



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Grado en Química

Trabajo Fin de Grado

Validación de un método analítico para determinación del contenido total de proteínas en leche

Alumno: Ana Belén Villar Illescas

Jaén, Junio 2017



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Grado en Química

Trabajo Fin de Grado

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE PROTEÍNAS EN LECHE

Alumno: Ana Belén Villar Illescas

Jaén, Junio 2017

ÍNDICE

RESUMEN / ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Definición y antecedentes	2
1.2. Proteínas en leche bovina	3
1.3. Método Biuret	5
1.4. Importancia de la validación de un método analítico	7
1.4.1. Función de la validación de métodos	7
1.4.2. Herramientas necesarias para la validación	9
1.4.2.1. Blancos	9
1.4.2.2. Muestras de rutina	9
1.4.2.3. Disoluciones de referencia	9
1.4.2.4. Estadística	9
1.5. Parámetros de validación	9
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Reactivos y patrones	13
3.2. Muestra	14
3.3. Aparatos e instrumentos	15
3.4. Procedimiento a realizar	16
3.4.1. Preparación de blancos	16
3.4.2. Construcción de la recta de calibrado	17
3.4.3. Preparación de la muestra	17
3.4.4. Procedimiento experimental de medida	18

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1. Optimización del método analítico	19
4.1.1. Espectros visibles del complejo formado con el reactivo	
Biuret	19
4.1.1.1. Espectros visibles de las proteínas empleando	
caseína como patrón. Diferencia con albúmina	23
4.1.2. Optimización de la dilución de las muestras de leche	
desnatada y efecto matriz sobre la señal	24
4.1.3. Optimización de la dilución de las muestras de leche entera	
y semidesnatada	27
4.2. Validación del método analítico	28
4.2.1. Rango dinámico lineal	28
4.2.2. Límite de detección y límite de cuantificación	30
4.2.3. Repetividad y reproducibilidad	32
4.2.4. Estudio de recuperación	35
4.2.5. Especificidad	37
4.2.6. Resumen de los parámetros de validación	40
4.3. Análisis de muestras comerciales de leche	41
5. CONCLUSIONES	42
6. BIBLIOGRAFÍA	43

RESUMEN / ABSTRACT

En este proyecto de fin de grado se estudia la optimización y la validación de un método analítico para la determinación total de proteínas en leche. La cantidad de proteínas totales se determina mediante el reactivo de Biuret, el cual es responsable de formar un complejo que desarrolla un color violeta que se puede medir en el UV-Vis a 548 nm. Para ello se establece un rango de trabajo en concentraciones hasta 4,8 mg/ml utilizando como patrón la caseína. La validación consistió en la determinación de algunos parámetros esenciales como el rango dinámico lineal, 0,27-2,40 mg/ml, el límite de detección, 6,34 mg/ml, o el límite de cuantificación, 21,12 mg/ml, además de un estudio de recuperación y un estudio de interferencias teniendo como interferentes a la lactosa y la grasa. Por último se determina la concentración de proteínas totales en distintas muestras comerciales de leche comparando el resultado con su valor declarado.

Abstract

In this dissertation, it has been studied the optimization and validation of an analytical method for the determination of total proteins in milk. The amount of total proteins is determined using the biuret reagent, which is responsible of a violet color that can be measured in the region UV-Vis at 548 nm. For this purpose, a working range was established in concentrations up to 4,8 mg/ml using the casein as a standard. The validation consisted in the determination of some essential parameters such as the linear dynamic range, 0,27-2,4 mg/ml, the limit of detection, 6,64 mg/ml, or the limit of quantification, 21,12 mg/ml, in addition to a recovery study and a study of interferences having as interferences to lactose and fat. Finally, the concentration of total proteins in different commercial samples of milk is determined by comparing the result with its declared value.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición y antecedentes

“La leche es el producto de la secreción de la glándula mamaria de animales bovinos sanos, obtenida por uno o varios ordeños, higiénicos, completos e ininterrumpidos” según se describe por el Ministerio de Salud en el decreto 2437 emitido en Agosto de 1983 en el Artículo 2 del capítulo 1. El consumo de esta remonta a cuando el ser humano dejó de ser nómada y empezó a domesticar en un principio a ovejas y cabras. No fue hasta el siglo XX y gracias a los avances y descubrimientos de Louis Pasteur años atrás (1864), cuando se empezó a manejar el arte de la conservación, convirtiéndola en una de las industrias alimentarias más importantes del mundo. (García, S.A.N.; 2015).

España se sitúa en el puesto número siete del ranking como país productor de leche de vaca en la Unión Europea. Alrededor del 87 % de la leche producida nacionalmente corresponde a este animal, el 7 % se debe a la leche de oveja y el 6% a la leche de cabra.



Figura 1. Producción de leche según su tipo.

Fuente: Fondo Español de Garantía Agraria (FEGA).

La leche es un alimento con gran aporte nutricional con una fuente significativa y económica de proteínas de alta calidad y otros nutrientes y sustancias (lactosa, urea, creatinina, proteínas...). Su constitución hoy día pende de varios factores como por ejemplo, esquemas de alimentación de los animales o la climatología. (Kamizake, N.K.K.; 2003). Debido a este aporte nutricional la leche es incorporada a la dieta alimenticia desde una edad muy temprana hasta ancianos, y aunque en los últimos

años su consumo ha disminuido en adultos, sigue siendo fundamental determinar el contenido proteico de la leche por ser un factor significativo para el precio pagado de la industria de la leche. (Agudelo, G.A.; 2005). En la siguiente tabla se muestra la composición de la leche en porcentajes según su contenido total.

Tabla 1. Composición de la leche bovina. Fuente: (Agudelo, G.A.; 2005).

Composición			Porcentaje
Sólidos Totales (12,0%)	Proteínas (3,2%)	Caseínas	2,6 %
		Lacto séricas	0,6 %
	Grasas		3,4 %
	Lactosa		4,7 %
	Minerales		0,7 %
	Agua		

Como se puede ver el agua es el componente mayoritario de la leche de vaca, fluctuando entre el 80 y 90%. El agua es la encargada de mantener a componentes como la lactosa en solución, a algunas grasas en emulsión e incluso a muchas proteínas en dispersión.

1.2. Proteínas en leche bovina

Las proteínas tienen una labor muy importante en la mayoría de procedimientos biológicos, ejerciendo como hormonas, enzimas, neurotransmisores, etc, además de que su determinación es imprescindible para la ciencia y tecnología de los alimentos y en varios sectores de la investigación a fin de garantizar la calidad y seguridad.

Las proteínas deben ser introducidas en el organismo a través de la ingesta de alimento ya el cuerpo humano no es capaz de sintetizarlas por sí solo. Son muy importantes en niños y adolescentes ya que la falta de estas puede provocar un retraso del crecimiento, en adultos por el contrario el déficit de proteínas puede ser el responsable de numerosos desequilibrios entre hormonas y la fatiga. Sin embargo un consumo excesivo de proteínas puede provocar una sobrecarga de trabajo para el hígado y los riñones además de una intensa acidez en el estómago.

La cantidad de proteína en la leche no es homogénea ya que es una combinación de diversas enzimas, proteínas y nitrógeno no proteico. Al menos el 3,5% de una muestra cualquiera de leche es proteína, esto simboliza el 38% de sólidos no grasos. Esta proteína láctea es una combinación de distintos pesos moleculares y fracciones proteicas.

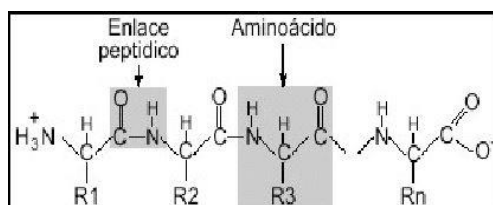


Figura 2. Estructura general de proteínas lácteas. Fuente: (Agudelo, G.A.; 2005).

Las proteínas contenidas en la leche se dividen en dos grupos: proteínas séricas y caseínas. La caseína es la proteína que se encuentra en una mayor proporción en la leche (80%) y contiene aminoácidos denominados esenciales que el ser humano no es capaz de asimilar, responsables además de que la proteína precipite en la fabricación de quesos. Estas proteínas se encuentran fusionadas formando micelas, hay tres tipos diferentes de caseínas (α , β y κ). La caseína κ es imprescindible por la función que realiza en la leche, su coagulación, estabilizando para ello otras caseínas que permiten la formación de nuevas micelas. A mayor proporción de caseína κ , menor será el tamaño de la micela. (López, R.A.L.; 2016)

Las micelas se organizan mediante pequeñas subunidades de distintas composiciones asociadas entre sí por minerales como el calcio, fósforo y magnesio. En la superficie de estas micelas se encuentran las caseínas κ todas ellas cargadas negativamente.

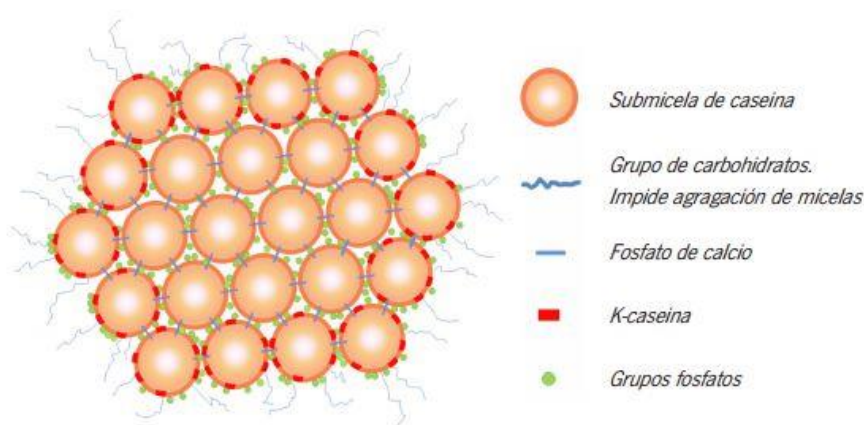


Figura 3. Micela de caseína. Fuente: (López, R.A.L.; 2016).

Las proteínas séricas en cambio se encuentran en una menor proporción y contienen un nivel de grasa mínimo, aunque su contenido en vitaminas, sales y lactosa son mayores, esta última a pesar de aportar al organismo suficiente energía, es la responsable de muchas alergias e intolerancias a la leche. Las proteínas séricas además tienen propiedades específicas como por ejemplo las inmunoglobulinas que son portadoras de anticuerpos. Estas proteínas séricas se distinguen de las caseínas por sus aminoácidos, los cuales aportan muy buenos valores nutricionales, y por su vulnerabilidad al calor ya que estas se desnaturalizan a los 90-100°C. (López, R.A.L.; 2016). La proteína sérica mayoritaria es la β -Lactoglobulina que posee un 50 % del total de la fracción proteica del lactosuero. En la siguiente tabla se muestran las fracciones proteicas que contiene la leche.

Tabla 2. Fracciones proteicas de la leche bovina. Fuente: (García, S.A.N.; 2015).

Fracciones		Concentración en leche (g/L)	
Proteína total		36,1	
Caseína	α 1- caseína	11,90	29,50
	α 2- caseína	3,10	
	β - caseína	9,80	
	κ - caseína	3,50	
	γ - caseína	1,20	
Proteínas del suero	β - lactoglobulina	3,20	6,60
	α - lactalbúmina sérica	1,20	
	Seroalbúmina	0,40	
	Inmunoglobulinas	0,80	
	Proteosa Peptona	1,00	

1.3. Método Biuret

En este trabajo se va a utilizar el método Biuret el cual es un método descrito para la cuantificación de proteínas. El método Biuret está basado en la formación de un complejo de cobre de color púrpura debido a la formación de un enlace peptídico entre un residuo de un aminoácido y dos iones de cobre (Cu^{2+}) siendo proporcional la intensidad del color presente en la disolución con el número de enlaces peptídicos formados. (Kangle. Z, 2017). El cobre en medio básico, reacciona con las proteínas

estableciendo un complejo cuadrado-planar con unión peptídica (figura 5). El producto obtenido en la reacción mostrará dos bandas de absorción, a 270 nm y a 540 nm. (Zaia, D.A.M.; 1988).

