

PRÁCTICA 4. ESPECTROFOTOMETRÍA

OBJETIVOS

Obtener el espectro de absorción del colorante E-124 y determinar, a partir del espectro, a) El coeficiente de absortividad molar k del colorante y b) la concentración de una muestra problema.

INTRODUCCIÓN

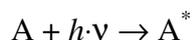
La Espectrofotometría es una de las técnicas experimentales más utilizadas para la detección específica de moléculas. Se caracteriza por su precisión, sensibilidad y su aplicabilidad a moléculas de distinta naturaleza (contaminantes, biomoléculas, etc) y estado de agregación (sólido, líquido, gas). Los fundamentos físico-químicos de la espectrofotometría son relativamente sencillos.

Las moléculas pueden 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:

$$E_{\text{fotón}} = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda ,$$

donde c es la velocidad de la luz, ν es su frecuencia, λ su longitud de onda y $h = 6.6 \cdot 10^{-34}$ J·s es la constante de Planck. Cuando decimos que una sustancia química absorbe luz de longitud de onda λ , esto significa que las moléculas de esa sustancia absorben fotones de esa longitud de onda.

En esta práctica estudiaremos la absorción de luz en el ultravioleta cercano ($\lambda \approx 325\text{-}420$ nm) y en el visible ($\lambda \approx 420\text{-}900$ 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:



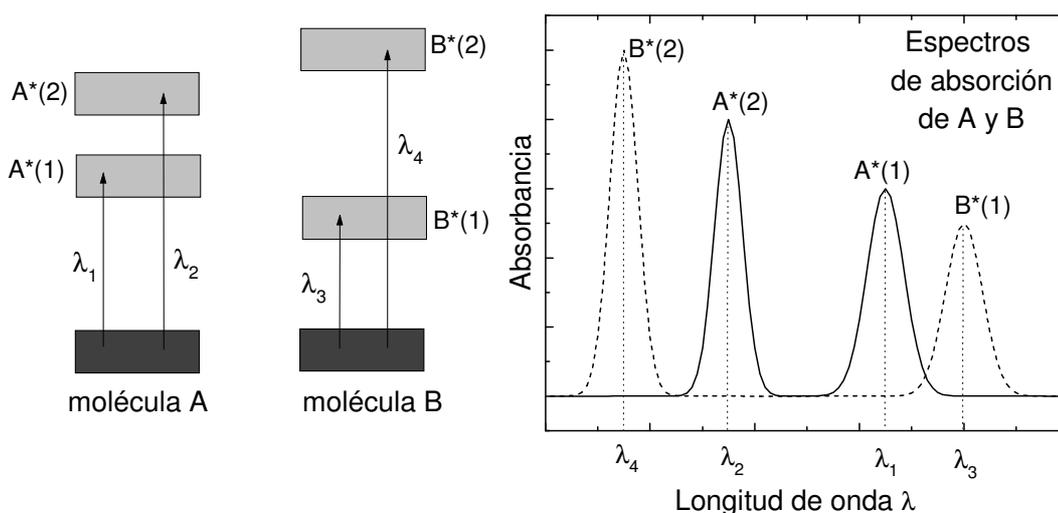
$$E(A^*) = E(A) + E_{\text{fotón}}$$

Como la energía se conserva, la diferencia de energía entre el estado fundamental de la molécula (A) y su estado excitado (A^*) debe ser exactamente igual a la energía del fotón. Es decir, una molécula sólo puede absorber fotones cuya energía $h \cdot \nu$ sea igual a la energía de un estado molecular excitado. Cada molécula tiene una serie de estados

