

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**POSGRADO EN CIENCIAS QUIMICAS**

***“Apuntes para Espectrometría de  
Radiación Ultravioleta Visible (UV/VIS)”***



Por:  
M. en C. A Ma. Magdalena García Fabila

Toluca Mexico, Octubre 2016.

# ***PRESENTACIÓN***

La Espectroscopía de Radiación Ultravioleta Visible es una técnica empleada en el análisis farmacéutico, ambiental, químico y de alimentos entre otros, ya que es una herramienta para la identificación y cuantificación de compuestos y ampliamente usada por las licenciaturas y maestrías que se imparten en la Facultad de Química, la cual cuenta con espectrofotómetros Marca Perkin Elmer, Thermo y Shimadzu. Estos equipos son empleados por alumnos e investigadores para el desarrollo de tesis de Licenciatura maestría o doctorado, además de investigaciones diversas, por lo que es necesario un compendio informativo de las posibilidades de la técnica y de sus bases teóricas.

Este documento se diseñó para el curso de Tópicos selectos "espectroscopía UV " de la Maestría en Ciencias Químicas y busca ser material de apoyo para el conocimiento de la técnica de Espectroscopía de Radiación Ultravioleta Visible, como el punto de partida para el desarrollo de análisis cualitativos y cuantitativos, la profundidad de los temas debe considerarse dependiendo de los alumnos, ya sean químicos o no químicos.

## *INDICE*

	Página
Presentación	2
Indice	3
1. Introducción a los métodos espectroscópicos	4
1.1 El espectro electromagnético	4
1.1.1 Propiedades de onda	4
1.1.2 Unidades de medición en espectroscopía	5
1.2 Regiones del espectro electromagnético	5
1.3 Formas de Interacción de la Materia con la Energía	7
1.3.1 Absorción	7
1.3.2 Emisión	8
1.3.3 Luminiscencia	8
1.3.4 Fluorescencia resonante	8
1.3.5 Fluorescencia Normal	9
1.3.6 Fosforescencia	10
1.3.7 Dispersión de la Luz	10
1.4 Leyes que rigen la espectrofotometría	11
1.4.1 Absorción en una muestra	11
1.4.2 Ley de Beer o Lambert y Beer	13
1.4.2.1 Desviaciones de la ley de Beer	14
2. Espectrofotometría Ultravioleta	16
2.1 Fundamentos de la Espectroscopia UV-VIS	16
2.2 Identificación espectrométrica de Compuestos orgánicos	19
2.3 Instrumentación UV-VIS	21
2.3.1 ¿Cómo es un equipo de UV-VIS?	22
2.4 Manejo de muestras para la técnica UV VIS	24
2.5 Cuantificación en la espectroscopía UV-VIS	26
3. Ejercicios	28
4. Practicas de Laboratorio	33
Glosario	37
Bibliografía	38

## 1. INTRODUCCIÓN A LOS MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

La radiación electromagnética es una forma de energía radiante que posee una naturaleza doble:

1. Como función de onda con la cual están relacionados los métodos de reflexión, refracción e interferencia constructiva y destructiva.
2. Como pequeñas partículas de energía llamadas fotones, que integran el espectro electromagnético con radiaciones de diferente energía y longitud de onda.

### 1.1 El Espectro Electromagnético

Una gran parte de los métodos analíticos, están basados en la interacción de la energía radiante con la materia. El mejor ejemplo de *radiaciones electromagnéticas* es la luz (radiación electromagnética visible) y ocupa sólo una pequeña región en un espectro de radiación electromagnética. Las ondas infrarrojas, Rayos X, ondas de radio, son clasificadas como radiación electromagnética y consiste en una señal simultánea alterna; eléctrica y magnética. Clerk Maxwell contribuyó con el valioso concepto vectorial eléctrico y magnético sobre las ondas electromagnéticas:

- “Una onda electromagnética de frecuencia es esencialmente una corriente eléctrica alterna con un efecto magnético asociado”.

Cada uno de estos tipos de radiación, tiene una cantidad de energía diferente. La clasificación de la radiación, de acuerdo a su energía nos da el espectro electromagnético. La clásica descripción de radiación electromagnética nos dice que ésta es continua y tiene una onda sinusoidal móvil. La onda móvil de la radiación electromagnética puede ser descrita en términos de longitud de onda y frecuencia.

#### 1.1.1 Propiedades de onda.

Una onda electromagnética, como su nombre lo indica, está formada por un componente eléctrico y uno magnético, que oscilan en planos perpendiculares entre sí y perpendiculares a la dirección de propagación de la onda. (Figura 1).

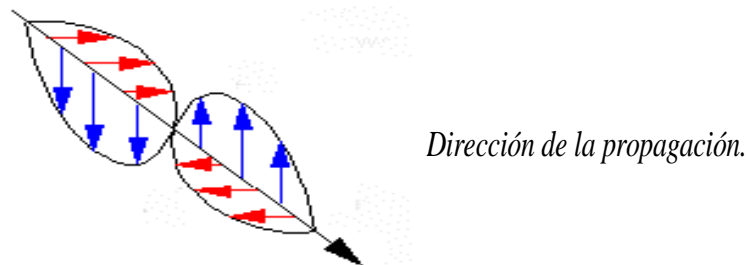


Figura 1. Movimiento ondulatorio de la luz. (Spectometric Analisis 2000)

Las propiedades de onda están relacionadas con la velocidad de la luz mediante la expresión:

$$c = \lambda \nu \approx 3 \times 10^{10} \text{ cm/s}$$

$\lambda$  = longitud de onda, es la distancia entre dos puntos correspondientes en la onda (Fig. 1).  
 $\nu$  = frecuencia, que es el número de ondas que pasa por un punto en la unidad de tiempo, o sea, en un segundo.

La Longitud de Onda y la Frecuencia están relacionados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\lambda = \frac{C}{\nu} \quad \therefore \nu = C\lambda^{-1}$$

donde:  $\nu'$  Número de Onda

### 1.1.2 Unidades de medición en espectroscopía.

Las unidades que se emplean en espectroscopía son:

Longitud de onda  $\lambda$ : se expresa en centímetros y subdivisiones, las cuales son:

Amstrongs:  $10^{-8}$  cm

Nanómetros :  $10^{-7}$  cm

Micrómetros:  $10^{-4}$  cm

Frecuencia: la unidad de frecuencia  $\nu$  en ciclos por segundo es el Hertz, o bien  $1/\lambda = \nu = \text{cm}^{-1}$ , llamada Kayser o número de onda.

## 1.2 REGIONES DEL ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO.

Un haz de energía luminosa está formado por radiaciones de diferente longitud de onda y frecuencia que abarcan el espectro electromagnético. De acuerdo con la longitud de onda de las radiaciones se forman las diferentes regiones que se describen en la figura 2 y en la tabla 1.

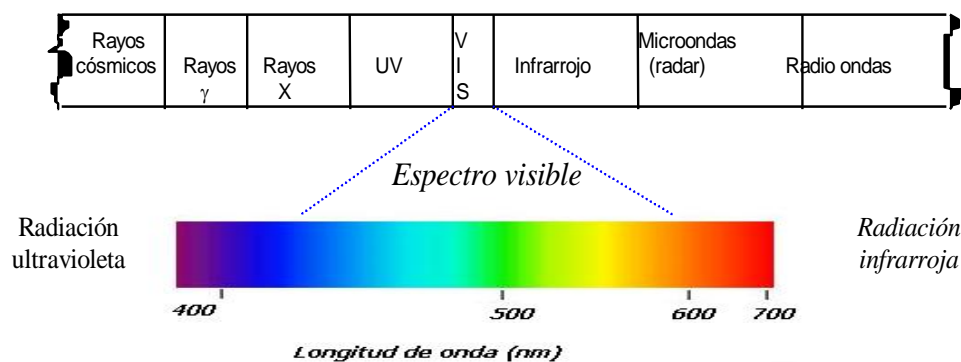


Figura 2 Regiones del espectro electromagnético. (Basado en Spectrometric Analisis 2000)

Tabla 1. Regiones del espectro electromagnético

<i>Región del espectro</i>	$\lambda$	$seg^{-1}$	$cm^{-1}$
Rayos cósmicos	0-10 <sup>-2</sup> Å	10 <sup>20</sup> - 3.2x10 <sup>19</sup>	
Rayos $\gamma$	10 <sup>-2</sup> - 3x10 <sup>-2</sup> Å	3.2x10 <sup>19</sup> - 1x10 <sup>18</sup>	
Rayos X	3x10 <sup>-2</sup> - 10 <sup>-2</sup> Å	1x10 <sup>18</sup> - 1x10 <sup>16</sup>	
Ultravioleta lejano (UV al vacío)	10 - 200 nm	1x10 <sup>16</sup> - 1x10 <sup>15</sup>	
Ultravioleta cercano	200 - 400 nm	1x10 <sup>15</sup> - 7.5x10 <sup>14</sup>	
Visible	400 - 750 nm	7.5x10 <sup>14</sup> - 4.0x10 <sup>14</sup>	2.5x10 <sup>4</sup> - 1.3x10 <sup>4</sup>
Infrarrojo cercano	0.75 - 2.5 $\mu$ m	4.0x10 <sup>14</sup> - 1.2x10 <sup>14</sup>	1.3x10 <sup>4</sup> - 4x10 <sup>3</sup>
Infrarrojo medio	2.5 - 50 $\mu$ m	1.2x10 <sup>14</sup> - 6x10 <sup>12</sup>	4x10 <sup>3</sup> - 2x10 <sup>2</sup>
Infrarrojo lejano	50 - 1000 $\mu$ m	6x10 <sup>12</sup> - 1x10 <sup>11</sup>	2x10 <sup>2</sup> - 10
Microondas	0.1 - 100 cm	1x10 <sup>11</sup> - 1x10 <sup>8</sup>	10 - 1x10 <sup>-2</sup>
Radio ondas	1 - 1000 m	1x10 <sup>8</sup> - 1x10 <sup>5</sup>	

1. **Rayos cósmicos y rayos gamma.** Por ser los rayos de menor longitud de onda, su energía es muy alta (1 X 10<sup>6</sup> eV) y dan lugar a reacciones nucleares.

