

# CAPÍTULO 2

## Métodos basados en la interacción del analito con la luz

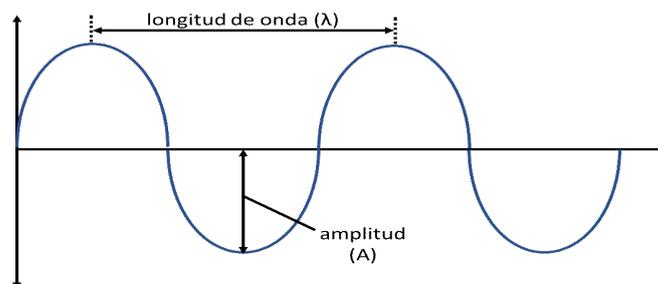
*Agustina Buet, Nadia S. Rolny y Paula I. Villabrille*

En este capítulo, se consideran tres tipos de interacción entre el analito y la luz: absorción, emisión y dispersión. Se describen los fundamentos de los métodos basados en dichas interacciones para determinar la concentración del analito presente en una muestra (análisis químico cuantitativo) y se presentan ejemplos de aplicación en cada caso.

### Conceptos generales sobre la interacción del analito con la luz

#### ¿Qué es la luz?

La **luz** es definida por la Física Clásica como una **radiación electromagnética** y se describe como una onda transversal a la dirección de propagación. Cada onda se caracteriza por un conjunto de parámetros que la definen: longitud de onda, número de onda, amplitud de onda y frecuencia de onda. La longitud de onda ( $\lambda$ ) corresponde a la distancia que existe entre dos máximos o dos mínimos de la onda y se mide en unidades de longitud (cm,  $\mu\text{m}$ , nm, etc.) (Figura 2.1). El número de onda ( $\bar{\nu}$ ) corresponde a la inversa de la longitud de onda y se mide en (unidades de longitud)<sup>-1</sup>, por ejemplo,  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\text{nm}^{-1}$ . La amplitud de onda ( $A$ ) se refiere a la distancia entre la línea de avance y el máximo de la onda y también se mide en unidades de longitud (Figura 2.1). En tanto que la frecuencia de onda ( $\nu$ ) representa el número de veces que pasa la onda completa por un punto fijo por unidad de tiempo, se mide en hercios ( $1 \text{ Hz} = 1/\text{s} = \text{s}^{-1}$ ).



**Figura 2.1.** Representación bidimensional de una onda electromagnética. El eje vertical (eje y) puede ser el campo eléctrico o magnético y el eje horizontal (eje x) puede ser el tiempo o la distancia.

Los parámetros que caracterizan a una radiación electromagnética están relacionados entre sí de la siguiente manera:

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

donde  $\nu$  se refiere a la frecuencia,  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío, una constante cuyo valor es  $3 \times 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  o  $3 \times 10^{10} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ . La unidad de medida para la longitud de onda ( $\lambda$ ) comúnmente utilizada en los métodos aquí presentados es nanómetros ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ).

A partir de la Física Cuántica, se agregó el concepto de **dualidad onda-partícula** y se comenzó a interpretar a la luz como una **onda de fotones** que se propagan. Dichos fotones representan paquetes discretos de energía denominados cuantos. Con este nuevo concepto, se interpreta a la luz como una onda que propaga energía. La energía de la onda (radiación electromagnética) queda definida como:

$$E = h \cdot \nu$$

donde  $h$  corresponde a la constante de Planck, siendo su valor de  $6,63 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ . Considerando que  $\nu = \frac{c}{\lambda}$ , se puede reemplazar en la expresión de energía:

$$E = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

A partir de ambas expresiones, se puede relacionar claramente que cuanto mayor es la frecuencia de la radiación electromagnética mayor será su energía. En cambio, cuanto mayor es la longitud de onda de la radiación electromagnética menor será su energía.

## ¿Qué es el espectro electromagnético?

El **conjunto de radiaciones electromagnéticas** de diferentes longitudes de onda conforma el **espectro electromagnético** abarcando desde los rayos  $\gamma$  hasta las ondas de radio (Figura 2.2).

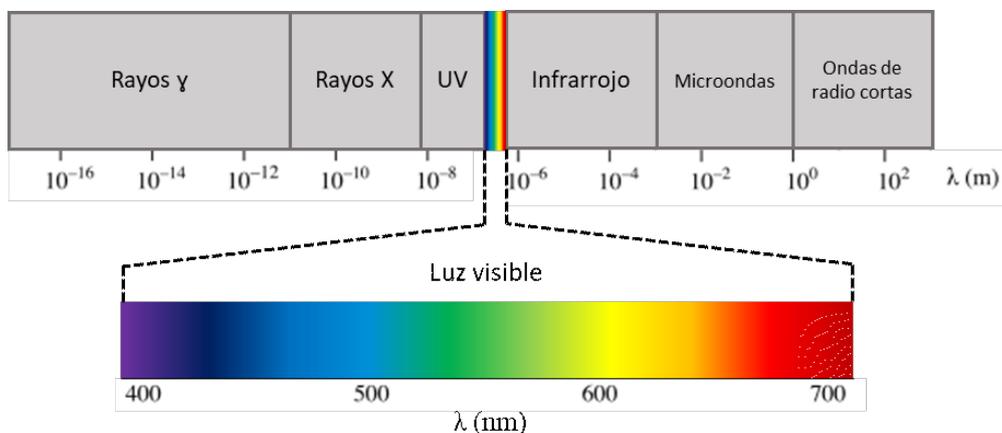


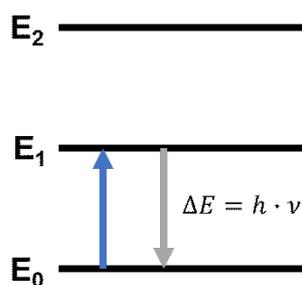
Figura 2.2. Representación esquemática del espectro electromagnético

Aquellas longitudes de onda que corresponden al rango entre 380-780 nm pertenecen a lo que se denomina **región visible del espectro** ya que las radiaciones electromagnéticas de estas longitudes de onda afectan la retina del ojo humano y provocan que observemos colores. La luz blanca contiene todos los colores del espectro visible y, por lo tanto, es un ejemplo de fuente de **luz policromática** (luz formada por varias longitudes de onda). En cambio, si la luz tiene un solo color, una única longitud de onda, se denomina **luz monocromática**.

A cada extremo de la región visible, se ubican la **región infrarroja** (con  $\lambda$  mayores a 780 nm) y la **región ultravioleta** (UV) (con  $\lambda$  menores a 380 nm). Como se ha mencionado, la energía de una radiación electromagnética es inversamente proporcional a su longitud de onda ( $E = h \cdot \frac{c}{\lambda}$ ), por lo tanto, los rayos visibles tienen menor energía que los rayos UV, pero mayor energía que los rayos infrarrojos.

## ¿Qué sucede cuando un átomo absorbe luz?

Dentro de un átomo, los electrones ocupan niveles discretos de energía (concepto que deriva de la Teoría Cuántica). Estos niveles se denominan con números enteros (1, 2, 3, etc.) y a medida que aumenta el nivel de energía, mayor es el número de orbitales presentes en cada nivel. Los electrones ocupan orbitales denominados con letras (s, p, d, etc.) y en cada orbital se ubican como máximo dos electrones apareados. Como ejemplo, el primer nivel sólo tiene 1 orbital (1s), en tanto que el segundo nivel posee 4 orbitales (2s, 2p<sub>x</sub>, 2p<sub>y</sub>, 2p<sub>z</sub>). De acuerdo con la posición de un átomo en la tabla periódica, se puede deducir la estructura electrónica del mismo. Por ejemplo, el átomo de sodio (Na), que tiene el número atómico 11, pertenece al período 3 y grupo 1. Esto quiere decir que tiene 11 electrones en total, los que ocupan hasta el tercer nivel de energía electrónica, que tiene 1 solo electrón en el último nivel: 1s<sup>2</sup>, 2s<sup>2</sup> y 2p<sup>6</sup>, 3s<sup>1</sup>. Teniendo en cuenta la estructura interna del átomo, cuando los electrones absorben una cantidad de energía adecuada pueden pasar de un nivel energético a otro de mayor energía (Figura 2.3). Este proceso se denomina **transición electrónica**, en el cual los electrones que están en su condición de menor energía posible (**estado fundamental**) pasan a un estado de mayor energía (**estado excitado**). La diferencia de energía entre los niveles son cantidades discretas de energía (determinados valores de  $h \cdot \nu$ ) que resulta característica para cada átomo.

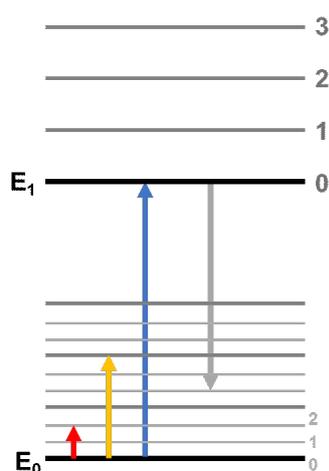


**Figura 2.3.** Representación esquemática de los niveles de energía en un átomo.

$E_0$ ,  $E_1$  y  $E_2$  representan los niveles electrónicos dentro del átomo. Para simplificar el esquema no se dibujaron los orbitales (*s*, *p*, etc.) dentro de cada nivel energético. La flecha azul representa un salto electrónico entre el nivel fundamental y el primer nivel excitado. La flecha gris indica el regreso al estado fundamental (proceso de relajación).

