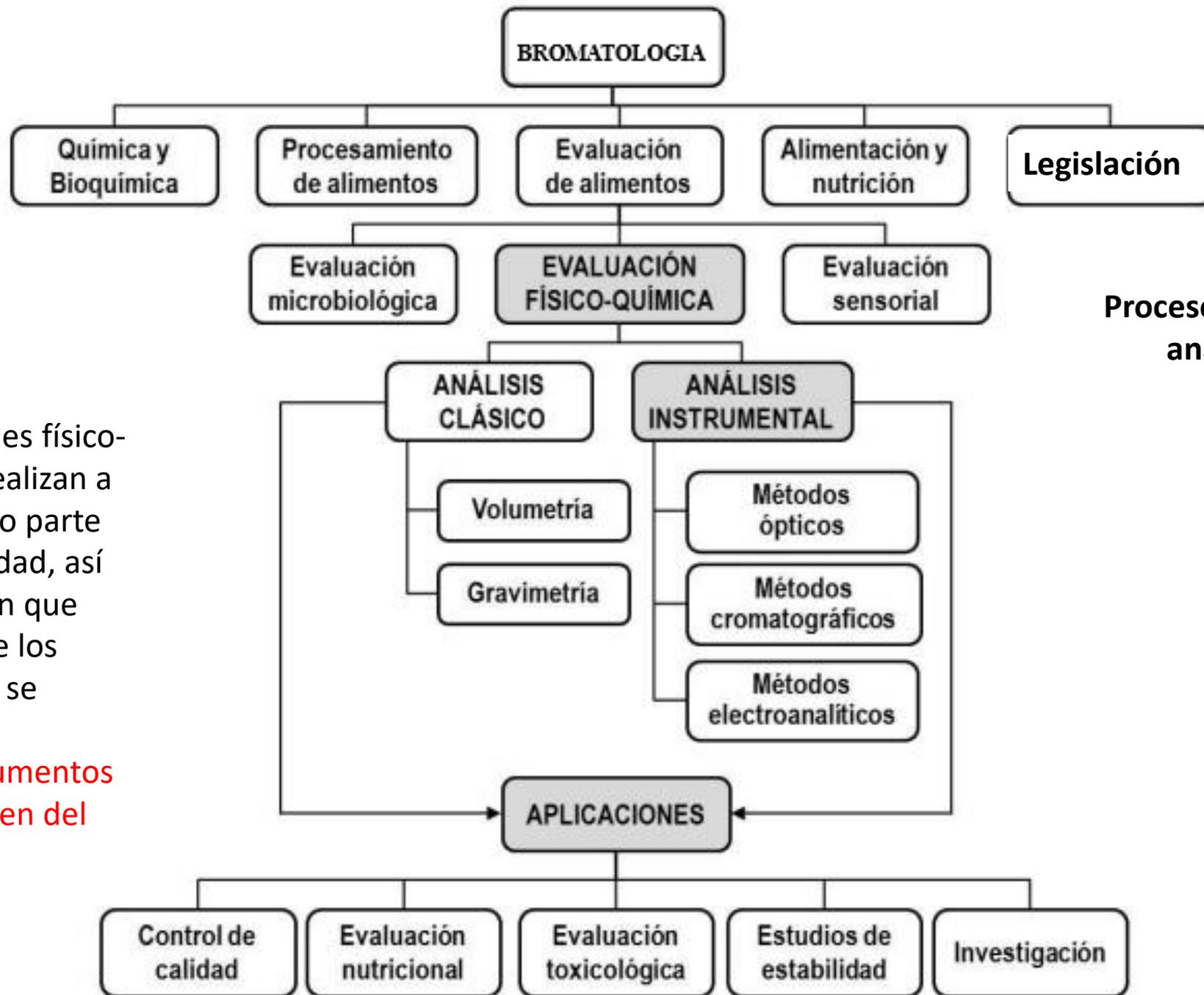


Métodos ópticos

REPASO

- Bromatología
- Normativa
- Evaluación FQ
- Aplicaciones



Proceso para un análisis

Las determinaciones físico-químicas que se realizan a los alimentos como parte del control de calidad, así como los límites en que deben encontrarse los componentes que se cuantifican están normadas en documentos técnicos y dependen del tipo de alimento.



Para seleccionar el método se debe considerar

Características del analito	Características de la matriz	Validación del método analítico
<p>Considerar la naturaleza química (inorg., org. bioQ)</p> <p>Propiedades físico químicas del componente que se desea cuantificar</p> <p>[componentes] macro (+1%), micro 0,01% y 0,1% o trazas (-0,01%).</p>	<p>Estado de agregación + la complejidad de la matriz + interferencias = Método mas específico</p> <p>No es lo mismo realizar un análisis sobre un producto líquido que sobre uno sólido, Así mismo, no es lo mismo en matriz sea más compleja (mayor número de componentes),</p>	<p>El objetivo es el establecer qué características del método son adecuadas para la aplicación que se pretende y asegurar que un procedimiento dará resultados reproducibles y confiables</p> <p>Exactitud - Precisión Selectividad Linealidad Sensibilidad de calibrado Límite de detección y límite de cuantificación Tolerancia o fortaleza Robustez</p>



Criterios de calidad de los instrumentos y métodos de análisis

Criterios	Definición	Expresión para el cálculo
Precisión	Describe la reproducibilidad de los resultados; es decir, la concordancia entre los valores numéricos de dos o más medidas que se han realizado exactamente de la misma forma	$CV = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100$ coeficiente de variación, Desviación estándar absoluta y relativa,
Veracidad	Es la proximidad de la concordancia entre el valor promedio obtenido en una serie de resultados de ensayo y el valor de referencia aceptado de la propiedad analítica que se está midiendo, o sea, el contenido verdadero de un analito dentro de la muestra en estudio	$\% \text{ Recuperación} = \frac{\bar{X}_{\text{experimental}}}{\text{Valor real}} \cdot 100$
Linealidad	Capacidad de un método o un instrumento analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un intervalo determinado	$y = mx + a$ Regresión lineal, R^2 coeficiente de determinación
Sensibilidad	Se define como la pendiente de la curva de calibrado a la concentración objeto de estudio	$S = mc + S_{bl}$
Límite de detección	Es la mínima concentración o la mínima masa de analito que se puede detectar para un nivel de confianza dado.	$3 S_{bl}$ Blanco más tres veces la desviación estándar del blanco
Límite de cuantificación	Es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con cierta confianza. A este límite también se le llama límite de determinación	$10 S_{bl}$ Blanco más diez veces la desviación estándar del blanco
Intervalo de concentración	Es el intervalo lineal de un método analítico o de un instrumento, que va desde la concentración más pequeña a la que se puede realizar la cuantificación (límite de cuantificación, LOQ) hasta la concentración a la que la curva de calibrado se desvía de la linealidad (límite de linealidad, LOL).	
Selectividad	Se define como la capacidad de un método o un instrumento analítico para medir exacta y específicamente el analito, sin interferencia de impurezas u otros componentes que puedan estar presentes en la muestra.	

Muestreo y Preparación de la muestra

Equipos

Algunos procedimientos de preparación de la muestra

Los procedimientos explicados constituyen tan solo unos pocos ejemplos de las numerosas operaciones que pueden emplearse como parte de la preparación de la muestra.

Homogenización Su objetivo es contribuir a que la porción de ensayo sea representativa de la muestra bruta. Se realiza **trituyendo y mezclando** las muestras sólidas y semisólidas o por **agitación** fuerte en el caso de los líquidos. En el caso de las emulsiones, como la leche por ejemplo, un **calentamiento en baño de María** facilita el proceso de homogenización.



Secado y desgrasado Se realizan cuando el contenido de humedad y/o grasa constituyen interferencias para el análisis. El secado a temperaturas superiores a 100°C en estufa, mientras que el desgrasado se realiza extrayendo la grasa con solventes orgánicos.

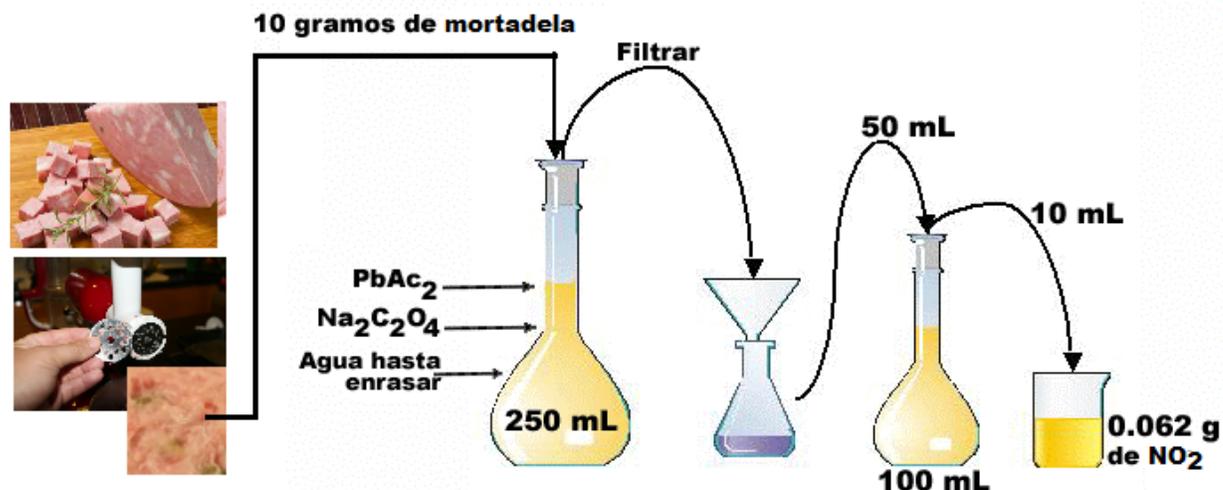
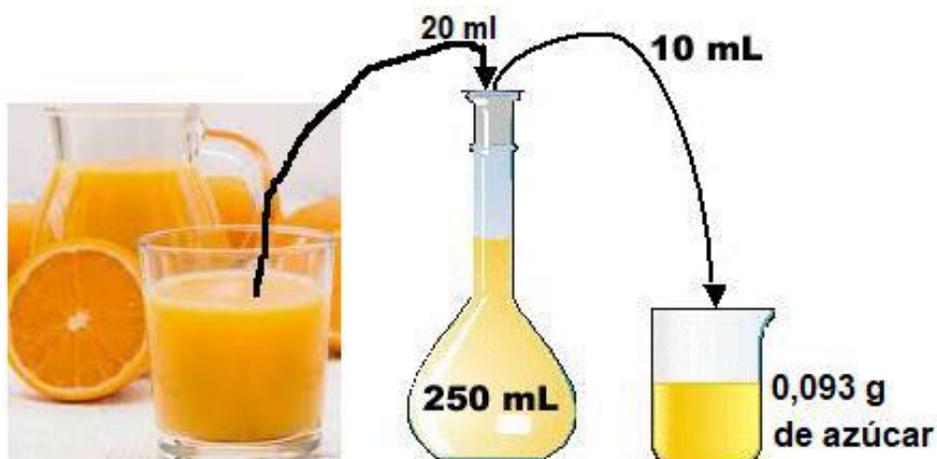


Concentración La evaporación, centrifugación. La concentración por membranas.

