

## EXPERIMENTO 6

### ESPECTRO DE ABSORCION DEL CITOCROMO-C OXIDADO Y REDUCIDO Y DETERMINACION CUANTITATIVA DE GLUCOSA

#### REQUISITOS

Revisar los conceptos de espectrofotometría y fotocolorimetría.

#### OBJETIVOS

Extraer y purificar parcialmente el citocromo-c, para comprobar su actividad por métodos colorimétricos ilustrando una reacción enzimática que usa ATP y su inhibición por iones

### 1. FUNDAMENTOS

Muchos métodos de análisis cuantitativo de materiales biológicos se basan en la separación de la sustancia en cuestión (presente en tales materiales) y su conversión química a una molécula capaz de absorber energía radiante. Si el producto en solución absorbe luz en la región visible del espectro, la solución será coloreada. La intensidad del color se usa como una medida de la concentración del producto disuelto y permite calcular la concentración de sustancia presente en el material biológico original. Por lo tanto revisaremos brevemente los principios involucrados para realizar estos tipos de análisis.

#### 1.1. Aspectos teóricos

Un procedimiento colorimétrico se basa en la comparación de una solución coloreada (representando una concentración desconocida de la sustancia bajo análisis) con un color patrón (que representa la sustancia de concentración conocida). La sustancia debe ser coloreada o ser capaz de dar reacciones que permitan la producción de color. Además, la intensidad del color debe depender de su concentración, de otra manera no tiene utilidad para propósitos colorimétricos. Un procedimiento fotométrico se basa en la medida directa de la intensidad del color en términos de absorción de luz de la solución a una  $\lambda$  específica del espectro. A diferencia de los procedimientos colorimétricos los cuales

están limitados a la porción visible del espectro, los principios generales de fotometría se aplican tanto a la absorción de energía radiante en las regiones ultravioleta e infrarrojo del espectro como a la absorción de luz en la región visible.

**1.1.1 Colorimetría:** Un procedimiento colorimétrico involucra tres operaciones fundamentales: 1. Preparación de la solución coloreada del compuesto desconocido.

2. Obtención de un patrón coloreado apropiado. 3. Comparación de los colores de 1 y 2.

Esta comparación de colores se hace utilizando colorímetros (instrumentos que facilitan tal comparación). Esta comparación puede hacerse de varias maneras: 1. Por comparación con una serie de patrones, 2. Por dilución al color exacto, 3. Por variación de la profundidad de la solución a través de la cual pasa la luz.

**1.1.2 Fotometría:** Consiste en la medida del poder transmisor de luz de una solución para determinar la concentración de material absorbente de luz presente en dicha solución. La proporción de luz incidente absorbida por la solución es función de la concentración de tal sustancia. La capacidad de una solución para transmitir la luz es su transmitancia (T) la cual se define como la relación de la intensidad  $I_2$  de la luz emergente de la celda (que contiene la solución X) a la intensidad  $I_1$  de la luz incidente (que entra a la solución).

$$T = I_2/I_1$$

En fotometría no es práctico ni necesario medir  $I_1$  o definir T de esta manera. En un procedimiento fotométrico hay siempre una cierta proporción de pérdida inespecífica de luz durante su paso a través de la solución, debido a reflexión en las paredes de la celda, dispersión y absorción por el solvente, reactivos, etc. En consecuencia, se debe tomar en cuenta la reducción de la intensidad de la luz debido a factores diversos así como también la debida absorción por la sustancia cuya concentración se desea determinar. Esto se logra determinando la transmitancia relativa, en la cual la transmitancia de la solución conteniendo material absorbente de luz (T soln), y la transmitancia de la solución de referencia sin el material absorbente en cuestión (T solv) se comparan en iguales condiciones de  $\lambda$  intensidad de luz incidentes y profundidad de la solución a ser atravesada por la luz.

$$T = T_{\text{soln}} / T_{\text{solv}} \text{ ó } T_c = I_e / I_r$$

$I_e$  = Intensidad de luz que sale de la solución que contiene el absorbente.