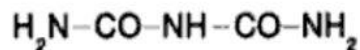


Figura 4. Fórmula del reactivo Biuret. Fuente: (García, S.A.N.; 2015).

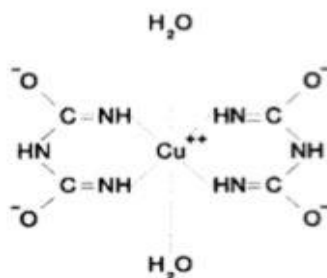


Figura 5. Complejo cuadrado-planar entre el cobre y los enlaces peptídicos.

Fuente: (García, S.A.N.; 2015).

Aunque la región a 270 nm presenta una sensibilidad muy alta, la banda más usada para el método Biuret es la de 540 nm, ya que la región de 270 nm provoca numerosas interferencias con el método. El citado método a analizar suele estar sometido a la interferencia de componentes que pueden reaccionar con los iones cobre (II).

A día de hoy el contenido en proteínas de la leche de vaca apenas ha sido investigado y las publicaciones recientes incorporan una cifra limitada de referencias en cuanto al método Biuret se refiere. La determinación de proteínas totales utilizando métodos espectrofotométricos se usa en áreas como investigación médica o análisis clínicos entre otros. (Zaia, D.A.M.; 1988). Entre los métodos más apropiados para dicha determinación además del método Biuret, hay que destacar el método Kjeldahl por su eficacia, basado en la medición de cuantía de nitrógeno, útil para la determinación de proteínas insolubles mediante volumetría. Este último método presenta dos problemáticas principales, una de ellas es un largo espacio de tiempo indispensable para la realización del ensayo, la segunda problemática que presenta este método es el requisito de llevar a cabo dos determinaciones para calcular la diferencia entre nitrógeno no proteico y el nitrógeno proteico total. (Carratù, B.; 2003).

En referencia al método Biuret se puede encontrar numerosas ventajas en comparación con el método Kjeldahl, (Keller, R.P.; 1966) y es que este usa reactivo de bajo coste, es mucho más rápido su análisis, se trata de un método simple de análisis de proteínas en el que no es habitual encontrar distinciones de color y por último y no menos importante es que escasas sustancias no proteicas intervienen en la reacción de Biuret, (Verheul, F.E.A.M.; 1986).

En lo que a desventajas se refiere el método Biuret no es un método muy sensible en comparación con el método de Lowry, (Zaia, D.A.M.; 1988) que se fundamenta en una reacción de cobre con el reactivo Folin-Ciocalteu. Aunque si es más sensible que el método oficial antes mencionado Kjeldahl, además de que debe estandarizarse el color mediante concentraciones de proteína conocida. Todas estas desventajas sitúan a este método en desventaja en referencia a otras metodologías. A pesar de esto el método Biuret es recomendado para determinar la concentración de proteínas totales en preparados muy concentrados como leche, saliva y plasma sanguíneo.

1.4. La importancia de la validación de un método analítico en un laboratorio

1.4.1. Función de la validación de métodos

La palabra validación es originaria de la palabra latina "Validus" que significa fuerte, y sugiere que algo ha sido demostrado para ser verdad, útil y de un nivel aceptable. Lo que significa que una investigación ha sido realizada, y que cuando se aplica correcta y cuidadosamente, produce resultados que son aptos para el propósito.

La validación de un método es una pieza importante en cualquier laboratorio que colabore en el desarrollo y disposición de la estandarización de métodos, con el fin de establecer comparaciones con otras metodologías y así verificar la exactitud de los artículos revisados, pudiendo conseguir información beneficiosa a partir de los datos experimentales y obtener conclusiones fiables sobre la validez del método. Dicha validación incluye todos los procedimientos que son necesarios para declarar que un método particular en la determinación cuantitativa de la concentración de un analito en una matriz, como en este caso es la leche, es aceptable para la aplicación propuesta. (Vinod, P.S.; 1992).

Un método analítico debe validarse cuando existe la necesidad de examinar si sus parámetros de rendimiento son apropiados para el problema planteado. El alcance de la validación dependerá de diversos factores como la instrumentación, los operadores e incluso el propio laboratorio. (Chandran, S.; 2007).

Para que un resultado analítico sea apropiado para su objetivo previsto, debe ser lo convenientemente confiable como para que las decisiones en base a este puedan adoptarse con confianza. La validación de un método no puede suprimir todos los errores que puedan surgir durante la implantación del método, aunque asegura que los grandes problemas se observen de distinta manera sugiriendo un mecanismo que controle la variabilidad.

Una vez finalizada la extensión del método y su alcance se puede emplear dos tipos de análisis. O bien un estudio comparativo interlaboratorio de los resultados obtenidos en cuyo caso se obtiene un amplio rango de robustez o por el caso contrario se obtendrán resultados individuales de un laboratorio por tener un método elaborado y concreto. (Morillas, P.P.; 2016).

Tras la validación de un método analítico se puede encontrar su verificación, y aunque esta es opcional proporciona numerosas ventajas. La verificación de un método puede ser necesaria cuando hay cambios representativos en el proceso como pudiera ser el uso de nuevos equipos o sus traslados.

Hay organismos públicos tales como 'EURACHEM' que proporcionan guías para la validación de métodos analíticos. Estas guías definen los parámetros más simbólicos y como calcularlos. Algunas guías además dan recomendaciones sobre planes o informes de validaciones a seguir, no son necesarios pero establecen documentos con mucha claridad y sencillez sobre los resultados obtenidos.

Los parámetros de validación más importantes son el rango dinámico lineal, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad, repetitividad y reproducibilidad, todos ellos se explicarán en el siguiente apartado 1.5. Parámetros de validación.

1.4.2. Herramientas necesarias para la validación

1.4.2.1. Blancos

El uso de blancos es necesario para discernir cuanta señal puede ser atribuida al analito. Podemos distinguir dos tipos de blancos, blancos de reactivos y blancos de matriz. En los primeros, incluidos los disolventes, se analizan con el fin de corroborar que su señal no interfiere en la señal de medida. Los segundos, blancos de matriz, son muestras que se usan para una estimación de las interferencias más precisa en el análisis. (Morillas, P.P; 2016).

1.4.2.2. Muestras de rutina

Estas muestras informan sobre la precisión, interferencias y sesgo que aparecen en el análisis cada día. Los métodos de referencia pueden facilitar con precisión una estimación del contenido del analito. (Morillas, P.P; 2016).

1.4.2.3. Disoluciones de referencia

Se trata de soluciones en las que se ha añadido analito hasta una concentración deseada y por tanto conocida, esto permite aumentar la respuesta del analito a medir y calcular sus valores en términos de cantidad añadida. Generalmente se usarán soluciones de referencia secundaria o de trabajo, pero estos últimos contrastados con materiales de referencia primarios. (Morillas, P.P; 2016).

1.4.2.4. Estadística

Las técnicas estadísticas son primordiales para asociar los resultados obtenidos en los análisis. En dichas técnicas estadísticas se evalúa la precisión, rango lineal, límite de cuantificación (LOQ), límite de detección (LOD) e incertidumbre de medida. (Morillas, P.P; 2016).

1.5. Parámetros de validación

Los parámetros fundamentales para garantizar la admisión del rendimiento de un método analítico son la selectividad, exactitud, precisión, rango de linealidad, robustez, límite de detección, límite de cuantificación y sensibilidad.

Especificidad

La especificidad es la capacidad de medir el analito en presencia de sustancias que se puede esperar que estén presentes en la matriz objeto de estudio. Normalmente estas podrían incluir metabolitos, degradantes, impurezas y algunos componentes de la matriz entre otros. (Peters, F.T.; 2007).

La palabra especificidad alude siempre a un 100% de selectividad, siendo lo contrario un 0% de interferencia. (Araujo, P.; 2009). Este parámetro se estudia midiendo el analito de interés en una muestra a la cual se le ha añadido interferentes intencionadamente con el fin de ver la respuesta que este proporciona. Principalmente el parámetro de especificidad se utiliza para la identificación de analitos, pruebas de pureza o análisis cualitativos entre otros. Si la muestra a analizar contiene impurezas u otras sustancias, como es en este caso la leche, la especificidad se puede calcular por adicción. Para ello se le pueden agregar sustancias en cantidades conocidas a preparados de la matriz y estos compararlos con los resultados que arrojan las muestras sin estos agregados.

Exactitud

La exactitud de un método es la aproximación del resultado adquirido con el valor aceptado como verdadero. Dicha exactitud se puede analizar con numerosos métodos como puede ser mediante un material de referencia certificado comparando el valor obtenido con el valor certificado, la segunda opción de calcular dicha exactitud es mediante un estudio de recuperación. (Chandran, S.; 2007).

Estudio de recuperación

El estudio de recuperación se trata de un análisis que sirve para estudiar la veracidad del método empleado. Por recuperación se entiende la señal que da la muestra cuando a esta se le añade analito, en comparación con la señal que se obtiene en ausencia de ese analito añadido, es decir con su concentración real. (Morillas, P.P.; 2016).

Precisión

La precisión de un método analítico se define como la magnitud de la dispersión de los resultados obtenidos en pruebas individuales realizados en diversas mediciones de una misma muestra. Dentro de este subapartado podemos destacar tres conceptos importantes como son la; repetibilidad, la precisión intermedia y la reproducibilidad.

La repetibilidad o también llamada precisión intra-ensayo, se determina calculando el porcentaje de desviación estándar relativa repitiendo para ello sucesivos análisis de muestras acondicionadas de forma independiente por un mismo operador, laboratorio y conjunto de reactivos en un día. (Chandran, S.; 2007)

La precisión intermedia es aquella precisión que se realiza bajo condiciones variadas dentro de un mismo laboratorio, como puede ser diferentes días, analistas o equipos. Estos datos se pueden calcular mediante un método de varianza como es el método ANOVA. (Peters, F.T.; 2007).

La reproducibilidad es de interés cuando el método analítico va a ser empleado en distintos laboratorios. Este parámetro se determina evaluando una misma muestra en distintos laboratorios con el fin de corroborar que se obtienen parecidos resultados demostrando por tanto una equivalencia estadística y analítica. (Chandran, S.; 2007).

Linealidad

La linealidad de un método es la capacidad de adquirir resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra analizada. La aceptación de los datos obtenidos se estima observando el coeficiente de regresión lineal y la intersección con los ejes para la gráfica de absorbancia frente a concentración. La linealidad viene determinada por un rango dinámico lineal siendo el extremo inferior el límite de cuantificación y el extremo superior, la última concentración a partir de la cual se observan desviaciones de la linealidad significativas. (Chandran, S.; 2007).

Robustez

La robustez se define como la capacidad del método analítico de no verse afectado por insignificantes cambios llevados a cabo por la validación o por el uso del método. Los factores que principalmente se estudian son el pH, cambios en el solvente la concentración del tampón presente. (Peters, F.T.; 2007).

Límite de detección

El límite de detección (LOD) se define como la cantidad mínima necesaria de analito que es capaz de detectarse de manera confiable usando el método previsto. Técnicamente el límite de detección es la concentración mínima que se obtiene a partir de la señal de una muestra, la cual se podría eliminar de la concentración obtenida a raíz de la señal de su blanco correspondiente. (Morillas, P.P.; 2016). Se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 1: } LOD = \frac{3\sigma}{m}$$

Siendo 'm' la pendiente de la ecuación y 'σ' la desviación estándar de todos los blancos medidos.

