



1. Título práctica de laboratorio:

DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE UNA DISOLUCIÓN USANDO EL ESPECTROFOTÓMETRO

Integrantes:

Código:

2. OBJETIVOS

General:

- Aprender a utilizar el espectrofotómetro para realizar medidas de diferentes diluciones con la finalidad de hallar la concentración de una sustancia o compuesto determinado.

Específicos:

- Aprender los principios básicos de la espectrofotometría UV visible.
- Conocer los componentes de un espectrofotómetro de un solo haz o de canal sencillo.
- Realizar la curva de calibración de una sustancia conocida.
- Determinar la concentración de una disolución o muestra problema.

3. REFERENTES CONCEPTUALES

Los métodos ópticos de análisis químico miden la radiación electromagnética que emite, absorbe o transmite la materia cuando su campo eléctrico o magnético interactúa con los mismos campos (eléctrico o magnético) de la radiación. Los átomos, moléculas o iones absorben energía luminosa (o radiante) y la almacenan en forma de energía interna lo que genera campos eléctricos o magnéticos en su estructura, los cuales a su vez interactúan de diversas formas frente a diferentes fuentes de radiación (Figura 1).

Dentro de los diferentes métodos ópticos se encuentran los métodos espectroscópicos que miden la radiación absorbida por la materia. La radiación absorbida puede ser de rayos X, de rayos ultravioleta o de luz visible o infrarroja, por ejemplo. La espectrofotometría es una técnica que, a una determinada longitud de onda, permite medir la intensidad de luz que una muestra absorbe y de este modo poder determinar la concentración del analito presente en ella, gracias a que las radiaciones electromagnéticas y la cantidad de luz absorbidas por la muestra, dependen en forma lineal de su concentración.

3.1. Espectrofotometría UV visible

Para analizar a nivel bioquímico biomoléculas se requiere del empleo de técnicas analíticas que permitan realizar determinaciones tanto cualitativas como cuantitativas, además de permitir su caracterización fisicoquímica y biológica.



La espectrofotometría ultravioleta (UV)-visible es un método basado en la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones electromagnéticas en la región ultravioleta (UV)-visible, cuando un haz de luz incide directamente sobre la muestra, lo que hace a su vez que las moléculas pasen de un estado energético basal (el de menor energía posible) a un estado excitado (estado de mayor energía). Lo que permite la determinación de la concentración de un analito en solución. La radiación electromagnética absorbida por una solución y la eficiencia de absorción, dependen de factores como la estructura atómica de la molécula, las condiciones del medio y la longitud de onda.

Cada molécula tiene una serie de estados excitados distintivos, por lo tanto, la absorción de la radiación electromagnética de una molécula a distintas longitudes de onda, representa su espectro de absorción (Roca, P., Oliver, J. & Rodríguez, AM, 2003).