$I_r$  = Intensidad de la luz que sale de la solución de referencia. La solución de referencia se define como aquella que contiene todos los materiales de la solución problema pero sin la sustancia absorbente que se va a estudiar.

$T_{\text{soln}}$  depende de: a. La naturaleza de la sustancia, b.  $\lambda$  de la luz incidente, c. La cantidad de material absorbente. De esta manera ni la intensidad  $I_1$ , ni la pérdida inespecífica de luz, necesita ser determinada y los reactivos que absorben luz, tampoco interfieren en el análisis. El cambio de transmitancia debido a la presencia de la sustancia absorbente de luz está determinado solamente por el incremento en absorción de luz sobre un nivel que se toma arbitrariamente como cero. Absorción cero es aquella del solvente o del blanco de reactivos medidos en condiciones iguales a la muestra problema. En algunas determinaciones fotométricas se ajusta el espectrofotómetro a cero absorbancia con el solvente, y se lee la absorción de luz al blanco de reactivos. Una manera de expresar  $T$  es en términos de su logaritmo negativo ( $-\log T$ ) conocido como densidad óptica (DO) o como absorbancia (A) de la solución.

DO =  $-\log T = \log 1/T$  Como  $T$  es una medida relativa, tiene un valor inferior a 1, en presencia de sustancia absorbente de luz. El valor se puede expresar en  $T$  por 100 si  $I_r$  se considera 100%.

$$100$$

Así: 
$$DO = \log \frac{100}{T\%} = 2 - \log T$$

**1.1.3. Ley de Lambert-Beer:** La Ley de Lambert-Beer que rige estas relaciones establece que la absorción de la luz es proporcional al número de moléculas de sustancia absorbente en la solución por donde pasa el haz luminoso; por lo tanto, la absorción varía con la longitud del trayecto de la luz en la solución y con la concentración del absorbente, en una forma característica para cada sustancia absorbente y para una  $\lambda$  dada.  $T = 10^{-E\epsilon c}$  donde  $T$  es la transmitancia relativa,  $E$  es una constante característica de la sustancia, (el coeficiente de extinción)  $l$  es la profundidad (longitud) de la solución a través de la cual pasa la luz y  $c$  es la concentración de material absorbente de luz.

La ecuación exponencial por las características particulares de la absorción de luz se puede convertir a la forma común logarítmica:

$$\log T = -E \times l \times c, \quad \log 1/T = -\log T = E \times l \times c, \quad \log 1/T = \text{absorbancia} = E \times l \times c$$

Donde absorbancia (A) es el logaritmo negativo de T; E está expresado como su log de base 10 para una cierta  $\lambda$  y l y c es la concentración de la sustancia absorbente en moles por litro. Si la transmitancia se mide a  $\lambda$  y l fijas, la única variable es c. En estas condiciones la ley de Lambert-Beer se expresa:  $Abs = K' \times c$ , donde K' combina los factores constantes. Si un factor está controlado por una variable solamente, entonces el cambio en el factor graficado versus el cambio en la variable dará una línea recta .

La pendiente de la recta es igual a E (K') y el valor de la ordenada para  $c = 0$  se considera cero. En general  $L = 1$  cm en cubetas calibradas del espectrofotómetro y es fácil establecer el valor de E. Si el % de transmitancia se gráfica (en el eje logarítmico de papel semilogarítmico) vs concentración, se obtiene una línea recta con pendiente negativa, lo cual indica que la transmitancia es menor a medida que aumenta la concentración lo cual es acorde con el concepto de que la absorción de luz aumenta con el incremento de la sustancia o material absorbente de luz en la solución problema. En general hay 4 pasos a realizar en un análisis fotométrico: a. Separación de la sustancia a ser determinada, b. Conversión cuantitativa a un producto coloreado o absorbente de luz, c. Medida de la absorbancia de luz, d. Cálculo de la concentración de la sustancia en la muestra original.

