

INTRODUCCIÓN:

Las proteínas pueden formar soluciones estables debido a las cargas de hidratación de las moléculas de proteína y a las cargas eléctricas que ellas poseen. Las proteínas ligan agua por formación de enlace de hidrógeno con sus diferentes grupos polares $-\text{OH}$, $-\text{OOH}$, NH_2 , NH , NO . Además las moléculas de agua combinadas con tales grupos polares pueden combinarse con más moléculas de agua por enlaces de hidrógeno.

La solubilidad de las proteínas es la resultante de dos fuerzas que se oponen, la atracción de moléculas de solvente por las moléculas de proteínas promueve su mantención en solución, en cambio la tracción de moléculas de proteínas entre sí tiende a evitar su disolución, es decir las proteínas tienden a ser solubles cuando tienen una carga neta (a valores de pH por encima o por debajo de sus puntos isoeléctricos. En cambio si se mezclan macromoléculas cargadas positiva y negativamente, la atracción electrostática hace que tiendan a asociarse unas con otras.

El estudio de los factores que afectan la solubilidad de las proteínas, ha permitido idear gran cantidad de métodos para precipitar estas sustancias de sus soluciones. Estos métodos tienen su principal aplicación en la desproteínización de los diversos fluidos biológicos (sangre, orina, liquido cefaloraquídeo, etc.) en los cuales se hace necesaria su interferencia en la determinación de otras sustancias presentes en estos medios.

Las proteínas son precipitadas de sus soluciones por ciertos ácidos tales como Zn^{+++} , Hg^{++} , Fe^{++} , Cu^{++} y Pb^{++} .

En general se aplica esta precipitación para los precipitantes pacidos a través de la formación catiónica de las moléculas de proteína.

OBJETIVOS

Experiencia n°1:

- Verificar el efecto de diferentes precipitantes de proteínas.

Experiencia n°2:

- Determinar el pI de la caseína

Experiencia n°3:

- Comprobar un micrometodo de determinación de proteínas en bajas concentraciones, (Folin Lowry).

MATERIALES

- **Tubos de ensayo**
- Gradillas
- Pipetas
- **Matraces**
- **Papel filtro**
- **Embudo**
- **Reactivo de Biuret**
- **Acido Tricloroacético**

- Agua destilada
- Sangre total o suero
- Acido sulfurico 2/3
- Tungstato de Na
- Acido acético 0.5 N
- Acido acético 0.1 N
- Caseina 0.5 %
- Papel Ph
- PHmetro
- Reactivo cuproalcalino
- Reactivo de Folin
- Solución de seroalbúmina
- Baño termorregulado
- Acido tartarico 0.02 M

METODOLOGIA

1. Precipitación de las proteínas sanguíneas con diferentes agentes precipitantes:

En este experimento se empleará sangre total o suero. Coloque 2 tubos de ensayo en una gradilla y prepare su experimento de acuerdo al siguiente protocolo:

Tubo	Ac. Tricloroacético	Ac. Túngstico
Ac. TCA	9.0 ml	–
Agua destilada	–	7.0 ml
Sangre total o suero	1.0 ml	1.0 ml
Ac. Sulfúrico 2/3 N	–	1.0 ml
Tungstato de Na 10%	–	1.0 ml

Agitar con la bagueta para obtener una precipitación completa. Luego filtre el sobrenadante usando papel filtro y embudo.

Usando alícuotas de 1.0 ml del filtrado identifique proteínas por la reacción de Biuret. Incluya además una alícuota de suero diluido 1:10.

Anote las D.O. obtenidas y los mg. de proteínas correspondientes a los filtrados 1 y 2 y del suero total (3)

2. Determinación de pI de la caseína:

Prepare 5 tubos de acuerdo al siguiente protocolo:

TUBOS	1	2	3	4	5
Ac. Acético 5N	2ml	–	–	–	–
Ac. Acético 0.1N	–	5	1.5	0.5	–
Agua Destilada	7ml	4	7.5	8.5	9
Caseína 0,5%	1ml	1	1	1	1

Mezcle bien el contenido de los tubos. Determine el pH de cada tubo (utilice papel pH).

Señale a través de la observación de los precipitados más intensos del pI de la caseína.