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es la concentración por encima de la cual puede cuantificarse confiablemente el analito. Este límite se calcula disminuyendo la concentración de analito hasta que la precisión del método es inaceptable usando una ecuación muy sencilla proveniente de la señal de 10 blancos de reactivos y de muestra. (Morillas, P.P.; 2016). Este límite de cuantificación se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 2: } LOQ = \frac{10\sigma}{m}$$

Siendo al igual que en el caso anterior del LOD 'm' pendiente de la recta y 'σ' la desviación estándar de los blancos utilizados.

Sensibilidad

La sensibilidad del método analítico se define como el aumento de la señal en relación al aumento unitario de la concentración. Dicha sensibilidad puede aumentar empleando varios elementos que lo afectan como la relación señal/ruido, la composición de la matriz, leche en este caso, y por ultimo las propiedades fisicoquímicas del analito. Cuando la calibración del método analítico a tratar es una recta, la sensibilidad es constante en todo el rango de medida. (Morillas, P.P.; 2016).

2. OBJETIVOS

El objetivo primordial de esta memoria es la optimización y validación de un método analítico concreto para la determinación de proteínas totales en leche de vaca usando el reactivo Biuret, estableciendo para ello los siguientes objetivos específicos:

- Validar el método analítico
- Aplicar el método Biuret a la determinación de proteínas en leche.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Patrones y reactivos

Los reactivos utilizados en todo el proceso de análisis son:

- ✓ Caseína de leche de vaca de la casa comercial SIGMA
- ✓ Albúmina de la casa comercial VWR PROLABO, cuyo bote tiene un peso de 250 g.

Para elaborar la disolución patrón se pesa 1 g de caseína o albúmina con precisión de 0,0001 g en balanza analítica y se disuelve en 100 ml de hidróxido de sodio 0,1 M, y se conservará a la temperatura ambiente. Este patrón será utilizado para el desarrollo de la recta de calibrado en una concentración de 10mg/ml.

- ✓ Hidróxido de sodio 0,1M (NaOH) de la casa comercial J.T.Baker que posee una masa molecular de 40,00 g/mol.
- ✓ Sulfato de cobre pentahidratado al 1% (p/v) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) de la casa comercial MERCK, que tiene una masa molecular de 159,60 g/mol.

- ✓ Hidróxido de sodio 2M (NaOH).
- ✓ Tartrato tetrahidratado de sodio y potasio al 1% (p/v) ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$). de la casa comercial Fluka Analytical con una pureza del 99% y una masa molecular de 282,23 g/mol.
- ✓ D-Lactosa monohidratada de la casa comercial SIGMA.

3.2. Muestra

Se utilizan siete tipos de leche de distintas casas comerciales, variando en su contenido en grasa y lactosa.

Tabla 3. Distintos tipos de leche y marcas usadas.

Tipo de leche	Marca	Contenido proteico declarado	Contenido en grasa declarado
Desnatada	Puleva A+D enriquecida con vitaminas	3,2 g/100ml	<0,5 g/100ml
	Hacendado	3,1 g/100ml	0,3 g/100ml
	Covap	3,2 g/100ml	0,3 g/100ml
	Día Sin Lactosa	3,1 g/100ml	0,2 g/100ml
	Hacendado Sin Lactosa	3,2 g/100ml	0,3 g/100ml
Semidesnatada	Puleva A+D enriquecida con vitaminas	3,1 g/100ml	1,6 g/100ml
Entera	Puleva	3,0 g/100ml	3,6 g/100ml

3.3. Aparatos e instrumentos

Balanza

La balanza analítica es un instrumento que se utilizó para medir pequeñas masas de sustancias. En este trabajo se utiliza para medir la masa de los reactivos y así preparar las distintas disoluciones. Es de la casa METTLER AJ100 y tiene una precisión de 0,0001 g y una capacidad máxima de 360 g.

Ultrasonido

El baño de ultrasonido es un dispositivo que utiliza las ondas sonoras con frecuencias superiores a 20.000 Hz. Posee un generador de 200 W y un medidor de tiempo con un máximo de 15 minutos, su peso es de 11 kg aproximadamente. Se emplea para disolver los reactivos en sus correspondientes disolventes.

Centrífuga

Es un aparato que hace que la muestra rote, acelerando por tanto, la decantación o la sedimentación y generando varias fases según la densidad que posean. Una centrífuga tiene distintos componentes a destacar como son la tapa, cámara, interruptor de encendido, marcador de tiempo, tacómetro, freno y control de velocidad. Una característica importante de estas es que las cargas deben ser colocadas en pares contrapuestos, usando la misma masa de manera que tengan el mismo centro de gravedad.

Este aparato es de la marca SIGMA modelo 11811 con un temporizador de hasta 3 horas y cabezal oscilante. Posee una capacidad de 4 tubos de 50 ml u 8 tubos de 15 ml. Se utiliza para desgrasar la leche a una velocidad de giro de 3000 rpm.

Espectrofotómetro

El instrumento utilizado es de la casa comercial VARIAN con el modelo Cary 50 UV-Visible. Para la determinación de proteínas se usa un instrumento de haz sencillo, y se calibrará a cero de absorbancia con el matraz del blanco.

Tabla 4. Instrumentación utilizada. Fuente: Elaboración propia.

	
Balanza analítica	Baño de ultrasonido
	
Ultracentrífuga	Espectrofotómetro UV-Vis

3.4. Procedimiento a realizar

3.4.1. Preparación de blancos

Se prepararon dos tipos de blancos distintos según su funcionalidad, pudiendo distinguir entre blanco de reactivos, necesarios para la recta de calibrado, y blancos de matriz.

Para los Blancos de reactivos se realizó el siguiente procedimiento en matraces de 25 ml:

- Se añadió 1 ml de hidróxido de sodio 2M (NaOH).
- Se añadió 6 ml de tartrato de sodio y potasio al 1% ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$).
- Agitar el matraz y esperar cinco minutos.
- Enrasar con agua destilada.

Para la preparación del blanco de matriz se realizó lo siguiente:

- Centrifugar una muestra de 25 ml de leche 20 minutos a 3000 rpm.
- Recoger sobrenadante y homogeneizar.
- Añadir 2 ml de ese sobrenadante al matraz.
- Añadir 1 ml de hidróxido de sodio 2M (NaOH).
- Añadir 6 ml de tartrato de sodio y potasio al 1%.
- Agitar el matraz y esperar cinco minutos.
- Enrasar con agua destilada.

3.4.2. Construcción de la recta de calibrado

La preparación de los patrones se llevó a cabo en matraces de 25 ml en el siguiente orden:

- Alícuotas de caseína o albúmina en las concentraciones 0; 0,8; 1,6; 2,4; 3,2; 4 y 4,8 mg/ml.
- 1,5 ml de sulfato de cobre al 1 % (p/v) (CuSO_4).
- Agregar 1 ml de NaOH 2M.
- Incorporar 6 ml de tartrato de sodio y potasio al 1% (p/v).
- Agitar vigorosamente el matraz.
- Esperar 5 minutos hasta completar reacción.
- Enrasar con agua destilada.

3.4.3. Preparación de la muestra

Para la elaboración de la muestra primero hay que proceder con el acondicionamiento de la leche:

- Centrifugar una muestra de leche de 25 ml durante 20 minutos a 3000rpm.
- Tomar sobrenadante y homogeneizar.

Tras esto se prepara la muestra en matraces de 25 ml:

- Añadir 2 ml de leche.
- Agregar 1,5 ml de sulfato de cobre al 1% (p/v) (CuSO_4).
- Incorporar 1 ml de hidróxido de sodio 2M (NaOH).

- Añadir 6 ml de tartrato de sodio y potasio al 1% (p/v).
- Agitar vigorosamente el matraz .
- Esperar 5 minutos hasta completar reacción.
- Enrasar con agua destilada.

3.4.4. Procedimiento experimental de medida

Todas las disoluciones cuyos procedimientos anteriormente han sido descritos van a ser medidos de la misma manera:

- La disolución a medir se coloca en cubeta de plástico de 1 cm de paso óptico.
- Se realiza un espectro desde 400 hasta 800 nm.
- Para obtener la misma línea base restar señal a 800 nm.
- Para obtener la señal neta se resta la señal de los blancos.
 - Blancos de reactivos se resta a los patrones.
 - Blancos de matriz se resta a las muestras con leche.
- A continuación representar los espectros.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Optimización del método analítico

4.1.1. Espectros visibles del complejo formado con el reactivo Biuret

El reactivo Biuret tal y como se cuenta en la introducción podrá ser medido espectrofotométricamente a 548 nm, rango en el cual debe aparecer un máximo fácilmente distinguible y proporcional a las concentraciones de albúmina añadida. En los métodos más comunes para la determinación de proteínas totales se utiliza la albúmina como patrón.

Para la realización de este espectro en un principio se preparó la disolución de albúmina en concentración 10 mg/ml con hidróxido de sodio 0,1M, de la que se extrajo un volumen de 4 ml que fue introducido en el matraz aforado junto con los demás volúmenes necesarios para la reacción de Biuret, donde tras esperar cinco minutos se midió su absorbancia en todo el rango de longitud de onda. A continuación se muestra el espectro obtenido.

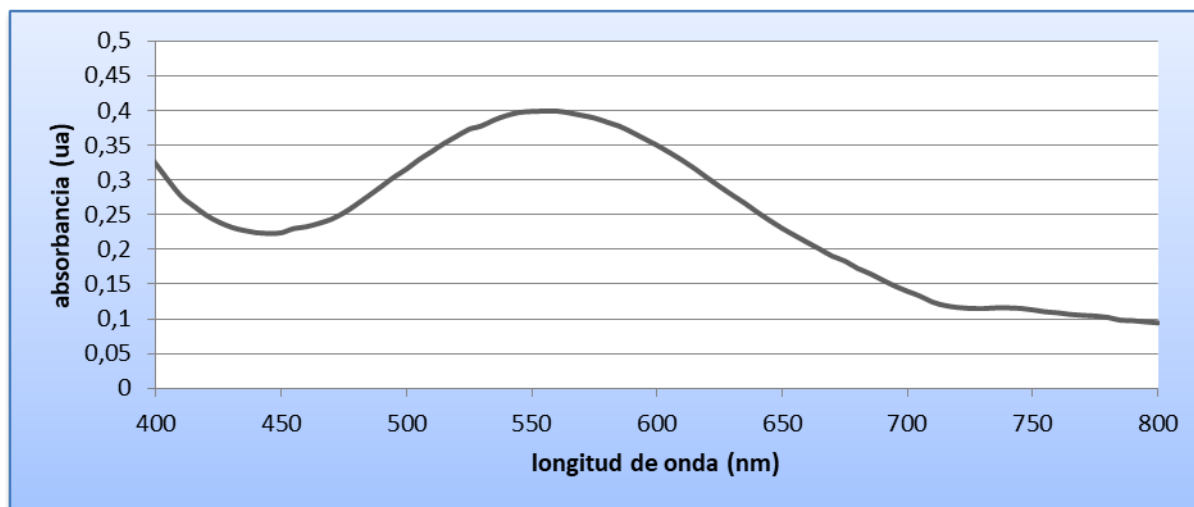


Figura 6. Espectro UV-Vis del complejo formado mediante la reacción de Biuret a partir de una disolución patrón de albúmina de 1,6 mg/ml de concentración.

Como se puede ver gráficamente los resultados analíticos obtenidos muestran un espectro en el rango del visible ya que va desde 400 hasta 800 nm, con un máximo de absorción a 548 nm.

En algunas reacciones es necesario cierto tiempo para una lectura invariable de absorbancia en las disoluciones realizadas, en este caso se tratará de cinco

minutos, principalmente porque es tiempo suficiente para que sea completa esta reacción con el reactivo Biuret y además porque se ahorra tiempo para el análisis.

