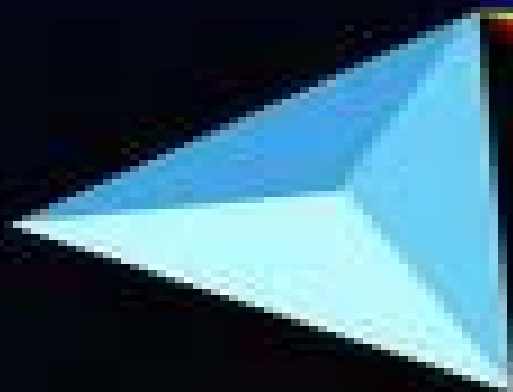


# ESPECTROFOTOMETRÍA

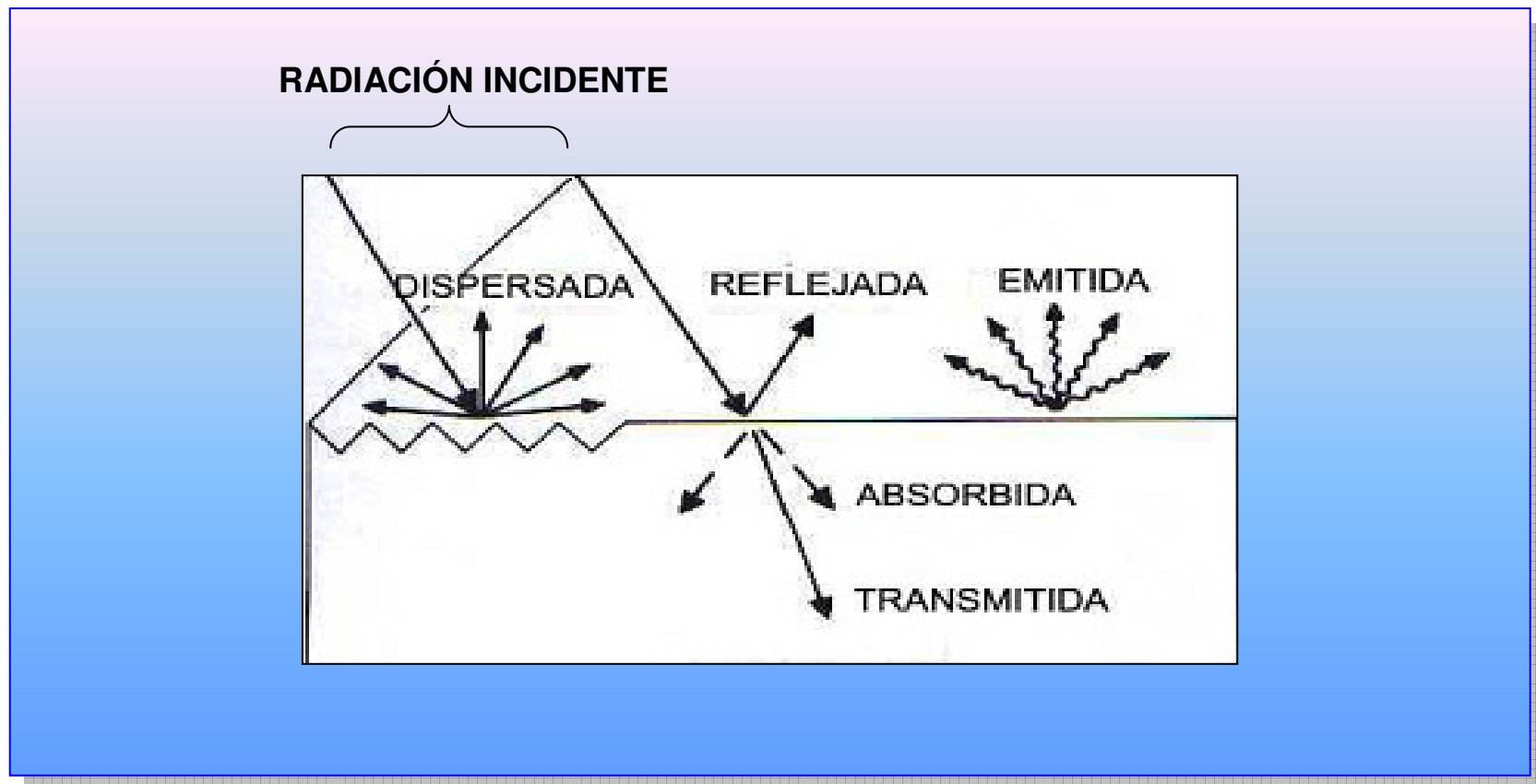


*INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS QUÍMICO*

*Prof. VILMA ROUCO*

*2010*

- **Técnica** instrumental de análisis fundamentada en la interacción **materia- radiación electromagnética**.

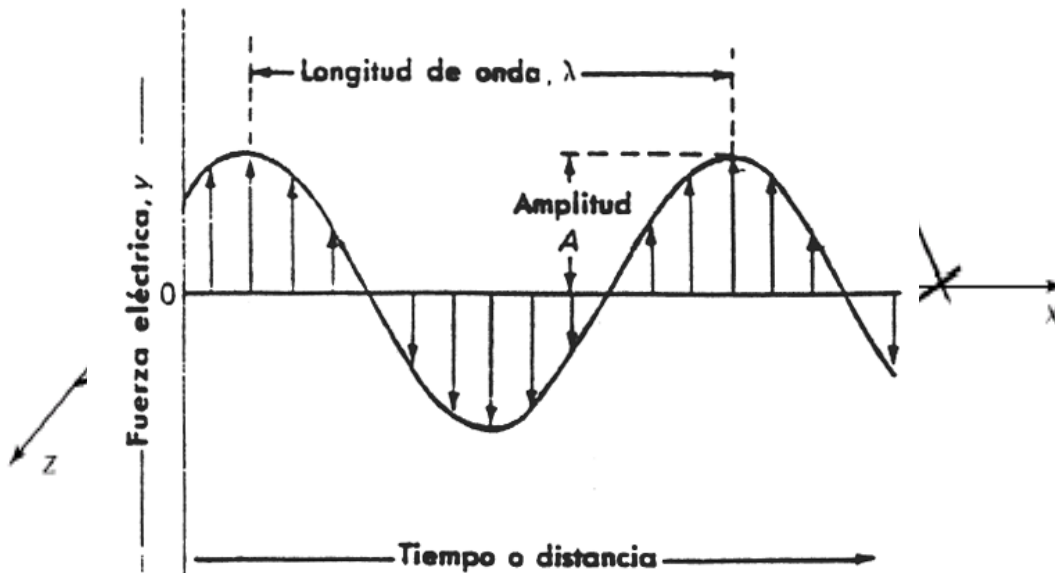


- ❑ Los **métodos** se basan en la medida de la radiación electromagnética **emitida** o **absorbida** por la materia.
- ❑ Los métodos de **emisión** utilizan la radiación emitida por la materia cuando esta es excitada por energía térmica, eléctrica o radiante.
- ❑ Los métodos de **absorción**, miden la **atenuación de la potencia de la radiación** que se produce como consecuencia de la interacción con la materia.
- ❑ **Alcance cuantitativo** y en algunos casos **cualitativo**.

# RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA

- Es una **onda** sinusoidal que se transmite a través del espacio a gran velocidad

## Parámetros



- **Longitud de onda ( $\lambda$ ):** distancia entre dos máximos (Å, nm,  $\mu\text{m}$ , etc.)
- **Frecuencia ( $\nu$ ):** número de oscilaciones por unidad de tiempo (Hz)

- El modelo ondulatorio falla al explicar los fenómenos asociados a la absorción y emisión de energía radiante.

- Es un flujo de **partículas discretas o paquetes de energía** llamados **cuantos o fotones**

➤ **COMPORTAMIENTO DUAL: ONDA/PARTÍCULA**

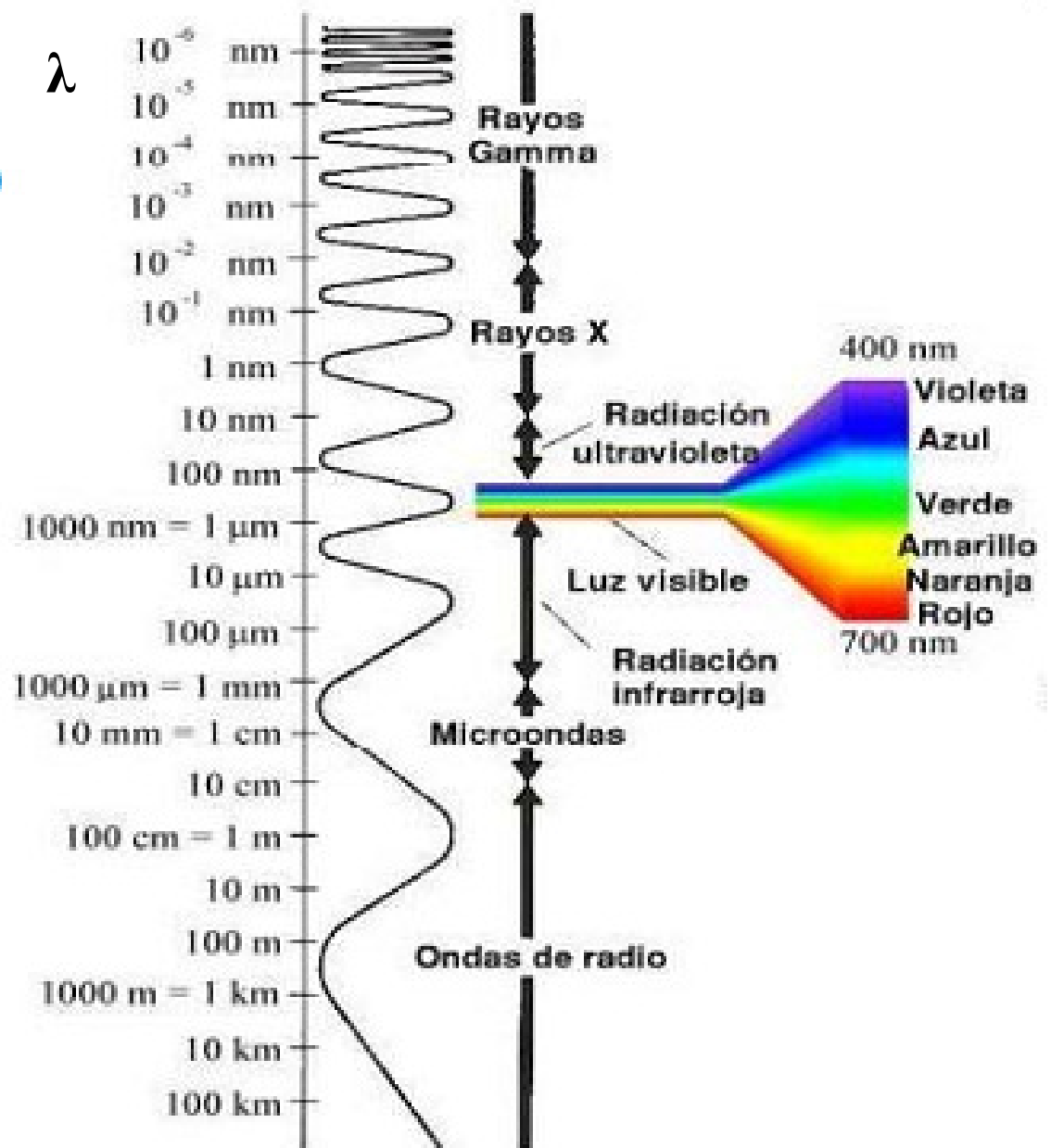
$$E = h \nu = h c / \lambda$$

**c**: velocidad de la radiación en el vacío ( $3,00 \times 10^{10}$  cm/s)

**h**: constante de Planck ( $6,63 \times 10^{-27}$  erg.s)

- Cada haz de radiación electromagnética se caracteriza por su  $\lambda$  o  $\nu$  y le corresponde una determinada E
- $\lambda$  y/o  $\nu$  se utilizan como criterio de **clasificación** y se establece un **espectro electromagnético** constituido por regiones o zonas de radiación que abarcan cierto intervalo de  $\lambda$ ,  $\nu$  y E.

# ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO

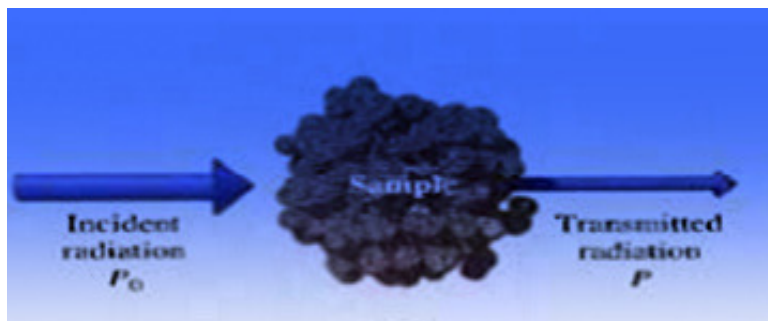


MAYOR UTILIDAD  
PARA ANÁLISIS  
QUÍMICO

# ABSORCIÓN DE RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA

- Se denomina **absorción** al proceso por el cual una especie absorbente (átomo, ión o molécula) **capta selectivamente** ciertas frecuencias (o longitudes de onda) de la radiación electromagnética incidente.
  - La energía electromagnética de la radiación incidente, se **transfiere** a los átomos, iones o moléculas que componen la muestra, **aumentando su energía**.
  - Se produce **atenuación de la Densidad de Potencia** de la radiación electromagnética incidente

$$P_0 > P$$

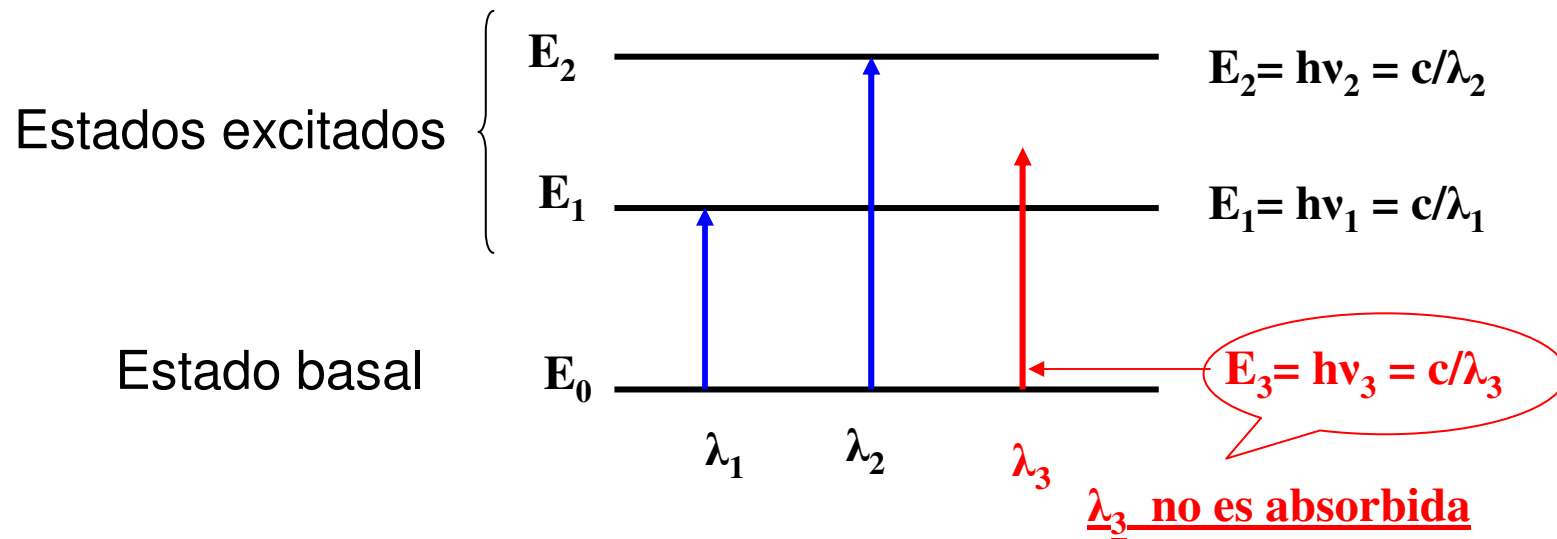


- **Densidad de Potencia Incidente ( $P_0$ ):** Energía de la radiación incidente por unidad de área y tiempo.
- **Densidad de Potencia transmitida ( $P$ ):** Energía de la radiación que atraviesa la muestra por unidad de área y tiempo.

## □ La absorción es un **proceso selectivo**

- Es la cantidad de **E** que posee un fotón la que determina si cierta especie absorberá o transmitirá la radiación de  $\lambda$  correspondiente

La teoría cuántica, establece que una molécula sólo puede existir en ciertos estados de energía "permitidos". Por tanto, la molécula debe absorber una **cantidad definida de E** para que ocurra la transición a un nivel energético superior.



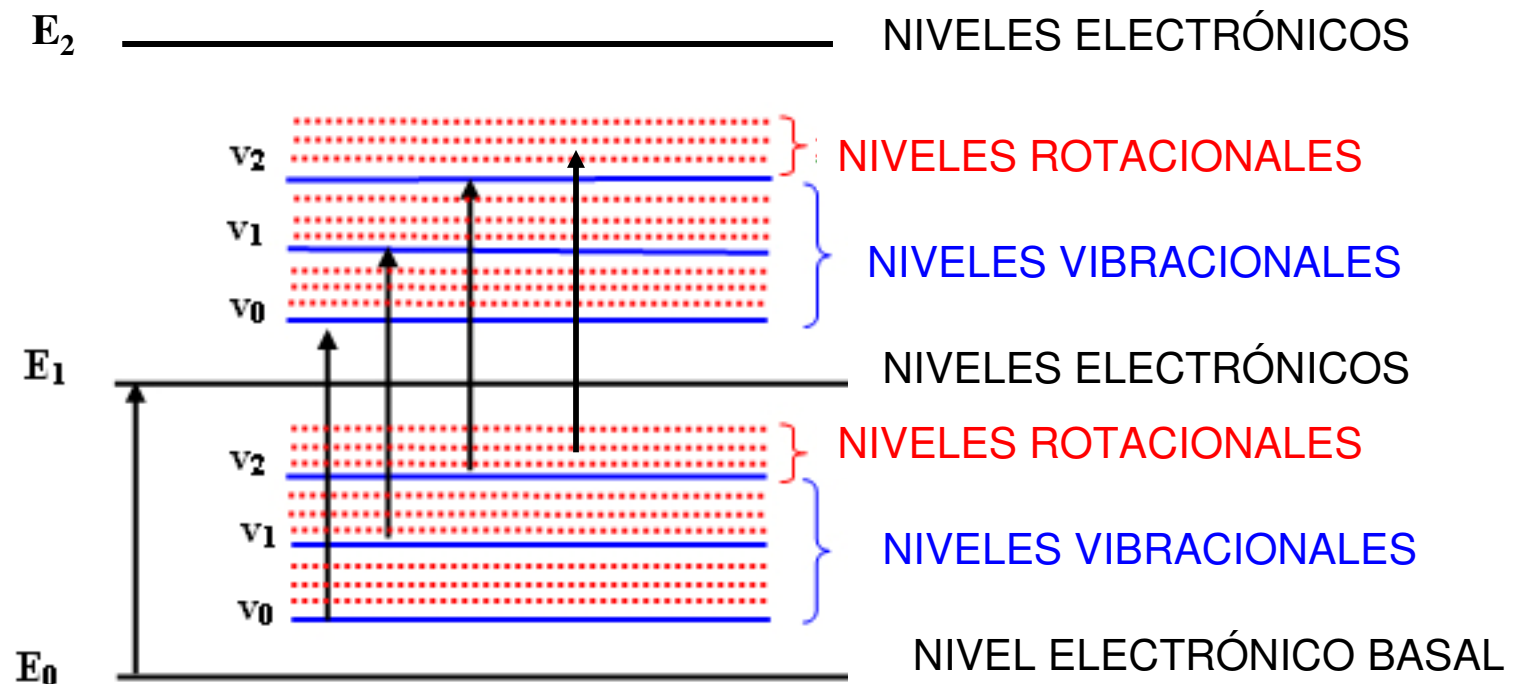


# ABSORCIÓN MOLECULAR

- La energía interna total de una molécula se compone por:

$$E = E_{\text{electrónica}} + E_{\text{vibracional}} + E_{\text{rotacional}}$$

- Para cada estado de energía electrónica de la molécula hay normalmente varios estados de vibración posibles y numerosos estados de rotación.

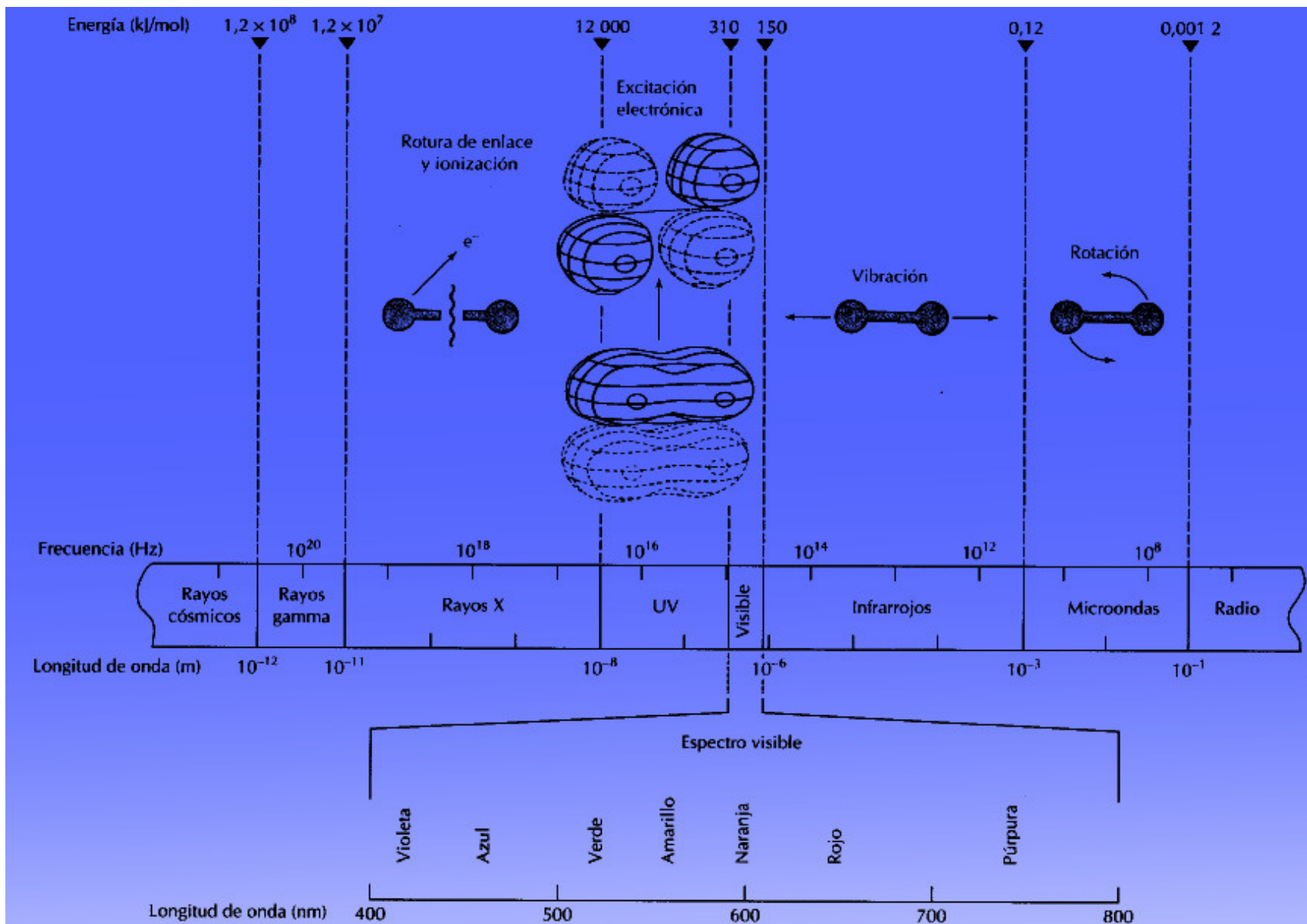


- La cantidad de energía absorbida puede relacionarse con los tipos de enlace que existen en la especie absorbente

