

Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)

Objetivo de la práctica: Determinación del contenido en nitritos presentes en una muestra de agua mediante la reacción colorimétrica de Griess.

Fundamentos:

Análisis de HNO_2 : La presencia de nitritos en muestras suele llevarse a cabo mediante métodos colorimétricos o cromatográficos.

En la práctica que nos ocupa, se llevará a cabo una reacción del HNO_2 con sulfanilamida (se trata de un antibiótico) en medio ácido para obtener un compuesto de diazonio que, a su vez, reacciona con la N-[1-naftil]etilendiamina para formar el compuesto de interés coloreado, con máximo de absorbancia a 540 nm.

Espectroscopía UV-Vis: Se trata de una técnica de análisis instrumental que permite medir la fracción de luz que es absorbida por una disolución.

El equipo consiste en una fuente de luz (que puede cubrir tanto el ultravioleta como el visible), que impacta sobre un elemento dispersor que permite separar la luz en sus diferentes longitudes de onda (monocromador). Así, el equipo permite seleccionar con cuál de todas las longitudes de onda se quiere irradiar la muestra, que se encuentra depositada en una cubeta cuadrada.

El material del cual esté fabricada la cubeta depende del rango en el que se pretenda medir: para obtener medidas en el rango ultravioleta, se requieren cubetas de cuarzo, dado que son transparentes para esas longitudes de onda; si por el contrario, el analito tiene máximos de absorción en el rango visible, las cubetas pueden estar fabricadas de vidrio. Su tamaño, como veremos, es un parámetro importante.

Una vez la radiación ha travesado la muestra, llega al detector, que cuantifica la cantidad recibida y calcula la *absorbancia*.

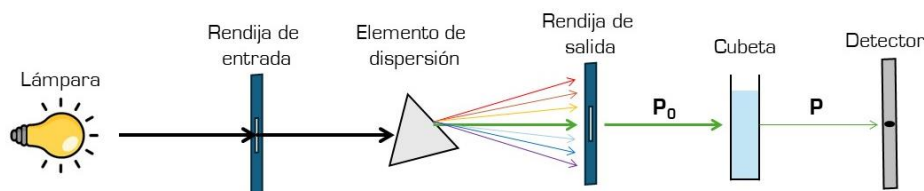


Figura 1. Esquema de un espectrofotómetro de UV-Vis.

Absorbancia: Es un parámetro físico-químico muy utilizado en laboratorios de análisis. Consiste, conceptualmente, en medir cuánta radiación de la que el equipo emite llega al receptor tras su interacción con la muestra.

Matemáticamente, se define la transmitancia, que es la relación entre P y P_0 :

$$T = \frac{P}{P_0}$$

Y la absorbancia, se obtiene con:

$$A = -\log T = -\log \frac{P}{P_0} = \log \frac{P_0}{P}$$

Debido a que la ecuación para obtener la absorbancia contiene un término referente a la cantidad de radiación que recibiría el detector de no haber ningún compuesto absorbente

presente, es imprescindible realizar un “cero” al equipo previo a la medida. Para ello, se mide previamente una disolución de **blanco**, que generalmente consiste en agua ultrapura.

Como se puede observar de las fórmulas mostradas más arriba, la absorbancia se trata de un parámetro adimensional, al ser resultado del logaritmo de un cociente.

La absorbancia se relaciona con la concentración de analito mediante la **Ley de Lambert-Beer**, que establece una relación lineal entre ambas:

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot l$$

donde c es la concentración en M [mol/litro]; ε es la absortividad molar [en L/(mol·cm)] y l es el paso o camino óptico, en cm. Generalmente, las cubetas suelen ser de 1 cm, de manera que simplifica mucho los cálculos, sin embargo, pueden usarse cubetas de mayor paso óptico para obtener una mayor sensibilidad en las medidas.

Tal y como se ve en la ley de Beer, al existir una **correlación lineal** entre absorbancia y concentración, se puede establecer una calibración entre ambos parámetros.

Calibración: El objetivo de la calibración es obtener un modelo matemático que correlacione un parámetro conocido con otro de interés y, *a priori*, desconocido. En el caso de la Química Analítica, dichos parámetros suelen ser la concentración y la señal analítica instrumental (en este caso, absorbancia).

El procedimiento es muy sencillo: se preparan una serie de disoluciones patrón de concentración conocida y se miden en el equipo, anotando su absorbancia (= señal analítica). Con ella, se obtiene un modelo matemático de tipo lineal que sigue la estructura $y = a \cdot x + b$. A continuación, se miden las disoluciones de muestra en las mismas condiciones que los patrones y se obtiene el valor de concentración correspondiente.

