

Guía de Cuantificación

Espectrofotométrica mediante Curva de Calibración

Introducción: La Espectrofotometría y la Ley de Lambert-Beer

La espectrofotometría UV-Vis es una técnica analítica que mide cuánta luz absorbe una sustancia química. La cantidad de luz absorbida (Absorbancia, A) a una longitud de onda específica es directamente proporcional a la concentración (c) del analito en la muestra.

Esta relación se describe mediante la **Ley de Lambert-Beer**:

$A = \epsilon \cdot b \cdot c$

- A**: Absorbancia (sin unidades)
- ε**: Coeficiente de extinción molar o absortividad molar (unidades dependen de 'c', típicamente M⁻¹·cm⁻¹) - es una medida de cuánto absorbe el analito a esa λ.
- b**: Paso óptico de la cubeta (distancia que recorre la luz, usualmente 1 cm)
- c**: Concentración del analito

Para determinar la concentración de una muestra desconocida, a menudo se construye una **Curva de Calibración (o Curva Estándar)**.

¿Qué es una Curva de Calibración?

Es un gráfico que se obtiene midiendo la absorbancia de varias muestras de concentración conocida (estándares). Al graficar Absorbancia (eje Y) vs. Concentración (eje X), se obtiene una relación (idealmente lineal) que permite determinar la concentración de muestras desconocidas midiendo su absorbancia e interpolando en la curva o usando su ecuación.

Proceso General para usar una Curva de Calibración

- Preparar una serie de soluciones estándar con concentraciones conocidas y crecientes del analito.
- Medir la absorbancia de cada estándar a la longitud de onda apropiada (λmax). Incluir un "blanco" (concentración cero).
- Graficar Absorbancia (Y) vs. Concentración (X).
- Realizar una **regresión lineal** sobre los puntos para obtener la ecuación de la recta que mejor se ajusta: $A = m \cdot C + b$.

- m** es la pendiente.
- b** es la ordenada en el origen (intercepto).
- Calcular el coeficiente de determinación **R²**, que indica qué tan bien se ajustan los datos a la recta (un valor cercano a 1 es ideal).

- Medir la absorbancia (A_{muestra}) de la muestra problema (concentración desconocida).
- Usar la ecuación de la recta para calcular la concentración desconocida

(C_{muestra}), despejando C: $C_{muestra} = (A_{muestra} - b) / m$

Relación entre la Pendiente (m) y ε:

Comparando $A = m \cdot C + b$ con la Ley de Lambert-Beer

$A = \epsilon \cdot b \cdot c$:

Si el paso óptico (b) es 1 cm y el intercepto (b) es cercano a cero, entonces la pendiente **m** de la curva de calibración es una medida directa de la absortividad molar (ε) en las unidades de concentración usadas en la curva.

Intercepto (b): Teóricamente, si el blanco (concentración cero) se usa correctamente para calibrar el espectrofotómetro a A=0, el intercepto 'b' debería ser cero. En la práctica, puede haber un pequeño valor debido a errores experimentales. Si es significativamente diferente de cero, debe incluirse en los cálculos.

Ejemplo 1: p-Nitrofenol (p-NF) a 405 nm

→ Datos de Calibración:

Se prepararon diluciones de p-NF y se midió su absorbancia a 405 nm (paso óptico b = 1 cm):

Concentración (µM)	Absorbancia (A)
50	0.900
25	0.450
12.5	0.225
6.25	0.113
3.125	0.056
0 (Blanco)	0.000

Al graficar A vs C y realizar una regresión lineal (por ejemplo, en Excel o software similar), se obtiene la ecuación de la recta:

$$A = 0.018 \cdot C + 0$$

(Nota: En este caso, el ajuste pasa por el origen o el intercepto es despreciable). El coeficiente de determinación fue **R² = 0.999**, indicando un excelente ajuste lineal.

→ La pendiente **m = 0.018**. Como b=1 cm, esto corresponde a **ε = 0.018 µM⁻¹·cm⁻¹**.

→ Ejercicio: Calcular Concentración de Muestras Desconocidas

Se miden dos muestras problema:

Muestra	Absorbancia (A _{muestra})
Muestra 1	0.324
Muestra 2	0.486

Usamos la ecuación $C = (A - b) / m$. Aquí b=0 y m=0.018 µM⁻¹.

