MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS DE ANÁLISIS

Introducción:

Además de las volumetrías y gravimetrías estudiadas, el químico analítico posee otros métodos de análisis que se basan, en general, en las propiedades físicas de la materia y en especial los efectos de la interacción entre radiación y materia. Estas medidas nos permiten conocer los componentes de una determinada muestra y la concentración de cada uno de ellos.

En base a la interacción materia-energia se han desarrollado una serie de instrumentos para poder realizar los análisis con resultados que no podrían obtenerse por otros métodos.

Para ello se deben conocer los fundamentos del método y obtener la información deseada. Los datos obtenidos van a ser utilizados por integrantes de otras ramas de la ciencia como químicos, bioquímicos, médicos, agrónomos, ingenieros, biológos, ciencias de la salud y alimentación, etc., dependiendo del tipo de muestra analizada.

Absorciometría molecular:

Vamos a describir algunas formas en las cuales la composición de la materia y la concentración de los analitos que la componen pueden estudiarse midiendo su habilidad para absorber la luz o radiación electromagnética.

Los métodos de absorción se basan en la disminución de la intensidad de un haz de radiación electromagnética cuando éste interacciona con un analito.

Naturaleza de la luz:

La luz es una forma de energía radiante que se propaga como una onda electromagnética que se transmite fácilmente por el espacio a altas velocidades.

La porción del espectro electromagnético que se utiliza en medidas absorciométricas es sólo una pequeña porción del mismo y que arbitrariamente lo dividimos en radiación ultravioleta (UV) que tiene un intervalo de longitudes de onda entre 200-400nm; visible desde 400-800nm e infrarroja (IR) desde 800 a 2,5 micras.

Hay dos propiedades de la luz que son de interés en absorciometría. Una es su *calidad* o clase que se describe por su longitud de onda o por su frecuencia, que es el espectro de absorción que es como una "huella digital" para determinar cualitativamente el analito absorbente y la otra es la *cantidad* que se refiere a la intensidad de absorción.

Interacción entre materia y energía:

En general, los métodos ópticos son toda técnica instrumental que se basa en la interacción materia-energía. Como resultado puede haber una absorción o emisión de energía radiante que son muy utilizadas en el análisis químico de muestras biológicas.

¿Cómo se produce el fenómeno de interacción materia-energía?

Cuando un haz de luz (radiación) blanca atraviesa un tubo que contiene agua pura, no sufre modificación, pero si el agua ahora contiene un poco de permanganato de potasio ($KMnO_4$), la radiación que emerge del tubo es de color violeta ¿Qué significa esto? Que una solución de $KMnO_4$ deja pasar, del total de la radiación incidente, sólo los componentes azul y rojo (violeta), siendo absorbida el resto de la radiación. Como este fenómeno se ha puesto de manifiesto con luz blanca, quiere decir que se ha producido en el intervalo visible de la radiación electromagnética donde el ojo humano es sensible y actúa como detector.

La absorción de energía radiante no es arbitraria, sino que sigue reglas perfectamente determinadas sobre parámetros como la longitud de onda absorbida o la frecuencia y la cantidad de absorción que son los principios básicos de la absorciometría molecular.

Si se considera la absorción de la luz en la región visible, los objetos se ven porque transmiten o reflejan sólo una porción de la luz en esta región.

Cuando una luz policrómatica (luz blanca), que contiene todo el espectro de longitudes de onda de la región visible, se hace pasar a través del objeto, éste absorbe algunas longitudes de onda y transmite las que no absorbe. Estas longitudes de onda residuales que se transmiten se ven como color. Este color será complementario de los colores absorbidos.

Podemos considerar el color como energía electromagnética comprendida dentro del espectro visible (400-800nm) que al incidir sobre la materia puede ser absorbida total o parcialmente. Cuando la absorción del espectro visible es total, el objeto aparece de color negro. Si rechaza o transmite todas las longitudes de onda del visible, se ve blanco y si absorbe sólo algunas longitudes de onda y transmite las restantes, el color que se observa es el complementario de las radiaciones absorbidas y depende de la respuesta ocular de cada individuo.

Carácter dual de la radiación electromagnética:

La radiación electromagnética tiene carácter ondulatorio y corpuscular. El primero posee una componente eléctrica y la otra magnética perpendicular a la anterior y ambas normales al sentido de propagación (Figura 1).