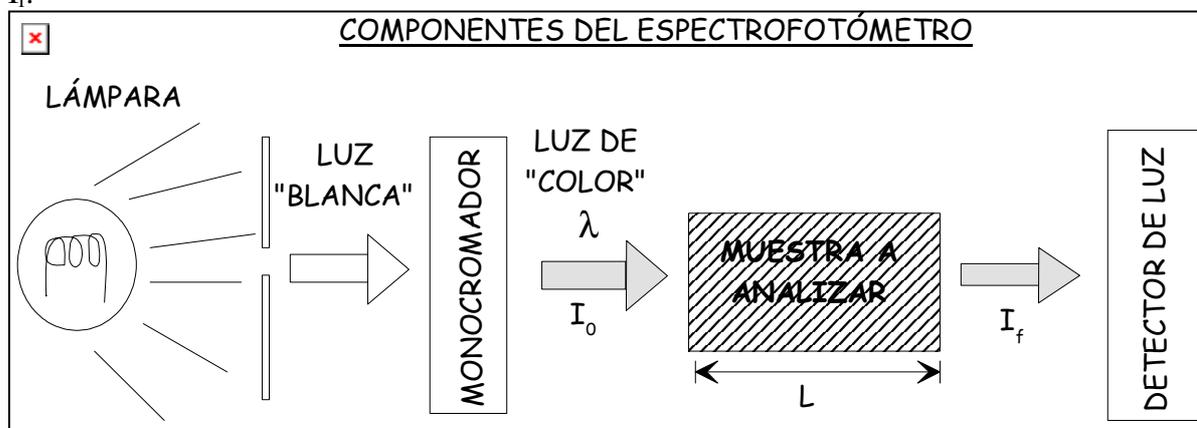
FUNDAMENTOS DE QUÍMICA-PRÁCTICA 4

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 sustancia o molécula.

En una ampliación a esta práctica, se puede detectar una mezcla de dos colorantes alimentarios, el rojo E-124 y un colorante verde midiendo su espectro de ultravioleta/visible. Cuando dos o más sustancias aparecen mezcladas en una misma muestra sus espectros de absorción aparecen superpuestos tal como se representa en la siguiente figura:



Los espectros de absorción se miden mediante un instrumento denominado espectrómetro. Los instrumentos que vamos a usar en esta práctica constan de una fuente de luz "blanca" caracterizada por un espectro de emisión continuo en un intervalo amplio de longitudes de onda (en nuestro caso 325 nm-900 nm) y de un monocromador que actúa como filtro óptico transmitiendo un haz de luz de longitud de onda fija λ e intensidad I_0 . Este haz de luz 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 .



FUNDAMENTOS DE QUÍMICA-PRÁCTICA 4

La intensidad del haz de luz se va atenuando a medida que atraviesa la cubeta debido a la absorción de las moléculas de la muestra. 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:

$$dI = -k \cdot [B] \cdot I \cdot dL$$

La constante k se denomina coeficiente de absortividad molar. La expresión anterior se puede integrar de la siguiente forma:

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

lo cual da lugar a la **ley de Beer-Lambert**¹ para la absorción 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 :

$$I_f = I_0 \cdot e^{-k \cdot [B] \cdot L}$$

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

$$A \equiv \ln \frac{I_0}{I_f} = k \cdot [B] \cdot L$$

La utilización de la absorbancia al realizar los espectros tiene la ventaja de ser directamente proporcional a la concentración de moléculas en la muestra.

PARTE EXPERIMENTAL

ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE UN COLORANTE Y DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIONES

La práctica que vamos a hacer consiste en la determinación de una concentración desconocida de un colorante alimentario en una muestra problema. Para ello realizaremos los siguientes experimentos:

- Mediremos el espectro de absorción de una disolución que contiene el colorante E-124 y localizaremos su máximo de absorción.
- Nos situaremos en dicho máximo y mediremos la absorbancia de 4 disoluciones de concentración conocida de colorante preparadas por nosotros. Esto nos proporcionará una recta de calibrado.

¹ En realidad, la ley de Beer-Lambert se define con una potencia de 10, en lugar de una exponencial. Para corregir este hecho basta recordar que $\ln x = (\ln 10) \log x$. El coeficiente de absorción molar sería en rigor $\epsilon = k / \ln 10$.

FUNDAMENTOS DE QUÍMICA-PRÁCTICA 4

- Mediremos la absorbancia de la muestra problema y determinaremos su concentración a partir de la recta de calibrado.

Procedimiento

1. Preparación de 4 disoluciones patrón de colorante E-124 a partir de una disolución concentrada del colorante (concentración **0,15 g/l** de colorante rojo E-124) que se proporciona ya preparada. En la preparación de las disoluciones patrón se utilizarán:

- pipetas y matraces aforados y la balanza de precisión.
- una disolución tampón de MES previamente preparada. El MES es una solución de un ácido orgánico (ácido 2-morfolino etanosulfónico) 50 mM neutralizado con NaOH hasta pH=6,5. El tampón garantiza que el pH se mantiene en torno a 6,5.

Cada pareja utilizará la disolución concentrada para preparar las siguientes 4 disoluciones más diluidas que serán las que se midan en el espectrofotómetro:

Disolución 1: diluir 1 ml de la disolución concentrada con 5 ml de tampón y enrasar con agua en un matraz aforado de 25 ml.

Disolución 2: idem, 2 ml de disolución concentrada.