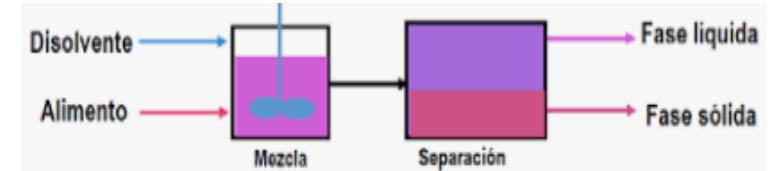
Las membranas de permeabilidad selectiva (solo dejan pasar a su través ciertas moléculas),.

La **crioconcentración**. técnica para concentrar líquidos,, mediante la congelación y posterior separación del agua en forma de cristales puros

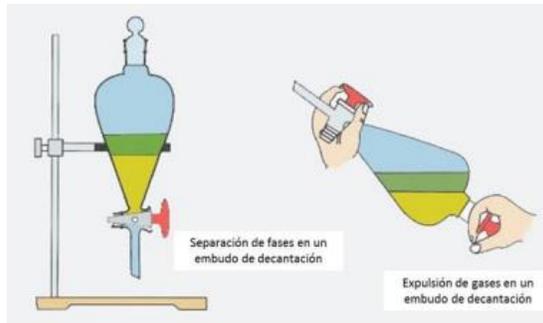
Dilución Se emplea para muestras líquidas en las cuales el analito se encuentra en altas concentraciones o en productos fuertemente coloreados cuya coloración interfiere en el análisis.



Extracción sólido- líquido Consiste en la extracción del analito a partir de una matriz sólida empleando un disolvente adecuado capaz de solubilizar el componente en estudio. Ejm. NaCl por Mohr en cárnicos, suspende en agua destilada por 1 H .

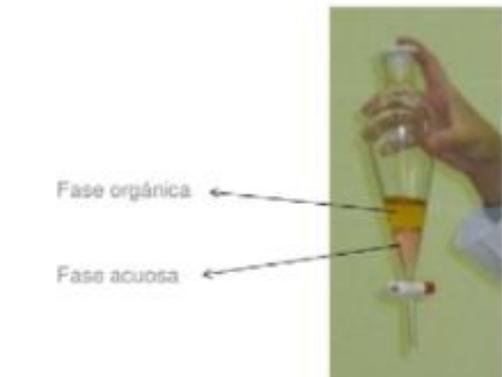


Extracción líquido - líquido



Algunos disolventes típicos en Análisis Químico

Polaridad decreciente ↑	Isooctano (99°C)	
	Hexano (69°C)	
	Tolueno (101°C)	
	Benceno (80°C)	
	Diclorometano (39°C)	
	Aceto de Etilo (77°C)	
	Cloroformo (61°C)	
	Etanol (78°C)	
	Acetona (56°C)	
	Dimetilsulfóxido (189°C)	
Metanol (64°C)		
Agua (100°C)		
	inmiscibles	miscibles



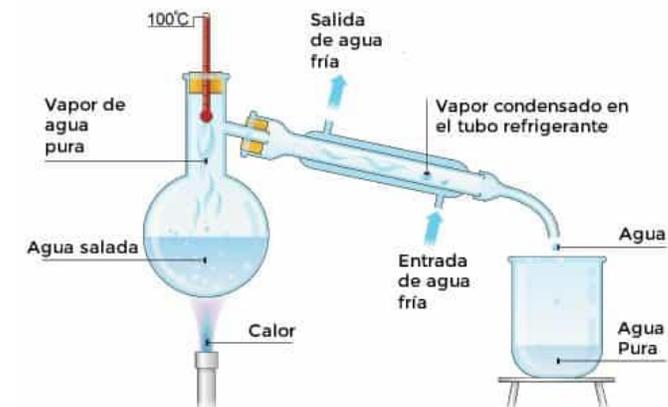
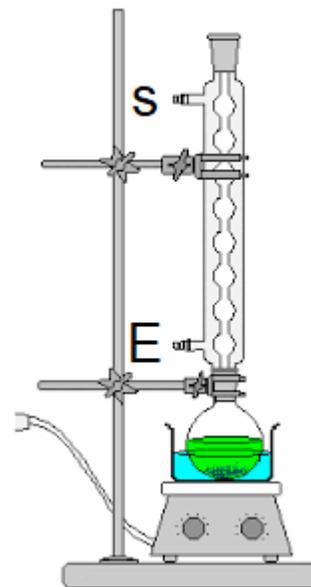
Eliminar solvente
PRESIÓN REDUCIDA
(ROTAVAPOR).

Destilación El analito se separa del resto de los componentes que pueden interferir en el análisis aplicando un procedimiento de destilación

Reflujo Es una operación que se realiza con el fin de propiciar o acelerar una reacción química entre dos sustancias mediante la aplicación de calor.

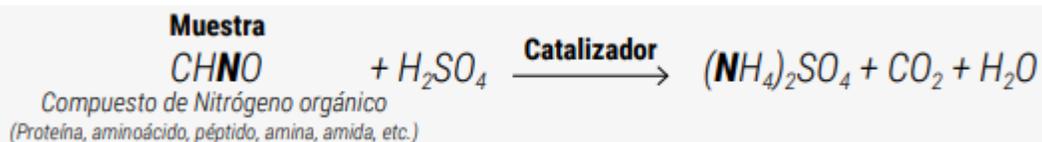


refrigerante en posición vertical.

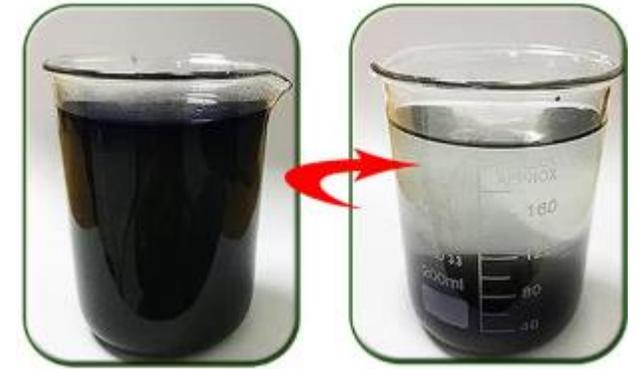


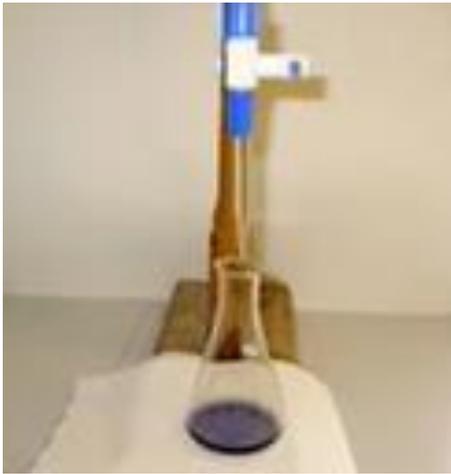
Incineración En algunas determinaciones de compuestos de naturaleza inorgánica se requiere eliminar primeramente el material orgánico para facilitar el análisis

Digestión Es un proceso de hidrólisis (ácida fundamentalmente) de la materia orgánica, que puede incluso, producir agentes oxidantes que transforman la materia orgánica a dióxido de carbono, vapor de agua y otros compuestos volátiles.

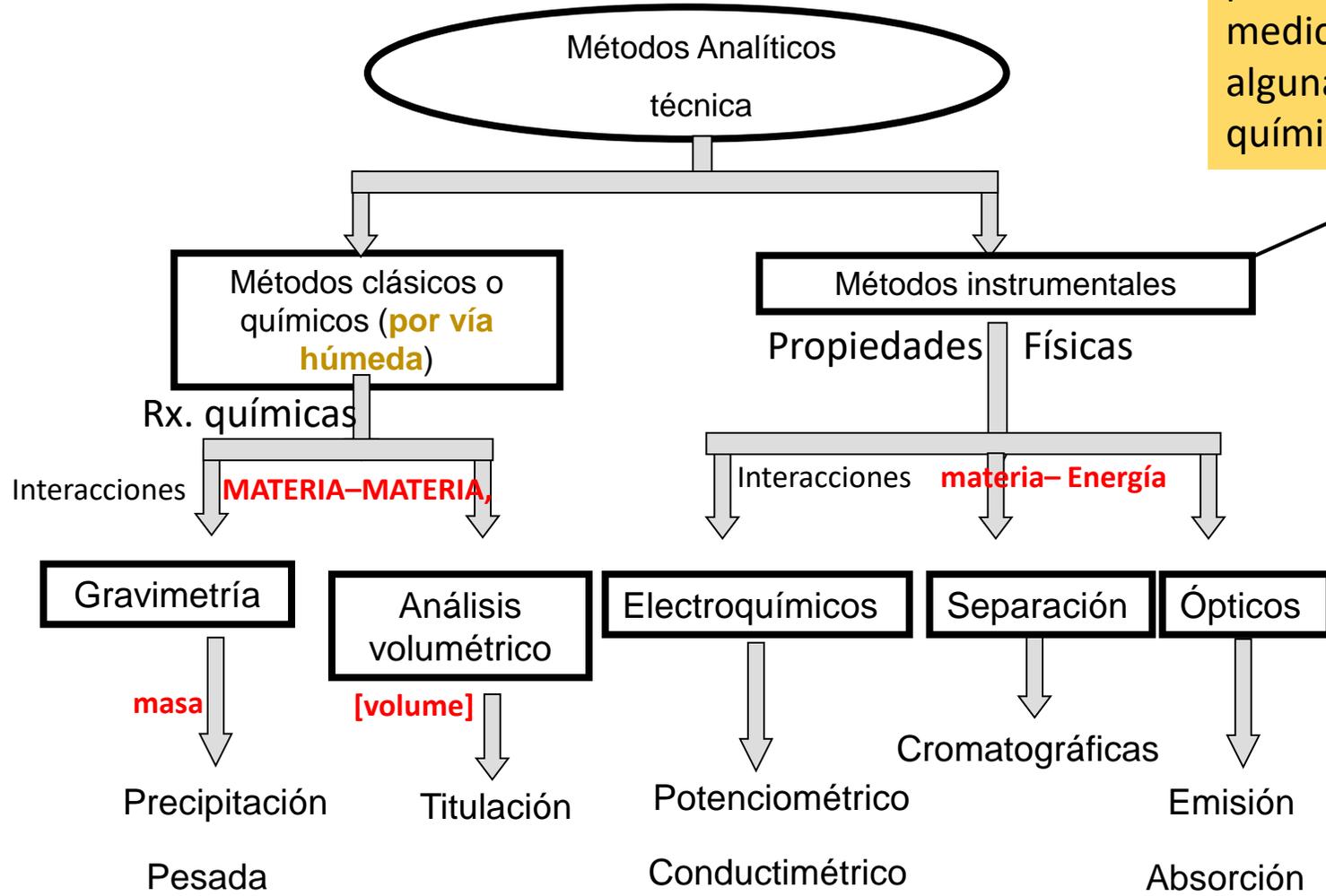


Clarificación: Consiste en eliminar las interferencias por precipitación o floculación empleando un agente precipitante adecuado. Así por ejemplo, en la determinación de azúcares reductores en compotas, los pigmentos y otras macromoléculas que constituyen interferencias, se precipitan por adición de una solución saturada de acetato de plomo. El precipitado se separa por filtración y se obtiene una solución transparente que contiene los azúcares objeto de cuantificación. Este procedimiento se conoce también con el nombre de defecación plúmbica





Constituyen un conjunto de procedimientos basados en la medición instrumental de alguna propiedad físico-química del sistema estudiado