2. **Rayos X.** Su energía es elevada ( 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup> eV) y producen transiciones de electrones cercanos al núcleo.

3. **Ultravioleta lejano.** Corresponde a una energía (1.24 X 10<sup>2</sup> a 6.2 eV) suficiente para excitar un electrón de unión sigma de su estado basal al orbital de antiunión  $\sigma^*$ .

4. **Ultravioleta cercano** ( 6.2 a 3.1 eV); excita los electrones  $\pi$  y los de no unión n.

5. **Visible.** ( 3.1 a 1.65 eV). Como en el caso del ultravioleta cercano excita electrones  $\pi$  y n. Las sustancias que se analizan son coloridas.

6. **Infrarrojo cercano** ( 1.65 a 0.5 eV). En esta región se observan picos debidos a vibraciones de estiramiento entre el hidrógeno y otros átomos, así como bandas de sobretono y bandas combinadas. Debido a la baja intensidad de las bandas, esta parte del espectro es de poca utilidad.

7. **Infrarrojo medio o fundamental.** Corresponde el espectro situado entre 2.5 y 50 micrómetros ( 0.5 a 0.025 eV). Se observan vibraciones fundamentales. Entre 2.5 y 15 micrómetros se usa mucho en la determinación de grupos funcionales orgánicos y, por lo tanto, es la parte que tiene mas aplicaciones en el análisis tanto cualitativos como cuantitativos. Las absorciones entre 15 y 50 micrómetros se deben a flexiones de átomos de peso relativamente alto o a compuestos cíclicos. Este espectro no tiene mucha aplicación en química analítica.

8. **Infrarrojo lejano.** La longitud de onda de esta parte del espectro se encuentra entre 50 y 1000 micrómetros ( 0.025 a 0.00124 eV). En ellas se observan vibraciones y rotaciones de baja frecuencia. No tiene actualmente aplicaciones en química analítica.

9. **Microondas.** Comprende la región del espectro entre 0.1 y 100 cms. (  $0.00124$  a  $1.24 \times 10^6$  eV). En esta región, al igual que en el infrarrojo lejano, se observan rotaciones y vibraciones de baja frecuencia.

10. **Radio ondas.** La región de longitud de onda entre 1 y 1000 m. registra las orientaciones de los spines fenómeno en el que se basan la resonancia magnética nuclear y la resonancia de spin electrónico.

La región del espectro visible ( figura 2) representa el color que absorbe un compuesto a determinada longitud de onda. El color que se observa en el compuesto es el complementario del que absorbió. La tabla 2 representa el color que absorbe un compuesto a la longitud de onda correspondiente, y el color que presenta el mismo.

*Tabla 2. Colores típicos del intervalo visible del espectro electromagnético.*  
(Esta tabla es válida cuando el color observado proviene de una sola sustancia colorida.)

$\lambda$	<b>Color absorbido</b>	<b>Color observado</b>
380 - 450	violeta	amarillo-verdoso
450 - 495	azul	amarillo
495 - 570	verde	violeta o rojo violeta
570 - 590	naranja	azul
590 - 620	amarillo	azul-verdoso
620 - 750	rojo	verde-azuloso

### **1.3 FORMAS DE INTERACCIÓN DE LA MATERIA CON LA ENERGÍA.**

La interacción de los compuestos con la energía radiante puede ser por las propiedades de onda de esta, como ya se mencionó, o bien como partículas energéticas. En el presente capítulo se tratará de las radiaciones como partículas energéticas. Las formas de interacción desde este punto de vista son:

#### **1.3.1 Absorción**

Cuando una radiación electromagnética pasa a través de un compuesto químico, este puede absorber una parte de la radiación. Cada frecuencia de dicha radiación tiene una energía propia  $h\nu$ . Si el compuesto contiene algún nivel energético que corresponda exactamente a una frecuencia determinada, este absorbe radiación pasando de un estado basal a un estado excitado (figura 2 a).

En esta excitación las especies absorben una cantidad de energía  $h\nu$  exactamente igual a la diferencia de energía  $E'$  entre los estados basal y excitados. Como parte de la radiación a una frecuencia determinada se absorbe, su intensidad disminuye y esta propiedad se aprovecha para la identificación o cuantificación de compuestos. La energía total de una molécula incluye los componentes electrónicos, vibracionales y rotacionales.

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

donde:

$E_{\text{electrónica}}$ : describe la energía electrónica de la molécula.

$E_{\text{vibracional}}$ : energía de la molécula relacionada con las diferentes vibraciones atómicas.

$E_{\text{rotacional}}$ : energía relacionada con la rotación de las moléculas alrededor de su centro gravitacional.

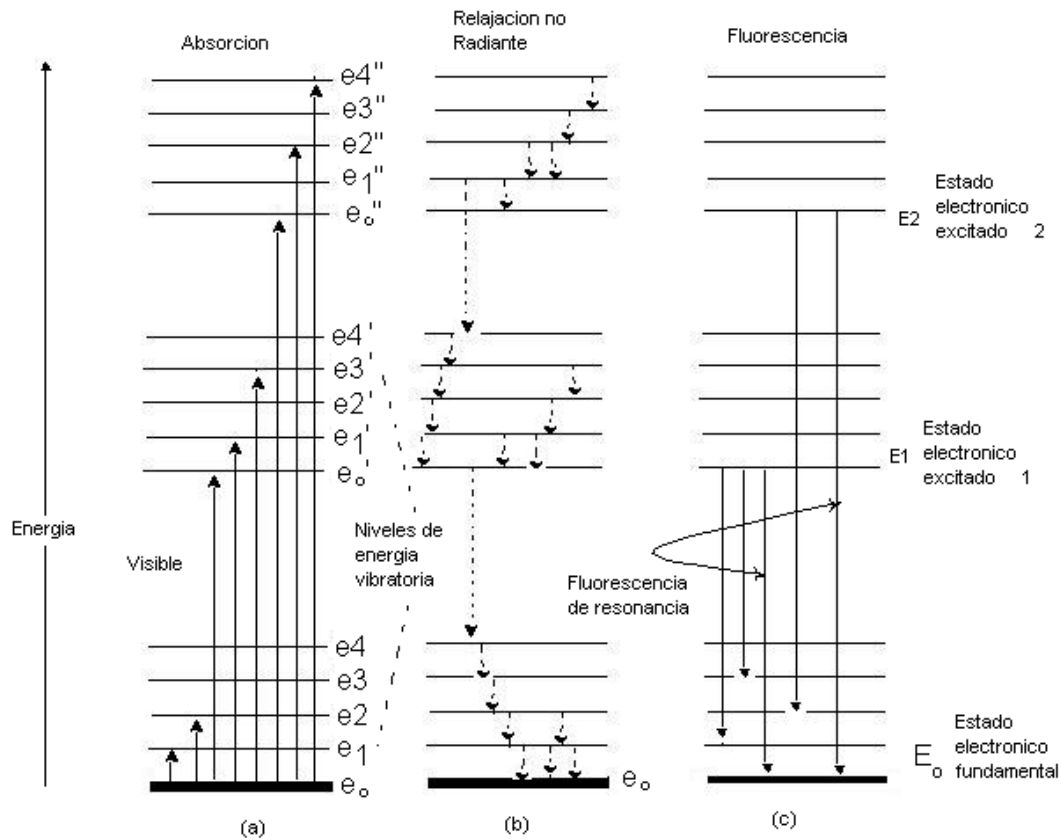


Figura 2. Diagrama parcial de niveles energéticos para una molécula orgánica fluorescente. (Skoog & West, 1992)

### 1.3.2 Emisión

La emisión es el fenómeno, inverso a la absorción, en donde el átomo, ión o molécula pasa de su estado basal al excitado por medio de energía diferente a la radiante, como arcos eléctricos, flamas, bombardeos electrónicos, etc, y vuelve a su estado basal o a un nivel menor de energía emitiendo fotones de energías características ( figura 2b). La intensidad de la radiación emitida depende del número de especies capaces de emitir fotones.



### ***1.3.3 Luminiscencia***

La luminiscencia es un fenómeno que combina la absorción con la emisión, ya que el átomo, ión o molécula pasa al estado excitado absorbiendo fotones, y regresa al estado basal emitiéndolos. Según la energía de los fotones emitidos, se pueden producir fenómenos de fluorescencia resonante, fluorescencia normal y fosforescencia.

### ***1.3.4 Fluorescencia resonante.***

Se produce cuando una molécula absorbe energía pasando a un estado excitado y vuelve a su estado basal mediante la emisión de un fotón de la misma energía que el fotón absorbido (figura 2 c)

### ***1.3.5 Fluorescencia normal.***

Si la molécula excitada se encuentra en solución rodeada de gran número de moléculas cercanas, pierde fácilmente energía vibracional por colisiones, y cae al nivel mas bajo de energía vibracional en el estado excitado. A este proceso se le conoce como relajación vibracional y es representado por R en la figura 3.

