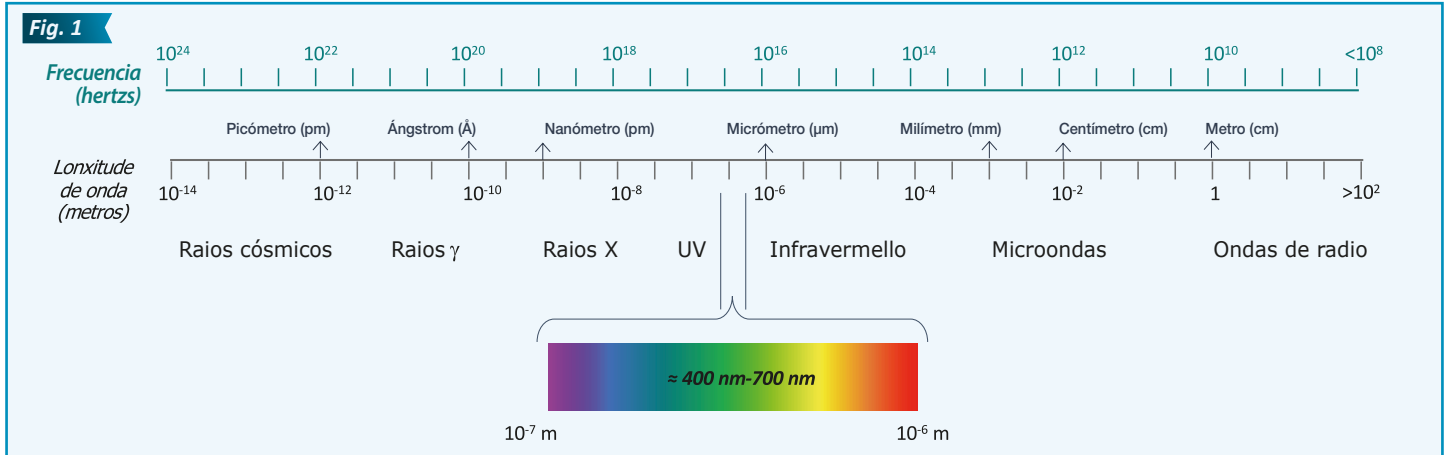


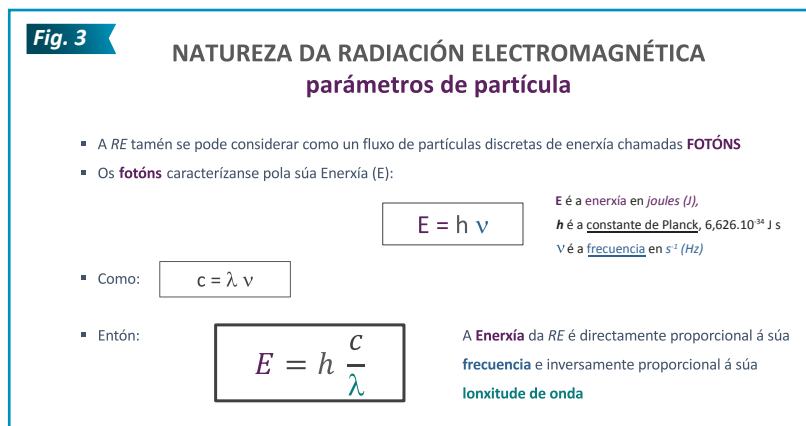
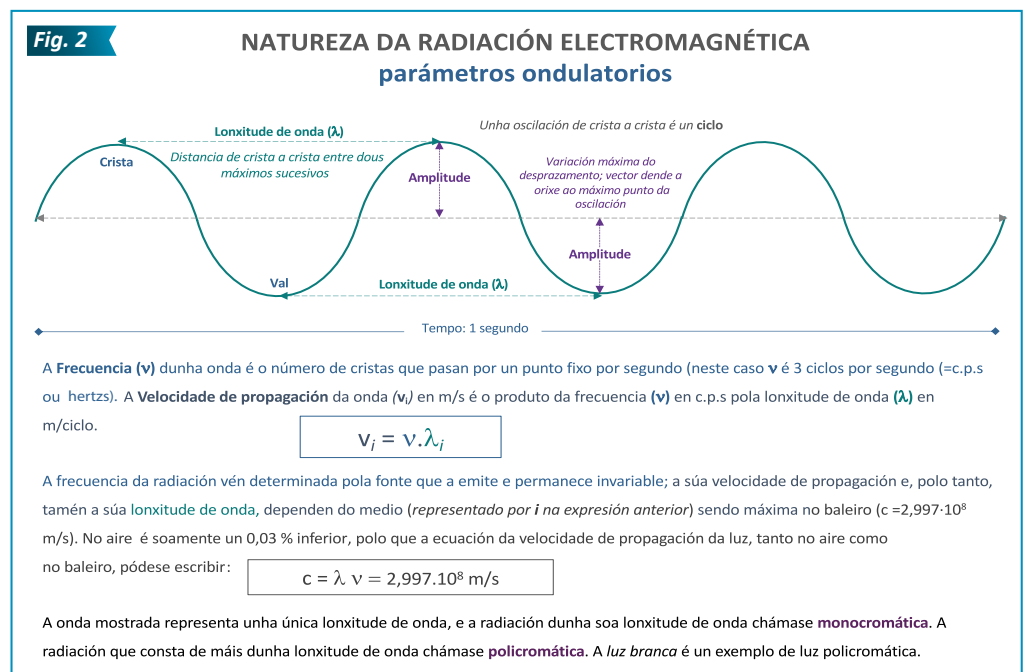
Marta Lores Aguín, Carmen García Jares (Dpto. de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía)