3. Metodo de Folin Lowry para determinación de proteínas:

Las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin – Ciocalteau para dar un complejo coloreado. El color que se forma se debe a la reacción del cobre con la proteína. La intensidad de color depende del número de aminoácidos aromáticos presentes en especial la tirosina y el triptófano.

REACTIVOS:

- Reactivo cuproalcalino: Solución de NaOH 0.5 N que contiene 10% Carbonato de Na, Tartrato de K al 0.1% y sulfato cúprico al 0.05%
- Reactivo de Folin: (Si viene como solución 2 N se diluye a 1 N).

Se prepara una solución de trabajo: 0.5 ml. Solución 1 N + 4 ml de agua destilada.

- Solución de seroalbúmina: solución stock: 100 pg/ml

Preparación reactivo 1:

Disolver el NaOH en aproximadamente 70 ml de agua destilada.

Agregar el Na₂CO₃ a la solución con NaOH poco a poco con agitación.

Agregar el tartaro de K a la solución. Disolver el CuSO₄ en los 30 ml restantes y agregar esta solución lentamente y con agitación a la solución con NaOH.

Protocolo de trabajo:

Sé mezcla el reactivo 1 con la muestra y el agua destilada y se deja reposar 10 minutos. Luego se agrega el reactivo Folin.

TUBOS	1	2	3
Reactivo 1	1 ml	1 ml	1 ml
Muestra (seroalbúmina)	1 ml	–	0.5 ml
Agua Destilada	–	1 ml	0.5 ml
Reactivo Folin	4 ml	4 ml	4 ml

Agitar rápido y fuerte. Colocar a 55° C por 5 minutos, enfriar rápido y leer la absorbencia a 650 nm.

NOTA: Lectura standard: una solución stock de 200 ug/ml lee a 650 nm 0.452 de D.O. (equivale a 30 ug)

RESULTADOS

1. Precipitación de las proteínas sanguíneas con diferentes agentes precipitantes:

- Considerando el coeficiente de absorción de la albúmina (a), calculada en el laboratorio Proteínas (parte 1) , se utiliza la siguiente formula.

$$a = 0.2246$$

TUBO	1	2	3
D.O.	0.016	0.099	0.024
Mg. Proteína	0.069	0.445	0.105

** se le agregaron 4 ml de reactivo de Biuret

2.Determinación de pI de la caseína:

TUBOS	1	2	3	4	5
PH	4	4	5	9	10

El pI de la caseína se manifiesta claramente en el tubo N° 3, pues según la observación este presenta un mayor precipitado (color blanquesino). Por lo tanto podemos decir que el pI de la caseína es 5.

3.Metodo de Folin Lowry para determinación de proteínas:

TUBOS	1	2	3
Absorbancia a 650 nm	1.203	0.102	0.661

*El tubo número 2 corresponde al blanco del experimento.

1.203 0.661

- 0.102 (Tubo Blanco) - 0.102 (Tubo Blanco)

1.101 0.559

TUBOS	1	3
Absorbancia a 650 nm		
Menos el blanco del experimento	1.101	0.559

Utilizando los datos dados por la lectura standard de una solución stock:

D.O = 452, C = 200 ug/ml, y la formula encontramos el valor de (a).

A= 0.452/200 a= 2.26*10⁻³

CONCLUSIONES

En nuestra tercera experiencia en el laboratorio que corresponde a la segunda parte de proteínas podemos concluir que el método de Folin Lowry es capaz de medir cantidades de proteínas en forma mas precisa, en microgramos. Por ejemplo en un virus, detecta las proteínas con mucho mas exactitud.

Pudimos comprobar también la solubilidad de las proteínas y las fuerzas que actúan en ella. Y darnos cuenta que es efectivo este método para la desproteinación de la sangre (con la que trabajamos (albúmina)).

Y observamos la precipitación de las proteínas con el ácido tricloroacético y el ácido tungstico y con algunos

metales como por ejemplo el cobre que estaba presente en el reactivo de Biuret.

Además determinamos el pH de la caseína con la que trabajamos.

BIBLIOGRAFÍA

- Guía de laboratorio N°3 , Proteínas (parte 2)
- *Bioquímica*, segunda edición

Christopher K. mathews y K.E. Van Holde .1996, España.

$$\mathbf{D.O = a * c}$$

$$\mathbf{D.O = a * c}$$