

Química Biológica I TP 1: ESPECTROFOTOMETRIA

OBJETIVOS:

- Reforzar el aprendizaje del uso del espectrofotómetro.
- Realizar espectro de absorción de sustancias puras: soluciones de azul de metileno.
- Realizar una curva de absorbancia vs concentración.
- Determinar la concentración de una muestra problema de azul de metileno.

FUNDAMENTO:

La **espectrofotometría** comprende una serie de técnicas analíticas usadas para análisis cuali y cuantitativo.

Una radiación electromagnética se puede describir como un flujo de partículas llamadas fotones, o bien como una onda propagándose en el espacio. De esta última descripción se toma el concepto de longitud de onda, definiéndolo como la distancia entre dos máximos consecutivos de la onda.

Esta es inversamente proporcional a la energía de la misma, de tal manera que el espectro de radiaciones electromagnéticas abarca un amplio rango de energías, las de menor energía son las ondas de radio y las de mayor energía son las llamadas radiación gamma.



Las moléculas tienen un estado energético que se puede alterar por la absorción de radiación electromagnética a determinada longitud de onda, lo que se puede medir para realizar un estudio cuali o cuantitativo.

Las principales ventajas de la espectrofotometría son:

- Sensibilidad relativa elevada.
- Facilidad para realizar mediciones rápidas.
- Grado de especificidad relativamente elevado.

Para obtener la máxima sensibilidad en una determinación debe conocerse la longitud de onda de mayor absorción de la sustancia analizada, que no deberá coincidir con una alta absorción de otras sustancias presentes en la reacción.

Cuando una radiación electromagnética de intensidad **I** atraviesa un medio homogéneo, parte de la radiación es absorbida por la muestra y otra parte es transmitida con una intensidad **i**, de tal manera que se define transmitancia de una muestra como la relación entre la radiación transmitida **i** versus la intensidad luminosa incidente **I**, multiplicado x 100:

$$\% T = \frac{i}{I} \times 100$$

La absorbancia es una medida de la cantidad de Energía luminosa incidente absorbida por una sustancia en solución. Está relacionada con Transmitancia por medio de :

$$A = -\text{Log } T \quad A = \log (100 / \%T)$$

La Ley de Lambert y Beer expresa que la absorbancia de una solución es directamente proporcional al camino recorrido por la radiación electromagnética y a la concentración de la solución.

$$A = abc$$

A: absorbancia

a: absorptividad específica de cada soluto

b: distancia recorrida por el haz de luz en cm

c: concentración de la solución

La absorptividad es la constante de proporcionalidad que nos permite igualar la ecuación, sus unidades dependerán de b y c, ya que la absorbancia no tiene unidades; si b está en centímetros y c en moles por litro, la absorptividad estará en litros / mol centímetro y se denomina coeficiente de absorción molar (E).

Requerimientos para poder aplicar la Ley:

- La medición del % de T es realizada con luz monocromática
- La medición del % de T es realizada a una región de absorción del componente a estudiar.
- La referencia es elegida de tal manera que C=0 cuando T= 100% o A= 0%
- La naturaleza de la solución debe ser tal que su transmisión responda a variaciones de C.

Espectrofotómetro

Los aparatos de medida de la absorción de la radiación electromagnética se denominan espectrofotómetros y pueden representarse de forma sencilla mediante el siguiente esquema:



La luz procedente de la fuente se hace pasar a través del monocromador, que la desdobla en haces monocromáticos. El colimador tiene una rendija de ajuste variable, y según su abertura se obtiene luz de una determinada longitud de onda. La longitud de onda que se desee utilizar se selecciona variando la posición del monocromador. La luz que sale del colimador se hace pasar por la solución y luego incide sobre el fototubo, donde se detecta. La señal se envía a un registrador, el cual puede ser la escala de un galvanómetro calibrado.

Calibración del espectrofotómetro

Prender el equipo llevando la llave hacia arriba. Esperar 15 minutos para que los circuitos alcancen temperatura.

Elegir la longitud de onda deseada con el selector.

Verificar 0% de T. Se realiza en modo transmitancia y colocando un cuerpo negro en reemplazo del tubo

Ajustar con el blanco el 0% de absorbancia trabajando con la tapa cerrada.

Reemplazar el blanco de reactivos por la muestra a analizar y leer el valor correspondiente de absorbancia.

Espectro de absorción

Consiste en un gráfico que representa el % T o la Absorbancia en función de la Longitud de onda a la cual se realiza la medición, para un amplio rango de longitudes de onda y para una misma concentración c de la muestra.

Permite determinar las longitudes de onda óptimas de absorción y las concentraciones adecuadas de trabajo.

Pasos para realizar un espectro de absorción :

Prender el equipo y dejar estabilizar.

Seleccionar la longitud de onda.

Ajustar 100 % T o 0 % A con el Blanco de reactivos.

Reemplazar el blanco por la muestra y leer absorbancia.

Seleccionar una nueva longitud de onda y repetir las operaciones.

Graficar Absorbancia vs longitud de onda y seleccionar aquella donde la A sea máxima.

Curva de calibración Absorbancia vs Concentración

Permite determinar la concentración de una muestra incógnita

Preparar una muestras de concentración conocida y creciente utilizando los mismos diluyentes y reactivos que se empleará en la preparación de la muestra incógnita.

Medir la absorbancia de estas muestras.

Medir la absorbancia de la muestra problema.

Graficar Absorbancia vs concentración.

Si la sustancia cumple con la Ley de Lambert y Beer el gráfico será una recta y será posible sacar un factor ya que la pendiente de la recta será la misma en todos los puntos. Así se podrá calcular la concentración de la muestra problema.

Si la sustancia no cumple la Ley, el gráfico será una curva y se extrapolará dentro de un rango apropiado para calcular el valor de la muestra problema.

PARTE EXPERIMENTAL

1- Espectro de absorción de solución de DICROMATO DE POTASIO para determinar la longitud de onda a la cual presenta su máxima absorción.

Preparar solución $0,5 \times 10^{-3}$ M

Llevar a cero con agua antes de realizar cada lectura. Medir las absorbancias a distintas longitudes de onda, con intervalos de 20 nm, desde 340 nm hasta 500 nm.

Graficar curva de absorbancia versus longitud de onda.

Observar cuál es la longitud de onda de mayor absorción que se utilizará para realizar la curva de calibración y determinar la concentración de una muestra problema.

2- Confección de la curva absorbancia versus concentración:

A partir de la solución patrón realizar cinco diluciones: 1/2; 1/4; 1/6; 1/8; 1/10.

Medir sus absorbancias a la longitud de onda determinada anteriormente y graficar absorbancia versus concentración.

3- Determinar con la gráfica anterior la concentración de la muestra problema.

Resultados

Long onda (nm)	Azul de metileno
	Abs ($\pm 0,001$)
400	0,007
410	0,006
420	0,006
430	0,006
440	0,009
450	0,011
470	0,014
490	0,021
510	0,020
530	0,027
550	0,051
560	0,070
570	0,090
580	0,124
590	0,176
600	0,236
610	0,278
620	0,292
630	0,325
640	0,399
650	0,496
660	0,553
670	0,474
680	0,251
690	0,096
700	0,030

Se puede comprobar la relación entre el color macroscópico de la solución y la longitud de onda de máxima absorción, siendo con el azul de metileno el color azul y la absorbancia máxima en aproximadamente 650 nm zona del naranja, es decir el color complementario.