



UNIVERSIDAD NACIONAL DE
PIURA

FACULTAD DE CIENCIAS



ESCUELA PROFESIONAL DE FÍSICA

Laboratorio virtual de espectrofotometría UV-VIS

Docente:

Dr. Quispe Moreno, Gustavo

Alumnos:

Torres Tarrillo, Rober E.
Carcamo Calderon, Andri, J.

Piura, Diciembre 2025

Contents

1 RESUMEN	3
2 INTRODUCCIÓN	3
3 MARCO TEÓRICO	4
3.1 Espectrofotometría UV-VIS	4
3.2 Glucosa	4
3.3 Glucemia	4
3.4 Método de Lowry	4
3.5 Creatinina	5
4 Determinación de la concentración de glucosa por un método enzimático colorimétrico	6
4.1 Objetivos	6
4.2 Materiales	6
4.3 Procedimiento	7
4.4 Datos para la calibración	8
4.4.1 Cálculo de la concentración de glucosa	8
4.4.2 Resultados de Absorbancia	9
4.4.3 Regresión lineal de la curva de calibración	9
4.5 Muestras	11
4.5.1 Cálculo de la concentración de glucosa a partir de la absorbancia	11
4.5.2 Cálculo de la concentración de glucosa en las muestras originales	12
4.6 Resultados	12
4.7 Conclusiones	13
5 Determinación de la concentración de glucosa por un método enzimático colorimétrico	14
5.1 Objetivos	14
5.2 Materiales	14
5.3 Procedimiento	14
5.4 Calibración	15
5.5 Cálculo de la concentración de glucosa en las muestras problema	16
5.5.1 Suero A	16
5.5.2 Suero B	17
5.6 Conclusiones	17
6 Determinación de la concentración de proteínas por un método colorimétrico: método de Lowry	18
6.1 Objetivos	18
6.2 Materiales	18
6.3 Procedimiento	19
6.4 Datos experimentales	19
6.4.1 Curva de calibración con proteína patrón	20
6.5 Concentración real del patrón y concentración en los tubos de calibración	22
6.6 Cálculo de la concentración de proteínas en las muestras	22
6.6.1 Muestra A	23

6.6.2	Muestra B	23
6.7	Conclusiones	23
7	Referencias	24

1 RESUMEN

El laboratorio virtual de espectrofotometría UV-VIS se desarrolló mediante el uso de un simulador interactivo, el cual permitió comprender el funcionamiento del espectrofotómetro y aplicar sus principios en el análisis cuantitativo de sustancias bioquímicas. A través del simulador, se obtuvieron datos de absorbancia necesarios para la construcción de curvas de calibración y la determinación de la concentración de muestras problema, aplicando la ley de Beer-Lambert. Durante la práctica se realizaron ensayos colorimétricos para la determinación de glucosa, proteínas mediante el método de Lowry y creatinina, midiendo la absorbancia a longitudes de onda específicas para cada analito. Los resultados evidenciaron una relación directamente proporcional entre la absorbancia y la concentración dentro del rango de trabajo, lo que confirmó la utilidad de la espectrofotometría UV-VIS como una técnica confiable y ampliamente empleada en el análisis bioquímico. Asimismo, el laboratorio virtual permitió reforzar los conceptos teóricos y desarrollar habilidades analíticas sin la necesidad de un entorno experimental físico. **Palabras clave:** absorbancia, concentración, espectrofotometría UV-VIS, simulador virtual, análisis bioquímico.

2 INTRODUCCIÓN

Dentro de las técnicas analíticas instrumentales se encuentra la espectrofotometría UV-visible, la cual es una de las más empleadas en el ámbito bioquímico debido a su robustez, sencillez y confiabilidad, además de requerir una instrumentación de costo relativamente bajo. Esta técnica permite realizar tanto mediciones directas como aquellas acopladas a otros procesos analíticos, tales como la cromatografía, electroforesis y análisis de fluidos. Su importancia radica en la capacidad de identificar sustancias mediante su espectro de absorción y determinar cuantitativamente la concentración de compuestos presentes en solución, así como en el seguimiento y monitoreo de reacciones químicas y enzimáticas (Skoog et al., 2020).

A nivel mundial, diversas investigaciones han implementado la espectrofotometría UV-VIS como herramienta analítica fundamental en estudios bioquímicos y clínicos. Esta técnica ha sido utilizada para la cuantificación de proteínas mediante métodos colorimétricos, así como para la determinación de metabolitos de interés biológico. Por ejemplo, Flores Ramos y Ruiz Soto (2017) emplearon espectrofotometría UV-VIS para la cuantificación de proteínas, reportando parámetros analíticos como alta linealidad y límites de detección adecuados para el análisis de muestras biológicas. Asimismo, otros estudios han aplicado la espectrofotometría directa para la determinación de hemoglobina libre en plasma, permitiendo el monitoreo de procesos hemolíticos sin el uso de reactivos altamente tóxicos (C. et al., 2020). En el contexto latinoamericano, la espectrofotometría UV-visible ha sido ampliamente utilizada en investigaciones orientadas al análisis clínico y bioquímico. En Colombia, se ha aplicado esta técnica para la determinación cuantitativa de carboxihemoglobina en muestras de sangre, empleando longitudes de onda específicas que garantizan resultados confiables y reproducibles (Manrique et al., 2016). De igual manera, se ha utilizado para la evaluación del potencial irritante ocular de sustancias químicas y para la cuantificación de proteínas totales mediante métodos como Bradford, seguidos de análisis espectrofotométricos en el rango visible (Torres Cabra et al., 2013). Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente laboratorio virtual fue conocer y comprender los principios básicos de la espectrofotometría UV-VIS, así como aplicar esta

técnica para la cuantificación de distintas sustancias bioquímicas y el registro de espectros de absorción, mediante el adecuado manejo de un simulador virtual.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Espectrofotometría UV-VIS