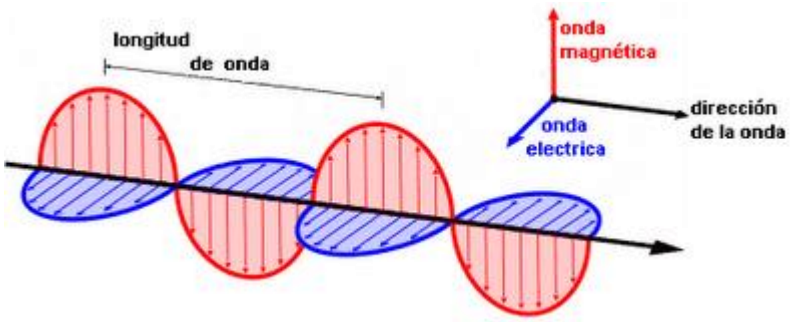


Figura 1 Carácter dual de la radiación electromagnética

En el segundo, la radiación electromagnética es como un flujo de paquetes discretos de energía llamados fotones, por eso se dice que la radiación electromagnética tiene un carácter dual.

La energía de un fotón es proporcional a la frecuencia de la radiación:

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

Donde:

E = energía de radiación.
h = constante de Plank.
ν = frecuencia.
c = velocidad de la luz.
λ = longitud de onda

Parámetros ondulatorios:

En la figura 2, se puede observar la *amplitud A* de la onda sinusoidal que se define como la longitud del vector eléctrico en el máximo de la onda. Otro parámetro es la *longitud de onda* (λ) que es la distancia lineal entre dos puntos sucesivos (máximos o mínimos).

La frecuencia, ν, es el número de oscilaciones del campo por segundo.

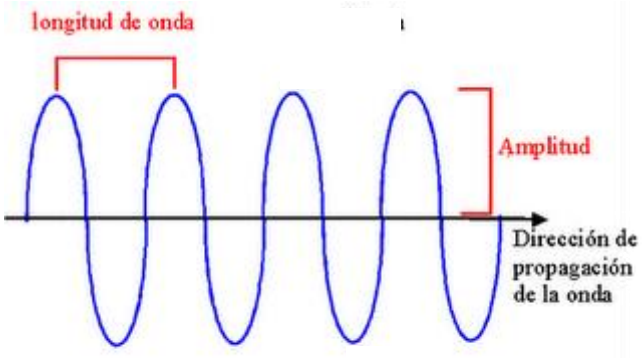


Figura 2 Parámetros ondulatorios

Espectro electromagnético:

El espectro electromagnético abarca un intervalo muy amplio de longitudes de onda que va desde los rayos γ hasta las ondas de radio, pasando por los rayos X, ultravioleta, visible, infrarrojo y microondas (Figura 3).

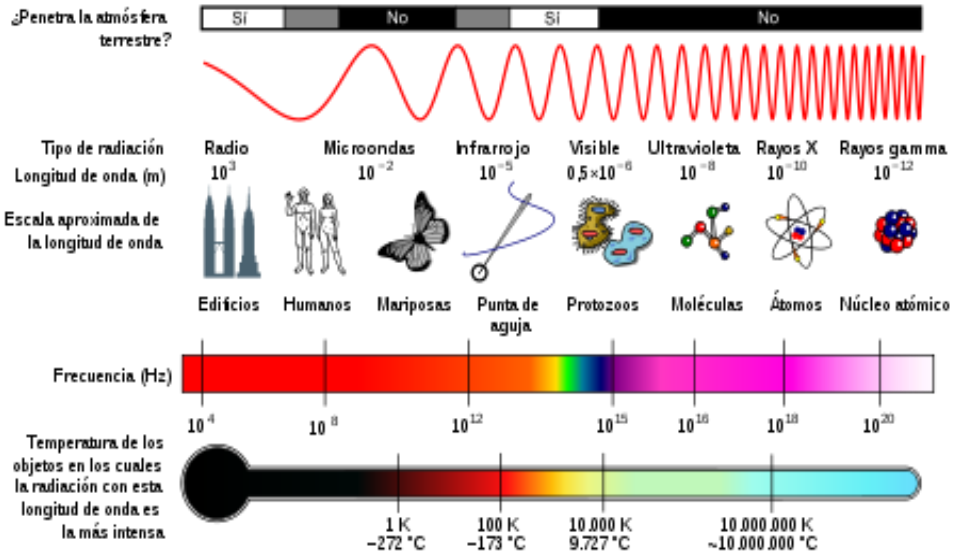


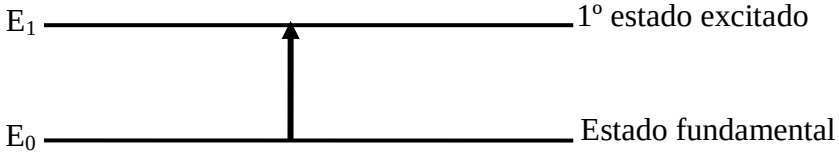
Figura 3

Teoría de la absorción de la radiación:

Todo analito molecular es capaz de absorber ciertas longitudes de onda características de la radiación electromagnética.

