	0.314
0.2256	10	18.6		0.731	0.309
0.2444	5	40	0.398	0.796	0.307
0.2632	5	36.8	0.434	0.868	0.303

Média . . . . .	0.309
Erro médio . . . . .	0.004
Erro padrão . . . . .	0.001
Coefficiente de variação . . . . .	1.294%

INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA SÔBRE OS RESULTADOS DA ANÁLISE. O quadro anterior revela não ser conveniente determinar-se a proteína, por meio da reação do biureto, empregando-se quantidades inferiores a 0.015 g per 100 cm<sup>3</sup>, pois não convém que a extinção seja inferior a 0.15. De outro lado, as percentagens calculadas pela extinção obtida quando se usam concentrações relativamente muito elevadas, de substâncias protéicas, são inaproveitáveis porque, a partir de certo limite, as extinções se mantêm em níveis aproximados e não mais acusam densidade ótica proporcional à quantidade de protéicos presente, o que, provavelmente, se deve ao fato de não existir em solução  $Cu(OH)_2$  bastante para a reação se processar completamente. Nessas condições, necessário se torna precisarem-se os limites das percentagens de proteína entre os quais o presente método se aplica com segurança. Para verificar êsse ponto usámos o sôro anteriormente empregado.

## QUADRO X

Influência da quantidade de proteína sôbre os resultados da análise.

Quantidade de proteína per 100 cm <sup>3</sup> g	D	E	k	Quantidade de proteína, determinada fotométricamente, per 100 cm <sup>3</sup> g
0.0752	18	0.745	0.248	0.0766
0.1128	44		0.357	0.1103
0.1504	32.4		0.490	0.1483
0.1880	25		0.602	0.1860
0.2256	18.6		0.731	0.2259
0.2632	36.8	0.434	0.868	0.2682
0.3008	36	0.444	0.888	0.2744
0.3384	34	0.469	0.938	0.2899
0.3760	35	0.456	0.912	0.2818

Esse quadro mostra que a partir de certa concentração, os resultados perdem significação, e que o limite superior se situa às voltas de 0.27%.

**INFLUÊNCIA DO DESPROTEINISANTE.** Em muitos casos a técnica de desproteinação do sangue, do sôro, ou do plasma é de especial significação, pois de acôrdo com método empregado, além da matéria protéica, outros componentes se precipitam de forma variável, inteiramente ou em parte apenas, ou, ainda, permanecem em solução, de sorte que os filtrados obtidos não apresentam a mesma composição.

Dos processos de desproteinação geralmente usados, dois particularmente se indicam para fins de dosagem da proteína por meio da reação do biureto: o que recomenda o emprêgo do ácido tricloracético e o de FOLIN-WU. Em ambos a quantidade de azoto não coagulável no filtrado se eleva a 25 - 40 mg per 100 cm<sup>3</sup> e nêles se acha a totalidade do ácido úrico, da uréa, da creatinina, do glutatião. A tioneína se precipita quando se usa a técnica de FOLIN-WU, e permanece em solução se o ácido tricloracético fôr o desproteinisante usado, caso em que também os peptidas se acham no filtrado (8). À vista dessas considerações, seria de julgar-se que os resultados obtidos pela desproteinação por qualquer das técnicas mencionadas, fossem semelhantes. O quadro seguinte esclarece êsse ponto. O sôro empregado nas demonstrações anteriores foi também usado no presente caso.

## QUADRO XI

Influência do desproteinizante sôbre os resultados da dosagem das proteínas por meio da reação do biureto.  
 Desproteinizantes usados:  $CCl_3COOH$  a 10% (I).  
 e  $WO_3Na_2$ , 2aq. a 10% e  $SO_4H_2$  0.67 N. (II).  
 Azoto proteico em (I) : 1.206%.  
 Azoto proteico em (II) : 1.216%.