Cuando parte de la energía se eliminó por relajación vibracional la molécula sufre una transición del estado excitado  $E_1$  de mayor energía al estado excitado  $E_2$  de menor energía. Dicha transición se conoce como conversión interna. Otra parte de energía se pierde rápidamente por relajación vibracional ( $R_2$ ) hasta llegar al nivel mas bajo de energía vibracional en el estado excitado  $E_2$ . Cuando del estado excitado  $E_2$  vuelve la molécula al estado basal emitiendo un fotón, se produce la fluorescencia normal. La frecuencia de esta fluorescencia es menor que la fluorescencia resonante. Muchos compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, producen fluorescencia en el espectro visible cuando se irradian con luz ultravioleta.

### **Estado singulete y estado triplete.**

Tanto en la fluorescencia resonante como en la normal la molécula tiene todos sus electrones con spines apareados; entonces se dice que se encuentra en estado singulete. El estado basal en la mayor parte de las moléculas es estado singulete. Cuando la molécula tiene dos electrones con espines no apareados la molécula se encuentra en estado triplete, de menor energía que el estado singulete. Esto se debe a que dos electrones con espines apareados tiene mayor energía que dos no apareados.

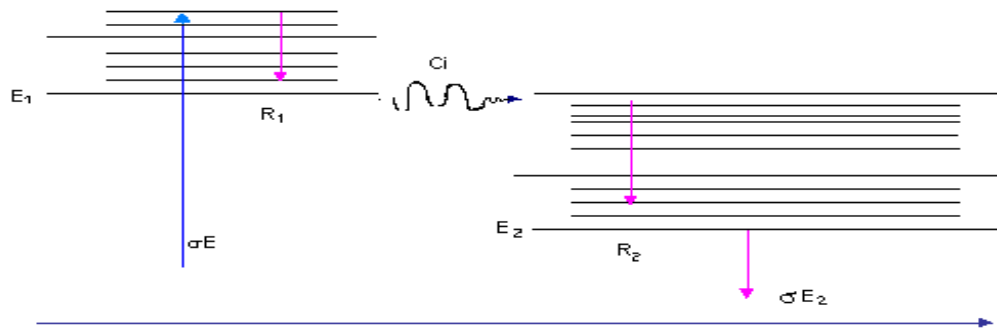


Figura 3 Fluorescencia normal.  $\sigma E_1$  representa la energía de excitación; R la energía de relajamiento;  $\sigma E_2$  fotón emitido de menor energía; E1 estado excitado de mayor energía; E2 nivel menor de energía de excitación. (Skoog & West, 1992)

### 1.3.6 Fosforescencia.

Cuando una molécula pasa de un estado singlete a un estado triplete se presenta el fenómeno llamado “ intersistema cruzado”. Con el cruzamiento los electrones se desaparean y la molécula queda en un nivel vibracional excitado que por relajación vibracional pasa al nivel mas bajo de energía E3. La energía del estado E3 es menor que E2, de lo que se deduce que una molécula en estado triplete tiende a perder su energía por colisiones. Si la molécula en un estado triplete pierde su energía  $\sigma E_3$  por emisión de un fotón, se produce la fosforescencia.

En el esquema del mecanismo se representa en la figura 4.

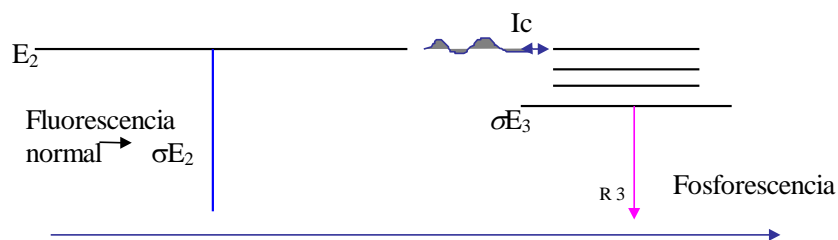


Figura 4. Mecanismo de fosforescencia. Ic representa el intersistema cruzado; E3 la molécula en estado triplete;  $\sigma E_3$  la energía del fotón emitido para volver del estado tríplete al estado basal. (Skoog & West, 1992)

La fosforescencia se presenta en muy pocas moléculas y actualmente no se suele aplicar a la química analítica.

### 1.3.7 Dispersión de la luz

Si una radiación electromagnética choca con una partícula pequeña con respecto a la longitud de onda de la radiación, esta sufre una perturbación debida a que la partícula esta sujeta al campo eléctrico oscilante. Si la partícula se puede polarizar \*, el campo eléctrico de la radiación induce un dipolo en la partícula. Durante el paso de la onda, el polo inducido oscila a la misma frecuencia que la radiación y forma un campo propio que actúa como una fuente de radiación. Esta radiación es de la misma frecuencia que la original, pero se propaga en todas direcciones produciendo una dispersión. Todos los átomos y moléculas pueden causar esta dispersión, conocida como “dispersión Rayleigh”.

Una de las propiedades mas importantes de la luz dispersa es que la intensidad de la radiación Rayleigh aumenta en proporción a la cuarta potencia de la frecuencia del rayo incidente. Cuando las partículas son grandes, comparadas con la longitud de onda del rayo incidente, la dispersión se denomina “dispersión Mie”, con las mismas frecuencias que el rayo incidente, pero la distribución angular de la luz dispersa no es uniforme como en la dispersión Rayleigh. Esta propiedad se aplica para la determinación del tamaño de partícula. La dispersión Mie es importante en nefelometría y turbidimetría, ya que están basadas en la medida de la dispersión de la radiación en partículas suspendidas.

## 1.4 LEYES QUE RIGEN LA ESPECTROFOTOMETRÍA

### 1.4.1 Absorción en una muestra.

Cuando un rayo  $P_0$  pasa a través de una solución, parte de este rayo se absorbe y el rayo que sale  $P$  es de una intensidad menor al incidente ( figura 5).

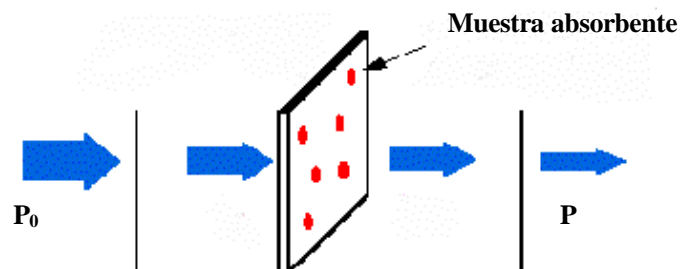


Figura 5. Paro de la luz a través de una celda con una solución que absorbe luz. (Basado en Spectrometric Analisis 2000)

La relación entre el rayo que sale y el rayo que incide se denomina transmitancia, T:

$$T = P/P_0 \quad (1)$$

La cantidad de luz absorbida es proporcional al número N de iones o moléculas capaces de absorber energía; por lo tanto, T disminuye a medida que la concentración aumenta.

Ley de Lambert y Beer, conocida generalmente como ley de Beer. Si se divide la solución en pequeñas secciones (figura 6), en cada sección se absorberá una pequeña cantidad de radiación  $\sigma P$ , que es proporcional a  $\sigma N$ , la cual ésta dada por la relación:

$$\sigma P = -K P \sigma N \quad (2)$$

K = Constante de proporcionalidad

P = Poder radiante

El signo negativo se debe a que la radiación disminuye.

Si las secciones se hacen infinitamente pequeñas la ecuación (22.5) se puede dar en forma diferencial:

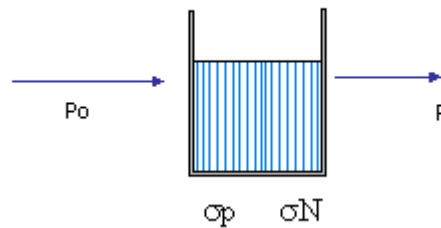


Figura 6. Celda dividida en pequeñas secciones.

$$dP = -K P dN \quad (3)$$

$$dP / P = -K dN \quad (4)$$

Si se integra entre los límites  $P_0$  y  $P$  y cero y  $N$  para el número de iones o moléculas presentes en la solución:

$$\int_{P_0}^P \frac{dP}{P} = -k \int_0^N dN \quad (5)$$

$$\ln \frac{P}{P_0} = -kN \quad (6)$$

Como N es proporcional a la concentración y a la longitud de la celda por donde atraviesa el rayo:

$$N = K'bc \quad (7)$$

b = longitud de la celda  
 c = concentración de la solución  
 K' = constante de proporcionalidad

Sustituyendo la ecuación (7) en la (8) y combinando K y la K' y la conversión del logaritmo natural a logaritmo base 10, se obtiene una constante llamada absorptividad a.

$$\log \frac{P}{P_0} = -abc \quad (8)$$

Cambiando signo:

$$-\log \frac{P}{P_0} = abc \quad (9)$$

$$-\log T = abc \quad (10)$$

$$-\log T = A \quad (11)$$

A = Absorbancia

$$A = abc \quad (12)$$

#### ***1.4.2 Ley de Beer o ley de Lambert y Beer***

La ecuación (12) se conoce como la ley de Beer o ley de Lambert y Beer; el valor de la absorptividad es característico de cada sustancia y se emplea cuando la concentración de la solución es estudio está dada en partes por millón o por miligramos; pero si la concentración es molar, la *a* se constituye por  $\epsilon$  y la constante se denomina absorptividad molar.

$$A = \epsilon bc \quad (13)$$

En los aparatos más sencillos la escala está dada en por ciento de transmitancia:

$$\%T = (T) (100) \quad (14)$$

Al graficar la respuesta como absorbancia en relación con la concentración, se obtiene una línea recta como la que aparece en la figura 7b.

