

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN ETANOL POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS

Carla José y Laura Briand

Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas-Dr. Jorge J. Ronco. Universidad Nacional de La Plata, CONICET, CCT La Plata. Calle 47 N° 257, B1900AJK La Plata, Buenos Aires, Argentina. carlajose@quimica.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La cuantificación de proteínas en solución -en forma exacta, precisa y reproducible- es probablemente uno de los problemas experimentales más frecuentes que enfrenta el investigador. Existe una amplia gama de métodos para estimar la concentración proteica de una muestra debido al desarrollo de la proteómica en los últimos años, pero pocos de ellos se encuentran disponibles. El principio de los métodos químicos empleados para la determinación de la concentración proteica es establecer una relación entre la cantidad de un producto (usualmente un cromóforo o un fluoróforo) formado por la reacción o interacción entre un reactivo y una función química proteica. El método de referencia para determinar químicamente la concentración proteica es la reacción de ninhidrina (1). Dentro de las alternativas a la reacción de la ninhidrina se encuentran los métodos de Lowry y del ácido bicinconínico y métodos basados en la interacción de las proteínas con colorantes (método de Bradford y de colorantes aniónicos). Así mismo, los métodos gravimétricos se basan en la determinación directa de la masa de proteínas deshidratadas y en la preparación de soluciones valoradas mediante pesada del componente proteico. El método espectroscópico basado en la espectroscopia de absorción UV ha probado ser sensible, muy versátil, con un error aceptable y susceptible de ser usado en un laboratorio medianamente especializado. Permite obtener valores con una exactitud del 10 % o mejor y una precisión del 1-2 % (2).

En este contexto, y teniendo en cuenta que nuestro interés es la cuantificación de proteína desorbida desde un biocatalizador en medio orgánico (etanol), lo cual agrega una complicación dado que los métodos mencionados anteriormente se basan en aplicaciones en sistemas acuosos, decidimos emplear la absorción UV-Visible para nuestros estudios.

EXPERIMENTAL

Materiales. En el presente trabajo se utilizaron seroalbúmina bovina (BSA) sólida (Sigma 99 %), muestra líquida de enzima CALB L (lipozyme batch LCN02102) provista por Novozymes Brasil, etanol absoluto (Carlo Erba 99,8 %) y cubetas plásticas UVette® 220-1600 nm con camino óptico 1cm.

Absorción UV-Visible de la lipasa B de Candida antarctica y Seroalbúmina bovina. Se obtuvieron espectros UV-Visible de soluciones de diferente concentración de las proteínas en agua destilada y etanol, tales medidas se realizaron en el momento inmediatamente posterior a la preparación de las soluciones y luego de 24 horas. En todos los casos se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda35 y todas las soluciones se prepararon por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Figuras 1A y B muestran los espectros UV-Vis de las soluciones de la lipasa CALB y seroalbúmina bovina en agua destilada. El máximo de absorción para BSA se localiza en los 280 nm, mientras que para CALB se observa un corrimiento del máximo hacia menores longitudes de onda (255-256 nm).

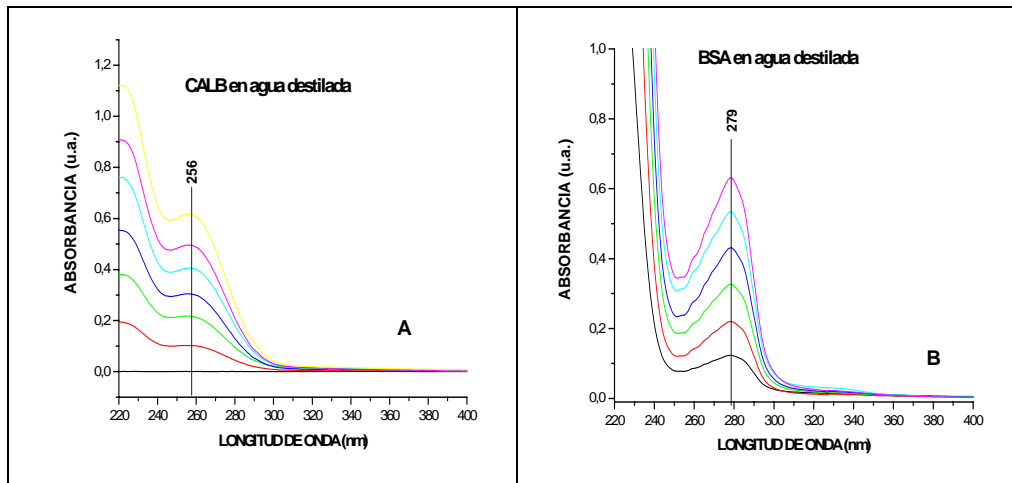


Figura 1. Espectros UV-Visible de soluciones de CALB (A) y BSA (B) en agua destilada. Rango de concentraciones para CALB/AD: 0,0341 a 0,2043 mg/ml. Rango de concentraciones para BSA/AD: 0,16 a 0,95 mg/ml.

