

Dosificación de Proteínas en la Clara de huevo

Prof. Raúl Britos.

INTRODUCCIÓN

Esta práctica tiene la finalidad de cuantificar proteínas en la clara de huevo utilizando el método colorimétrico basándose en una curva de calibración de gelatina sin sabor como patrón.

La gelatina, es un polímero derivado del colágeno, y se obtiene de tejidos ricos en colágeno como los huesos, cartílagos, tendones, piel de ganado porcino y vacuno. La gelatina dependiendo de la calidad está formada entre 90 a 99,95 % de proteína pura, independientemente de lo anterior en esta práctica la utilizaremos como patrón (100 % pura) para construir la curva de calibración.

Como reactivo para colorimetría se utiliza el reactivo de biuret, dado que el sulfato de cobre (II) alcalino reacciona con compuestos que tengan dos o más enlaces peptídicos proporcionando complejos de color violeta, por lo que sirve para reconocer péptidos y eventualmente proteínas en la clara de huevo.

OBJETIVOS

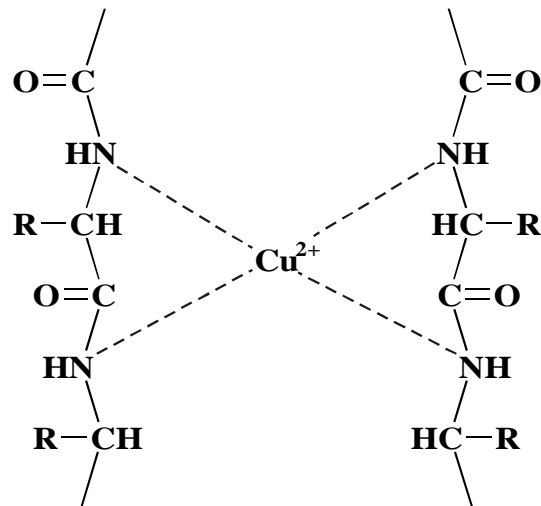
- Construir una curva de calibración de gelatina sin sabor.
- Dosificar proteínas en la clara de huevo por medio de un método colorimétrico.

MARCO TEÓRICO

La presencia de proteínas en una mezcla se puede determinar mediante la reacción del biuret. El reactivo de biuret contiene sulfato cúprico (CuSO_4) en solución acuosa alcalina (presencia de NaOH o KOH).

La reacción se basa en la formación de un compuesto de color violeta, debido a la formación de un complejo de coordinación entre los iones Cu^{2+} y los pares de

electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos.



La reacción debe su nombre a la biurea, una molécula formada a partir de dos de urea ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), que es la más sencilla que da positiva esta reacción, común a todos los compuestos que tengan dos o más enlaces peptídicos consecutivos en sus moléculas.

Espectrofotometría: Principios básicos

A diferencia de las pruebas realizadas anteriormente, la reacción de biuret es cuantificable, es decir, a mayor concentración de proteínas, mayor intensidad de color violeta. Estas reacciones, en las que el color formado es proporcional a la cantidad de sustancia se llaman **reacciones colorimétricas**.

Midiendo la intensidad de color se podría conocer la concentración de la sustancia que lo produce. Para ello se aplican técnicas fotométricas, empleando un aparato llamado **colorímetro** (si mide sólo un determinado color) o **espectrofotómetro** (si realiza una medida de todo el espectro de colores).

Colorimetría

Los métodos fotométricos son aquellos que implican la interacción entre la materia y la radiación electromagnética.

La luz tiene un carácter dual, es decir, se comporta como onda y como partícula.

Las ondas luminosas son una especie de radiación electromagnética, están formadas por campos magnéticos y eléctricos oscilantes perpendiculares entre sí.

Como toda onda está caracterizada por una longitud de onda (λ), una frecuencia (ν) y una velocidad de propagación (c), la velocidad de la luz ($3,0 \times 10^8$ m/s). Estas tres variables se relacionan:

$$c = \lambda \cdot \nu$$

Desde el punto de vista energético, es más conveniente considerar a la luz formada por partículas llamadas fotones. Cada fotón tiene una energía determinada que está dada por:

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

Siendo h la constante de Planck ($6,62 \times 10^{-34}$ J/s). Esta ecuación muestra la relación directamente proporcional que existe entre la energía y la frecuencia de una radiación electromagnética.