Estos pasos (a-c) toman en cuenta las relaciones entre absorción de luz,  $\lambda$  y concentración. Si uno simultáneamente con el desconocido, analiza una solución de la sustancia de concentración conocida (patrón) y se miden sus densidades ópticas, la concentración del desconocido está dada por:  $C_x = A_x / A_{st} \times C_{st}$ , donde  $C_x$  y  $A_x$  corresponden a concentración y absorbancia del desconocido, y  $C_{st}$  y  $A_{st}$  son concentración de una solución patrón dada. Utilizando solución patrón de concentración creciente y midiendo su absorbancia, se obtiene, una curva de calibración (siempre tratando st y desconocido de igual manera en cuanto a  $\lambda$ , l, etc). El espectro de absorción de una sustancia depende de sus propiedades químicas y físicas. Se puede establecer las  $\lambda$  de absorción máx. y min., y ese espectro es característico de la sustancia en cuestión, en las condiciones bajo las cuales se hizo el experimento. Si estas condiciones cambian por modificación del pH, del estado de óxido-reducción, propiedades de absorción de las propias cubetas o el solvente utilizado, etc, el espectro puede ser distinto. Estos espectros de diferencia (ox-red) son de interés para interpretar las propiedades del absorbente. Los

iones, colorantes y sustancias orgánicas tienen espectros de absorción característicos, que pueden desviarse en función de las condiciones empleadas en el estudio. También es importante establecer el E para determinar  $\lambda$  máx.; esta constante puede constituir un medio de identificación o una medida de concentración de la sustancia absorbente. Por ej. las soluciones de  $\text{NAD}^+$  son incoloras a simple vista. Cuando este compuesto pasa al estado reducido ( $\text{NADH}$ ), se puede usar su absorbancia a 340 nm como índice de la actividad de la enzima deshidrogenasa que utiliza el  $\text{NAD}^+$  como coenzima.

**1.1.4 Fotómetros:** Son aparatos utilizados para medir la intensidad de la luz absorbida por la sustancia a ser estudiada. En general consta de: a. 1 ó 2 células fotoeléctricas, b. Un set de filtros capaces de transmitir luz solamente en una porción limitada del espectro (por ej. Filtros verde, rojo, azul), c. Fuente de luz, d. Sitio para colocar tubo conteniendo el material absorbente de luz, e. Escala de lectura.

Un ejemplo de fotómetro de filtros es el Klett-Summerson. El aparato se ajusta a cero con la solución referencia (solvente) por ej. o blanco re reactivos); este tubo se remueve y se reemplaza por la solución a examinar. La lectura sobre la escala (obtenida moviendo un botón hasta que el galvanómetro lea cero) es la medida de la absorción de luz por la solución problema. Esta se compara con las lecturas obtenidas para soluciones patrón (como lo explica anteriormente). La escala sobre el instrumento no es usual. Está graduada en unidades proporcionales a D.O., los números representan  $\text{DO.}/2$  y con el punto decimal omitido. Así una lectura de 250 en el Klett, corresponde a una DO. de 0.500.

**1.1.5 Espectrofotómetros:** Son instrumentos usados para medir la cantidad de luz de una  $\lambda$  dada, que es transmitida por una muestra problema en solución. En lugar de filtros se usan prisma y un selector de  $\lambda$ . **a. Fuente de luz** (blanca, u.v), **b. Lente** que transmite luz recibida en un rayo en ángulo recto, **c. Monocromador** o prisma para separar el rayo luz en sus componentes, **d. Seleccionador** de la  $\lambda$  deseada, **e. Compartimiento para colocar el tubo** o cubeta que contiene la muestra, **f. Detector fotoeléctrico**, **g. Escala de lectura.**

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Equipos materiales y reactivos**

Reactivos para determinar glucosa por el método de Somogyi-Nelson.

Sangre

Sulfato de cobre al 7%

Tungstato de sodio al 10%.

Oxalato de Na 0,1M.