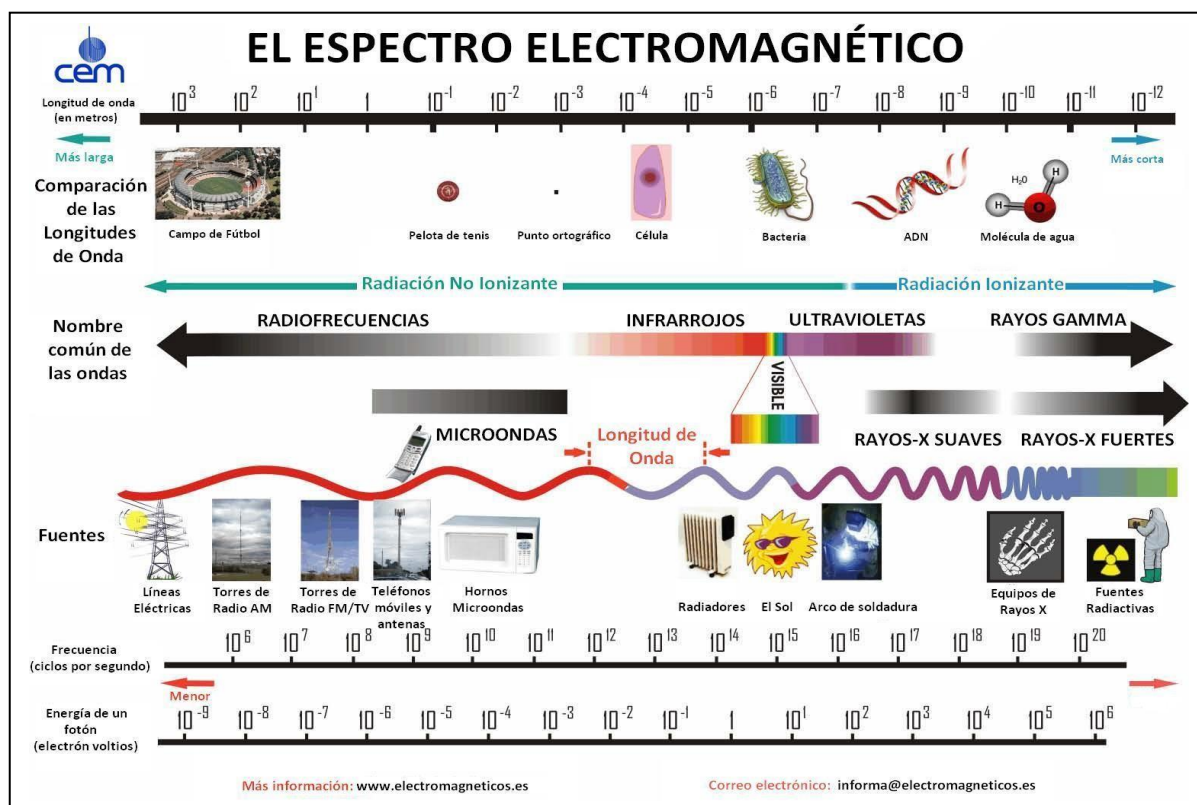


Figura 1: Espectro electromagnético

(Imagen tomada de: <https://deralaja.wordpress.com/2015/07/03/el-espectro-electromagnetico/>)

La región UV, con rangos de longitudes de onda entre 100 - 400 nm, permite la detección de compuestos como proteínas y ácidos nucleicos. En la región visible, con rangos de longitud de onda entre 380 - 750 nm (que inciden en la retina, permitiendo la percepción de los colores) se pueden determinar compuestos como azúcares, lípidos entre otros.

Para determinar el espectro de absorción de una muestra y su concentración dentro del



espectro UV-visible, se utiliza un instrumento denominado **espectrofotómetro**, que tiene la capacidad de medir la absorbancia de una solución, gracias a que cada analito absorbe o emite energía lumínica de una particular longitud de onda. La cantidad de luz transmitida por una muestra, se mide por el porcentaje de transmisión o transmitancia (%T):

$$\% T = I_t/I_o \times 100 \quad (\text{donde, } I_t \text{ es luz transmitida y } I_o \text{ es luz incidente})$$

Por el contrario, la luz absorbida por la muestra puede determinarse mediante la Absorbancia (A), que representa un valor logarítmico derivado del porcentaje de la transmitancia.

$$A = -\log_{10}/T \quad (\text{donde T es la transmitancia})$$

La cantidad de luz absorbida es directamente proporcional a la distancia recorrida por la luz a través de la solución y de la concentración del analito en la sustancia. Esta relación está determinada por la ley de *Lambert-Beer* la cual nos indica que la radiación absorbida por una solución, a una longitud de onda determinada, es directamente proporcional a su concentración (Roca, P., Oliver, J. & Rodríguez, AM, 2003).

3.2. Representación gráfica de resultados:

Una gráfica es la representación visual de la relación entre dos variables. Una variable es una característica que puede ser medida y por tanto puede cambiar su valor. Las variables pueden ser independientes o dependientes (Figura 2).

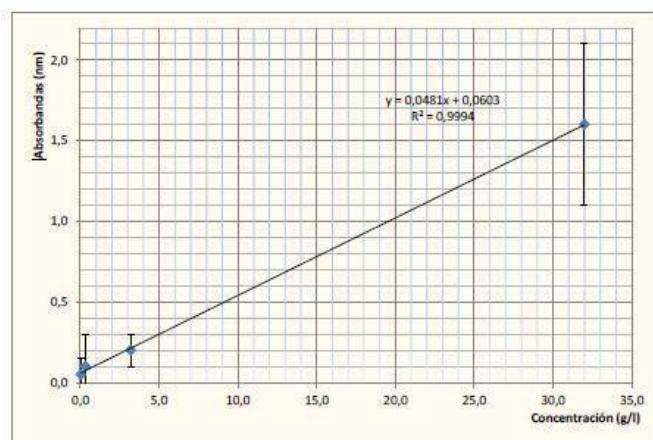


Figura 2. Representación gráfica de resultados. Una variable es independiente cuando la característica que mide no está siendo analizada y se suele representar en la horizontal de las gráficas o eje X. Por el contrario, la variable es dependiente cuando es justamente la característica que se está analizando y por tanto su valor es variable; se representa en la vertical de las gráficas o eje Y.

4. CONSULTA PREVIA

- Observe los siguientes videos:
 - ❑ Excitación electrónica: <https://www.youtube.com/watch?v=4jyfi28i928>
 - ❑ La ciencia de la luz: <https://www.youtube.com/watch?v=uH9RfOH9iA8>
 - ❑ ¿La luz es una partícula o una onda? <https://www.youtube.com/watch?v=J1yIApZtLos>
- Con lo aprendido en los videos, describa con sus propias palabras por qué la materia puede ser detectada y, de acuerdo a ello, cómo es posible determinar la concentración de una sustancia.



- Indique, tanto con palabras como con un esquema, cómo funciona un espectrofotómetro sencillo.
- ¿Qué entiende por curva de calibración? ¿Cómo se hace una curva de calibración?
- Investigue cómo realizar la ecuación de una recta en Excel y como determinar el valor de una variable por extrapolación sobre la recta.