Cuando la radiación pasa a través de un medio transparente, ciertas frecuencias se eliminan por absorción porque la energía se transfiere temporalmente a la molécula y como consecuencia, disminuye la intensidad de la radiación.

La absorción de energía promueve a estas partículas desde su estado fundamental a uno ó varios estados excitados de mayor energía. La energía de los fotones excitadores debe coincidir exactamente con la diferencia de energía entre el estado fundamental y uno de los estados excitados de la especie absorbente. Esta diferencia de energía es propia de cada especie y así proporciona un medio para caracterizar los constituyentes de una muestra (análisis cualitativo).



Leyes de la absorción de la radiación:

Supongamos que tenemos un medio homogéneo, transparente contenido en una celda de camino óptico ***b***. La celda tiene caras paralelas, planas y es transparente a la radiación. Un haz de luz (radiación) monocromática de intensidad I_0 incide sobre una de las caras de la celda en forma normal (perpendicular). Una sustancia capaz de absorber luz que es parcialmente transparente transmitirá una porción de radiación incidente I_t (intensidad transmitida). Parte de la radiación incidente se absorbe en el medio absorbente, de modo que una parte de la I_0 emerge de la celda (Figura 4).

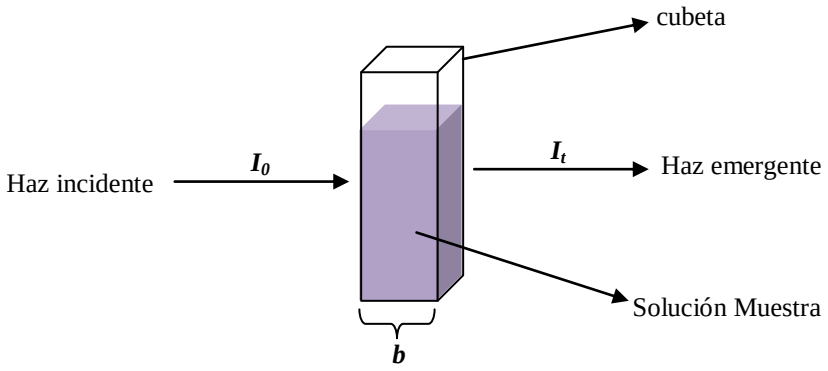


Figura 4 Leyes de la absorción

Ley de Lambert-Beer:

La ley de Lambert-Beer, es una combinación de dos leyes, las cuales permiten relacionar la concentración de un compuesto dado, con la proporción de luz absorbida por el compuesto, a una longitud de onda determinada.

Una sustancia capaz de absorber luz que es parcialmente transparente transmitirá una porción de radiación incidente. La relación entre las intensidades de luz transmitida e incidente equivale a la ***TRANSMITANCIA*** (***T***).

$$T = I_t / I_0$$

Donde:
I_0 = intensidad de luz incidente.
I_t = intensidad de luz transmitida.

La intensidad de luz se define como el número de fotones que están interactuando en una unidad de tiempo (segundos). Un valor de ***transmitancia*** de 100% representa una sustancia totalmente transparente, mientras que un valor de 0% representa una sustancia totalmente opaca.

Para valores intermedios se puede definir la ***ABSORBANCIA*** (***A***), la cual está dada por el logaritmo en base 10 del recíproco de la ***transmitancia***:

$$A = \log (1/T) = \log (I_0/I_t)$$

Es posible ahora definir la ***Ley de Lambert-Beer***, la cual establece que la ***absorbancia*** es proporcional a la concentración de la sustancia que absorbe y al grosor del camino que debe atravesar el haz de luz. Esto se expresa en la siguiente ecuación:

$$A = \varepsilon.b.C$$

Donde:

A = absorbancia
ε = absortividad molar cuando la concentración viene expresada en mol L y el camino óptico en cm.
b = camino óptico
C = concentración

Unidades:

A = adimensional
ε = L mol^{-1} cm^{-1}
b = cm
C = mol L^{-1}

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

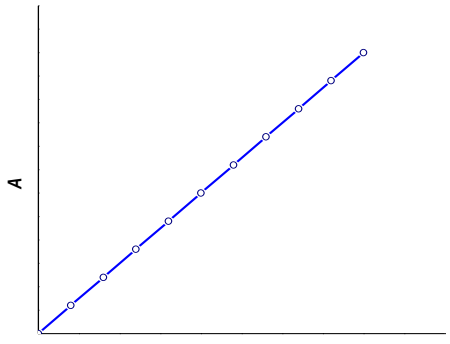


Figura 5

Curva de calibrado:

Cuando se hace una representación gráfica de la A vs. C, si se cumple la ley de Lambert.Beer da una recta que pasa por el origen y cuya pendiente es ε.b . Conocido el camino óptico, se puede conocer ε .

La figura 5 es una representación de una *curva de calibrado* que permite hacer determinaciones cuantitativas.

Curva espectral:

Las variaciones que se producen con la λ generalmente son muy grandes y una curva que representa dichas variaciones se llama *curva espectral o espectro*, que es característico para cada sistema soluto-solvente, tiene una forma particular y sirve desde el punto de vista cualitativo.

La curva espectral permite decidir la zona espectral más adecuada para el trabajo cuantitativo ya que se puede obtener la λ óptima de trabajo.

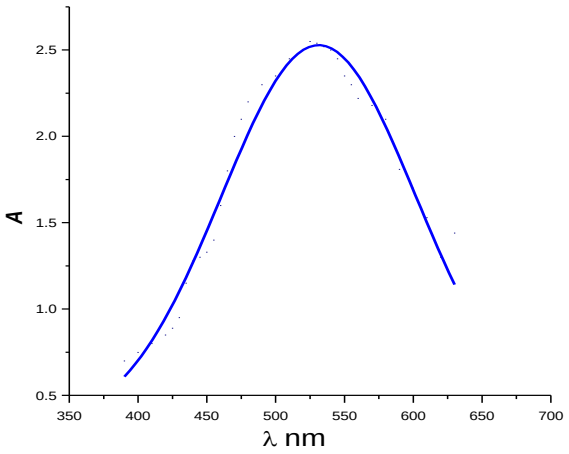


Figura6 Curva espectral de Permanganato de potasio

Limitaciones de la ley de Lambert-Beer:

La ley de Beer es una *ley límite* ya que describe bien el comportamiento de la absorción en soluciones diluidas. A concentraciones mayores, la proximidad de los iones altera la absortividad molar por interacciones electrostáticas.

Desviaciones de la ley de Lambert-Beer

Las desviaciones que se producen de la ley de Beer pueden ser:

1- Desviaciones químicas:

Aparecen cuando el analito se disocia, asocia o reacciona con el disolvente para dar un producto diferente que presenta un espectro distinto.

2- Desviaciones instrumentales:

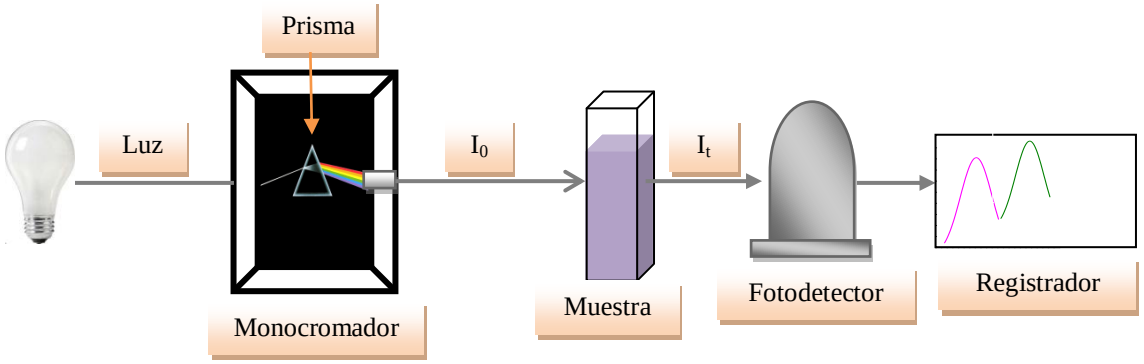
- No monocromaticidad de la radiación.
- Mala respuesta del detector.
- Deficiencia de la amplificación de la señal.
- Celdas con caminos ópticos variables.