Estas técnicas fotocolorimétricas se utilizan generalmente para la determinación de concentraciones de diferentes sustancias aprovechando su coloración característica o la que resulta del tratamiento con algún reactivo apropiado.

Todos los métodos ópticos se pueden clasificar en función de la interacción de materia y radiación en:

- ❖ **Interacciones que no transfieren energía**, como por ejemplo polarización, refracción, reflexión, entre otros.
- ❖ **Interacciones con transferencia de energía** dentro de las cuales podemos encontrar:
 - a) absorción: la absorción de un fotón lleva a un átomo o molécula a un nivel de energía superior (excitado), y cuando vuelve al estado

fundamental se produce una emisión de energía, ya sea en forma de calor, luz, etc.

- b) emisión: la absorción de energía por parte de un átomo, lo lleva a un nivel energético superior, y volviendo a su estado de menor energía o fundamental emite un fotón cuya energía y longitud de onda dependerán de las transiciones energéticas en cuestión.

Conviene aclarar que el contenido energético de un átomo o molécula no está dado sólo por interacciones energéticas de los electrones, sino también por su movimiento (vibraciones o rotaciones, por ejemplo).

En la práctica se considerará que aquellos factores no específicos como la reflexión en la superficie del recipiente o dispersión en el medio, permanecen constante de tal forma que la disminución de la intensidad o potencia de haz de luz es debido a las partículas absorbentes localizadas en el camino óptico. Esta disminución de la intensidad de la luz depende del número y del tamaño de dichas partículas.

La importancia de estos métodos radica en el hecho en que se pueden hacer mediciones en un rango muy grande del espectro electromagnético. A su vez, pueden hacerse usando bandas muy angostas (espectrofotometría) o utilizando bandas anchas (fotocolorimetría).

Al conjunto de todos los tipos de ondas o radiaciones se denominan **espectro electromagnético**.

Fotocolorímetro



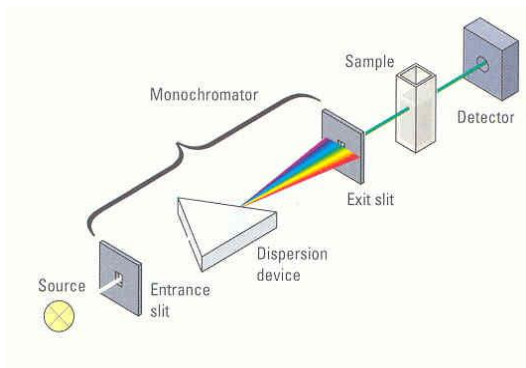
El instrumento con el cual se realizan mediciones de absorbancia es el Fotómetro o Fotocolorímetro.

La variación del color de un sistema homogéneo con la concentración de algún componente es la base del análisis fotométrico. El análisis fotométrico se usa en química analítica cuantitativa y se basa en la medición de la potencia de radiación absorbida por un medio absorbente.

El fundamento de esta técnica consiste en el pasaje de una radiación de una determinada longitud de onda (λ) a través de una solución coloreada, y en la medición de la potencia de la radiación absorbida por dicha solución. También puede aplicarse a especies químicas que no son coloreadas, pero que al reaccionar con ciertos reactivos generan especies coloreadas.

La ventaja de los métodos fotométricos es que permiten determinar cantidades pequeñas de sustancias o iones en una muestra de estudio.

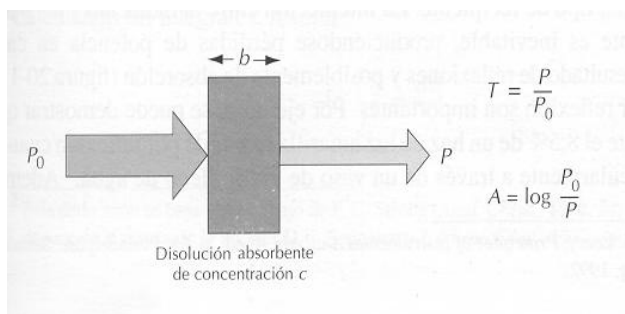
Las partes más importantes del colorímetro son las siguientes: una lámpara de filamento de tungsteno como fuente de luz, una lente para obtener un haz de radiación paralela, un filtro de absorción, un diafragma variable, un porta cubeta para la solución y una fotocélula.