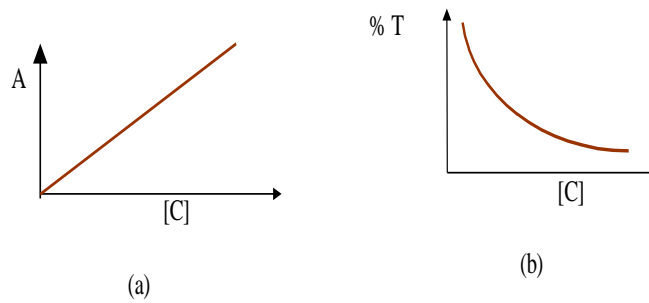


Figura 7 Relación de la respuesta y la concentración [C].

En cambio sí se gráfica porcentaje de transmitancia contra concentración, se obtiene una curva (figura 7b). La equivalencia de porcentaje de transmitancia (%T) a absorbancia (A) se emplea la relación:

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

#### 1.4.2.1 Desviaciones de la ley de Beer.

Se dice que se cumple con la ley de Beer, cuando al graficar la concentración & respuesta en absorbancia, se obtiene una línea recta, en cambio, cuando no se obtiene una línea recta, al graficar absorbancia contra concentración, se dice que existe una desviación de la ley de Beer. Cuando la desviación es hacia el eje de las ordenadas, es positiva, y negativa si dicha desviación es hacia el eje de las abscisas (figura 8).



Figura 8. Desviaciones de la ley de Beer.

Las desviaciones de origen físico se deben a cambios en el medio, como son: índice de refracción, presión, temperatura y solvente. Entre las de origen químico se encuentran cambios en el equilibrio químico, incluyendo pH, la presencia de agentes acomplejantes, reacciones competitivas entre iones metálicos, etc. Por último, los instrumentales, como

una radiación policromática, fuente de radiación inestable, detectores deficientes, diafragma no controlado, selección inadecuada de longitud de onda, defectos en la parte óptica, etc.

## 2. ESPECTROSCOPIA DE RADIACION ULTRAVIOLETA-VISIBLE

### 2.1 Fundamentos de la Espectroscopia UV-VIS

La absorción molecular en la región ultravioleta y visible del espectro depende de la estructura electrónica de una molécula. La absorción de energía se cuantifica y da por resultado la elevación de los electrones desde orbitales en el estado básico a orbitales de mayor energía en un estado excitado. Para muchas estructuras electrónicas, la absorción no ocurre en una porción fácilmente accesible de la región ultravioleta.

En la práctica, la espectrometría ultravioleta está limitada en gran parte a los sistemas conjugados.

Sin embargo se tiene gran ventaja en cuanto a la selectividad de la absorción ultravioleta: los grupos característicos pueden reconocerse en moléculas de complejidad ampliamente variable. Una gran parte de la molécula relativamente compleja puede resultar transparente en el ultravioleta de modo que existe la posibilidad de obtener un espectro similar al de una molécula bastante mas simple.

El espectro ultravioleta está formado por una gráfica de la longitud de onda en función de la intensidad de absorción . ( Véase figura 9)

Los datos frecuentemente se muestran en forma de gráfica o presentación tabular de la longitud de onda en función de la absorptividad molar o el logaritmo de la absorptividad molar  $\epsilon_{\max}$  o  $\log \epsilon_{\max}$

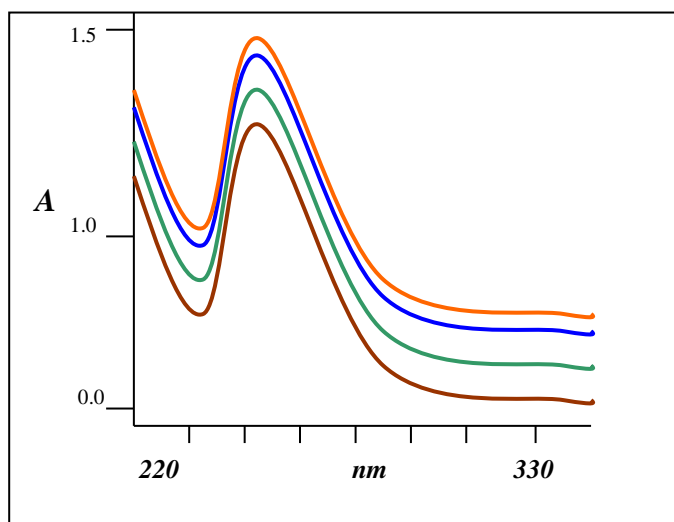


Figura 9. Espectro típico de DNA leído de 220 a 330nm. (Basado en Dyer John R. y Garbarin)



El uso de la absorptividad molar como unidad de la intensidad de absorción tiene la ventaja de que todos los valores de intensidad se refieren al mismo número de especies absorbentes.

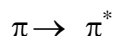
Las longitudes de onda en la región ultravioleta generalmente se indican en nanómetros ( $1\text{nm}=10^{-7}\text{ cm}$ ) o angstroms, ( $1\text{Å}=10^{-8}\text{ cm}$ ). Ocasionalmente, la absorción se indica en números de onda; nosotros estamos principalmente interesados en la región de ultravioleta que se extiende desde 200 hasta 300 nm. La atmósfera es transparente en esta región que resulta ser fácilmente accesible con la óptica del cuarzo.

La energía total de la molécula es la suma de su energía electrónica de unión, su energía vibracional y su energía rotacional. La magnitud de estas energías disminuye en el orden siguiente:

$$E_{\text{elec}}, E_{\text{vib}}, \text{ y } E_{\text{rot}}$$

La energía absorbente en la región ultravioleta produce cambios en la energía electrónica de la molécula que resulta de las transiciones de electrones de valencia en la molécula.

Estas transiciones consisten en la excitación de un electrón desde un orbital molecular lleno al siguiente orbital de energía mayor. El orbital antiénlace se designa por un asterisco se indica de la siguiente forma:



La relación entre la energía absorbida en una transición electrónica y la frecuencia ( $\nu$ ), longitud de onda  $\lambda$  y número de ondas de la radiación que produce la transición es:

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

donde :

$h$  es al constante de planck, y

$c$  la velocidad de la luz.

$\sigma E$  es la energía absorbida en una transición electrónica en una molécula desde un estado de energía bajo hasta un estado de energía alto (estado excitado).

La energía absorbida depende de la diferencia de energía entre el estado básico y el estado excitado; cuanto menor es la diferencia de energía mayor la longitud de onda de la absorción. El exceso de energía en el estado excitado puede dar por resultado la desasociación o ionización de la molécula o se puede volver a emitir en forma de calor o luz. El desprendimiento de energía en forma de luz da por resultado la fluorescencia o fosforescencia.

Ya que la energía ultravioleta es cuantificada, el espectro de absorción que se origina de una transición electrónica simple debe consistir en una línea discreta simple.

Los espectros de las moléculas simples en estado gaseoso consisten en picos de absorción estrechos, representando cada uno de los mismos una transición desde una combinación particular de niveles vibracionales y rotacionales en el estado básico electrónico hasta una combinación correspondiente en el estado excitado; donde los niveles se designan como  $\nu_0, \nu_1, \nu_2$  y así sucesivamente.

En las moléculas de mayor complejidad que contienen más átomos, la multiplicidad de los subniveles vibracionales y la cercanía de su espaciamiento da lugar a que las bandas discretas se derrumben, obteniéndose bandas de absorción amplias.

Las principales características de una banda de absorción son su posición e intensidad. La posición de la absorción corresponde a la longitud de onda de la radiación cuya energía es igual a la requerida para la transición electrónica. La intensidad de la absorción depende principalmente de dos factores: la probabilidad de interacción entre la energía de radiación y el sistema electrónico para elevar el estado básico al estado excitado, así como la polaridad del estado excitado.

La absorción intensa se presenta cuando la transición va acompañada de un gran cambio en el momento de transición. La absorción con  $\epsilon_{\text{máx}} > 10^4$  es una absorción de alta intensidad; la absorción de baja intensidad corresponde a los valores de  $\epsilon_{\text{máx}} < 10^3$ . Las transiciones de baja probabilidad son transiciones “prohibidas”.

La intensidad de la absorción puede expresarse como transmitancia ( $T$ ) definida por

$$T = P / P_0$$

Donde:

$P_0$  = intensidad de la energía radiante que incide en la muestra e

$P$  = intensidad de la energía radiante que sale de la muestra.

Una expresión más conveniente para la intensidad de absorción es la que se deriva de la ley de Lambert-Beer:

$$\log_{10} (P_0/P) = kcb = A$$

donde

$k$  = constante característica del soluto

$c$  = concentración del soluto

$b$  = longitud de la trayectoria a través de la muestra

$A$  = absorbancia

Cuando  $c$  se expresa en moles por litro =  $A = \epsilon cb$  donde el término  $\epsilon$  se conoce como absorptividad molar.

Si ahora se define la concentración  $c$  del soluto como g/litro, la expresión se transforma en

$$A = abc$$

donde  $a$  es la absorptividad y consecuentemente relacionada con la absorptividad molar mediante

$$\varepsilon = aM$$

donde  $M$  es el peso molecular del soluto.