La espectrofotometría UV-VIS es una técnica analítica ampliamente utilizada para la cuantificación de sustancias químicas y bioquímicas en solución. Su principio se basa en la absorción selectiva de radiación electromagnética por parte de una sustancia a una longitud de onda determinada. Según Skoog et al. (2020), “la espectrofotometría de absorción molecular mide la attenuación de la radiación incidente como resultado de la absorción por moléculas en fase líquida”. La relación entre absorbancia y concentración está descrita por la ley de Beer-Lambert, la cual establece que “la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración del analito y a la longitud del trayecto óptico” (Harris, 202). Este principio es la base para la construcción de curvas de calibración empleadas en el laboratorio virtual UV-VIS.

3.2 Glucosa

La glucosa es un monosacárido de seis átomos de carbono que desempeña un papel central en el metabolismo energético celular. Es la principal fuente de energía para los tejidos, especialmente el sistema nervioso central y los eritrocitos. La glucosa se obtiene a partir de la digestión de carbohidratos y de procesos metabólicos como la glucogenólisis y la gluconeogénesis. Su regulación es fundamental para mantener el equilibrio metabólico del organismo (Murray et al., 2021). En los ensayos espectrofotométricos, la glucosa puede determinarse mediante métodos enzimáticos que producen un compuesto coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra.

3.3 Glucemia

La glucemia se define como la concentración de glucosa en la sangre y constituye un indicador clave del estado metabólico y endocrino. En condiciones normales, los valores de glucemia se mantienen dentro de un rango estrecho gracias a la acción coordinada de hormonas como la insulina y el glucagón. Alteraciones persistentes en la glucemia pueden estar asociadas a patologías metabólicas, siendo la diabetes mellitus una de las más relevantes desde el punto de vista clínico y bioquímico (American Diabetes Association, 2024).

3.4 Método de Lowry

El método de Lowry es una técnica colorimétrica utilizada para la cuantificación de proteínas totales en muestras biológicas. Se basa en la reacción de los enlaces peptídicos con iones cúpricos en medio alcalino y en la posterior reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por aminoácidos aromáticos, generando un complejo coloreado azul. La absorbancia medida mediante espectrofotometría es proporcional a la concentración de proteínas presentes. A pesar del desarrollo de métodos más modernos, el método de Lowry sigue siendo ampliamente empleado por su alta sensibilidad (Sapan et al., 2020).

3.5 Creatinina

La creatinina es un producto final del metabolismo de la creatina fosfato en el músculo. Delanaye et al. (2022) indican que “la creatinina sérica es uno de los biomarcadores más utilizados para evaluar la función renal debido a su producción relativamente constante y su eliminación por filtración glomerular” . En análisis bioquímicos, la creatinina puede cuantificarse mediante métodos colorimétricos cuya absorbancia es directamente proporcional a su concentración, aplicando los principios de la espectrofotometría UV-VIS.

4 Determinación de la concentración de glucosa por un método enzimático colorimétrico

4.1 Objetivos

1. Construir la curva de calibración de glucosa utilizando disoluciones patrón y medir su absorbancia a 505 nm.
2. Ajustar los datos a una línea recta mediante regresión lineal para establecer la relación entre absorbancia y concentración de glucosa.
3. Determinar la concentración de glucosa en los tubos preparados con las muestras problema (tubos 6 a 11) utilizando la ecuación de la recta de calibración.
4. Calcular la concentración de glucosa en las muestras originales (A y B) corrigiendo por el factor de dilución de cada tubo.

4.2 Materiales

1. Dos muestras problema para la determinación de la concentración de glucosa.
2. Disolución patrón de glucosa, concentración 10 mg/dL.
3. Disolución salina de NaCl, concentración 0.9 g/L.
4. Reactivo cromógeno (R), que contiene:
 - Glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4).
 - Peroxidasa (EC 1.11.1.7).
 - Fenol.
 - 4-aminofenazona (PubChem CID: 6009; InChIKey: RMMXTBMQSGEXHJ-UHFFFAOYSA-N).
 - Tampón Tris 92 mM, pH = 7.4.
5. Espectrofotómetro ajustable a una longitud de onda de 505 nm.
6. Micropipetas de volumen variable P200 y P1000.
7. Tubos de ensayo.