## ¿Qué sucede cuando una molécula absorbe luz?

Una molécula está formada por la unión entre átomos; estas uniones no son estáticas ya que permanentemente vibran y rotan. Por lo tanto, la **energía interna (E) de una molécula** comprende tres componentes: **E rotacional**, **E vibracional** y **E electrónica**. Esto se debe a que los electrones que establecen la unión entre átomos dentro de la molécula tendrán determinado nivel energético de vibración y de rotación, además de su nivel electrónico. En consecuencia, las moléculas pueden absorber radiación electromagnética y sufrir **transiciones rotacionales, vibracionales y electrónicas** según la energía absorbida, siendo menor la energía requerida para las transiciones rotacionales y mayor para las transiciones electrónicas (Figura 2.4). Por consiguiente, la energía de la radiación de microondas alcanza sólo para transiciones rotacionales, en tanto que la energía de la radiación infrarroja alcanza para las transiciones vibracionales y rotacionales, mientras que la energía de las radiaciones visibles y UV alcanza para producir transiciones electrónicas, vibracionales y rotacionales.



**Figura 2.4.** Representación esquemática de los niveles de energía en una molécula: electrónicos ( $E_0$ ,  $E_1$ ); vibracionales (0, 1, 2, 3) y rotacionales (0, 1, 2).

La excitación en la molécula puede ser rotacional (flecha roja), vibracional (flecha amarilla) o electrónica (flecha azul). Para simplificar el esquema, los niveles rotacionales (en color gris) se dibujaron sólo en el nivel electrónico  $E_0$ , pero este esquema se repite en todos los niveles energéticos.

## ¿Qué sucede con un átomo y una molécula excitados?

Tanto los átomos como las moléculas excitados son inestables y, rápidamente, buscarán la manera de regresar al nivel de menor energía, eliminando el exceso de energía a través de un **proceso de relajación**. Esto puede ocurrir por diversos fenómenos: liberación de calor y/o emisión de luz (Figura 2.3, flecha gris y Figura 2.4, flecha gris, para el caso del átomo y la molécula, respectivamente).

## Clasificación de los métodos basados en la interacción de los analitos con la luz

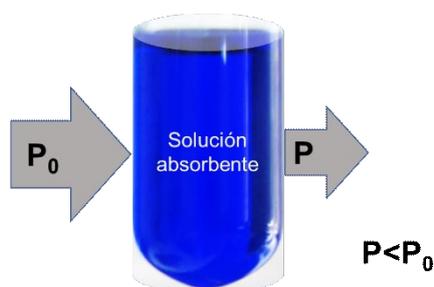
Según el tipo de interacción entre los analitos y la luz, los métodos de análisis químico cuantitativo que se tratarán en este capítulo se dividen en:

- Espectrofotometría de absorción molecular y atómica
- Espectrofotometría de emisión atómica
- Métodos no espectrofotométricos de dispersión

La espectrofotometría de absorción se basa en la medida de la luz absorbida para excitar el analito, en tanto que la espectrofotometría de emisión mide la luz emitida por el analito previamente excitado. En ambos métodos, el analito debe estar formando parte de una solución antes de ser introducido en el equipo de medición. Por otra parte, los métodos no espectrofotométricos se basan en la medición de la dispersión de la luz por parte del analito para lo cual será necesario que el analito se encuentre conformando partículas en suspensión.

## Espectrofotometría de absorción

Si se imagina un haz de **luz monocromática** atravesando una solución que contiene una **especie absorbente**, la potencia del haz de luz emergente ( $P$ ) disminuye respecto del haz incidente ( $P_0$ ) como consecuencia de la **absorción de energía** por parte de las especies absorbentes presentes en la solución (Figura 2.5).



**Figura 2.5.** Dibujo que representa un haz de luz monocromática que incide sobre una solución absorbente.  $P_0$ : potencia del haz incidente y  $P$ : potencia del haz emergente. La potencia del haz emergente será menor que la potencia del haz incidente debido al fenómeno de absorción que ocurre en la solución.

A partir de la absorción de luz por parte de la especie absorbente, hay dos conceptos relacionados entre sí: **transmitancia (T)** y **absorbancia (A)**. Se define como transmitancia a la fracción de luz que deja pasar dicha solución, por lo tanto, puede valer entre 0 y 1:

$$\text{Transmitancia} \quad T = \frac{P}{P_0}$$

La transmitancia porcentual (T%) corresponde a  $100 \cdot T$  y puede tomar valores entre 0 y 100 %. La absorbancia se define a partir de la transmitancia como:

$$\text{Absorbancia} \quad A = -\log\left(\frac{P}{P_0}\right) = -\log T$$

De las expresiones matemáticas presentadas, se puede deducir que **cuanto mayor es la A, menor será la T**, es decir que, si una solución absorbe mucho, transmitirá poco. Se puede observar además que, de acuerdo con la definición de T y A, ambas propiedades son adimensionales, ya que se definen a partir de un cociente de la misma magnitud ( $P/P_0$ ). En la espectrofotometría de absorción, se mide la absorbancia (A), ya que es directamente proporcional a la concentración de la especie que absorbe luz en la muestra.

## Espectrofotometría de absorción molecular UV-visible

La espectrofotometría de absorción molecular en la región UV y visible tiene una amplia aplicación para el análisis cuantitativo de moléculas orgánicas, inorgánicas y bioquímicas.

### Fundamento del método

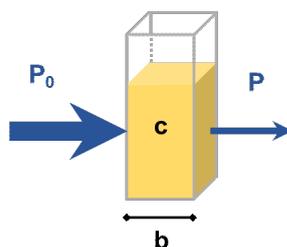
Para medir la concentración de un analito por este método es necesario que el analito (o un producto de reacción del analito) tenga la propiedad de **absorber luz en la región del UV-visible** del espectro electromagnético. Tal como se describió previamente, cuando dicho haz de luz incide sobre la **solución del analito**, éste absorbe energía, la que utiliza para pasar de su estado fundamental de energía a un **estado excitado**, produciéndose transiciones rotacionales, vibracionales y electrónicas en la molécula de interés.

### ¿Cómo se relaciona la medida de absorbancia con la concentración?

#### Ley de Lambert-Beer

Cuando un haz de luz monocromática atraviesa una solución, la absorbancia es directamente proporcional a la distancia recorrida por la luz atravesando la solución absorbente y a la

concentración de la especie absorbente en la solución. La distancia recorrida por la luz atravesando la solución se denomina camino óptico y se mide generalmente en cm (Figura 2.6).



**Figura 2.6.** Esquema que representa el fenómeno que describe la ley de Lambert-Beer.  $P_0$  es la potencia del haz de luz monocromática incidente;  $P$  es la potencia del haz emergente;  $c$  es la concentración, y  $b$  es el camino óptico.

La representación matemática de la **Ley de Lambert-Beer** es:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

donde:

$A$ : absorbancia, magnitud adimensional

$\varepsilon$ : absorptividad molar, constante que se define como la unidad de absorbancia por unidad de concentración y por unidad de longitud de la trayectoria de luz; depende de la naturaleza de la solución y de la longitud de onda de la luz incidente. En general, su unidad es la inversa de la molaridad por la inversa de cm, es decir  $(M \cdot cm)^{-1}$  ó  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

$b$ : camino óptico, en general se mide en cm

$c$ : concentración de la especie absorbente expresada en molaridad (M)

Dado que la absorbancia y la absorptividad molar dependen de la longitud de onda de la luz incidente, muchas veces se expresa la ecuación de Lambert-Beer como una función de la longitud de onda:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot b \cdot c$$

Con cierta frecuencia, se utiliza como constante de proporcionalidad la absorptividad ( $a$ ) en lugar de la absorptividad molar en la Ley de Lambert-Beer:

$$A = a \cdot b \cdot c$$

Las unidades de  $a$  son  $(L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1})$  y, por lo tanto, en este caso, la concentración del analito se debe expresar en  $g \cdot L^{-1}$ .

La Ley de Lambert-Beer es una **ley límite**, sólo se cumple **en condiciones de luz monocromática y soluciones diluidas**.

### Representación gráfica de la Ley de Lambert-Beer

La Figura 2.7 representa la absorbancia medida a una determinada longitud de onda en función de la concentración de un analito. Se puede observar que la representación gráfica de la Ley de Lambert-Beer es una recta. En el eje de las ordenadas (eje Y) se representan los valores de A y en el eje de las abscisas (eje X) se representan las concentraciones del analito. La pendiente de la recta corresponde al producto  $\varepsilon \cdot b$ .

