

# 7. Medida del pH: Disoluciones reguladoras. Precipitación isoeléctrica de la caseína

**José Peinado Peinado, Fermín Toribio Meléndez-Valdés**

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales,  
Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*

## RESUMEN

El pH de una disolución se puede medir experimentalmente usando indicadores coloreados o bien mediante un medidor electrónico (pH-metro) que proporciona una medida más precisa. En esta práctica vamos a usar dos indicadores, uno que cambia de color en la zona ácida (naranja de metilo) y otro que lo hace en la alcalina (fenolftaleína). La zona de cambio de color o zona de viraje depende del valor de la constante de acidez del indicador. Con un pH-metro mediremos de forma más exacta la concentración de protones de las soluciones. En esta práctica vamos a estudiar el comportamiento de diferentes disoluciones reguladoras frente a la adición de cantidades moderadas de ácidos y bases fuertes empleando como sistema de referencia el agua destilada. Mediremos el pH de cada disolución y observaremos las diferencias entre lo estimado con los indicadores y lo realmente medido con el pH-metro. Compararemos estos valores con los calculados para cada caso empleando la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

La capacidad tampón de las proteínas es debida a sus aminoácidos constituyentes y es mayor que la de los sistemas inorgánicos. Dependiendo del pH del medio en que se encuentren, los aminoácidos pueden tener carga negativa, positiva o compensada (igual número de cargas de ambos signos). La carga de una proteína va a depender del tipo de aminoácidos que la forman y del pH del medio en que se encuentre. El punto isoeléctrico (pI) es el pH para el cual una proteína presenta carga neta compensada (igual número de cargas positivas que negativas) y en el mismo, la solubilidad de la proteína es mínima.

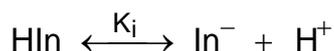
*Palabras clave:* Especies iónicas del ácido fosfórico, fenolftaleína, naranja de metilo, punto isoeléctrico

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El pH de una disolución se puede medir experimentalmente usando: a) indicadores coloreados y b) un medidor electrónico (pH-metro), que nos proporciona una medida mucho más precisa.

En esta práctica vamos a usar dos indicadores, uno que cambia de color en la zona ácida (naranja de metilo) y otro que lo hace en la alcalina (fenolftaleína). La zona de cambio de color o zona de viraje depende del valor

de la constante de acidez del indicador. Recordemos que los indicadores son sustancias orgánicas que presentan un débil carácter ácido-base:

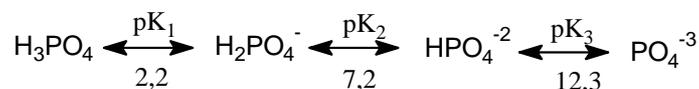


y además las formas conjugadas del par ácido-base presentan diferente color. En la tabla se indican las características de los indicadores que vamos a usar.

Indicador	pK <sub>a</sub>	Forma ácida (color)	Forma básica (color)
Naranja de metilo	3,7	rojo	amarillo
Fenolftaleína	8,9	incolore	rojo rosa

Con el pH-metro medimos de forma mucho más exacta la concentración de protones de una disolución. Se trata de un instrumento que nos mide la diferencia de potencial eléctrico en una pila electroquímica. El electrodo de medida de pH usado es el llamado electrodo de vidrio y su potencial frente al electrodo de referencia depende de la concentración de protones de la disolución en la que se encuentre sumergido.

Las disoluciones reguladoras de pH o tampones contienen simultáneamente las dos formas conjugadas de un par ácido-base de fuerza media ó débil y su pH apenas cambia cuando le añadimos cantidades moderadas de ácidos y/o bases fuertes. En esta práctica vamos a usar el sistema del ácido fosfórico como modelo:



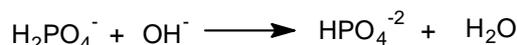
Para cualquier tampón, su pH dependerá de su pK y de la relación de concentraciones de las formas presentes en disolución, tal como nos indica la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$\text{pH} = \text{pK}_a - \log \frac{|\text{HA}|}{|\text{A}^-|}$$

Aplicada esta ecuación al sistema del fosfato que vamos a usar será:

$$\text{pH} = 7,2 - \log \frac{|\text{H}_2\text{PO}_4^-|}{|\text{HPO}_4^{2-}|} = 7,2 - \log \frac{|\text{moles de H}_2\text{PO}_4^- \text{ presentes}|}{|\text{moles de HPO}_4^{2-} \text{ presentes}|}$$

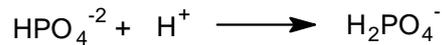
Al añadir una base fuerte (NaOH) tendrá lugar la reacción:



y el pH de la disolución resultante será mayor que el inicial y será:

$$\text{pH} = 7,2 - \log \frac{|\text{moles de H}_2\text{PO}_4^- - \text{moles de OH}^- \text{ añadidos}|}{|\text{moles de HPO}_4^{2-} + \text{moles de OH}^- \text{ añadidos}|}$$

