



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

PRÁCTICA 2

Introducción a la espectrofotometría de absorción. Determinación de proteínas en suero

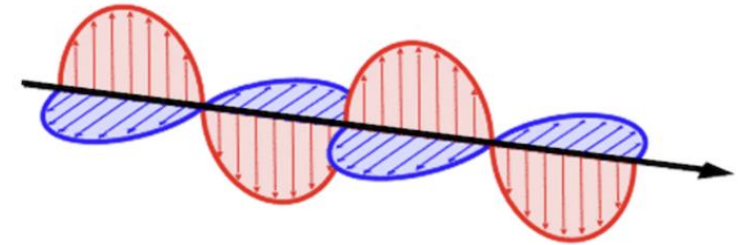
Bioquímica y Biología Molecular I
Grado en Medicina



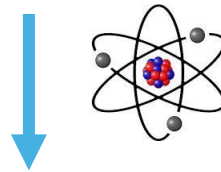
INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROFOTOMETRÍA

Introducción

LUZ → formada por → Ondas electromagnéticas

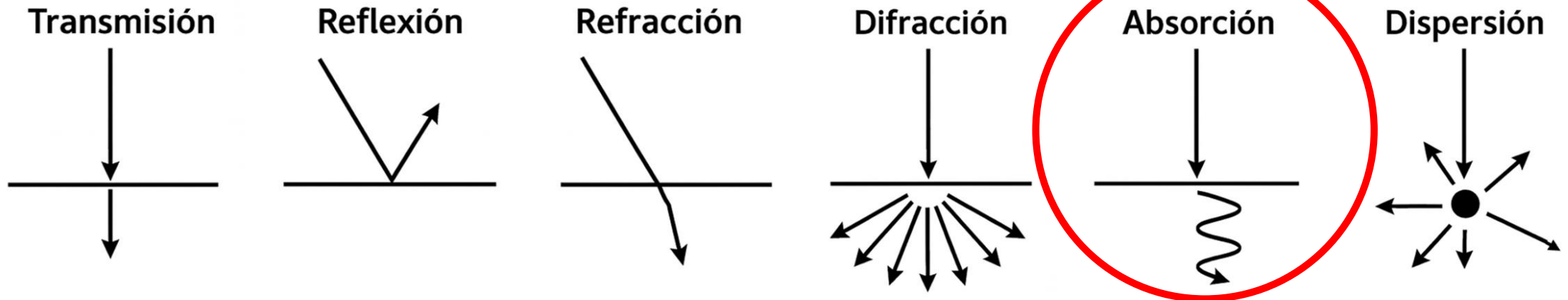


FOTOMETRÍA:
medida de la luz



Comportamientos de la luz

Espectrofotometría



INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROFOTOMETRÍA

El color de los cuerpos

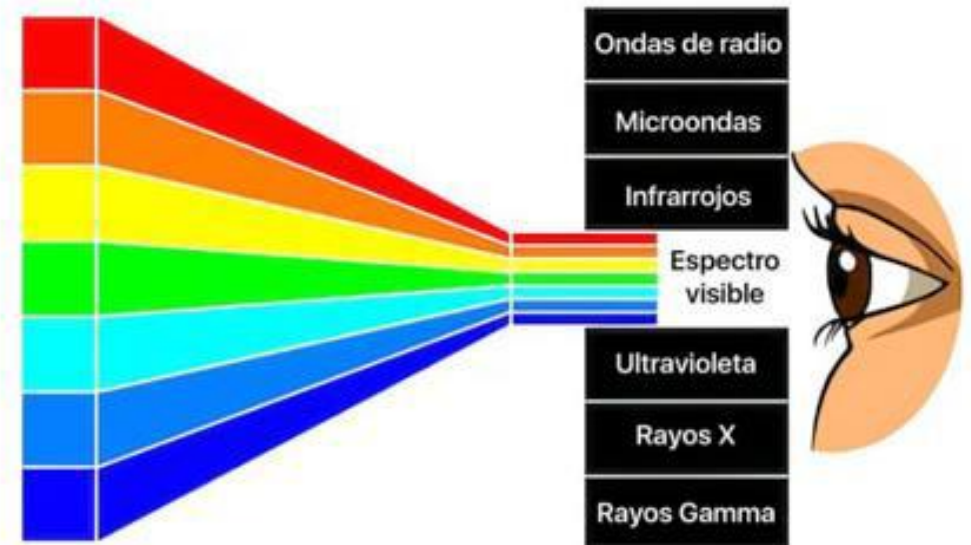
Color de una sustancia

- Las radiaciones que refleja un cuerpo a una determinada λ a cuando incide sobre él la radiación lumínica, es lo que el ojo humano percibe como color.
- Depende de las longitudes de onda que refleja, NO de las que absorbe.