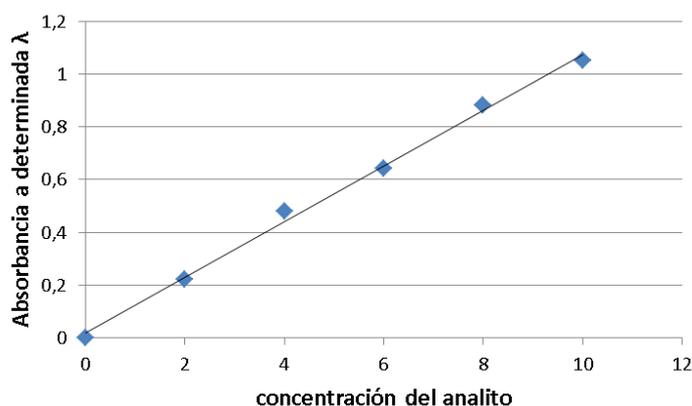


Figura 2.7. Ejemplo de representación gráfica de la relación entre absorbancia y concentración (Ley de Lambert-Beer)

### ¿Por qué se pierde la linealidad entre A y c? Desviaciones de la Ley de Lambert-Beer

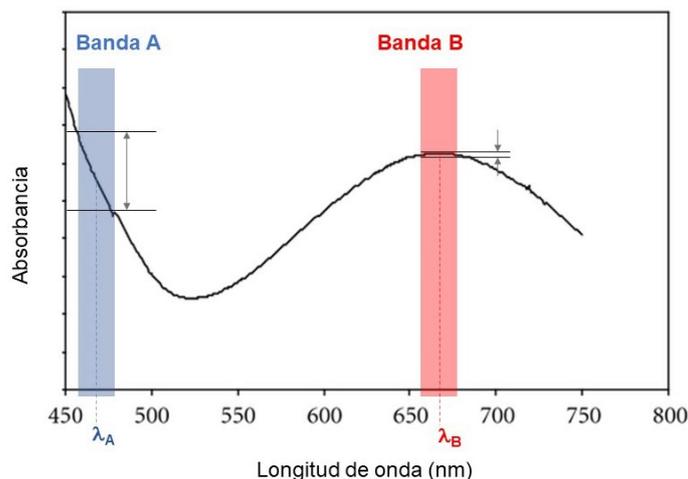
- Si la solución del analito es concentrada (en general, mayor a  $1 \times 10^{-2}$  M) se pierde la relación lineal entre la A y la c; las moléculas muy próximas entre sí comienzan a interferir entre ellas en el proceso de absorción de energía. Se suele decir que la recta se “plancha” a altas concentraciones.

- Desviaciones químicas: se pierde la relación lineal entre A y c cuando existen interferencias en la solución, tales como asociación o disociación del analito en solución, reacciones del analito con el solvente y presencia de otros componentes en la muestra que también absorben luz incidente.

- Desviaciones instrumentales: la Ley de Lambert-Beer se aplica usando luz monocromática. Sin embargo, en la práctica, el espectrofotómetro utiliza una fuente policromática de luz y, mediante un sistema óptico adecuado (una red de difracción o un filtro), se selecciona un segmento de longitudes de onda centrado en aquella que se desea utilizar; a este segmento se lo denomina banda. Por este motivo, es muy importante elegir adecuadamente la longitud de onda de trabajo.

### ¿Cómo se elige la longitud de onda de trabajo?

Para ello se utiliza el **espectro de absorción**, que es un gráfico característico para cada especie absorbente en el que se representan las absorbancias en función de la longitud de onda de la luz incidente (Figura 2.8).



**Figura 2.8.** Representación de un espectro de absorción de un analito. A es la banda de longitudes de onda centrada en  $\lambda_A$  y B es la banda de longitudes de onda centrada en  $\lambda_B$ .

Si se analiza la banda centrada en la longitud de onda  $\lambda_B$ , se concluye que no hay gran variación en la lectura de absorbancia a lo largo de esa banda. Por el contrario, la banda centrada en la longitud de onda  $\lambda_A$ , muestra una variación importante en la lectura de absorbancia a lo largo de la banda. Concretamente, se debe elegir una longitud de onda ubicada en una región plana del espectro de absorción correspondiente (como  $\lambda_B$  en el espectro de la Figura 2.8) a fin de minimizar el error instrumental.

¿Qué ocurre si en la solución de estudio hay otras especies absorbentes además del analito? Si dichas especies absorben a la misma longitud de onda que el analito, pero sin interactuar con éste, las absorbancias se suman. Entonces se aplica la Ley de Lambert-Beer mediante la siguiente expresión:

$$A_{total\lambda} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \varepsilon_1 \cdot b \cdot c_1 + \varepsilon_2 \cdot b \cdot c_2 + \dots + \varepsilon_n \cdot b \cdot c_n$$

Es decir, la absorbancia total en una longitud de onda única ( $\lambda$ ) para una muestra de componentes múltiples (1, 2, ..., n) es la suma de las absorbancias individuales ( $A_1, A_2, \dots, A_n$ ) y se deben realizar medidas de absorbancia total a tantas longitudes de onda comunes como componentes tenga la mezcla. Un ejemplo de este caso es la determinación de pigmentos (clorofilas y carotenoides) en extractos vegetales. En relación con ésta, se recomienda la lectura de Lichtenthaler (1987, pp. 359-366) donde se presentan las expresiones de cálculo correspondientes a cada longitud de onda, teniendo en cuenta la presencia simultánea de dichos pigmentos en el extracto de interés.

## Descripción del equipo básico

En la espectrofotometría de absorción molecular, el equipo que se utiliza se denomina espectrofotómetro UV-visible. Este equipo permite medir la absorbancia en las regiones visible y UV

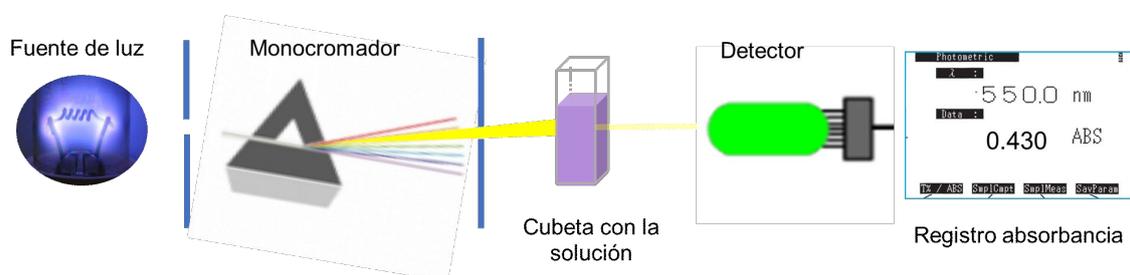
del espectro electromagnético. En la Figura 2.9, se muestra un espectrofotómetro Shimadzu-UV mini-1240 de simple haz. Se puede observar la cavidad donde se ubica la cubeta, recipiente que se utiliza para contener la muestra líquida a medir.



**Figura 2.9.** Fotografías de un espectrofotómetro UV-visible Shimadzu-UV mini-1240

La Figura 2.10 muestra los componentes de un espectrofotómetro UV-visible, que se detallan a continuación:

- Fuente de luz policromática. Para la región visible se selecciona la lámpara de tungsteno y para la región UV la lámpara de deuterio.
- Sistema óptico (colimador, monocromador). Este componente es fundamental, ya que permite generar una luz que se asemeja a una monocromática. Cuanto mejor es el monocromador más estrecho será el intervalo de longitudes de onda del haz producido.
- Cubeta (debe ser de un material transparente a la región espectral de interés, de vidrio o de plástico para el visible y de cuarzo para UV). El ancho de la cubeta se asocia al camino óptico (b).
- Detector (Fototubo). Dispositivo que transforma la radiación en energía eléctrica capaz de ser medida.
- Procesador y lector de la señal.



**Figura 2.10.** Representación esquemática de los componentes de un espectrofotómetro UV-visible de simple haz

## ¿Cómo se puede determinar la concentración de un analito utilizando el método espectrofotometría de absorción molecular UV-visible?

- **Utilizando la ecuación de la Ley de Lambert-Beer.** Se aplica cuando se conoce el valor de la absorptividad molar ( $\epsilon$ ) para el analito que se quiere cuantificar a la longitud de onda de trabajo y en la solución utilizada (datos de bibliografía). En estos casos, se mide la absorbancia de la muestra a analizar y utilizando la ecuación de la Ley de Lambert-Beer se puede despejar el valor de la concentración. Esta modalidad de trabajo es la que se utiliza para medir pigmentos en extractos vegetales o productos agroindustriales.

- **Utilizando el procedimiento de la curva de calibración.** Se aplica cuando los valores de absorptividad molar no se conocen y en los casos en los que se necesita realizar una reacción previa para lograr que el analito se transforme en una especie absorbente de luz UV o visible. En este procedimiento se prepara una serie de soluciones de concentración conocida del analito que se quiere cuantificar, se lleva a cabo la reacción previa para generar el compuesto absorbente y luego se mide la absorbancia de estas soluciones absorbentes en el espectrofotómetro UV-visible. La recta de calibración (curva de calibración) obtenida será la referencia para transformar la medida de absorbancia de una muestra desconocida en un valor de concentración para el analito. El concepto general de la curva de calibración fue presentado en el Capítulo 1.

## Ejemplos de aplicación de espectrofotometría de absorción molecular

### Determinación rápida del contenido de $\beta$ -caroteno en zanahorias por espectrofotometría de absorción molecular en el visible

Los pigmentos que dan sus colores atractivos a frutas y verduras, ¿son funcionales únicamente a los vegetales? Varios estudios han puesto de manifiesto las propiedades antioxidantes y antitumorales de pigmentos carotenoides. Por ello, desde el punto de vista nutricional, el interés por estos pigmentos se ha intensificado notablemente. El contenido de carotenoides en vegetales se puede determinar por espectrofotometría de absorción molecular en el visible.

#### **Procedimiento analítico basado en el trabajo de Olives Barba y col. (2006)**

**Preparación de la muestra:** las verduras frescas se cortan, trituran y homogeneizan en un molinillo para obtener una muestra representativa para el análisis de carotenoides. Se pesan 3 g de muestra y se mezclan con 100 mL del solvente de extracción (*n*-hexano:acetona:etanol, 50:25:25) en un recipiente protegido de la luz. Se agita magnéticamente durante 30 min y se obtienen los extractos por centrifugación.