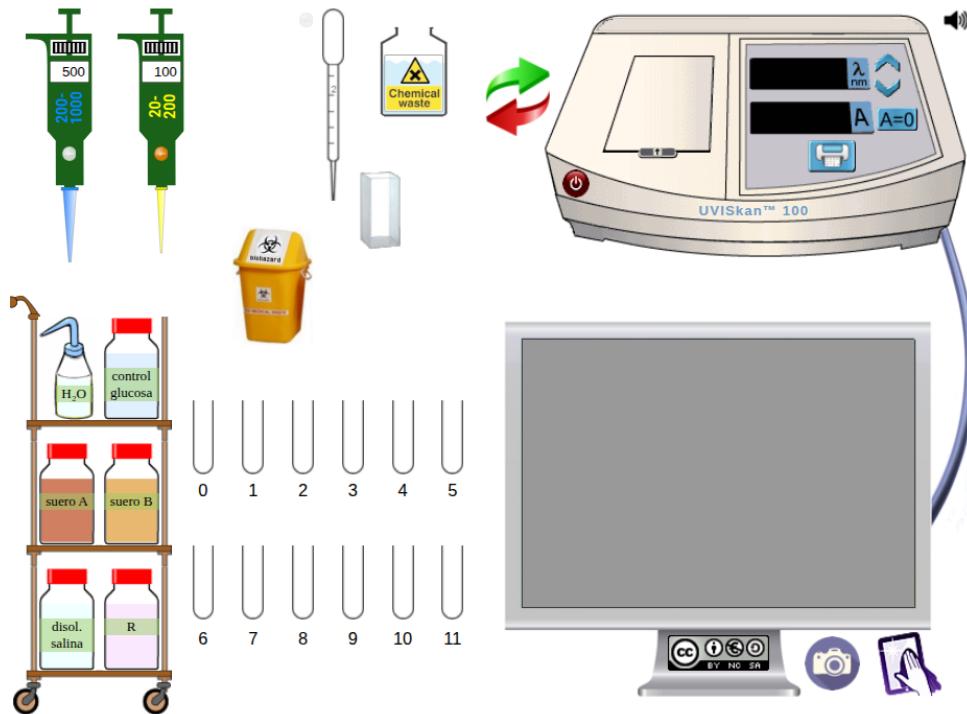


Figure 1: Materiales del laboratorio virtual.

4.3 Procedimiento

1. Encender el espectrofotómetro y dejarlo estabilizar durante unos minutos. Ajustar la longitud de onda a $\lambda = 505 \text{ nm}$.
2. Rotular doce tubos de ensayo del 0 al 11, correspondientes al blanco, los patrones de glucosa y las muestras problema.
3. Preparar el blanco (tubo 0) añadiendo $1000 \mu\text{L}$ de disolución salina de NaCl 0.9 g/L.
4. Preparar los tubos patrón de glucosa (tubos 1 a 5) pipeteando los volúmenes indicados de disolución patrón de glucosa (10 mg/dL) y completando hasta un volumen total de $1000 \mu\text{L}$ con disolución salina.
5. Preparar los tubos de las muestras problema (tubos 6 a 11) añadiendo los volúmenes correspondientes de las muestras A y B, y completando cada tubo hasta $1000 \mu\text{L}$ con disolución salina.
6. Añadir a cada tubo un volumen fijo de reactivo cromógeno (R), asegurando que el mismo volumen se agregue a todos los tubos, incluido el blanco.
7. Mezclar suavemente el contenido de cada tubo mediante agitación manual o con un vortex, evitando la formación de burbujas.
8. Incubar las mezclas durante el tiempo indicado por el método (por ejemplo, 10–15 minutos) a temperatura ambiente para permitir el desarrollo del color.
9. Ajustar el espectrofotómetro con el blanco (tubo 0) a absorbancia cero.

10. Medir la absorbancia de los tubos patrón (1 a 5) a $\lambda = 505$ nm y registrar los valores obtenidos.
11. Construir la curva de calibración graficando la absorbancia en función de la concentración de glucosa de los patrones y obtener la recta de aproximación.
12. Medir la absorbancia de las muestras problema (tubos 6 a 11) a $\lambda = 505$ nm.
13. Calcular la concentración de glucosa en cada tubo de muestra utilizando la ecuación de la recta de calibración.
14. Corregir la concentración obtenida en cada tubo por el factor de dilución correspondiente para determinar la concentración de glucosa en las muestras originales A y B.

4.4 Datos para la calibración

Tubo	Patrón de glucosa (μL)	Disolución salina (μL)
0	0	1000
1	30	970
2	90	910
3	150	850
4	300	700
5	500	500

Table 1: Preparación de los tubos patrón para la curva de calibración de glucosa (tubos 0–5).

4.4.1 Cálculo de la concentración de glucosa

La concentración del patrón madre de glucosa es:

$$C_0 = 10 \text{ mg/dL}$$

El volumen total en cada tubo es constante:

$$V_{\text{total}} = 1000 \mu\text{L}$$

La concentración de glucosa en cada tubo patrón se calcula mediante:

$$C_i = C_0 \frac{V_{\text{patrón},i}}{V_{\text{total}}}$$

Sustituyendo los valores experimentales:

$$C_i = 10 \frac{V_{\text{patrón},i}}{1000} \quad (\text{mg/dL})$$

La relación entre la absorbancia y la concentración está dada por la recta de calibración:

$$A = aC + b$$

donde a es la pendiente y b la ordenada al origen. Despejando la concentración:

$$C = \frac{A - b}{a}$$

Tubo	Patrón de glucosa (μL)	Disolución salina (μL)	Concentración (mg/dL)
0	0	1000	0.00
1	30	970	0.30
2	90	910	0.90
3	150	850	1.50
4	300	700	3.00
5	500	500	5.00

Table 2: Preparación de los tubos patrón y concentraciones de glucosa utilizadas para la curva de calibración.

4.4.2 Resultados de Absorbancia

Tubo	Concentración de glucosa (mg/dL)	Absorbancia (505 nm)
0	0.00	0.000
1	0.30	0.058
2	0.90	0.159
3	1.50	0.261
4	3.00	0.519
5	5.00	0.835

Table 3: Absorbancia medida a 505 nm en función de la concentración de glucosa para los tubos patrón.