## **ANÁLISIS CUALITATIVO**

### Dilucidación estructural de compuestos orgánicos

- La radiación infrarroja aumenta la amplitud de oscilación periódica de átomos o grupos de átomos con respecto a otros átomos o grupos de la molécula (rotación, tensión, flexión)  **$E_{\text{vibracional}}$**
- La absorción de radiación ultravioleta o visible provoca la transición de electrones de enlace a orbitales de mayor energía.  **$E_{\text{electrónica}}$**

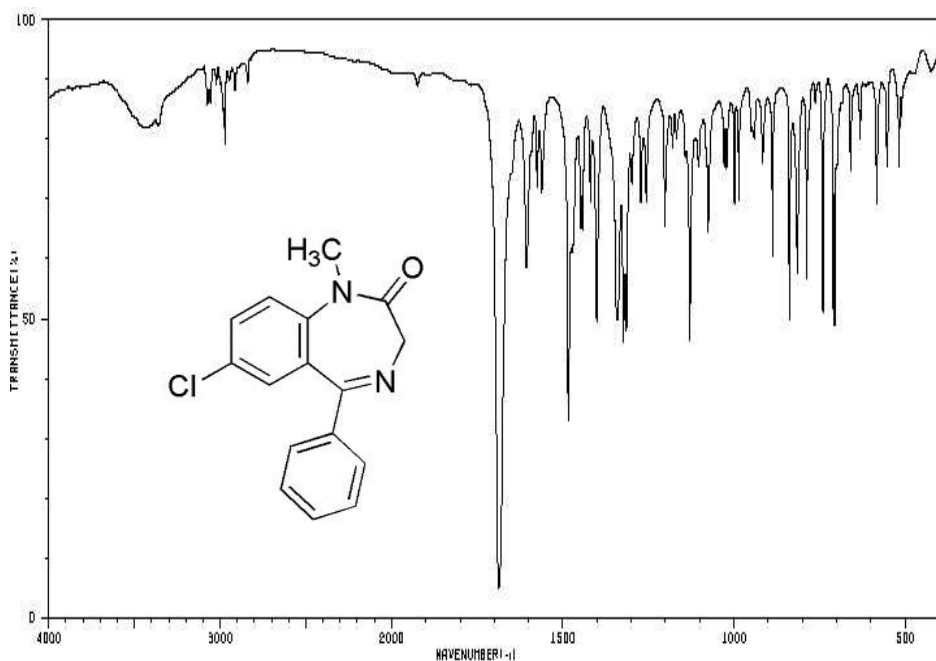


¿Cómo se registra?

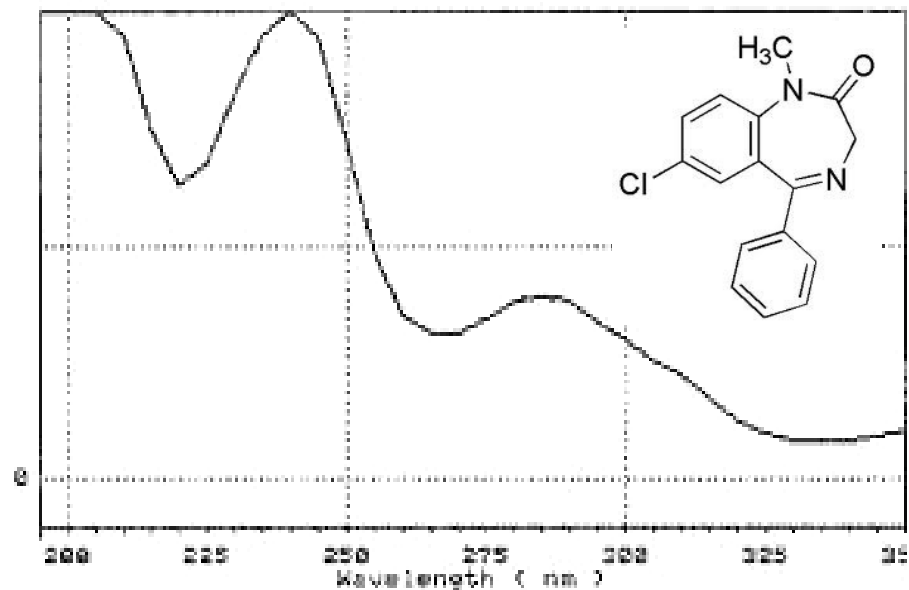
# ***ESPECTRO DE ABSORCIÓN MOLECULAR***

- **Gráfico** que representa la variación de Energía absorbida por la especie absorbente (analito) en función de la longitud de onda de la radiación incidente. Experimentalmente se mide ABSORBANCIA o TRANSMITANCIA (cantidad de radiación absorbida o transmitida)
  
- Analíticamente, un espectro de absorción es el registro de una propiedad característica de la materia absorbente, utilizable con intención cualitativa y/o cuantitativa.

## Espectro IR



## Espectro UV



- En general, un espectro IR se distingue por la riqueza de detalles aún para moléculas muy sencillas y por bandas de absorción que se pueden asignar con precisión a grupos funcionales. Además, las moléculas más complejas pueden presentar numerosas bandas de absorción difíciles de asignar pero muy útiles en la identificación (zona de la "huella digital")

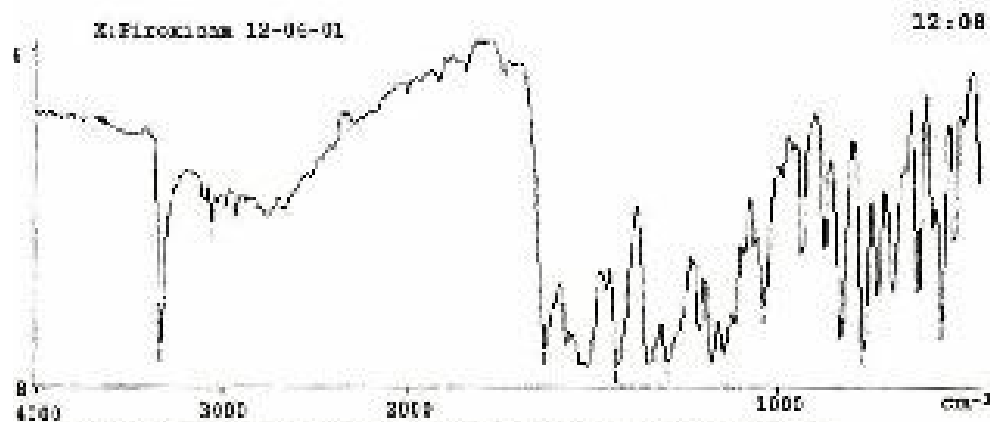
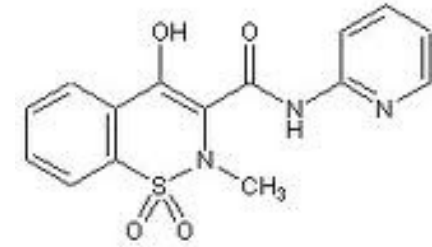
- Sin embargo, la espectroscopía **UV tiene aplicación cualitativa limitada** puesto que al solaparse las transiciones electrónicas con las de vibración y rotación, se pierde la estructura fina del espectro, y de este modo la absorción es una banda ancha de  $\lambda$ . Resulta un espectro continuo, con unos pocos picos anchos o bandas y escaso detalle, difícil de interpretar

Determinación de grupos funcionales

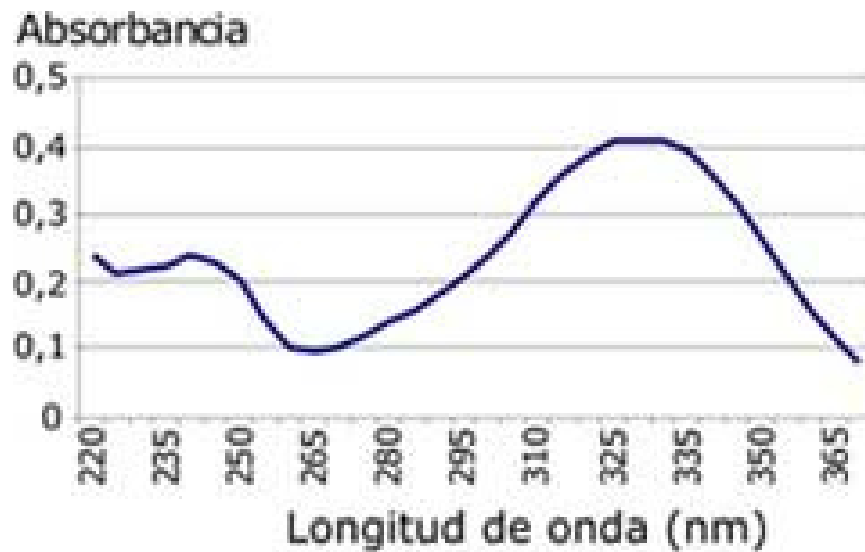
# Ejemplos de cromóforos

Cromóforo	Ejemplo	Disolvente	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{máx}}$	Tipo de transición
Alqueno	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}=\text{CH}_2$	<i>n</i> -Heptano	177	13.000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Alquino	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$	<i>n</i> -Heptano	178	10.000	$\pi \rightarrow \pi^*$
			196	2.000	—
			225	160	—
Carbonilo	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{CH}_3\text{CCH}_3 \end{array}$	<i>n</i> -Hexano	186	1.000	$n \rightarrow \sigma^*$
			280	16	$n \rightarrow \pi^*$
Carbonilo	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{CH}_3\text{CH} \end{array}$	<i>n</i> -Hexano	180	grande	$n \rightarrow \sigma^*$
			293	12	$n \rightarrow \pi^*$
Carboxilo	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{CH}_3\text{COH} \end{array}$	Etanol	204	41	$n \rightarrow \pi^*$
Amido	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{CH}_3\text{CNH}_2 \end{array}$	Agua	214	60	$n \rightarrow \pi^*$
Azo	$\text{CH}_3\text{N}=\text{NCH}_3$	Etanol	339	5	$n \rightarrow \pi^*$
Nitro	$\text{CH}_3\text{NO}_2$	Isooctano	280	22	$n \rightarrow \pi^*$
Nitroso	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$	Etil éter	300	100	—
			665	20	$n \rightarrow \pi^*$
Nitrato	$\text{C}_2\text{H}_5\text{ONO}_2$	Dioxano	270	12	$n \rightarrow \pi^*$

## Ejemplo: Espectros de absorción de Piroxicam



IR: IDENTIFICACIÓN



UV: CARACTERIZACIÓN



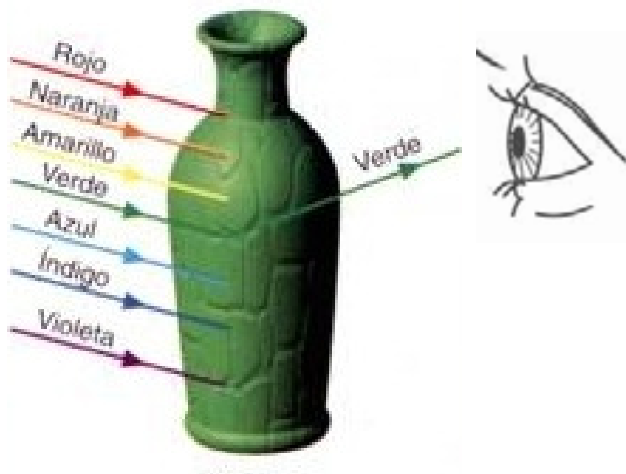
## ¿ESPECTRO VISIBLE?