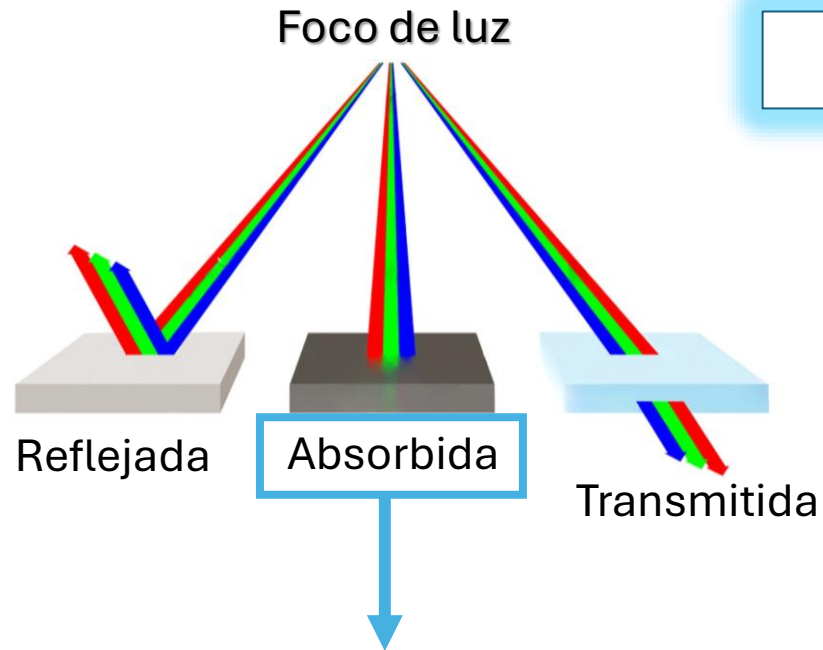
Longitud de onda	Color	Color complementario
400-450 nm	Violeta	Amarillo verdoso
450-500 nm	Azul	Amarillo
500-580 nm	Verde	Rojo
580-595 nm	Amarillo	Azul
595-610 nm	Naranja	Azul verdoso
610-750 nm	Rojo	Verde

Ojo humano

- Solo percibe radiaciones del espectro visible (400-700nm).



INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROFOTOMETRÍA



Fotocolorimetría

Técnica analítica que se utiliza para determinar la concentración de una sustancia en una disolución a partir de la cantidad de luz que absorbe.

Fundamento

Si el rayo incide perpendicularmente $i_r=0$

$$I_0 = I_t + I_a$$

Transmisión (T): cantidad de luz que es recogida tras atravesar la solución

$$T = I_t/I_0$$

Opacidad (O): inverso de la transmisión

$$O = 1/T$$

Absorbancia (A): logaritmo de la opacidad

$$A = \log 1/T$$

INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROFOTOMETRÍA

Fundamento

Cuando $I_0 = I_t$



Transmitancia = 100%



La muestra no absorbe a esa λ

Si el rayo incide perpendicularmente $I_r = 0$

$$I_0 = I_t + I_a$$

Transmisión (T): cantidad de luz que es recogida tras atravesar la solución

$$T = I_t / I_0$$

Opacidad (O): inverso de la transmisión

$$O = 1/T$$

Absorbancia (A): logaritmo de la opacidad

$$A = \log 1/T$$

INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROFOTOMETRÍA

Ley de Lambert-Beer

La absorción de luz depende de la concentración, de la distancia que tiene que atravesar la luz y de la naturaleza de la sustancia

$$T = 10^{-E \cdot x \cdot c}$$

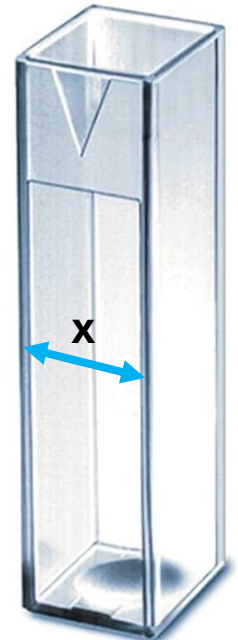
E: coeficiente de extinción molar
x: distancia que atraviesa la luz
c: concentración de la sustancia