La intensidad de una banda de absorción en el espectro ultravioleta generalmente se expresa como la absorptividad molar a la máxima absorción,  $\varepsilon_{\text{máx}}$  o  $\log \varepsilon_{\text{máx}}$ . Cuando se desconocen la constitución de un material absorbente, la intensidad de la absorción puede expresarse en la forma:

$$E_{\text{cm}}\% = A / cb$$

donde

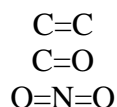
$c$  = concentración en gramos por 100 ml

$b$  = longitud de la trayectoria a través de la muestra en centímetros.

## 2.2 IDENTIFICACION ESPECTROMETRICA DE COMPUESTOS ORGANICOS

Es necesario definir algunos términos que frecuentemente se utilizan en la descripción de los espectros electrónicos.

**CROMÓFORO** . Un grupo insaturado covalentemente que es responsable de la absorción electrónica por ejemplo



**AUXÓCROMO** . Un grupo saturado que, cuando se encuentra unido a un cromóforo, altera tanto la longitud de onda como la intensidad del máximo de absorción; por ejemplo



**Desplazamiento batocrómico**. Es el desplazamiento de la absorción a una mayor longitud de onda debido al efecto del solvente.

**Desplazamiento hipsocrómico**. Es el desplazamiento de la absorción a una menor longitud de onda debido a un efecto de solvente.

**Efecto hiperocrómico**. Aumento de la intensidad de absorción.

**Efecto hiperocrómico**. Disminución de la intensidad de absorción.

Las características de absorción de las moléculas orgánicas en la región ultravioleta dependen de las transiciones electrónicas que pueden ocurrir y del defecto del medio atómico en las transiciones. La figura 11 resume las facilidades relativas con que pueden ocurrir las diversas transiciones.

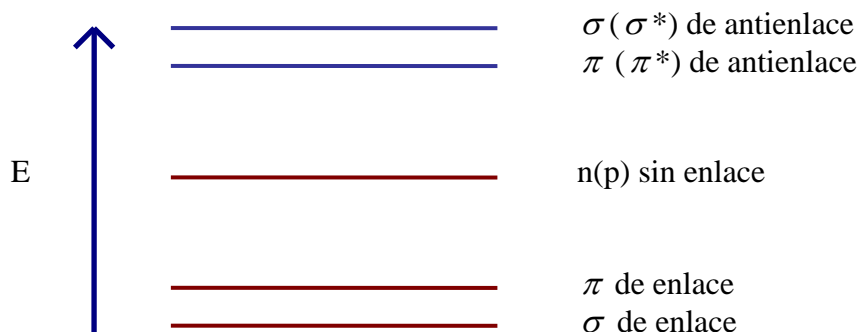


Figura 11. Cambios de energía.

Aun cuando los cambios de energía no se muestran a escala, se puede observar fácilmente, por ejemplo que la transición  $n \rightarrow \Pi^*$  requiere de menor energía que la transición  $\Pi \rightarrow \Pi^*$ .

Las transiciones  $n \rightarrow \Pi^*$  **también denominadas bandas R** de los grupos cromóforos simples tal como el grupo carbonilo son prohibidas y las bandas correspondientes se caracterizan por bajas absorptividades molares, también están caracterizadas por el desplazamiento hipsocrómico.

Cuando las bandas adicionales hacen su aparición, la transición  $n \rightarrow \Pi^*$  se desplaza a una mayor longitud de onda pero puede quedar hundida en bandas de mayor intensidad.

Las bandas atribuidas a las transiciones  $\Pi \rightarrow \Pi^*$  (bandas k) aparecen en el espectro de las moléculas que tienen estructuras  $\Pi \rightarrow \Pi$ .

Estas transiciones  $\Pi \rightarrow \Pi^*$  están caracterizadas por una alta absorptividad molar,  $\epsilon_{\text{máx}} > 10000$ .

Las transiciones  $\Pi \rightarrow \Pi^*$  (bandas K) de los sistemas di o polieno conjugados pueden distinguirse de las correspondientes a los sistemas de enona al observar el efecto de cambiar la polaridad del solvente. Las transiciones  $\Pi \rightarrow \Pi^*$  de los sistemas dieno o polieno no son esencialmente sensibles a la polaridad del solvente, los dobles enlaces de hidrocarburo no son polares. Sin embargo, las absorciones correspondientes de las enonas quedan sometidas al desplazamiento batocrómico, el cual frecuentemente va acompañado del aumento en la intensidad conforme se incrementa la polaridad del solvente.

Las bandas B ( bandas bencenoide) son características de los espectros de moléculas aromáticas y heteroaromáticas. El benceno muestra una banda de absorción amplia, con picos múltiples, en la región del ultravioleta cercano entre 230 y 270 nm .

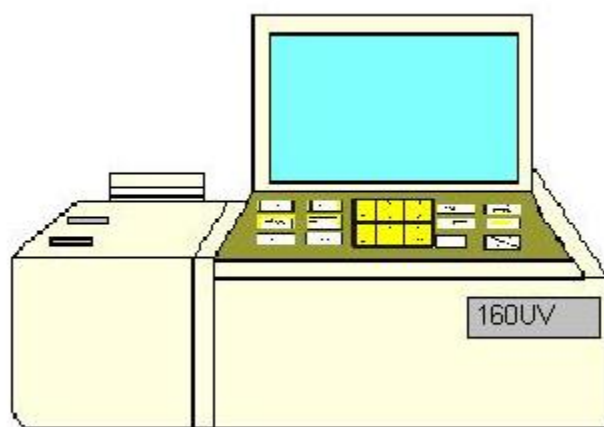
Cuando un grupo cromofórico está unido al anillo aromático, las bandas B se observan a mayores longitudes de onda que las transiciones  $\Pi \rightarrow \Pi^*$

Las bandas E ( bandas etilénicas) , igual que las bandas B, son características de las estructuras aromáticas. Las bandas  $E_1$  y  $E_2$  del benceno se observan cerca de 180 nm y 200 nm respectivamente. La sustitución auxocrómica lleva la banda  $E_2$  a la región del ultravioleta cercano.

En la sustitución auxocrómica, el heteroátomo con el par solo de electrones comparte estos electrones con el sistema de electrón  $\Pi$  del anillo, facilitando la transición  $\Pi \rightarrow \Pi^*$  .

La absorptividad molar de las bandas E generalmente varía entre 2000 y 14 000.

### 2.3 INSTRUMENTACION UV-VIS



#### *¿Cómo es un equipo de UV-Vis?*

Los aparatos diseñados para la medición de absorción o emisión de radiación electromagnética en función de la longitud de onda se denominan:

- Fotómetros
- Espectrómetros
- Espectrofotómetros

La descripción de los equipos se presenta a continuación.

### **Fotómetro.**

Es un instrumento que proporciona la relación o alguna función de la relación de los poderes de radiación de 2 haces electromagnéticos. Utilizan como monocromador simplemente filtros.

### **Espectrómetro.**

Es un instrumento con un sistema monocromador con el que se llevan a cabo mediciones de un intervalo espectral. La cantidad detectada esta en función del poder de radiación. Utilizan rejillas difractoras o prismas para dispersar la luz.

### **Espectrofotómetro.**

Es un espectrómetro con equipo accesorio que proporciona la relación o una función de la relación, del poder de radiación de 2 haces electromagnéticos con respecto a la longitud de onda espectral. Utilizan rejillas difractoras o prismas para dispersar la luz.

#### **2.3.1 Como se conforma un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible.**

Un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible se compone basicamente de 7 partes:

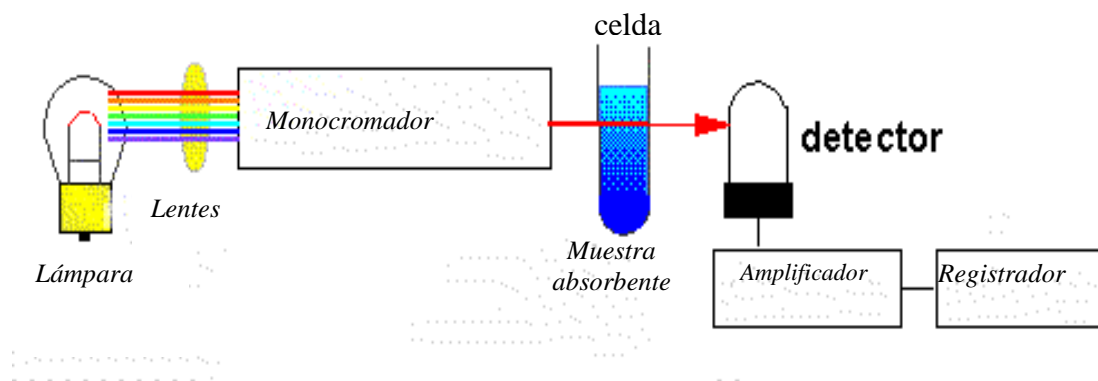


Figura 12. Componentes básicos de un espectrofotómetro. (Basado en Spectrometric Analisis 2000)

- Fuente de luz ó lámpara
- Lentes
- Monocromador
- Celdas donde se coloca la muestra
- Detector
- Amplificador
- Registrador

Las lamparas o fuentes luminosas son usualmente:

Para UV: Deuterio, Mercurio, Xenon.

Para Visible: Tungsteno.