4.4.3 Regresión lineal de la curva de calibración

A partir de los datos experimentales de concentración de glucosa C y absorbancia A , se realiza un ajuste lineal del tipo:

$$A = aC + b$$

El número de puntos experimentales es:

$$n = 6$$

Los valores promedio de las variables son:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = 1.7833 \text{ mg/dL}$$

$$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i = 0.3053$$

Las sumas necesarias para la regresión lineal se definen como:

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = 18.0683$$

$$S_{yy} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$$

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = 3.0169$$

La pendiente de la recta de calibración se obtiene mediante:

$$a = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} = 0.16697$$

La ordenada al origen está dada por:

$$b = \bar{y} - a\bar{x} = 0.00756$$

Por lo tanto, la ecuación final de la recta de calibración es:

$$A = 0.16697 C + 0.00756$$

El coeficiente de determinación se calcula como:

$$R^2 = \frac{S_{xy}^2}{S_{xx} S_{yy}} = 0.9995$$

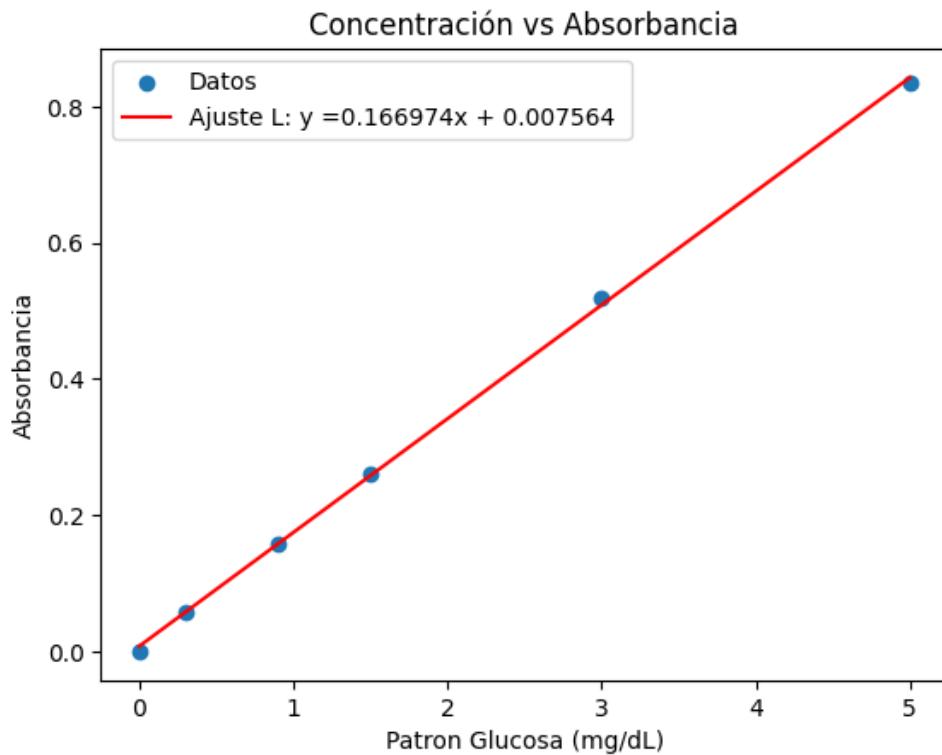


Figure 2: Regresión lineal de la curva de calibración.

4.5 Muestras

Tubo	Muestra A (μL)	Disolución salina (μL)
6	80	920
7	40	960
8	20	980

Table 4: Preparación de los tubos correspondientes a la muestra A.

Tubo	Muestra B (μL)	Disolución salina (μL)
9	200	800
10	400	600
11	700	300

Table 5: Preparación de los tubos correspondientes a la muestra B.

4.5.1 Cálculo de la concentración de glucosa a partir de la absorbancia

La concentración de glucosa en cada tubo correspondiente a las muestras problema se obtiene despejando la concentración a partir de la ecuación de la recta:

$$C_{\text{tubo}} = \frac{A - b}{a} \quad (1)$$

Así para los datos se tiene

Tubo	Muestra A (μL)	Concentración en el tubo (mg/dL)
6	80	7.76
7	40	3.91
8	20	1.91

Table 6: Concentración de glucosa en los tubos correspondientes a la muestra A.

Tubo	Muestra B (μL)	Concentración en el tubo (mg/dL)
9	200	0.06
10	400	0.02
11	700	0.09

Table 7: Concentración de glucosa en los tubos correspondientes a la muestra B.

4.5.2 Cálculo de la concentración de glucosa en las muestras originales

La concentración de glucosa en la muestra original se obtiene aplicando la ecuación:

$$C_{\text{muestra}} = C_{\text{tubo}} \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{muestra}}} \quad (2)$$

donde:

- C_{tubo} es la concentración de glucosa calculada en el tubo de ensayo a partir de la curva de calibración,
- $V_{\text{total}} = 1000 \mu\text{L}$ es el volumen total del tubo,
- V_{muestra} es el volumen de muestra añadido al tubo.

4.6 Resultados

Tubo	Muestra A (μL)	Concentración en el tubo (mg/dL)	Concentración real (mg/dL)
6	80	7.76	97.0
7	40	3.91	97.8
8	20	1.91	95.5

Table 8: Concentración de glucosa en los tubos y concentración final en la muestra A.

Muestra A (tubos 6–8) Promedio de la muestra A: $\bar{C}_A \approx 96.8 \text{ mg/dL}$

Muestra B (tubos 9–11) Promedio de la muestra B: $\bar{C}_B \approx 0.167 \text{ mg/dL}$

Tubo	Muestra B (μL)	Concentración en el tubo (mg/dL)	Concentración real (mg/dL)
9	200	0.063	0.315
10	400	0.021	0.0525
11	700	0.093	0.133

Table 9: Concentración de glucosa en los tubos y concentración final en la muestra B.