Con el fin de ver el efecto en los espectros del aumento de la concentración de analito se preparó una batería de disoluciones con concentraciones perfectamente conocidas de albúmina y se midió su absorbancia tras el procedimiento. La disolución del blanco de reactivo en este caso también contenía sulfato de cobre al 1%. A continuación se muestra el espectro obtenido.

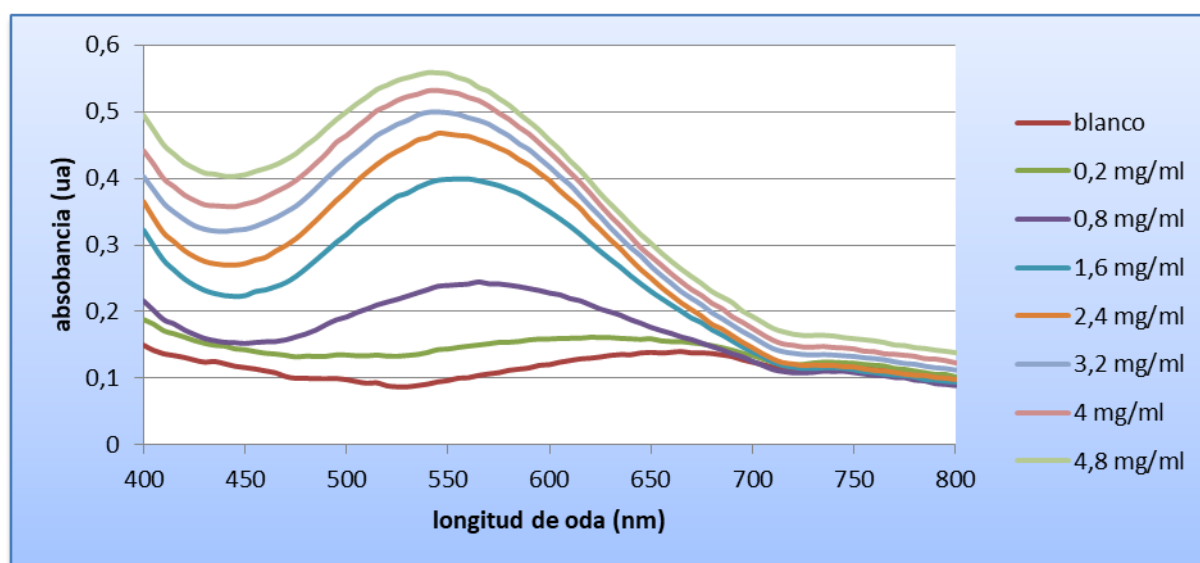


Figura 7. Espectros UV-Vis para una serie de patrones de albúmina con concentraciones hasta 4,8 mg/ml.

Los resultados que se muestran en esta figura nos muestran un espectro con un máximo observable a 548 nm que coincide el máximo descrito en bibliografía. (Birghila, S.; 2015).

Sin embargo la observación del espectro completo nos dice que sería conveniente corregir la línea base de todos los espectros, ya que posee valores que difieren a la longitud de 800 nm, lo cual se debe a la desviación relativa de los espectros. Esta desviación nos proporciona una señal incorrecta, algo más elevada de lo que le correspondería. La corrección de dichos espectros eliminará su desviación, viendo solo espectralmente la contribución que presentan los reactivos.

El segundo problema a tratar es el blanco de reactivo que tal cual como se puede ver en la figura 7 no es el más adecuado porque parece presentar un pequeño máximo de absorción a la longitud de onda de 675 nm, el cual podría coincidir con el

ligero color púrpura que presentaba su disolución. En cualquier caso este máximo estaría desplazado en comparación con el que presentan el resto de disoluciones lo que hace pensar que no es el blanco más correcto. Como solución a esto se propondrá un estudio de blancos de reacción para establecer cuál es el más indicado, intentando eliminar la contribución de ese pequeño máximo a la longitud de 675 nm, eligiendo para ello un blanco de reactivo que no desarrollara color para no inducir a ninguna interferencia.

El mencionado estudio de blancos consistió en diversas disoluciones con distintos reactivos empleados con el fin de observar sus espectros UV-Vis pudiendo discernir así cual es el más correcto para eliminar la contribución de los reactivos y aislar por tanto la señal que ofrece el complejo cuadrado-planar del cobre en el reactivo Biuret. El contenido de las disoluciones preparadas se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 5. Contenido de distintas disoluciones de blanco de reactivo.

Reactivos/Matraces	1	2	3	4	5	6
Sulfato de Cobre 1%	-	1,5 ml	1,5 ml	-	-	1,5 ml
Hidróxido de sodio 2M	1 ml	1 ml	-	-	1 ml	-
Tartrato de sodio y potasio 1%	6 ml	-	6 ml	6 ml	-	-

En base a los resultados que se obtuvieron se demostró en primer lugar que las disoluciones que contenían sulfato de cobre no eran adecuadas para el posible blanco, puesto que algunas contenían grumos insolubles (matraces 3 y 6) y en la disolución del matraz 2 se desarrolló el color púrpura característico del complejo de Biuret. Esto se explica fácilmente ya que el reactivo de sulfato de cobre aporta el cobre necesario a las disoluciones para la formación del complejo cuadrado-planar a analizar.

Los resultados espectrales de las disoluciones restantes (matraces 1, 4 y 5, respectivamente) fueron los siguientes:

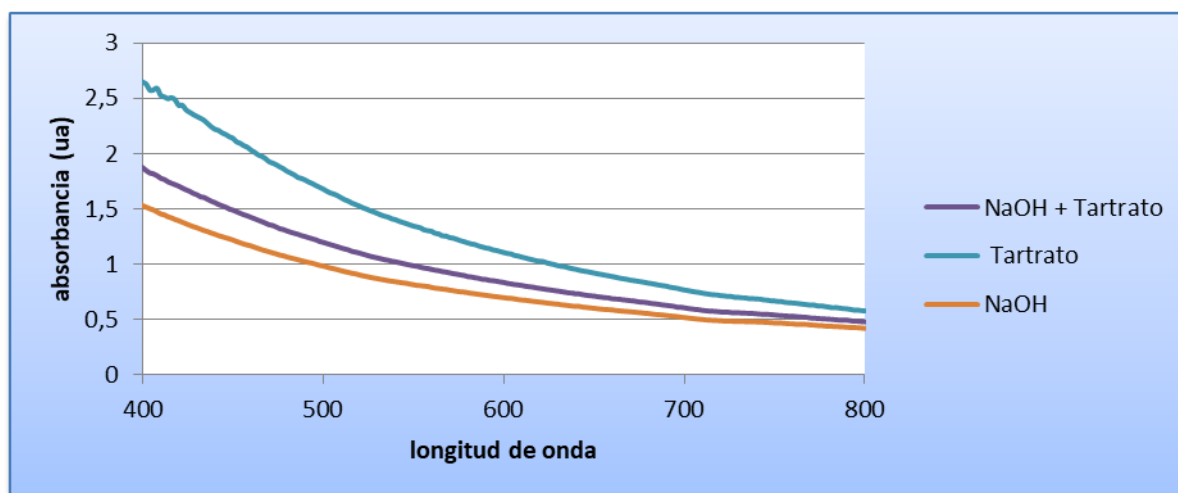


Figura 8. Espectros UV-Vis de posibles blancos de reactivos en disolución con agua destilada.

Los espectros obtenidos en esta figura muestran resultados prácticamente parecidos con absorbancias en aumento para iguales longitudes de onda. Teniendo en cuenta los espectros obtenidos se concluye que el mejor blanco será el que contiene hidróxido de sodio y tartrato de sodio y potasio, por contener todos los reactivos incluidos en las disoluciones a excepción del sulfato de cobre por su participación en el complejo del Biuret.

Teniendo en cuenta todos estos problemas iniciales se muestra a continuación el espectro final corregido de la calibración externa con albúmina.

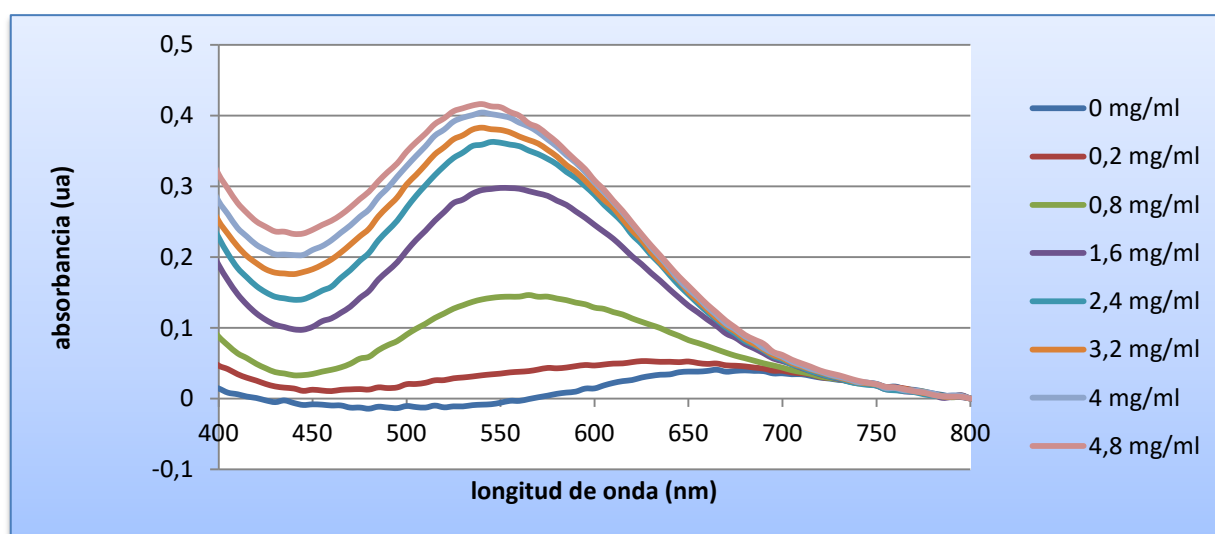


Figura 9. Espectros UV-Vis para una serie de patrones de albúmina con concentraciones hasta 4,8 mg/ml.

Este espectro final sigue mostrando un pequeño máximo a la longitud de 675 nm pero esta vez su forma es mucho más limpia y definida habiendo eliminado toda la contribución del blanco a la longitud de onda de medida en 548 nm.

4.1.1.1. Espectros visibles de las proteínas empleando caseína como patrón. Diferencia con albúmina.

En diversas publicaciones, (Keller, R.P.; 1986), describen la cuantificación de proteínas con albúmina, pero ciertamente la proteína mayoritaria de la leche bobina es la caseína. En esta memoria se comprobará si hay diferencia espectral entre ambas.

La caseína es en sí misma es una fosfoproteína que se encuentra en la leche, generalmente está presente en la fase soluble combinada con el calcio en un complejo específico llamado caseinógeno. La única diferencia molecular con la albúmina es que esta última se absorbe más rápido por el organismo y en un menor tiempo mientras que la caseína lo hace más lentamente pero tiene una calidad nutricional mayor.

Seguidamente se mostrará un espectro de caseína, con las mismas correcciones que al espectro anteriormente mostrado de albúmina.