Otra diferencia significativa en los equipos es que los espectrofotómetros de luz Ultravioleta visible suelen ser de dos tipos

- a) de un haz
- b) de doble haz

a continuación se presenta un diagrama para su mejor comprensión de un espectrofotómetro de un haz o haz simple y posteriormente un diagrama esquemático de un espectrofotómetro de doble haz.

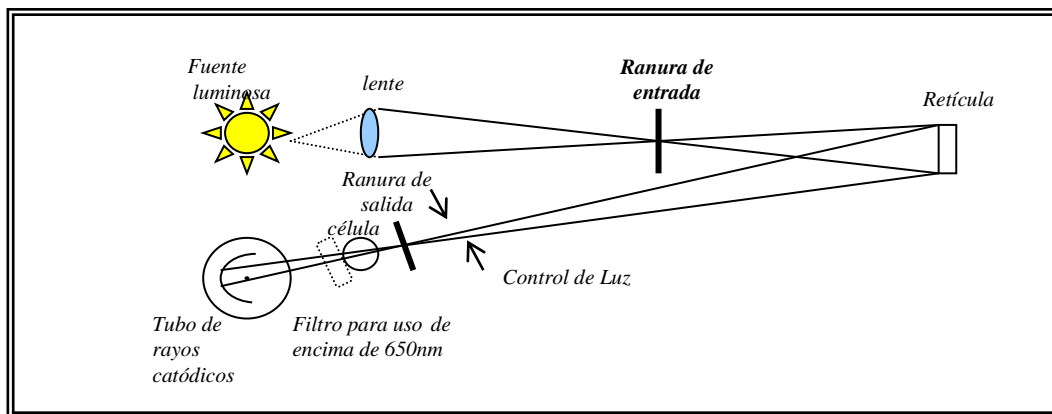


Figura 13. Espectrofotómetro de haz simple. (Basado en Spectrometric Analysis 2000)

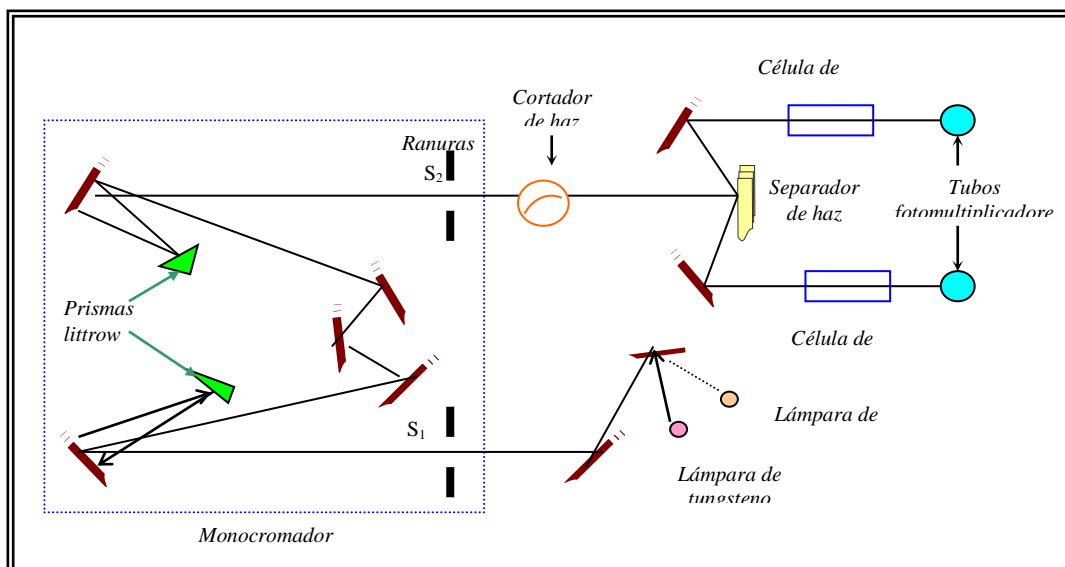


Figura 14. Espectrofotómetro de doble haz. (Basado en Spectrometric Analisis 2000)

## 2.4 Manejo de muestras para la técnica ultravioleta visible.

Para realizar un análisis eficiente se requiere de un buen manejo de la muestra, para las regiones de ultravioleta visible usualmente se manejan muestras en fase líquida (soluciones) o en fase vapor.

### Soluciones.

Las muestra en estado líquido deben manejarse en forma de soluciones debido a que en las regiones ultravioleta y visible el porcentaje de transmitancia de los compuestos a los que se les pueden determinar espectros deben quedar dentro de 20 y 65% porque a valores fuera de este rango existe mucha incertidumbre. Es preferible para compuestos cuyas absorciones molares sean altas en su máximo de absorción, es recomendable manejar soluciones diluidas, ya que a concentraciones altas los compuestos dan porcentajes bajos de transmitancia.

### Disolventes.

- En estudios espectrofotométricos, los disolventes deben disolver o diluir la muestra y transmitir en la región de longitudes de onda en estudio.
- Para la region ultravioleta se emplean disolventes que no absorben arriba de 200-220nm (agua, alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol isopropilico, hexano, ciclohexano, octano, éter dietílico, dioxano, acetonitrilo..)

### Celdas para contener las muestras.

Existen en variedad de formas y materiales. Los espectrofotómetros se equipan con portaceldas, ya sea para celdas rectangulares estándar de 10 mm de trayecto optico o de otras medidas, además un accesorio para conservar la temperatura constante en las celdas.



Las caras ópticas de las celdas están altamente pulidas y se construyen con mucha precisión esto, para evitar pérdidas por flexión o difusión de la luz en su superficie.



Figura 15. Celdas para UV-VIS. Fuente (www.teknokroma.es)

***Tamaño de las celdas:***

- Las celdas de 1,2 y 5 mm de trayecto óptico se utilizan cuando la muestra tiene un coeficiente de extinción alto y no es conveniente realizar una dilución.
- Las celdas de 20 y 40 mm de trayecto óptico se emplean cuando la sensibilidad analítica está limitada y además su uso puede evitar una extracción de solvente.

***Cálculos aplicando directamente la ley de Beer.***

Como el coeficiente de absorptividad molar de gran número de compuestos se encuentra en tablas, es posible calcular la concentración del compuesto aplicando la ley de Beer:

$$C=A/\varepsilon b$$

Sin embargo, es preferible emplear un estándar de referencia, ya que la concentración determinada en esta forma está sujeta a muchas fuentes de error, como la reproductividad de las condiciones, errores instrumentales, etc.

## 2.5 Cuantificación en la espectroscopía UV- VIS

### *Métodos de comparación con estándar*

Cuando se prepara un estándar con una concentración semejante y en las mismas condiciones que la muestra, la concentración del compuesto en estudio se puede determinar aplicando la ley de Beer:

$$\begin{aligned}A_M &= \varepsilon_M b_M c_M \\A_E &= \varepsilon_E b_E c_E\end{aligned}$$

La relación de absorbancias entre la muestra y el estándar está dada por:

$$\frac{A_M}{A_E} = \frac{\varepsilon_M b_M c_M}{\varepsilon_E b_E c_E}$$

Si se emplea la misma celda en ambas determinaciones:  $b_M = b_E$ , y como el coeficiente de absorptividad molar es el mismo para la muestra y el estándar,  $\varepsilon_M = \varepsilon_E$ ; por lo tanto:

$$A_M/A_E = C_M/c_E$$

De donde:

$$c_M = A_M c_E / A_E$$

Este método es rápido y sus resultados son confiables.

### *Método de adición de estándar.*

Generalmente se emplea para concentraciones pequeñas de muestra.

Para este método se emplean dos soluciones:

1. Solución A, que sólo contiene la muestra en estudio.
2. Solución B, que contiene un volumen exactamente medido de la solución A y un volumen medido de la solución estándar.

### ***Preparación de curvas de calibración.***

Este método es necesario preparar una serie de diluciones del estándar. Se miden las absorbancias y se grafican contra las concentraciones respectivas; se obtiene una gráfica de absorbancia contra concentración. De la absorbancia de la muestra en estudio se calcula, por medio de la gráfica, la concentración.

Las curvas de calibración proporcionan resultados más exactos que los métodos aplicando la ley de Beer.

### ***Aplicaciones cuantitativas.***

#### ***Compuestos orgánicos.***

Los compuestos que tienen un coeficiente de absorptividad molar alto se pueden determinar directamente; en caso contrario, se debe preparar un derivado con coeficiente molar alto. Cuando un compuesto es puro o se encuentra en una mezcla en la que dicho compuesto es el único que absorbe, la determinación es relativamente sencilla. La absorbancia se mide a la longitud de onda máxima, la cual se puede encontrar en tablas o bien obteniendo previamente un espectro del compuesto.



#### ***Compuesto inorgánicos.***

Es necesario preparar complejos, usualmente se leen como complejos coloridos. Esta aplicación se usa mucho para las mediciones de compuestos metálicos tóxicos en el campo de las ciencias ambientales.

### 3. Ejercicios

En adelante encontraras un apartado de preguntas y problemas para trabajar en clase y en casa, como apoyo para tu mejor aprendizaje.