5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Materiales y equipos por grupo de trabajo

- 5 microtubos de 1,5 ml
 - 1 gradilla para microtubos
- Para todo el grupo**
- 1 Espectrofotómetro
 - Micropipetas de 100 – 1000 μL
 - Cajas de puntas para micropipetas 100 – 1000 μL
 - Cubetas de espectrofotómetro

Reactivos

- 5 ml solución concentrada de colorantes: - Azul de metileno al 0,001%
- 10 ml de solución diluyente (agua destilada)
- 8 microtubos cada uno con 1 ml de disolución de azul de metileno con diferentes concentraciones (muestra problema)

Materiales que debe traer el estudiante

- Papel absorbente de cocina (Al menos 5 hojas por grupo).
- 1 Marcador para plástico o vidrio
- Elementos de bio-protección (gafas, cofia, tapabocas, guantes, bata, zapatos cerrados)

6. PROCEDIMIENTO

Al iniciar la práctica asegúrese de encender el espectrofotómetro 10 min antes de usarlo para que la lámpara de tungsteno se caliente.

6.1. Calibración del espectrofotómetro

- Seleccione la longitud de onda (650 nm si se utiliza azul de metileno).
- Coloque 1,0 ml de la solución blanco (agua destilada) en una de las cubetas del espectrofotómetro.
- Limpie el exterior de la cubeta con un paño o papel absorbente para eliminar líquidos y huellas dactilares.
- Verifique la dirección del haz de luz, coloque la cubeta en el compartimento de manera correcta y cierre la tapa del equipo con suavidad.
- Ponga el equipo a cero (0) de absorbancia y cien (100) de transmitancia.
- Retire la cubeta con el blanco.

6.2. Curva de calibración:

- Realice una dilución seriada, con 5 diluciones y un factor de dilución 1:2.



- Utilice una disolución stock/madre de azul de metileno, con una concentración inicial de 0.001%. Use agua destilada como diluyente.
- Coloque 1,0 ml de la primera dilución en una cubeta del espectrofotómetro.
- Inmediatamente el valor de absorbancia aparecerá en pantalla.
- Registre el valor de la absorbancia en la tabla de resultados correspondiente (Numeral 2.1. del informe, Tabla 1).
- Repita la medición de absorbancia con todas las diluciones.
- Realice la gráfica con la curva de calibración (ver numeral 2.2. del informe).

6.3. Determinación de concentración de muestra problema:

- Realice la calibración del espectrofotómetro como se describe en el numeral 6.1.
- Determine la absorbancia de la sustancia que el docente le entregará.
- Localice el dato de absorbancia de la muestra problema sobre la gráfica (numeral 6.2) y determine la concentración extrapolando sobre la curva de calibración.

Manejo de residuos: los residuos deben descartarse en recipiente verde (orgánico), gris (reciclable) y rojo (peligroso). Residuos de azul de metileno deben ir en recipiente para colorantes.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Jhonson T., Case, C. Laboratory experiments in microbiology. 6a. Edición. San Francisco (California USA). Ed. Addison Wesley Logman, Inc.; 2001.
- Roca P., Oliver J., Rodríguez A. Bioquímica: técnicas y métodos. 1ª. Edición. Madrid (España). Ed. Hélice. 2003. Pp. 79-84

8. GUÍA PARA LA REALIZACIÓN DEL INFORME DE LABORATORIO

- Para el informe de la práctica se presentará uno por grupo de trabajo (máximo 4 integrantes).
- **El día de la práctica se debe entregar este informe de laboratorio sin la gráfica, la cual deberá entregarse el día siguiente a la práctica (ver numeral 2.3 del informe).**
- A continuación, encontrará el formato para realizar el informe.

INFORME DE PRÁCTICA DE LABORATORIO

1. TÍTULO PRÁCTICA DE LABORATORIO: DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE UNA DISOLUCIÓN USANDO EL ESPECTROFOTÓMETRO .

Integrantes:	_____	Código:	_____
	_____		_____
	_____		_____
	_____		_____

1. CONSULTA PREVIA

Conteste en esta sección las preguntas del numeral 4 de la guía.

2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En esta sección desarrolle las actividades descritas en el numeral 6 de la guía.

Disolución	Absorbancia
1:2	
1:4	
1:8	
1:16	
1:32	

2.1. Tabla de resultados

Tabla 1. Datos para la curva de calibración.

2.2. Determinación de la concentración de una sustancia problema

Una vez medida la absorbancia de la sustancia problema, extrapole este dato en la curva de calibración y determine la concentración de la muestra problema. Realice la gráfica en Excel determinando la ecuación de la recta. La gráfica debe estar numerada y debe describir las variables relacionadas con sus respectivas unidades de medida.

3. CONCLUSIONES

Redacte un párrafo en el cual se describa la relación que puede existir entre la detección de la concentración de una sustancia y la práctica médica.

BIBLIOGRAFÍA

Ingrese la lista de referencias utilizadas para la resolución del informe. Cite de acuerdo con la norma Vancouver.