- a) Fuente luminosa
- b) Lente
- c) Filtro
- d) Diafragma
- e) Porta cubeta
- f) Detector (fotocélula en este caso).

Procesos de absorción

Cuando una muestra absorbe la luz, la potencia radiante (energía por segundo por unidad de área del haz) disminuye. Es decir, cuando la luz monocromática de potencia P_0 incide sobre una muestra de espesor l , la potencia de haz emergente es P siendo $P_0 \geq P$.



De esta forma se define una nueva magnitud, la transmitancia (T), que

es la fracción de luz incidente que sale de la muestra:

$$T = \frac{P}{P_0}$$

Por lo tanto, la transmitancia varía de cero a uno.

El porcentaje de transmitancia (% T) varía de cero a cien por ciento y se define:

$$\%T = \frac{P}{P_0} \times 100$$

Una magnitud física más útil de trabajar es la Absorbancia (A), magnitud adimensional, que está dada por la siguiente relación:

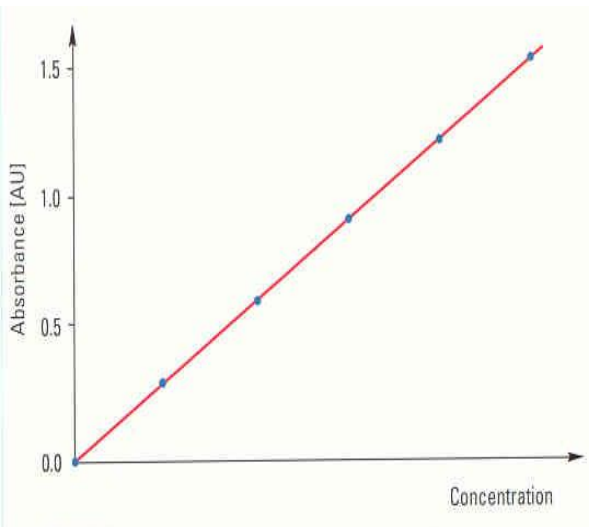
$$A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = -\log T$$

Entonces, $A=0$ cuando no se produce absorción de luz. El aspecto fundamental de la absorbancia está relacionado a su proporcionalidad directa con la concentración de la especie absorbente en la muestra. Esto está planteado en la ley de Beer-Lambert, que está representada por la siguiente ecuación:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

Donde: ϵ es una constante de proporcionalidad, denominada absorptividad molar, cuyas unidades son $M^{-1} \cdot cm^{-1}$. Esta, es característica de cada sustancia e indica cuanta la luz se absorbe a una longitud dada.

Si se sigue la ley de Beer-Lambert y l se mantiene constante, el gráfico de $A = f(C)$ da una recta que pasa por el origen.



Existen diversas razones por la cual la ley de Beer-Lambert no se cumple, y por lo tanto que afectan a los resultados y el gráfico deja de ser una recta.

Algunos de estos factores pueden ser:

- ❖ Que la luz no sea monocromática.
- ❖ Que las soluciones sean muy concentradas con lo que las partículas de soluto empiezan a interactuar entre sí, cambiando sus propiedades eléctricas.
- ❖ Que hayan cambios en la naturaleza de las especies absorbentes o en las propiedades de la solución, por ejemplo ionización, disociación, etc.

