

Práctica 1

DETERMINACIÓN DE FOSFATOS EN AGUAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA

1. Objetivo

El objetivo de esta práctica es la determinación del contenido de fosfatos solubles en una muestra de agua mediante espectrofotometría ultravioleta-visible. Se aplicará el método de adiciones estándar para eliminar interferencias con otros compuestos.

Los abonos inorgánicos están constituidos por diversas clases de fosfatos solubles, los más comunes de los cuales derivan de los **aniones meta-** (PO_3^-), **piro-** ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) y **ortofosfato** (PO_4^{3-}). Debido a su elevada solubilidad, estos aniones son arrastrados fácilmente por las aguas superficiales hacia ríos, acuíferos, etc. Otra fuente de fosfatos la constituyen los vertidos urbanos que contienen detergentes: para aumentar su eficacia, algunos detergentes utilizan fosfatos inorgánicos en su composición como agentes alcalinizadores. Las aguas naturales contienen normalmente cantidades de fosfatos por debajo de **1 mg/l**. Cantidades superiores de estos nutrientes favorecen el crecimiento de algas que consumen el oxígeno del medio acuático y provocan la desaparición de especies vegetales y animales.

2. Metodología experimental

A. Fundamento

El método propuesto para determinar fosfatos se basa en la formación de un heteropoliácido con el reactivo vanado-molbídico (de color amarillo y soluble en agua) cuya **absorción de luz** se mide a **420 nm**. Para el ortofosfato, la formación de este complejo tiene lugar según la reacción:



En esta identificación interfieren concentraciones apreciables de Fe(III), silicato y arseniato, entre otras especies. Es decir, estas especies absorben luz a la longitud de onda utilizada (420 nm, absorción del $\text{P}(\text{VMo}_{11}\text{O}_{40})^{3-}$). Para eliminar dicha interferencia se preparará un **blanco** (sin fosfato) cuya absorbancia se restará de la del resto de las muestras.

Adicionalmente, es posible que la absorbancia del complejo se vea afectada **por efectos de matriz**. La matriz puede potenciar o atenuar la absorbancia de luz por el complejo, lo cual puede conducir a resultados erróneos. Para minimizar este efecto, aplicaremos el **método de adiciones estándar**, que consiste en la adición de cantidades crecientes del analito de interés (fosfato en nuestro caso) a una cantidad fija de muestra. Éste procedimiento resulta más efectivo que un **calibrado externo** (recta de calibrado con disoluciones patrón) cuando la matriz interfiere en la detección. En esta práctica estudiaremos la importancia de los efectos de matriz, determinando la concentración de fosfato mediante ambos métodos y comparando los resultados.

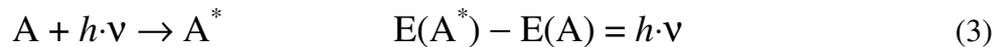
B. Espectrofotometría

La espectrofotometría es una de las técnicas experimentales más utilizadas para la detección específica de moléculas de distinta naturaleza (contaminantes, biomoléculas, etc) y estado de agregación (sólido, líquido, gas). El fundamento físico-químico de la espectrofotometría está relacionado con la capacidad de las moléculas de absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Esto permite que se inicien ciclos vitales de muchos organismos, entre ellos el de la fotosíntesis en plantas y bacterias.

La Mecánica Cuántica nos dice que la luz está compuesta de fotones cada uno de los cuáles tiene una energía:

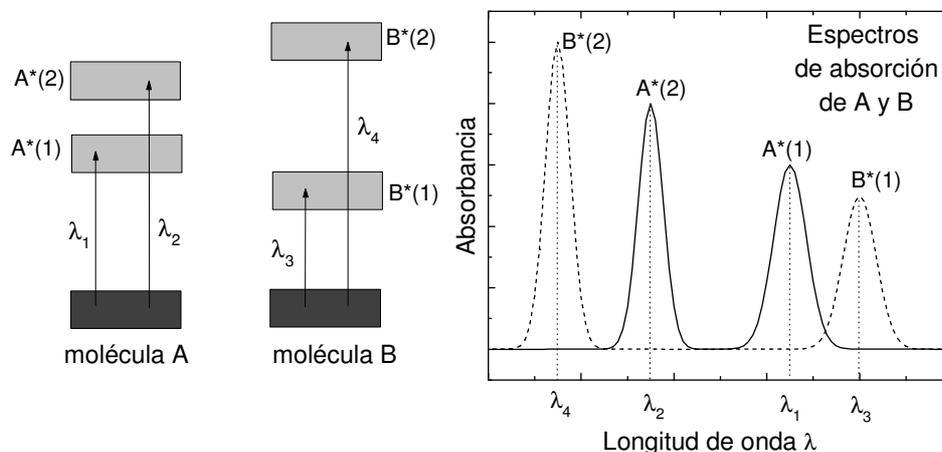
$$E_{\text{fotón}} = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda \quad (2)$$

