



Trabajo Práctico de Laboratorio

Análisis Cuantitativo por Absorción. Espectrofotometría visible.

Objetivo: *Iniciar al alumno en el estudio de los métodos cuantitativos de absorción de radiación electromagnética para determinar la concentración de los analitos presentes en una muestra de interés bromatológico.*

I. Fundamentos Teóricos:

El análisis cuantitativo por absorción, se basa en la *absorción selectiva* de radiación en la zona *visible* del espectro electromagnético que se produce cuando dicha radiación, atraviesa una *solución coloreada* que contiene al analito de interés y que se coloca en una celda, dando lugar a que el *rayo emergente difiera del incidente*. Es así, que el proceso de absorción *disminuye* el poder radiante (intensidad) de la radiación transmitida desde un valor P_0 (correspondiente al haz incidente) hasta un valor P (correspondiente al haz que *emerge* de la solución). La absorción no es el único proceso por el cual se reduce el poder de radiación de la luz que atraviesa la solución. Las *reflexiones* en la superficie de la celda, así como la *dispersión* causada por partículas en suspensión también contribuyen a esa disminución. Para compensar estas pérdidas, se coloca primero en la celda una solución "*en blanco*" constituida por el disolvente y todos los constituyentes del sistema investigado, *menos* el que quiere determinarse.

Así el poder radiante de la radiación transmitida corresponde al poder radiante incidente *original*, menos las pérdidas por reflexión, dispersión, etc. Se designa a este poder radiante como P_0 y es igual al *poder radiante incidente "corregido"*, cuando el "blanco" se reemplaza por la muestra.

La radiación que *absorbe* la muestra se *determina* entonces, comparando la intensidad del haz transmitido cuando no hay muestra (P_0) con la del haz transmitido cuando hay muestra (P). La relación entre estos dos poderes de radiación P/P_0 se conoce como *transmitancia*, T , ó al multiplicarla por 100, como *porcentaje de transmitancia*, $\% T$.

De acuerdo con la *ley de Lambert-Beer*, que rige los cálculos cuantitativos, la transmitancia está relacionada con la longitud de *paso óptico* b (en cm) a través de la solución y la *concentración* c (moles/l) del soluto absorbente de la solución en la siguiente forma:

$$-\log \frac{P}{P_0} = -\log T = \varepsilon b c$$

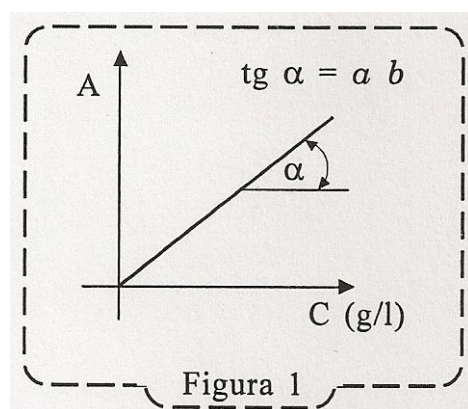
Donde ε es la *absortividad molar*, característica de la especie absorbente y función de la longitud de onda de la luz. Al término $-\log P/P_0$ se denomina absorbancia, A , entonces

$$A = \varepsilon b c \quad \text{ó} \quad A = a b c$$

Siendo a la *absortividad* para una especie cuya concentración se expone en gramo/litro.

La expresión anterior, es la forma más conveniente de la ley de Beer para fines analíticos, pues la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del analito absorbente de interés, cuando la absortividad y el camino óptico se mantienen constantes.

La figura 1 muestra la gráfica correspondiente a la absorbancia vs. concentración que resulta una recta que pasa por el origen.



En el proceso de una determinación fotométrica, uno de los aspectos más importantes es la selección de la longitud de onda apropiada para las mediciones de absorbancias. Esta selección se realiza sobre una curva obtenida con la absorbancia de una solución del analito investigado, obtenida a varias longitudes de onda, es decir una curva

de la A (ordenadas) en función de λ (abscisas). La gráfica así obtenida se designa como el espectro de absorción del compuesto.

Si se desea obtener alta sensibilidad es preciso elegir una longitud de onda para la cual el valor de la absorbancia sea alto.



La ley de Lambert-Beer es válida sólo para luz monocromática, un requisito que se alcanza difícilmente en la práctica. Es así que se trabaja con filtros o monocromadores para obtener una banda estrecha de longitud de onda, que además deberá corresponder a una zona de poca pendiente en la curva espectral, se tiene entonces una monocromacidad aceptable.

Una técnica experimental de amplia difusión en espectrofotometría visible es el uso de una curva de calibrado. Se la obtiene midiendo la absorbancia de distintas soluciones del analito de interés en concentraciones conocidas y distintas, y graficando la absorbancia en función de estas con concentraciones. A continuación se mide la absorbancia de la solución problema y la concentración de la especie absorbente se lee en la curva de calibrado.

Si el sistema en estudio *cumple con la ley de Beer* la curva de calibrado será una línea recta que pasa por el origen (Figura 1). Sin embargo en la práctica, la línea es recta sólo hasta un cierto límite de concentración, y después de este aparecen desviaciones de la ley causadas por factores tanto químicos como instrumentales. Si las desviaciones de la curva no son considerables, las determinaciones cuantitativas son factibles.

De lo expuesto hasta aquí, surge entonces que los pasos sucesivos a seguir toda vez que se desee emplear una técnica espectrofotométrica son los siguientes:

1. Trazado de la curva espectral (Espectro de absorción del compuesto).

1.a. Preparar a partir de una droga patrón una solución del componente que se desea determinar en una concentración estipulada y trazar la *curva espectral*, realizando para ello una serie de medidas de absorbancia a *distintas* longitudes de onda y *[c] constante*.

1.b. Sobre la curva espectral, seleccionar la longitud de onda de trabajo que corresponda a un máximo de la curva. Se logra así máxima sensibilidad y reproducibilidad.

1.c. Preparar una serie de soluciones patrones de concentraciones crecientes y perfectamente conocidas en el componente a determinar.



2. Verificación de la ley de Lambert-Beer (Trazado de la curva de Calibrado)

2.a. Desarrollar el color con un reactivo adecuado, simultáneamente en los patrones y en la muestra, si es necesario.

2.b. Efectuar las lecturas de la absorbancia, A , de los patrones a la longitud de onda seleccionada ($\lambda = \text{cte}$)

2.c. Graficar absorbancia, A vs. concentración.

2.d. Medir la A de la muestra y usando la gráfica determinar su concentración.