

COLORIMETRÍA: ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LA RIBOFLAVINA

INTRODUCCION

La colorimetría es una de las técnicas empleadas con mayor asiduidad en los laboratorios de Bioquímica. Esta técnica suministra información cualitativa y cuantitativa sobre sustancias en disolución. El colorímetro es un instrumento diseñado para dirigir un haz de luz paralela monocromática a través de una muestra líquida y medir la intensidad del haz luminoso emergente.

La fracción de luz incidente absorbida por una solución a una longitud de onda está relacionada con el paso óptico y con la concentración de la especie absorbente. Estas dos relaciones están combinadas en la ley de Lambert-Beer:

$$\text{Log } I_0 / I = \epsilon \cdot c \cdot l$$

en donde I_0 e I son las intensidades de la luz incidente y emergente respectivamente, l el paso óptico de la muestra absorbente (cm), c la concentración de la especie absorbente (moles/litro) y ϵ el coeficiente de absorción molar ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). La expresión $\log I_0 / I$ se denomina absorbancia y se designa por A (siendo adimensional). Fijando el paso óptico (habitualmente 1 cm), resulta que la absorbancia A es directamente proporcional a la concentración del soluto absorbente. El coeficiente de absorción molar varía con la naturaleza del compuesto absorbente, el disolvente, la longitud de onda y también con el pH.

La aplicación obvia de la ley de Lambert-Beer es el uso del colorímetro para determinar la concentración de una gran variedad de moléculas que absorben luz (p. ej. Carotenos, clorofila, hemoglobina, etc.). La técnica se extiende a sustancias no coloreadas como azúcares o aminoácidos después de alguna reacción capaz de convertir sustancias incoloras en derivados coloreados.

Los espectros de absorción, gráficos que relacionan absorbancia con longitudes de onda, son frecuentemente utilizados en Bioquímica para la caracterización e identificación de biomoléculas.

En esta práctica se realizará un sencillo análisis espectrofotométrico de la vitamina riboflavina consistente en la obtención del espectro de absorción y construcción de una curva patrón para verificar la ley de

Lambert-Beer, calcular el coeficiente ϵ y determinar la concentración de una muestra de riboflavina de concentración desconocida.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Uso del colorímetro:

- 1-Encender el instrumento y esperar unos 10 minutos antes de proceder a la realización de medidas. A continuación seleccionar el modo Absorbancia.
- 2-Seleccionar la longitud de onda deseada . Ajustar el cero de absorbancia, usando para ello la cubeta del colorímetro con el disolvente de la muestra (el blanco) y presionando el botón de calibración.
- 3-A continuación se mide la absorbancia de la muestra utilizando la misma cubeta del colorímetro pero previamente bien lavada.
- 4-Para leer a otras longitudes de onda realizar los ajustes descritos en 2.

A) Espectro de absorción de riboflavina

- 1-Preparar 25 ml de riboflavina 50 μM en tampón fosfato 20 mM (pH 7,0).
- 2-Realizar medidas de absorbancia de la dilución de riboflavina contenida en el tubo 5 (de la curva estándar descrita posteriormente), en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 340 y 500 nm a intervalos de 10 nm, utilizando el tubo 1 para calibrar el colorímetro y tabular los resultados en la siguiente tabla.

Long. onda (nm)	Absorbancia	Long. onda (nm)	Absorbancia
340		430	
350		440	
360		450	
370		460	
380		470	
390		480	
400		490	
410		500	
420			

1- Realizar el espectro de absorción representando A frente a la correspondiente longitud de onda, λ .

2-Seleccionar el máximo de absorción (λ máx), a partir del espectro.

B) Curva estándar para la riboflavina

1-A partir de la solución madre de riboflavina (50 μM) preparar 6 diluciones, tal como se indica en la tabla siguiente.

Tubo (nº)	Riboflav. (ml)	Tampón (ml)	Concentración	Absorbancia
1	0	3		
2	0,5	2,5		
3	1	2		
4	1,5	1,5		
5	2	1		
6	2,5	0,5		

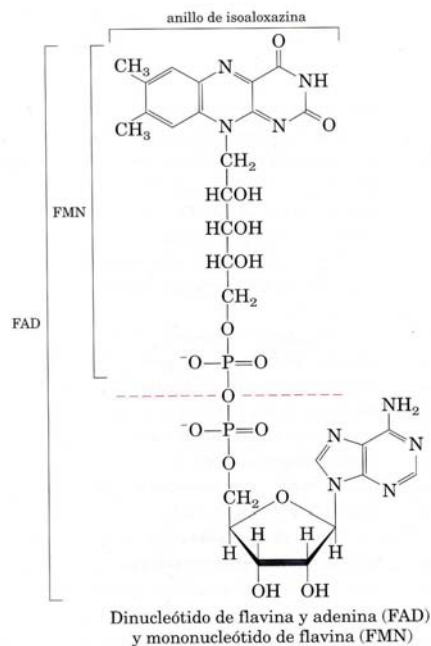
1-Calcular las concentraciones molares de riboflavina e incluirlas en la tabla anterior.

2-Medir la absorbancia de cada disolución a 450 nm y completar la tabla anterior incluyendo los resultados de esas medidas.

3-Construir la curva patrón representando A (450 nm) frente a las respectivas concentraciones. (En condiciones normales de laboratorio sería necesario realizar las determinaciones de las disoluciones de riboflavina por triplicado y representar la absorbancia promedio para cada concentración).