As técnicas espectroscópicas de análise baséanse na interacción entre a *radiación electromagnética (RE)* e os átomos e moléculas que forman a materia. A RE abarca dende as ondas de radio ata a radiación gamma e os raios cósmicos.



A RE pode comportarse como unha **onda** (Fig.2) ou como unha **partícula** (Fig.3). A mecánica cuántica explica o fenómeno da dualidade “onda-partícula” para toda a materia, incluíndo a RE.

A figura 2 representa a compoñente eléctrica dunha onda de radiación que se propaga por un só eixo (dise que está “polarizada nun plano”) cos seus parámetros característicos:



Cando a RE interacciona coa materia poden ocorrer varios fenómenos: uns baseados nas **propiedades ondulatorias**, como a **transmisión, a reflexión ou a dispersión de radiación**; e outros baseados nas **propiedades corpusculares**, como a **absorción e a emisión** de xeito descontínuo.

Espectroscopia é o termo xeral que describe a ciencia das interaccións da *RE* coa materia. Considérase tamén un alcance máis amplo da *espectroscopia*, entendéndoa como a interacción entre a materia e outras formas de enerxía (feixes de electróns, feixes de ións, ondas acústicas...). A medida e interpretación dos fenómenos de absorción e emisión de *RE* por parte dos átomos ou das moléculas que conforman a materia chámase *espectrometría* ou *espectrofotometría*. Este último termo soe referirse á absorción e emisión de radiación na rexión Visible (Vis) -unha parte moi pequena do espectro electromagnético-, que xunto coa rexión Ultravioleta (UV) utilizaremos nas técnicas espectrofotométricas para medir a concentración (cantidade) das especies químicas de interese. Ademais, segundo a *natureza da especie química* que se quere medir falamos de técnicas *atómicas* (átomos) ou *moleculares* (moléculas).

Fig. 4

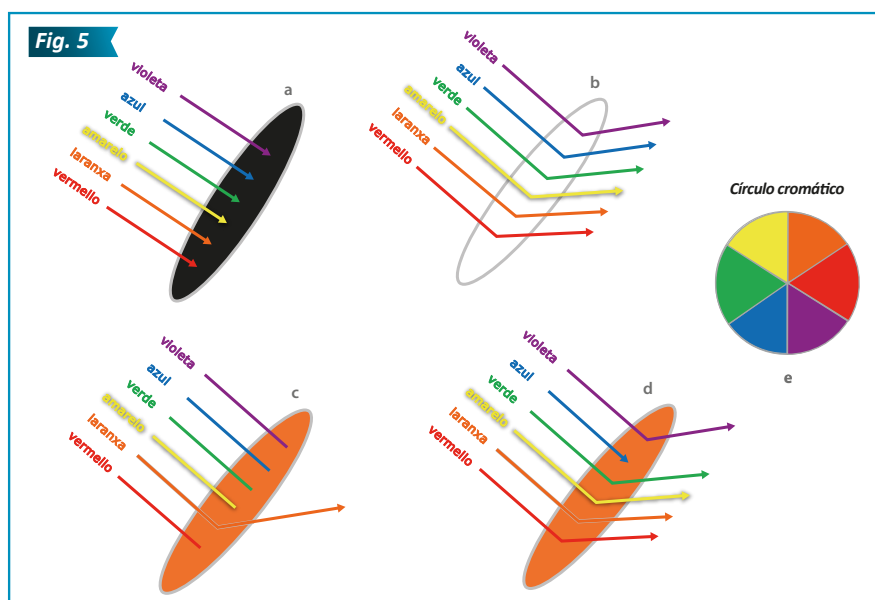
Radiación	Espectroscopia	Transición cuántica	Rango $\approx \lambda$	Especie química
Raios γ	Emisión	Núcleos atómicos	0,5 pm-1,5 Å	Átomos
Raios X	Absorción Emisión Fluorescencia Difracción	Electróns internos	0,1-100 Å	Átomos
UV-Visible	Absorción Emisión Fluorescencia	Electróns de enlace	180-780 nm (UV: 180-380 nm), (Vis: 380-7800 nm)	Átomos Moléculas
Infravermello	Absorción Dispersión (Raman)	Rotación/Vibración de moléculas	1-300 mm	Moléculas
Microondas	Absorción	Rotación de moléculas	1-4 mm	Moléculas

