

INTRODUCCION TEORICA FUNDAMENTOS DE ESPECTROFOTOMETRÍA

Introducción :

La espectrofotometría es uno de los métodos de análisis más usados, y se basa en la relación que existe entre la absorción de luz por parte de un compuesto y su concentración. Cuando se hace incidir luz monocromática (de una sola longitud de onda) sobre un medio homogéneo, una parte de la luz incidente es absorbida por el medio y otra transmitida, como consecuencia de la intensidad del rayo de luz sea atenuada desde P_0 a P , siendo P_0 la intensidad de la luz incidente y P la intensidad del rayo de luz transmitido. Dependiendo del compuesto y el tipo de absorción a medir, la muestra puede estar en fase líquida, sólida o gaseosa. En las regiones visibles y ultravioleta del espectro electromagnético, la muestra es generalmente disuelta para formar una solución.

Cada sustancia tiene su propio espectro de absorción, el cual es una curva que muestra la cantidad de energía radiante absorbida, **Absorbancia**, por la sustancia en cada longitud de onda del espectro electromagnético, es decir, a una determinada longitud de onda de la energía radiante, cada sustancia absorbe una cantidad de radiación que es distinta a la que absorbe otro compuesto (Fig. 1)

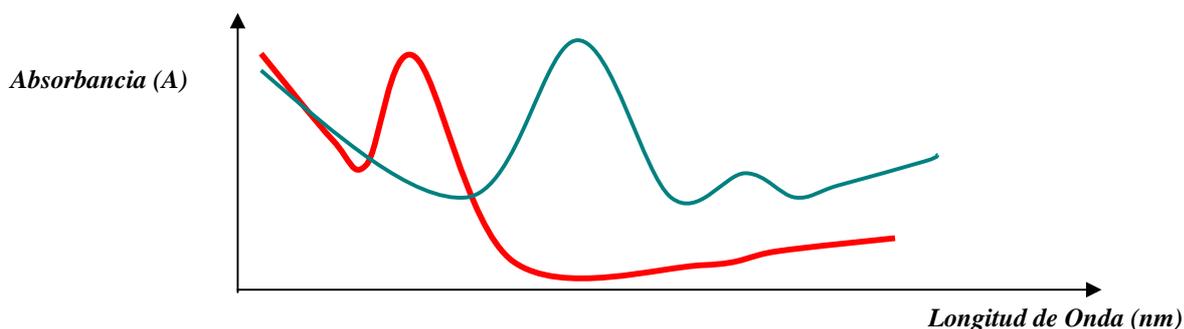


Fig. 1 Espectro de absorción de dos compuestos diferentes.

El método espectrofotométrico se rige por dos leyes fundamentales : Ley de Lambert y Ley de Beer.

1.- Ley de Lambert. :

Esta ley establece que cuando pasa luz monocromática por un medio homogéneo, la disminución de la intensidad del haz de luz incidente es proporcional al espesor del medio, lo que equivale a decir que la intensidad de la luz transmitida disminuye exponencialmente al aumentar aritméticamente el espesor del medio absorbente (Fig. 2):

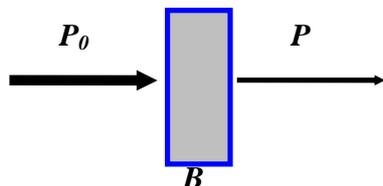


Fig. 2. Ley de Lambert

La siguiente relación matemática da cuenta de esta ley: $P / P_0 = e^{-kb}$

P_0 : Intensidad de la luz incidente P : Intensidad de la luz transmitida b : Espesor del medio absorbente
 k : Constante, cuyo valor depende de la naturaleza del soluto, de la longitud de onda de la luz incidente, del espesor del medio absorbente y de la naturaleza del medio.

2.- Ley de Beer :

La intensidad de un haz de luz monocromática disminuye exponencialmente al aumentar aritméticamente la concentración de la sustancia absorbente, cuando este haz pasa a través de un medio homogéneo (Fig. 3).

