

# **Bioquímica Médica I**

**Jorge Contreras Pineda**

## **Práctica: Espectrofotometría**

### **GENERALIDADES:**

Un espectrofotómetro o colorímetro hace uso de la transmisión de la luz a través de una solución para determinar la concentración de un soluto dentro de la solución. Un espectrofotómetro difiere de un colorímetro en la manera en la cual la luz es separada en sus longitudes de onda componentes. Un espectrofotómetro usa un prisma y un colorímetro utiliza filtros.

Ambos se basan en un diseño simple en el cual la luz de una determinada longitud de onda pasa a través de una muestra y se mide la cantidad de luz que es transmitida. Esto es realizado colocando una fotocelda del otro lado de la muestra. Todas las moléculas absorben energía radiante en una longitud de onda u otra. Esas que absorben energía dentro del espectro visible son conocidos como pigmentos. Las proteínas y los ácidos nucleicos absorben luz en el rango ultravioleta.

El diseño de un espectrofotómetro incluye una fuente de luz, un prisma, un portaceldas y una fotocelda. Conectado a cada equipo se tienen apropiados sistemas eléctricos o mecánicos para controlar la intensidad luminosa, la longitud de onda, y para la conversión de energía recibida por la fotocelda en un cambio de voltaje. La fluctuación de voltaje es mostrada en una escala métrica, es presentada digitalmente, o es almacenada en una computadora para su posterior análisis.

Los espectrofotómetros son muy útiles por la relación de la intensidad de color en una muestra y su relación con la cantidad de soluto dentro de la muestra. Por ejemplo, si usted usa una solución de una sustancia roja en agua, y mide la cantidad de luz azul absorbida cuando atraviesa la solución, una fluctuación medible de voltaje puede ser inducida en una fotocelda. Si una solución roja es diluida a la mitad por la adición de agua, entonces el color será aproximadamente 1/2 de intenso y el voltaje generado en la fotocelda será aproximadamente la mitad. Es decir, hay una relación entre el voltaje y la cantidad de colorante en la muestra.

Dada la geometría de un espectrofotómetro lo que es medido en la fotocelda es la cantidad de luz que llega a la celda. El medidor de voltaje lee la cantidad de luz transmitida a la fotocelda. La transmisión de la luz no es una función lineal, es más bien una función de tipo exponencial.

Podemos monitorear el nivel de transmisión y convertirlo en un porcentaje de la cantidad de luz transmitida en comparación a cuando ningún colorante está presente.

Así, si la 1/2 de la luz se transmitió, entonces podemos decir que la solución tiene un porcentaje de transmitancia del 50 %. Note que es siempre un dato comparativo con una solución que no contiene colorante.

La transmitancia es el porcentaje de luz que pasa a través de una muestra.

Lo que hace a todo esto fácil de aplicar, es la conversión de esa información de porcentaje de transmitancia en una función logarítmica conocida como absorbancia (o densidad óptica).

### **La Ley de Beer-Lambert**

Definición

La absorbancia: Es el negativo del logaritmo en base 10 de la transmitancia.

$$A = -\log_{10} T$$

A=absorbancia

T=transmitancia

La absorbancia es más útil en espectrofotometría que la transmitancia, debido a que la representación gráfica de la concentración versus la absorbancia produce una línea recta. La representación gráfica de la concentración versus la transmitancia es exponencial. El  $-\log$  calcula el inverso de la transmitancia, de tal manera que la absorbancia aumenta con la concentración creciente de colorante. La transmitancia decrece cuando se aumenta la cantidad de colorante rojo en nuestro ejemplo.

La relación de la absorbancia con la concentración se encontró por dos bioquímicos que tiene la ecuación para una línea recta,  $y = mx + b$ , donde la  $m$  es la pendiente de la línea y  $b$  es la intercepción de la recta con el eje  $y$ . Si la medición se realiza de tal manera que  $b = 0$  (es decir, una solución que no contiene colorante no tiene absorbancia), y si sustituimos a absorbancia por  $y$ , entonces la concentración por  $x$ ,  $m$ , llegamos a la formulación de la Ley de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon Cl$$

Donde A = absorbancia

C = concentración molar

$\epsilon$  = el coeficiente de extinción molar para una determinada longitud de onda

l = distancia que atraviesa la luz por la muestra en centímetros

Los equipos y las celdas están diseñados de tal manera que l siempre es 1 cm y por tanto es ignorado.