#### Preguntas

1. ¿Qué es un cromóforo y un auxóchromo?
2. ¿Para qué sirve el monocromador en un equipo de UV?
3. ¿Con qué fin se calibra un equipo de UV-Visible?
4. ¿Con qué se calibra el equipo de luz UV y Visible?
5. ¿Qué tipo de muestras se pueden analizar por espectrofotometría de luz UV-Vis?
6. ¿Los equipos de espectroscopia UV-Vis emplean lámparas, estas tienen una vida útil, cada cuanto tiempo es recomendable cambiar la lámpara?
7. Los equipos de espectroscopia UV-Vis usualmente tienen un modo de barrido y un modo cinético. ¿Cuándo se emplea cada uno de ellos?
8. Describe la ley de Lambert y Beer.
9. La relación entre un rayo que sale y un rayo que incide se denomina T, ¿Qué nombre recibe este símbolo y como se expresa matemáticamente la relación mencionada?
10. A medida que T aumenta la concentración leída disminuye ¿Por qué?
11. Dibuja un diagrama de un espectrofotómetro de Luz UV y describe sus partes.
12. ¿Cuales son algunas causas de las desviaciones de origen físico de la ley de Beer?
13. ¿Cuales son algunas causas de las desviaciones de origen químico de la ley de Beer?
14. ¿Cómo se expresa matemáticamente el coeficiente de Absortividad molar?
15. ¿Para que sirve calcular el coeficiente de absortividad molar de un compuesto?
16. ¿Cuál es la relación entre la transmitancia y la absorbancia?
17. ¿Cuándo un haz de luz incide sobre una solución que contiene moléculas y esa energía cae dentro del rango de la región ultravioleta, ¿qué le sucede a la molécula? Explica esto mediante un diagrama.
18. Al decir que hay una región de energía en el ultravioleta, ¿a qué nos referimos exactamente en cuanto a las longitudes de onda, que hay en la región?
19. Si tienes una muestra que presenta una absorción en 454 nm, esto quiere decir que:
20. Menciona algunas aplicaciones industriales para la espectrofotometría de luz UV/Vis.

#### Problemas

21. Una determinación de contaminantes por medio de UV/vis, necesitó la formulación de una curva de calibración, cuyos resultados se observan en la tabla 2. Determine las concentraciones del analito, en las muestras denotadas como muestra 1, muestra 2.

Tabla 3. Curva de calibración para contaminantes por medio de UV/vis

Solución	Concentración (ppm)	Absorbancia
1	0	0.001
2	6	0.361
3	15	0.712
4	30	1.268
Muestra 1	_____	0.563
Muestra 2	_____	0.385

22. A. J. Mukhedkar y N. V., en 1963 publicaron la cuantificación simultánea de cobalto y níquel, en base a la absorción de sus complejos con el 8-quinolinol. Las absorptividades molares correspondientes a los máximos de absorción son:

Tabla 4. Datos

	Longitud de onda	
	365 nm	700 nm
$\epsilon_{Co}$	3529	428.9
$\epsilon_{Ni}$	3228	0.00

Calcule la concentración de níquel y cobalto en cada una de las siguientes soluciones: la celda es de un centímetro.

Solución	Absorbancia	
	365 nm	700 nm
1	0.816	0.074
2	0.516	0.033

23. Una mezcla de dos componentes, absorbe una radiación igual a 0.225, con una absorptividad molar ( $L/mol \cdot cm$ ) de  $\epsilon_A = 250$  y  $\epsilon_B = 1500$ , respectivamente. Mientras a una segunda longitud de onda sus valores de absorptividad molar ( $L/mol \cdot cm$ ) se modifican a  $\epsilon_A = 1050$  y  $\epsilon_B = 80$  con una absorción de energía total igual a 0.282. Determine la concentración de cada analito, si el ancho del paso óptico es 1.00 cm. (Rubinson, J.F., y Rubinson, K. A., 2000.)

24. Para determinar la presencia de clorofenol en un insecticida se elaboró una curva de calibración, los datos generados son:

Tabla 5. Datos ejercicio 24.

[ppm]	Absorbancia (A)
0	0.000
0.002	0.089
0.005	0.247
0.01	0.410

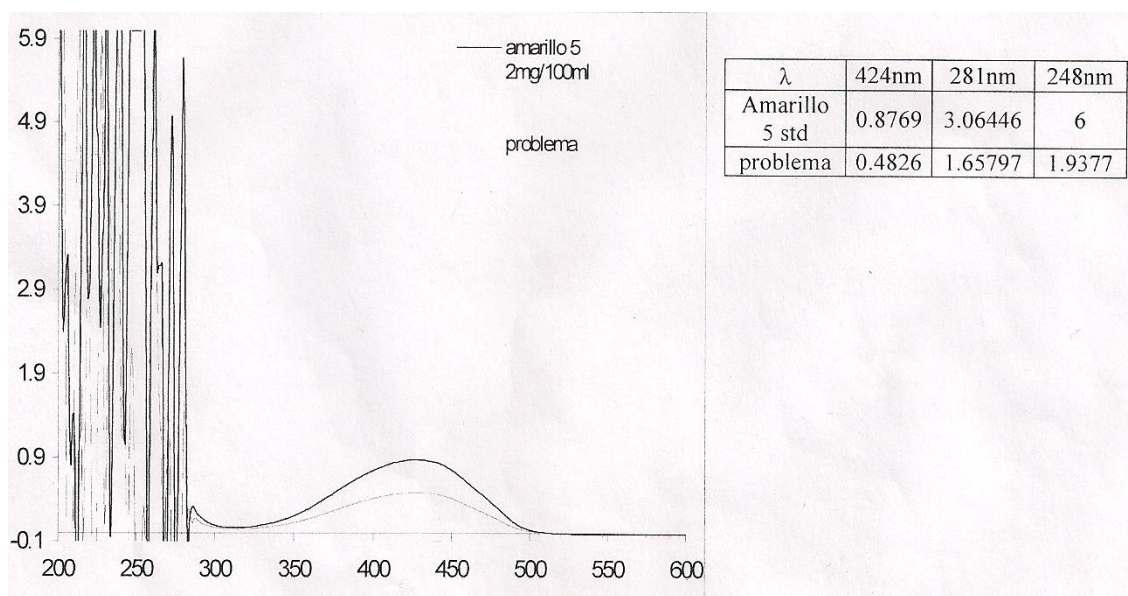
Por otra parte, una muestra de 2.6 g fue disuelta en 500 mL de metanol y al leerla se obtuvo una absorbancia de 0.169.

Mencione si las condiciones de análisis son adecuadas y si la curva de calibración es aceptable.

Reporte la concentración que presenta la muestra de clorofenol expresando los resultados en mg/mL.

25. Si se tiene una muestra "A" de concentración 1M y reporta una absorbancia de 1.02 y una muestra "B" de concentración 0.0001 M y la misma absorbancia. Determine ¿cuál tiene un coeficiente de absorptividad mayor?

26. En un laboratorio se elaboran soluciones constantemente y a veces se dejan almacenadas indeterminadamente. Se encontró un litro de una solución acuosa de un colorante amarillo y para conocer su concentración se leyó una solución estándar de colorante amarillo No. 5 con pureza de 88.54%. Del reactivo estándar se pesaron 2 mg y diluyeron en 100 mL de agua destilada. Datos obtenidos:



- a) La muestra corresponde a colorante amarillo. Sí \_\_\_\_ No \_\_\_\_\_. Justifique su respuesta.
- b) ¿Cuál es la longitud máxima de absorbancia para el colorante?
- c) Determine el coeficiente de absortividad específico del colorante amarillo No.5, si la celda en la que se contuvo la muestra midió un centímetro de ancho se pesaron 2 mg del estándar y diluyeron en 100 mL de agua destilada.
- d) ¿Cuál es la concentración de la muestra problema en ppm?

27. Mencione cuáles son las reacciones que ocurren en el análisis de fósforo por espectroscopia visible.

28. Se tiene una solución patrón de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , que fue preparada con 0.1915 g del reactivo seco y un litro de agua (solución A). La solución "A" se usó para elaborar una dilución de 4 ppm de fósforo (solución B). La solución B, permitió preparar una curva de calibración y después de desarrollar color, debido a la reacción específica para el fósforo, se leyó en un espectrofotómetro obteniendo algunos datos. Complete la información en la siguiente tabla, realizando cálculos, gráficas y lo necesario para contestar correctamente.

Tabla 6.

mL solución patrón	Volumen final de la solución (aforo) mL	Absorbancia	Concentración
Blanco	10	0.0000	
1	10	0.2506	
2	10	0.4535	
3	10	0.5171	
4	10	0.7635	
5	10	0.8715	

La información anterior, ayudó a analizar muestras desgasificadas de refresco de cola y diluidas 1 a 100 en V/V de agua. Complete la siguiente tabla, realizando cálculos, gráficas y lo necesario para contestar correctamente.

Tabla 7.

Muestra	Absorbancia	Concentración de fósforo en refresco diluido	Contenido de fósforo en un refresco de 250 mL
Refresco 1	0.2891		
Refresco 2	0.5392		
BLANCO	0.0003		

29. Se tiene una muestra de ácido acetil salicílico que absorbe a 254 nm en espectrometría UV y se elabora una curva patrón con un estándar con lo que se obtienen los siguientes datos:

Tabla 8.

Concentración	Absorbancia
0.40	0.5
0.80	1.0
1.2	1.5
1.6	2.0
2.0	2.5

También se cuenta con 3 soluciones de concentración desconocida las cuales presentan las siguientes absorbancias a 254 nm

Tabla 9.

Muestra	Concentración	Absorbancia
B	X	2.38
C	X	0.98
D	X	1.8

Realiza los cálculos necesarios para determinar la concentración de cada solución de ácido acetil salicílico.