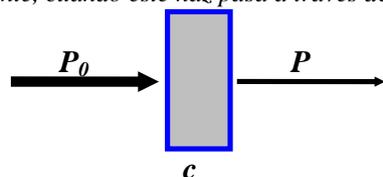


Fig. 3. Ley de Beer

La relación matemática que da cuenta de esta ley se muestra a continuación :

$$P / P_0 = e^{-k \cdot c}$$

donde :

P_0 : Intensidad de la luz incidente

P : Intensidad de la luz transmitida

c : Concentración de la solución

k : Constante, cuyo valor depende de la naturaleza del soluto, de la longitud de onda de la luz incidente, de la concentración de la solución, y frecuentemente, de la naturaleza del medio.

Ambas leyes se combinan en una sola, generando la **Ley de Lambert-Beer**

$$\log P_0 / P = a b c \quad \text{ó} \quad A = a b c$$

$$A = \log P_0 / P = - \log T$$

donde :

a : Absortividad

b : Longitud o espesor del medio (longitud de la cubeta)

c : Concentración de la solución

$P/P_0 = T$: Transmitancia

Los términos absorbancia y transmitancia son definidos a continuación

Transmitancia (T) : Es la razón entre la luz monocromática transmitida (P) por una muestra y la energía o luz incidente (P_0) sobre ella. Tanto la energía radiante incidente como la transmitida deben ser medidas a la misma longitud de onda.

$$T = P / P_0 = 10^{-abc} \quad \text{ó} \quad \%T = 100 P / P_0$$

Se acostumbra a considerar la transmitida como la razón de la luz transmitida por la muestra y la luz transmitida por un estándar arbitrario. Este estándar puede ser el líquido (solvente) en que esta disuelta la muestra, aire, blanco analítico (solución que contiene todos los componentes de la solución problema menos la sustancia problema) u otra sustancia elegida arbitrariamente. Debido a que la transmitancia de este estándar no es necesariamente 100%, es necesario especificar el estándar con el cual la muestra es comparada.

Absorbancia(A) : Se define como la cantidad de energía radiante absorbida por una sustancia pura o en solución. Matemáticamente, corresponde al logaritmo negativo de la transmitancia. T , transmitancia expresada como fracción decimal $\%T$, transmitancia expresada como porcentaje.

$$A = - \log T = 2 - \log \%T$$

Pero.

$$T = P / P_0 = 10^{-abc}$$

Luego

$$A = - \log (P / P_0) = - \log 10^{-abc}$$

$$A = a b c$$

Esta ecuación indica que la absorbancia es una función lineal de la concentración, donde a es una constante de proporcionalidad llamada absorptividad. La magnitud de a depende de las unidades de b y c . Si la concentración c está expresada en moles por litro y la longitud de la cubeta b en centímetros, la constante a recibe el nombre de absorptividad molar (ξ). Luego

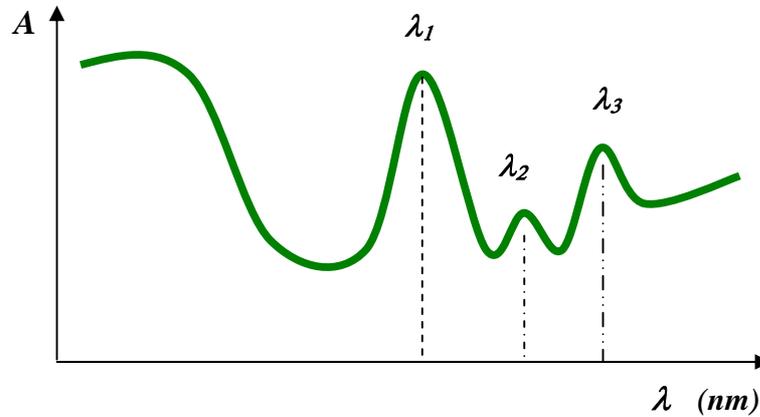
$$A = \xi b c$$

Mediciones de transmitancia y absorbancia.