4.7 Conclusiones

1. **Construcción de la curva de calibración:** La curva de calibración permitió correlacionar de manera directa la absorbancia medida con la concentración de glucosa en los tubos patrón.
2. **Ajuste lineal:** El ajuste de los datos a una línea recta fue adecuado, obteniendo la ecuación $A = 0.16697C + 0.00756$, que sirve para estimar concentraciones en tubos con muestras problema.
3. **Determinación en los tubos problema:** Las concentraciones calculadas en los tubos 6 a 11 muestran que las muestras se encuentran dentro del rango medible por la curva de calibración, permitiendo su cuantificación precisa.
4. **Concentración en las muestras originales:** Aplicando el factor de dilución, se obtuvieron las concentraciones finales de glucosa: $\bar{C}_A \approx 96.8 \text{ mg/dL}$ y $\bar{C}_B \approx 0.167 \text{ mg/dL}$, mostrando que la muestra A es significativamente más concentrada que la B.

5 Determinación de la concentración de glucosa por un método enzimático colorimétrico

5.1 Objetivos

1. Determinar la concentración de glucosa en muestras de suero sanguíneo mediante un método espectrofotométrico basado en la reacción enzimática glucosa oxidasa-peroxidasa y la ley de Lambert–Beer.
2. Calcular la glucemia de los sueros problema (A y B) a partir de la comparación de sus absorbancias con un control patrón de glucosa, considerando las diluciones aplicadas durante el procedimiento experimental.

5.2 Materiales

1. Dos muestras de suero en las que se quiere determinar la concentración de glucosa.
2. Disolución control de glucosa (o patrón), con concentración verificada de 100 mg/dL.
3. Disolución salina: NaCl 0.9 g/L.
4. Reactivo cromógeno (R), que contiene:
 - (a) Glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4).
 - (b) Peroxidasa (EC 1.11.1.7).
 - (c) Fenol.
 - (d) 4-aminofenazona (PubChem CID: 6009; InChIKey: RMMXTBMQSGEXHJ-UHFFFAOYSA-N).
 - (e) Tampón Tris 92 mM, pH = 7.4.

5.3 Procedimiento

1. Conectar el espectrofotómetro y ajustar la longitud de onda a 505 nm.
2. Tener en cuenta las siguientes notas importantes:
 - (a) El control de glucosa se analiza por triplicado (tubos 1, 2 y 3).
 - (b) Las diluciones del suero no se realizan manualmente en el laboratorio virtual; sin embargo, se aplican internamente. Aunque la pipeta tome la muestra del frasco sin diluir, el contenido de los tubos 7 y 10 se considera diluido 1/2, y el de los tubos 8 y 11 diluido 1/5.
3. Empleando las micropipetas de volumen variable P200 y P1000, preparar en tubos de ensayo las mezclas indicadas.
4. Una vez preparados todos los tubos, añadir 2 mL del reactivo cromógeno a cada uno y esperar 15 minutos virtuales para el desarrollo de la reacción.

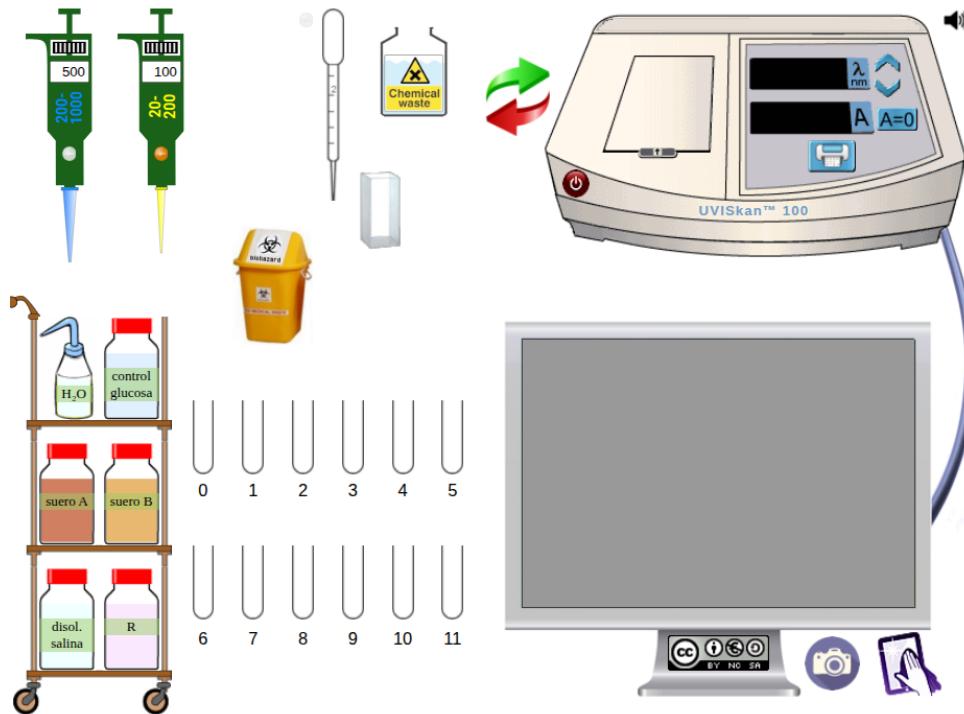


Figure 3: Materiales del laboratorio virtual.

5. Transferir con una pipeta Pasteur el contenido del tubo n.^o 0 a la cubeta del espectrofotómetro, introducir la cubeta en el equipo y pulsar el botón “A = 0” para ajustar el blanco. Retirar la cubeta y vaciarla.
6. Transferir el contenido del tubo n.^o 1 a la cubeta, introducirla en el espectrofotómetro y anotar el valor de absorbancia en el cuaderno de laboratorio. Si se desea, pulsar el botón correspondiente para registrar la lectura en la pantalla inferior.
7. Repetir el procedimiento descrito en el paso anterior para el resto de los tubos.
8. Construir una tabla con todas las medidas de absorbancia obtenidas. Opcionalmente, utilizar el botón correspondiente para copiar el listado de valores.