Quantidade de sôro tomada para a análise cm <sup>3</sup>	Proteína per 100 cm <sup>3</sup> g (KJELDAHL)		D	E	k	$\frac{c}{k}$	Quantidade de proteína determinada fotométricamente g per 100 cm <sup>3</sup>
	II	I					
0.025	0.0118	—	66	0.181	0.060	0.313	0.0185
0.025	—	0.0190	65	0.187	0.062	0.306	0.0190
0.050	0.0376	—	42.5	0.372	0.124	0.303	0.0383
0.050	—	0.0380	42	0.377	0.126	0.302	0.0387
0.075	0.0564	—	28	0.552	0.184	0.307	0.0569
0.075	—	0.0570	28	0.552	0.184	0.310	0.0565
0.100	0.0752	—	18	0.745	0.248	0.303	0.0766
0.100	—	0.0760	18	0.745	0.248	0.306	0.0761
0.125	0.0940	—	25	0.602	0.301	0.312	0.0930
0.125	—	0.0950	25.4	0.595	0.298	0.319	0.0915
0.150	0.1128	—	44		0.357	0.316	0.1103
0.150	—	0.1140	42		0.377	0.302	0.1156
0.175	0.1316	—	38		0.420	0.313	0.1298
0.175	—	0.1330	37.6		0.427	0.317	0.1311
0.200	0.1504	—	32.4		0.490	0.307	0.1514
0.200	—	0.1520	32		0.495	0.307	0.1520
0.225	0.1692	—	28		0.552	0.307	0.1707
0.225	—	0.1710	27		0.569	0.301	0.1747
0.250	0.1880	—	25		0.602	0.312	0.1860
0.250	—	0.1900	23.4		0.631	0.301	0.1937
0.275	0.2068	—	22		0.658	0.314	0.2027
0.275	—	0.2090	22		0.658	0.318	0.2020
0.300	0.2256	—	18.6		0.731	0.309	0.2259
0.300	—	0.2280	17.5		0.757	0.301	0.2324
0.325	0.2444	—	40	0.398	0.796	0.307	0.2460
0.325	—	0.2470	40	0.398	0.796	0.310	0.2444
0.350	0.2632	—	36.8	0.434	0.868	0.303	0.2682
0.350	—	0.2660	36	0.444	0.888	0.300	0.2726

(I) Ácido tricloracético a 10% . . .	{	Média . . . . .	0.309
		Erro médio . . . . .	0.004
		Erro padrão . . . . .	0.001
		Coefficiente de variação . . . . .	1.294%
(II) $WO_3Na_2$ , 2 aq. + $SO_4$ 0.67 N.	{	Média . . . . .	0.307
		Erro médio . . . . .	0.007
		Erro padrão . . . . .	0.002
		Coefficiente de variação . . . . .	2.280%

De acôrdo com êsses números, e pelo menos no caso particular apresentado pelo quadro XI, os resultados não se alteram de forma sensível, de sorte a haver alcance prático de monta, quando à desproteïnização tricloracética se substitui a feita de acôrdo com a técnica de FOLIN-WU. Praticamente, pois, parece-nos que ambos os desproteïnizantes se podem aconselhar.

DENSIDADE ÓTICA E CONCENTRAÇÃO PROTÉICA NO CASO DO SÔRO DE SANGUE DO HOMEM, DO CÃO, DO BOI, DO CARNEIRO, E DO CAVALO. ROBINSON e HOGDEN (6) mostraram que iguais concentrações de proteínas dão transparências iguais quer se trate de sangue de homem, de cão, ou de coelho. Nós verificámos que o mesmo se dá com relação ao carneiro, ao cavalo e ao boi. Assim, pois, o método de determinação fotométrica da proteína por meio da reação do biureto pode ser aplicado ao sôro do sangue humano e ao de certas espécies economicamente muito importantes, sem que tal processo necessite ser modificado. E' provável que outras espécies se possam alinhar ao lado das referidas acima e que o método descrito apresente aspecto de generalidade. Os quadros seguintes resumem os resultados obtidos e documentam o que afirmamos.