$$A = \log 1/T$$

$$A = \log 1/10^{-E \cdot x \cdot c}$$

$$A = E \cdot x \cdot c$$

Ecuación de Lambert-Beer



INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROFOTOMETRÍA

Fotometría frente a un patrón o estándar

Para hacer un análisis fotométrico hay que comparar la solución problema con otra de concentración conocida

$$A_{\text{patrón}} (A_p) = E \cdot x \cdot C_p$$

$$A_{\text{muestra a analizar}} (A_m) = E \cdot x \cdot C_m$$

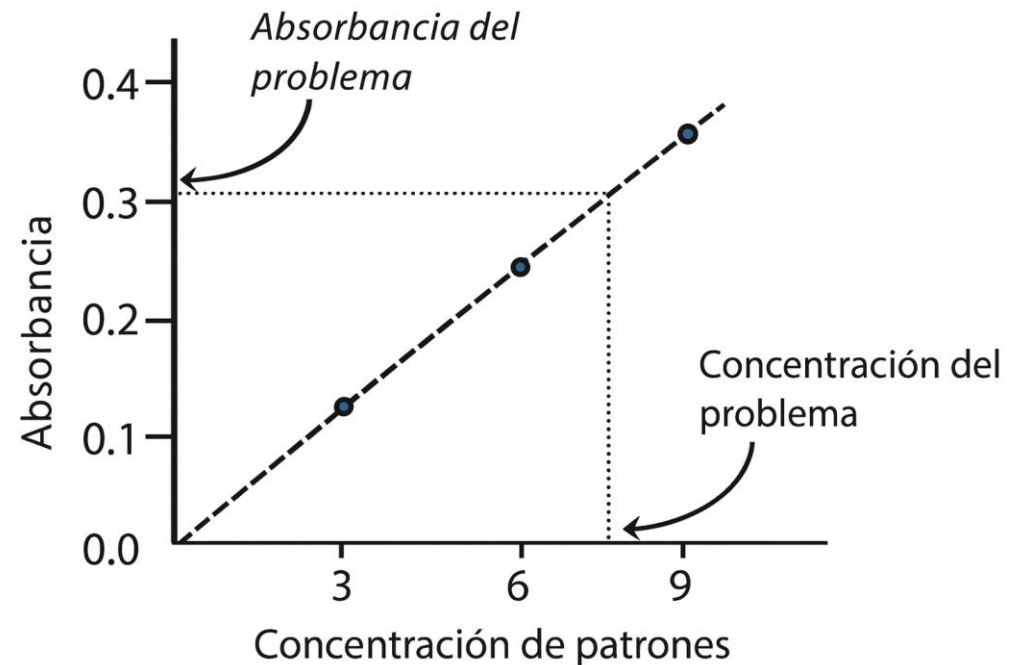
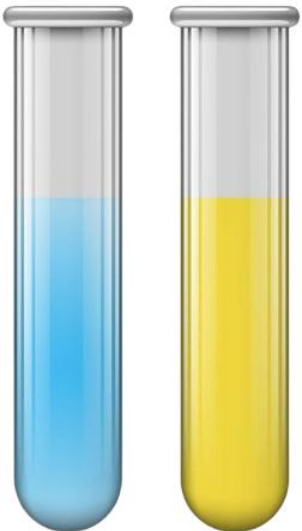
Como E y x son = en ambos:

$$\frac{A_p}{A_m} = \frac{C_p}{C_m}$$

despejando

$$C_m = \frac{C_p \cdot A_m}{A_p}$$

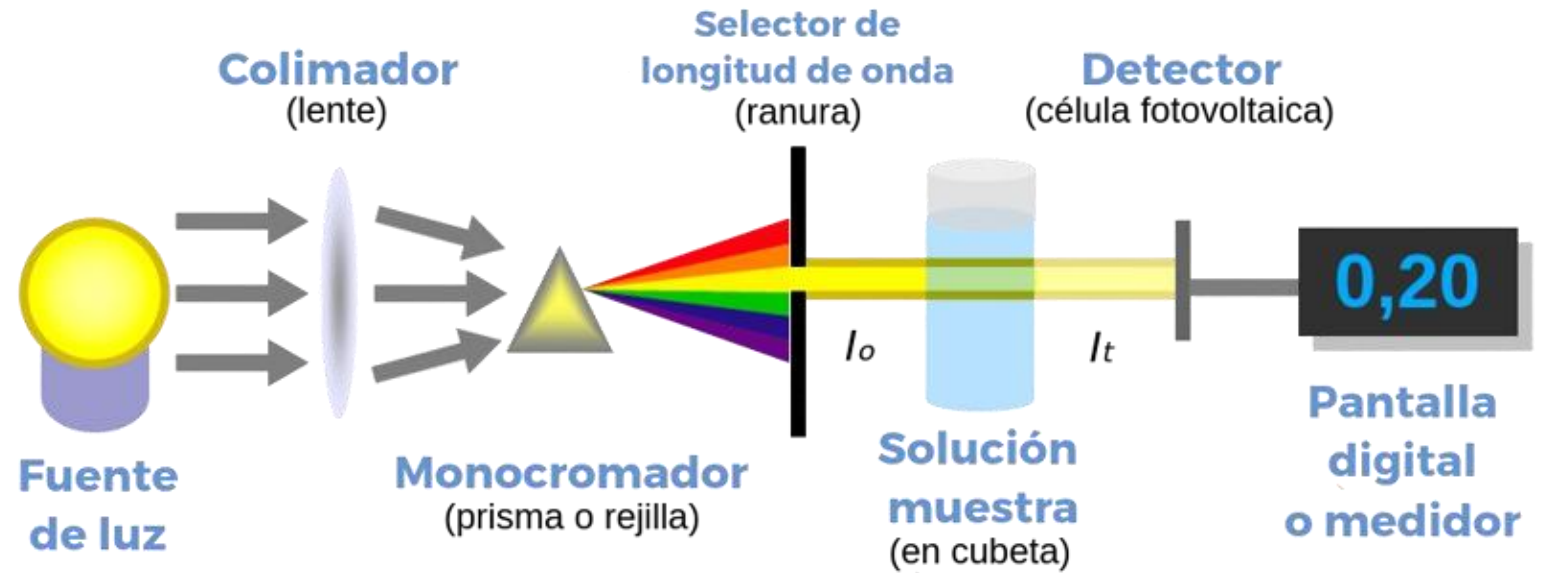
Patrón Muestra



La lectura de la muestra problema se hará interpolando sobre la recta patrón.

INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROFOTOMETRÍA

Espectrofotómetro



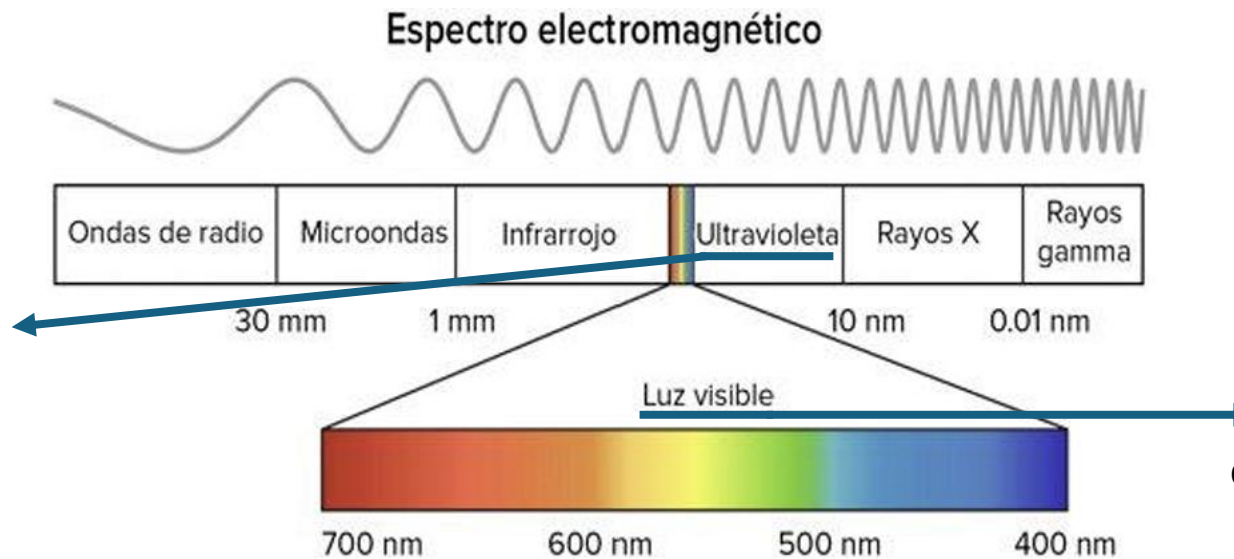
DETERMINACIÓN DE PROTEINAS EN SUERO MEDIANTE LA REACCIÓN DE BIURET

Fundamento

En espectrofotometría de absorbancia se emplean dos regiones del espectro:

Ultravioleta (195–400 nm)

Algunos aminoácidos absorben luz en esta zona, por lo que todas las proteínas pueden detectarse según su contenido en estos aminoácidos.