5.4 calibración

Tubo	Concentración de glucosa (mg/dL)	Absorbancia (505 nm)
1	100	0.322
2	100	0.321
3	100	0.321

Table 10: Tabla de calibración espectrofotométrica (tubos 0 a 3) con valores de absorbancia medidos a 505 nm.

Con estos datos la media de la absorbancia es:

$$\bar{A}_{\text{control}} = \frac{0.322 + 0.321 + 0.321}{3} = \frac{0.964}{3} = 0.321$$

La concentración de glucosa se calcula por comparación con el control patrón, según:

$$c = \frac{A}{\bar{A}_{\text{control}}} \times c_{\text{control}}$$

donde $\bar{A}_{\text{control}} = 0.321$ y $c_{\text{control}} = 100 \text{ mg/dL}$.

Tubo	Absorbancia (505 nm)	Concentración de glucosa (mg/dL)
1	0.322	100.3
2	0.321	100.0
3	0.321	100.0

Table 11: Concentración de glucosa calculada para los tubos control (1 a 3).

5.5 Cálculo de la concentración de glucosa en las muestras problema

La concentración de glucosa se calcula empleando la ley de Lambert–Beer:

$$A = \varepsilon \cdot L \cdot c$$

donde A es la absorbancia, ε es el coeficiente de extinción molar, L es la longitud del camino óptico y c es la concentración. Dado que ε y L se mantienen constantes para todas las mediciones, la concentración de glucosa se determina por comparación con el control patrón:

$$c = \frac{A}{\bar{A}_{\text{control}}} \cdot c_{\text{control}}$$

donde $\bar{A}_{\text{control}} = 0.321$ y $c_{\text{control}} = 100 \text{ mg/dL}$. En todos los casos se emplea un volumen de muestra de $20 \mu\text{L}$, al que se añaden 2 mL de reactivo cromógeno.

5.5.1 Suero A

Tubo	Volumen de muestra (μL)	Absorbancia (505 nm)	Concentración de glucosa (mg/dL)
6	20	0.488	152.0
7	20	0.249	77.6
8	20	0.085	26.5

Table 12: Volumen empleado, absorbancias medidas y concentraciones de glucosa calculadas para el suero A.

La concentración del suero de partida se calcula como:

$$c_A = \frac{152.0 + (77.6 \times 2) + (26.5 \times 5)}{3} = \frac{152.0 + 155.2 + 132.5}{3} = 146.6 \text{ mg/dL}$$

5.5.2 Suero B

Tubo	Volumen de muestra (μL)	Absorbancia (505 nm)	Concentración de glucosa (mg/dL)
9	20	0.480	149.5
10	20	0.231	71.9
11	20	0.085	26.5

Table 13: Volumen empleado, absorbancias medidas y concentraciones de glucosa calculadas para el suero B.

La concentración del suero de partida se calcula como:

$$c_B = \frac{149.5 + (71.9 \times 2) + (26.5 \times 5)}{3} = \frac{149.5 + 143.8 + 132.5}{3} = 141.9 \text{ mg/dL}$$

5.6 Conclusiones

- Se cumplió el objetivo de determinar la concentración de glucosa en muestras de suero sanguíneo mediante un método espectrofotométrico basado en la reacción enzimática glucosa oxidasa-peroxidasa y la aplicación de la ley de Lambert–Beer.
- Se alcanzó el objetivo de calcular la glucemia de los sueros problema A y B a partir de la comparación de sus absorbancias con un control patrón de glucosa, teniendo en cuenta las diluciones aplicadas durante el procedimiento experimental.

6 Determinación de la concentración de proteínas por un método colorimétrico: método de Lowry

6.1 Objetivos

1. Determinar la concentración de proteínas en muestras problema mediante el método colorimétrico de Lowry, utilizando seroalbúmina bovina como proteína patrón.
2. Establecer una curva de calibración a partir de soluciones patrón de albúmina y emplearla para calcular la concentración de proteínas en las muestras de partida A y B a partir de sus valores de absorbancia.

6.2 Materiales

1. Dos muestras problema en las que se desea determinar la concentración de proteínas.
2. Disolución patrón de seroalbúmina bovina (BSA), concentración 2 g/L.
3. Reactivo C, preparado mezclando los reactivos A, B1 y B2 en proporción 100 : 1 : 1 (v/v).
4. Reactivo A: carbonato sódico (Na_2CO_3) al 2% en hidróxido sódico (NaOH) 0.1 M.
5. Reactivo B1: sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 1%.
6. Reactivo B2: tartrato sódico-potásico al 2%.
7. Reactivo de Folin–Ciocalteau diluido 1/4 en agua.