- Sólo *son absorbentes* las especies que tienen **COLOR**

¿Aplicabilidad limitada ?

**Desarrollo de color**

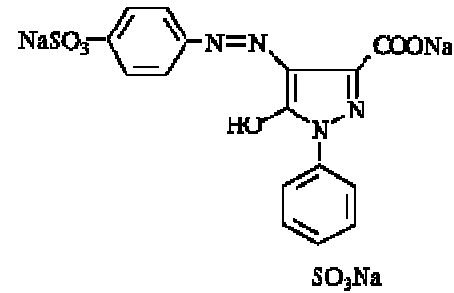
- El color observado es consecuencia de la **absorción selectiva** de energía en la región **visible** del espectro y de la **transmisión** o **reflexión** de la radiación no absorbida.



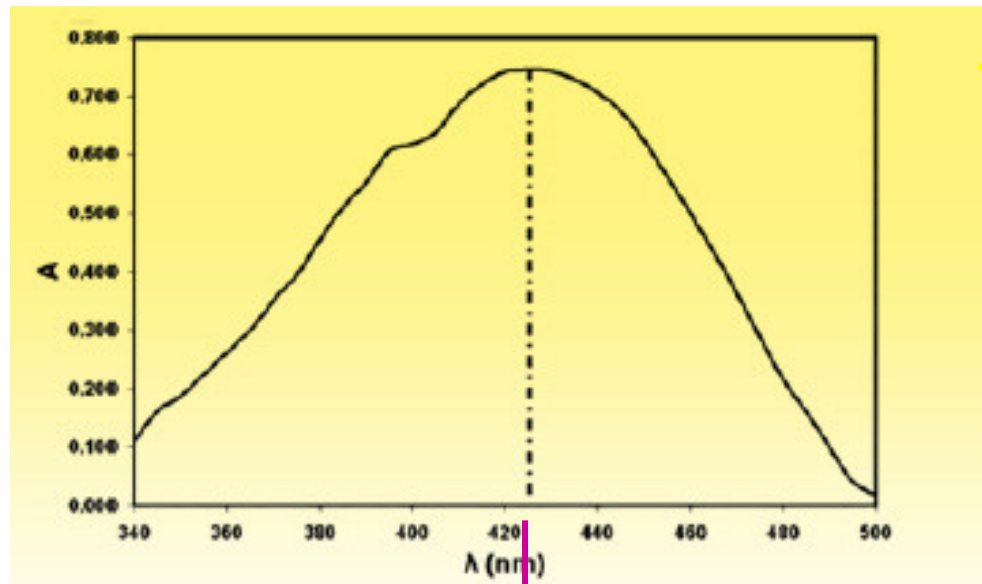
<b>Longitud de onda de máxima absorbancia</b>	<b>Color absorbido</b>	<b>Color observado</b>
380-420	Violeta	Amarillo verdoso
420-440	Azul violáceo	Amarillo
440-470	Azul	Naranja
470-500	Verde azulado	Rojo
500-520	Verde	Púrpura
520-550	Verde amarillento	Violeta
550-580	Amarillo	Azul violáceo
580-620	Naranja	Azul
620-680	Rojo	Verde azulado
680-780	Púrpura	Verde

# Ejemplo

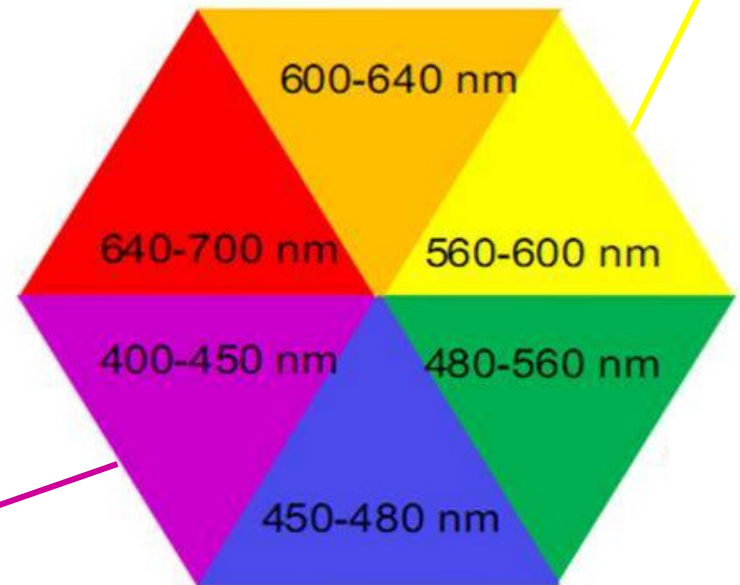
**Tartrazina** Colorante amarillo



Espectro de absorción visible



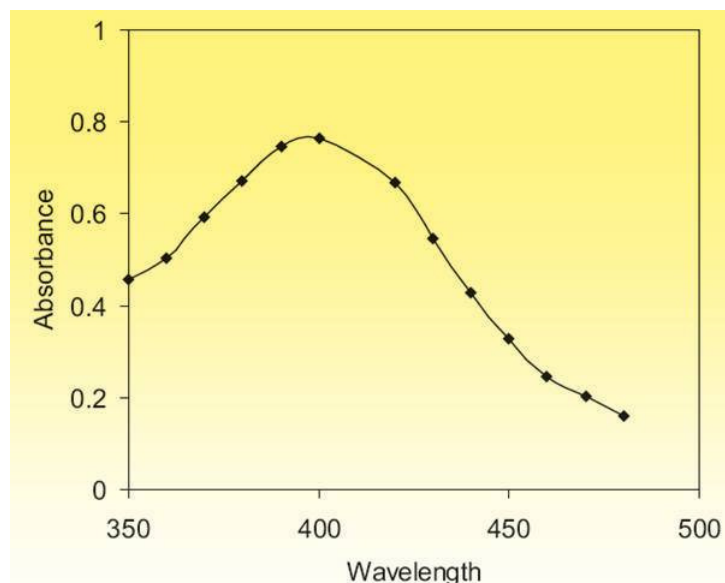
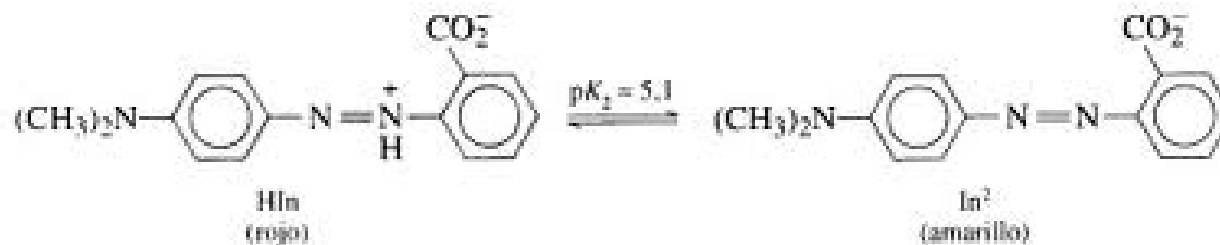
Se observa



Absorbe

Colores complementarios

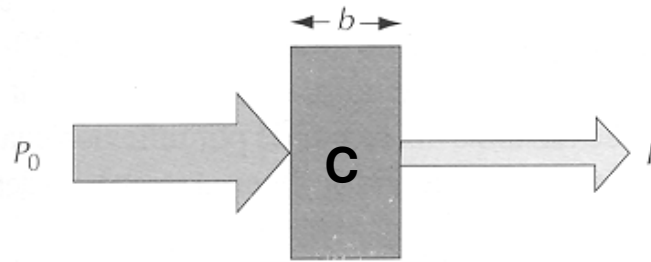
¿Cómo será el espectro de absorción visible de  $K_2CrO_4$  o de la forma básica de rojo de metilo?



La espectrofotometría de Absorción visible **No** tiene alcance cualitativo

## MÉTODOS CUANTITATIVOS DE ABSORCIÓN

- Un haz de **radiación monocromático**, pasa a través de una capa de solución de  $b$  cm de espesor y que contiene una especie molecular absorbente de concentración  $C$ .



### PARÁMETROS:

- La **transmitancia  $T$**  de la solución es la fracción de radiación incidente transmitida (o no absorbida) por la solución. En general se expresa en porcentaje (0 - 100) %

$$T = \frac{P}{P_0} \quad \%T = 100 \frac{P}{P_0}$$

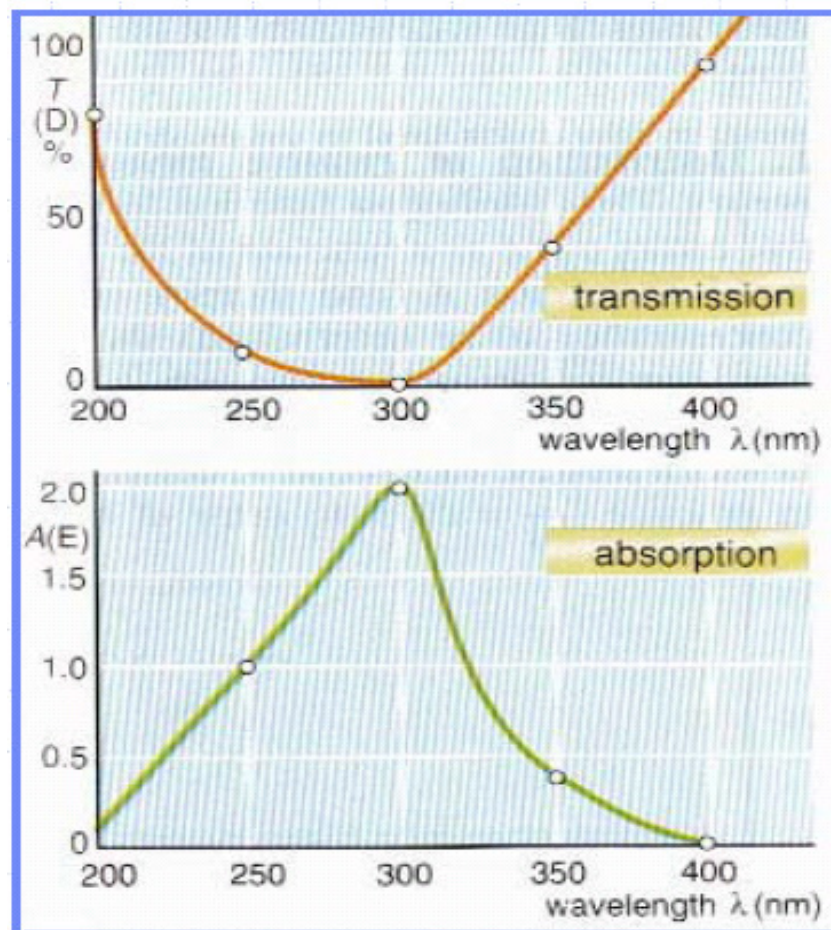
- La **absorbancia, A**, es la medida de **la atenuación** de la densidad de potencia de la radiación cuando esta incide sobre una muestra absorbente.

$$A = \log \frac{P_0}{P} = -\log_{10} T = \log 1/T$$

- ✓ Cuando no hay absorción de radiación  $P_0 = P$ , entonces,  $A=0$ ,
- ✓ Cuando se absorbe el 99% de la radiación, se transmite el 1%, entonces,  $A=2$

**Los instrumentos se calibran entre 0 y 2 unidades de A**

## Relación A - T



## LEYES DE LA ABSORCIÓN

- **Ley de LAMBERT**: cuando un haz de luz atraviesa un medio absorbente de **concentración constante**, la cantidad de energía luminosa absorbida por el medio es directamente proporcional a la distancia recorrida (**camino óptico, b**) por la radiación en el medio absorbente.