**Curva de calibración:** se prepara una serie de soluciones de concentración conocida (entre 0,47 y 9,32  $\mu\text{M}$ ) del patrón de referencia certificado de  $\beta$ -caroteno en *n*-hexano y una solución blanco que no contenga el pigmento. Se registra el espectro de absorción de una de las soluciones de  $\beta$ -caroteno en *n*-hexano y se selecciona la longitud de onda óptima de trabajo ( $\lambda=446$  nm). Para ello, se utiliza un espectrofotómetro UV-visible con una lámpara de tungsteno como fuente luz policromática y una cubeta de plástico para contener la solución a

medir. Se mide el valor de absorbancia para cada una de las soluciones preparadas a  $\lambda=446$  nm. Se construye la curva de calibración con la serie de datos de pares ordenados (c, A), donde c, concentración de  $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{M}$ ) y A, absorbancia medida a  $\lambda$ .

**Medición y obtención del resultado:** la cuantificación en la capa de *n*-hexano de los extractos se realiza a partir de la medida de la absorbancia a  $\lambda=446$  nm en las condiciones mencionadas previamente. Fórmula de cálculo:

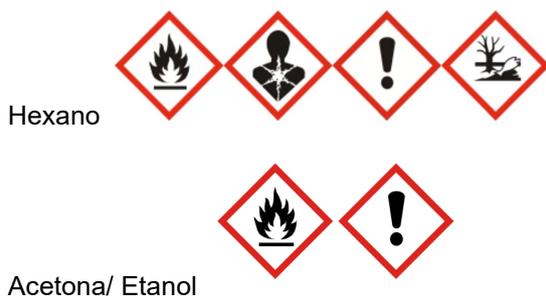
$$\text{Concentración de } \beta\text{-caroteno} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{A(\lambda)-b}{m} \cdot M \left( \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{mol}} \right) \cdot \frac{V(\text{mL})}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1\text{g}}{a(\text{g})}$$

donde A( $\lambda$ ): absorbancia medida del extracto, b: ordenada al origen de la ecuación de la recta, m: pendiente de la ecuación de la recta, V: volumen de solvente de extracción (100 mL, en este caso), a: alícuota de la muestra (3 g, en este caso), M: masa molar de  $\beta$ -caroteno ( $536,87 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

**Interferencias:** la cuantificación de  $\beta$ -caroteno por este método espectrofotométrico da lugar a la sobreestimación del contenido de carotenoides en alimentos ricos en licopeno, como el tomate o la sandía, debido a la superposición de las bandas de absorción de los espectros de ambos pigmentos.

**Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos y el equipo utilizado:** se debe consultar el protocolo interno del laboratorio y las fichas de datos de seguridad de los reactivos utilizados durante la actividad práctica, a fin de mantener la seguridad y salud en la utilización de productos químicos y el manejo responsable del equipamiento empleado.

En particular, se deben tomar medidas de precaución en la manipulación de los solventes orgánicos para preparar la mezcla de extracción, de acuerdo con los pictogramas correspondientes:



### Determinación de la concentración de fosfato en hojas por espectrofotometría de absorción molecular en el espectro visible

El fosfato es uno de los macronutrientes con mayor demanda por parte de los cultivos. Si bien la fertilización fosforada es una práctica generalizada, dada la baja biodisponibilidad del fosfato en los suelos de diversas regiones de nuestro país y la alta demanda por parte de las plantas, el fosfato resulta muchas veces un nutriente limitante en los cultivos. Por esta razón, con frecuencia se incluye la determinación de fósforo en los tejidos vegetales como uno de los parámetros importantes para evaluar el estado nutricional de un cultivo (análisis foliar de nitrógeno, fósforo y potasio -NPK-).

**Fundamento del método:** el método espectrofotométrico del ácido vanadomolibdofosfórico consiste en la reacción del ortofosfato con molibdato de amonio bajo condiciones ácidas, para formar un heteropoliácido, el ácido molibdofosfórico que en presencia del ion vanadato da lugar

al ácido vanadomolibdofosfórico de color amarillo, cuya intensidad es proporcional a la concentración de fosfatos presentes en la muestra.

**Procedimiento analítico basado en los trabajos de Sadzawka y col. (p. 91, 2007) y Kitson y Mellon (1944)**

**Preparación de la muestra:** las hojas (3-5 g) se secan en estufa a 60 °C hasta peso constante y se registra el peso seco (PS) de las mismas. A continuación, se llevan a cenizas en mufla a 500 °C (6 h). Las cenizas obtenidas se disuelven con 3,5 mL de ácido nítrico de calidad analítica y finalmente se diluyen en matraz aforado de 25,0 mL con agua ultrapura (un agua con un alto grado de purificación tal que reduce al mínimo posible la cantidad de los iones presentes). El valor del volumen total de la solución de las cenizas, Vd, corresponde a 25 mL en este caso.

**Curva de calibración:** se prepara una solución patrón de fosfato 250 mg·L<sup>-1</sup> (P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>): se secan 1,25 g de fosfato diácido de potasio KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> grado analítico a 105 °C durante 1 h. Se disuelven 1,0975 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhidro y se llevan a 1000 mL finales en un matraz aforado, usando una solución de ácido nítrico 10 %m/m preparada en agua ultrapura. La solución se almacena a 4 °C en frasco de vidrio. Esta solución es estable durante seis (6) meses. Por otro lado, se prepara el reactivo vanadato-molibdato. Para ello se preparan dos soluciones, A y B. Solución A: se pesan 12,5 g de heptamolibdato de amonio tetrahidratado, y se disuelve en aproximadamente 150 mL de agua destilada. Solución B: se calientan hasta ebullición 160 mL de agua destilada aproximadamente en un vaso de precipitado de 500 mL y se disuelven 0,625 g de vanadato de amonio, se deja enfriar y se añaden 165 mL de HCl(c). Una vez preparadas las soluciones, se añade A sobre B, se trasvasa a un matraz de 500 mL y se enrasa.

A una serie de matraces aforados de 25,0 mL se transfieren volúmenes de 0; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 y 6,0 mL de la solución patrón de fosfato (250,00 mg·L<sup>-1</sup>). Se agregan 5,0 mL de reactivo vanadato-molibdato y se enrasa con agua destilada para preparar soluciones de concentración conocida en el rango de 0 a 60,00 mg·L<sup>-1</sup>. Se deja desarrollar el color durante 10 min.

Se realiza un barrido del espectro de absorción del complejo formado entre el patrón de fósforo (solución de concentración intermedia entre las preparadas) y el reactivo vanadato-molibdato en el rango 400–490 nm de la región visible y se selecciona la longitud de onda de trabajo.

Posteriormente, se miden las absorbancias de todas las soluciones patrones preparadas para la curva de calibración a la longitud de onda seleccionada para verificar el comportamiento lineal (Ley de Lambert-Beer). Se ajusta el espectrofotómetro con el blanco de reactivos y se mide la absorbancia a la longitud de onda de trabajo seleccionada. Se realiza la curva de calibración representando en un gráfico la absorbancia de las soluciones de concentración conocida de fosfato (eje Y) contra la concentración de fósforo en los mismos (eje X). Se obtiene la ecuación de la recta resultante del ajuste lineal.

**Medición y obtención del resultado:** para la reacción de desarrollo de color de la muestra se toma una alícuota de 10,0 mL de muestra pretratada (solución ácida de cenizas) en un matraz de 25,0 mL, se adicionan 5,0 mL de reactivo vanadato-molibdato y se enrasa con agua destilada. Se deja desarrollar el color durante 10 min. Asimismo, se prepara un blanco de reactivos en el cual el volumen de muestra se sustituye por agua destilada sometida al mismo tratamiento preliminar y se procede de igual forma que con la muestra. Se ajusta el espectrofotómetro con el blanco de reactivos y se mide la absorbancia de la muestra a la longitud de onda seleccionada. Fórmula de cálculo para determinar la concentración de P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> en hojas:

$$\text{Concentración de fosfato } \left( \frac{\text{mg}}{\text{gPS}} \right) = \frac{Ac-b}{m} \cdot \frac{Vd(\text{mL})}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{D} \cdot \frac{1g}{PS(g)}$$

donde Ac: absorbancia corregida ( $A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}$ ), b: ordenada al origen de la ecuación de la recta, m: pendiente de la ecuación de la recta, Vd: volumen de solución de las cenizas, D: factor de dilución en las muestras que sea necesario preparar una dilución, PS: peso seco de hojas que se llevó a cenizas.

**Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos y el equipo utilizado:** se debe consultar el protocolo interno del laboratorio y las fichas de datos de seguridad de los reactivos utilizados durante la actividad práctica, a fin de mantener la seguridad y salud en la utilización de productos químicos y el manejo responsable del equipamiento empleado. En particular, se deben tomar medidas de precaución en la manipulación del ácido inorgánico concentrado de acuerdo con los pictogramas correspondientes.



Ácido nítrico..

## Espectrofotometría de absorción atómica

La espectrofotometría de absorción atómica se aplica a una amplia variedad de muestras y permite la detección y cuantificación de múltiples elementos a través de su **atomización**; es decir, de su conversión en átomos gaseosos; y la posterior medición de la energía absorbida por parte de éstos.