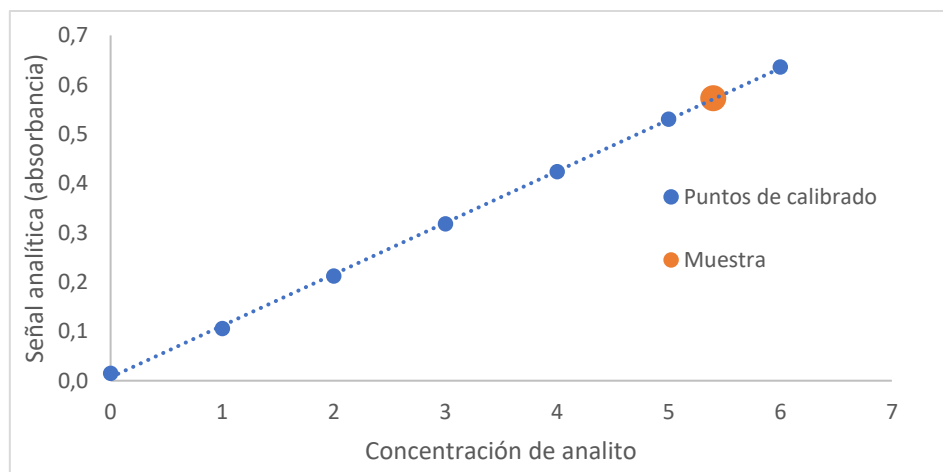


Figura 2. EJEMPLO de calibración (los valores son arbitrarios).

En el caso que nos ocupa, la ecuación de Lambert Beer nos indica que el modelo de calibración será una recta que pase por (0, 0).

Preguntas

1.- Supongamos que en el laboratorio se han medido las siguientes disoluciones y que los valores de absorbancia registrados son los mostrados. Si se ha utilizado una cubeta de 1 cm, ¿Cuál es el coeficiente de absorptividad del analito a la longitud de onda de 260 nm?

Concentración analito (mg/L)	Absorbancia a 260 nm
0	0,015
1	0,106
2	0,212
3	0,318
4	0,424
5	0,530
6	0,636

2.- En el caso de la pregunta anterior, se han registrado los siguientes valores de absorbancia para las muestras. ¿Cuál es el valor de concentración en la disolución de medida?

Réplica de muestra	Absorbancia a 260 nm
1	0,573
2	0,580
3	0,571

Ahora, sabiendo que dicha disolución de medida se preparó pipeteando 1 mL de muestra a un matraz de 10 mL de volumen total, ¿Cuál es el valor de concentración en muestra?

Anexo

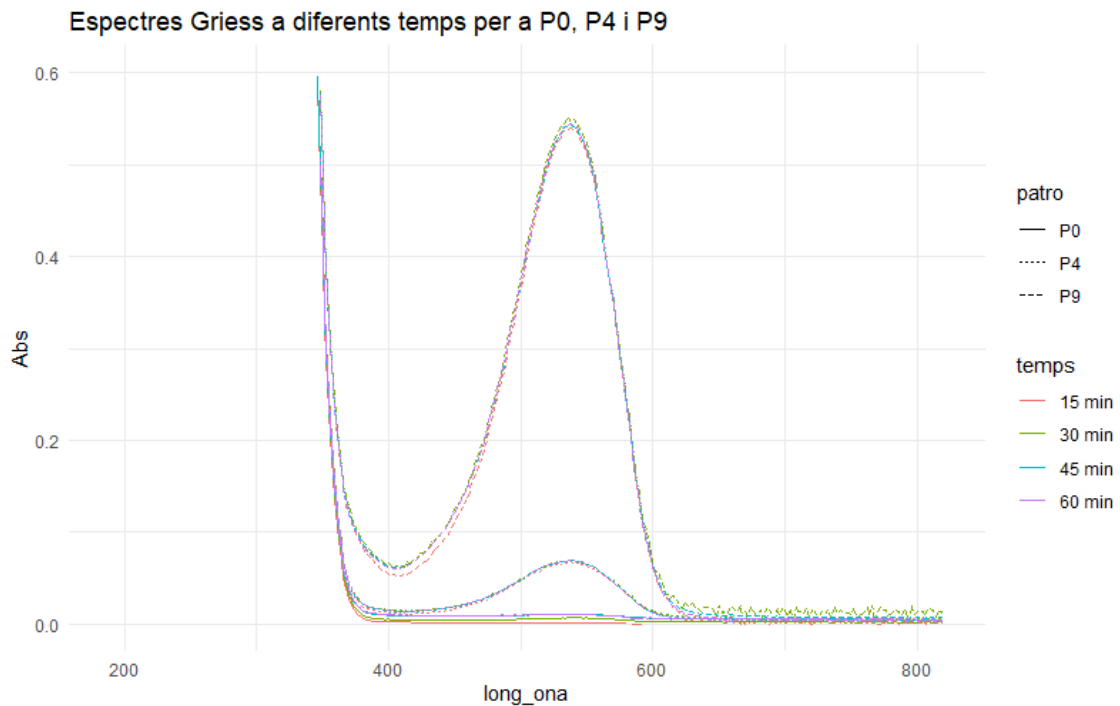


Figura 3. Espectros de absorción para 3 patrones diferentes a diferentes tiempos de reacción.