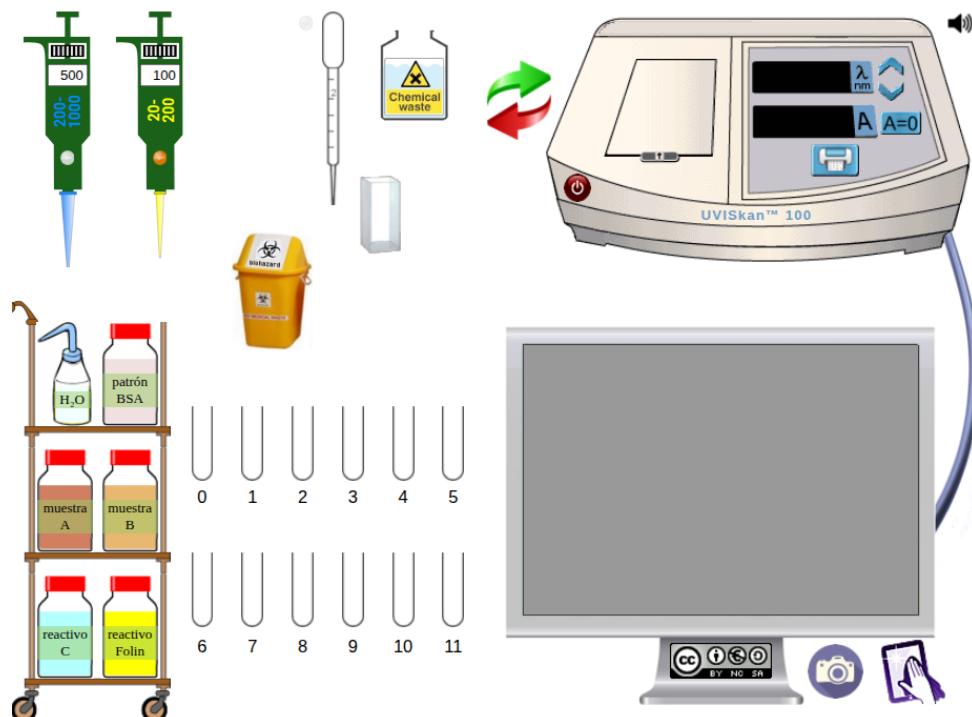


Figure 4: Materiales del laboratorio virtual.



Figure 5: Compuestos reales.

6.3 Procedimiento

1. Se conecta el espectrofotómetro y se ajusta la longitud de onda a 580 nm.
2. Empleando micropipetas P200 y P1000, se preparan los tubos de ensayo con un volumen total de 400 μL según la Tabla 14.
3. A cada tubo se añaden 2 mL del reactivo C y se deja reaccionar durante 10 minutos virtuales.
4. Posteriormente, se añaden 200 μL del reactivo de Folin–Ciocalteau diluido a cada tubo y se espera 15 minutos virtuales para el desarrollo del color.
5. El contenido del tubo 0 se transfiere a la cubeta del espectrofotómetro y se ajusta el blanco pulsando “A = 0”.
6. Se mide la absorbancia de los tubos restantes (1 a 9) y se registran los valores obtenidos.

6.4 Datos experimentales

Las absorbancias se miden a una longitud de onda de $\lambda = 580 \text{ nm}$. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 15.

Tubo	BSA (μL)	Muestra (μL)	Agua (μL)
0	0	—	400
1	30	—	370
2	60	—	340
3	90	—	310
4	120	—	280
5	150	—	250
6	—	120 (A)	280
7	—	200 (A)	200
8	—	120 (B)	280
9	—	200 (B)	200

Table 14: Preparación de tubos para la determinación de proteínas por el método de Lowry.

Tubo	Absorbancia (580 nm)
1	0.233
2	0.445
3	0.612
4	0.798
5	0.850
6	0.306
7	0.458
8	0.760
9	0.436

Table 15: Valores de absorbancia obtenidos para el método de Lowry.

6.4.1 Curva de calibración con proteína patrón

La concentración de proteína en cada tubo patrón se calcula a partir de la disolución de BSA de 2 g/L y el volumen total de 400 μL .

Tubo	Concentración de proteína (g/L)	Absorbancia (580 nm)
0	0.00	0.000
1	0.15	0.233
2	0.30	0.445
3	0.45	0.612
4	0.60	0.798
5	0.75	0.850

Table 16: Datos de calibración para el método de Lowry empleando albúmina bovina como patrón.

Para la curva de calibración del método de Lowry se ajusta una recta de la forma:

$$A = m c + b$$

donde A es la absorbancia y c la concentración de proteína (g/L). El ajuste se realiza mediante el método de mínimos cuadrados, definiendo las siguientes magnitudes:

$$\bar{c} = \frac{1}{n} \sum c_i \quad \bar{A} = \frac{1}{n} \sum A_i$$

$$S_{xx} = \sum (c_i - \bar{c})^2 \quad S_{xy} = \sum (c_i - \bar{c})(A_i - \bar{A})$$

A partir de los datos de calibración (tubos 1 a 5):

c (g/L)	A
0.15	0.233
0.30	0.445
0.45	0.612
0.60	0.798
0.75	0.850

con $n = 5$, se obtienen los valores medios:

$$\bar{c} = 0.45 \quad \bar{A} = 0.588$$

A continuación, se calculan las sumas:

$$S_{xx} = (0.15 - 0.45)^2 + (0.30 - 0.45)^2 + (0.45 - 0.45)^2 + (0.60 - 0.45)^2 + (0.75 - 0.45)^2 = 0.225$$

$$S_{xy} = (0.15 - 0.45)(0.233 - 0.588) + (0.30 - 0.45)(0.445 - 0.588) + \\ (0.45 - 0.45)(0.612 - 0.588) + \\ (0.60 - 0.45)(0.798 - 0.588) + (0.75 - 0.45)(0.850 - 0.588) = 0.236$$

La pendiente de la recta se calcula como:

$$m = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} = \frac{0.236}{0.225} = 1.05$$

La ordenada al origen se obtiene mediante:

$$b = \bar{A} - m \bar{c} = 0.588 - (1.05)(0.45) = 0.12$$

Por lo tanto, la ecuación de la recta de calibración es:

$$A = 1.05 c + 0.12$$

Para R^2 Se tiene:

$$S_{yy} = \sum (A_i - \bar{A})^2$$

Usando $\bar{A} = 0.588$, se obtiene:

$$S_{yy} = (0.233 - 0.588)^2 + (0.445 - 0.588)^2 + (0.612 - 0.588)^2 + (0.798 - 0.588)^2 + (0.850 - 0.588)^2 = 0.259$$

$$R^2 = \frac{S_{xy}^2}{S_{xx} S_{yy}}$$

Sustituyendo los valores obtenidos:

$$R^2 = \frac{(0.236)^2}{(0.225)(0.259)} = 0.96$$

Por lo que es un buen ajuste.