Se obtiene una señal: $S \propto C_{\text{analito}}$

Instrumentos básicos, bureta y balanza

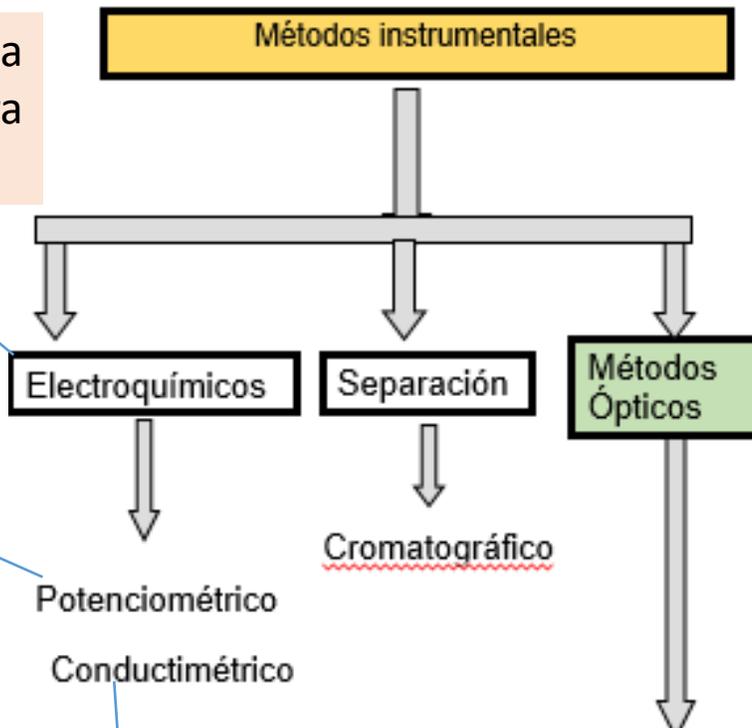
Instrumentos complejos



Conjunto de técnicas que emplean las propiedades eléctricas que presenta una disolución cuando forma parte de una celda electroquímica, para determinar la concentración de un analito.

Los métodos potenciométricos de análisis se basan en las medidas del potencial de celdas electroquímicas en ausencia de corrientes apreciables.

Los métodos conductimétricos están basados en la conducción eléctrica de los iones en una disolución.



POTENCIOMETRIA



1. ELECTRODO DE REFERENCIA (un electrodo con un potencial conocido y constante con el tiempo)

2. ELECTRODO INDICADOR O DE TRABAJO (un electrodo sensible a la especie electroactiva o ANALITO)

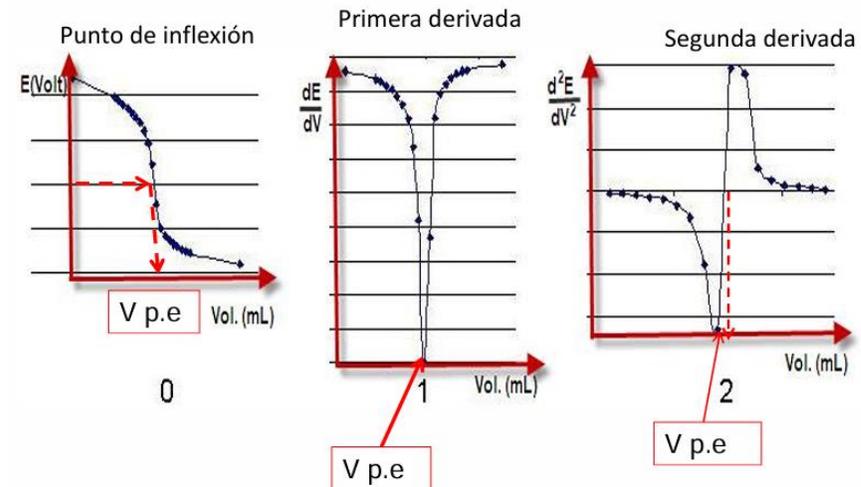
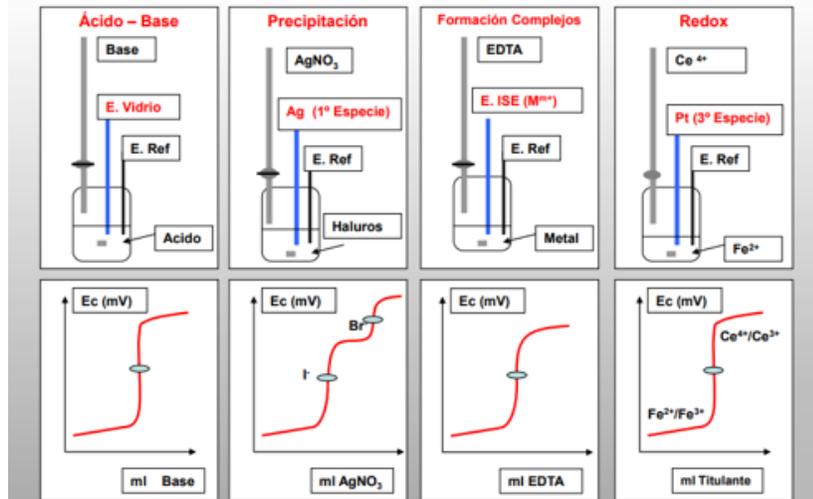
3. POTENCIÓMETRO. Un dispositivo para medir el potencial con resistencia grande respecto de la celda

APLICACIONES

Existen electrodos de trabajo de distinto tipo.

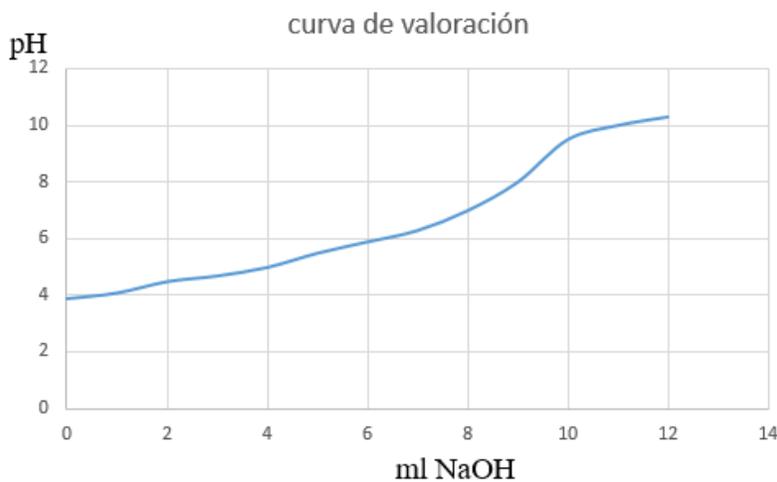
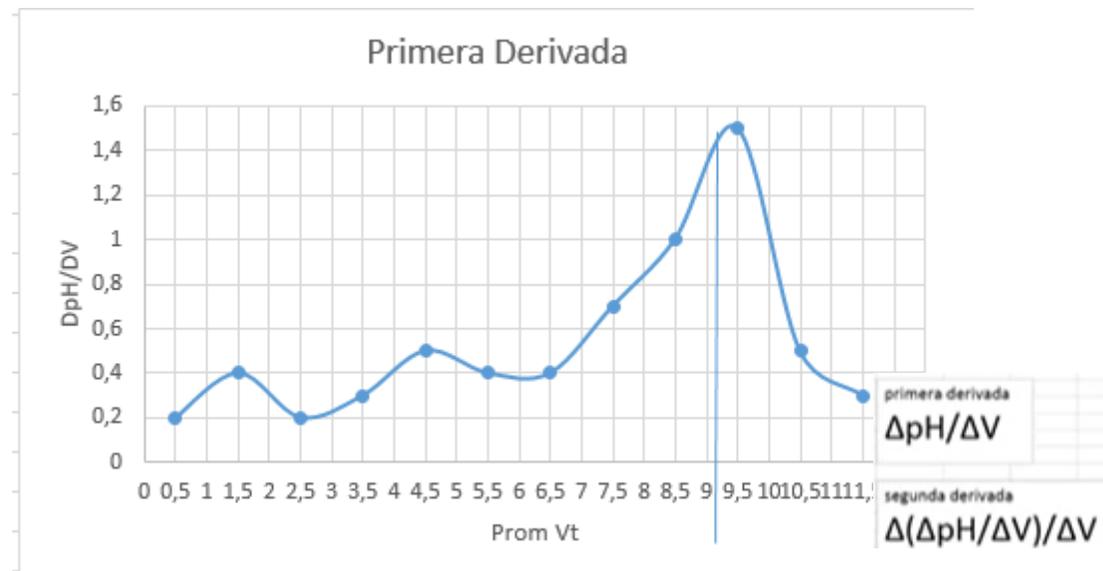
- ✓ Determinación del **pH**
- ✓ Determinación del **ión fluoruro** en agua potable.
- ✓ Determinación del **ión calcio** en suero sanguíneo
- ✓ Determinación del **ión nitrato** en pulpa de tomates
- ✓ Determinación de **glucosa** en sangre
- ✓ Determinación de **urea** en leche
- ✓ Determinación de **dióxido de carbono** en un efluente
- ✓ Determinación de **pesticidas** en agua natural

Las Titulaciones Potenciométricas se pueden aplicar a cualquier equilibrio químico!!!



Cálculo del volumen a través de la segunda derivada

fx		=+(C5+C4)/2										
C	D	E	F	G	H	I	J	K				
				GRAFICO			GRAFICO					
Vt(ml)	pH	DpH	DV	prom de Vt(ml)	DpH/DV	Vprom(G)	D ² (DpH/DV)					
0	3,9											
1	4,1	0,2	1	0,5	0,2							
2	4,5	0,4	1	1,5	0,4	1	0,2					
3	4,7	0,2	1	2,5	0,2	2	-0,2					
4	5	0,3	1	3,5	0,3	3	0,1					
5	5,5	0,5	1	4,5	0,5	4	0,2					
6	5,9	0,4	1	5,5	0,4	5	-0,1					
7	6,3	0,4	1	6,5	0,4	6	-8,88178E-16					
8	7	0,7	1	7,5	0,7	7	0,3					
9	8	1	1	8,5	1	8	0,3					
10	9,5	1,5	1	9,5	1,5	9	0,5					
11	10	0,5	1	10,5	0,5	10	-1					
12	10,3	0,3	1	11,5	0,3	11	-0,2					



S	T	
x	y	
18	9	0,5
19	10	-1
20	X	0
21	$m = -1,5 = (T19 - T18) / (S19 - S18)$	
$Vt = X = 9,33 = ((T20 - T18) + (T21 * S18)) / T21$		



$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

$$x_2 = \frac{y_2 - y_1 + mx_1}{m}$$

REVISAR ESTE TEMA EN EL LIBRO ANALISIS INSTRUMENTAL DE LOS ALIMENTOS

391 / 538



100%



varían de 5 a 60 segundos, mientras que los sensores de gas y enzimáticos requieren de 1 a 5 minutos o más para la determinación de una muestra simple.

13.4.4. Aplicaciones de los métodos potenciométricos en el análisis de los alimentos

Sin dudas, la aplicación más trascendental de los métodos potenciométricos en el análisis de los alimentos, está en la medición directa del pH, dada la enorme importancia que tiene el control de este parámetro en la elaboración de los productos alimentarios, tanto como indicador de las condiciones higiénicas como para el control de los procesos de transformación; así mismo el pH de los alimentos tiene un impacto significativo en las características organolépticas de los mismos.