donde $h = 6.6 \cdot 10^{-34}$ J·s es la constante de Planck, c es la velocidad de la luz, ν es su frecuencia y λ su longitud de onda. Cuando decimos que una molécula absorbe luz de longitud de onda λ , esto significa que la molécula absorbe *un fotón* de esa longitud de onda. En esta práctica estudiaremos la absorción de luz en el visible-ultravioleta cercano ($\lambda \approx 325\text{-}700$ nm). Cuando una molécula absorbe un fotón en este intervalo espectral, se excita pasando un electrón de un orbital del estado fundamental a un orbital excitado de energía superior. De esta manera la molécula almacena la energía del fotón:



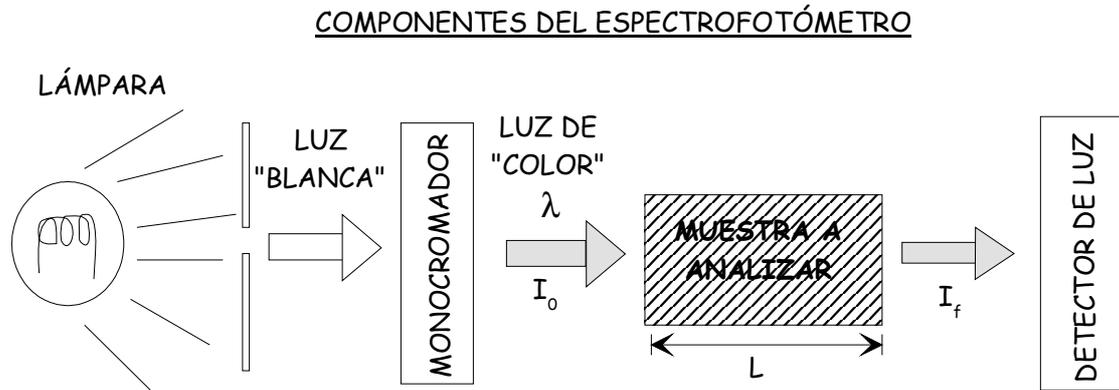
Como la energía se conserva, la diferencia de energía entre el estado excitado (A^*) y el fundamental de la molécula (A) debe ser exactamente igual a la energía del fotón. Cada molécula tiene una serie de estados excitados discretos (o bandas) que dependen de su estructura electrónica y que la distinguen del resto de moléculas. Como consecuencia, el **espectro de absorción**, es decir, la luz absorbida en función de la longitud de onda, constituye una verdadera señal de identidad de cada molécula. Dos moléculas distintas presentarán espectros de absorción distintos, como se representa esquemáticamente en la figura 1.

Figura 1: Hipotéticos espectros de absorción de dos moléculas distintas A y B



Un **espectrofotómetro** (figura 2) consta de una fente de luz "blanca" caracterizada por un espectro de emisión continuo en un intervalo amplio de longitudes de onda (en nuestro caso 350nm-900 nm). Un monocromador actúa como filtro óptico transmitiendo un haz de luz de longitud de onda fija λ e intensidad I_0 que penetra en la cubeta de análisis donde se encuentra la muestra. Un detector sensible a la luz mide la intensidad del haz a la salida I_f .