## 4. Practicas de Laboratorio

En este capitulo encontrarás algunas practicas de laboratorio para que practiques lo aprendido durante el curso.

### *Practica 1. Uso de la ley de Lamber & Beer*

#### **Objetivo.**

Determinar la concentración de una muestra problema empleando el coeficiente de absorptividad.

#### **Antecedentes:**

La ley de Lamber & Beer considerada originalmente como un postulado ha sido objeto de numerosas interpretaciones y demostraciones considerando hipótesis estadísticas, cinéticas o simplemente lógicas, esta ley se refiere a la fracción de la luz absorbida, se cumple en las siguientes condiciones:

- ✓ La luz empleada debe ser monocromática.
- ✓ La concentración debe ser baja.
- ✓ La disolución debe ser homogénea.
- ✓ La disolución no debe ser fluorescente.
- ✓ El soluto debe ser estable, no debe sufrir transformaciones fotoquímicas.
- ✓ El soluto no debe originar asociaciones variables con el disolvente.

#### **Características del Analito:**

Se requiere de un compuesto que absorba en la región UV/Visible, por lo que debe contener grupos cromóforos. Para esta practica se recomienda que el compuesto sea soluble en agua a temperatura ambiente.

Analito\_\_\_\_\_

#### **Materiales y equipo:**

Bitácora

Espectrofotómetro con un rango de trabajo de 200 a 700 nm

Material común de laboratorio. (espátula, matraces volumétricos de 100 y 10 ml, vasos de pp de 10 ml, piseta)

Balanza analítica

*Nota: Todo el material de vidrio empleado en esta determinación debe ser lavado preferentemente con extrán, enjuagado con agua corriente y enjuagando con agua destilada o deionizada según sea el caso.*

**Procedimiento:**

- 1) Preparar 10 ml de una solución del analito de concentración 100 mg/L
- 2) A partir de esta solución preparar 3 diluciones de concentración conocida

Concentraciones:

A \_\_\_\_\_  
B \_\_\_\_\_  
C \_\_\_\_\_

- 3) Leer el espectro de cada una de las diluciones preparadas.
- 4) Observando el espectro, elegir la longitud de onda a la cual el compuesto analizado tiene mayor absorbancia.

Longitud elegida \_\_\_\_\_

- 5) Obtener matemáticamente con la ayuda de la ley de Lamber & Beer el coeficiente de absortividad del analito.
- 6) Con ayuda de los datos generados graficar la concentración contra la absorbancia obtenida

Tabla 10.

Concentración		Absorbancia
inicial	100 mg/L	
A		
B		
C		

- 7) Cuantificar la muestra problema empleando el método de la ley de Lamber & Beer y el método de la curva de calibración.
- 8) Discuta los resultados Obtenidos
- 9) Concluya.

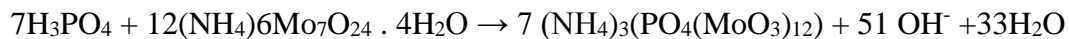
## Practica 2 Determinación de fósforo en bebidas.

### Objetivo.

Determinar la cantidad de fósforo por un método espectrofotométrico (en forma de ortofosfatos) presente en las bebidas, aplicable cuando la concentración de ortofosfatos es de 1 a 20 mg/dm<sup>3</sup>.

### Antecedentes

Los métodos se basan en transformar los compuestos fosforados a ortofosfatos, los cuales se hacen reaccionar con molibdato de amonio para formar el ácido molibdo-fosfórico. En el método del azul de molibdeno o del cloruro estannoso, el ácido molibdo-fosfórico se reduce para producir el complejo colorido conocido como azul de molibdeno. La intensidad de la coloración se determina por espectrofotometría.



El complejo de fosfo-molibdato tiene una mezcla de Mo<sup>+5</sup> y Mo<sup>+6</sup>, su composición es indefinida. Este complejo es reducido a un compuesto azul soluble.

### Características de la muestra:

Se requiere de una bebida que en teoría contenga fósforo, si se elige un refresco colorido se recomienda digerir, para eliminar interferencias.

Muestra \_\_\_\_\_

### Materiales y equipo:

Bitácora

Espectrofotómetro con un rango de trabajo de 200 a 900 nm

Material común de laboratorio. (espátula, matraces volumétricos de 100 y 10 ml, vasos de pp de 10 ml, piseta)

Balanza analítica

### Reactivos:

Las sustancias que a continuación se mencionan deben ser grado analítico, a menos que se especifique otra cosa. Cuando se mencione el uso de agua, debe entenderse deionizada.

Ácido Sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Molibdato de amonio tetrahidratado (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O).

Ácido Ascórbico

Hidróxido de sodio (NaOH).

Fosfato de potasio monobásico anhidro (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Sal disódica de fenolftaleína (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>)

Alcohol etílico (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O)

Metanol (CH<sub>4</sub>O)

## Preparación de soluciones:

### 1. Solución stock de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Pesar 0.01915gr de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> seco y disolver en 100mL de agua

Elaborar con esta solución una que contenga 4 ppm de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (requiere al menos 25ml)

### 2. Solución reductora

2.1 0.78 g de molibdato de amonio en 39 mL de agua

2.2 1.056 g de ac. Ascórbico en 60 ml de agua

2.3 11ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc en 125 ml de agua

Mezclar 2.1, 2.2 y 2.3 aforar a 250ml y etiquetar

### 3. Preparar la curva de calibración

Tabla 11.

Estándar	Conc (ppm)	ml de solución de trabajo	ml de soln reductora	Volumen de aforo (ml)
1	0.4	1	4	10
2	0.8	2	4	10
3	1.2	3	4	10
4	1.6	4	4	10
5	2.0	5	4	10
blanco	0	0	4	10

La curva será incubada durante 45 minutos a 50 °C

Posteriormente se enfria a temperatura ambiente

Realiza un barrido para seleccionar la longitud de absorvancia máxima y realiza las lecturas

Longitud de Absorbancia máxima \_\_\_\_\_ nm

### 4. Preparar la muestra

Des-gasificar el refresco mediante agitación

Se toma 1 ml del refresco y se diluye a 50ml

De esta dilución se toma 1 ml y se le adicionan 4 ml de solución reductora y se afora a 10 ml con agua deionizada.

Para mayor seguridad realizar las determinaciones por triplicado.

Calcular el coeficiente de variación para evaluar la reproducibilidad del método.

5. **Leer** en el espectrofotómetro seleccionando la longitud de onda máxima del espectro del complejo azul.

6. Desarrollar la curva de calibración calcular la ecuación de la curva ( $y=ax+b$ ) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

Reportar la concentración de fósforo encontrada en las muestras y compararlas con lo que reportan las etiquetas y la bibliografía.

## Glosario

UV-VIS	Ultravioleta ultravioleta visible
$\lambda$	Longitud de onda
$\nu'$	Número de onda
nm	Nanómetros : $10^{-7}$ cm
Hertz	Unidad de frecuencia
Å	Amstrong
$\mu$ m	Micrometro
cm	Centímetro
m	Metro
eV	Electron volt
V	Volt
$\pi$	Pi, referido a electrones en el subnivel pi
n	Referido al electrones en el subnivel energetico n
E	Energía
$E_0$	Estado electronico fundamental
$\sigma E_1$	Representa la energía de excitación
R	Energía de relajamiento
$\sigma E_2$	Fotón emitido de menor energía
$E_1$	Estado excitado de mayor energía
$E_2, E_3$	Nivel menor de energía de excitación
$P_0$	Intensidad de energía incidente
P	Intencidad de energía saliente
A	Absorbancia
T	Transmitancia
$\epsilon$	Epsilon, coeficiente de absortividad molar
a	Coeficiente de absortividad específico
[C], c	Concentración
pH	Potencial de hidrogeno
h	Constante de planck
mm	Milimetro
b	Paso óptico
ppm	Partes por millón
L	Litro
M	Concentración molar
mL	Mililitro
mg	Miligramo
std	Estandar
v/v	Volumen por volumen
$dm^3$	Decimetro cúbico= 1l

## ***Bibliografía***

1. Dyer John R., Garbarino Juan.A. Aplicaciones de Espectroscopia en compuestos orgánicos. Ed. Prentice Hall. Madrid
2. Galindo Urban Salvador. Breve Introducción a la espectroscopia. Ed. UAEM.
3. Giusti M. M., Wrolstad R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. Food Analytical Chemistry (2001) pp 9-17.
4. Harvey David. Química Analítica Moderna. Ed. Mc Graw Hill. España (2002). pp 573.
5. Hunt B.J., James M.I. Polymer Characterisation. Ed Blackie Academic & Professional. 363pags. Great Britain 1993.
6. Llorente Uceta M A., Horta Subyaga A. Técnicas de caracterización de Polímeros. Universidad Nacional de Educación a Distancia. 400 pags. Madrid 1991.
7. Skoog and Leary Análisis Instrumental 4ª. Edición. Ed. Mc. Graw Hill. Madrid.1994.
8. Skoog D.A., West D.M. Análisis Instrumental Ed. Mc Graw Hill. 462 pags. Mexico 1992.
9. Shimadzu Application News. Spectrometric Analisis 2000.
10. Rouessac Francis, Rouessac Annick. Métodos y Técnicas Analíticas Instrumentales Modernas Ed. Mc. Graw Hill. Madrid. 2003. 441pp.
11. Rubinson Kenneth A., Rubinson Judith F. Analisis Instrumental. Ed. Prentince may España (2000). 847 pp.
12. [www.teknokroma.es](http://www.teknokroma.es). (2016).