El pH, como la temperatura y la humedad, son importantes para la conservación de los alimentos. De ahí que generalmente, disminuyendo el valor de pH de un

CONDUCTIVIDAD

La **conductividad** es una medida de la concentración iónica total que tiene una disolución.

- Esta propiedad depende de la presencia de iones, su concentración, movilidad, valencia y de la temperatura de la medición.
- Las soluciones de la mayor parte de los compuestos inorgánicos son buenas conductoras.
- Las moléculas orgánicas al no disociarse en el agua, la conductancia es nula.

➤ Las unidades de medida habituales de la conductividad de una disolución son los Siemens/cm (S/cm).

➤ **Salinidad**

. Se expresa en ppm ó g/L de NaCl.

➤ **STD (Sólidos Totales Disueltos)**

. Se expresa en ppm ó g/L de CaCO₃.

Célula de conductividad.

- Sonda de temperatura.

- Instrumento de medida:

Conductímetro



FIN DEL REPASO

TEMA DE HOY

METODOS OPTICOS



METODOS OPTICOS

Actualmente estos métodos están generalizados, debido a su rapidez, a la gran gama de instrumentación disponible y sus grandes posibilidades de automatización.

Todos los métodos ópticos se basan en la **interacción de la radiación electromagnética (REM) con el analito.**

qué es la
REM

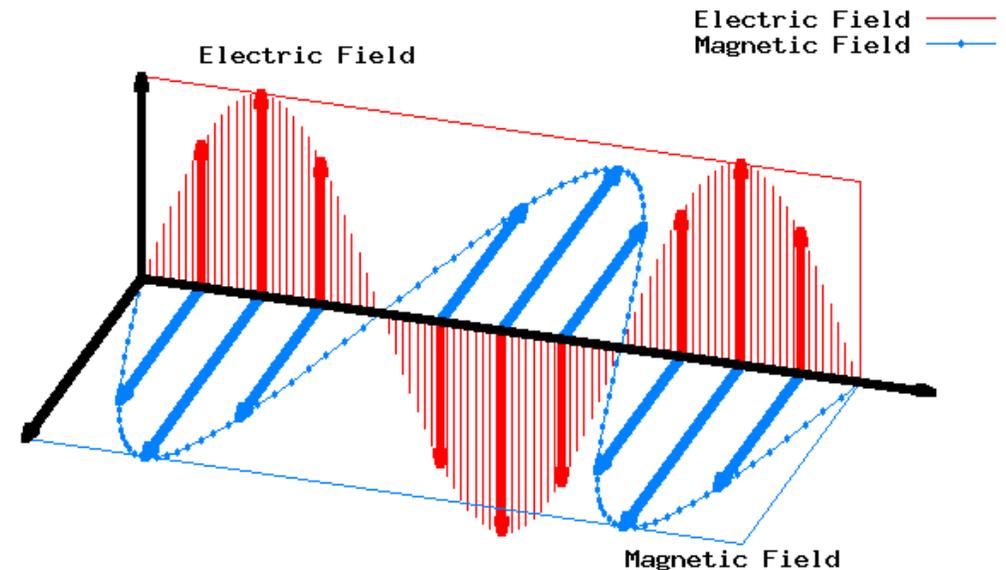


La radiación electromagnética (REM)

La REM es una combinación de campos eléctricos y magnéticos oscilantes, que se propagan a través del espacio a enormes velocidades sin un soporte material transportando energía de un lugar a otro.

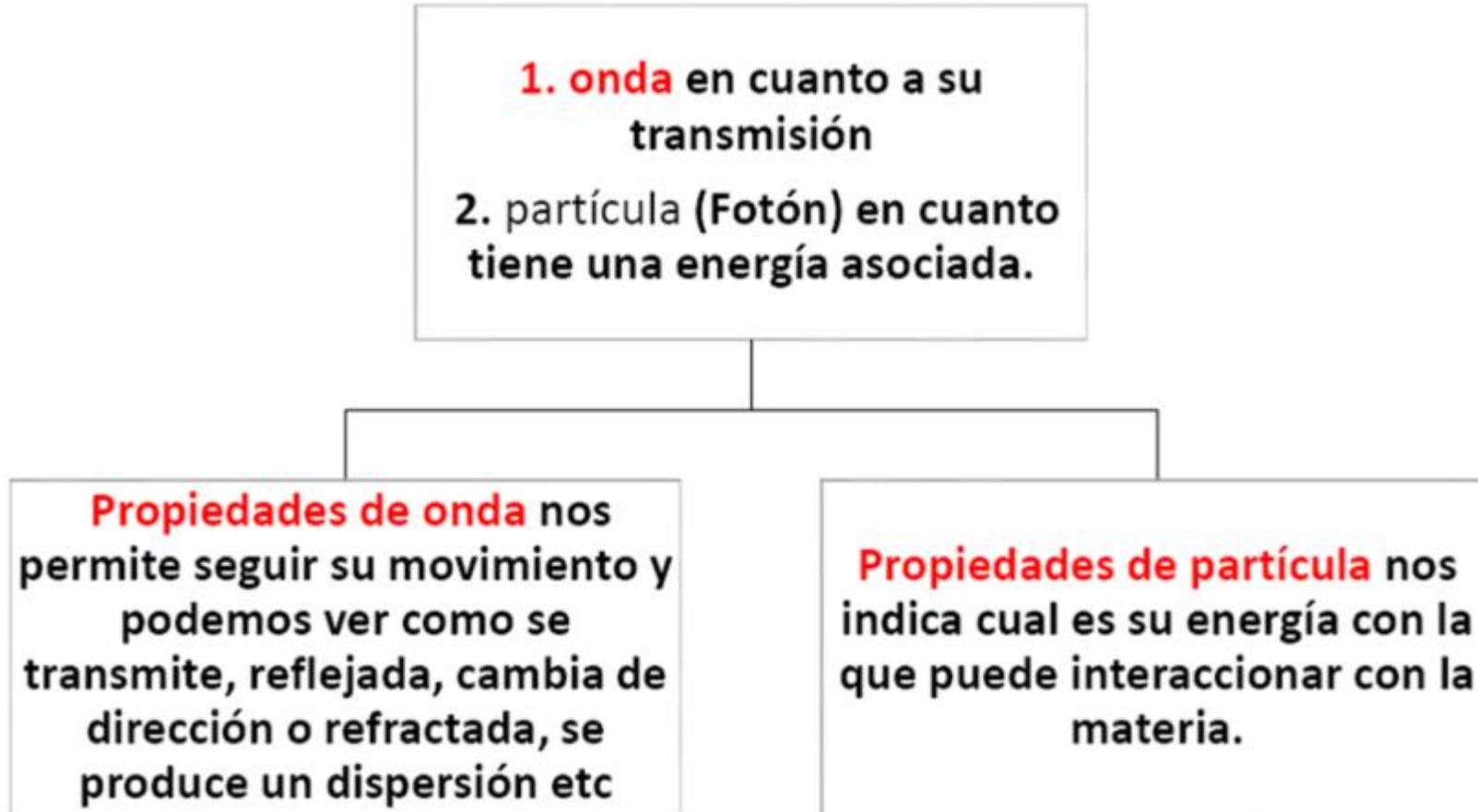
Es un tipo de energía que adopta muchas formas, siendo la más fácilmente reconocibles la luz y el calor radiante.

Manifestaciones menos evidentes son los rayos X, la radiación ultravioleta e infrarroja, las microondas y las ondas de radio.



La energía que transporta una REM se desplaza mediante ondas.

La REM posee una doble condición con sus propiedades respectivas :

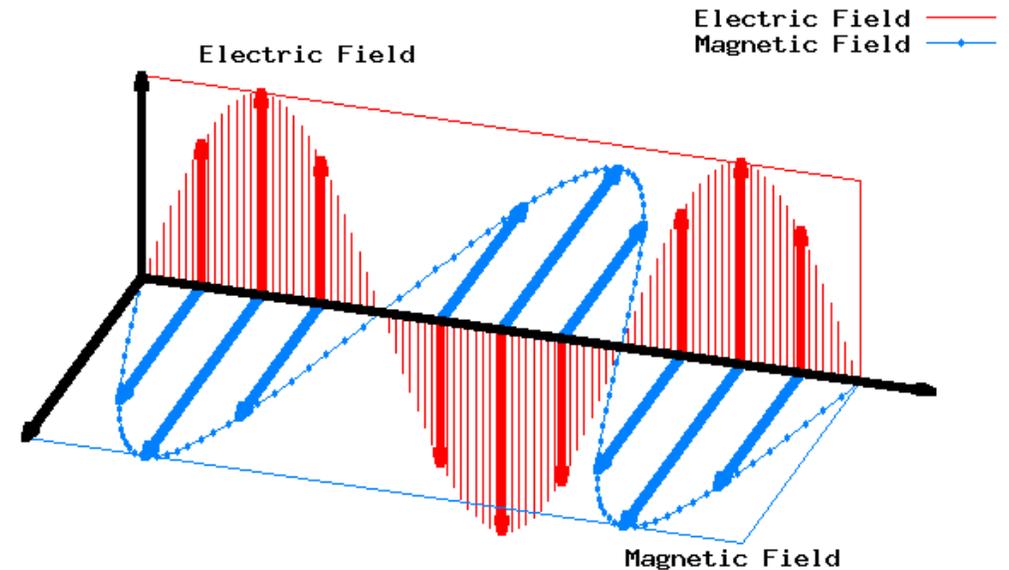


Propiedades de la radiación como onda.

Puede considerarse que la radiación electromagnética está constituida por ondas que se propagan en el espacio a la velocidad c .

Las ondas están constituidas por componentes eléctricos y magnéticos perpendiculares entre sí, como se indica en la Figura 2.1., donde se representa una onda polarizada que se propaga a lo largo del eje X

A diferencia de otros fenómenos ondulatorios, como el sonido, la radiación electromagnética, no necesita un medio de apoyo para transmitirse y, por tanto, se propaga fácilmente a través del vacío



Para caracterizar una onda pueden usarse los siguientes parámetros:

Longitud de onda, λ :

Frecuencia,
la velocidad y
la amplitud.

Los parámetros que caracterizan a la radiación electromagnética como una onda, son los siguientes:

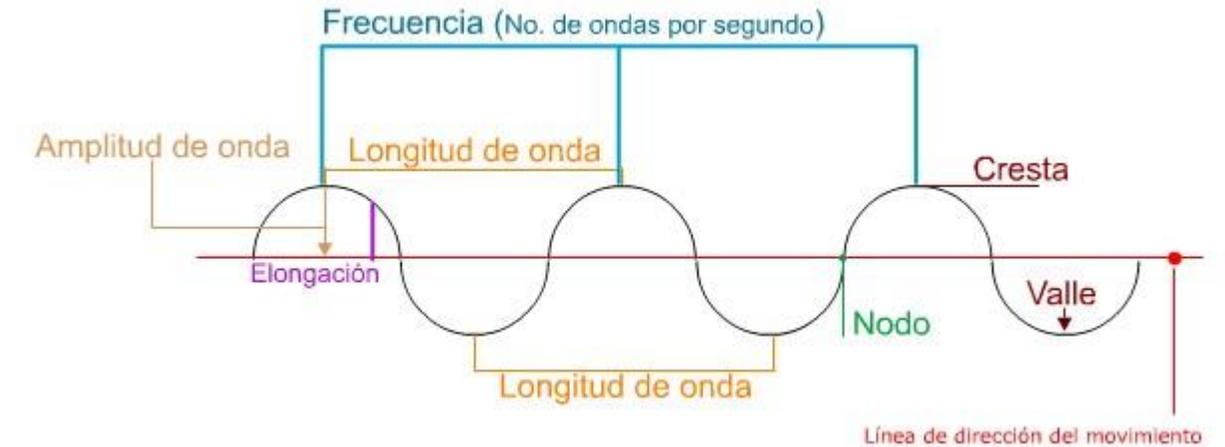
1. Longitud de onda (λ):

Es la distancia entre las crestas de dos ondas consecutivas, y se mide en unidades de longitud (m, cm, A, **nm**, μm)

1 angstrom (A) = 10^{-10} m
1 nanometro (nm) = 10^{-9} m
1 micrometro (μm) = 10^{-6} m

Amplitud

Es la distancia vertical entre la punta de la cresta y el eje central de la onda. Esta es la propiedad asociada con el brillo, o intensidad, de la onda.