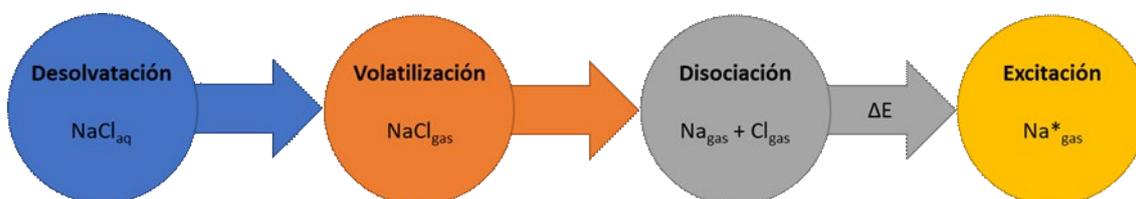
### Fundamentos del método

La espectrofotometría de absorción atómica se basa en la medición de la **energía absorbida por los átomos** en estado vapor cuando **pasan de su estado fundamental a un estado excitado**. A temperatura ambiente, los átomos se encuentran en estado fundamental, el estado de menor energía. Los átomos de los distintos elementos absorben energía de longitudes de onda

características para pasar del estado fundamental al estado excitado (ver Figura 2.3), las que conforman el espectro de absorción atómica característico de cada elemento. En la espectrofotometría de absorción atómica, se hace incidir un haz de luz de una longitud de onda particular para cada átomo, según su espectro de absorción, para detectarlo y cuantificarlo en una muestra determinada, reduciendo las posibles interferencias por otros elementos. Este método es muy específico dado que la energía necesaria para que ocurran las **transiciones electrónicas** es característica para cada elemento.

Para poder detectar los elementos que se encuentran en una muestra mediante este método, se debe lograr la excitación de los átomos en estado de vapor como mencionamos antes, para lo cual la muestra se nebulizará sobre una llama. Al nebulizar una muestra líquida en una llama, ocurrirá una serie de procesos que llevarán a la **excitación de los átomos** (Figura 2.11). Primero, se producirá la desolvatación de las sales, luego, las sales se fusionarán y se evaporarán, posteriormente, éstas se disociarán, generando el vapor atómico. Los átomos presentes en el vapor atómico absorberán energía de una longitud de onda característica y pasarán al estado excitado.

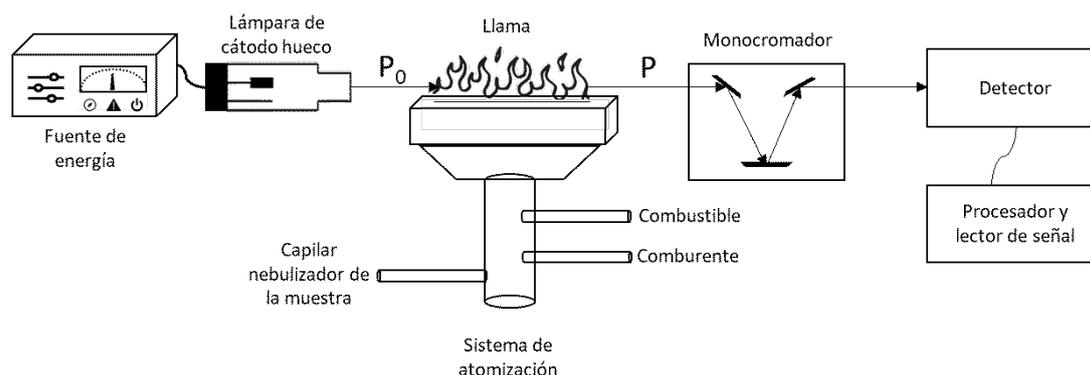
La **absorción de energía** por parte de los átomos para pasar del estado fundamental al estado excitado será **proporcional a la cantidad de átomos presentes en la muestra**, por lo cual, la cuantificación de los elementos presentes en una muestra determinada se realiza a partir de la medición de la absorbancia de la muestra.



**Figura 2.11.** Procesos que ocurren en la llama tomando como ejemplo el átomo de sodio, formando parte de una solución de cloruro de sodio (NaCl)

## Descripción del equipo básico

El espectrofotómetro de absorción atómica básico está compuesto por una fuente de radiación, un sistema de nebulización, un sistema de atomización, un monocromador, un detector y un sistema informático para procesar y leer la señal (Figura 2.12). La precisión y la exactitud de la espectrofotometría de absorción atómica dependen en gran medida de los métodos de introducción de la muestra y de su atomización.



**Figura 2.12.** Esquema de los componentes básicos de un espectrofotómetro de absorción atómica

La nebulización directa es el método de introducción de la muestra más utilizado. Consiste en un nebulizador que introduce la muestra en forma de aerosol de manera continua en el sistema de atomización. La muestra debe estar en estado líquido para poder utilizar estos métodos. Una vez introducida la muestra, los elementos presentes en ella deben convertirse en átomos para que puedan ser detectados y cuantificados por este método. Este proceso se denomina **atomización**. Para esto, se suelen utilizar distintas fuentes de energía: el calor de una llama de combustión ordinaria o un plasma de radiofrecuencia, siendo este último el atomizador más potente. El método más utilizado de atomización es el método de la llama, donde se produce la atomización a partir de la energía calórica brindada por la misma. La mezcla de combustible y comburente será la que determinará la temperatura de la llama y, en consecuencia, su capacidad de excitar los átomos de los distintos elementos. En la Tabla 2.1., se muestran las temperaturas que alcanzan las distintas combinaciones de combustible y comburente utilizadas en este método.

**Tabla 2.1.** Temperaturas obtenidas según las combinaciones de combustible-comburente

Combustible	Comburente	Temperatura obtenida (°C)
gas natural	aire	1.700-1.900
gas natural	oxígeno	2.700-2.800
acetileno	aire	2.100-2.400
acetileno	óxido nitroso	2.600-2.800
acetileno	oxígeno	3.050-3.150
hidrógeno	aire	2.000-2.100
hidrógeno	oxígeno	2.550-2.700

*Información extraída de Skoog y col. (2015, p. 783).*

Una vez que los analitos se encuentran como átomos, son capaces de absorber energía electromagnética adecuada y pasar al estado excitado. En este método, la fuente de radiación electromagnética más utilizada son las **lámparas de cátodo hueco**. Estas lámparas son específicas para el elemento que se quiera cuantificar permitiendo obtener curvas de calibración lineales y evitando interferencias con otros elementos. En su interior contienen un ánodo de tungsteno y un cátodo del elemento que se quiere cuantificar o con una fina capa del mismo. El funcionamiento consiste en la excitación del elemento del cátodo por una corriente eléctrica, generando una emisión de radiación electromagnética específica que incidirá sobre la muestra atomizada, donde se producirá la absorción por parte del analito. En la espectrofotometría de absorción atómica, se requiere que el ancho de banda del haz incidente sea muy estrecho para evitar interferencias con otros elementos, ya que las bandas de absorción son muy finas.

Luego de atravesar la zona de atomización en la que los analitos absorben energía del haz incidente, el haz emergente llega al monocromador que permitirá seleccionar la radiación electromagnética de la longitud de onda específica para cada elemento que impactará en el detector. El detector registra la potencia del haz luego de atravesar la zona de la llama donde se encuentran los analitos (P). Previamente a realizar las medidas, se debe ajustar el 100 % de transmitancia, utilizando agua ultrapura para nebulizar en lugar de la muestra, esta acción permite registrar la potencia del haz incidente ( $P_0$ ). Seguidamente, el procesador de la señal brindará un valor de absorbancia a partir de la lectura de transmitancia.

## Ejemplos de aplicación de espectrofotometría de absorción atómica

### Determinación de zinc en plantas de trigo por espectrofotometría de absorción atómica

Debido a los sucesivos ciclos de cultivos, los suelos se empobrecen en nutrientes y generan deficiencias que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que repercute en el rendimiento y la calidad nutricional de los granos. El zinc (Zn) es un micronutriente esencial para las plantas, esto quiere decir que, aun cuando se necesita en cantidades muy pequeñas, es esencial para el normal crecimiento y desarrollo de los cultivos. Un análisis de micronutrientes en plantas necesita de un método que sea selectivo a partir de una mezcla compleja y con gran capacidad de detección cuando el analito está en muy bajas concentraciones. En este sentido, la espectrofotometría de absorción atómica es una herramienta adecuada.

#### **Procedimiento analítico basado en el trabajo de Buet y col. (p. 339, 2014)**

**Preparación de la muestra:** 1-3 g de muestra de distintos órganos de las plantas (raíces, hojas y vástagos) se secan en estufa a 60 °C hasta peso constante; seguidamente se registra el peso seco (PS) de los mismos. A continuación, las muestras se colocan en viales de vidrio y se llevan a cenizas en mufla a 500 °C durante 6 h. Las cenizas se disuelven en 0,5 mL de ácido nítrico de calidad analítica y se diluyen con 3 mL de agua ultrapura, correspondiendo al volumen de disolución de las cenizas (Vd), (Figura 2.13).



**Figura 2.13.** Esquema de la preparación de la muestra.

Es conveniente, además, preparar un vial de control blanco, que se ponga en la mufla vacío y al que luego se le agregue ácido nítrico y agua ultrapura como se realiza con las muestras. Este control de blanco permitirá corregir el resultado por el aporte de las trazas de Zn presentes en el ácido nítrico y de los materiales utilizados en el procedimiento.