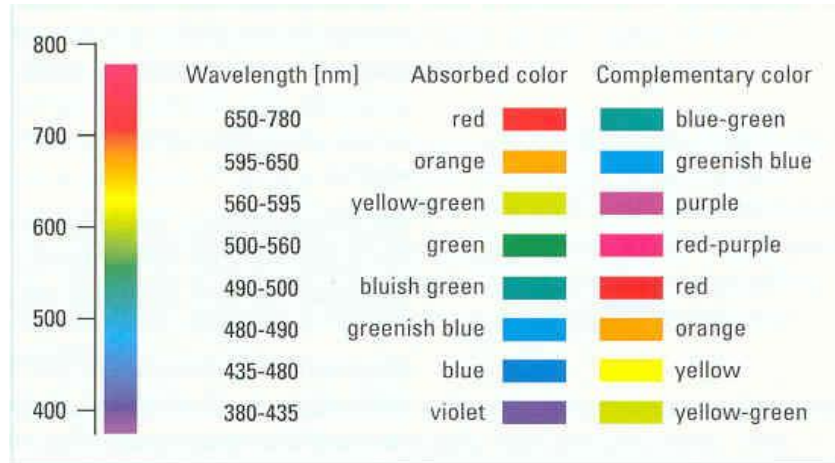
Selección del filtro

Los filtros utilizados en los fotocolorímetros consisten en vidrios de color o gelatina impregnada y tienen la propiedad de transmitir de luz de cierta zona del espectro electromagnético absorbiendo el resto.

Para elegir el filtro a usar para una determinada solución coloreada, se realizan lectura de absorbancia empleando distintos filtros. Se usará el filtro con el que se registre una absorbancia máxima.

Otra forma de seleccionar es eligiendo aquel de color complementario al de la solución; el siguiente cuadro es muy útil.

Color del filtro	Color de la solución	Longitud de onda λ(nm)
Violeta	Verde-amarillento	400-435
Azul	Amarillo	435-480
Azul-verdoso	Anaranjado	480-490
Verde-azulado	Rojo	490-500
Verde	Púrpura	500-560
Verde-amarillento	Violeta	560-580
Amarillo	Azul	580-595
Anaranjado	Azul verdoso	595-610
Rojo	Verde-Azulado	610-750



Al seleccionar el filtro se deben considerar las posibles interferencias de otras sustancias presentes en la muestra. El espectro de absorción del complejo de biuret con los enlaces peptídicos presenta máximo de absorción a 330 y 540 nm. Aunque la sensibilidad mayor es a 330 nm se prefiere utilizar un filtro de 540 nm para evitar interferencias y para que se cumpla la ley de Beer.

MATERIALES

- Fotocolorímetro (Filtro 540 nm)
- Celdas del fotocolorímetro (1cm de camino óptico).
- Balanza
- Matraz aforado 100,00 mL
- Tubos de ensayo
- Pipetas
- Cuentagotas
- Vaso de Bohemia

SUSTANCIAS Y REACTIVOS

- Reactivo de biuret
- Agua destilada
- Gelatina sin sabor.

NORMAS DE SEGURIDAD

- Manipular el reactivo de biuret con precaución ya que presenta un pH mayor a 7, siendo un medio fuertemente alcalino. Este reactivo se prepara con hidróxido de sodio NaOH (el hidróxido de sodio es una sustancia corrosiva, venenosa y peligrosa). Puede ser letal si se ingiere.
- Use indumentaria adecuada (guantes, lentes y túnica).

TÉCNICA

Puesta a punto del fotolorímetro

1. Encender el fotolorímetro (se recomienda encenderlo 15 minutos antes de realizar mediciones).
2. Verificar que en la ranura para el filtro del fotolorímetro se encuentre el filtro seleccionado **de $\lambda = 540\text{nm}$** .
3. Girar la perrilla de encendido a la posición de absorbancia.

Manipulación del fotolorímetro

1. Colocar agua destilada en la cubeta del fotolorímetro hasta $\frac{3}{4}$ de su capacidad e insertarla en la ranura correspondiente del aparato.
2. Utilizando la perilla de ajuste llevar a cero la lectura de absorbancia. (Primero utilizando la perilla de ajuste grueso y luego la de ajuste fino).
3. Retirar la cubeta que contiene agua destilada y colocar la solución patrón hasta $\frac{3}{4}$ de su capacidad y medir su valor de absorbancia.
4. Repetir lo mismo con todas las soluciones incluyendo la solución problema.