$$A \propto b$$

- **Ley de BEER** cuando un haz de luz atraviesa un medio absorbente de **espesor constante**, la cantidad de energía luminosa absorbida por el medio es directamente proporcional a la **concentración** del absorbente en el medio

$$A \propto C$$



□ La combinación de las leyes, se conoce como **Ley de BEER**

$$A = a b C$$

$$A = \xi b C$$

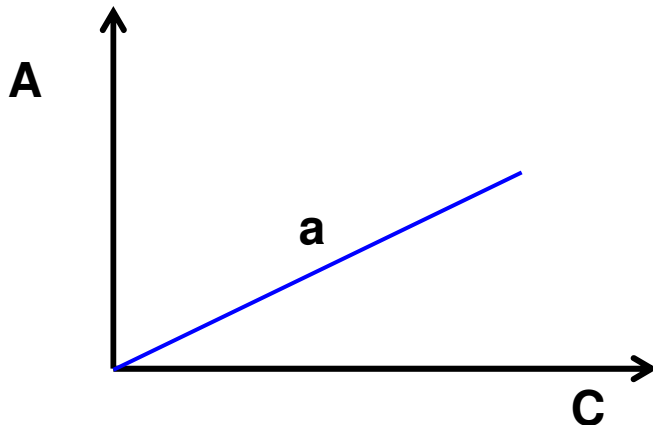
donde: b es el camino óptico (cm)

C es la concentración

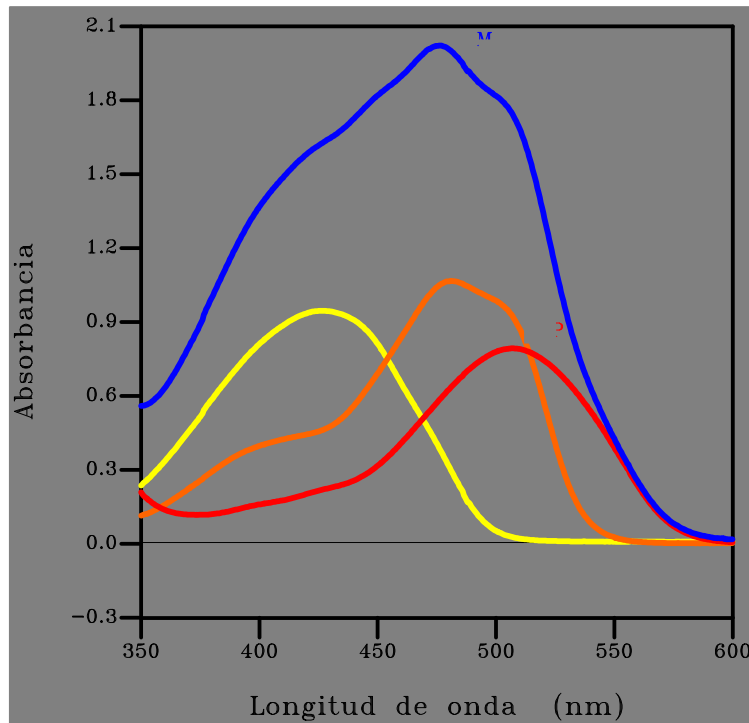
$\xi$  es la **absortividad molar** (L/mol.cm)

a es la **absortividad** (L/g.cm)

- Cuando la **radiación** incidente es **monocromática** y el **camino óptico es constante**, la **absorbancia** es directamente proporcional a la **concentración** de la especie absorbente.



a (ó  $\xi$ ) es una constante de proporcionalidad



Para cada caso, el espectro de absorción se obtiene a partir de una solución de la muestra ( $C_{\text{absorbente}}$  y  $b$  son constantes) midiendo  $A$  a diferentes  $\lambda$

En ningún caso  $A$  es constante, por tanto,  $a$  es una **característica** de la **especie absorbente** y es **función de  $\lambda$** .

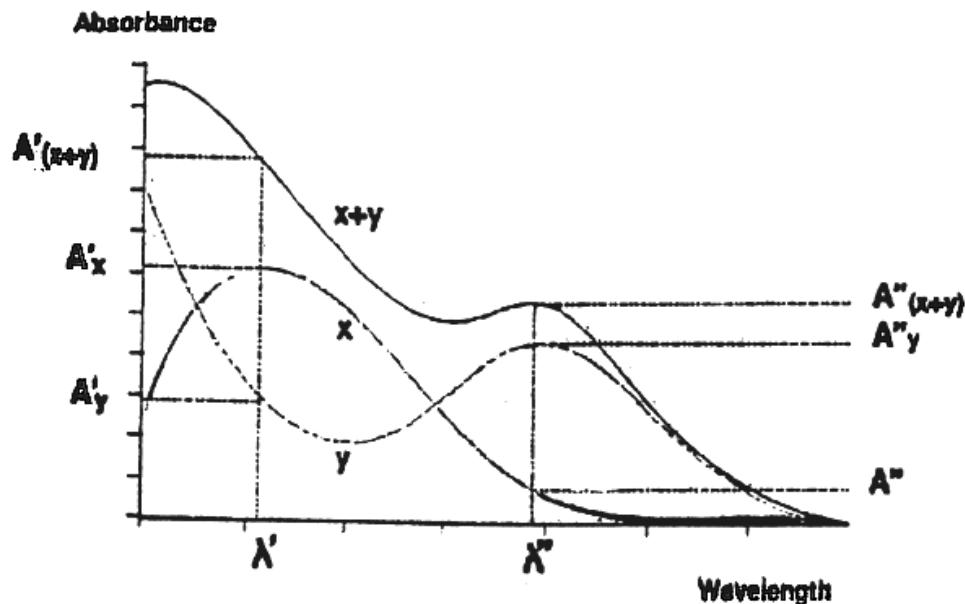
Además,  $a$  es función de la **temperatura** y del **solvente**. En soluciones concentradas,  $a$  también es función de  $C$

Por tanto, la obtención de espectros, o medida de  $A$  con fines analíticos, sea de identificación, caracterización o parte de una determinación cuantitativa, exige reproducción de las condiciones en cada medida experimental

- **Muestras multicomponentes:** Cuando **no hay interacción** entre especies, cada especie absorbente verifica la ley de Beer.
- La ley de Beer es **aditiva**, por tanto, para un sistema multicomponente, en el que los componentes no interaccionan entre si, se verifica que la **A** de la muestra es la suma de la **A** de cada componente:

$$A_T = A_1 + A_2 + \dots + A_n$$

$$A_T = \xi_1 bc_1 + \xi_2 bc_2 + \dots + \xi_n bc_n$$



## Alcance de la ley de Beer:

La ley de Beer,  $A = a b C$ , es una ley experimental que se demuestra teóricamente, **suponiendo que se cumplen varias condiciones:**

- ✓ La radiación incidente es monocromática.
- ✓ En el proceso de absorción, las especies actúan independientemente unas de otras. No hay interacción entre especies
- ✓ La absorción tiene lugar en un volumen de sección recta y uniforme. El camino óptico es constante
- ✓ La emisión de la energía absorbida ocurre rápidamente, en forma de calor y no radicional. NO produce fotoefectos significativos
- ✓ El índice de refracción, **n**, de las disoluciones a medir es independiente de la concentración de las especies absorbentes. No hay cambio significativo de  $\lambda$ , y por tanto, de a. (**Ver REFRACCIÓN**)

# REFRACCIÓN

Cuando un haz de luz **pasa de un medio a otro** de diferente densidad, se produce un **cambio en la velocidad de propagación**.

- Se denomina índice de refracción, al cociente entre la velocidad de la luz en el vacío ( $c$ ) y la velocidad de la luz en un medio material transparente ( $v$ ).

$$n = \frac{c}{v} \quad n > 1$$

Como **la frecuencia ( $f$ )** de la luz **no cambia** al pasar de un medio a otro, **cambia la longitud de onda**.

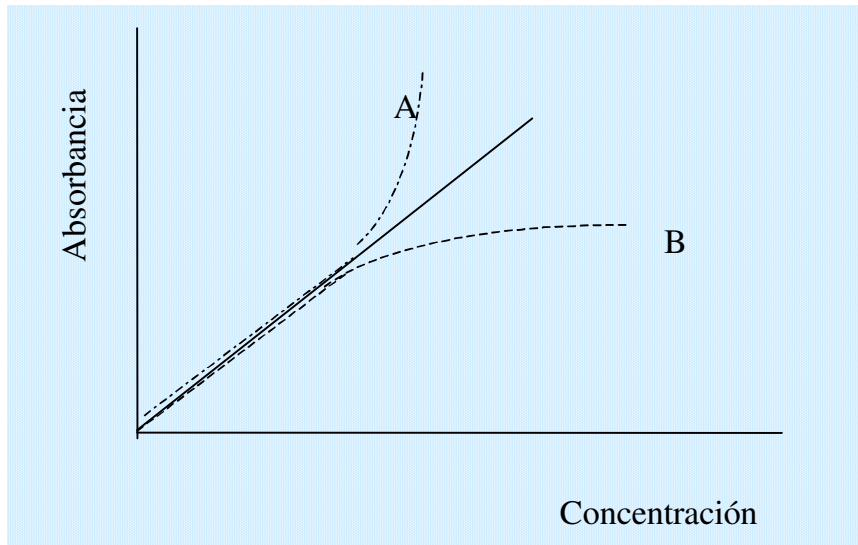
$$n = \frac{c}{v} = \frac{\lambda_0 \cdot f}{\lambda \cdot f} = \frac{\lambda_0}{\lambda}$$

Cuando la luz se propaga de un medio material a otro medio material de diferente  $n$ , se verifica:

$$\frac{n_1}{n_2} = \frac{v_2}{v_1} = \frac{\lambda_2}{\lambda_1}$$

Beer sólo se cumple cuando el cambio de concentración de la solución no produce un cambio significativo de  $n$ .

# DESVIACIONES DE LA LEY DE BEER



- ✓ INTRINSECAS – Limitaciones Reales
- ✓ INSTRUMENTALES – De medida
- ✓ QUÍMICAS – cambio asociado a un cambio de concentración por reacción
- ✓ OTRAS

## □ **Limitaciones reales**

- ✓ La Ley de Beer sólo se verifica en soluciones diluidas ( $C \leq 0,01 \text{ M}$ ).
- ✓ Concentraciones mayor que  $0,01 \text{ M}$ , producen aumento de las interacciones y variación de la absortividad molar (cambia  $\lambda$  porque varía  $n$ ), que conduce a una relación no lineal entre A y C.

## ❑ *Desviaciones Instrumentales*

- La Ley de Beer es un ejemplo de ley límite y solo se verifica cuando la radiación incidente es **monocromática**.
- Existen dos causas principales para que la radiación no sea monocromática:
  - ✓ Mal funcionamiento del equipo:
    - fluctuaciones de potencia de la fuente.
    - radiación errática que llega al detector sin pasar por el camino óptico del instrumento.
    - respuesta no lineal del detector- amplificador.
  - ✓ En Espectrofotometría de Absorción Molecular rara vez se puede usar radiación monocromática. Los **selectores de  $\lambda$**  de los equipos, **dejan pasar una “banda” mas o menos estrecha y simétrica en torno a la  $\lambda$  deseada.**

**causa instrumental de error sistemático e inevitable !!!!**

## □ *Desviaciones Químicas:*

- Su origen es una reacción química que modifica la concentración de la especie absorbente. **Desviación APARENTE**
- Cuando las especies absorbentes experimentan **asociación, disociación o reacción con el solvente**, originan productos con características absorbentes distintas de las del analito.