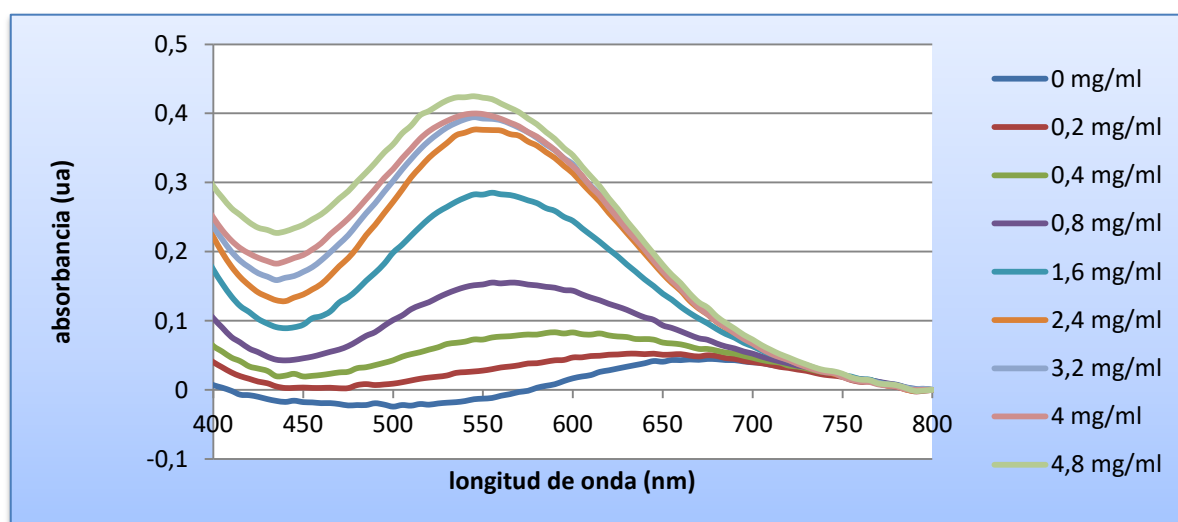


Figura 10. Espectros UV-Vis para una serie de concentraciones de caseína hasta 4,8 mg/ml.

Como se puede observar, esta figura presenta un máximo espectral en el mismo lugar que la albúmina indicativo de que la formación del complejo cuadrado-planar del reactivo Biuret correspondiente a las proteínas se ha formado. Puesto que la caseína es la proteína mayoritaria de la leche y arroja unos resultados parecidos a la albúmina, los siguientes resultados, gráficos y demás ensayos analíticos se harán utilizando este patrón a la misma concentración que anteriormente estaba la albúmina, 10 mg/ml.

4.1.2. Optimización de la dilución de las muestras de leche desnatada y efecto matriz sobre la señal

Los procedimientos descritos en bibliografía suelen emplear una dilución de la leche de 2:25 ml. (Birghila, S.; 2015). Para este trabajo emplearé diluciones 1:25 y 2:25 para comprobar que dilución es aceptable para la determinación de la concentración de proteínas en leche con el método Biuret.

Las muestras con las que se intentará optimizar el método contendrán 1 y 2 ml de leche a las que anteriormente se habrá centrifugado y homogeneizado su sobrenadante.

Tabla 6. Contenido volumétrico en disoluciones de muestras y blanco.

	Leche	CuSO₄.5H₂O	NaOH	C₄H₄KNaO₆.4H₂O
Muestra 1	1 ml	1,5 ml	1 ml	6 ml
Muestra 2	2 ml	1,5 ml	1 ml	6 ml
Blanco	-	-	1 ml	6 ml

A continuación se muestra el espectro obtenido de ambas diluciones de la muestra junto con el blanco de reactivo:

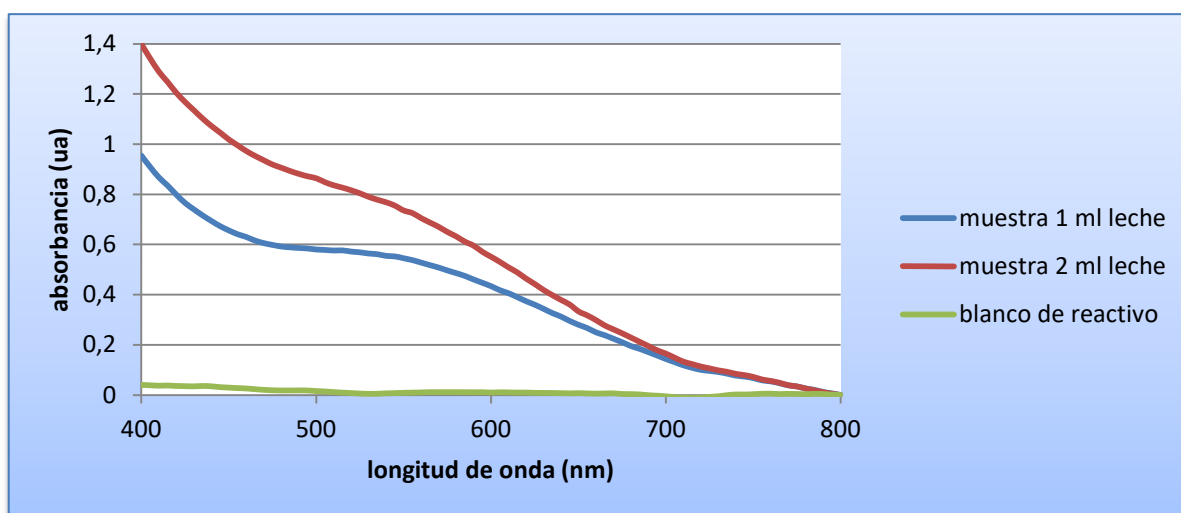


Figura 11. Espectros UV-Vis de la optimización de blanco de muestras en leche.

El primer problema a tratar como conclusión a este espectro obtenido es que de nuevo el blanco no es correcto. El espectro obtenido por el blanco de reactivo proporciona una señal muy baja en correspondencia con la alta señal de las muestras, a las que tampoco se les observa ningún máximo claramente diferenciable sino tan solo una pequeña curva, problemas debidos a la dispersión de la luz. Esta dispersión de la luz es provocada por la turbidez de la leche, que aunque se centrifuga no se elimina por completo dando lugar a estos errores.

La mayor problemática que se presenta hasta el momento es usar un blanco correcto que compense estos efectos de dispersión de luz. Para ello y en primer lugar se realizó un espectro con leche en ambas diluciones con el fin de poder examinar que señal emitían por si solas sin ningún reactivo añadido.

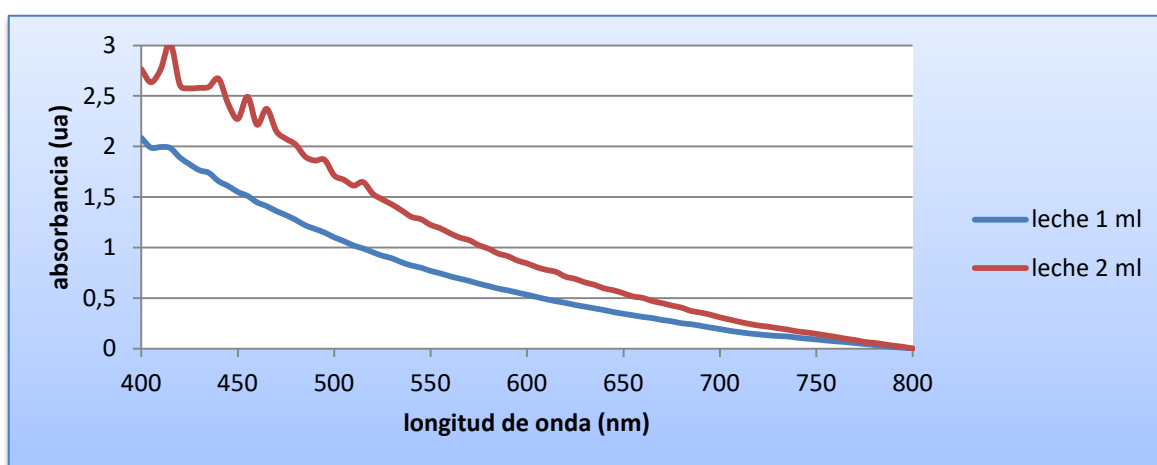


Figura 12. Espectros UV-Vis de leche en dilución 1:25 y 2:25 en agua destilada.

Tal y como se puede contemplar la leche por sí sola no desarrolla ningún máximo pero si proporciona una señal de fondo debida a la dispersión de la luz por las partículas en suspensión contenidas en esta matriz. Estas partículas en suspensión existen a pesar de haber centrifugado anteriormente la leche por lo que el fondo que se crea impide ver la verdadera señal que se obtiene con el reactivo Biuret, en consecuencia sería conveniente que el blanco de matriz contuviera leche.

A priori, un blanco no debería contener leche, ya que no puede contener el analito en cuestión, y teniendo en cuenta que el analito son las proteínas de la leche y no hay leche sin proteínas en principio no debería tener leche el blanco, sino como al comienzo se pensó, es decir agua destilada y los reactivos necesarios. Pero si el blanco de matriz no contuviera leche se estaría obviando por tanto el fondo que esta proporciona, dando lugar a resultados erróneos y a máximos no muy bien definidos como en la figura 11.

El contenido volumétrico que presentará por tanto cada blanco de matriz será:

Tabla 7. Contenido volumétrico de muestras y blancos con 1 y 2 ml

	Leche	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	NaOH	$\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Muestra 1	1 ml	1,5 ml	1 ml	6 ml
Blanco 1	1 ml	-	1 ml	6 ml
Muestra 2	2 ml	1,5 ml	1 ml	6 ml
Blanco 2	2 ml	-	1 ml	6 ml

A continuación se muestra un nuevo espectro, esta vez con un blanco de matriz adecuado a cada señal, con el fin de poder dilucidar que dilución será la más correcta finalmente.

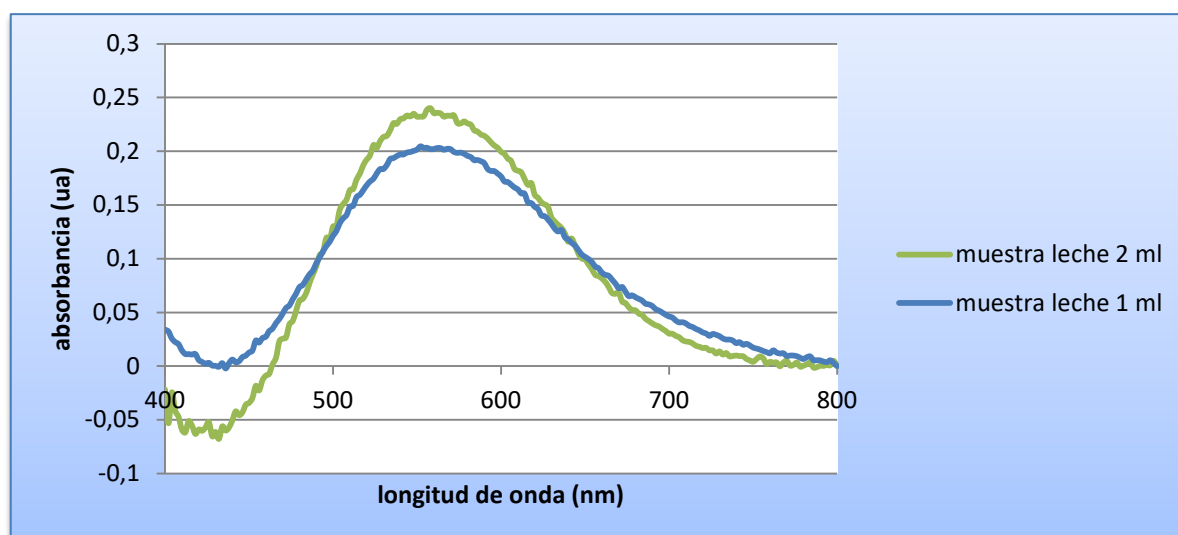


Figura 13. Espectros UV-Vis de muestras de leche con 1 y 2 ml, con la contribución de sus respectivos blancos restada.

En base a los resultados obtenidos se puede deducir que la dilución que más se ajusta es la de 2:25 ya que posee un espectro mejor definido, además de presentar un máximo no muy alto, para seguir añadiendo concentraciones de patrones en la recta de calibrado, pero no tan bajo como la señal que es proporcionada por la muestra en dilución 1:25. Por lo que se comprueba que las publicaciones de la bibliografía tienen razón en sus escritos. (Birghila, S.; 2015).