Note que la pendiente de la línea recta resultará de la representación gráfica de la concentración (el eje vertical o Y) vs la absorbancia (el eje de las abscisas o X).

Para utilizar un espectrofotómetro hay que preparar una serie de diluciones con concentración conocida. Una de estas muestras no contendrá soluto y es conocido como el "BLANCO". Se usa para ajustar el instrumento para leer transmitancia del 100 % o 0 de absorbancia. En la práctica, un valor de transmitancia (la absorbancia infinita) de 0 % es establecido colocando un objeto opaco la fuente de luz y la fotocelda. El control electrónico es accionado a fin de que muestre una lectura de transmitancia de 0 %.. La muestra "BLANCO" (no contiene soluto o colorante) es colocada en el porta celda, y el espectrofotómetro reajustado para leer transmitancia de 100 %. Todas la demás medidas serán hechas solo por introducir las muestras en el porta celdas y medir el % de transmitancia. La mayoría de espectrofotómetros tienen sistema de conversión del % de transmitancia en absorbancia.

Después de registrar la absorbancia para una serie de muestras de concentración conocida (estándares), se hace una gráfica del valor de absorbancia (el eje vertical o Y) vs la concentración (el eje de las abscisas o X). La pendiente de la línea es el coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ).

Note que esto puede ser computado directamente por rearrreglo de la ley de Beer-Lambert, así:

$$\epsilon = A/C$$

Este valor puede calcularse para cada lectura y el promedio asumida como el valor de la pendiente. Recuerde que este valor es una constante. Así, una vez que se calcula, subsiguientemente puede usarse para determinar una concentración desconocida por un nuevo rearrreglo de la ley del Beer-Lambert

$$C=A/\epsilon$$

Cualquier valor de absorbancia puede ser fácilmente convertido a una concentración correspondiente solamente dividiendo la absorbancia por  $\epsilon$ .

El uso de la ley del Beer-Lambert es fácil de observar con coloraciones rojas. No es tan fácil visualizar, sin embargo, es preciso para medir longitudes de onda no visibles. Tanto longitudes de onda en el infrarrojo o ultravioleta (UV) pueden ser medidas. La UV es muy útil para los biólogos debido a que muchas moléculas (todas las proteínas y todos ácidos nucleicos) absorben luz ultravioleta. Los únicos cambios que se necesita hacer es el uso de celdas de cuarzo en lugar de celdas o tubos de vidrio o plástico. El vidrio y el plástico absorben la luz UV y por lo tanto son inapropiados para el uso en un espectrofotómetro UV. Un equipo capaz de utilizar luz visible (usualmente con una lámpara de tungsteno o halógeno) y luz UV es conocido como un espectrofotómetro UV/Vis.

## **EI ESPECTRO DE ABSORCIÓN:**

El análisis de pigmentos a menudo precisa un uso diferente de un espectrofotómetro. En la utilización del instrumento para la determinación de la concentración de una

sustancia(las Leyes de Beer-Lambert), la longitud de onda fue determinada y colocada en un valor a todo lo largo del procedimiento. Este valor es determinado por un análisis de la absorción de una solución variando la longitud de onda.

Independientemente del equipo utilizado, la línea de base debe ser continuamente fijada cada vez que la longitud de onda sea variada.

Al utilizar un espectrofotómetro con un solo portaceldas, el equipo es colocado en 0A/100%T con el “blanco”, la longitud de onda es colocada y luego la muestra es colocada y leída. La longitud de onda es variada por arriba o por abajo, el equipo es colocado en 0A/100%T con el “blanco”, se coloca la misma muestra y es leída. Este procedimiento se repite con todos los valores de longitud de onda que vayan a ser utilizados.

En este procedimiento, la muestra es la misma, pero la longitud de onda es variada. Los compuestos tienen diferentes coeficientes de absorción para cada longitud de onda. Así, cada vez que la longitud de onda es alterada, el instrumento debe ser recalibrado.

