

TRONCO COMÚN DIVISIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MÓDULO: ENERGIA Y CONSUMO DE SUSTANCIAS FUNDAMENTALES

PRÁCTICA No. 2

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

MÉTODO DE BIURET

OBJETIVO:

- Manejar en el laboratorio el método de Biuret para la determinación de proteínas.
- Observar y determinar experimentalmente el efecto del pH sobre las proteínas de la leche.

GENERALIDADES:

- Investigación bibliográfica por parte de los estudiantes sobre colorimetría y punto isoeléctrico de las proteínas.

MATERIAL POR EQUIPO:

- 1 Probeta de 50 ml
 - 2 Gradillas
 - 2 Pipetas graduadas de 10 ml
 - 3 Pipetas graduadas de 5 ml
 - 1 Pipeta graduada de 1 ml
 - 12 Tubos de ensaye (15x100 mm)
 - 12 Tubos de ensaye (16x150 mm)
 - 1 Vaso de precipitados de 100 mL
 - 1 Balanza granataria
- Papel parafilm® para 10 tubos de ensaye
De ser necesario, 1 embudo de vidrio o plástico de tallo corto y papel filtro.

REACTIVOS POR EQUIPO:

- Agua destilada
- Solución de ácido acético 0.1 N
- Solución de acetato de sodio 0.1 N
- Solución de caseína (concentración 4 mg/ml)
- 50 mL de Reactivo de Biuret

NOTA: El éxito de la práctica depende en gran parte de la limpieza del material. Asegúrate que todo esté perfectamente limpio.

APARATOS POR EQUIPO:

- 1 Centrífuga clínica.
- 1 Balanza granataria.
- 2 Espectrofotómetros.
- 4 Celdas para espectrofotómetro.

MATERIAL POR EQUIPO DE ALUMNOS:

- 10 g De leche en polvo descremada.
- 1 Plumón indeleble.
- Masking tape.
- Jabón y franela.

PARTE EXPERIMENTAL

1. DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO:

1.1. Preparar de una serie de tubos con solución amortiguadora de acetatos:

Coloca en una gradilla 6 tubos de ensaye (15x100 mm) rotulados con números consecutivos (1-6). Adiciona a cada tubo las soluciones de ácido acético y acetato de sodio que indica la siguiente Tabla 1:

| TUBO | Solución de ácido acético 0.1 N (ml) | Solución de acetato de sodio 0.1 N (ml) |
|------|---|--|
| 1 | 5.0 | - |
| 2 | 4.0 | 1.0 |
| 3 | 3.0 | 2.0 |
| 4 | 2.0 | 3.0 |
| 5 | 1.0 | 4.0 |
| 6 | - | 5.0 |

Tabla 1 | El volumen final de cada tubo deberá ser de 5 ml.

2. PREPARACIÓN DE LA LECHE:

2.2. En un vaso de precipitados de 100 ml disuelve 6 g de leche en polvo descremada con 50 ml de agua destilada.

NOTA: añade el agua poco a poco para evitar que se formen grumos que podrían dificultar la obtención de una solución homogénea. No debes calentar la leche para disolverla.

2.3. En un tubo de ensaye de 16 x 150 mm mide 2 ml de la leche rehidratada preparada como se indicó anteriormente y añade 8 ml de agua destilada, agita cuidadosamente por inversión. Esta muestra de leche diluida (1:5) se ocupará para llevar a cabo la determinación del punto isoeléctrico de las proteínas descrito en el siguiente párrafo.

3. PUNTO ISOELÉCTRICO:

3.1. Añade 1 ml de la leche diluida (1:5) a cada tubo de solución amortiguadora que preparaste en el punto 1.

3.2. Mezcla cuidadosamente por inversión todos los tubos y deja reposar por espacio de 10 minutos. Observa el aspecto de las mezclas preparadas. En el tubo donde observes grumos de leche suspendidos en la solución, te indicará que las proteínas de la leche se han insolubilizado debido al pH de la solución. Este pH es denominado:

- Punto Isoeléctrico -

3.3 Coloca los tubos de manera balanceada dentro del rotor de la centrífuga. Cada tubo deberá pesar lo mismo que aquel tubo que ocupará el lugar frente a él dentro de la centrífuga. Centrifuga los tubos a 2500 rpm durante 10 minutos.

3.4. Separa el sobrenadante (cuidando de no resuspender el precipitado acumulado en el fondo del tubo) y transfiere a tubos limpios de 15x100 mm rotulados con el número de tubo que les corresponde.