Figura 2: Esquema del espectrofotómetro



La intensidad del haz de luz se va atenuando a medida que atraviesa la cubeta con la muestra debido a la absorción de las moléculas. El ritmo de absorción depende de la intensidad inicial de luz y de la concentración de moléculas. De esta manera, cuando un haz de luz de intensidad I recorre una distancia dL en una muestra con una concentración de moléculas $[B]$, se produce una atenuación de intensidad dI dada por:

$$dI = -k [B] I dL \quad (4)$$

El significado de la constante de proporcionalidad k se discute más abajo. La expresión anterior se puede integrar de la siguiente forma:

$$\frac{dI}{I} = -k \cdot [B] \cdot dL \Rightarrow \int_{I_0}^{I_f} \frac{dI}{I} = -k \cdot [B] \cdot \int_0^L dL \Rightarrow \ln \frac{I_f}{I_0} = -k \cdot [B] \cdot L \quad (5)$$

lo cual da lugar a la **ley de Lambert-Beer** para la absorción de luz en un medio, que relaciona la intensidad a la salida de la muestra I_f , con la intensidad inicial I_0 , la concentración de moléculas y la distancia recorrida por la luz en la muestra, L :

$$I_f = I_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot [B] \cdot L} \quad (\epsilon = k / \ln 10) \quad (6)$$

El espectrofotómetro, en lugar de la intensidad, mide la **absorbancia A** que se define por:

$$A \equiv \log_{10} \frac{I_0}{I_f} = \epsilon \cdot [B] \cdot L \quad (7)$$

donde la constante ϵ es la denominada **absortividad molar**¹ (o también coeficiente de extinción), que en general depende de la longitud de onda de la luz incidente.

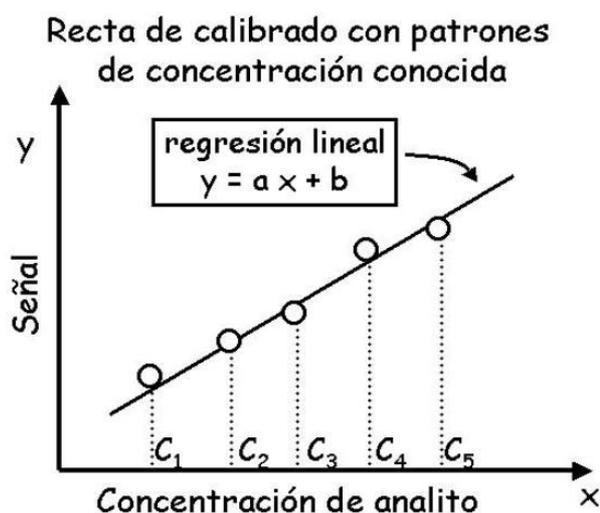
Como se puede observar, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de moléculas en la muestra. Es decir **la representación de absorbancia frente a concentración sigue una recta de pendiente $m = \epsilon \cdot L$** . Esta ley de proporcionalidad se cumple para luz monocromática (de una longitud de onda dada) y disoluciones diluidas de las moléculas absorbentes (< 0.01M). Se encontrarán en general desviaciones cuando se realicen experimentos sobre muestras concentradas de analitos.

C. Métodos de calibrado: patrón externo y adiciones estándar

Una **curva de calibrado** representa la respuesta de un método analítico (señal detectada) sobre **muestras patrón** o estándar con concentraciones conocidas de analito. Se prepara además una **disolución blanco**, que contienen únicamente la **matriz**, es decir todos los reactivos y disolventes de la muestra salvo el analito de interés. En el intervalo de respuesta lineal del método analítico (dentro del cual la señal es proporcional a la concentración de analito), se obtiene una recta de calibrado a partir del procedimiento siguiente (ver figura 3):

- 1) Se representa la señal detectada corregida de la señal del blanco frente a la concentración de cada disolución patrón;
- 2) se realiza una regresión lineal de los puntos resultantes por el método de mínimos cuadrados (ver el apéndice de este guión). . **Se recomienda el uso de Excel para obtener la recta de ajuste**. La recta de calibrado $y = a x + b$ (x : concentración , y : señal) permite obtener la concentración de cualquier muestra problema a partir de la señal obtenida experimentalmente

Figura 3: Recta de calibrado a partir de patrones externos



¹ Nótese que la ley de Lambert-Beer se define en la ecuación (6) con una potencia de 10, en lugar de una exponencial (como correspondería a invertir la relación $\ln(I_t/I_0)$ de la ecuación (5). Para corregir este hecho basta recordar que $\ln x = (\ln 10) \log x$. De ahí la relación para la absortividad $\epsilon = k/\ln 10$.

El método alternativo de **adiciones estándar** consiste en añadir sobre la muestra problema cantidades crecientes conocidas de analito. De esta manera, todas las medidas se realizan sobre la misma matriz. Al representar la señal experimental frente a la concentración de analito *añadida* resulta una recta a partir de cuya pendiente y ordenada en el origen se obtiene la concentración de la muestra problema. El procedimiento se demuestra e ilustra en la figura 4.

