

## **Anexo 2. Método de Biuret<sup>1</sup>**

### **Materiales:**

- Espectrofotómetro a 550nm
- Celdas para espectrofotómetro
- Pipetas de 1ml y 5ml
- Propipeta
- Gradilla
- 6 tubos de ensayo
- Vasos de precipitados
- Solución estándar de proteína
- Reactivo de Biuret

### **Preparación del Reactivo de Biuret:**

Disolver 1.9g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 3.35g de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  en 350 ml de agua destilada. Agregar lentamente y con agitación 100ml de solución de  $\text{NaOH}$  5M. Aforar a 500ml con agua destilada.

### **PROCEDIMIENTO**

#### **Curva de Calibración:**

Se obtiene la curva de calibración midiendo la absorbancia de una serie de soluciones de concentraciones conocidas de una misma sustancia tratadas con un mismo método y medidas a igual longitud de onda en el mismo instrumento. Para medir la concentración de una sustancia se elige por lo general, la región de máxima absorción del espectro, denominada longitud de onda analítica.

El resultado se expresa en una gráfica de la absorbancia (**A**) en función de la concentración (**c**). Si el sistema sigue la ley de Lambert-Beer se obtiene una línea recta que pasa cerca del origen; de cuya pendiente se puede obtener el coeficiente de extinción E.

---

<sup>1</sup> Bohinski (1991), Finlayson (1969)

Es posible determinar gráficamente la concentración de una muestra desconocida ( $c_x$ ) midiendo la absorbancia de la muestra ( $A_x$ ) e interpolando en la curva de calibración.

Normalmente la concentración se estima a partir de la ecuación de la curva de calibración:

$$A = mc + b$$

Donde  $A$  es la absorbancia,  $c$  es la concentración y  $b$  es la ordenada al origen. El coeficiente de concentración se puede calcular con la pendiente de la recta.

### Solución estándar de albúmina:

Preparar una solución madre de albúmina con una concentración de 1mg/mL de la siguiente forma:

Disolver 100 mg de albúmina y aforar a 100 mL.

### Análisis

1. Preparar los tubos enumerándolos como se muestra en la tabla.
2. Agregar el volumen indicado de la solución de albúmina (estándar S).
3. Agregar el volumen indicado de agua a cada tubo.
4. Agregar 4mL del reactivo Biuret a cada tubo.
5. Mezclar e incubar los tubos por 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Leer la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm en el espectrofotómetro.

**Nota:** para los tubos de las muestras de leche se deben de centrifugar a 600 RPM durante 15 min, con ello se trata de evitar interferencias de grasas y azúcares; posteriormente se toma la cantidad indicada de la muestra y se filtra la solución.

TUBO	albúmina (mL)		H <sub>2</sub> O (mL)	Reactivo . Biuret (mL)	Absorbancia	Concentración %
	2.5%	Muestra Problema				
1 B	0,0	---	1,0	4,0		
2 S	1,0	---	0,0	4,0		
3 S	0,8	---	0,2	4,0		
4 S	0,6	---	0,4	4,0		
5 S	0,4	---	0,6	4,0		
6 MP	---	<b>1,0</b>	0,0	4,0		

## RESULTADOS

De acuerdo a los datos:

- Calcular la concentración de la albúmina para cada uno de los tubos.
- Completar la **Tabla** con los valores de absorbancia y concentración.
- Construir una gráfica absorbancia versus concentración, trace la recta obtenida por regresión.
- Obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de regresión.
- Calcular la concentración de la muestra problema en las cubetas mediante la ecuación de la recta.
- Calcular la concentración en la muestra original aplicando el factor de dilución.