4.1.3. Optimización de la dilución de las muestras de leche entera y semidesnatada

La aplicación de esta optimización a otros tipos de leche con distintos contenidos proteicos como puede ser la leche entera o semidesnatada resultó algo más compleja. A continuación se muestran los espectros obtenidos para ambos tipos de leche en iguales condiciones que para la leche desnatada.

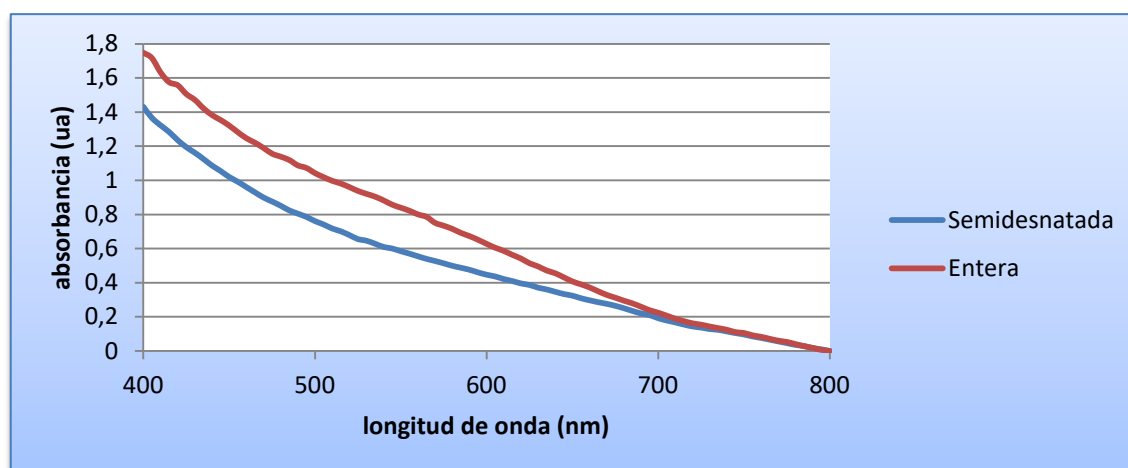


Figura 14. Espectros UV-Vis de leche semidesnatada y entera en dilución 2:25

Como se puede ver en el gráfico las señales obtenidas por ambos tipos de leche no presentan ningún máximo observable a la longitud de onda de 548 nm correspondiente a las proteínas. Esto se debe a que estos tipos de leche poseen un mayor contenido graso el cual no se elimina con tanta facilidad que con la leche desnatada en el proceso de centrifugación. Esta grasa proporciona una señal de fondo con una mayor intensidad que en la leche desnatada, lo que provoca que haya más partículas en suspensión en la disolución y por lo tanto una mayor turbidez imposible de eliminar, dificultando finalmente una clara señal por parte del detector. Para ahorrar problemas ambas variedades de leche quedaron fuera de este estudio.

4.2. Validación del método analítico

Se realizó la validación del método analítico para comprobar que el método de cuantificación proteica mediante el reactivo Biuret presenta características de desempeño adecuadas.

Para validar este método se estudió el rango dinámico lineal, el límite de detección y el límite de cuantificación de los blancos, la repetitividad y la reproducibilidad del método, la especificidad y por último un estudio de recuperación.

4.2.1. Rango dinámico lineal

Un rango dinámico lineal es un intervalo en el cual un método analítico determinado obtiene unos resultados aceptables. Este rango está determinado por el

límite de cuantificación (LOQ), como límite inferior, y por la última concentración a partir de la cual se encuentran variabilidades importantes, como límite superior.

Para la realización del rango dinámico lineal se elaboró una recta de calibrado de concentraciones perfectamente conocidas, estas concentraciones fueron 0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 2,4; 3,2; 4,0 y 4,8 mg/ml. Las tres últimas concentraciones de este gráfico no muestran linealidad sino mayores anomalías.

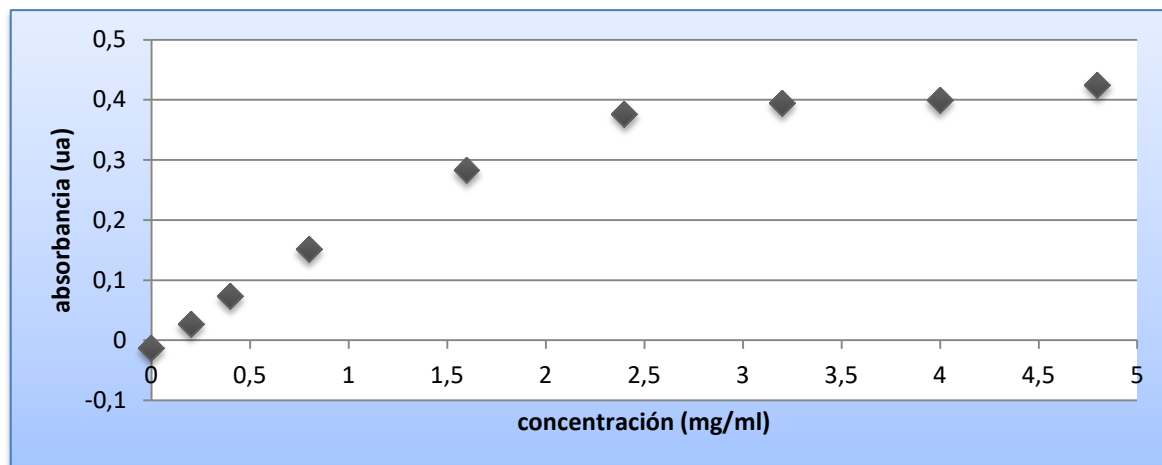


Figura 15. Curva de calibrado con caseína.

Para dilucidar que concentración sería la más adecuada como límite superior del intervalo dinámico lineal se procederá a un ajuste por mínimos cuadrados con el fin de observar el coeficiente de correlación partiendo de la concentración 0 mg/ml hasta las concentraciones de 1,6; 2,4 y 3,2 mg/ml que es donde se nota que puede haber una buena linealidad.

Tabla 8. Tabla con el coeficiente de correlación para distintas concentraciones medidas.

	1,6 mg/ml	2,4 mg/ml	3,2 mg/ml
Coeficiente de correlación	0,9857	0,9883	0,9488

El coeficiente de correlación obtenido en la concentración de 3,2 mg/ml es el más bajo lo que demuestra que no es muy lineal, lo que hace pensar que su ajuste no es correcto. Sin embargo las concentraciones de 1,6 y 2,4 mg/ml presentan un coeficiente de correlación más cercano a la unidad indicativo de su buena linealidad. Debido a que la segunda concentración, 2,4 mg/ml, presenta un punto más en la

recta de calibrado, su grafico aportará por tanto unos datos más reales y fiables en comparación con la concentración de 1,6 mg/ml a pesar de esta tener un coeficiente de correlación muy parecido.

En la siguiente figura se muestra el ajuste por mínimos cuadrados hasta la concentración de 2,4 mg/ml obteniendo la siguiente ecuación con un coeficiente de regresión lineal de 0,9883:

$$\text{Ecuación 3: } A = 0,1639 \cdot C + 0,0019$$

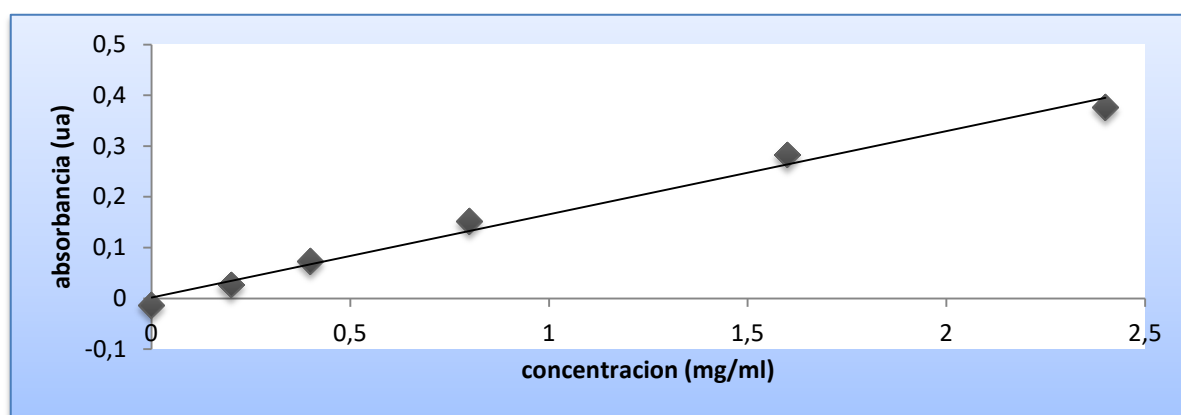


Figura 16. Recta de calibrado con caseína con concentraciones hasta 2,4 mg/ml.

Por tanto, el límite superior del rango dinámico lineal será 2,4mg/ml, y teniendo en cuenta la preparación de muestra utilizada y su procedimiento, esto correspondería a una concentración en leche de 30mg/ml.

4.2.2. Límite de detección y límite de cuantificación

Tanto para el límite de detección como para el de cuantificación se elaboró un blanco de reactivos, necesario para la recta de calibrado, y un blanco de matriz, necesario para las muestras. Como se ha dicho anteriormente la composición del blanco debería ser en principio solo blanco de reactivo pero la matriz es muy compleja debido al propio fondo que presenta y su turbidez, y puede tener una influencia, por eso se va a preparar ambos tipos de blancos. Para poder preparar los blancos de matriz lo que se hace es no introducir todos los reactivos para que el color no se pueda desarrollar, pero si añadir leche. En la siguiente tabla se muestran los reactivos y cantidades utilizados en cada caso.

Tabla 9. Composición de los blancos utilizados.

Composición	Leche	NaOH 2M	C ₄ H ₄ KNaO ₆ .4H ₂ O al 1%
Blanco de matriz	2 ml	1 %	6 %
Blanco de reactivo	--	1 %	6 %

Para la obtención de las concentraciones de los blancos se tuvo en cuenta la ecuación extraída de la recta de calibrado, ecuación 3. Se midieron un total de 10 repeticiones de blancos, tanto blancos de reactivos como blancos de matriz.

Tabla 10. Concentraciones obtenidas en mg/ml para los distintos blancos de reactivos y de matriz analizados.

	Blancos de reactivos	Blancos de matriz
Blanco 1	0,043	2,31
Blanco 2	0,051	2,36
Blanco 3	0,044	2,31
Blanco 4	0,046	2,35
Blanco 5	0,040	2,38
Blanco 6	0,045	2,36
Blanco 7	0,047	2,36
Blanco 8	0,048	2,39
Blanco 9	0,049	2,34
Blanco 10	0,055	2,38

El cálculo para estos límites, LOD y LOQ, se hizo según la ecuación 1 y 2 tal y como se dijo en el punto 2.5. Parámetros de validación. En la siguiente tabla se muestran los diferentes resultados obtenidos para los límites de detección y cuantificación.

Tabla 11. Límites de detección y cuantificación obtenidos para blancos de reactivos y de muestra analizados.

Blancos	Composición	Desviación estándar	LOD (mg/ml)	LOQ (mg/ml)
De reactivos	NaOH Tartrato	0,004	0,080	0,267
De matriz	Leche , NaOH Tartrato	0,03	6,34	21,12

Como se puede observar el límite de cuantificación obtenido en los blancos de reactivos no proporciona un límite fiable sino demasiado optimista, en cambio los límites de detección y cuantificación obtenidos en los blancos de matriz aumentan por la necesidad de tener que introducir la matriz objeto de estudio, que es la leche. Esta variabilidad en el caso de estos blancos o aumento en comparación con los blancos de reactivos es debida a que la leche posee demasiada turbidez y aunque esta se centrifuga, no se consigue eliminar completamente. Esta dispersión de la luz provoca una mayor variabilidad en la medida de la absorbancia consiguiendo en estos casos unos datos más reales y significativos para el estudio.