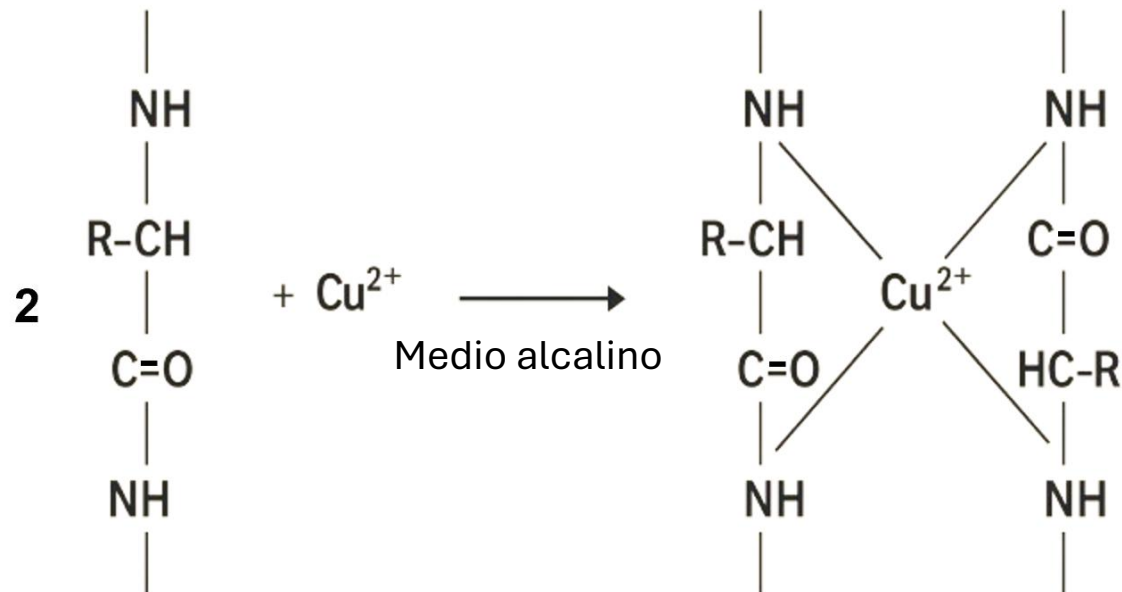
Visible (400–780 nm)

Las proteínas pueden reaccionar con colorantes, generando productos coloreados cuya intensidad se mide por su absorbancia, permitiendo su cuantificación.

DETERMINACIÓN DE PROTEINAS EN SUERO MEDIANTE LA REACCIÓN DE BIURET

Fundamento

Solución proteica + Sulfato de cobre \longrightarrow Complejo cúprico (violeta)



+ Intensidad color \longrightarrow + [Proteínas]
REACCIÓN COLORIMÉTRICA

Resultado cualitativo:

- **Violeta:** presencia de proteínas
- **Azul claro:** ausencia de proteínas

DETERMINACIÓN DE PROTEINAS EN SUERO MEDIANTE LA REACCIÓN DE BIURET

Fundamento



- **Sulfato de cobre (II) (6mM):** aporta los iones Cu^{2+} que reaccionan con los enlaces peptídicos
- **Hidróxido de sodio (0.1M):** proporciona el medio alcalino necesario para la reacción
- **Tartrato de sodio y potasio (16mM):** estabiliza la solución y evitar la precipitación del cobre
- **Ioduro de potasio (16mM):** evita la oxidación del cobre (II) a cobre (I) o a óxidos insolubles

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN SUERO MEDIANTE LA REACCIÓN DE BIURET

Usos y diagnóstico



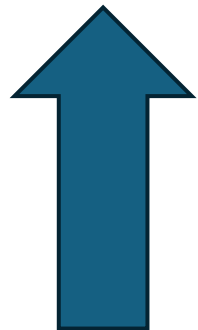
Aplicaciones:

Permite cuantificar proteínas totales en suero, plasma u otras muestras



Importancia clínica:

La concentración de proteínas puede aumentar o disminuir según la patología



- Mieloma múltiple
- Lupus eritematoso sistémico
- Endocarditis bacteriana
- Meningitis bacteriana
- Macroglobulinemia de Waldenström



- Insuficiencia renal
- Desnutrición severa
- Infecciones crónicas



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

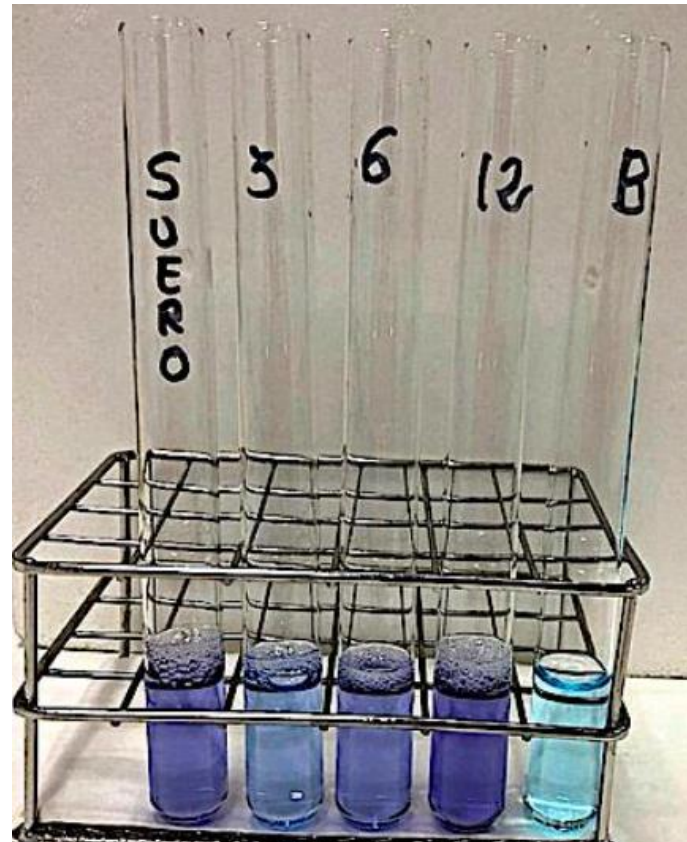
PROTOCOLO DE LA PRÁCTICA



DETERMINACIÓN DE PROTEINAS EN SUERO MEDIANTE LA REACCIÓN DE BIURET

Protocolo

1. Rotular los tubos de ensayo



DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN SUERO MEDIANTE LA REACCIÓN DE BIURET

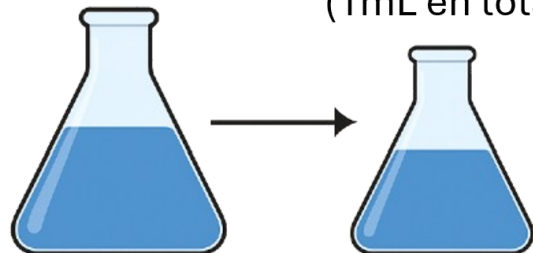
Protocolo

2. Realizar los cálculos y preparar las disoluciones

A partir de una solución madre de albúmina bovina de 12 g/100ml se preparan:

a) Solución patrón 6g/100ml

Solución madre de albúmina bovina 12g/100mL
Solución patrón 6g/100mL (1mL en total)

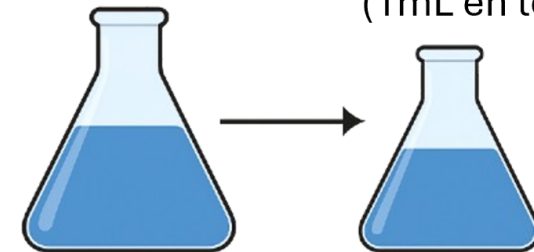


$$12 \times V_i = 6 \times 1 \longrightarrow V_f = 0,5\text{mL}$$

Hay que coger 0,5 mL de la solución madre y 0,5 mL de agua destilada

b) Solución patrón 3g/100ml

Solución madre de albúmina bovina 12g/100mL
Solución patrón 3g/100mL (1mL en total)



$$12 \times V_i = 3 \times 1 \longrightarrow V_f = 0,25\text{mL}$$

Hay que coger 0,25 mL de la solución madre y 0,75 mL de agua destilada

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

DETERMINACIÓN DE PROTEINAS EN SUERO MEDIANTE LA REACCIÓN DE BIURET

Protocolo

3. Depositar en cada uno estas cantidades de reactivo:

	Blanco	Problema	Patrón
H₂O	0.1 ml (100 µl)	--	--
Patrones (3, 6, 9 y 12 g/100ml)	--	--	0.1 ml (100 µl)
Suero o muestra	--	0.1 ml (100 µl)	--
Reactivo Biuret	5 ml	5 ml	5 ml