Las mediciones de absorbancia o transmitancia se hacen por comparación entre la muestra problema y un estándar arbitrario o referencia. Como la referencia debe poseer un porcentaje de transmitancia de 100%, esta es llamada referencia de 100%, o una absorbancia de cero.

Selección de longitud de onda de trabajo.

La longitud de onda de trabajo corresponde, generalmente, a la longitud de onda en la cual la absorbancia del analito (sustancia a analizar) es máxima, y recibe la denominación de Lambda máximo (λ_{max}). Para seleccionar el λ_{max} , se hace un espectro de absorción o curva espectral, y que consiste en una gráfica de la absorbancia de una solución de la sustancia absorbente de concentración adecuada, medida a distintas longitudes de onda y en ella se determina el λ_{max} . (Fig.4).



En este caso
 $\lambda_{max} = \lambda_1$

Fig. 4 . Curva espectral

Las mediciones de absorbancia se hacen en la zona de longitudes de onda donde se espera que absorba la sustancia problema. Si se trata de sustancias coloreadas, las mediciones se realizan en la zona visible del espectro electromagnético (380 a 800nm). En el caso de sustancias no coloreadas, las mediciones se realizan en la región ultravioleta del espectro electromagnético (200 a 380nm).

Curva de Calibración.

Uno de los métodos más utilizados para determinar la concentración de una muestra problema, es el método de la curva de calibración. Esta curva de calibración es una gráfica que relaciona la concentración de al menos cinco soluciones de estándar de concentraciones conocidas, con la absorbancia de cada uno de ellos a la longitud de onda máxima (λ_{max}) (Fig. 5).

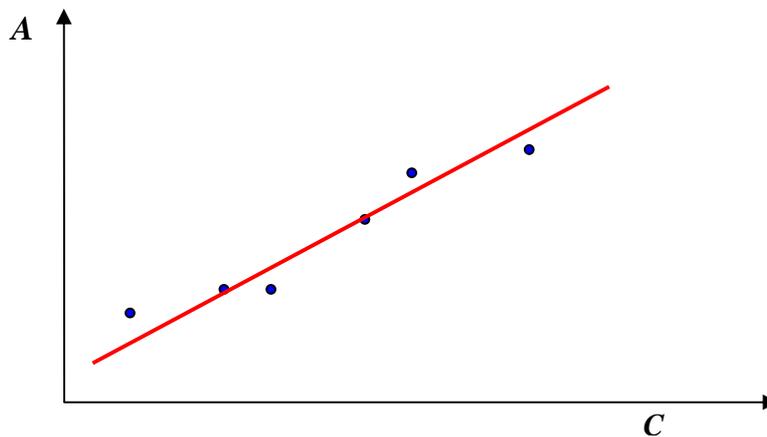


Fig. 5. Curva de Calibración

Una vez obtenida la gráfica se determina la función matemática que presenta dicha recta a través del tratamiento estadístico de regresión de los mínimos cuadrados, la cual relaciona la absorbancia y la concentración de un analito. La siguiente ecuación matemática corresponde a dicha función:

$$A = m c + n \quad (\text{Ecuación 1})$$

A : Absorbancia.

n : Intercepto de la recta

m : Pendiente de la recta y que corresponde al producto entre absortividad \underline{a} de la muestra y el espesor \underline{b} de la cubeta.