Sulfato de Zn

Ferrocianuro de potasio 0.01M

Buffer fosfato 0,2M de pH 7.4

Citocromo c  $1.5 \times 10^{-4}$  M

Filtros

Centrífuga

Tubos

Espectrofotómetro

### **2.2 Procedimiento:**

#### **2.2.1. Espectro de absorción del citocromo c.**

Se estudiarán los cambios del espectro de absorción del citocromo c, hemoproteína con funciones de pigmento respiratorio, como consecuencia del estado de óxido-reducción de esta molécula. El citocromo c durante su funcionamiento recibe electrones de una molécula donadora y se reduce; luego vuelve a oxidarse por acción de otro componente respiratorio, al que cede sus electrones. En la práctica seguiremos el proceso de óxido-reducción empleando el espectrofotómetro. Se establecerán los espectros de absorción del citocromo c en su forma oxidada y reducción, así como los picos de absorción máxima.

Se ajusta el instrumento a  $A = 0$  con el blanco para  $\lambda$  380 nm, se mide y se anota la absorbancia del tubo conteniendo citocromo c (2,3 ml. H<sub>2</sub>O 0,1 ml. K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 0,01M, 0,5 ml. de amortiguador fosfato 0,2M de pH 7.4 y 0.1 ml. de citocromo c  $1,5 \times 10^{-4}$  M), se repite la maniobra a intervalos de 10 nm, volviendo a establecer el cero del instrumento para cada  $\lambda$ , con el tubo que contiene el blanco de

reactivos. Se construye el espectro de absorción entre 380-630 nm. En el papel milimetrado se construye la gráfica  $\lambda$ , expresada en nm en las abcisas, y la absorbancia del tubo con citocromo c oxidado en las ordenadas. Se traza una curva continua que pasa por los puntos experimentales. Este es el espectro de absorción de la variedad oxidada del citocromo c.

Construya un espectro de citocromo c reducido. Añada al blanco y al tubo con el citocromo c, cristales de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , mezclando cuidadosamente; se hacen lecturas a 550 nm hasta absorción constante. Esto tiene por objeto evitar exceso de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$ , que absorbe luz por debajo de 390 nm. Una vez hecho esto, proceda a leer desde 380-630 nm para obtener el espectro reducido. Con sus resultados construya las gráficas correspondientes al espectro oxidado y reducido del citocromo-C-. Discuta sus resultados.

### **2.2.2. Determinación de azúcar reductor (glucosa sanguínea) por el método de Somogyi-Nelson.**

Construcción de una grafica de calibración: Base del método: La sangre es desproteinizada con  $\text{Ba}(\text{OH})_2\text{-ZnSO}_4$  el filtrado así obtenido prácticamente no contiene otros azúcares reductores distintos de glucosa; este filtrado se calienta con un reactivo cúprico-alkalino formándose un precipitado insoluble de óxido cuproso. Se añade reactivo arseno-molibdico con lo cual se desarrolla un color cuya intensidad es proporcional a la cantidad de óxido cuproso precipitado y por consiguiente a la concentración de glucosa en el filtrado. El factor limitante de la reacción es la glucosa, y los reactivos están en exceso. El color desarrollado se compara con aquel obtenido en cada uno de una serie de soluciones conteniendo cantidades conocidas de glucosa (curva patrón).

**2.2.2.1 Solución de hidróxido de bario.** Disuelva 90 g de  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  en agua destilada y diluya a 2 L. Filtre.

**2.2.2.2. Solución de sulfato de zinc.** Disuelva 100 g. de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en agua destilada csp 2 L. Es importante que 1 y 2 se neutralicen entre sí. Mida 10 ml de sol. Diluya con 40 ml  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, añada 2 gotas de fenolftaleína y titule con solución 1 hasta que una gota de 1 provoque el color rosado de la mezcla. Si se requiere más o menos de 10 ml diluya una u otra solución y chequee de nuevo.