As rexións do espectro electromagnético que interesan con fins analíticos e os métodos espectrométricos asociados resúmense na seguinte táboa (Fig. 4) onde se resalta en cor a primeira técnica que imos considerar na colección *Esenciais USC*. As técnicas de resonancia de spin electrónico e resonancia magnética nuclear son tamén espectroscópicas, pero baséanse na compoñente magnética da radiación; aquí consideramos as técnicas máis frecuentes con base na compoñente eléctrica da *RE*.

ESPECTRO(FOTO)METRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR UV/Vis

Cando falamos coloquialmente de *luz*, referímonos á parte da *RE* que é visible para os nosos ollos. Para simplificar, usaremos a partir de aquí este termo para referirnos á radiación electromagnética tanto da rexión Visible como da UV. A *luz* pode ser absorbida polas moléculas, proporcionándolles parte ou toda a súa enerxía.

Cando se absorbe luz, a enerxía (E) que transportan os fotóns transfírese aos electróns das moléculas do material co que interactúa. Cada material ten unha disposición particular de electróns e de enlaces que implican electróns. Por esta razón, diferentes materiais, absorben luz de diferentes lonxitudes de onda. Así, a cor dun obxecto está determinada polas lonxitudes de onda da luz que absorbe (Figura 5): é negro cando absorbe todas as cores da luz (Fig. 5a) e é branco cando reflicte todas as cores (Fig. 5b). Un obxecto pode ser laranxa porque reflicte soamente esa cor e absorbe todas as demais (Fig.5c); ou ben, porque reflicte todas as cores menos a azul, que é a cor complementaria da laranxa (Fig.5d). A complementariedade das cores básicas esquematízase no círculo cromático (Fig. 5e).



A absorción de luz é a base para as medicións espectrofotométricas; o instrumento que se utiliza chámase *espectrofotómetro* e consta de diversos compoñentes con funcións específicas (Fig.6):

Fig. 6



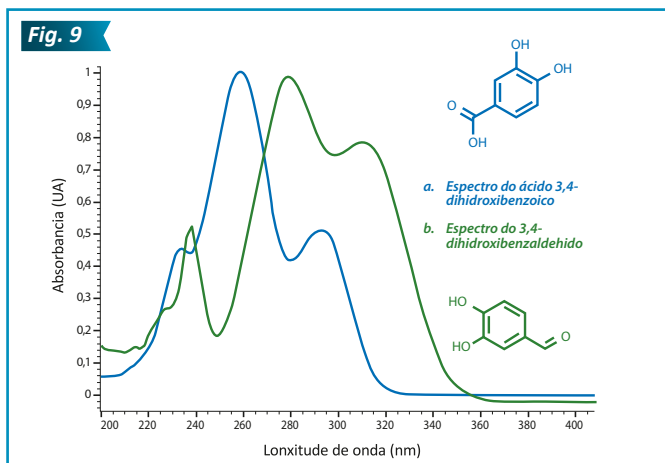
Os espectrofotómetros axudan a responder cuestións esenciais no laboratorio:

- Cal é a identidade ou a natureza dun(s) compoñente(s) dunha mostra? **Análise cualitativa**
- Canto analito está presente nunha mostra? **Análise cuantitativa**

O espectrofotómetro permite amosar graficamente o patrón de absorción de luz que chamamos *espectro de absorbancia* (Fig. 7). Neste gráfico, a *lonxitude de onda* está no eixe dos X e a medida da cantidade de luz absorbida no eixe dos Y, expresada de xeito habitual en unidades de absorbancia (A). Todos os espectrofotómetros miden, en realidade, *transmitancia* (T) (a relación entre a cantidade de luz transmitida a través dunha *mostra* e a cantidade de luz transmitida a través dun *branco*). En xeral, interesa máis a luz que absorbe unha mostra, pero as magnitudes están directamente relacionadas: $A = -\log T$. O espectro de absorbancia da figura 7 correspóndese coa disolución do colorante *verde naftol* (Fig. 6) e presenta un máximo de absorbancia a 710 nm (na rexión vermella do espectro visible, ver fig. 1 e 5).

