

PRÁCTICA N° 2:

CURVA DE CALIBRADO

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

De los métodos de trabajo que se emplean en espectrofotometría ultravioleta-visible, la curva de calibración es el más laborioso; sin embargo, su realización se aconseja siempre que se empieza un nuevo kit de reactivos o se cambia de marca. Esto se debe a que permite establecer con mayor precisión los límites de concentración permitidos en la muestra y, al trabajar con varios puntos de referencia da lugar a menos errores en la interpretación del resultado.

La periodicidad con que debe realizarse la curva de calibración está establecida en la rutina de trabajo de cada laboratorio y depende del grado de interés en su control de calidad interno.

2. FUNDAMENTO

Consiste en realizar diferentes disoluciones de la sustancia que vamos a analizar, en nuestro caso, partiremos de una disolución madre de concentración conocida, a partir de la cual realizaremos distintas diluciones.

3. REACTIVOS Y EQUIPOS

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro a 525 nm.
- Cubetas desechables.
- Pipetas.
- Matraz aforado de 100 ml.
- Tubos de ensayo.
- KMnO_4 en polvo.
- Agua destilada.

4. MUESTRAS

La sustancia de trabajo será el permanganato potásico (KMnO_4).

5. PROCEDIMIENTO

1. Preparamos una disolución madre del permanganato potásico. Pesamos 20 mg de sustancia y la llevamos a un matraz de 100 ml completando con agua destilada.
2. De esta disolución madre realizamos las siguientes diluciones: $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ y $\frac{1}{10}$. Calculamos la concentración correspondiente a cada una de ellas.
3. Llenamos una cubeta del espectrofotómetro con cada una de las diluciones, incluida la disolución madre. Preparamos un blanco de reactivos con agua destilada en otra cubeta.
4. Realizamos la lectura de las cubetas, empezando con el blanco para poner el aparato a 0 de Absorbancia. Anotamos cada una de las absorbancias obtenidas.

6. LECTURA DE RESULTADOS.

1. En papel milimetrado representamos cada uno de los valores obtenidos, anotando en el eje de abscisas (vertical) la absorbancia o densidad óptica (D.O), y en el eje de ordenadas (horizontal) las concentraciones de cada una de las diluciones.
2. Si unimos los puntos resultantes, obtendremos una curva de calibración, donde la zona de concentraciones que cumple la ley de Lambert-Beer debe ser una recta.
3. En esta curva podemos extrapolar la absorbancia de una muestra de concentración desconocida poniendo así a prueba la calidad de nuestro trabajo.

7. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

La curva de calibración debe tener una zona recta que cumple la ley de Lambert-Beer. En esta zona debe estar incluida la concentración de la muestra problema. En el caso de tener una concentración mayor, debemos diluir la muestra hasta que su absorbancia puede ser extrapolada.

La concentración obtenida así deberá ser multiplicada por el factor de dilución para obtener el dato de concentración real de la muestra.