4.2.3. Repetividad y reproducibilidad

Para el estudio de la repetividad y reproducibilidad se hizo un estudio combinado de repetividad y precisión intermedia de cuatro replicas para cada patrón de caseína siendo las concentraciones 0,8; 1,6; 3,2 y 4 mg/ml durante tres días. Además se midió también una muestra por cuadruplicado con sus correspondientes blancos. A partir de los resultados obtenidos se pudo desarrollar por tanto el método ANOVA. A continuación se muestran todos los resultados obtenidos y sus correspondientes coeficientes de variación, los cuales vendrán dados en porcentaje:

Taba 12. Análisis de repetividad para distintas concentraciones conocidas de caseína y su absorbancia proporcionada.

Concentraciones	Día 1	Día 2	Día 3
0,8 mg/ml	0,145	0,150	0,150
	0,145	0,149	0,153
	0,148	0,150	0,145
	0,147	0,153	0,153
Coefficiente variación	1,120%	1,077%	2,245%
1,6 mg/ml	0,284	0,283	0,291
	0,289	0,284	0,289
	0,291	0,285	0,289
	0,291	0,291	0,290
Coefficiente variación	1,333%	1,183%	1,889%
3,2 mg/ml	0,403	0,376	0,391
	0,395	0,386	0,389
	0,397	0,387	0,377
	0,401	0,393	0,385
Coefficiente variación	0,878%	1,848%	1,575%
4 mg/ml	0,396	0,399	0,385
	0,391	0,385	0,384
	0,394	0,393	0,380
	0,396	0,387	0,396
Coefficiente variación	0,684%	1,657%	1,847%
Muestra	0,273	0,280	0,274
	0,273	0,267	0,279
	0,265	0,273	0,294
	0,278	0,272	0,288
Coefficiente variación	3,451%	3,270%	3,232%

Tal y como se puede observar todos los coeficientes de variación de los resultados obtenidos son muy buenos ya que a que en ningún caso se supera el 5% de variabilidad, pero de nuevo se observa mayor dispersión en la muestra debido a los efectos de la turbidez en comparación con los datos que proporcionan los patrones. A pesar de esta diferencia los resultados son aceptables. Esto proporciona un método analítico con una repetitividad adecuada y fiable para el fin propuesto.

A continuación se calculará la reproducibilidad con un estudio de precisión intermedia mediante un análisis de ANOVA, con el fin de hacer un estudio entre días para cada concentración. Pudiendo diferenciar así si hay diferencias notables para las concentraciones obtenidas en un mismo día o en varios días. El valor crítico de F para estos conjuntos de datos es: 4,3. Si el valor para F es mayor que la F crítica, se utilizará la siguiente ecuación para calcular la precisión intermedia:

$$\text{Ecuación 4: } S_{RW} = \sqrt{S_{entre}^2 + S_{dentro}^2}$$

Siendo S_{entre}^2 la varianza que hay entre días y S_{dentro}^2 la varianza que hay para un mismo día. Si por el contrario el valor para F es menor que la F crítica, el factor día no sería influyente en este estudio y por lo tanto para el cálculo de la precisión intermedia se consideraría el conjunto entero de datos como una sola población, según la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 5: } S_{RW} = \sqrt{S_{total}^2}$$

Tabla 13. Datos de estudio ANOVA y precisión intermedia.

Concentración	Desviación entre grupos	Desviación dentro de los grupos	Valor de F	Precisión intermedia
0,8 mg/ml	$4,5 \cdot 10^{-5}$	$5,8 \cdot 10^{-5}$	3,5	$3,0 \cdot 10^{-3}$
1,6 mg/ml	$4,5 \cdot 10^{-5}$	$7,3 \cdot 10^{-5}$	2,1	$3,0 \cdot 10^{-3}$
3,2 mg/ml	$4,8 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-4}$	4,2	$8,5 \cdot 10^{-3}$
4 mg/ml	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$2,8 \cdot 10^{-4}$	2,1	$6,1 \cdot 10^{-3}$
Muestra	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$4,1 \cdot 10^{-4}$	3,6	$8,2 \cdot 10^{-3}$

Teniendo en cuenta el valor de F, el cual fue menor que la F crítica, el cálculo de la precisión intermedia se realizó siguiendo la ecuación 5, donde el conjunto entero de datos fue considerado como una sola población.

4.2.4. Estudio de recuperación

Para la realización de este estudio de recuperación se fortificaron cuatro muestras de leche con un nivel de concentración de caseína. La concentración final a obtener de caseína fue 0,8 mg/ml lo que supone añadir una concentración de 10 mg/ml a la muestra inicial de leche. La muestra sin fortificar será aquella que no tenga ninguna concentración añadida de caseína, sino la propia que contenga la leche. El procedimiento a realizar para ambos será el descrito en el apartado 3.4.3. Preparación de la muestra, utilizando para ello blanco de matriz. Las concentraciones que se obtuvieron fueron las siguientes:

Tabla 16. Concentraciones obtenidas para una muestra sin fortificar y otra muestra fortificada de leche para distintas marcas comerciales

Marca Comercial	Concentración	Medidas (mg/ml)	Media (mg/ml)
Puleva	Sin Fortificar	1,40	1,39
		1,35	
		1,42	
	Fortificada 0,8mg/ml	2,26	2,20
		2,22	
		2,13	
Covap	Sin fortificar	1,42	1,42
		1,43	
		1,40	
	Fortificada 0,8mg/ml	1,86	1,93
		1,96	
		1,96	
Día 'Sin Lactosa'	Sin fortificar	1,32	1,36
		1,41	
		1,36	
	Fortificada 0,8mg/ml	1,83	1,86
		1,88	
		1,86	

Hacendado 'Sin Lactosa'	Sin fortificar	1,32	1,33
		1,36	
		1,29	
	Fortificada 0,8mg/ml	1,88	1,91
		1,89	
		1,99	

Ahora se aplica la siguiente ecuación para calcular la recuperación:

$$\text{Ecuación 6: } \% R = \left| \frac{C_F - C_I}{C_A} * 100 \right|$$

Siendo C_F la concentración fortificada, C_I la concentración sin fortificar y C_A la concentración añadida a la muestra, además este porcentaje vendrá dado en valor absoluto.

El citado estudio de recuperación se realizó a cuatro muestras diferentes sobre un nivel de concentración. Las medidas de cada muestra fortificada se hicieron por triplicado de modo que se puede establecer la desviación típica asociada al porcentaje de recuperación en un intervalo de confianza que se puede expresar como:

$$\text{Ecuación 7: } \text{Desviación} = \frac{\sqrt{D_F^2 - D_{SF}^2}}{C_A} * 100$$

Donde D_F^2 es el cuadrado de la desviación fortificada y D_{SF}^2 es el cuadrado de la desviación sin fortificar. C_A al igual que anteriormente se ha dicho es la concentración añadida a la muestra. En las siguientes tablas aparecerán los resultados obtenidos para la recuperación y su desviación asociada.

Tabla 17. Datos del porcentaje de recuperación y su desviación asociada para las cuatro marcas comerciales de leche analizadas.

Muestra	Puleva	Covap	Día 'Sin Lactosa'	Hacendado 'Sin Lactosa'
Fortificada 0,8mg/ml	101 ± 7	63 ± 10	62 ± 9	74 ± 2

En base a los resultados obtenidos se puede decir que a excepción de la leche Puleva el porcentaje de recuperación está algo bajo, posiblemente debido a pérdidas importantes en el proceso de centrifugación. Aunque también puede ser debido a las

interferencias de algunas sustancias, por eso a continuación se hará un estudio de interferencias, teniendo como influyentes a la lactosa y la grasa. El caso de la leche Puleva se puede explicar en base al contenido en sosa añadido a la leche, el cual pudiera ser mayor al de las otras tres marcas comerciales.

4.2.5. Especificidad

La especificidad para el método Biuret se estableció para dos parámetros esenciales que constituyen la leche, la grasa y la lactosa, siendo estos potenciales interferentes importantes en la matriz. Para poder definir correctamente la especificidad se va a establecer la cantidad máxima que se admite de cada uno de estos dos interferentes sin que esto produzca una alteración en la señal significativamente. Esta cantidad máxima o límite, definida como la tolerancia del método, será aquel que no proporcione una diferencia significativa con los datos que el método proporcione.

Influencia de la grasa

Para el estudio de la tolerancia del método a la presencia de grasa en la leche se prepararon disoluciones en agua con grasa con los niveles similares declarados en los tres tipos de leches existentes en el mercado (entera, semidesnatada y desnatada) con concentraciones del 3,5%; 1,6% y 0,5%. (Barreiro, F.J.M.; 2001). Estos preparados homogéneos o también llamados, muestras sintéticas serían la base del análisis, ya que contendría patrones con caseína y una concentración conocida de grasa simulando la leche además de los reactivos necesarios para la reacción de Biuret. Los blancos de estas disoluciones fueron blancos de reactivos con 2ml añadidos de la disolución de grasa en el nivel deseado. Para la preparación de estas muestras se utilizó mantequilla como sustitutivo de la grasa.

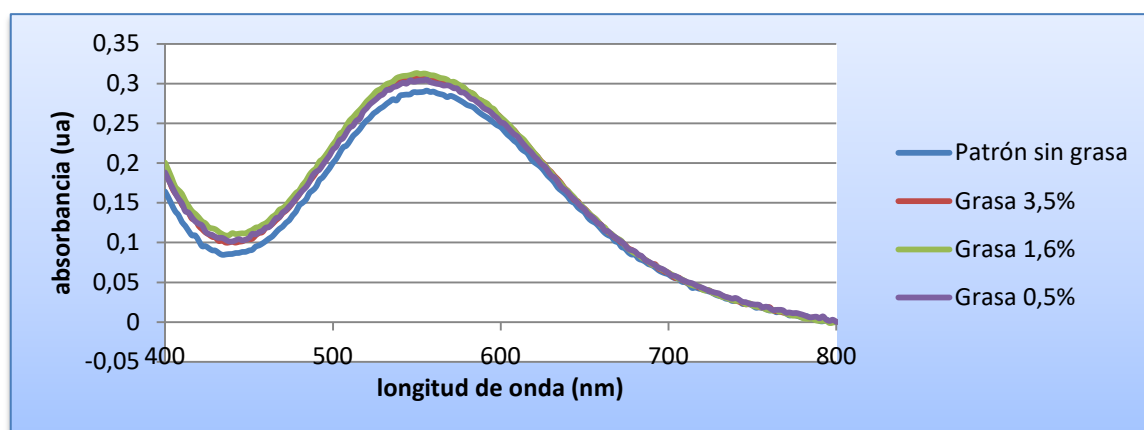


Figura 18. Espectros UV-Vis de muestras sintéticas de leche con distintos niveles de grasa y un patrón sin grasa.

Tal y como se puede observar parece ser que la grasa no influye significativamente en los espectros obtenidos en comparación con la muestra sin grasa. A continuación se muestra la cuantificación de la señal:

Tabla 15. Porcentaje de variación de la señal según contenido graso.

Grasa 3,5%	Grasa 1,6%	Grasa 0,5%
7,90 %	6,80 %	4,54 %

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y sabiendo que todos son menores al 10% se puede decir que la grasa no influye significativamente en el método. Esto puede ser debido a que en el proceso de centrifugación la grasa se acumulaba formando un bloque semisólido que no era recolectado junto con el sobrenadante para su homogeneización. Por lo tanto el nivel de tolerancia que se acepta para la grasa es del 3,5% correspondiente a la cantidad de grasa que posee la leche entera, donde cualquier tipo de leche que posea una concentración en grasa mayor a este porcentaje influirá significativamente en la señal obtenida. Este nivel de tolerancia no es del todo correcto ya que según se explicó en el apartado 4.1.3 Optimización de la dilución de las muestras de leche entera y semidesnatada, estos tipos de leche quedaban fuera del estudio por su alto contenido graso. Por lo que como conclusión final se puede decir que la grasa utilizada y los resultados que esta proporciona no se pueden equiparar al contenido graso real que contiene la matriz de la leche.