Los espectros de estas mismas proteínas en etanol son semejantes a los obtenidos en agua destilada en cuanto a que se mantienen las localizaciones de los máximos de absorción como puede observarse en las Figuras 2 A y B.

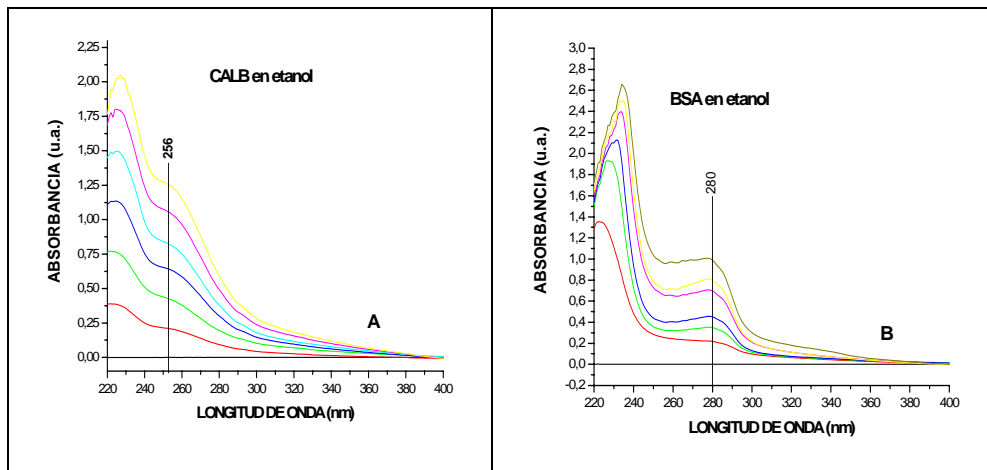


Figura 2. Espectros UV-Visible de soluciones de CALB (A) y BSA (B) en etanol. Rango de concentraciones para CALB/AD: 0,0341 a 0,2043 mg/ml. Rango de concentraciones para BSA/AD: 0,16 a 0,95 mg/ml.

A partir de los espectros mostrados anteriormente se obtuvieron gráficos de absorbancia en 280 nm en función de la concentración de BSA en agua y alcohol. Las respuestas son claramente lineales en ambos medios como se observa en la Figura 3.

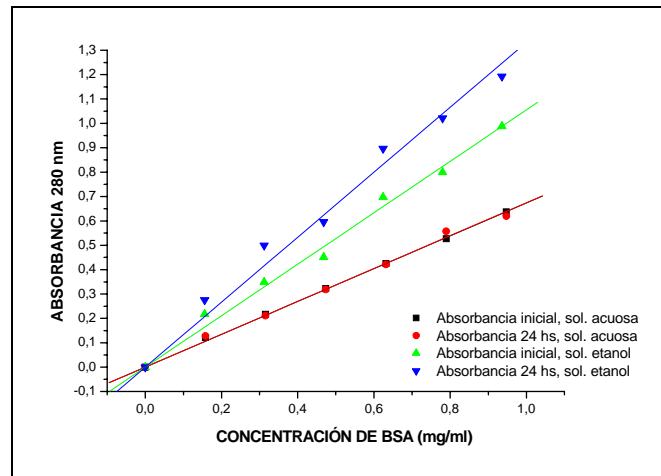


Figura 3. Absorbancia en 280 nm en función de la concentración de BSA (mg/ml) en agua destilada y en etanol

Los resultados demuestran una perfecta reproducibilidad en las medidas en un plazo de 24 horas para el sistema BSA/AD, mientras que para el sistema BSA/etanol hay un aumento del valor de absorbancia máxima en el tiempo. Así mismo, se observa que los valores de absorbancia en etanol son siempre mayores que los observados en el sistema acuoso.