COMPARAÇÃO DOS VALORES PROTEICOS OBTIDOS POR MEIO DO MÉTODO DE KJELDAHL E DA REAÇÃO DO BIURETO

QUADRO XII

Sôro de sangue do homem.  
Azoto proteico: — 1.136%.

Quantidade de sôro tomada para a análise cm <sup>3</sup>	Volume da solução corada cm <sup>3</sup>	Quantidade de proteína per 100 cm <sup>3</sup> (KJELDAHL) g	D	E	k	$\frac{c}{k}$	Quantidade de proteína per 100 cm <sup>3</sup> (Biureto) g
0.025	10	0.0178	67	0.174	0.058	0.307	0.0180
0.050	10	0.0355	46	0.337	0.112	0.317	0.0347
0.075	10	0.0533	31	0.509	0.170	0.314	0.0527
0.100	10	0.0710	20	0.699	0.233	0.305	0.0722
0.125	10	0.0888	27	0.569	0.285	0.312	0.0884
0.150	10	0.1065	45		0.347	0.307	0.1076
0.175	10	0.1243	41		0.387	0.321	0.1200
0.200	10	0.1420	34		0.469	0.303	0.1454
0.225	10	0.1598	31		0.509	0.314	0.1578
0.250	10	0.1775	26		0.585	0.303	0.1814
0.275	10	0.1953	23		0.638	0.306	0.1978
0.300	10	0.2130	20.8		0.682	0.312	0.2114

Média da relação  $\frac{c}{k}$  . . . . . 0.310  
 Erro médio . . . . . 0.006  
 Erro padrão . . . . . 0.002  
 Coeficiente de variação . . . . . 1.935%

## QUADRO XIII

Sôro de sangue de cão.  
Azoto proteico: — 0.960%.

Quantidade de sôro tomada para a análise cm <sup>3</sup>	Volume da solução corada cm <sup>3</sup>	Quantidade de proteína per 100 cm <sup>3</sup> (KJELDAHL) g	D	E	k	$\frac{c}{k}$	Quantidade de proteína per 100 cm <sup>3</sup> (Biureto) g
0.050	10	0.030	51	0.292	0.097	0.309	0.030
0.075	10	0.045	36	0.444	0.148	0.304	0.046
0.100	10	0.060	26	0.585	0.195	0.308	0.060
0.125	10	0.075	19	0.721	0.240	0.313	0.074
0.150	10	0.090	25	0.602	0.301	0.299	0.093
0.175	10	0.105	46		0.337	0.312	0.104
0.200	10	0.120	41.5		0.382	0.314	0.118
0.225	10	0.135	37		0.432	0.313	0.134
0.250	10	0.150	33		0.482	0.311	0.149
0.275	10	0.165	29		0.538	0.307	0.167
0.300	10	0.180	27		0.569	0.316	0.176
0.350	10	0.210	21.4		0.670	0.313	0.208

Média da relação  $\frac{c}{k}$  . . . . . 0.310  
 Erro médio . . . . . 0.005  
 Erro padrão . . . . . 0.001  
 Coeficiente de variação . . . . . 1.613%

## QUADRO XIV

Sôro de sangue de boi.  
Azoto proteico: — 1.152%.

Quantidade de sôro tomada para a análise cm <sup>3</sup>	Volume da solução corada cm <sup>3</sup>	Quantidade de proteína per 100 cm <sup>3</sup> (KJELDAHL) g	D	E	k	$\frac{c}{k}$	Quantidade de proteína per 100 cm <sup>3</sup> (Biureto) g
0.050	10	0.036	45	0.347	0.116	0.310	0.036
0.075	10	0.054	29	0.538	0.179	0.302	0.055
0.100	10	0.072	19	0.721	0.240	0.300	0.074
0.125	10	0.090	27	0.569	0.285	0.316	0.088
0.150	10	0.108	44.5		0.352	0.307	0.108
0.175	10	0.126	40		0.398	0.317	0.123
0.200	10	0.144	34		0.469	0.307	0.144
0.225	10	0.162	29.6		0.529	0.306	0.163
0.250	10	0.180	26		0.585	0.308	0.180
0.275	10	0.198	22		0.658	0.301	0.203
0.300	10	0.216	20.6		0.686	0.315	0.211