2. Frecuencia, ν

Es el número de veces que oscila una onda en un segundo y se mide en ciclos/segundo o hercios (Hz).

La relación entre longitud de onda y frecuencia es:

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

siendo c la velocidad de propagación, que en el vacío es de $2,9979 \times 10^{10}$ cm/s.

La radiación electromagnética como partícula

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

la radiación electromagnética se contempla como flujo de partículas energéticas denominados fotones.

La energía de un fotón es proporcional a la frecuencia de la radiación.

La energía del fotón es proporcional a la frecuencia de la radiación (relación de Einstein-Planck):

Diagrama que muestra la derivación de la energía de un fotón:

$$E = pc = \frac{hc}{\lambda}$$

Donde:

- E : Energía de la luz
- p : momento, relacionado con la longitud de onda λ por $p = \frac{h}{\lambda}$ (Constante de Planck h y Longitud de onda λ)
- pc : energía asociada a su movimiento
- h : Constante de Planck
- c : velocidad de la luz
- λ : Longitud de onda

donde h la constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$).

Indica que la energía de un fotón de radiación monocromática ideal (una sola frecuencia) depende únicamente de su longitud de onda,

3. Energía (E):

La energía transportada por una radiación electromagnética se puede medir en Julios (J), aunque más frecuentemente se mide en electronvoltios (eV).

Espectro electromagnético

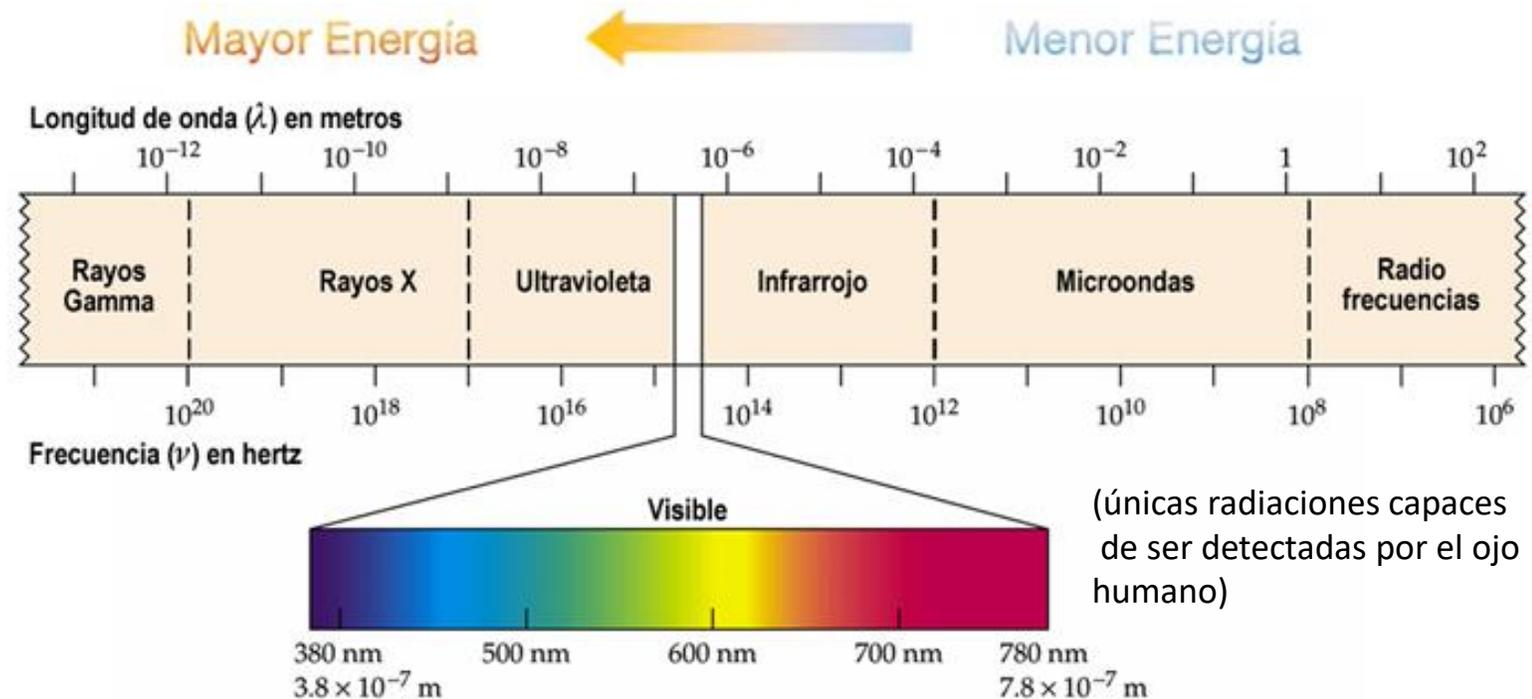
En las **técnicas espectroscópicas** se utilizan diferentes magnitudes para caracterizar las radiaciones, todas ellas relacionadas entre sí.

Así: La frecuencia (Hz), la energía asociada al fotón o mol de fotones (J, J/mol) y el número de onda (cm^{-1}) son directamente proporcionales mientras que la longitud de onda λ (m, cm, nm) es inversamente proporcional a las anteriores.

De acuerdo con estas magnitudes se pueden clasificar a las radiaciones electromagnéticas en diferentes regiones, de fronteras algo imprecisas, donde los procesos moleculares asociados con la absorción o emisión son bien diferentes.

Así, **el espectro electromagnético es el conjunto de radiaciones electromagnéticas en sucesión, ordenadas de acuerdo con su frecuencia.**

En la figura se muestran las diferentes regiones del espectro electromagnético y el rango de longitudes de ondas y frecuencias correspondientes a cada una de ellas



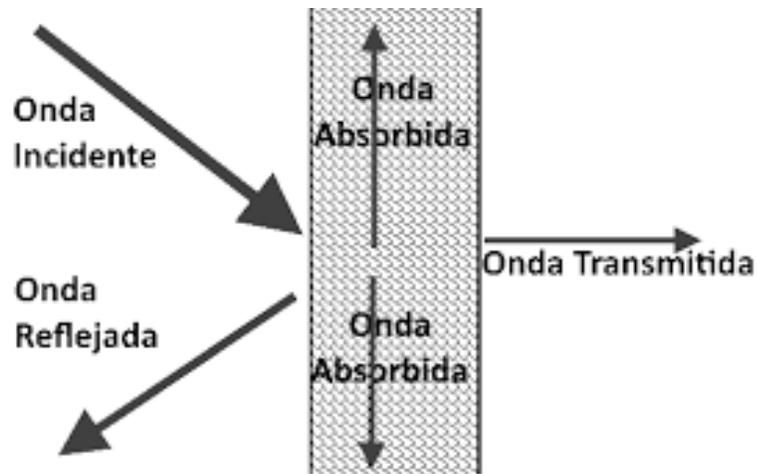
Espectro electromagnético

Región	Energía (J/mol)	Frecuencia ν (Hz)	Longitud de onda λ	
			cm	Unidades usuales
Rayos gamma	-	$> 3 \cdot 10^{20}$	$> 1 \cdot 10^{10}$	$> 100 \text{ \AA}$
Rayos X	\cong miles kJ/mol	$3 \cdot 10^{17} - 3 \cdot 10^{20}$	$1 \cdot 10^{10} - 1 \cdot 10^7$	$10^2 - 10 \text{ \AA}$
Ultravioleta	\cong decenas kJ/mol	$8 \cdot 10^{14} - 3 \cdot 10^{17}$	$1 \cdot 10^7 - 4 \cdot 10^5$	1 - 200 nm
Visible	\cong decenas kJ/mol	$4 \cdot 10^{14} - 8 \cdot 10^{14}$	$4 \cdot 10^5 - 8 \cdot 10^5$	400 - 800 nm
Infrarrojo	\cong miles J/mol	$1 \cdot 10^{12} - 4 \cdot 10^{14}$	$8 \cdot 10^5 - 3 \cdot 10^2$	1 - 300 μm
Microondas	\cong decenas J/mol	$3 \cdot 10^8 - 1 \cdot 10^{12}$	$3 \cdot 10^2 - 100$	0.03 - 100 cm
Radiofrecuencias	hasta 1 J/mol	$3 \cdot 10^5 - 3 \cdot 10^8$	$100 - 10^5$	1 - 1000 m

INTERACCIÓN DE RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA CON LA MATERIA

Cuando la radiación pasa desde el vacío a la superficie de una porción de materia, el vector eléctrico de la radiación interactúa con los átomos y moléculas del medio.

La naturaleza de esta interacción depende de **las propiedades de la materia** y puede dar lugar a procesos de **absorción**, **emisión**, **refracción** y **desviación del plano de luz**, entre otros fenómenos.



Difracción: Se denomina difracción de una onda a la propiedad que tienen las ondas de rodear los obstáculos en determinadas condiciones

Difracción de Onda.



Reflexión

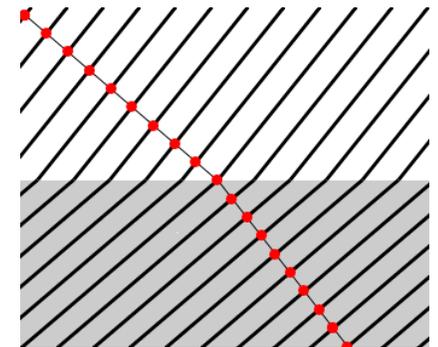
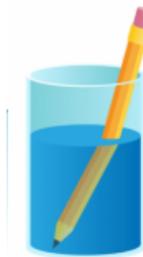
La luz viaja hacia la superficie de un objeto y al chocar rebota



Reflexión: Caso es la luz que se refleja en un espejo, permitiéndonos ver nuestra imagen

Refracción

La luz pasa de un medio a otro (agua, aire, vidrio) y la luz cambia de dirección



Clasificación de los Métodos ópticos de análisis



Existe **intercambio** de energía entre REM y la materia.

Espectroscópicos

No espectroscópicos

Existe **interacción** entre REM y la materia.

Miden la intensidad de la radiación en función λ , mostrando espectros que se forman debido a las transiciones entre distintos niveles energéticos.

Miden cambios en dirección o las propiedades físicas de la REM, como dispersión, refracción, difracción y rotación óptica.