La Figura 4 muestra los valores de absorbancia en 256 nm en función de la concentración para CALB en ambos solventes. Se observa un comportamiento lineal en ambos casos y, al igual que lo observado para BSA, los valores de absorbancia son superiores cuando la proteína se encuentra en etanol respecto a los valores en agua destilada para una misma concentración proteica. Los resultados demuestran una muy buena reproducibilidad en las medidas en un lapso de 24 horas, independientemente del solvente empleado.

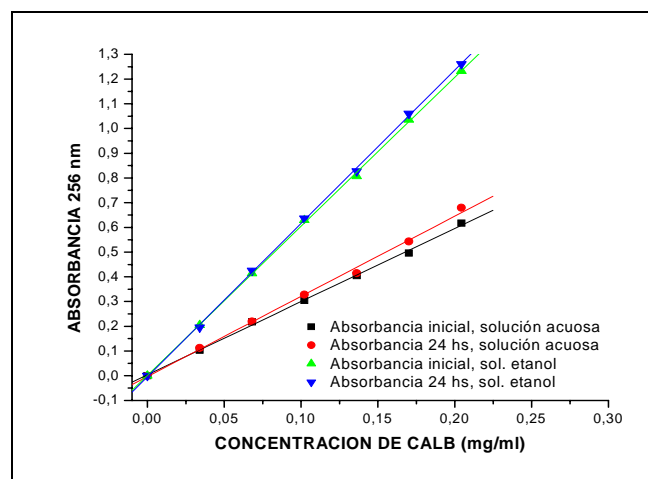


Figura 4. Absorbancia en 256 nm en función de la concentración de lipasa CALB (mg/ml) en agua destilada y en etanol.

En la Figura 5 se comparan los valores de absorbancia en función de la concentración para ambas proteínas en un mismo solvente. Estos gráficos muestran que se comete

error al emplear BSA como estándar en la cuantificación de CALB, ya que se sobreestimaría la concentración de CALB, y esto es independiente del solvente utilizado.

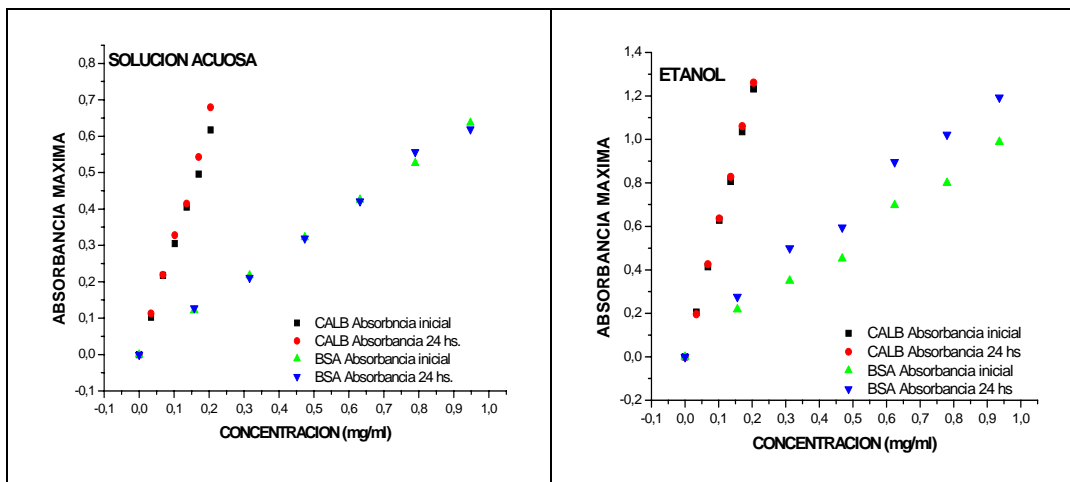


Figura 5. Comparación de las absorbancias máximas de soluciones de diversas concentraciones de BSA y CALB en agua destilada y etanol.

CONCLUSIONES

Los resultados permiten concluir que la magnitud de la absorción de BSA y CALB difiere según el solvente encontrándose para ambas proteínas mayor valor de absorbancia en etanol respecto al sistema acuoso. En este sentido es importante destacar la invalidez del empleo de BSA como estándar para cuantificación de CALB ya que los valores de concentración encontrados para las soluciones de CALB utilizando BSA como referencia no coinciden con las concentraciones obtenidas a partir de la cuantificación por precipitación de CALB, sino que ocurre una sobreestimación de la lipasa.

REFERENCIAS

1. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 6281-6285.
2. C.M. Stoscheck, *Methods Enzymol.* 182(1990) 50-69.