Figura 4: Recta de calibrado a partir de adiciones estándar

Método de adiciones estándar

(cuando es imposible aislar los efectos de matriz)

En el intervalo de respuesta lineal la señal S es proporcional a la concentración de analito

$$S = a(C_s + C_x) \quad \begin{array}{l} C_x: \text{concentración problema} \\ C_s: \text{concentración añadida} \end{array}$$

$$S = a(C_s + C_x) = a C_s + a C_x = a x + b$$

Recta de calibrado $y = a x + b$ ($y = S$, $x = C_s$, $b = a C_x$)

C_x se puede obtener de dos formas a partir de la recta:

- 1) $b/a = C_x$
- 2) extrapolación a $y = 0 \Rightarrow x = -b/a = -C_x$



3. Aparatos y material

Material

9 matraces aforados de 25 ml	Probeta de 250 ml
1 matraz aforado de 100 ml	Pipetas de 1, 5 y 10 ml
1 vaso de precipitado de 100 ml	5 vasos de precipitado de 50 ml
Matraces aforados de 100ml y 1000 ml por banco (3-4 parejas)	

Reactivos

Heptamolibdato amónico	ortofosfato ácido potásico
Metavanadato amónico	

5. Procedimiento experimental

A. Preparación de reactivos

1. Reactivo vanado-molibdico (única para todos): En unos 400 ml de agua destilada, disolver 20g de heptamolibdato amónico, $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Preparar una segunda disolución de 0.5 g de metavanadato amónico, NH_4VO_3 , en 300 ml de agua y añadir 100 ml de ácido nítrico concentrado (con guantes y gafas de protección, en la campana extractora). Mezclar ambas disoluciones en un matraz aforado de un litro y enrasar con agua destilada.
2. Disolución patrón de ortofosfato $(\text{PO}_4)^{3-}$ (1 g/l en *fosfatos*) (única para todos): Preparar 100 ml de disolución patrón en matraz aforado disolviendo la cantidad adecuada (cálculala) de KH_2PO_4 en agua destilada.
3. Disolución de trabajo de ortofosfato (0.1 g/l): Cada pareja prepara una disolución de trabajo pipeteando 10 ml de disolución patrón y enrasando a 100 ml con agua destilada en matraz aforado.

B. Calibrado externo

En matraces aforados de 25 ml se pipetea alícuotas de la disolución de trabajo de forma que la concentración final de fosfato sea de 3, 5, 10, 15 y 20 mg/l. Se agregan 10 ml de la disolución vanado-molibdato amónico a cada una de ellas y se enrasa con agua destilada. Agitar cada matraz para homogeneizar la disolución y dejar en reposo 10 minutos para que tenga lugar el desarrollo del color.

Preparar además un *blanco* (disolución con 10 ml de vanado-molibdato, sin fosfato).

C. Preparación de las muestras problema

Pipetear 5 ml de la disolución problema y pasarlos a un matraz aforado de 25 ml. Añadir 10 ml de la disolución vanado-molibdato y enrasar con agua destilada. Repetir este procedimiento otras 2 veces más para tener 3 muestras problema. Dejar reposar 10 minutos

D. Medidas de absorbancia

- Ajustar el espectrofotómetro para medidas de absorbancia a 420 nm
- Introducir el blanco en el aparato y ponerlo a cero.
- Medir finalmente la absorbancia a 420 nm de los patrones y de las 3 muestras.

- Construir la recta de calibrado y determinar la concentración de cada muestra problema.
- La concentración de fosfatos en la muestra problema original será el resultado de promediar los resultados de las tres medidas y aplicar el factor de dilución. El error se obtiene a partir de la dispersión de los datos: $\varepsilon = t \cdot (s/\sqrt{N})$, donde s es la desviación cuadrática y N el número de medidas realizadas.

E. Determinación de fosfato por el método de adiciones estándar

Con el fin de minimizar *efectos de matriz* se aplica el método de adiciones estándar. Para ello se pasan 4 alícuotas del mismo volumen de muestra problema en matraces de 25 ml. A 3 de esos matraces se les añade cantidades crecientes de la disolución de trabajo. A continuación se agregarán 10 ml de la disolución de vanado-molibdato y se enrasará con agua destilada. Dejar reposar 10 minutos.