- Dispersión:* turbidimetría, nefelometría
- Refracción:* refractometría,
- Difracción:* rayos X
- Rotación óptica:* polarimetría

Métodos de adsorción miden la disminución de la potencia de la REM debido a la absorción que se produce con la interacción con el analito

Métodos de emisión. Mide La REM emitida cuando el analito libera energía

Las transiciones entre los distintos niveles energéticos pueden tener lugar a nivel molecular o atómico

Nivel molecular: UV-Visible, IR, microondas
Nivel atómico: absorción atómica, rayos X

Nivel molecular: fluorimetría, fosforimetría, quimioluminiscencia
Nivel atómico: Emisión atómica. ICP. fluorescencia de rayos X

Métodos Espectroscópicos De Absorción

La **espectroscopia** de absorción o **espectrometría** Se basa en la absorción de REM por una muestra, midiendo la cantidad de luz absorbida por la misma, lo que permite analizar la composición y estructura de la muestra

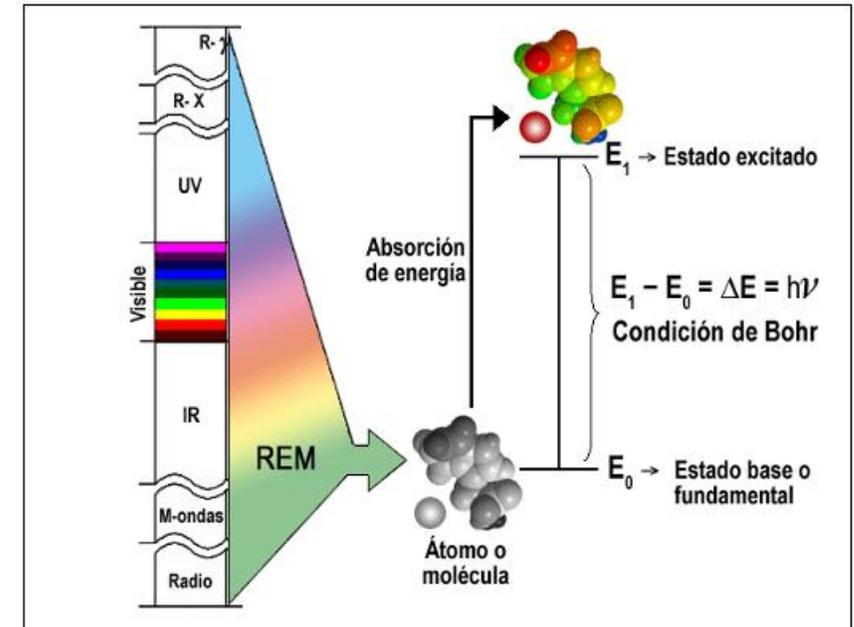
El mecanismo consiste en que un haz de REM atraviesa una muestra a determinadas longitudes de onda donde una parte de la radiación la atraviesa (**TRANSMITANCIA**) y otra parte es absorbida (**ABSORBANCIA**).

Cuando la radiación pasa a través de la muestra, ciertos fotones son absorbidos por las moléculas presentes a una determinada longitud de onda, lo que provoca una excitación de los electrones a niveles de energía más altos.

Las diferencias de energía entre los diferentes **niveles energéticos** son **únicas para cada especie y dependen de su estructura**, ello significa que cada sustancia absorbe radiación de diferente energía y longitud de onda.

Este fenómeno permite identificar y cuantificar componentes en una muestra, así como obtener información sobre su estructura molecular

Miden la radiación **absorbida** por átomos, moléculas o iones (muestra).



Éstas técnicas muestran espectros que se forman debido a las transiciones entre distintos niveles energéticos .

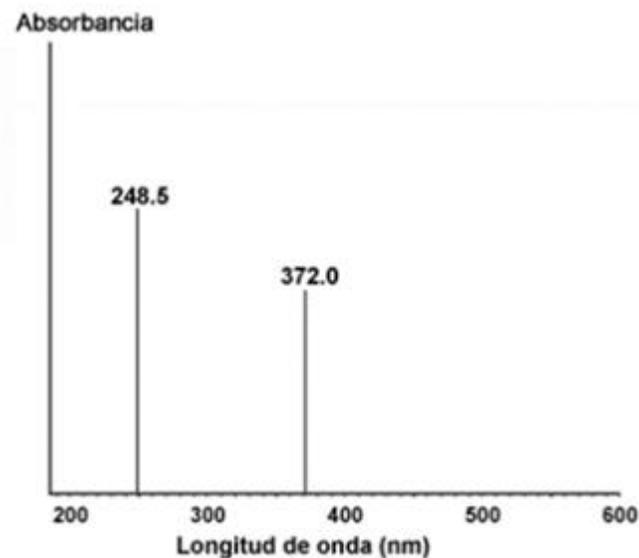
Espectros de absorción

Un espectro de absorción es una representación gráfica de la absorbancia de un analito en función de la longitud de onda de la radiación λ

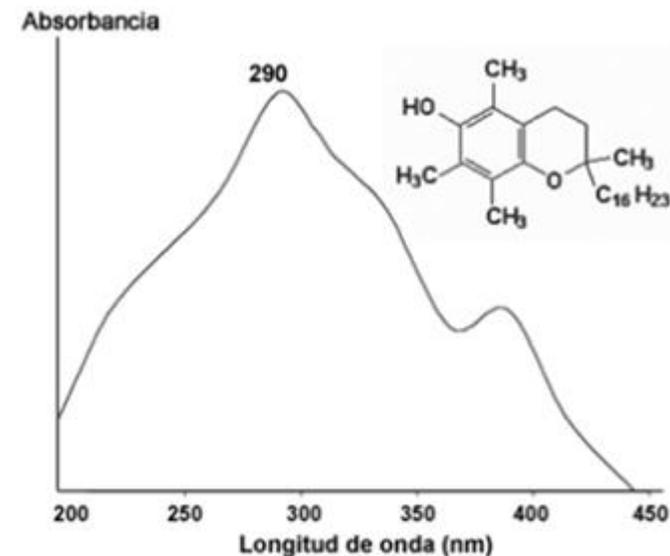
Un espectro de absorción se obtiene al someter una muestra a un barrido de radiación electromagnética de diferentes longitudes de onda.

La manera de representar un espectro de absorción es mediante un gráfico en cuya abscisa (eje X) se representa una magnitud de la radiación (frecuencia, **longitud de onda**, número de onda) y en la ordenada (eje y) se describe la intensidad de la absorción por la sustancia (**Absorbancia**, % de transmitancia)..

el **espectro de absorción atómica** se presenta en forma de líneas, correspondientes a unas pocas frecuencias.



B. Espectro de absorción atómica del hierro



Espectro de absorción molecular de la vitamina E

Espectro de **absorción molecular** se caracteriza por presentarse en forma de bandas cubriendo una amplia gama de longitudes de ondas,

LEY DE ABSORCIÓN DE LA RADIACIÓN

La transmitancia es la relación entre la potencia de la radiación de la fuente que sale de la muestra (P) y la que incide sobre ella (P_0).

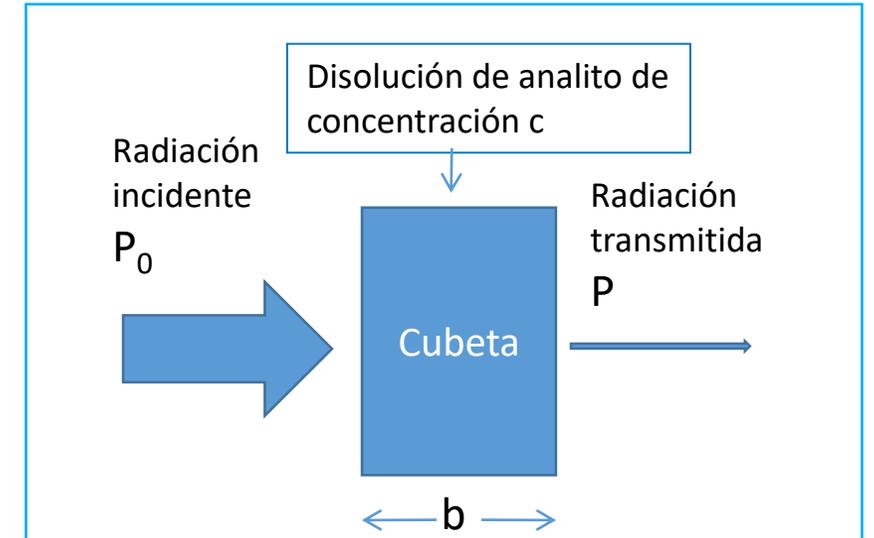
$$\text{Transmitancia} = T = P/P_0$$

T puede valer desde 0 hasta 1.

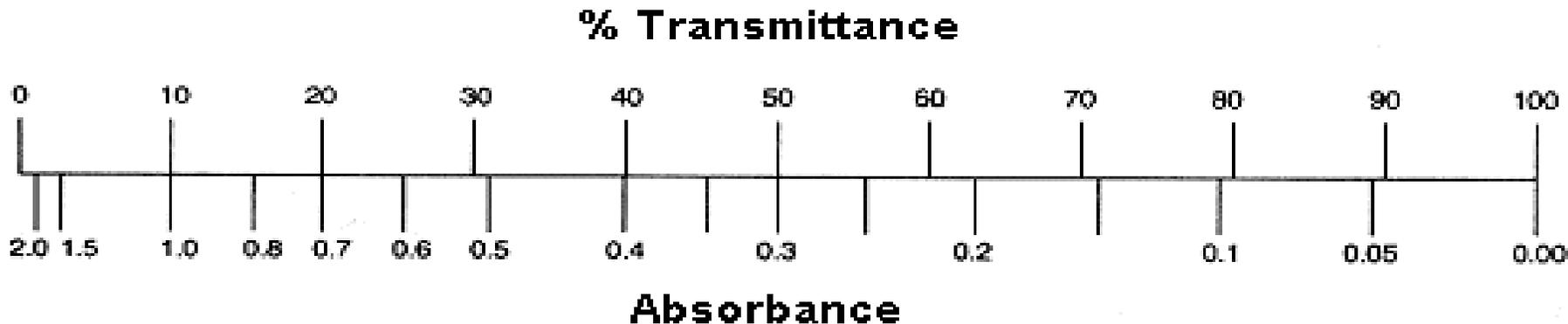
$\%T = (P/P_0) \times 100$ puede valer desde 0 hasta 100 %

Absorbancia es una magnitud física adimensional relacionada con la potencia de haz absorbido

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



Cuando no hay absorción de radiación $P_0 = P$ y entonces $A = 0$, mientras que si se absorbe el 99% de la radiación, solo se transmite el 1%, la $A = 2$

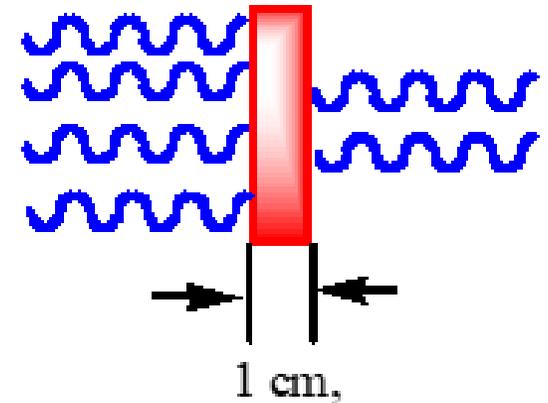


Se deduce que cuanto mayor es la A menor será la T

2 leyes
fundamentales

Ley de Bouguer-Lambert:
relación entre absorción de
la radiación y espesor del
medio absorbente

Ley de Beer: relación entre
la concentración de la
especie absorbente y la
radiación absorbida



Ley de Lambert-Beer: muestra cómo la absorbancia **es directamente proporcional** a la **longitud b** de la trayectoria a través de la solución **y** a la **concentración c** del analito o especie absorbente.

$$A = \epsilon \times b \times c$$

Ley de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon * b * c$$

c: concentración

b: longitud del camino optico

(ε): **a** **absortividad** **o** constante de proporcionalidad

$$A = a * b * c$$

Si la concentración c viene expresada en mol/L (M), la cte de proporcionalidad se denomina **coeficiente de extinción molar ó absortividad molar** y se representa por ε (unidades L/cm·mol). **La absortividad molar, ε , es característica de cada especie a una λ determinada**

Si la concentración c viene expresada g/L, ppm %....., la cte de proporcionalidad se conoce como **absortividad específica a** : (unidades L/cm·g, si c =g/L)

$$\text{Absorbancia} = A = -\log T$$

$$T = 10^{-A}$$

$$T = 10^{-\varepsilon bc}$$

Aplicación de la ley de Beer a mezclas

- La ley de Beer se aplica a soluciones que contiene más de una clase de sustancia absorbente.
- Siempre que no haya interacción entre las especies

Donde 1, 2, ..., y n son los componentes absorbentes.