Média da relação  $\frac{c}{k}$  . . . . . 0.308  
 Erro médio . . . . . 0.006  
 Erro padrão . . . . . 0.002  
 Coeficiente de variação . . . . . 1.948%



QUADRO XV

Sôro de sangne de cavalo.  
Azoto proteico: — 1.206%.  
(V. quadro IX)

QUADRO XVI

Sôro de sangue de carneiro.  
Azoto proteico: — 1.120%.

Quantidade de sôro tomada para a análise cm <sup>3</sup>	Volume da solução corada cm <sup>3</sup>	Quantidade de proteína per 100 cm <sup>3</sup> (KJELDAHL) g	D	E	k	$\frac{c}{k}$	Quantidade de proteína per 100 cm <sup>3</sup> (Biureto) g
0.050	10	0.0350	45.5	0.342	0.114	0.307	0.0351
0.075	10	0.0525	30.6	0.514	0.171	0.307	0.0527
0.100	10	0.0700	22	0.658	0.219	0.320	0.0675
0.125	10	0.0875	15.5	0.810	0.270	0.324	0.0832
0.150	10	0.1050	46		0.337	0.312	0.1038
0.175	10	0.1225	40		0.398	0.308	0.1226
0.200	10	0.1400	34		0.469	0.299	0.1444
0.225	10	0.1575	31		0.509	0.309	0.1563
0.250	10	0.1750	26		0.585	0.299	0.1802
0.275	10	0.1925	23		0.638	0.302	0.1965
0.300	10	0.2100	20		0.699	0.300	0.2153

Média da relação  $\frac{c}{k}$  . . . . . 0.308  
 Erro médio . . . . . 0.008  
 Erro padrão . . . . . 0.002  
 Coeficiente de variação . . . . . 2.597%

Esses quadros demonstram que quantidades iguais de proteínas dão densidades óticas praticamente iguais, no caso do sôro de sangue dos animais referidos e, também, do coelho (6). As diferenças encontradas se situam dentro dos limites dos êrros experimentais. Assim sendo, poder-se-ia estabelecer, para os casos estudados, um coeficiente numérico geral, média de tôdas as relações  $\frac{c}{k}$  contidas nos quadros acima publicados. Teríamos, então:

Média . . . . . 0.309  
 Erro médio . . . . . 0.006  
 Erro padrão . . . . . 0.001  
 Coeficiente de variação . . . . . 1.941%

REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS. Para se organizarem os quadros anteriores, tomaram-se da mesma solução alcalina da matéria protéica tanto as aliquotas necessárias para a determinação do azoto das proteínas, como as destinadas à dosagem destas fotométricamente, por meio da reação do biureto. Para verificar a maneira por

que se reproduzem os resultados, porém, os volumes empregados nas várias determinações, tomados do mesmo sôro, foram tratados de per si pelo desproteínizante e, em seguida, de acôrdo com o método descrito. Assim procedendo, obtivemos os resultados que se vêm no quadro seguinte:

QUADRO XVII  
REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS

Sôro de sangue de carneiro.  
Azoto proteico: — 1.120%.  
Matéria proteica: — 7.00%.