Disolución 3: idem, 3 ml de disolución concentrada.

Disolución 4: idem, 5 ml de disolución concentrada.

2. Calcular la molaridad de todas las disoluciones, incluida la concentrada. Usar los datos que se facilitan en el anexo.

3. Medir el espectro de absorción del colorante de 325 a 685 nm sobre la disolución 4: Tras realizar el blanco, se introduce una cubeta con la disolución 4 (la más concentrada) y se mide la absorbancia en el intervalo de longitudes de onda fijado tomando valores cada 20 nm. Se repite la operación de manera más fina en la región donde se haya observado una mayor absorbancia, esta vez tomando valores cada 10 nm. Establecer, a partir de esta medida, dónde se encuentra el máximo de absorción del colorante. Anotar el valor de absorbancia para esa longitud de onda de la Disolución 4.

4. Repetir la medida, a la misma longitud de onda (máximo de absorción del colorante) para las disoluciones 3, 2, 1 y para una mezcla problema de concentración desconocida. Anotar los correspondientes valores de absorbancia frente a concentración para hacer una recta de calibrado.

5. Proceder a realizar el análisis de datos:

5.1 Representar gráficamente el espectro de absorción del colorante (absorbancia frente a longitud de onda).

5.2 Representar la absorbancia en el máximo de las Disoluciones 1-4 frente a la molaridad y ajustar los 4 puntos a una recta por el método de mínimos cuadrados. A partir de la regresión lineal obtenida, determinar:

a) El coeficiente de absortividad molar k del colorante E-124 a la longitud de onda escogida.

b) La concentración de la muestra problema.

FUNDAMENTOS DE QUÍMICA-PRÁCTICA 4

5.3 Contestar a las siguientes preguntas después de estudiar el tema de “ácido-base” en el segundo cuatrimestre.

¿Por qué es prudente, en general, usar un tampón de pH para medir colorantes?

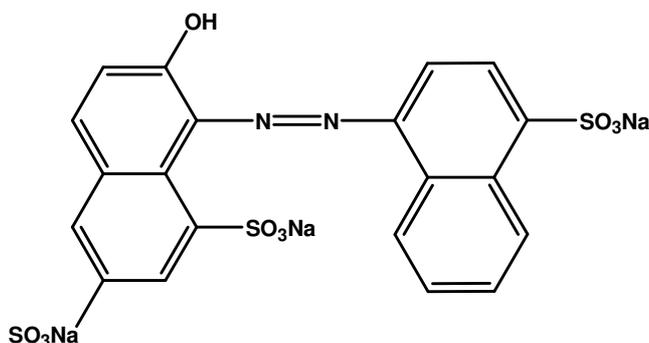
¿Por qué, en el caso concreto del colorante considerado, no era necesario usar un tampón de pH, sino que podrían haberse realizado las medidas en agua destilada sin tampón? Recurrir a datos de la literatura para contestar a esta pregunta.

ANEXO

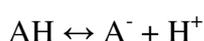
Los colorantes azoicos tienen la fórmula general $R^1-N=N-R^2$ y comprenden más compuestos que todas las demás clases de colorantes reunidos. Se usan como tintes para textiles, grasas, madera, papel, alimentos (jarabes, mermeladas, etc). Su uso en alimentos se está reduciendo debido a la toxicidad de algunos de los miembros de esta clase.

El colorante "E-124" según la lista de aditivos alimentarios de la CEE, se denomina también Ponceau 4R o rojo cochinilla A, aunque no tiene relación química con la cochinilla (número CAS: 2611-82-7). Se trata, sin embargo, de un derivado sintético de la familia de los colorantes monoazoicos de peso molecular 604,51 g/mol. En Estados Unidos, su uso está prohibido ya que se considera cancerígeno.

Se utiliza para dar color de "fresa" a los caramelos y productos de pastelería, helados, etc, y también en sucedáneos de caviar y derivados cárnicos (en el chorizo, por ejemplo, sustituyendo en todo o en parte al pimentón).



Este colorante, al igual que la mayoría de los colorantes de su clase y de otras clases, puede perder un protón (H^+) en medio básico:



En las condiciones en las que se realiza esta práctica, el color se debe a la molécula neutra. A menudo, el anión correspondiente tiene otro color o es incoloro. Esto se podría comprobar en la práctica echando unas gotas de NaOH 1 M a una pequeña cantidad de la disolución 4.

También sería posible, en una ampliación a la práctica, medir el espectro de un segundo colorante y ver como interfiere en la determinación de la concentración de E-124.