4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS CON EL MÉTODO DE BIURET:

4.1. Coloca en una gradilla 11 tubos de ensaye (16x150 mm). Rotula uno de ellos como número cero, el cual llevará los reactivos para calibrar el espectrofotómetro (blanco de reactivos o testigo). Los siguientes 4 tubos llevarán números consecutivos del I al IV (romanos), y los restantes del 1 al 6 (arábigos). Los rotularás con el número que corresponda a los sobrenadantes obtenidos por centrifugación según se indicó en el punto 3.4.

4.2. Añade a cada tubo los reactivos para determinar proteínas en la curva de calibración (tubos I a V) y en los sobrenadantes (tubos 1 a 6) de acuerdo a lo indicado en la Tabla 2.

| CURVA DE CALIBRACIÓN | | | | | | | TUBOS PROBLEMA | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tubo | 0 | I | II | III | IV | V | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Agua (ml) | 1 | 0.8 | 0.6 | 0.4 | 0.2 | - | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Solución patrón (4mg/ml) | - | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 | - | - | - | - | - | - |
| Reactivo de Biuret (ml) | 4.0 ml A TODOS LOS TUBOS | | | | | | | | | | | |
| Sobrenadante | - | - | - | - | - | - | 0.5 | - | - | - | - | - |
| Sobrenadante | - | - | - | - | - | - | - | 0.5 | - | - | - | - |
| Sobrenadante | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.5 | - | - | - |
| Sobrenadante | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.5 | - | - |
| Sobrenadante | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.5 | - |
| Sobrenadante | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.5 |

Tabla 2| Datos para elaborar la curva de calibración y para la determinación de las muestras problema.

NOTA: Mezcla cuidadosamente cada reactivo y deja en reposo por 30 minutos para favorecer el desarrollo del color. Es importante que el espectrofotómetro se haya calentado previamente por un tiempo de por lo menos 15 minutos. Posteriormente calibra el espectrofotómetro con la solución blanco a una absorbancia de cero, con una longitud de onda de 570 nm.

Si observas alguna turbidez en alguno de los tubos, es conveniente que filtres con ayuda del embudo de tallo corto y papel filtro antes de hacer la lectura.

5. RESULTADOS:

5.1. Al usar el espectrofotómetro, los valores que obtuviste corresponden a la absorbancia (A).

Anota tus resultados en la Tabla 3.

| Tubo | I | II | III | IV | V | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------------|---|----|-----|----|---|---|---|---|---|---|---|
| Absorbancia (A) | | | | | | | | | | | |
| Proteína (mg) | | | | | | | | | | | |

Tabla 3| Absorbancia y contenido proteico.

5.2. Calcula el contenido proteico de los tubos I a V de acuerdo al volumen empleado de la solución estándar de caseína (anótalos en la Tabla 3) y traza una gráfica colocando estos valores en el eje de las “x”. Coloca los valores de absorbancia obtenidos para cada uno de estos tubos en el eje de las “y” y traza la curva correspondiente.

Interpola los valores de absorbancia de los tubos 1 a 6, y calcula la cantidad de proteína presente en cada sobrenadante.

Para calcular los mg/ml de proteína debes multiplicar el valor de mg interpolado de la curva de calibración por el factor de dilución de la leche.

Anota tus resultados obtenidos en la Tabla 4.

| Proteína | mg/ml | mg/100 ml |
|----------------|-------|-----------|
| Sobrenadante 1 | | |
| Sobrenadante 2 | | |
| Sobrenadante 3 | | |
| Sobrenadante 4 | | |
| Sobrenadante 5 | | |
| Sobrenadante 6 | | |

Tabla 4| Cantidad de proteína presente en las muestras problema.

5.3. Haciendo uso de la ecuación de Henderson-Hasselbach calcula el pH del tubo donde observaste la mayor precipitación de caseína.

6. CUESTIONARIO:

6.1. Describe brevemente la Ley de Lambert y Beer.

6.2. ¿Cuáles son las limitaciones la Ley de Lambert y Beer?

6.3.¿Cuáles son los cuidados que se deben tener con las celdas para el espectrofotómetro?

7. BIBLIOGRAFÍA

7.1. Bisswanger H. (2004). Practical Enzymology. Wiley-VCH. Germany. 255 pp.

7.2. Christensen H.N. and Palmer G.A. (1974). Enzyme Kinetics. A learning program for students of the biological and medical sciences. W.B. Saunders Company. USA. 163 pp.

7.3. McAllister R.A. (1975). Las enzimas y determinación de la actividad enzimática. El Manual Moderno, S.A. México. 94 pp.

7.4. Nelson D.L. and Cox M.M. (2005). Lehninger, Principles of Biochemistry. W.H. Freeman and Company. New York. 1119 pp.

7.5. Herrera, E. (1991). Bioquímica. Aspectos estructurales y vías metabólicas. Interamericana McGraw-Hill. Nueva York. 922 pp.