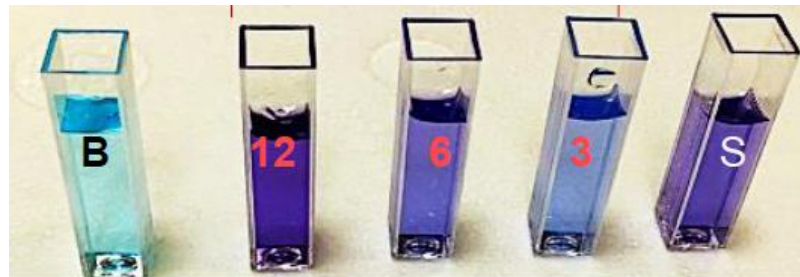
DETERMINACIÓN DE PROTEINAS EN SUERO MEDIANTE LA REACCIÓN DE BIURET

Protocolo

4. Mezclar y dejar reposar 20min a temperatura ambiente



5. Pasar el contenido de los tubos a las cubetas de medida



6. Medir las absorbancias en el espectrofotómetro a $\lambda=560\text{nm}$



DETERMINACIÓN DE PROTEINAS EN SUERO MEDIANTE LA REACCIÓN DE BIURET

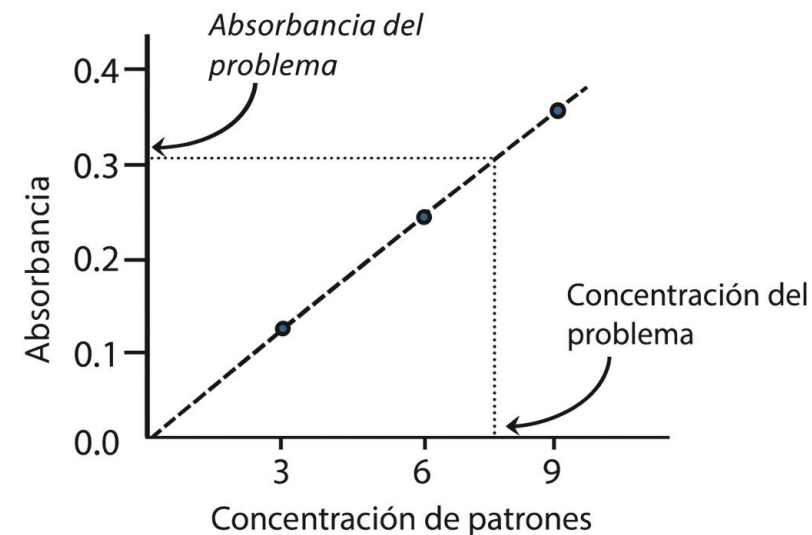
Protocolo

7. Anotar el resultado en una tabla

CONCENTRACIÓN PATRÓN	ABSORBANCIA
Blanco	0
3	0,2
6	0,4
12	1
Suero	0,8

8. Realizar los cálculos

- Se construye la recta patrón
- Se extrapolan los datos de la muestra



DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN SUERO MEDIANTE LA REACCIÓN DE BIURET

Valores normales

Las cifras normales de proteínas totales van aumentando gradualmente:

- **Recién nacidos:** 4.6-7.0 g/100ml
- **Adultos:** 6-8 g/100ml.



**Thank
You**



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TEST





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TEST

Práctica 2:
Introducción a la espectrofotometría de absorción.
Determinación de proteínas en suero

1. ¿Sería posible determinar la concentración de proteínas de un suero mediante la técnica de Biuret sin utilizar muestras de concentración conocidas (patrones)?

- a) No, en cualquier determinación cuantitativa mediante espectrometría es necesario el uso de patrones.
- b) Sí, el uso de esos patrones sólo sirve para entender el fundamento de absorbancia.
- c) Sí, basta con medir la absorbancia total de la muestra.
- d) Sí, solo es necesario incluir un "blanco" para conocer la absorbancia sin proteínas.
- e) Sí, porque el espectrofotómetro calcula automáticamente la concentración a partir del color observado.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TEST

Práctica 2:
Introducción a la espectrofotometría de absorción.
Determinación de proteínas en suero

2. ¿Cuál de las siguientes respuestas es FALSA?