## OPERACIÓN DEL ESPECTROFOTÓMETRO UNICO™ SERIE 1100

### Principio de funcionamiento

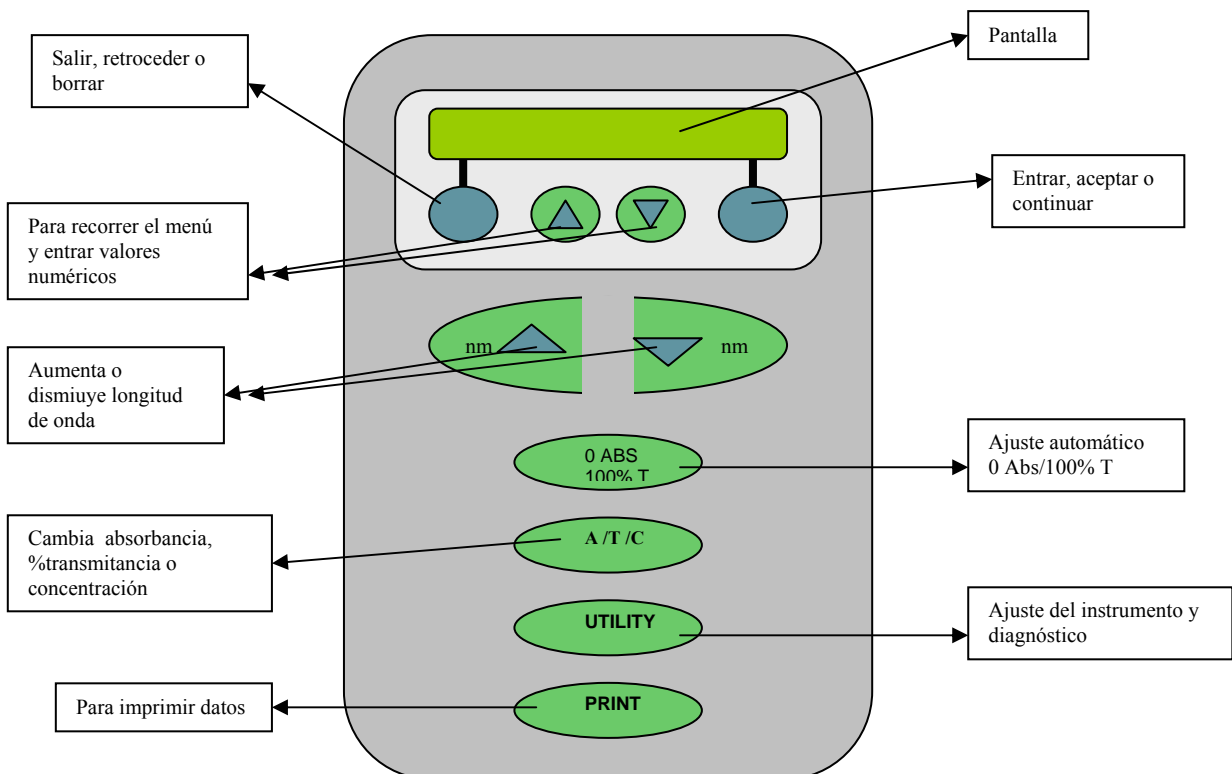
El espectrofotómetro consiste de 5 partes: Fuente de luz (lámpara de halógeno), prisma, portaceldas, detector y pantalla digital. El rango de longitud de onda está entre 335 y 1000 nm. El prisma permite aislar y obtener la longitud de onda de interés. El detector recibe y convierte la luz transmitida en una señal eléctrica. En la pantalla digital se muestra la absorbancia o la transmitancia.



## OPERACIÓN BÁSICA

1. Encienda el equipo y permita calentar por 15 minutos.
2. Seleccione transmitancia o absorbancia.
3. Seleccione la longitud de onda.
4. Prepare el "BLANCO", llene una celda o tubo y límpiela con un trozo de tela o papel. Siempre limpie las celdas o tubos antes de colocarlas en el porta celdas.
5. Inserte la celda en el porta celdas y ciérrelo.
6. Oprima el botón de ajustar 0 A/100% T.
7. Remueva el "BLANCO" y coloque otra celda con la solución a ser examinada.
8. Lea la transmitancia o absorbancia.

## OPERACIÓN DEL ESPECTROFOTÓMETRO GENESYS™ 20



## **OPERACIÓN BÁSICA PARA MEDICIÓN DE ABSORBANCIA Y %TRANSMITANCIA**

1. Asegúrese que el portacelda este vacío antes de encender el equipo.
2. Encienda el equipo y permita que caliente por 30 minutos.
3. Seleccione Absorbancia, %Transmitancia o Concentración
4. Seleccione la longitud de onda.
5. Inserte el “blanco” en el portaceldas y ciérrelo.
6. Ajuste 0A o 100%T
7. Remueva el “blanco” e inserte la muestra en el porta celdas. La medición de absorbancia o %Transmitancia aparece en la pantalla.