Ejemplo: soluciones de  $K_2Cr_2O_7$ :



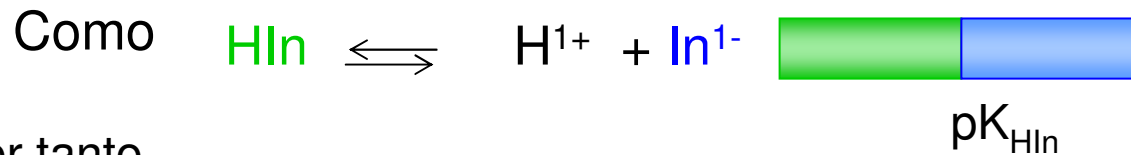
- ✓ Las  $[CrO_4^{2-}]$  y  $[Cr_2O_7^{2-}]$  en el equilibrio dependen de  $C_T$  y del pH.
- ✓ Cualquier cambio de pH originará modificaciones de las concentraciones relativas de ambas especies. El  $CrO_4^{2-}$  (amarillo) absorbe a 372 nm y el  $Cr_2O_7^{2-}$  (naranja) absorbe a 350 y 450 nm. Si se preparan patrones por dilución de un estándar con agua, cambiará el pH y se observarán desviaciones aparentes de la ley de Beer.

**Recordar aditividad de Absorbancia**



## Ejemplo 2

Cuando se mide una solución de HIn, se espera que:  $A = a_{\text{HIn}} b C_T$



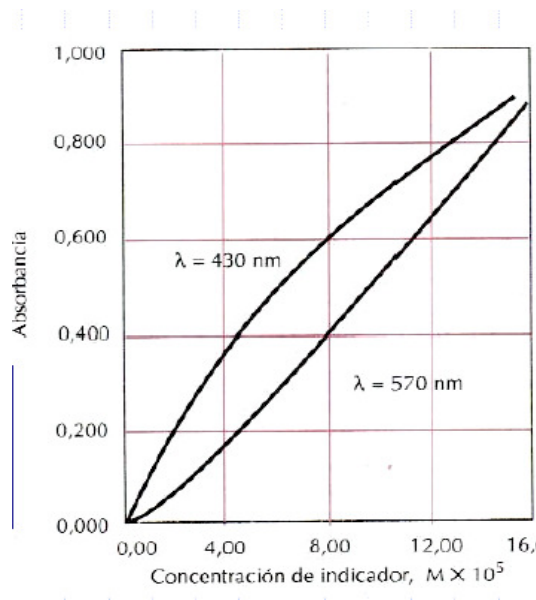
Por tanto,

$$C_T = C_{\text{HIn}} + C_{\text{In}} \quad \text{y} \quad A = b [(aC)_{\text{HIn}} + (aC)_{\text{In}}]$$

	$a_{430}$	$a_{570}$
HIn	630	7120
In <sup>1-</sup>	20600	960

a **570 nm**,  $a_{\text{HIn}} > a_{\text{In}}$ , se tendrá una **A menor** que la esperada. **Desviación negativa**

a **430 nm**,  $a_{\text{In}} > a_{\text{HIn}}$ , se tendrá una **A mayor** que la esperada. **Desviación positiva**



**Para obtener linealidad**, es necesario medir a un valor de pH constante en el que predomine el analito:

A pH < pK<sub>HIn</sub> se tiene  $C_T \approx C_{\text{HIn}}$ , entonces,

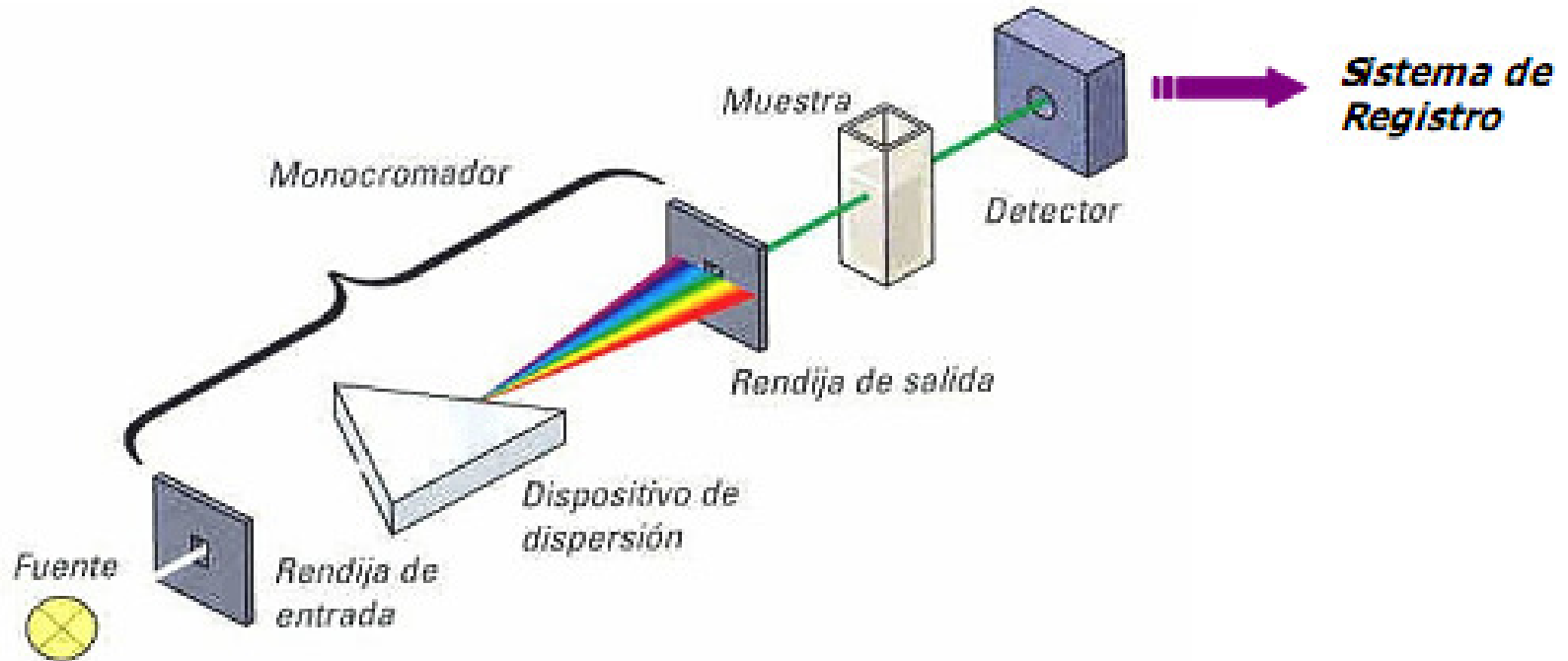
$$A = a_{\text{HIn}} b C_T$$

**TAMPONAR A pH de predominio del analito**

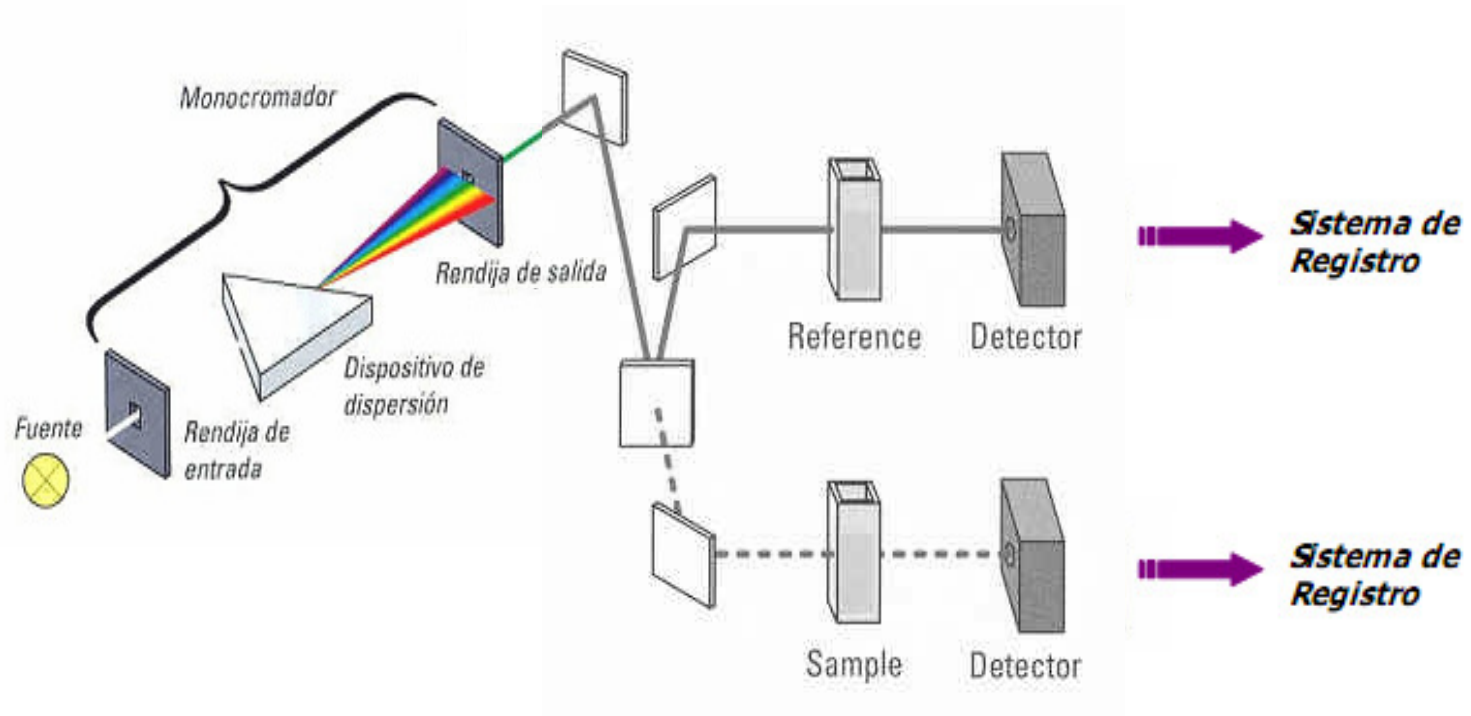
# ***INSTRUMENTOS***

- ❑ Espectrofotómetros
- ❑ Filtrofotómetros o Colorímetros
  
- Los instrumentos para medir la absorción de radiación UV o visible constan básicamente de los siguientes componentes:
  - ✓ Fuente de radiación
  - ✓ Selector de longitud de onda
  - ✓ Compartimento de muestra
  - ✓ Detector
  - ✓ Procesador de señal y presentación de lectura

- Esquema de un espectrofotómetro convencional de simple haz



- Esquema de un espectrofotómetro convencional de doble haz



## FUENTES

- La fuente de energía radiante debe producir un haz de radiación estable y de potencia suficiente para facilitar la detección y medida.
- Fuentes:

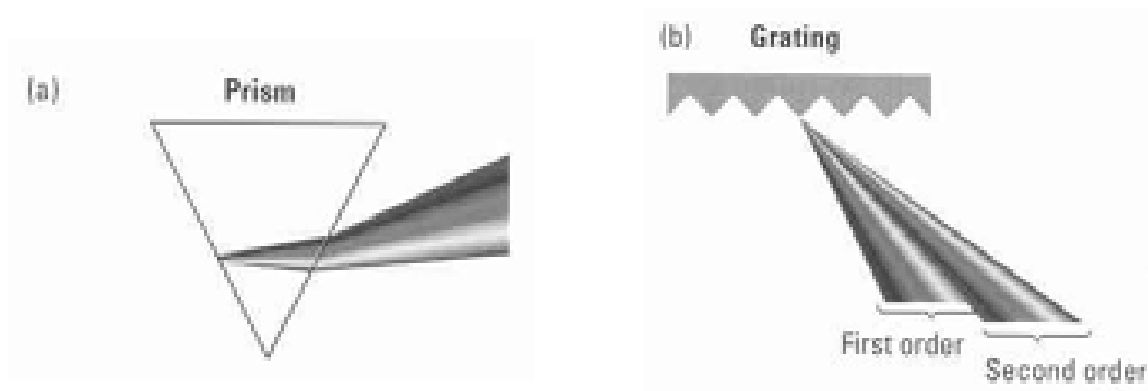
- ✓ Fuentes de  $H_2$  y  $D_2$ : espectro continuo entre 160 -375 nm (UV-Visible)
- ✓ Filamento de W: espectro continuo entre 320 y 2500 nm (Visible-IR)