Luego se mide la absorbancia de la solución problema y se interpola su valor en la gráfica o se reemplaza en la ecuación (1), para obtener el valor de concentración del analito. La concentración de la solución problema debe estar comprendida en el rango de concentración que comprende la curva de calibración. Si la concentración de la solución problema es menor que la concentración del estándar más diluido, debe usarse el método de adición estándar, que consiste en adicionar un volumen determinado de un estándar concentrado a la solución problema, antes de realizar la lectura y que permite que esta lectura este dentro de las obtenidas para la curva de calibración. En el caso contrario, si la concentración del analito es mayor que la concentración del estándar más concentrado la solución problema deberá ser diluida.

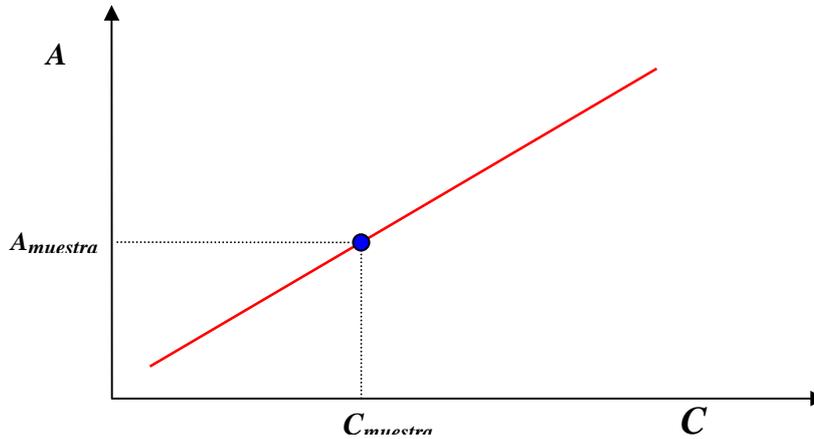


Fig. 6. Interpolación Gráfica

Al hacer la curva de calibración, se debe emplear la longitud de onda de máxima absorbancia (λ_{max}), para obtener una recta con la máxima pendiente y así tener mayor sensibilidad y precisión al hacer las mediciones.

La medición de la absorbancia de la solución problema debe hacerse a la misma longitud de onda que fue hecha la curva de calibración.

TRABAJO PRÁCTICO N°2
TEJIDOS DUROS MINERALIZADOS
ESMALTE Y HUESO

INTRODUCCION

La parte dura de un diente está compuesta por tres tejidos mineralizados: esmalte, dentina y cemento. El esmalte es de origen epitelial bucal y tiene características químicas - biológicas únicas. La dentina y cemento son de origen mesodermico y tienen características químicas - biológicas similares al hueso. El esmalte adulto tiene solo un 0,5% de proteína en peso, en comparación con el 20% de hueso y dentina. El esmalte humano tiene un componente inorgánico entre un 95-96%, para dentina, cemento y hueso estos valores están alrededor de un 70%. Los componentes minerales de esmalte, dentina, cemento y hueso están formados por cristales de fosfato de calcio básicos con una distribución espacial de sus átomos equivalentes a la hidroxiapatita mineral. La disolución del tejido mineral dentario, es el mecanismo principal de la caries. Los factores que controlan la disolución es un proceso complejo, donde factores como impurezas, tamaño del cristal, defectos cristalinos, afectan la velocidad de disolución.

Objetivos :

- Visualizar la desmineralización ácida del diente y hueso.
- Determinar espectrofotométricamente uno de sus productos de disolución, fosfato.
- Comparar la velocidad de desmineralización entre diente y hueso.

1. Desmineralización ácida de dientes y huesos

Materiales necesarios

- 3 Dientes y 3 huesos
- HCl 0,05 M
- Acido láctico 0,05 M y concentrado
- Tubos de ensayo
- Pinzas

Etapa experimental :

Tome tres dientes y tres trozos de hueso y colóquelos en tubos de ensayo, agrégueles las siguientes soluciones durante el tiempo indicado para cada uno de ellos.