4-Calcular ϵ a partir de la curva estándar de riboflavina.

5-Determinar la concentración de una muestra problema suministrada por el instructor.



APENDICE

Deducción de la ley de Lambert-Beer: Cuando una intensidad de luz I atraviesa un espesor $d\chi$ de disolución coloreada de concentración c sufre una absorción dI proporcional al espesor, a la intensidad incidente y a la concentración de la disolución. Depende también de la naturaleza de la sustancia en estudio, lo que se refleja en un parámetro k característico.

$$-dI = I \cdot k \cdot c \cdot d\chi$$

El signo (-) indica que se pierde intensidad lumínica. Operando tenemos:

$$\frac{dI}{I} = -k \cdot c \cdot d\chi$$

e integrando entre el espesor cero (intensidad I_0) y el espesor l (intensidad I) se obtiene:

$$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -k \cdot c \cdot \int_0^l d\chi; \quad \ln \frac{I}{I_0} = -kcl \quad (1) \text{ o bien } \boxed{I = I_0 \cdot e^{-kcl}}$$

$$2,3 \log \frac{I_0}{I} = kcl \quad \log \frac{I_0}{I} = \frac{k}{2,3} cl \quad (1)$$

Se llama transmitancia (T) al cociente I/I_0 multiplicado por 100 y absorbancia (A) al logaritmo decimal del cociente I_0/I . Por tanto,

$$T = \frac{I \cdot 100}{I_0}; \quad A = \log \frac{I_0}{I} \quad \text{de donde } A = \log \frac{100}{T}; \text{ o bien } A = 2 - \log T$$

De la formula (1) podemos deducir.

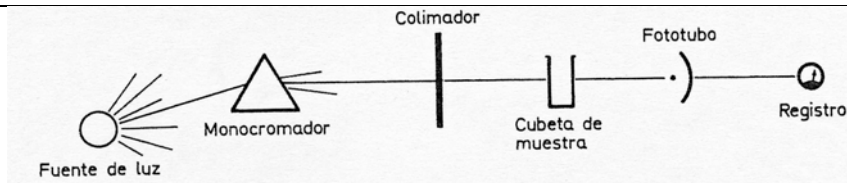
$$A = k' \cdot c \cdot l$$

k' es el coeficiente de absorción específico y puede medirse en diversas unidades. Si la concentración c se expresa en moles/litro, y la longitud l en cm, el coeficiente k' se convierte en ϵ (coeficiente de absorción molar).

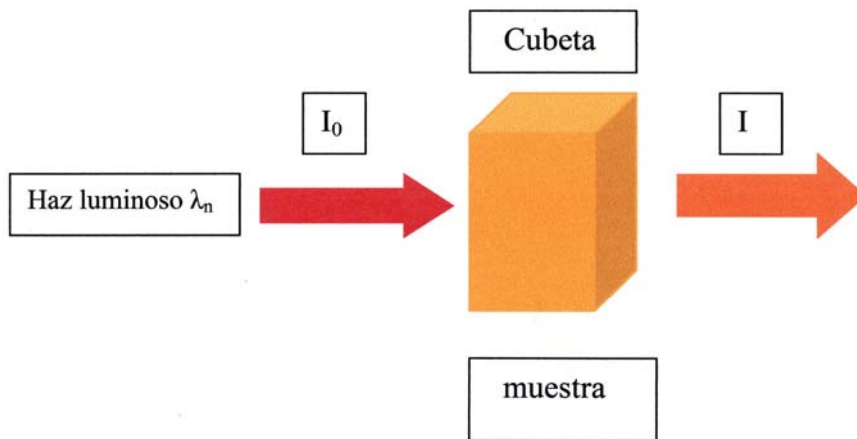
$$A = \epsilon \cdot c \cdot l. \quad (2)$$

Así definimos ϵ como la absorción de 1 cm de paso óptico de una disolución 1 M de la sustancia en estudio, a la longitud de onda elegida. La

ecuación (2) expresa de forma sencilla la ley de Lambert-Beer. Esta ley suele cumplirse mejor en las disoluciones diluidas que en las concentradas. Cuando no se conoce la masa molecular del soluto, la concentración se expresa en g/l ó en %; en consecuencia, debe utilizarse el coeficiente de absorción específica ($a_{1\%}$) ó ($a_1^{0/00}$).



Representación esquemática de un espectrofotómetro



Algunos valores de coeficientes de absorción molar (ϵ) útiles en bioquímica

Sustancia	λ (nm)	ϵ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)
NADH	340	$6,22 \cdot 10^3$
NADH	260	$15 \cdot 10^3$
NAD ⁺	260	$18 \cdot 10^3$
ATP	259	$15,4 \cdot 10^3$
AMP	260	$15,4 \cdot 10^3$
AMP	280	$2,5 \cdot 10^3$
GMP	260	$11,7 \cdot 10^3$
GMP	280	$7,7 \cdot 10^3$
CMP	260	$7 \cdot 10^3$
CMP	280	$8 \cdot 10^3$
UMP	260	$9 \cdot 10^3$
UMP	280	$7 \cdot 10^3$
FAD	450	$11,3 \cdot 10^3$
FAD	260	$37 \cdot 10^3$
FMN	450	$12,2 \cdot 10^3$
FMN	260	$27,1 \cdot 10^3$