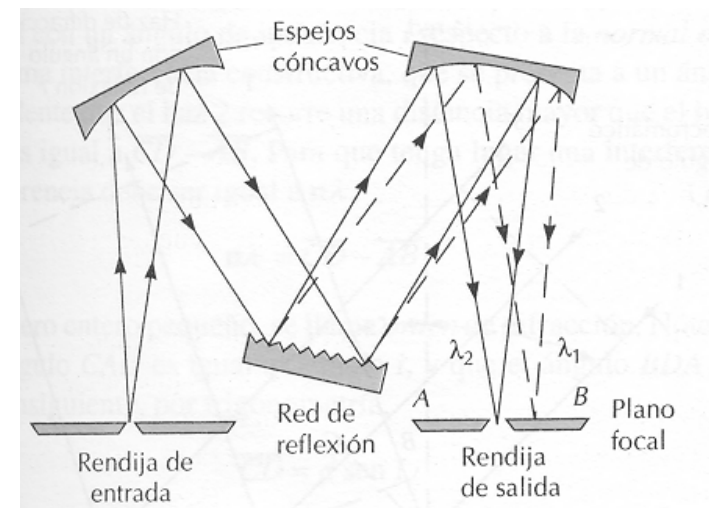
- La radiación policromática de la fuente se enfoca sobre la rendija de entrada de un monocromador

## SISTEMA SELECTOR DE LA LONGITUD DE ONDA :

- FOTÓMETROS (colorímetros): utilizan **filtros** que permiten obtener bandas de radiación que abarcan un intervalo limitado de longitudes de onda
  - ✓ Filtros de absorción
  - ✓ Filtros de interferencia
- *ESPECTROFOTÓMETRO*: utiliza un sistema óptico complejo de selección de longitud de onda: **MONOCROMADOR** constituido por uno o más sistemas dispersión de radiación

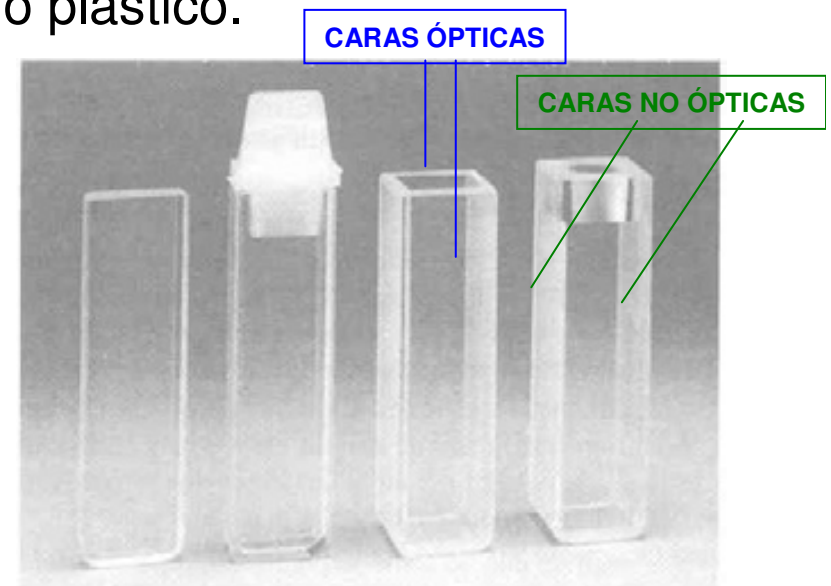


- El monocromador transmite selectivamente una estrecha banda de longitudes de onda a través de la rendija de salida.
- Se compone de una rendija de entrada, una lente colimadora, un dispositivo de dispersión (normalmente un prisma o una rejilla), una lente de enfoque y una rendija de salida.
- El ancho de banda efectivo de un monocromador depende de la dispersión de la red o del prisma así como de la anchura de las rendijas de entrada y salida.
- Si el ancho de banda es pequeño se obtiene mejor resolución de las bandas espectrales de absorción. Sin embargo, disminuye la potencia de la radiación transmitida y la exactitud.



## CELDAS

- Los recipientes para la muestra y soluciones de referencia se llaman celdas o cubetas y sus características son la transparencia y el camino óptico.
- Las celdas deben construirse con materiales transparentes a la radiación de la zona espectral de trabajo.
- Para UV se requieren celdas de cuarzo o sílice fundida, transparentes entre 200 y 2000 nm
- En la región visible se utilizan celdas de vidrios transparentes entre 350 y 2000 nm y algún tipo de polímero plástico.
- **La longitud del área de sección transversal de la celda se corresponde con el camino óptico** y en general es de 1 cm aunque varia entre 0,5 y 5 cm.





## DETECTORES

- Para la detección de la radiación se utiliza un *transductor* que convierte la energía radiante en una señal eléctrica.
- Este debe responder a la radiación en un amplio intervalo de longitud de onda de forma lineal y tener sensibilidad, estabilidad (o mínimo nivel de ruido) y tiempo de respuesta adecuados
- Entre los más utilizados se encuentran fototubos y tubos fotomultiplicadores.



## **NUESTROS INSTRUMENTOS**

### **ESPECTROFOTÓMETRO THERMO SPECTRONIC**

#### *Especificaciones Espectrofotómetro 20 GENESYS<sup>®</sup>*

**Longitud de onda:** 325 a 1100 nm

**Ranura espectral:** 8 mm

**Rango fotométrico:** (0-125) %T ; (-0.1-2.5) A ; (0-1999) C

**Energía parásita:** 0.1%T, medida a 340 y 400 nm

**Repetibilidad de longitud de onda:** 0.5 nm

**Exactitud de longitud de onda:** 2.0 nm

**Ruido a 500 nm:** 1 mA a 0A y 2 mA a 2A, pico-a-pico (15 segundos)

**Exactitud fotométrica:** 0.003 A para el rango (0.0 - 0.3) A y 1.0% para el rango (0,3 - 2.5) A

**Vida de la lámpara Visible:** ~1000 horas

**Rejilla de difracción** 1200 líneas/mm

**Portacubetas:** Una



## **ESPECTROFOTÓMETRO ÚNICO**

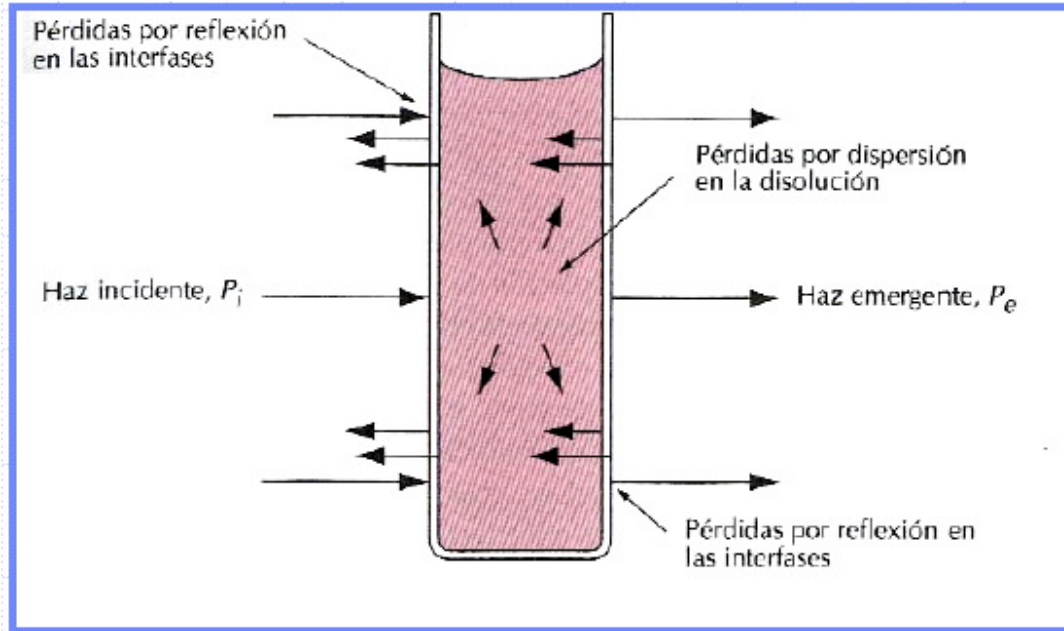
<b>Especificaciones</b>	<b>Modelo 2100UV</b>
<b>Ancho Espectral (Rendija)</b>	5 nm
<b>Monocromador</b>	Haz simple, Red de difracción de 1200 líneas/mm
<b>Rango de Longitud de Onda</b>	<b>200-1000 nm</b>
<b>Exactitud de Longitud de Onda</b>	±2 nm
<b>Repetibilidad de Longitud de Onda</b>	±1 nm
<b>Luz Espuria (Stray Light)</b>	< 0.3%T a 220 & 340 nm
<b>Rango Fotométrico</b>	0-125%T 0-2.5A 0-1999C (0-1999F)
<b>Exactitud Fotométrica</b>	±0.004A a 0.5A
<b>Fuente de Luz</b>	Bombillas Halógena de Tungsteno/Deuterio
<b>Portacubeta</b>	De cuatro cubetas

## MEDIDA DE ABSORBANCIA o TRANSMITANCIA

$$A = \log \frac{P_0}{P} = -\log_{10} T = \log 1/T$$

- ❑ P y P<sub>0</sub> no se pueden medir adecuadamente en el laboratorio
- ❑ Se obtiene una absorbancia experimental que se aproxima a la absorbancia real de la solución

$$A = \log \frac{P_0}{P} \approx \log \frac{P_{\text{disolvente}}}{P_{\text{solución}}}$$



- La interacción entre la radiación y las paredes de la celda, que produce reflexión, y la dispersión causada por heterogeneidad del disolvente (matriz), produce pérdida de potencia del haz de radiación que el instrumento registra como A.

$$A_{\text{leída}} = A_{\text{absorbente}} + A_{\text{celda}} + A_{\text{solvente}}$$

Error sistemático, sesgo

- Se compara la potencia del haz que se transmite a través de la solución del analito con la que atraviesa una **cubeta idéntica** que contiene el solvente de la muestra. Es decir, se hacen dos medidas: Blanco y Muestra

Al poner inicialmente la disolución “blanco” en la cubeta la potencia de la radiación transmitida representa la radiación incidente,  $P_0$ , menos las pérdidas por reflexión, dispersión, absorción de la cubeta, etc., es decir una potencia incidente corregida,  $P_{\text{solvente}}$ .

Cuando el blanco se sustituye por la muestra, y **suponiendo que las pérdidas** por reflexión, dispersión, absorción de la cubeta, etc., **son idénticas** de una medida a otra, la potencia transmitida será  $P_{\text{solución}}$ .

$$\begin{array}{l} A_{\text{blanco}} = A_{\text{celda}} + A_{\text{solvente}} \\ A_{\text{muestra}} = A_{\text{absorbente}} + A_{\text{celda}} + A_{\text{solvente}} \end{array} \quad \left. \vphantom{\begin{array}{l} A_{\text{blanco}} = A_{\text{celda}} + A_{\text{solvente}} \\ A_{\text{muestra}} = A_{\text{absorbente}} + A_{\text{celda}} + A_{\text{solvente}} \end{array}} \right\} \boxed{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}} = A_{\text{absorbente}}}$$

### Corrección automática

En general, los instrumentos permiten "llevar a cero de A", función que se utiliza cuando se lee el blanco y no es necesario hacer la corrección numérica

La corrección por blanco **sólo es válida** cuando se utiliza una **única celda** para las dos medidas.