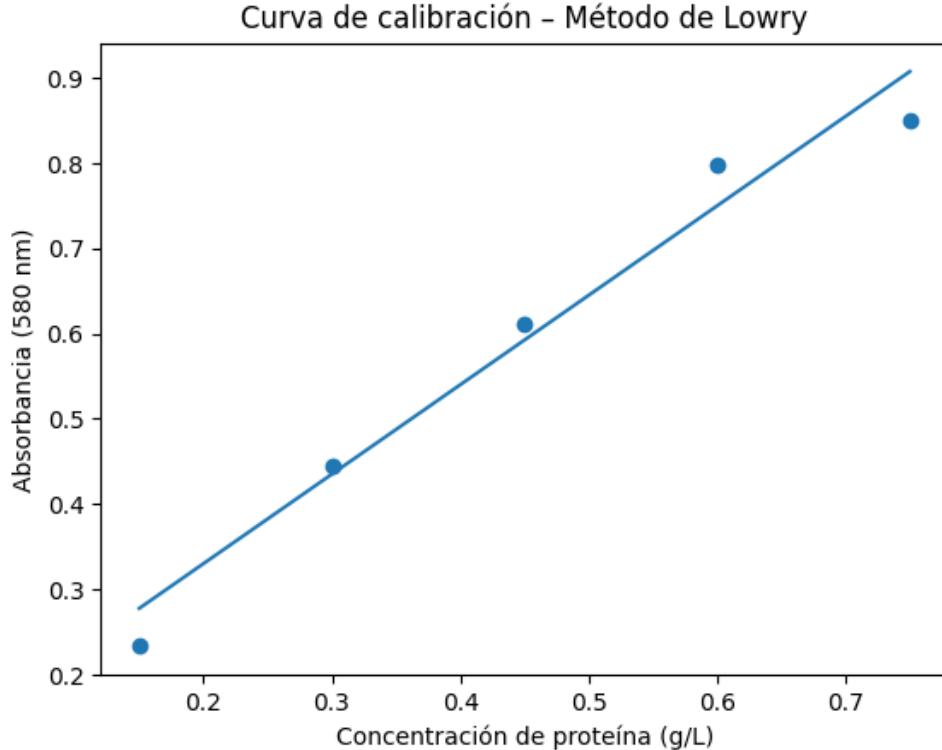


Figure 6: Curva de calibración del método de Lowry: absorbancia a 580 nm en función de la concentración de proteína (BSA).

6.5 Concentración real del patrón y concentración en los tubos de calibración

La disolución patrón de seroalbúmina bovina (BSA) tiene una concentración real de:

$$c_{\text{real}} = 2 \text{ g/L}$$

La concentración de proteína en cada tubo de calibración se calcula considerando la dilución producida al preparar un volumen total de 400 μL :

$$c_{\text{tubo}} = c_{\text{real}} \cdot \frac{V_{\text{patrón}}}{V_{\text{total}}}$$

donde $V_{\text{total}} = 400 \mu\text{L}$.

6.6 Cálculo de la concentración de proteínas en las muestras

La recta de calibración obtenida mediante mínimos cuadrados es:

$$A = 1.058c + 0.112$$

Tubo	Volumen de BSA (μL)	Concentración real (g/L)	Concentración en el tubo (g/L)
0	0	2.00	0.00
1	30	2.00	0.15
2	60	2.00	0.30
3	90	2.00	0.45
4	120	2.00	0.60
5	150	2.00	0.75

Table 17: Concentración real del patrón de BSA y concentración efectiva en los tubos de calibración.

Despejando la concentración de proteína en el tubo:

$$c_{\text{tubo}} = \frac{A - 0.112}{1.058}$$

La concentración real de la muestra se obtiene corrigiendo por el factor de dilución aplicado durante la preparación del tubo:

$$c_{\text{real}} = c_{\text{tubo}} \cdot \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{muestra}}}$$

donde $V_{\text{total}} = 400 \mu\text{L}$.

6.6.1 Muestra A

Tubo	V_{muestra} (μL)	c_{tubo} (g/L)	c_{real} (g/L)
6	120	0.184	0.613
7	200	0.328	0.655

Table 18: Concentración de proteínas en el tubo y concentración real para la muestra A.

6.6.2 Muestra B

Tubo	V_{muestra} (μL)	c_{tubo} (g/L)	c_{real} (g/L)
8	120	0.613	2.043
9	200	0.307	0.613

Table 19: Concentración de proteínas en el tubo y concentración real para la muestra B.

6.7 Conclusiones

1. Determinar la concentración de proteínas en muestras problema mediante el método colorimétrico de Lowry, utilizando seroalbúmina bovina como proteína patrón.
2. Establecer una curva de calibración a partir de soluciones patrón de albúmina y emplearla para calcular la concentración de proteínas en las muestras de partida A y B a partir de sus valores de absorbancia.

7 Referencias

- American Diabetes Association. (2024). Standards of care in diabetes—2024. *Diabetes Care*, 47(Suppl. 1), S1-S350.
- Delanaye, P., Glasscock, R. J., and Pottel, H. (2022). An age-calibrated definition of chronic kidney disease: Rationale and benefits. *Clinical Biochemistry*, 101, 1-6.
- Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V. W., and Weil, P. A. (2021). *Harper's Illustrated Biochemistry* (32nd ed.). McGraw-Hill.
- Sapan, C. V., Lundblad, R. L., and Price, N. C. (2020). Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 67(1), 1-9.