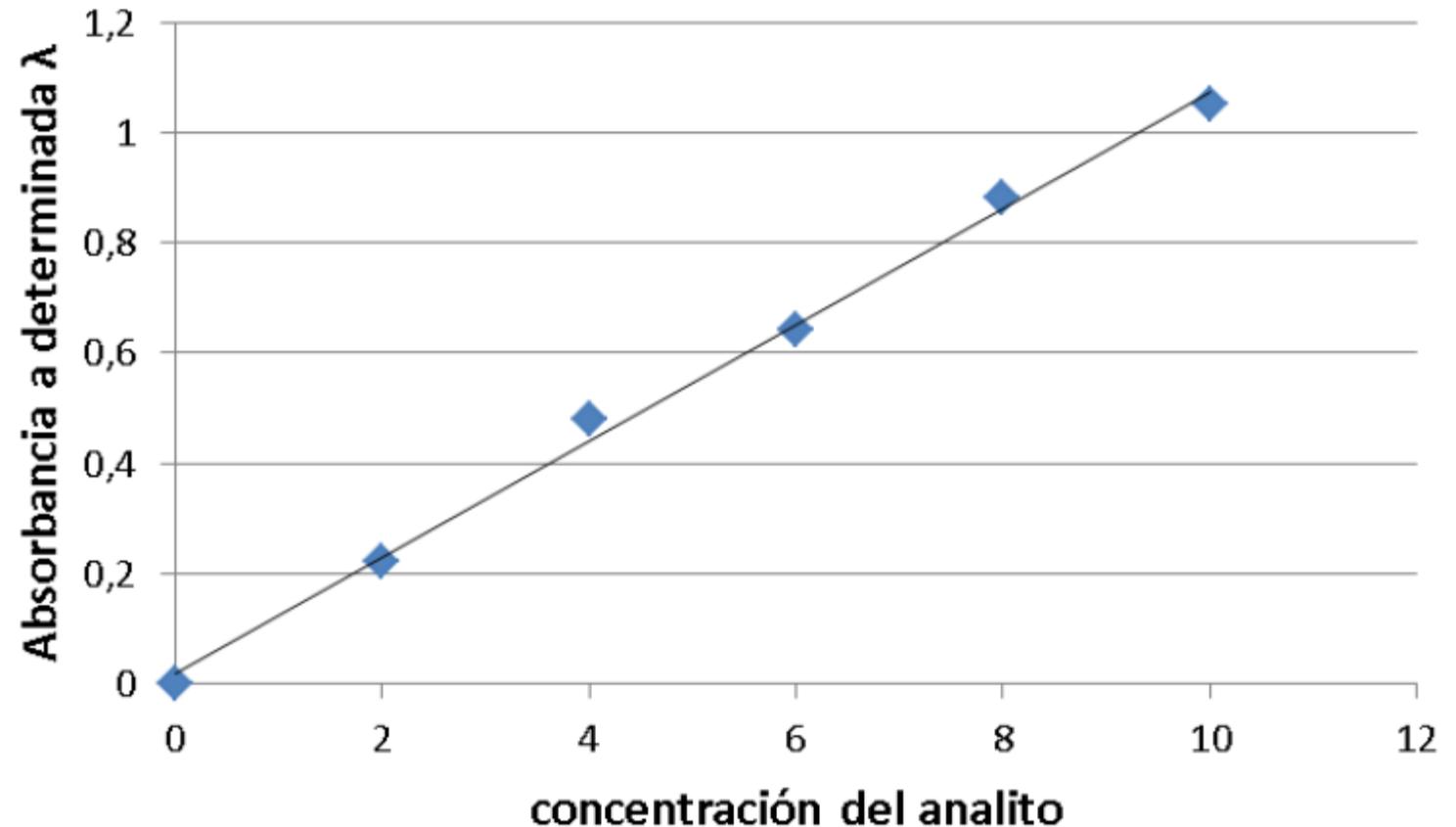
$$A_{total} = A_1 + A_2 + \dots A_n$$

$$A_{total} = \varepsilon_1 b c_1 + \varepsilon_2 b c_2 + \dots \varepsilon_n b c_n$$

La **ley de Lambert Beer** es una ley límite, es decir que sólo se cumple en determinadas condiciones: **luz monocromática y soluciones diluidas.**

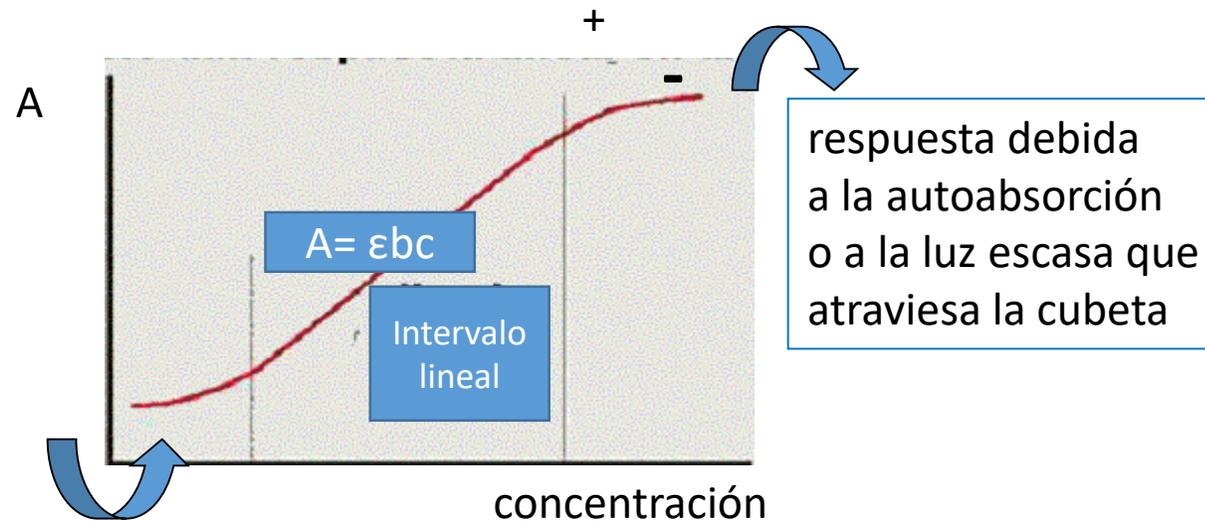
Representación gráfica de la Ley de Lambert y Beer

- La representación gráfica de la ley de Lambert y Beer **es una recta.**
- En el eje Y se representan los valores de A
- en el eje X se representan las concentraciones del analito.
- La pendiente de la recta corresponde al producto $\epsilon \times b$.



Desviaciones de la Ley de Beer

La proporcionalidad directa entre absorbancia y concentración cuando **b** es constante, sólo se cumple en un intervalo de concentraciones del analito (Para $c < 0,01 \text{ M}$) Fuera de dicho intervalo se observan en las curvas de calibrado desviaciones positivas o negativas de la linealidad debido a las limitaciones de la Ley de Beer:



respuesta del blanco,
interferencias o escasa
sensibilidad

respuesta debida
a la autoabsorción
o a la luz escasa que
atraviesa la cubeta

Para la aplicación cuantitativa, las medidas de A de la muestra deben estar incluidas en el intervalo lineal

Limitaciones de la ley de Beer

- Las desviaciones se producen cuando:
 1. La concentración de la solución a medir es muy alta (en general mayor a 0,010 M)
 2. La luz incidente no es monocromática
 3. La cantidad de luz absorbida por el solvente es elevada
 4. Hay luz transmitida que no es generada a partir de la sustancia a cuantificar
 5. Los lados de la celda donde se deposita la muestra no son paralelos
 6. Mezcla de varias especies químicas que absorben luz de la misma longitud de onda: las especies “compiten” entre sí por la luz, cada una con diferente absorptividad.

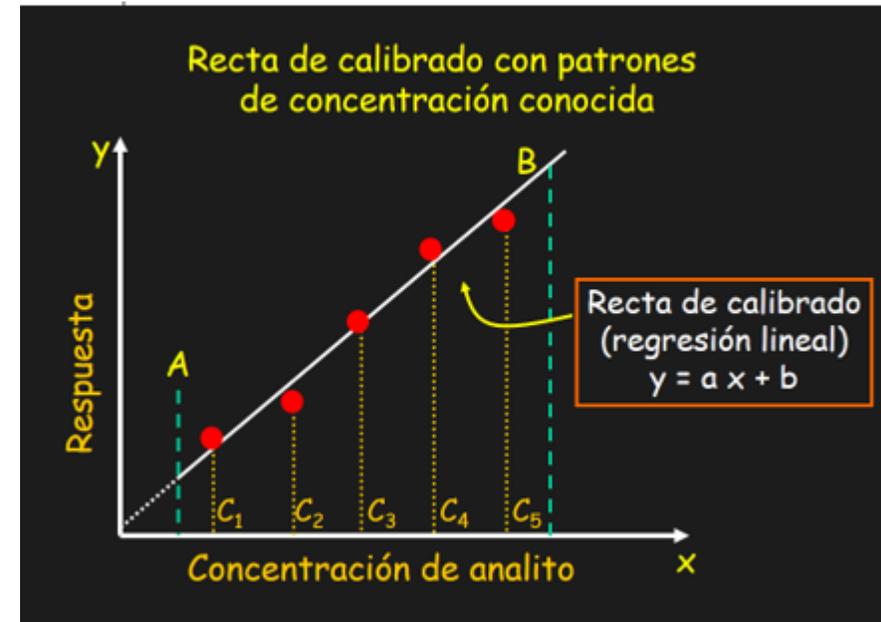
Calibración con patrones de concentración conocida

1. Curva de calibración.- Se miden las absorbancias de patrones para obtener la ecuación de la recta de calibrado generalmente aplicando el método de mínimos cuadrados:

$$A = mc + b$$

• Los estándares o patrones de calibración se deben aproximar tanto como sea posible a la composición final de las muestras reales y deben abarcar un intervalo razonable de concentraciones del analito.