Aplicacións cualitativas: os espectros UV/Vis son relativamente sinxelos (comparados con outros como os de infravermello) pero tamén son menos característicos dunha substancia en particular. Con todo, para substancias determinadas pódense usar para confirmar a identidade dunha mostra.

Nas análises de identificación (cualitativas), o espectro da mostra que estamos analizando compárase co espectro dun patrón puro: se coinciden, hai moitas probabilidades de que o composto sexa o mesmo (Fig.8).



Aplicacións cuantitativas: Lei de Beer e curvas de calibración.

A Lei de Beer establece que para unha radiación monocromática, a absorbancia (**A**) é directamente proporcional ao camiño óptico **b** a través do medio e á concentración **c** da especie absorbente: $A = abc$, onde **a** é a constante de proporcionalidade denominada *absortividade*, que indica a tendencia inherente dun material a absorber luz dunha lonxitude de onda específica. Cando a *concentración* se expresa en *moles por litro* e a *ruta óptica* en *cm*, a absortividade denomínase *absortividade molar* e represéntase polo símbolo ϵ , orixinando a expresión máis coñecida da Lei de Beer:

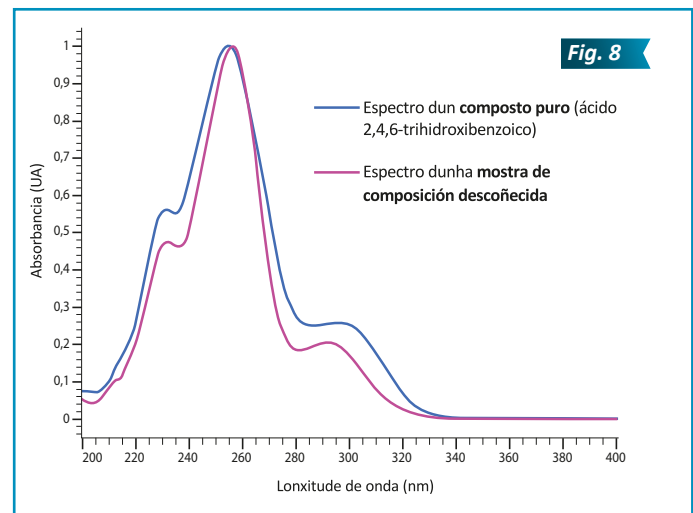
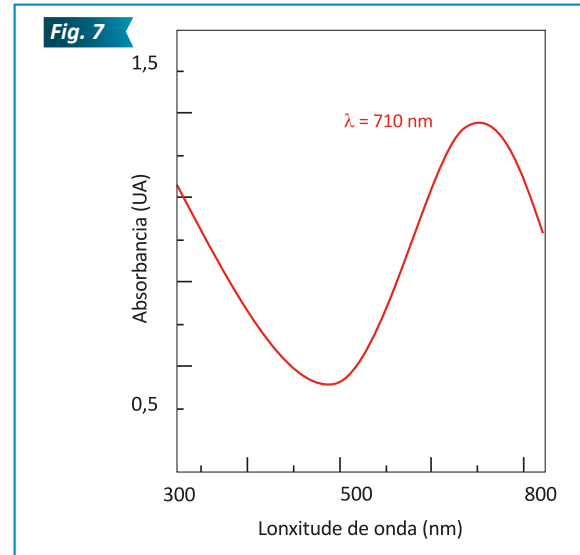
$$A = \epsilon bc$$

DEFINICIÓNS

Analito: substancia de interese cuxa presenza e/ou cantidade nunha mostra avalíase usando un instrumento, un ensaio ou unha análise.

Mostra: subconxunto dun todo que representa ese todo. Materia na que queremos determinar a presenza e/ou cantidade dun analito.

Branco: Referencia que non contén o analito pero contén o disolvente (nunha mostra líquida).



Tamén se poden usar os espectros UV-Vis para obter información sobre as características estruturais dunha substancia (Fig.9): os espectros da figura correspóndense con dous compostos puros que só se diferencian nun grupo funcional: ácido (-COOH) ou aldehído (-CHO); o resto da estrutura química é exactamente igual nas dúas moléculas.