- Por practicidad, se recomienda usar dos celdas

**¿Todas las celdas son ópticamente idénticas?**

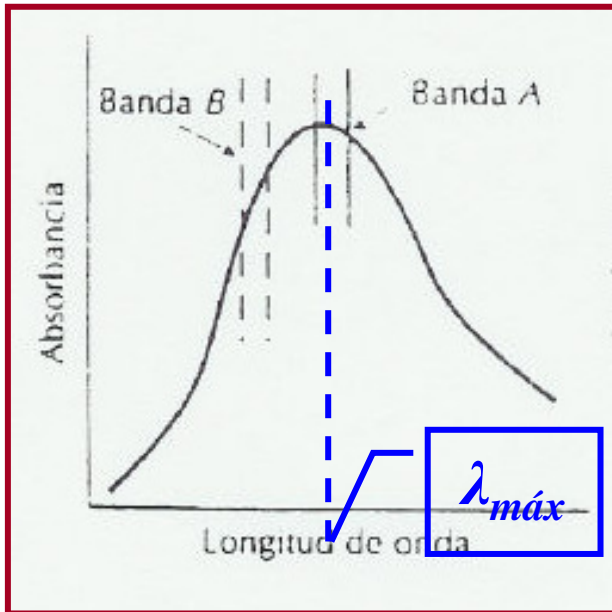
**NO**, a excepción de las **celdas apareadas**

$$A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}} = A_{\text{absorbente}} + |\Delta A_{\text{blanco1-2}}|$$

**SESGO**

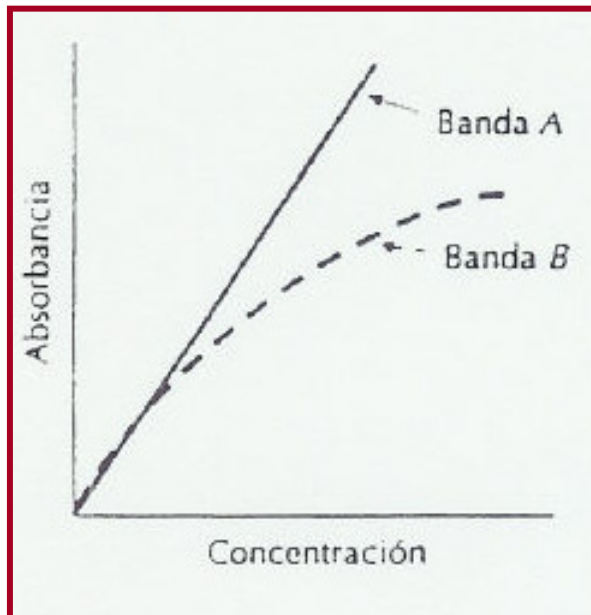
- **Corrección por transparencia de celda:** Cuando para hacer la corrección por medida de blanco, se utilizan dos cubetas **no apareadas** para el solvente y la muestra, se debe corregir la lectura del problema por diferencia de transparencia entre celdas. Entonces, utilizando blanco, se mide la absorbancia de cada celda y se tiene en cuenta la diferencia para corregir las lecturas de absorbancia en las muestras y el solvente.

## ¿Cuál es la $\lambda$ de medida?



- El espectro de absorción permite determinar la longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ).

Se pretende **LINEALIDAD**



- Se recomienda emplear  $\lambda_{m\acute{a}x}$  (banda A) para las medidas puesto que en esta condición la **absortividad puede considerarse constante** y se evitan desviaciones de la Ley de Beer **por emplear radiación policromática**



## ¿Cómo se convierte la medida de A del analito en C de analito?

### Curva de calibración

- ❑ Una curva de calibración determina la **relación funcional** existente entre la **respuesta del instrumento** de medida y una propiedad adecuada del analito como ser **masa o concentración**.
- ❑ Las curvas de calibración **se aplican** cuando **no se conoce** la relación entre la respuesta obtenida con respecto a la propiedad medida y cuando se desea **eliminar el sesgo** de un método de análisis. **Su determinación constituye el proceso de calibración**.
- ❑ Para determinar esta función **se mide la respuesta del método a una serie de patrones de concentración exactamente conocida** y se determina la relación funcional **por regresión**. Una vez determinada, es posible conocer la concentración del analito a partir de la respuesta obtenida para la muestra aplicando la función inversa (**interpolación**).
- ❑ Una forma **especialmente conveniente** de la curva de calibración es la **lineal**. Cuando ella se cumple la función que se obtiene adopta la forma:

$$R = a + bC$$

Donde R es la respuesta instrumental, por ejemplo absorbancia; C es la propiedad del analito, por ejemplo concentración; b es la pendiente de la recta (**sensibilidad**) y a es la ordenada en el origen.

## Para construir una curva de calibración se debe considerar:

✓ **Cantidad de puntos**: depende de la calidad de ajuste que se pretenda. Cuantos más puntos se tomen, se puede esperar un mejor ajuste, sin embargo, aumenta el tiempo y costo de la determinación. Existe una cantidad mínima de puntos que depende de la función de calibración. Por ejemplo, si la misma es una recta se necesitan dos puntos, si es un polinomio de segundo grado se necesitan tres puntos, etc. De todos modos, cuando no se conoce el método o el comportamiento del sistema, es recomendable utilizar un número de puntos superior a la cantidad mínima. En general se trabaja con un **mínimo de cinco puntos** durante las etapas de desarrollo del método. Cuando el método se ha validado y se verifica periódicamente, la calibración de rutina puede realizarse midiendo la cantidad mínima de puntos.

✓ **Rango de concentración**: Está determinado por la técnica de análisis a utilizar, por el instrumento utilizado y también por el analito y el problema. Por ejemplo, en espectrofotometría de absorción **se puede establecer un rango óptimo** de absorbancia dentro de los cuales debe encontrarse la medida para obtener una precisión adecuada. Entonces, para cierto analito de absorptividad conocida es posible **fijar un rango** de concentración que ha de utilizarse para obtener una **precisión aceptable**.

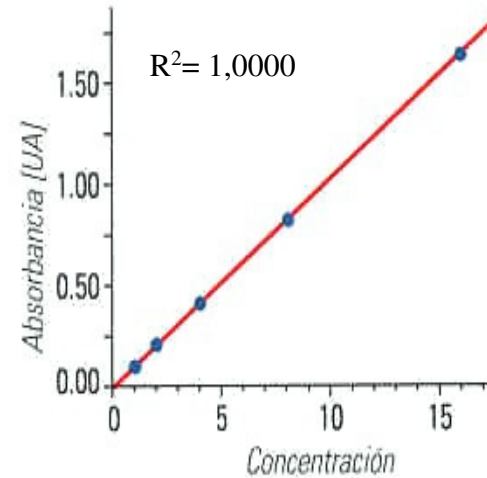
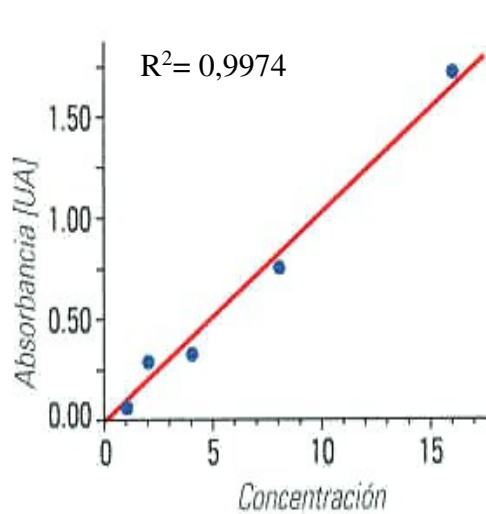
Esto también está determinado por la calidad del instrumento de medida. La excepción a este criterio se encuentra para aquellas muestras que contienen una concentración tan baja de analito (análisis de trazas) que es necesario diseñar la curva de calibración para que contenga la concentración estimada de analito en el problema tal como es y el **criterio de rango óptimo** pasa a segundo plano ya que **solo es aplicable cuando la concentración del analito en la muestra problema es suficientemente alta para que ésta se ajuste, por dilución, al rango preestablecido de la curva de calibración.**

✓ **Distribución de puntos**: Aunque no existen argumentos matemáticos importantes, es recomendable, para facilitar la presentación e interpretación, seleccionar las concentraciones de modo que los puntos de la curva queden uniformemente distribuidos y el problema centrado en el rango de C.

Cuando es posible, la variación de concentración se elige considerando la **sensibilidad** y el **rango de linealidad** del método.

✓ **Selección del método de ajuste**: Muchas veces es necesario utilizar criterios estadísticos muy rigurosos. Sin embargo, para muchos casos, es aceptable utilizar criterios simples como el factor de correlación ( $R^2$ ) con respecto a la regresión y la inspección visual de los puntos del gráfico superpuestos con las curvas de regresión.

El factor de correlación ( $R^2$ ) es un parámetro estadístico que expresa el ajuste de los puntos con respecto a una distribución particular, que es perfecto cuando es igual a la unidad.



# RESUMEN

## ETAPAS DE UN MÉTODO ESPECTOFOTOMÉTRICO CUANTITATIVO

1. Puesta en solución y eliminación de interferencias excluyentes.
2. Obtención del espectro de absorción y determinación de  $\lambda_{\text{máx.}}$  u óptima:
  - Utilizando una solución patrón y la solución blanco, medir absorbancia en el rango a utilizar (UV o Visible) utilizando un intervalo de 20 nm. En caso de observar un cambio de tendencia en la medida de absorbancia disminuir el intervalo a 5 o 10 nm. (**BARRIDO ESPECTRAL**)
3. Obtención de la curva de calibración: Siendo posible, se elige un rango de A, incluido en el rango fotométrico de mayor exactitud (0,3 -2)
  - Con el valor de A obtenido en (2) para la  $\lambda$  seleccionada y suponiendo que se cumple Beer, se calcula la absortividad (a) del analito.
  - Con el valor de **a** y suponiendo que se verifica Beer, se calcula la concentración necesaria para obtener **A** dentro del rango elegido:

$A_{\text{máxima}} \rightarrow C_{\text{máxima}}$   
 $A_{\text{mínima}} \rightarrow C_{\text{mínima}}$  } **Rango de concentración**

- Considerando que se requiere que la muestra quede centrada, el número de soluciones a utilizar (mínimo 5:  $C_1 - C_5$ ) y la sensibilidad (cuando se conozca), se elige la variación de  $C$  a emplear (**distribución uniforme**)
- 4. Se preparan las soluciones de concentración elegida en (3) y se calcula cada concentración con exactitud (patrones).
- 5. Se mide la **A** de cada patrón y de la muestra a  $\lambda$  seleccionada, replicando 5 veces la medida de  $A$  de cada solución.
- 6. Utilizando XY dispersión de **EXCEL** se grafica  **$A f (C)$**
- 7. Se determina la relación funcional entre Absorbancia y concentración, utilizando la función insertar “LÍNEA DE TENDENCIA” y seleccionando las siguientes opciones:
  - ✓ Distribución ( la de mejor ajuste según inspección visual, lineal, polinómicas ....)
  - ✓ Mostrar la ecuación de la línea de tendencia y el coeficiente de correlación ( $R^2$ )
- 8. Una vez conocida la ecuación que corresponde a la curva de calibración, se calcula por interpolación el valor de concentración de la muestra

problema utilizando el valor de Absorbancia obtenido para cada una de las replicas de la muestra problema.

9. Se realiza el tratamiento de datos y se expresa resultado

## CARACTERÍSTICAS DE LOS MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

- Amplia aplicabilidad.
- Elevada sensibilidad: los límites de detección  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  M.
- Selectividad de moderada a alta.
- Buena exactitud
- Facilidad y comodidad en las medidas espectrofotométricas.
- Fácil automatización.

## CAMPO DE APLICACIÓN

- ✓ **Especies absorbentes:** compuestos orgánicos que contengan grupos cromóforos y especies inorgánicas como son los metales de transición.
- ✓ **Especies no absorbentes:** se transforman con un reactivo para producir un compuesto absorbente (desarrollo de color).



## Bibliografía:

Skoog, Douglas et al. Fundamentos de Química Analítica. Editorial Cengage Learning. 8ta. Edición. 2009