Interferencia de lactosa

Para el estudio de la tolerancia del método a la presencia de lactosa en leche se prepararon disoluciones en agua con lactosa de niveles similares y algo superiores a los que presenta la propia leche, con un 4, 6 y 8% de lactosa. (Agudelo, G.A.; 2005). Además se prepararon dos niveles más con un 0,4 y 0,2% de lactosa, es decir niveles que poseían unas concentraciones diez veces menores a los que presenta la propia leche. Estas muestras sintéticas también contuvieron patrones con caseína y una concentración añadida de lactosa simulando la leche además de los reactivos necesarios para la reacción de Biuret. Los blancos de estas disoluciones son como siempre blancos de reactivos con 2ml añadidos de la disolución de lactosa en el nivel deseado.

A continuación se muestran los espectros obtenidos para las tres concentraciones en comparación con un espectro de un patrón que no contiene lactosa añadida, el cual contiene caseína a la concentración de 1,6 mg/ml.

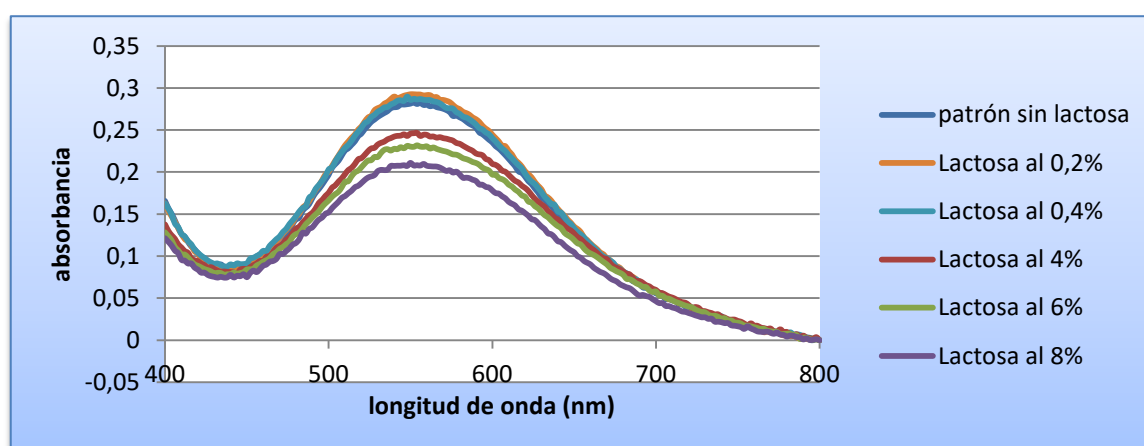


Figura 17. Espectros UV-Vis de muestras sintéticas de leche con diferentes concentraciones de lactosa y un patrón sin lactosa.

Parece que la lactosa influye provocando una disminución de la señal a la longitud de onda de medida. A continuación se muestra la cuantificación de la señal:

Tabla 14. Porcentaje de disminución de la señal según composición en lactosa.

Lactosa 0,2 %	Lactosa 0,4 %	Lactosa 4 %	Lactosa 6 %	Lactosa 8 %
0,45 %	1,10 %	20,58 %	24,42 %	32,25 %

En base a los resultados obtenidos se puede decir que la lactosa influye significativamente en la señal medida provocando un falso negativo. Por el contrario los espectros realizados con concentraciones diez veces menores a la que tiene la propia leche proporcionan espectros mejores, similares al patrón sin lactosa. En base a estos resultados se puede establecer un límite de tolerancia del 0,4 % donde cualquier tipo de leche que presente una concentración en lactosa mayor a este porcentaje, 1,10 %, influirá significativamente en la señal obtenida. Se comprueba por tanto lo que se dice en algunas referencias bibliográficas donde la lactosa influye significativamente en el análisis. (Keller, R.P.; 1966).

4.2.6. Resumen de los parámetros de validación

En la siguiente tabla se muestran todos los resultados obtenidos en los parámetros de validación del método analítico a modo de resumen. Siendo el rango dinámico lineal que se muestra el obtenido por la recta de calibrado y los límites de detección y cuantificación los proporcionados por los blancos de matriz. El conjunto de todos estos datos permite visibilizar fácilmente cuanto varía el método:

Tabla 18. Resumen de los parámetros de validación para una calibración con caseína.

Parámetros de validación		Resultados
Rango dinámico lineal		0,27 – 2,40 mg/ml
Límite de detección		6,34 mg/ml
Límite de cuantificación		21,12 mg/ml
Precisión intermedia	Concentración 0,8mg/ml	$3,0 \cdot 10^{-3}$
	Concentración 1,6mg/ml	$3,0 \cdot 10^{-3}$
	Concentración 3,2mg/ml	$8,5 \cdot 10^{-3}$
	Concentración 4 mg/ml	$6,1 \cdot 10^{-3}$
	Muestra	$8,2 \cdot 10^{-3}$

Recuperación	Fortificación 0,8 mg/ml	Puleva	Covap	Día “Sin lactosa”	Hacendado “Sin lactosa”
		101±7	63±10	62±9	74±2
Especificidad	Interferencia de lactosa	Nivel de tolerancia>0,4%			
	Interferencia de grasa	Nivel de tolerancia>2,5%			

4.3. Análisis de muestras comerciales de leche

A pesar de que durante la validación se ha demostrado que el método Biuret tiene unos porcentajes de recuperación muy bajos debidos a la interferencia de a lactosa que se ha detectado, este trabajo será completado aplicándolo a distintas muestras comerciales de leche entre las que se puede destacar marcas como Covap o Hacendado entre otras, además de la propia leche Puleva usada en la validación del método. Estos análisis se elaboraron por triplicado para cada una de las muestras empleadas.

Tabla 19. Concentraciones de distintas muestras comerciales obtenidas comparadas con sus valores declarados.

Marca comercial de leche	Valor declarado (g/100ml)	Concentración determinada (g/100ml)
Puleva	3,2	1,72
Covap	3,2	1,92
Hacendado	3,1	1,79
Día ‘Sin lactosa’	3,1	1,66
Hacendado ‘Sin lactosa’	3,2	1,66

Tras observar los resultados de estos cinco tipos de leche diferentes se puede decir que el método Biuret está limitado para la cuantificación de proteínas puesto que solo consigue cuantificar la mitad de las proteínas presentes debido a la interferencia de la lactosa la cual influye significativamente en todo el análisis. En el caso de la leche sin lactosa el contenido proteico cuantificado es menor aun en comparación con la leche con lactosa, pero sigue sin alcanzar el valor declarado. Esto último se debe a que para que la leche no contenga lactosa a esta se le añade la enzima responsable de su descomposición, la lactasa. Por lo tanto no es que desaparezca la lactosa de la leche sino que se descompone en sus dos azúcares más pequeños, glucosa y galactosa. Estos azúcares reductores se unen al cobre transformándolo a Cu^+ , formando un nuevo complejo provocando interferencias con el método Biuret, impidiendo la cuantificación de proteínas. (Moreano, P.M.M.; 2015)

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha realizado una validación analítica exhaustiva del método Biuret, basada en la formación de un complejo cuadrado-planar entre un residuo de un aminoácido y dos iones de cobre (Cu^{2+}) unidos mediante enlace peptídico, empleado para la determinación de proteínas totales en una matriz compleja como es la leche. Para ello se ha realizado un estudio sobre la influencia del blanco o del efecto matriz entre otros, además de algunos parámetros esenciales para la validación dicho método. En el efecto matriz se encontró una cuantía importante de problemas debido a la turbidez de la leche la cual posee una matriz muy compleja con numerosas partículas en suspensión que causan la desviación de la luz, con lo que se tuvo que realizar un blanco de reactivo o un blanco de matriz según el caso. Un aspecto relevante a destacar es la grave interferencia de la lactosa que lleva a porcentajes de recuperación inferiores al 80 % que hace que no sean admisibles para un método analítico. Cabe destacar también que debido a la cantidad de grasa que posee la leche semidesnatada o entera, el estudio estuvo limitado para leche desnatada solamente. Como conclusión final se ha de decir que el método Biuret empleado no es válido para la determinación de proteínas totales por sus numerosas limitaciones.

6. BIBLIOGRAFÍA

Agudelo, G.A., Bedoya, M.O. (2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista Lasallista de Investigación* 1 (2), 38-42.

Arajo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B* (877), 2224-2234.

Barreiro, F.J.M., Losada, P.F., Ruza, S.E. (2001). Valor de marca, calidad percibida y calidad real: un análisis comparativo del mercado de la leche. *Estudios Agrosociales y Pesqueros* 190, 195-221.

Birghila, S., Mirela, B.M., Prajitura, C., Nicoleta, R.F, Negreanu-Pirjol, T., (2015). Spectrophotometric Method for the Determination of Total Proteins in Egg White Samples. *Revista de Chimie (Bucharest)* 3 (66), 378-381.

Carratù, B., Boniglia, C., Scalise, F., Ambruzzi, A. M., Sanzini, E. (2003). Nitrogenous components of human milk: non-protein nitrogen true protein and free amino acids. *Food chemistry* 81, 357-362.

Chandran, S., Singh, R. S. P. (2007). Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Pharmazie* 62, 4-14.

Fondo Español de Garantía Agraria (FEGA). Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medioambiente. (2017). <https://www.fega.es/es/node/44809>

García, S.A.N. (2015). Estudio comparativo de composición química de leche (cabra y vaca). Empleando 3 métodos de hidrólisis proteica. Universidad de México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 2015. Tesis

Kangle, Z., Liqing, W., Zhangjing, H., Bin, Y., Yi, Y. (2017). Measurement of the total protein in serum by biuret method with uncertainty evaluation. *Measurement* 112, 16-21.

- Kamizake, N. K.K., Gonçalves, M .M., Zaia, C. T.B.V., Zaia, D. A. M. (2002). Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the kjeldahl method and spectrophotometric methods. *Journal of Food Compositionand Analysis* 16, 507-516.
- Keller, R.P., Neville, M.C. (1986). Determination of Total Protein in Human Milk: Comparison of Methods. *Clinical Chemistry* 1 (32), 120-123.
- Keller, R.P., Neville, M.C. (1966). Determination of Total Protein in Human Milk. *Clinical chemistry* 10 (32), 2003-2004.
- López, R.A.L., Barriga, V.D. (2016). La leche. Composición y características de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, 34p.
- Moreano, P.M.M. (2015). Determinación de azúcares reductores y su relación con carbohidratos no absorbidos en niños(a) del centro “María Montessori” del Cantón Latacunga en el periodo 2014-2015. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencias de la Salud.
- Morillas, P.P y colaboradores. (2016). Guía Eurachem. La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. Eurolab España (1ªed. 2016).
- Peters, F.T., Drummer, O. H., Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic science international* 165, 216-224.
- Verheul, F. E. A. M., Bosh, M. J. A., Cornelissen, P. J. H. C. (1986) Simplified and rapid methods for the determination of protein, fat and lactose in human milk and the energy intake by the breast-fed infant. *Journal clinical chemistry and clinical biochemistry* 19, 341-346.

Vinod P. S., Kamal K.M., Shrikant, D., McGilveray, L.J., Jerome, P.S, Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C.T., Cook, E., McDowall, R.D., Pittman, K.A., Sidney, S. (1992). Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies. *Journal of pharmaceutical sciences* 3 (81), 309-312.

Zaia, D.A.M., Zaia, C.T.B.V., Lichtig, Jaim. (1988). Determinação de Proteínas Totais Via Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos Métodos existentes. *Química nova* 21 (6), 787-793.