Instrumental utilizado en UV-Visible: Espectrómetro:

Los instrumentos espectrométricos incluyen 5 componentes:

1. Fuente estable de energía radiante.
2. Un dispositivo que aisle una región estrecha del espectro electromagnético o selector de λ.
3. Una celda o cubeta transparente para la muestra.
4. Un detector de radiación que convierte la energía radiante en una señal utilizable (generalmente eléctrica).
5. Un sistema de tratamiento y lectura de la señal que visualiza la señal transducida en una escala, en un medidor digital o un registro gráfico.

En la siguiente figura se ilustra los diferentes componentes de un espectrómetro.



Pasos a seguir toda vez que se desee emplear un espectrofotómetro:

1-Preparar a partir de una droga de calidad garantizada, una solución del componente que se desea determinar en una concentración tal que el valor de la absorbancia de a la longitud de onda en que la absortibidad sea máxima, caiga entre 0,3 y 0,7 unidades de A.

Figura de Espectrómetro UV-Visible

2- Utilizando la solución preparada en 1, efectuar el

trazado de la curva espectral para lo cual se realiza una serie de medidas de A a distintas longitudes de onda y concentración constante.

3-Trabajando sobre la curva espectral seleccionar la longitud de onda de trabajo que corresponda a un máximo de la curva y en zona de meseta, si fuera posible. Esto tiene por objeto lograr máxima sensibilidad y reproducibilidad.

4- Preparar una serie de soluciones patrones de concentraciones crecientes y perfectamente conocidas, en el componente a determinar.

5-Desarrollar el color con un reactivo cromogénico adecuado, cuando ello sea necesario.

6-Realizar las lecturas de la Absorbancia de los patrones a la longitud de onda seleccionada (λ = cte.), y graficar A vs. Concentración. Esta gráfica permitirá verificar el cumplimiento de la ley de Beer y calcular el valor de ε.

7-Medir la absorbancia de la muestra y determinar su concentración

Nota: Las mediciones espectrofotométricas se realizan tomando como referencia una solución (blanco) que contiene todos los reactivos y fue sometida al mismo tratamiento que la muestra, pero que ***no contiene*** el elemento a determinar.

*Las celdas deben tomarse por sus caras **despulidas** y colocarse de modo que la radiación incida sobre las **caras pulidas.***

APLICACIONES DE LA ABSORCIOMETRIA MOLECULAR UV-VISIBLE

Análisis cualitativo y cuantitativo de *curcumina* en una muestra de colorante para comidas

La **curcumina** es un colorante natural, procedente de la cúrcuma especia obtenida del rizoma de la planta del mismo nombre cultivada principalmente en la India, también denominada "azafrán de la India" y utilizada desde la antigüedad para diversas aplicaciones. Tiene un sabor cálido, amargo y se usa frecuentemente para darle el sabor o el color a los polvos de curry, a las mostazas, a las mantequillas y a los quesos. Además tiene muchas propiedades importantes para la salud. En la *Unión Europea*, es un aditivo alimentario autorizado con el código ***E-100ii***.

Preparación de las soluciones patrones*:*

a) Preparar 250 mL de una solución patrón de curcumina de 1000 ppm.

b) Tomar 50 mL de la solución anterior y diluirla a 100 mL con agua destilada .Ésta solución tiene una concentración de 500 ppm.

c) A partir de la solución de 500 ppm, preparar diluciones de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 ppm de curcumina respectivamente (volumen final 10 mL).

Trazado de la curva espectral:

a) Realizar la curva espectral variando la longitud de onda entre 380-500nm, a intervalos de 10nm.

b) Para el trazado de curva espectral utilizar la solución patrón de 25 ppm de curcumina anotando para cada longitud de onda la A leída.

Procedimiento:

1. Encender el equipo.
2. Colocar en el portacelda la celda con la solución de referencia (agua destilada) y llevar a 0 (cero) de absorbancia (100%T).
3. Colocar en la celda la solución de 25 ppm de curcumina y medir la absorbancia.
4. Repetir el paso 2 y 3 para cada longitud de onda. Anotar los valores de A.
5. Trazar la curva espectral graficando A vs. λ y elegir la λ de trabajo más adecuada.

Trazado de la curva de calibrado y determinación de la concentración de curcumina en una muestra.

1- Medir la absorbancia de las soluciones patrones preparadas de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 ppm de curcumina y anotar los valores.

2- Realizar una gráfica de Absorbancia vs. concentración.

3- Medir la absorbancia de la muestra a la misma longitud de onda y determinar su concentración haciendo uso del gráfico.