Calcular las alícuotas de la muestra problema y las adiciones de forma que la concentración estimada de fosfato no exceda de 20 mg/l.

Medidas de absorbancias:

Poner a cero el espectrofotómetro con el mismo blanco del apartado anterior y medir la absorbancia a 420 nm de cada muestra.

Construir la recta de adiciones estándar y determinar la concentración de fosfatos. Aplicar el factor de dilución correspondiente.

Para el cálculo de errores en este apartado, pedir el resultado obtenido a 2 parejas del mismo turno de prácticas y realizar los cálculos de la desviación estándar.

F. Presentación de resultados

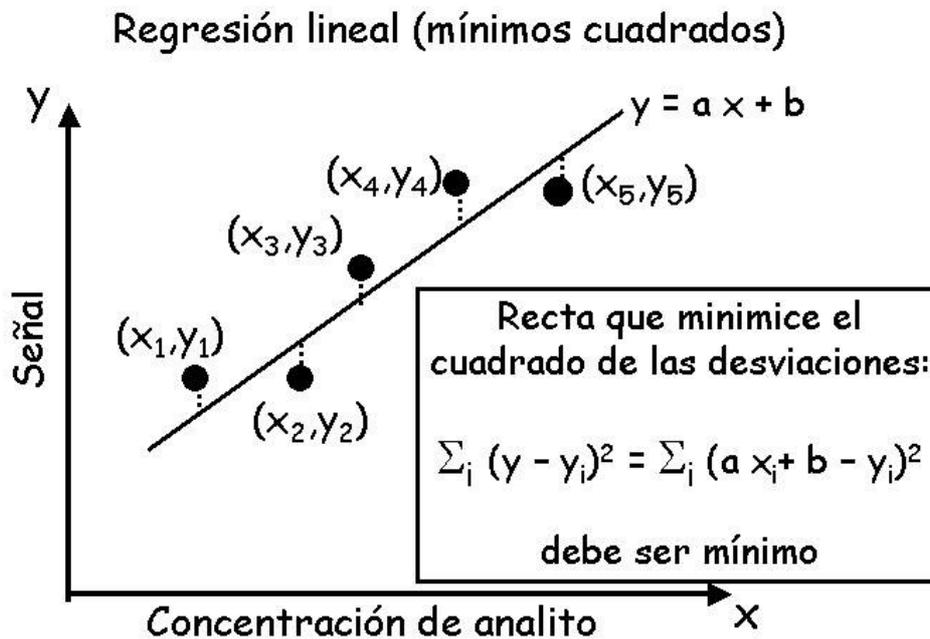
1. Incluir todas las medidas de absorbancia y concentraciones de las disoluciones patrón de fosfato correspondientes en tablas.
2. Representar en gráficas independientes los datos experimentales de los dos calibrados realizados (*patrón externo* y *adiciones estándar*), así como cada una de las rectas por mínimos cuadrados (se recomienda el uso de Excel)
3. Para cada uno de los métodos utilizados (calibrado y adiciones estándar), expresar la concentración de fosfato resultante de la muestra problema junto con los errores absoluto y relativo de la determinación. Comparar ambos métodos y discutir los resultados.

6. Gestión de residuos:

Los reactivos de esta práctica no son peligrosos para el medioambiente en bajas concentraciones y se pueden desechar en el fregadero.

7. Bibliografía

Daniel C. Harris, **Análisis Químico Cuantitativo** 2ª ed., Ed. Reverte. **Capítulos 4, 5 y 19**

Apéndice 1: Regresión lineal por mínimos cuadrados: Expresiones de cálculo

Regresión lineal:

$$y = (a \pm \Delta a) x + (b \pm \Delta b)$$

$a = \frac{C}{A}, \quad b = \bar{y} - a \bar{x}$	coeficiente de correlación
$\Delta a = \sqrt{\frac{R}{A \cdot (N-2)}}, \quad \Delta b = \Delta a \cdot \sqrt{\frac{D}{N}}$	$\rho = \frac{C}{\sqrt{A \cdot B}}$

definiciones

$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum x_i$	$\bar{y} = \frac{1}{N} \sum y_i$
$A = \sum (x_i - \bar{x})^2$	$B = \sum (y_i - \bar{y})^2$
$C = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	$D = \sum (x_i)^2$
$R = \sum (ax_i + b - y_i)^2$	