**2.2.2.3. Reactivo cúprico-alkalino. Sol. A:** Disuelva 50 g de carbonato de sodio anhidro, 50 g de tartrato doble de sodio y potasio, 40 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 400 g de sulfato de sodio anhidro, en más o menos 1,5 L de agua. Complete a 2 L., con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Mezcle y filtre si no está clara. Mantenga a temperatura ambiente. **Sol B:** Disuelva 150 g. de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  destilada, complete a 1 litro. El día a ser usado, coloque 4 ml., de solución B y diluya a 100 ml., A y mezcle.

**2.2.2.4. Reactivo arsenomolibdato.** Disuelva 100 g. de sulfato de amonio en 1800 ml.,  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Añada 84 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (agitando) añada a esta solución 100 ml., de ortoarsenato de sodio ( $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (prepara disolviendo 12 g de sal/100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ). Coloque la mezcla 1 - 2 días a  $37^\circ\text{C}$  en botella ámbar con tapa de vidrio.

**2.2.2.5. Soluciones patrón (standard) de glucosa.** Disuelva 1 g., de glucosa anhidra en 10 - 15 ml., de solución al 0,2 % de ácido benzoico, transfiriéndola cuantitativamente a un balón aforado de 100 ml., diluyendo hasta la marca con la solución, de ácido benzoico. Mezcle. mantenga en nevera. Esta solución contiene 10 mg., de glucosa/ml., solución "Stock". A partir de esta solución "Stock" prepare una solución de trabajo diluyendo 1 ml., de "Stock" hasta 100 ml., con solución 0.2 % de ácido benzoico. ¿Cuál es la concentración (mg/100) de glucosa de esta solución de trabajo?

**2.2.2.6. Desproteización:** Coloque 1 ml., de sangre oxalatada (5 ml., sangre + 0.5 ml., oxalato de sodio 0.1M.) en una fiola de 50 ml. coloque la de solución de sulfato de zinc, mezclando por rotación, tape la fiola y agite vigorosamente. Filtre o centrifugue. El filtrado o sobrenadante se usará en la experiencia analítica. La desproteización también puede hacerse así: 1 ml., de sangre + 7 ml.,  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Añada 1 ml., de sulfato de cobre al 7% agite. Después de 2 min , agregue 1 ml., de tungstato de sodio al 10%. Agite vigorosamente. Filtre o centrifugue. Disponga una serie de 8 tubos y proceda como lo indica el informe.



### 3. INFORME 6 (CITOCROMO-C)

Apellidos

Nombres

Grupo de prácticas

N° del mesón

Fecha

N° del estudiante

Calificaciones

Entrada		Desarrollo		Informe		Definitiva	
---------	--	------------	--	---------	--	------------	--

1. Elabore una tabla en esta hoja para anotar sus resultados.

Tubo	Sol. de trabajo (ml).	Agua destilada (ml)	Reactivo Cu <sup>++</sup> alcali-no. (ml)	Dejar 20 min en agua hirviente. Tape los tubos.	Enfríe 1 min en agua	Arseno molibdato (ml)	Agua (ml)	Concentración de glucosa mg./tubo	DOa 520 nm.
1	0	1	1	"	"	1	7		
2	0.1	0.9	1	"	"	1	7		
3	0.2	0.8	1	"	"	1	7		
4	0.3	0.7	1	"	"	1	7		
5	0.4	0.6	1	"	"	1	7		
6	0.6	0.4	1	"	"	1	7		
7*		0.5	1	"	"	1	7		
8*		0.5	1	"	"	1	7		

2. Con los datos obtenidos en los tubos 1-6 construya una curva de calibración y pegue en esta hoja, colocando las lecturas a 520 mμ en el eje de las ordenadas y el contenido de glucosa en cada tubo en el eje de las abscisas. Use esta curva para calcular el contenido de glucosa en su muestra problema: mg de glucosa/100 ml. de sangre no oxalatada. Además, haga el cálculo usando solamente un patrón (Cst y D.O. <sub>st</sub>) aplicando la fórmula:

$$C_X = \frac{A_x}{A_{st}} = X \text{ Cst.}$$

**3. Discuta sus resultados.**

**Nota: El informe debe ser entregado al finalizar la práctica.**