**Curva de calibración:** para realizarla, se utiliza sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ , PM:  $287,56 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) certificado como patrón de referencia y agua ultrapura como solvente. Se prepara una solución madre (concentrada) de 50 ppm de Zn ( $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Zn) en un matraz aforado. Se debe tener en cuenta que, en cada mol de sulfato de zinc, hay un mol de Zn; por lo tanto, para preparar 1 litro de la solución madre, se deberán pesar 219,9 mg de  $\text{ZnSO}_4$  y disolver en agua ultrapura. Una vez preparada la solución madre, se procede a preparar diluciones de la misma que serán las soluciones patrón que formarán la curva de calibración. Las concentraciones de dichas soluciones son 0,25; 0,50; 1,00 y 1,50 ppm de Zn. Además, se utiliza un patrón de 0 ppm que consiste en agua ultrapura.

**Medición y obtención del resultado:** para realizar la medida en el equipo, se selecciona e instala la lámpara de cátodo hueco del elemento que se pretende medir, en este caso, Zn. Se prende el equipo según las instrucciones de uso, que, por lo general, involucra la apertura y regulación de las llaves de los gases (acetileno y aire) para alimentar la llama; luego se enciende la llama e inmediatamente después se sumerge el capilar del sistema de nebulización de la muestra en agua ultrapura. El equipo se calibra estableciendo la longitud de onda de medición (213,9 nm para el Zn) y el cero de absorbancia con agua ultrapura. Luego se nebulizan los patrones de la curva de calibración de menor a mayor concentración. Se lava el sistema utilizando agua ultrapura y se nebulizan las muestras. Entre cada muestra, se debe realizar el lavado con agua ultrapura. Se registran los valores de absorbancia de cada patrón de la curva de calibración y de cada muestra. Se registra, además, el valor de absorbancia del vial de control blanco para luego corregir la absorbancia de las muestras. Hay equipos con software más sofisticado que realizan el cálculo de la ecuación de la curva de calibración y brindan el valor de concentración directamente.

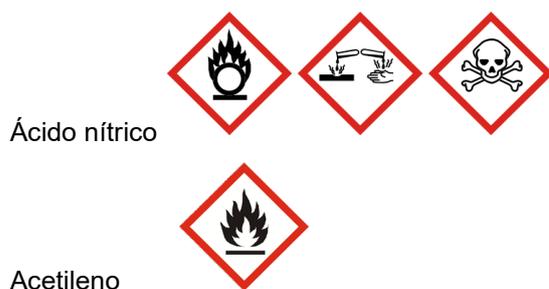
Cuando se mide una gran cantidad de muestras, es conveniente nebulizar un patrón de la curva de calibración para verificar que no haya desvíos durante el uso continuado del equipo. Idealmente se realiza esta acción cada 10 muestras. En caso de que se haya producido un desvío, se deberá calibrar nuevamente el equipo. En equipos más sofisticados, existe esta función, mediante la cual este proceso se realiza automáticamente.

Se revisa que cada muestra ingrese en el rango de medidas comprendido en la curva de calibración. En caso de que alguna muestra supere el rango de concentración, se debe preparar una dilución de la misma. Una vez realizadas las medidas, se obtendrán los resultados de concentración de Zn a partir de la curva de calibración utilizando los valores de absorbancia registrados. En equipos sofisticados, se cuenta con la función de generar la ecuación de la curva de calibración y por lo tanto la lectura de absorbancia se utiliza automáticamente para calcular la concentración del analito en la solución de las cenizas. En estos casos, es importante verificar el ajuste de la curva de calibración a una ecuación lineal. Fórmula de cálculo de la concentración de Zn en órganos vegetales:

$$\text{Concentración de Zn } \left( \frac{\text{mg}}{\text{g PS}} \right) = \frac{Ac - b}{m} \cdot \frac{Vd \text{ (mL)}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{D} \cdot \frac{1 \text{ g}}{\text{PS (g)}}$$

donde Ac: absorbancia corregida ( $A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}$ ), b: ordenada al origen de la ecuación de la recta, m: pendiente de la ecuación de la recta, Vd: volumen de disolución de las cenizas (3,5 mL, en este caso), D: factor de dilución en las muestras que sea necesario preparar una dilución, PS: peso seco del órgano que se llevó a cenizas.

**Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos y el equipo utilizado:** durante el desarrollo del protocolo para realizar estas mediciones, hay varias cuestiones de seguridad a tener en cuenta. Respecto a los reactivos utilizados, se deben tomar medidas de precaución en la manipulación del ácido nítrico, ya que corresponde a un ácido fuerte, corrosivo, comburente y tóxico por inhalación. Cuando se realiza la disolución de las cenizas hasta que se agrega agua se debe trabajar bajo campana, con el equipo de protección personal (guardapolvo, guantes y gafas). Luego, se puede trabajar en mesada, con el equipo de protección personal. Respecto a la utilización del equipo, es importante prestar atención a la composición de la mezcla de combustible (acetileno) y comburente (aire), ya que el acetileno es un gas inflamable que puede provocar incendios y explosiones. Se debe revisar regularmente el estado de los tubos y del sistema de compresión de aire.

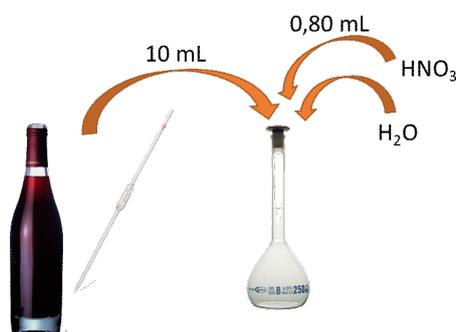


### Determinación de cobre en vinos por espectrofotometría de absorción atómica

La presencia de metales puede provocar alteraciones en el vino, entre las más comunes podemos mencionar la quiebra férrica y la quiebra cúprica. El vino pierde limpidez y se vuelve turbio; suelen generarse sedimentos blanquecinos, azulados, pardos o negruzcos, según el caso. Metales tales como el Cu y el Fe juegan un papel muy importante en la estabilidad, color, claridad e incluso afectan las características organolépticas de los vinos. Por tal motivo, es necesaria la determinación de cobre en vino a fin de controlar su calidad; para ello, se puede utilizar la espectrofotometría de absorción atómica.

**Procedimiento analítico basado en el trabajo de Durguti y col. (p. 412, 2020)**

**Preparación de la muestra:** se toma una alícuota de 10 mL, exactamente medidos, de la muestra de vino y se transfieren a un matraz aforado de 40 mL. Se agregan 0,80 mL de ácido nítrico de calidad analítica y se lleva a volumen final con agua ultrapura (Figura 2.14).



**Figura 2.14.** Esquema de la preparación de la muestra

Para realizar la curva de calibración se utiliza una solución madre de 1000 ppm de Cu (1000 mg·L<sup>-1</sup> de Cu) en ácido nítrico calidad analítica 2 %m/v. A partir de esta solución madre, se procede a preparar las soluciones patrón que formarán la curva de calibración. Se preparan soluciones de concentración 1,00; 5,00 y 10,00 ppm de Cu. Además, se realiza un patrón de 0 ppm que consiste en una solución de ácido nítrico calidad analítica 2 %m/v en agua ultrapura.

**Medición y obtención del resultado:** es muy similar al ejemplo anterior. Se debe seleccionar e instalar la lámpara de cátodo hueco del elemento que se pretende medir, en este caso, Cu. Se prende el equipo según las instrucciones de uso, que, por lo general, involucran la apertura y regulación de las llaves de los gases (acetileno y aire) para alimentar la llama. Luego se enciende la llama e inmediatamente después se sumerge el capilar del sistema de nebulización de la muestra en agua ultrapura. Posteriormente se establece la longitud de onda de medición (324,8 nm para el Cu) y el cero de absorbancia con agua ultrapura. Luego se procede de la misma manera que en el ejemplo anterior.

Los resultados se obtienen como se describió en el ejemplo anterior. Una vez realizado el gráfico, se debe obtener la ecuación de la recta, a partir de la cual se despejará el valor de concentración para cada muestra, utilizando el correspondiente valor de absorbancia leído en el espectrofotómetro. Fórmula de cálculo de la concentración de Cu en vino:

$$\text{Concentración de Cu } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = \frac{Ac - b}{m} \cdot \frac{Vm \text{ (mL)}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1000}{a \text{ (mL)}}$$

donde Ac: absorbancia corregida ( $A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}$ ), b: ordenada al origen de la ecuación de la recta, m: pendiente de la ecuación de la recta, Vm: volumen del matraz (40 mL, en este caso), a: volumen de la alícuota utilizada para preparar una dilución.

**Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos y el equipo utilizado:** se deben tener en cuenta las mismas medidas de seguridad descritas en el ejemplo anterior.



Ácido nítrico..



Acetileno

## Espectrofotometría de emisión atómica

La espectrofotometría de emisión atómica se basa en la medida de la **luz emitida** por un **analito previamente excitado**, es decir, la radiación electromagnética característica que emiten **átomos** de un elemento en **estado vapor** cuando pasan de un estado excitado a su estado fundamental.

La muestra líquida debe ser atomizada, proceso similar al descrito para el caso de la espectrofotometría de absorción atómica. Si la fuente de energía que se utiliza es el calor de la llama, la técnica se denomina fotometría de llama (se presenta a continuación) y, si se utiliza un plasma de radiofrecuencias, la técnica se conoce como espectrofotometría de emisión con fuente de plasma.