## **OPERACIÓN PARA MEDICIÓN DE CONCENTRACIÓN USANDO UN FACTOR**

1. IGUAL
2. IGUAL
3. Seleccione modo concentración
4. Seleccione longitud de onda
5. Oprima la tecla de función de factor
6. Seleccione el factor con la tecla para recorrer el menú y entrar valores numéricos. Finalmente oprima aceptar.
7. Inserte el “blanco” y oprima 0A/100%T.
8. Remueva el “blanco” e inserte la muestra. La concentración calculada aparece en la pantalla.

## **OPERACIÓN PARA MEDICIÓN DE CONCENTRACIÓN UTILIZANDO UN ESTÁNDAR**

1. Igual al anterior
2. Igual al anterior
3. Igual al anterior
4. Igual al anterior
5. Oprima la tecla de función estándar
6. Seleccione la concentración del estándar con la tecla para recorrer el menú y entrar valores numéricos. Finalmente oprima la tecla de **Fijar C** para calcular y ver el factor para el estándar seleccionado.
7. Remueva el estándar e inserte la muestra e el portaceldas. La concentración de la muestra aparece en la pantalla.

## PROCEDIMIENTO

### Materiales

Micropipetas P1000 y P200

Puntas azules y amarillas.

Agua destilada

Solución 1.0 M de  $\text{CuSO}_4$

Celdas o tubos de vidrio o plástico

Solución de  $\text{CuSO}_4$  de concentración desconocida

### CURVA ESPECTRAL Y DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE MÁXIMA ABSORBANCIA

1. Prepare una solución 200 mM de  $\text{CuSO}_4$ .
2. Ajuste el equipo para medir absorbancia.
3. Lea la absorbancia desde 400 nm hasta 800 nm a intervalos de 50 nm, es decir, 400, 450, 500, 550, etc. Con esta información realice una gráfica de longitud de onda en nm vs absorbancia. Eje X longitud de onda y eje Y absorbancia. Esto corresponde a una curva espectral, la longitud de onda máxima es aquella con la cual se determina el coeficiente de extinción molar utilizado para la determinación de concentraciones.
4. Asuma que la solución 1.0 M de  $\text{CuSO}_4$  corresponde a una solución 1 X, utilizando agua prepare 1 mL de diluciones simples 0,5 X, 0,2 X, 0,1 X y 0,05 X. Determine la concentración molar para cada dilución.
5. Mida la absorbancia para cada una de las soluciones y realice una gráfica de concentración vs absorbancia. En la parte de la curva que corresponde a una línea recta se puede determinar la concentración de una solución de  $\text{CuSO}_4$  desconocida. Si queda por abajo no es una información válida y nada por hacer, si queda por arriba se puede hacer una dilución y posteriormente el dato de absorbancia se puede multiplicar por el factor de dilución.
6. A partir de la solución 1.0 M de  $\text{CuSO}_4$ , utilizando agua prepare 1 mL de diluciones simples 1:2, 1:5, 1:10, 1:50, y 1:100. Determine la concentración molar para cada dilución.
7. Mida la absorbancia para cada una de las soluciones y realice una gráfica de concentración versus absorbancia. En la parte de la curva que corresponde a una línea recta se puede determinar la concentración de una solución de  $\text{CuSO}_4$  desconocida. Si queda por abajo no es una información válida y nada por hacer, si queda por arriba se puede hacer una dilución y posteriormente el dato de absorbancia se puede multiplicar por el factor de dilución.
8. A partir de la solución 1.0 M de  $\text{CuSO}_4$ , utilizando agua prepare 1 mL de diluciones seriadas 1:5, 1:25, 1:125, and 1:625 Determine la concentración molar para cada dilución.

9. Mida la absorbancia para cada una de las soluciones y realice una gráfica de concentración vs absorbancia. En la parte de la curva que corresponde a una línea recta se puede determinar la concentración de una solución de  $\text{CuSO}_4$  desconocida. Si queda por abajo no es una información válida y nada por hacer, si queda por arriba se puede hacer una dilución y posteriormente el dato de absorbancia se puede multiplicar por el factor de dilución.