Al añadir un ácido fuerte (HCl) tendremos:



y el pH disminuye:

$$\text{pH} = 7,2 - \log \frac{|\text{moles de H}_2\text{PO}_4^- + \text{moles de H}^+ \text{ añadidos}|}{|\text{moles de HPO}_4^{2-} - \text{moles de H}^+ \text{ añadidos}|}$$

Las proteínas son macromoléculas formadas por cadenas de  $\alpha$ -aminoácidos, unidos entre sí por enlaces peptídicos (amido) formados por condensación del grupo carboxilo de uno con el amino del otro. La secuencia (orden) en que se encuentran unidos los aminoácidos es característica de cada proteína. La capacidad tampón de las proteínas es debida a la estructura química de los aminoácidos; que son moléculas que poseen grupos carboxilo (ácidos) y amino (básicos) en su estructura molecular. Dependiendo del pH del medio en que se encuentren, los aminoácidos pueden tener carga negativa, positiva o compensada (igual número de cargas de ambos signos). Por tanto la carga de una proteína va a depender del tipo de aminoácidos que la forman y del pH del medio en que se encuentre. El punto isoeléctrico (pI) es el pH para el cual una proteína presenta carga neta compensada (igual número de cargas positivas que negativas) y en el mismo, la solubilidad de la proteína es mínima. A  $\text{pH} > \text{pI}$  la carga que presenta la proteína es negativa y a  $\text{pH} < \text{pI}$  la carga será positiva.

Los objetivos de esta práctica son:

- Medir el pH de distintas disoluciones
- Comprobar la función reguladora de las disoluciones tampones
- Estudiar la variación de la carga de la caseína con el pH y determinar su punto isoeléctrico

## 2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

- 2 Buretas de 25 ml y pipetas de 10 ml
- Gradilla con 8 tubos de ensayo de 15 ml
- Disolución de NaOH 0,2 M
- Disolución de HCl 0,2 M
- Disolución de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,2 M
- Disolución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 M
- Naranja de metilo
- Fenolftaleína
- Leche desnatada
- HCl 0,1 N
- NaOH 0,1 N
- Tubos de ensayo de 10 ml

### 3. PROTOCOLO A REALIZAR

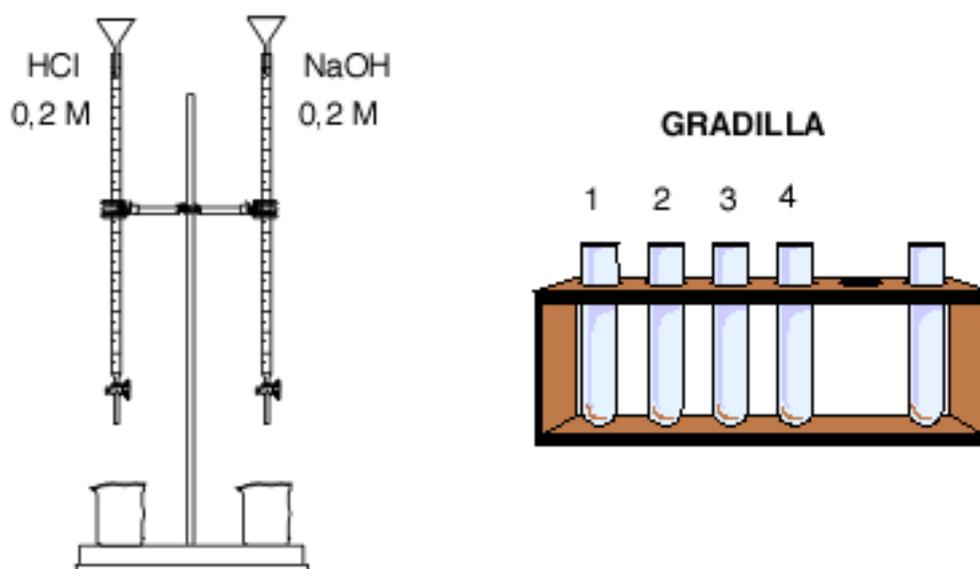
El desarrollo experimental consta de dos partes diferentes. En la primera vamos a estudiar el comportamiento frente a los ácidos y bases fuertes de sistemas tampón constituidos por sales del ácido fosfórico. En la segunda comprobaremos que la capacidad reguladora de las proteínas es mayor que la de los sistemas inorgánicos.