- d. 5ml de HCl 0,05 M por 5 minutos
- e. 5ml de ácido láctico 0,05 M, por 30 minutos
- f. 5ml de ácido láctico concentrado, por 30 minutos

Retire los trozos de diente y hueso de cada tubo con la pinza y rotule las soluciones obtenidas indicando tipo de sólido, ácido, tiempo de incubación y el número de su grupo.

2. Determinación de fosfatos

Principio:

El fosfato de naturaleza inorgánica presente en el material biológico, forma con el molibdato de sodio un fosfomolibdato, que por reducción, se convierte en azul de molibdeno, determinable por espectrofotometría; y que es proporcional a la cantidad de fosfato inorgánico presente:

Materiales

- Espectrofotómetros
- Reactivo 1 : Solución Bisulfito - Borato : 0,19 M - $5,2 \times 10^{-2}$ M.
- Reactivo 2 : Solución Molibdato de Sodio - Acido Sulfúrico : 0,1M - 2,6 N.
- Reactivo 3 : Solución Reductora (Sulfato P - Metilaminofenol)- Bisulfito : $2,9 \times 10^{-2}$ M - 0,32M
- Reactivo 4 : Solución Sulfito - Carbonato (Desproteinizadora) $5,5, \times 10^{-2}$ M - 0,4M
- Reactivo 5 : Solución Patrón Fosfato : 5mg P/100ml solución.
- Matraces aforados de 10 ml o tubos de ensayo
- Pipetas de 1 ml graduadas al 0.1
- Pipetas de 2 ml
- Reloj de alarma
- Agua destilada

Curva de Calibración :

a.- Marque 5 matraces aforados de 10 ml según la siguiente tabla y agregue a cada uno de ellos los reactivos correspondientes y en el orden determinado. Cumpla con cada etapa de la reacción:

N° Matraz	Vol. Reactivo 5 (ml)
1	0
2	0.1
3	0.2
4	0.3
5	0.4

b.- Agregar a cada matraz 1,0 ml de reactivo 1
 0,2 ml de reactivo 2
 0,2 ml de reactivo 3

c.- Tapar los matraces, mezclar bien y dejar reposar por 15 minutos a temperatura ambiente.

d.- Agregar a cada matraz : 2 ml de reactivo 4

e.- Mezclar bien, enrasar con agua a 10 ml y medir transmitancia a 750 nm.

f.- Llene la siguiente tabla y calcule $A = 2 - \log T$

Matraz N°	Reactivo 5 (ml)	mg P/100 ml	% T	A
1	0	0		
2	0.1	0.05		
3	0.2	0.10		
4	0.3	0.15		
5	0.4	0.20		

g.- Grafique en papel milimetrado mg P/100 ml v/s A y calcule a partir de estos datos la ecuación de regresión correspondiente.

Soluciones Muestras:

- a. Tome 1 ml de las soluciones muestras clorhídricas y dilúyalas a 50 ml con agua.
- b. Tome 1 ml de las soluciones muestras clorhídricas diluidas y llévela a un matraz de 10 ml, repita todos los pasos de la curva de calibración a partir del punto b.
- c. Tome 1ml de las muestras acéticas y lácticas (sin diluir) y transfírelas a matraces de 10 ml y proceda en forma similar al punto anterior

Cálculos:

Muestras clorhídricas. El valor de concentración obtenido por interpolación o a través de la ecuación de regresión se multiplica por 10 y luego por 50. Se expresa como mg de P por 100 ml.

Muestras acéticas y lácticas. El valor de concentración obtenido por interpolación o a través de la ecuación de regresión se multiplica por 10. Se expresa como mg de P por 100 ml.

Cuadro Resumen:

Complete el siguiente cuadro con sus resultados experimentales.

Concentración de fosfato mg/100 ml

	Diente	Hueso
Acido clorhídrico 0.05 M		
Acido láctico 0.05 M		
Acido láctico concentrado		

NOTA : Si utiliza tubos de ensayo, complete a 10 ml sumando los volúmenes utilizados y completando con agua destilada por diferencia.