## Fotometría de llama

### Fundamento del método

La excitación del analito se logra mediante el calor de una llama (energía térmica). El tiempo de vida del **átomo excitado** es breve y rápidamente vuelve al estado fundamental emitiendo luz de una longitud de onda característica (fotón:  $E = h \cdot \frac{c}{\lambda}$ ). La **señal de emisión** que se mide en el fotómetro de llama es directamente proporcional a la concentración del átomo que emite:

$$\text{Señal emisión} = k \cdot c$$

donde  $k$ : constante de proporcionalidad y  $c$ : concentración del analito cuya emisión se mide en el fotómetro de llama.

La temperatura máxima alcanzada por la llama de combustión ordinaria define para qué tipo de analitos se puede utilizar la técnica. En el fotómetro de llama se utiliza gas natural-aire como la mezcla combustible-comburente; en este caso, la temperatura máxima de la llama puede alcanzar 1.700-1.900 °C (ver Tabla 2.1.). Esta temperatura es relativamente baja y, por lo tanto,

sólo permite analizar analitos cuyos átomos sean fácilmente excitables, es decir, elementos del grupo 1 (metales alcalinos) y grupo 2 (metales alcalinotérreos) de la tabla periódica.

La llama debe cumplir los requisitos de tener una temperatura uniforme y lograr la combustión completa. La manera práctica de controlar que se cumplen estas condiciones es la observación de conos azules en la llama. Estos se logran mediante la regulación del caudal de combustible (gas natural) y comburente (aire).

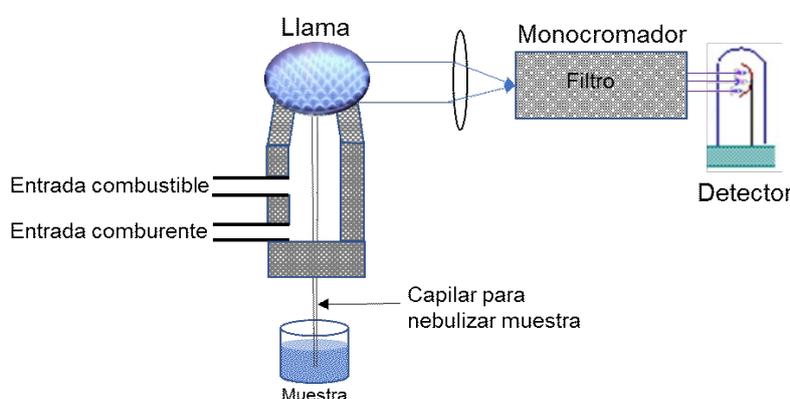
¿Cuáles son los procesos que ocurren en la llama? Los procesos son comunes a los descritos en absorción atómica y fueron esquematizados en la Figura 2.11 para el caso del átomo de sodio como analito formando parte de una solución de salmuera (agua con sal común, NaCl). Sin embargo, en la espectrofotometría de emisión atómica, hay un proceso adicional que tiene lugar luego de la excitación de los átomos en estado vapor: la emisión de luz cuando los átomos excitados vuelven al estado fundamental (proceso de relajación). Siguiendo el ejemplo del sodio como analito, este último proceso involucra la relajación de los átomos de sodio excitados emitiendo luz de una longitud de onda de 589 nm (línea amarilla característica del sodio). La energía del fotón emitido se corresponde con la diferencia de energía entre ambos estados.

¿Qué pasa con los átomos de cloro de NaCl? Dado que es un elemento del grupo 7 de la tabla periódica (muchos electrones en la última capa) el calor de la llama aire-gas natural no es suficiente para excitarlo.

¿Qué pasa si en la muestra hay átomos de potasio y de calcio? Dado que son del grupo 1 y 2 respectivamente en la tabla periódica, estos átomos también se excitan con la energía de la llama aire-gas natural y emiten luz con una frecuencia característica para regresar al estado fundamental. Utilizando el filtro adecuado, el detector del fotómetro sólo recibirá la señal del sodio, aunque se pueden producir interferencias si dichos elementos se encuentran en una relación potasio:sodio > 5:1 y calcio:sodio > 10:1.

## Descripción del equipo

El fotómetro de llama está compuesto por un sistema nebulizador, un sistema atomizador, un sistema óptico, un detector y un sistema para procesar y leer la señal (Figura 2.15).

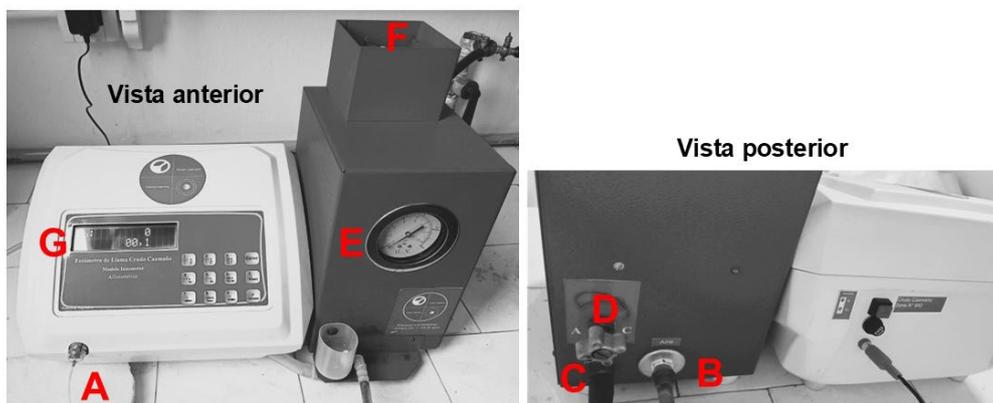


**Figura 2.15.** Esquema de los componentes básicos de un fotómetro de llama

¿Cuál es la diferencia con los componentes de un espectrofotómetro de absorción atómica? Ambos equipos presentan varios componentes comunes (sistema de nebulización, sistema de atomización, monocromador, detector y procesador y lector de la señal); la diferencia radica en que en absorción atómica se requiere un componente adicional: una fuente de luz (comparar las Figuras 2.12 y 2.15).

Descripción de los componentes del fotómetro de llama:

- Sistema nebulizador: sistema que toma la muestra a analizar y la coloca directamente como pequeñas gotas sobre la llama a través de un capilar.
- Sistema atomizador: entrada de aire (comburente) y entrada de gas natural (combustible), ambas con regulador de presión que generarán la llama.
- Llama: lugar donde la muestra pasa por una serie de procesos que terminarán con la emisión de luz por parte de los componentes de la muestra que logran excitarse.
- Sistema óptico: un filtro que permite seleccionar la longitud de onda que llega al detector; es decir, seleccionará de todas las emisiones que se producen en la llama, aquella que corresponde al analito que queremos cuantificar.
- Detector: fototubo
- Procesador y lector de la señal.



**Figura 2.16.** Fotografías del fotómetro de llama Crudo Ionómetro - Crudo Camaaño.

**A** Aguja de nebulizador, **B** Oliva entrada de aire, **C** Oliva entrada de gas natural, **D** Válvula reguladora de gas natural, **E** Manómetro de presión de aire, **F** Visor de llama en el mechero y **G** Visualizador de cristal líquido para lectura.

En la Figura 2.16, se muestran fotografías de un fotómetro de llama comercial donde se indican los componentes que pueden identificarse externamente.

### ¿Cómo se puede determinar la concentración de un analito utilizando el fotómetro de llama?

Se utiliza el método de la curva de calibración. Se preparan soluciones de concentración conocida del analito que queremos cuantificar y se miden en el fotómetro de llama, registrando la señal de emisión correspondiente. La recta de calibración obtenida será la referencia para transformar la señal de emisión de cualquier muestra desconocida en un valor de concentración para el analito estudiado.

Las posibles fuentes de error en la fotometría de llama pueden ser de dos tipos:

- Factores instrumentales: son los que dependen de las características del equipo y de los parámetros controlables, tales como tipo de mechero, características de la llama, presión de combustible y comburente, etc. En la práctica, se ajustan las variables operacionales de modo de obtener la máxima señal de la solución del analito y se mantienen constantes durante toda la medida. Por lo tanto, cada vez que se procesen muestras se debe realizar la curva de calibración correspondiente.
- Factores asociados a la composición de la muestra (matriz) que generen posibles interferencias: los aniones que forman la sal determinan la facilidad de la disociación en vapor atómico (cloruros y nitratos se disocian fácilmente, sulfatos y fosfatos son más difíciles), componentes de la muestra que emiten fotones de  $\lambda$  cercanas y componentes que se ionizan más fácilmente que el analito.

## Ejemplos de aplicación de fotometría de llama

### Análisis del contenido de potasio en tejidos vegetales por fotometría de llama

Es una práctica de rutina controlar el estado nutricional de un cultivo mediante un análisis foliar donde se determina el contenido en hojas de nitrógeno, fósforo y potasio, conocido como NPK. El potasio es uno de los macronutrientes que necesitan las plantas. Es un ion intracelular que cumple funciones muy importantes como mantenimiento de la turgencia, activador de muchas enzimas (ATPasas) y es indispensable para el adecuado funcionamiento de los estomas a través de los cuales las plantas realizan su intercambio de gases. El análisis de potasio se realiza habitualmente por fotometría de emisión a la llama.

### Procedimiento analítico basado en los trabajos de Rolny y col. (2011) y Samar Raza y col. (2013)

**Preparación de la muestra:** se pesan de 1 a 3 g de hojas frescas, se secan en estufa a 70 °C por 48 h. Luego se llevan a cenizas, utilizando una mufla a 500 °C por 2 h. Las cenizas obtenidas se digieren con una solución de ácido clorhídrico 0,005 M en un matraz aforado de 50 mL.

