

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN CLARA DE HUEVO

1. OBJETIVOS

- Construir una curva de calibración a partir de una solución stock de proteínas.
- Dosificar proteínas en clara de huevo por medio de un método colorimétrico.

2. MATERIALES Y EQUIPOS

- Material de vidrio de uso general: probeta de 100,0 mL, cuentagotas, vaso de Bohemia de 100 mL, vidrios reloj, matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- Material volumétrico de vidrio: matraces aforados de 100,00 mL y 25,00 mL, pipeta aforada de 10,00 mL, bureta de 10,00 mL.
- Balanza.
- Equipo para colorimetría:
 - Espectrofotómetro capaz de operar a 545 nm con celdas de vidrio o de plástico con un paso óptico de 1 cm.
 - Fotocolorímetro con filtro en el entorno de los 540 nm (color verde) con celdas de vidrio o de plástico con un paso óptico de 1 cm.

3. REACTIVOS

- **Reactivo de biuret:** Preparar 60 mL de una solución de hidróxido de sodio al 10 % m/V en un vaso de Bohemia de 100 mL. Por otro lado, colocar 0,3 g de sulfato de cobre (II) pentahidratado, 1,2 g de tartrato de sodio y potasio en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y disolver en 100 mL de agua destilada. Con agitación constante agregar la solución de hidróxido de sodio al 10 % m/V al matraz y llevar a 200 mL con agua destilada.
- **Solución stock de proteína patrón 10,00 g/L:** Masar 1,00 g de gelatina sin sabor (se asume que contiene 1,00 g de proteínas). Transferir a un vaso de Bohemia, agregar 20 mL de agua destilada, dejar reposar por dos minutos para permitir su hidratación y calentar hasta que se disuelva. Cuando la temperatura del sistema sea de alrededor de 40 °C, trasvasar cuantitativamente a un matraz aforado de 100,00 mL. y enrasar con agua destilada. Evitar agitar demasiado para no generar espuma, en caso que se genere espuma agregar 1 mL de etanol al 96 °GL.

4. PROCEDIMIENTO

4.1. Puesta a punto del fotocolorímetro o del espectrofotómetro

Encender el instrumento (se recomienda encenderlo 15 minutos antes de realizar mediciones).

Seleccionar la longitud de onda de trabajo $\lambda = 545 \text{ nm}$ o seleccionar el filtro correspondiente. Verificar que mida absorbancia.

4.2. Curva de calibración de proteína patrón

Transferir la solución stock de proteína patrón de concentración 10,00 g/L a una bureta de 10,00 mL limpia y otra con hidróxido de sodio 0,1 mol/L. Enrasar ambas buretas en cero cuidando que no queden burbujas de aire en su pico.

Transferir los siguientes volúmenes de solución a una serie de seis matraces aforados de 25,00 mL:

	Blanco	Solución 1	Solución 2	Solución 3	Solución 4	Solución 5
V Patrón (mL)	0	1	2	3	4	5
V NaOH (mL)	5	4	3	2	1	0

Enrasar cada matraz con reactivo de biuret. Homogeneizar bien.

4.3. Preparación de la solución problema

Medir 1,00 g de clara de huevo y transferirlo a un matraz aforado de 50,00 mL. Enrasar con agua destilada.

Para que la concentración de la solución problema no exceda el rango de trabajo, medir con una pipeta aforada 10,00 mL de la solución anterior y transferir a un matraz aforado de 25,00 mL. Enrasar con reactivo de biuret.

4.4. Determinación colorimétrica

Ajustar el equipo con el blanco, de manera que su absorbancia sea cero. Colocar la solución hasta tres cuartas partes de la cubeta tomándola por la parte rayada o esmerilada, secarla bien con papel absorbente por fuera y colocarla dentro del compartimento de la cubeta.

Medir la absorbancia de cada una de las soluciones a 545 nm (por duplicado) luego de transcurridos 15 minutos de agregado el reactivo de biuret.

Cuidar que la superficie de la cubeta esté perfectamente limpia antes de realizar las mediciones.

Leer el valor de la absorbancia de la primera muestra (solución 1) y registrarlo. Descartar la muestra ya medida.

Enjuagar la cubeta con un pequeño volumen de la solución 2 con el objetivo de arrastrar todo resto de la muestra anterior que pueda quedar en la cubeta.

Medir la absorbancia de la solución 2 y registrarla. Repetir los pasos anteriores con las siguientes soluciones: 3, 4, 5 y problema.

Registrar todos los datos en la siguiente tabla:

Solución	C proteínas (g/L)	A
Blanco		
1		
2		
3		
4		
5		
Problema		

5. TRATAMIENTO DE DATOS

Graficar la concentración de proteína para cada solución (expresa en g/L) contra la absorbancia en un diagrama de dispersión y encontrar la ecuación de la recta de mejor ajuste a la serie de datos experimentales mediante el método de mínimos cuadrados, así como el valor del coeficiente de correlación R^2 .

A partir de la absorbancia obtenida para la muestra problema interpolar en la ecuación anterior para obtener la concentración de proteínas (expresada en g/L), y a partir de ella calcular la concentración de proteínas en la clara de huevo (tener en cuenta la dilución que se realizó a la solución de clara de huevo).