- Muestra 1:** C = (0.324 - 0) / 0.018 = **18 µM**
- Muestra 2:** C = (0.486 - 0) / 0.018 = **27 µM**

Ejemplo 2: D-Glucosa con reactivo DNS a 570 nm

El método del DNS (Ácido 3,5-Dinitrosalicílico) reacciona con azúcares reductores (como la glucosa) en caliente y en medio alcalino, generando un producto coloreado (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico) cuya absorbancia a 570 nm es proporcional a la concentración de azúcar.

→ Datos de Calibración:

Se prepararon estándares de glucosa y se midió la absorbancia tras la reacción con DNS (b = 1 cm).

[Glucosa] (mM)	Absorbancia (A)
10	1.200
5	0.600
2.5	0.300
1.25	0.150
0.625	0.075
0 (Blanco)	0.000

La regresión lineal da la ecuación:

$$A = 0.12 \cdot C + 0$$

(De nuevo, el intercepto 'b' es cero o despreciable). El ajuste es muy bueno: **R² = 1.000** (perfecto ajuste en estos datos idealizados).

→ La pendiente **m = 0.12**. Con b=1 cm, el coeficiente efectivo es **ε = 0.12 mM⁻¹·cm⁻¹**.

→ Ejercicio: Calcular Concentración de Muestras Problema

Muestras desconocidas:

Muestra	Absorbancia (A _{muestra})
Muestra A	0.840
Muestra B	0.360

Usando $C = (A - b) / m$ con b=0 y m=0.12 mM⁻¹:

- Muestra A:** C = (0.840 - 0) / 0.12 = **7.00 mM**
- Muestra B:** C = (0.360 - 0) / 0.12 = **3.00 mM**

Ejemplo 3: Permanganato de Potasio (KMnO4) a 540 nm

Este ejemplo sigue la estructura vista en el vídeo de referencia, donde se utiliza una regresión lineal completa y se maneja un posible intercepto no nulo.

→ Datos de Calibración (Ejemplo tipo vídeo):

Se prepararon estándares de KMnO₄ y se midió su absorbancia a 540 nm (b = 1 cm).

Concentración KMnO ₄ (Molar, M)	Absorbancia (A)
0.0300	0.162
0.0600	0.330
0.0900	0.499
0.120	0.670
0.150	0.840

Al realizar la regresión lineal sobre estos puntos (usando una calculadora, Excel, Desmos, etc.), se obtiene una ecuación aproximada (similar a la del vídeo):

$$A \approx 5.653 \cdot C - 0.0086$$

El coeficiente de determinación **R²** podría ser muy cercano a 1 (ej. 0.999+), indicando un buen ajuste lineal.

→ Pendiente **m ≈ 5.653 M⁻¹·cm⁻¹** (esto sería ε si b=1 cm).

→ Intercepto **b ≈ -0.0086**. Aunque teóricamente debería ser 0, este pequeño valor negativo puede surgir del ajuste de datos reales. Es importante usarlo en el cálculo.

→ Ejercicio: Calcular Concentración de Muestra Desconocida (Como en el vídeo)

Una muestra de KMnO₄ tiene una absorbancia **A_{muestra} = 0.539**.

Usamos la ecuación completa y despejamos C: $C = (A - b) / m$

Sustituimos los valores:

$$C = (0.539 - (-0.0086)) / 5.653$$
$$C = (0.539 + 0.0086) / 5.653 \quad C = 0.5476 / 5.653$$

Calculando:

C ≈ 0.09686 M

Considerando las cifras significativas (la absorbancia tiene 3), redondeamos a 3:

→ Concentración de la muestra ≈ **0.0969 M**

Importancia del Intercepto: En este caso, ignorar el pequeño intercepto (-0.0086) daría C = 0.539 / 5.653 ≈ 0.0954 M, un resultado ligeramente diferente. Incluir el intercepto obtenido de la regresión mejora la precisión del cálculo basado en los datos experimentales.

Conclusión

Las curvas de calibración son herramientas fundamentales en química analítica. Permiten cuantificar sustancias midiendo una propiedad física (como la absorbancia) y relacionándola con la concentración a través de un modelo matemático (usualmente lineal) obtenido a partir de estándares conocidos. La correcta preparación de estándares, medición y análisis de datos (regresión lineal) son cruciales para obtener resultados precisos.