Esta Lei é a base para a análise cuantitativa por espectrofotometría de absorción e afirma que a cantidade de luz que sae dunha mostra redúcese por tres causas: a concentración da substancia absorbente na mostra (**c** na ecuación); a distancia que percorre a luz pola mostra (ruta óptica ou **b**) e a probabilidade de que un fotón dunha lonxitude de onda determinada sexa absorbido polo material específico da mostra (a absorptividade, ϵ).

Dado que ϵ é constante para un composto determinado a unha lonxitude de onda fixa e específica (λ) e **b** está determinada polo tamaño da cubeta escollida para realizar a medida, existe unha relación lineal entre a absorbancia medida e a concentración de analito, que nos vai servir para determinar a cantidade dese analito nunha mostra.

As aplicacións cuantitativas da espectrofotometría teñen como propósito determinar a concentración (cantidade) dun **analito** nunha **mostra**. Implican tipicamente a utilización dunha “curva de calibración” ou “curva patrón”, representada nun gráfico coa concentración do analito no eixe X e a absorbancia no eixe Y. Para construír unha curva de calibración, prepáranse **patróns** con cantidades coñecidas do analito e prepárase tamén un **branco**. (Fig. 10a)

Mídense as absorbancias dos patróns a unha lonxitude de onda especificada e represéntanse graficamente os resultados obtidos. Despois búscase a liña que mellor se axusta aos resultados experimentais (Fig.10b,c). O método estatístico usado para determinar a ecuación desa liña chámase “método dos mínimos cadrados” e calcula a ecuación dunha recta tal que minimiza a desviación total dos puntos experimentais respecto da recta (**ecuación de regresión**). A calidade do axuste avalíase polo coeficiente de regresión, que varía entre 0 (non hai relación entre as variables **x** e **y**) e 1 (a relación é perfecta, todos os puntos experimentais coinciden coa recta teórica).

Disolucións patrón con concentracións coñecidas (de 3 a 15 mg/L) do analito (**verde naftol**) xunto co branco (**auga**)

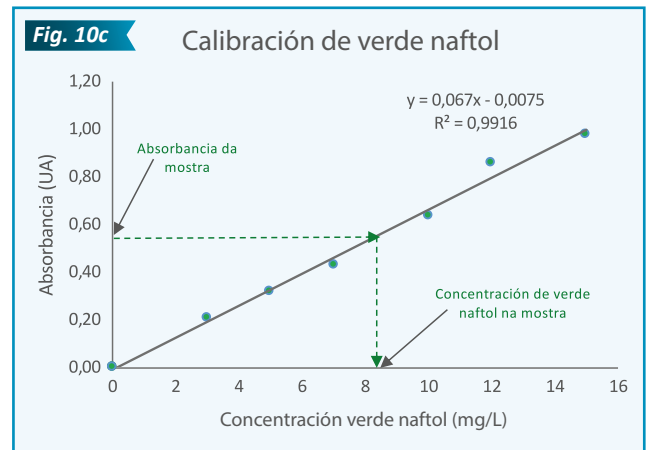


Medidas espectrofométricas ($\lambda=710\text{ nm}$)

Fig. 10b

	Concentración verde naftol (mg/L)	Absorbancia (UA) $\lambda=710\text{ nm}$
Branco B	0	0,00
Patrón 1	3	0,21
Patrón 2	5	0,32
Patrón 3	7	0,43
Patrón 4	10	0,64
Patrón 5	12	0,86
Patrón 6	15	0,98
Mostra	?	0,56

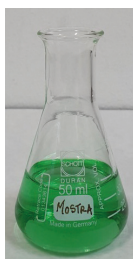
Fig. 10c



Despexamos **x** na ecuación de regresión, substituímos o valor da absorbancia da mostra no **y** e obtemos a concentración de **verde naftol** na **mostra problema** \Rightarrow
 $X=(0,56+0,0075)/0,067 \Rightarrow$ **8,47 mg/L**

Fig. 10d

Mostra problema na que queremos determinar a concentración descoñecida do analito (**verde naftol**)



Unha vez temos a ecuación da regresión, medimos a absorbancia da mostra (Fig.10d) á mesma lonxitude de onda específica; o valor da absorbancia substitúese no **y** da ecuación, permitindo despexar o **x**, para poder determinar a cantidade de analito descoñecida (concentración) presente na mostra.

A Figura 10 no seu conxunto resume o procedemento de obtención dunha curva de calibración para a determinación dun colorante (**verde naftol**) nunha **mostra acuosa** que contén unha cantidade de verde naftol descoñecida; o **branco** nesta determinación é **auga**. A medida das absorbancias realízase á lonxitude de onda máxima, que é aquela na que a absorbancia é máxima, e dedúcese do espectro de absorbancia do composto (Fig.7) medido previamente.