- a) Los valores normales de proteínas en suero de un recién nacido se encuentran en el rango de 4,6–7 g/100 mL.
- b) El reactivo de Biuret contiene CuSO_4 en solución acuosa alcalina.
- c) Los valores normales de proteínas en suero de un adulto se encuentran en el rango de 8–12 g/100 mL.
- d) La determinación de proteínas por la técnica de Biuret es específica y cuantitativa.
- e) En el método de Biuret, la intensidad del color violeta aumenta con la concentración de proteínas.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TEST

Práctica 2:
Introducción a la espectrofotometría de absorción.
Determinación de proteínas en suero

3. Elige la respuesta que NO es correcta: La ley de Lambert–Beer...

- a) Relaciona la intensidad de luz entrante en un medio con la saliente y la absorbancia.
- b) Explica la relación entre la absorción de luz por una sustancia en solución y la concentración de esta y la longitud del cuerpo que la luz atraviesa.
- c) Se aplica a la espectrofotometría para cambiar el color de una sustancia.
- d) Tiende a no ser válida para concentraciones muy elevadas, especialmente si el material dispersa mucho la luz.
- e) Permite cuantificar la concentración de una sustancia a partir de su absorbancia medida experimentalmente.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TEST

Práctica 2:
Introducción a la espectrofotometría de absorción.
Determinación de proteínas en suero

4. Si al añadir reactivo de Biuret a una solución la mezcla se torna violeta oscuro podemos afirmar que:

- a) En la solución existen proteínas.
- b) En la solución no existen proteínas.
- c) En la solución puede o no puede haber proteínas.
- d) En la solución existen sólo aminoácidos.
- e) El color violeta se debe a la presencia de iones cloruro.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TEST

Práctica 2:

Introducción a la espectrofotometría de absorción.
Determinación de proteínas en suero

5. En la ley de Lambert–Beer, la “x” representa:

- a) La longitud de onda.
- b) La masa molar.
- c) La energía absorbida.
- d) La concentración de la sustancia.
- e) El espesor de la cubeta.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TEST

Práctica 2:
Introducción a la espectrofotometría de absorción.
Determinación de proteínas en suero

6. El color violeta en la reacción de Biuret se debe a:

- a) La oxidación del cobre.
- b) La formación de un complejo entre Cu^{2+} y los grupos peptídicos.
- c) La presencia de aminoácidos aromáticos.
- d) La alcalinidad del medio.
- e) La reducción del Cu^{2+} a Cu^+ .



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TEST

Práctica 2:
Introducción a la espectrofotometría de absorción.
Determinación de proteínas en suero

7. En el método del Biuret, el complejo cúprico formado absorbe luz principalmente en:

- a) La región ultravioleta (200–300 nm).
- b) La región roja (700–800 nm).
- c) El infrarrojo cercano.
- d) La región azul del espectro visible (alrededor de 560 nm).
- e) Todas las longitudes de onda por igual.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TEST

Práctica 2:
Introducción a la espectrofotometría de absorción.
Determinación de proteínas en suero

8. Si se utiliza una cubeta con paso óptico doble (2 cm en lugar de 1 cm), la

absorbancia:

- a) No cambia.
- b) Se duplica .
- c) Se reduce a la mitad.
- d) Depende del color del complejo.
- e) Disminuye exponencialmente.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TEST

Práctica 2:
Introducción a la espectrofotometría de absorción.
Determinación de proteínas en suero

9. ¿Por qué la reacción de Biuret no detecta aminoácidos libres?

- a) Porque no contienen enlaces peptídicos.
- b) Porque no poseen grupos carboxilo.
- c) Porque no absorben en el visible.
- d) Porque precipitan en medio alcalino.
- e) Porque son incoloros.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TEST

Práctica 2:
Introducción a la espectrofotometría de absorción.
Determinación de proteínas en suero

10. Un paciente con valores de proteínas séricas totales de 9,5 g/100 mL

probablemente presenta:

- a) Desnutrición.
- b) Hipoalbuminemia.
- c) Hiperproteïnemia asociada a deshidratación o mieloma múltiple.
- d) Hipoproteïnemia por malabsorción.
- e) Error de dilución.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

PRÁCTICA 2

Introducción a la espectrofotometría de absorción. Determinación de proteínas en suero

Bioquímica y Biología Molecular I
Grado en Medicina