2. Se mide la absorbancia de la muestra y la concentración de la muestra se calcula a partir de la ecuación de la recta de calibrado sustituyendo su valor de A y despejando la c correspondiente

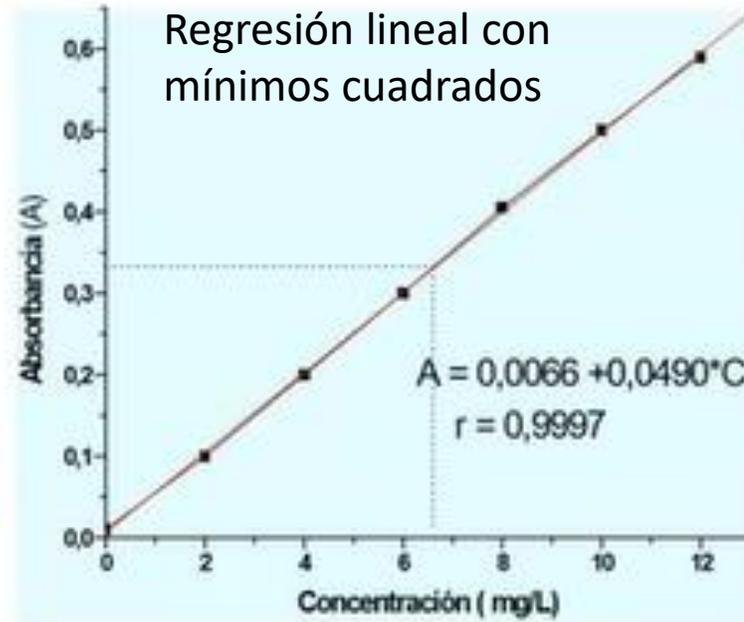


Ejemplo

Curva de calibración

Concentración mg/L	Absorbancia
0	0,010
2	0,100
4	0,200
6	0,300
8	0,405
10	0,500
12	0,590
muestra	0,340

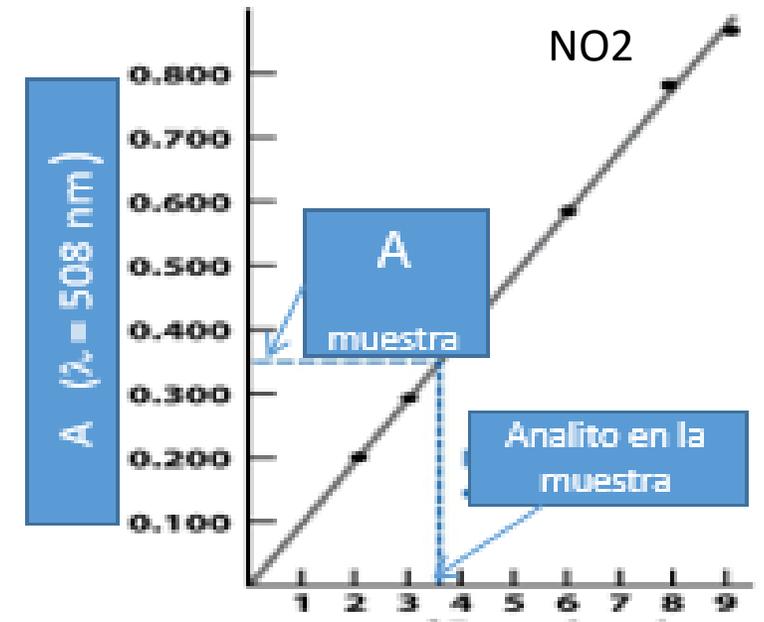
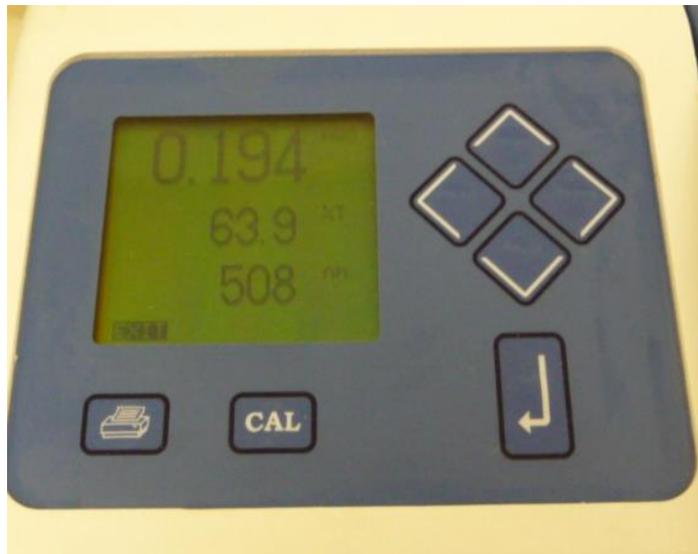
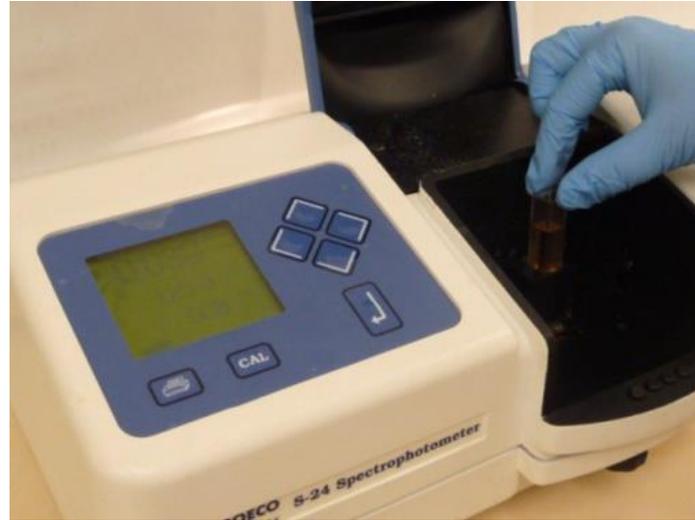
Cx = 6,80 mg/L



- **ESTÁNDARES:** Soluciones que contienen concentraciones conocidas del analito
- **BLANCO:** Solución con la misma composición que el estándar, *excepto* el analito
- **MUESTRA:** Solución de la sustancia problema con el analito a cuantificar

R es un control estadístico de la curva de calibración, debe ser lo más cercano a 1 posible.

Calibración con patrones de concentración conocida



Métodos de comparación con un estándar

- 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:

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

$$\begin{aligned}A_M &= \epsilon_M b_M c_M \\A_E &= \epsilon_E b_E c_E\end{aligned}$$

- 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, $\epsilon_M = \epsilon_E$

$$\frac{A_M}{A_E} = \frac{\epsilon_M b_M c_M}{\epsilon_E b_E c_E}$$

$$A_M/A_E = C_M/C_E$$

$$C_M = A_M * C_E / A_E$$

- Este método es rápido y sus resultados son confiables.

Método de las adiciones estándar

Cuando se analizan muestras complejas, como alimentos ó cenizas vegetales, suele ser imposible o muy difícil preparar estándares que se asemejen a las muestras.

En este caso, *el método de las adiciones estándar es útil para contrarrestar los efectos de matriz.*

Ventaja . Permite tener resultados mas confiables

Desventaja resulta tedioso porque cada curva se realiza para cada tipo de muestra

Método de las adiciones estándar:

- a) El método de un solo punto
- b) El método de las adiciones múltiples

Método de las adiciones estándar. El método de un solo punto

- Se toman dos porciones de la muestra
- Una porción se mide como de costumbre
- A la segunda porción se le agrega una cantidad conocida de la disolución estándar de analito
- Ambas respuestas se utilizan entonces para calcular la concentración desconocida, suponiendo una relación lineal entre la respuesta y la concentración del analito



$$A_1 = abCx \qquad A_2 = ab \left(\frac{VxCx + VstCst}{Vx + Vst} \right)$$

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{abCx(Vx + Vst)}{ab(VxCx + VstCst)}$$

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{CxVx + CxVst}{VxCx + VstCst}$$

$$A_2CxVx + A_2CxVst = A_1VxCx + A_1VstCst$$

$$A_2CxVx + A_2CxVst - A_1VxCx = A_1VstCst$$

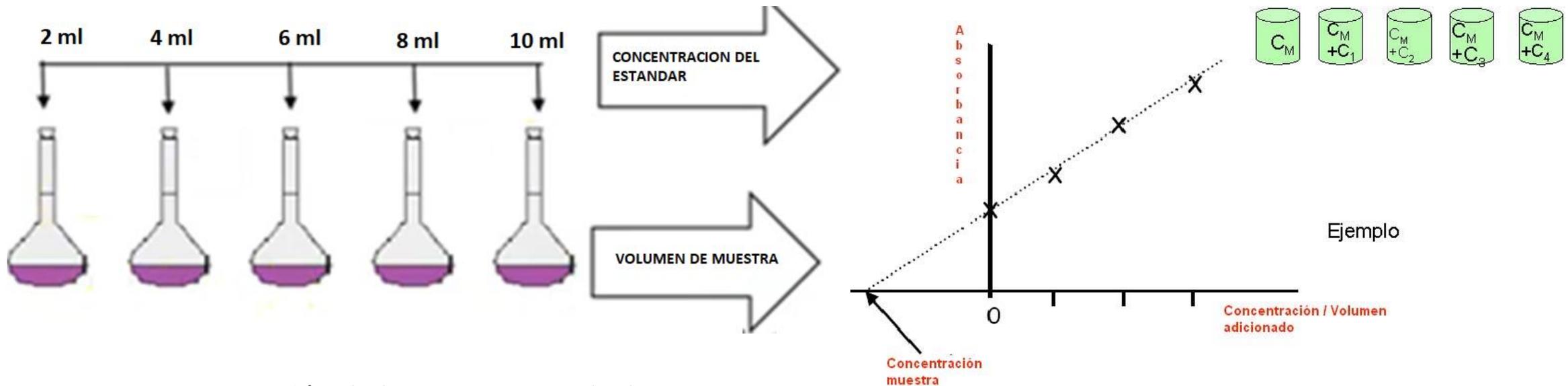
factorizando $Cx[(A_2 - A_1)Vx + A_2Vst] = A_1VstCst$

$$Cx = \frac{A_1VstCst}{(A_2 - A_1)Vx + A_2Vst}$$

$$c_x = A_1 v_s c_s / A_2 v_t - A_1 v_x$$

Método de las adiciones estándar. El método de las adiciones múltiples

- Varias alícuotas idénticas V_x de la solución desconocida con concentración C_x se transfieren a matraces volumétricos de volumen V_t .
- A cada uno de esos matraces se le añade un volumen variable V_s de una disolución patrón del analito, con concentración conocida C_s .
- Después, se añaden los reactivos que originan el color y se diluye cada solución hasta un volumen V_t .



- La concentración de la muestra se calcula por

$$C_x = (C_s / V_x) (b/m)$$

Método de las adiciones estándar

DEDUCCION

- Si el sistema químico sigue la ley de Beer,

$$A_i = (\epsilon b V_s C_s / V_t) + (\epsilon b V_x C_x / V_t) = K V_s C_s + K V_x C_x$$

K es una constante = $\epsilon b / V_t$

- Una gráfica de A_i en función de V_s debe originar una recta de la forma : $A_i = m V_s + b$

Donde la pendiente m y la ordenada en el origen b vienen dadas por

$$m = K C_s \quad \text{y} \quad b = K V_x C_x$$

- El análisis de mínimos cuadrados de los datos se puede utilizar para determinar m y b ; después, es posible calcular C_x a partir del cociente de esas dos cantidades y los valores conocidos de V_x y C_s

$$C_x = (C_s / V_x) (b/m)$$