Preparación de la solución madre de gelatina sin sabor (solución patrón)

1. Medir la masa de 1,00 g de gelatina (se asume que existe 1,00 g de proteínas) y transvasar cuantitativamente a un matraz aforado 100,00 mL.

2. Disolver en agua tibia y enrasar con agua destilada a temperatura ambiente hasta el aforo

(Se pueden producir burbujas de aire sobre la solución, lo cual impide un correcto aforo, por lo tanto se recomienda dejar 24 h de reposo).

Preparación de soluciones diluidas de gelatina

Se toman cinco tubos de ensayo rotulados de 0 a 4 y se procede según la siguiente tabla:

Tubos	Solución de gelatina (10,0 g/L)	Agua destilada (mL)	Reactivo de biuret (mL)
0	-	1,00	4,00
1	1,00	-	4,00
2	0,75	0,25	4,00
3	0,50	0,50	4,00
4	0,25	0,75	4,00

Construcción de la curva de calibración

1. Una vez homogeneizado el color en los cinco tubos de ensayo se vierte parte de la solución del tubo 0 (solución blanco) en una cubeta del colorímetro ($\frac{3}{4}$ de su capacidad), tomándola por la parte rayada, y se coloca en el colorímetro de modo que el haz de luz atraviese las caras lisas de la cubeta.
2. Se ajustan las lecturas de Absorbancia a cero moviendo las perillas de ajuste grueso y fino. Se retira la cubeta.
3. Se coloca parte de la solución del tubo 1 en otra cubeta del colorímetro y se lee la absorbancia. Se anota el valor en la tabla correspondiente y se retira la cubeta.

4. Se procede de igual modo que en el ítem anterior para los tubos restantes. Se descartan las soluciones de las cubetas y se enjuagan cuidadosamente con agua destilada.

Preparación de la Solución problema: Clara de huevo

1. Se toma 1,00 mL de clara de huevo y se lo diluye en 100,00 mL de agua destilada, para que, dada la concentración proteica de esta solución, el valor de la absorbancia no exceda el rango de trabajo.
2. Para determinar el valor de absorbancia de la solución problema diluida en agua destilada, se le debe agregar a 1,00 mL de la misma 4,00mL de reactivo de biuret y se procede para la mismo modo que para la realización de la curva de calibración.

Determinación del volumen promedio de la clara de huevo¹

1. Para determinar el volumen promedio de la clara de un huevo, se debe determinar el volumen de por lo menos seis claras de huevos.
2. Con dichos volúmenes se calcula un valor promedio.
3. Tomaremos como volumen promedio **36,0 mL de clara por huevo**

¹ El volumen de clara depende del contenido de agua, de las diferentes razas de gallinas y del tamaño de los huevos.

TABLA DE DATOS

Tubos	Concentración de proteínas (g de proteína/L solución)	A (Absorbancia)
0		
1		
2		
3		
4		
5 (solución problema)		

BIBLIOGRAFÍA

- "Principios de química" - Dickerson - Gray - Haight Editorial Revertè 1976
- "Química" - Chang - 6º Edición Mc Graw Hill 1998.
- "Química: la ciencia central" - Brown - 7º Edición Prentice Hall 1998.
- Kolthoff, I.M. ; Sandell, E. B.; Meehan, E.J.; Stanley Bruckenstein; ANÁLISIS QUÍMICO CUANTITATIVO. 4ª ed. Nigar, S.R.L. Buenos Aires.
- Lazzerini, S_Sulé, P.; (2001); Guía Básica Laboratorio de Química de Educación Media.
- Harris, D. "Análisis Químico Cuantitativo". 3ª Ed. Editorial Iberoamericana S.A de C.V, 1992. EEUU.

APÉNDICE 1

Preparación del Reactivo de biuret.

1. Se masa 1,6 g de sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).
2. Se disuelve en agua hasta 500,0 mL y luego se agrega 300,0 mL de solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2,5 mol/L.
3. Se agregan unos cristales de Tartrato de sodio y potasio.
4. Enrasar a 1L.
5. El reactivo se conserva tapado.