

APARTADO II

ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LAS FORMAS OXIDADA Y REDUCIDA DEL FMN. LEY DE LAMBERT-BEER: CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR

(J. Peinado, F. Toribio)

3(II). PROTOCOLO A REALIZAR

3(II).1. Espectro de absorción de las formas oxidada y reducida del FMN

El FMN en su forma oxidada presenta color amarillo. Cuando se reduce, la forma reducida, FMNH₂, no presenta color. La reducción se hará empleando un potente reductor, el ditionito sódico, también llamado hidrosulfito (Na₂S₂O₄).

1. Paso primero: Se necesitan 3 tubos, uno blanco y dos que contienen igual cantidad de FMN que, en uno de ellos, se reduce por adición de ditionito sódico.

(volumen en ml)	Blanco	FMN	FMNH ₂
Agua	5,0	4,4	4,3
FMN 0,25 mM	-	0,6	0,6
Ditionito Sódico 0,5 M	-	-	0,1

El ditionito debe ser preparado en el momento y, tras adicionarlo al tubo con FMN, se deben comenzar las lecturas en el colorímetro inmediatamente, debido a la tendencia a oxidarse del FMNH₂ y que se observa por la aparición de nuevo del color amarillo.

2. Paso segundo: Con el blanco se ajusta a cero el colorímetro. Tras sacar el tubo blanco, se lee la absorbancia de los otros dos tubos a distintas longitudes de onda, desde 380 a 500 nm.

3(II).2. Ley de Lambert-Beer. Cálculo del coeficiente de extinción molar

La absorbancia medida en el colorímetro varía linealmente cuando se emplean concentraciones diluidas del compuesto.

1. Paso primero: Se prepararán los siguientes tubos de ensayo, cuya composición y concentración se indican a continuación. El tubo 6 se suministrará ya preparado para que los alumnos determinen la concentración de FMN que contiene.

	Blanco	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
Agua (ml)	5,0	4,9	4,8	4,6	4,4	4,2	
FMN 0,25 mM (ml)	0,0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	X

2. Paso segundo: Se selecciona 450 nm, ya que a esta longitud de onda está el máximo de absorción del FMN; se ajusta el cero de absorbancia con el

blanco y se mide la absorbancia de los tubos, empezando por el de menor concentración.

4(II). RESULTADOS Y DISCUSION

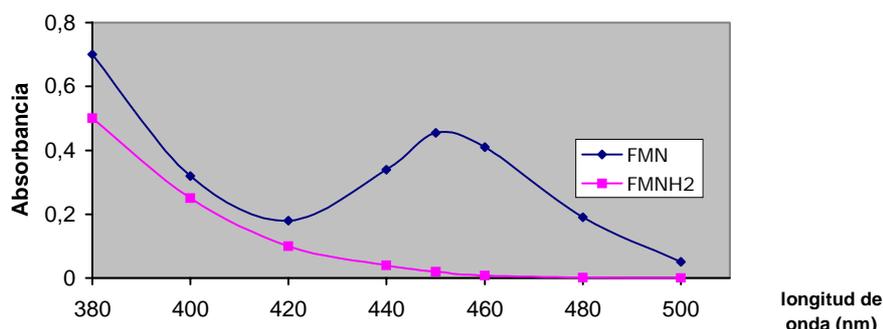
4(II).1. Espectro de absorción de las formas oxidada y reducida del FMN

1. Paso primero: Los valores de absorbancia obtenidos a distintas longitudes de onda se muestran en la siguiente tabla.

Longitud de onda (nm)	380	400	420	440	450	460	480	500
FMN	0,80	0,40	0,20	0,32	0,44	0,38	0,23	0,10
FMNH ₂	0,70	0,35	0,10	0,04	0,01	0,005	0,00	0,00

2. Paso segundo: La representación de los espectros del FMN oxidado y reducido muestra que la máxima diferencia se encuentra a 450 nm y ésta será la longitud de onda que se empleará para el apartado 3(II).2, acerca de la comprobación de la ley de Lambert-Beer.

Espectro de las formas oxidada y reducida de FMN



4(II).2. Ley de Lambert-Beer. Cálculo del coeficiente de extinción molar

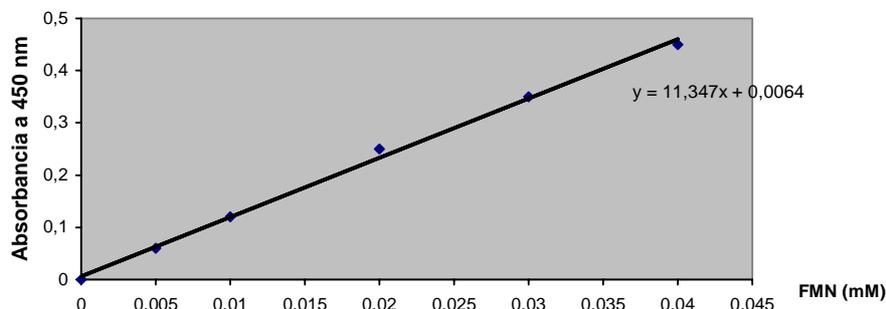
1. Paso primero: La ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot c \cdot l$) indica que la absorción de luz a una determinada longitud de onda es directamente proporcional a la concentración de una disolución de un compuesto.

La recta de calibrado para la determinación gráfica de ϵ se obtiene representando en una gráfica los valores de absorbancia obtenidos en ordenadas frente a los correspondientes de concentración (abscisas).

	Blanco	tubo 1	tubo 2	Tubo 3	tubo 4	tubo 5	tubo 6
Conc. Final (mM)	0	0,005	0,01	0,02	0,03	0,04	
Absorbancia a 450 nm	0	0,056	0,12	0,24	0,33	0,45	?

2. Paso segundo: Se calcula gráficamente el valor del coeficiente de extinción molar, que es la pendiente de la recta. En nuestro caso, el valor de ϵ es $11,347 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Ley de Lambert-Beer (relación entre absorbancia y concentración)



3. Paso tercero: Con este valor se puede calcular la concentración de FMN en el tubo 6, ya que con el valor de absorbancia leída se puede despejar c de la ley de Lambert-Beer.

5(II). DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

El FMN presenta un sistema de dobles enlaces conjugados en el anillo de isoaloxazina, que es el responsable del color amarillo de la molécula. Se puede recorrer el anillo de isoaloxazina de izquierda a derecha y encontrarnos alternados enlaces dobles y simples. Cuando el FMN se reduce, al captar dos electrones y dos protones se altera la conjugación de los dobles enlaces y el máximo de 450 nm desaparece, y ahora el FMNH_2 no presenta color ya que el anillo intermedio presenta dos enlaces simples contiguos.