Quantidade de sôro tomada para a análise cm <sup>3</sup>	Volume da solução corada cm <sup>3</sup>	D	E	k	Proteína par 100 cm <sup>3</sup> do sôro (Biureto) g	Diferença entre os dois métodos %
0.050	10	46	0.337	0.112	6.91	— 1.29
0.050	10	45	0.347	0.116	7.17	+ 2.43
0.050	10	44	0.357	0.119	7.39	+ 5.57
0.075	10	30.6	0.514	0.171	7.05	+ 0.71
0.075	10	31	0.509	0.170	7.00	0.00
0.100	10	21.2	0.674	0.225	6.95	— 0.72
0.100	10	21.8	0.662	0.221	6.83	— 2.43
0.100	10	21	0.678	0.226	6.98	— 0.29
0.125	10	16	0.796	0.265	6.55	— 7.43
0.125	10	15	0.824	0.275	6.80	— 2.86
0.150	10	46		0.337	6.94	— 0.86
0.150	10	44		0.357	7.29	+ 4.14
0.150	10	47		0.328	6.76	— 3.43
0.175	10	39		0.409	7.22	+ 3.14
0.175	10	40		0.398	7.03	+ 0.43
0.200	10	34		0.469	7.25	+ 3.57
0.200	10	35		0.456	7.05	+ 0.71
0.200	10	34.6		0.461	7.12	+ 1.71
0.250	10	25.4		0.595	7.35	+ 5.00
0.250	10	27		0.569	7.03	+ 0.43
0.300	10	19		0.721	7.43	+ 6.14
0.300	10	19.5		0.710	7.31	+ 4.43

Êsses números mostram que os resultados dados pelos referidos métodos são comparáveis, e que o que emprega a reação do biureto é aconselhável para a determinação fotométrica das proteínas.

#### SUMMARY

*The biuret reaction has been adapted into a reliable procedure for the photometric determination of blood serum proteins, the optical densities being measured with the Zeiss - Pulfrich step-photometer.*

*It has been demonstrated that a blank solution is a satisfactory compensating liquid.*

*We have studied the effect of the concentration and volume of the reagents employed for the development of the color; time that the colored solution is allowed to stand before centrifuging to remove the precipitated cupric hydroxide; and final volume on color readings.*

*The color system follows Lambert-Beer's law; therefore the concentration of an unknown is readily calculated.*

*Quantities of proteins ranging from 0.015% to 0.27% can be determined with a fair degree of accuracy.*

*Trichloroacetic acid and sodium tungstate + sulfuric acid (Folin-Wu) have been employed for precipitating the proteins, and both have been found to give results which are very nearly the same.*

*It has been found that the optical density values are the same for equal concentrations of proteins from the blood sera of humans, dogs, oxen, horses and sheeps.*

#### BIBLIOGRAFIA

- 1 — RIEGLER, E. — 1914 — Eine colorimetrische Bestimmungsmethode des Eiweisses — *Zeitschr. für anal. Chem.* — 53: 242-245.
- 2 — AUTENRIETH, W. e MINK, F. — 1915 — Über colorimetrische Bestimmungsmethoden: Die quantitative Bestimmung von Harneiweisse. — *Münch. med. Wochschr.* — 62: 1417-1421.
- 3 — AUTENRIETH, W. — 1917 — Über colorimetrische Bestimmungsmethoden: Die Bestimmung von Serumalbumin und Globulin im Harn, in der Ascitesflüssigkeit und im Blutserum. — *Münch. med. Wochschr.* — 64: 241-245.
- 4 — FINE, J. — 1935 — The biuret method of estimating albumin and globulin in serum and urine. — *Bioch. Jour.* — 29: 799-803.
- 5 — LIEBEN, F. e JESSERER, H. — 1936 — Studien zur Biuretreaktion der Proteine, — *Bioch. Zeitschr.* — 285: 36-44.
- 6 — ROBINSON, H. W. e HOGDEN, C. G. — 1940 — The biuret reaction in the determination of serum proteins. — *Jour. Biol. Chem.* — 135: 707-725.
- 7 — ROBINSON, H. W. e HOGDEN, C. G. — 1940 — The biuret reaction in the determination of proteins. — *Jour. Biol. Chem.* — 135: 727-731.  
und theoretischen-Gebrauch — (pág. 498) — Berlin, Urban & Schwarzenberg.