#### 3.1. Tampones de fosfato

Vamos a preparar en tubos de ensayo las disoluciones que se indican a continuación, para lo cual a cada tubo de ensayo le añadiremos lo siguiente:

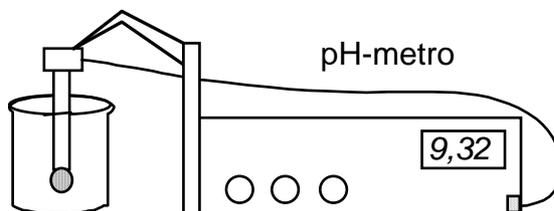
Tubo	pH*	Contenido
1	7,0	10 ml de agua + 1 gota de Naranja de metilo
2	4,8	5 ml de agua + 5 ml de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,2 M + 1 gota de Naranja de metilo
3	9,1	5 ml de agua + 5 ml de $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,2 M + 1 gota de Naranja de metilo
4	7,2	5 ml de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,2 M + 5 ml de $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,2 M + 1 gota de Naranja de metilo
5	7,0	10 ml de agua + 1 gota de Fenolftaleína
6	4,8	5 ml de agua + 5 ml de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,2 M + 1 gota de Fenolftaleína
7	9,1	5 ml de agua + 5 ml de $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,2 M + 1 gota de Fenolftaleína
8	7,2	5 ml de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,2 M + 5 ml de $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,2 M + 1 gota de Fenolftaleína

(\*).-Son valores aproximados no experimentales



A los tubos numerados del 1 al 4 le añadimos HCl 0,2 M desde la bureta, anotando el volumen de ácido necesario para hacer que el naranja de metilo cambie a rojo. Entonces el pH de la disolución será ligeramente inferior a 3,7. Igual haremos con los tubos numerados del 5 al 8, pero añadiendo desde la bureta NaOH 0,2 M. Cuando el indicador vire a rojo-rosado, el pH de la disolución será alrededor de 9,0. Los colores de cada tubo con especies de fosfato lo compararemos con el de los tubos de agua en cada caso. Observar

que los tubos con agua destilada, sólo necesitan una gota de ácido y/o base para hacer que tenga lugar el viraje del indicador en cada caso. Estos colores servirán para determinar el punto final de adición de ácido y/o base en los tubos con disoluciones tampón. Medir el pH de cada disolución usando el pH-metro, anotando el pH de cada tubo. Comprobaremos que el pH medido es distinto en cada tubo a pesar de que observemos colores idénticos. El pH inicial teórico de cada disolución se indica al pie de la tabla.



El uso del pH-metro es muy simple. Lavamos el electrodo con agua destilada y lo introducimos en la disolución cuyo pH queremos determinar, esperamos hasta que la lectura se mantenga estable y anotamos el valor. Después es necesario lavar de nuevo con agua destilada antes de realizar otra medida. Al final, una vez enjuagado de nuevo se introduce en su disolución de conservación.

### **CUESTIONES**

- 1.- Explicar el color rojo que se observa en el tubo 7 antes de añadir NaOH.
- 2.- ¿Por qué los tubos 2 y 6 tienen un pH ácido?
- 3.- ¿Por qué tenemos que añadir distintas cantidades de ácido a los tubos del 1 al 4 para llegar al mismo pH final?
- 4.- Teniendo en cuenta las concentraciones de las disoluciones usadas y los volúmenes de NaOH y HCl gastados según el caso, calcule de forma teórica el pH que deberían tener al final del experimento los tubos 4 y 8.

### **3.2. Capacidad reguladora de las proteínas**

Una vez estudiado el comportamiento del sistema fosfato vamos a observar que las proteínas necesitan una mayor cantidad de ácido y/o base fuerte para que varíe el pH de la disolución. Para ello emplearemos una muestra de leche que contiene caseína. La caseína (del latín *caseum* = queso) es una fosfoproteína presente en la leche de los mamíferos (es el 80% de las proteínas de la leche de vaca y el 50% de la humana). Por hidrólisis se obtienen 18 aminoácidos distintos y ácido fosfórico que en su mayor parte se encuentra esterificando el grupo hidroxilo de la serina, uno de sus aminoácidos constituyentes. La composición de esta proteína varía según su origen. La humana contiene del 14,9 al 15,1% de N y un 0,45% de P; la de vaca un 15,6% de N y 0,81% de P. Mediante distintos métodos (precipitación con HCl/etanol, ultracentrifugación, electroforesis..) se han podido separar distintas fracciones: caseína  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , que se diferencian por sus contenidos en azufre y fósforo y difieren en peso molecular.

Vamos a comprobar que la solubilidad de la caseína es mínima a un pH igual a su punto isoeléctrico. Para lo cual se seguirá el siguiente procedimiento:

Poner unos 3 ml de leche en un tubo de ensayo y añadir gota a gota HCl 0,1 N agitando tras cada adición hasta lograr la precipitación de las caseína. Mediremos el volumen de ácido añadido y el pH de tubo en ese momento. Anotar lo que ocurre cuando seguimos añadiendo más ácido. Añadir ahora disolución de NaOH 0,1 N y observar cómo precipitan de nuevo las proteínas y medir el pH del tubo. Observar qué ocurre si seguimos añadiendo NaOH.