**Curva de calibración:** se utiliza una solución patrón de 500 mg·L<sup>-1</sup> (ppm) de potasio preparada a partir de KCl (PM: 74,55 g·mol<sup>-1</sup>) grado analítico, previamente secado en estufa a 105 °C por 1 h. Las diluciones de trabajo (rango 0-50 ppm) se preparan diariamente con agua destilada.

**Medición y obtención del resultado:** se conecta el fotómetro de llama siguiendo las instrucciones de uso. Se abren las entradas de los gases (aire y gas natural) y se enciende la llama. Se selecciona el filtro adecuado, según el elemento a medir, potasio en este caso. Se sumerge el capilar del sistema de nebulización en agua destilada y se ajusta el cero de señal de emisión. Posteriormente, se nebuliza la solución de mayor contenido del analito y se ajusta el máximo de la escala. Finalmente, se nebulizan las soluciones de concentración conocida de patrón en orden creciente. Se lava el sistema utilizando agua destilada y se nebulizan las muestras. Entre cada

muestra, se lava el sistema con agua destilada. Se registran los valores de señal de emisión de cada solución de concentración conocida de la curva de calibración y de cada muestra.

Se construye la curva de calibración con la serie de datos de pares ordenados ( $c$ ,  $S$ ), donde  $c$ : concentración de potasio (ppm) y  $S$ : señal de emisión de potasio. Fórmula de cálculo:

$$\text{Concentración de potasio } \left(\frac{mg}{g}\right) = \frac{S - b}{m} \cdot \frac{V (mL)}{1000 mL} \cdot \frac{1 g}{a (g)}$$

donde  $S$ : señal emisión,  $b$ : ordenada al origen de la ecuación de la recta,  $m$ : pendiente de la ecuación de la recta,  $V$ : volumen solución cenizas (50 mL en este caso),  $a$  alícuota de muestra (1 g en este caso).

**Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos y el equipo utilizado:** se debe consultar el protocolo interno del laboratorio y las fichas de datos de seguridad de los reactivos utilizados durante la actividad práctica a fin de mantener la seguridad y salud en la utilización de productos químicos y el manejo responsable del equipamiento empleado.

### **Determinación de Cd en muestras de tejido vegetal por la técnica de espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo**

Las plantas pueden presentar elevados niveles tanto de elementos esenciales como no esenciales, de procedencia natural o antropogénica. Algunas plantas que crecen en suelos contaminados han desarrollado la capacidad de acumular grandes cantidades de metales y metaloides en sus tejidos, sin presentar síntomas de toxicidad. Esta característica es la base de la fitorremediación de suelos y aguas. Los elementos tóxicos que suelen ser acumulados más fácilmente por las plantas son As, Cd y Pb. El contenido de estos metales en plantas se puede determinar por espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo.

### **Procedimiento analítico basado en el trabajo de García Salgado y col. (2009)**

**Preparación de la muestra:** se selecciona la parte aérea del vegetal, se tritura y seca antes de su digestión. La digestión de la muestra vegetal se realiza mediante el calentamiento en horno de microondas. Para ello, se pesan con exactitud aproximadamente 250 mg de muestra y se colocan en un vaso de teflón. La muestra se digiere con 10 mL de ácido nítrico al 70 %v/v. Se aplica un programa de digestión que comprende una rampa de temperatura de 200 °C durante 15 min y un tiempo de permanencia de 10 min a esta temperatura. Las muestras digeridas se diluyen a 25 mL con agua destilada.

**Curva de calibración:** se utiliza una solución patrón de grado analítico de 1.000 mg·L<sup>-1</sup> del elemento a analizar. Las diluciones de trabajo se preparan diariamente con agua destilada.

**Medición y obtención del resultado:** características analíticas para Cd, longitud de onda seleccionada 226,5 nm, límite de detección 0,08 µg·g<sup>-1</sup>, límite de cuantificación 0,3 µg·g<sup>-1</sup>; la precisión del método, evaluada como desviación estándar relativa, es de 0,6 µg·g<sup>-1</sup>. Las muestras vegetales digeridas se analizan mediante un espectrómetro de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (reconocido como ICP de acuerdo con las siglas en inglés de *Inductively Coupled Plasma*). Se ha demostrado que el contenido elemental para las muestras vegetales recogidas en

suelos contaminados por metales presenta una gran variabilidad en función del tipo de especie de planta. El nivel de concentración de cadmio puede oscilar entre valores inferiores al límite de cuantificación ( $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y  $19,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Fórmula de cálculo de la concentración de cadmio:

$$\text{Concentración de cadmio } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right) = \frac{Sd - b}{m} \cdot \frac{V (\text{mL})}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1 \text{ g}}{PS (\text{g})}$$

donde  $Sd$ : señal emisión de muestra diluida,  $b$ : ordenada al origen de la ecuación de la recta,  $m$ : pendiente de la ecuación de la recta,  $V$ : volumen de solución (25 mL en este caso),  $PS$ : peso seco de hojas (0,25 g en este caso).

**Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos y el equipo utilizado:** se debe consultar el protocolo interno del laboratorio y las fichas de datos de seguridad de los reactivos utilizados durante la actividad práctica, a fin de mantener la seguridad y salud en la utilización de productos químicos y el manejo responsable del equipamiento empleado. En particular, se deben tomar medidas de precaución en la manipulación del ácido inorgánico concentrado y de la solución patrón del elemento metálico, de acuerdo con los pictogramas correspondientes:



Ácido nítrico ..



Cadmio solución 1000 ppm

## Turbidimetría

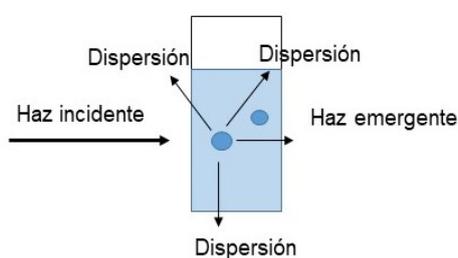
La **turbidimetría**, como su nombre lo indica, nos permite medir la turbidez de una suspensión. Pero ¿qué es la turbidez? Se entiende por turbidez la falta de transparencia de un líquido debida a la presencia de partículas en suspensión. Cuanto mayor sea la cantidad de sólidos suspendidos en el líquido, mayor será el grado de turbidez.

Para medir la concentración de un analito por este método es necesario que el analito (o un producto de reacción del analito) presente en la muestra a analizar, esté suspendido en el líquido de análisis y es indispensable que esa suspensión (mezcla heterogénea compuesta por un sólido que se dispersa en un medio líquido) sea uniforme.

## Fundamento del método

El método se basa en el grado de **atenuación**, es decir, la disminución de la potencia, que experimenta un **haz de luz que se propaga a través de una suspensión**. La atenuación se

produce debido a tres fenómenos: 1- reflexión (la luz regresa con un ángulo igual al de incidencia), 2- absorción (la partícula absorbe parte de la energía lumínica) y 3- dispersión (desviación de la dirección de la luz incidente) que experimenta la luz cuando la muestra suspendida en el medio interfiere con ésta. El fenómeno de **dispersión** de la luz por parte del analito es el más importante en este método. Cuando la luz atraviesa la muestra se dispersa en todas direcciones (Figura 2.17). La luz dispersada se ve afectada por la longitud de onda de la luz incidente, ya que la luz azul (430-450 nm) se dispersa en mayor medida que la amarilla (570 nm) o roja (650 nm), proporcionando una sensibilidad más alta. También se ve afectada por propiedades de la materia, como el tamaño de las partículas y el índice de refracción (para profundizar se recomienda la lectura de Rubinson y Rubinson, 2001, p. 296-297).

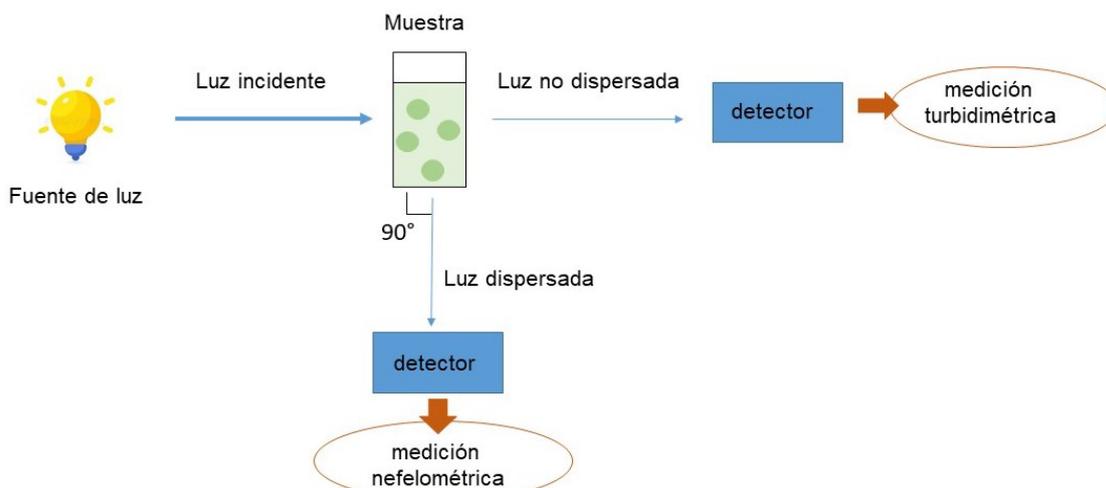


**Figura 2.17.** Esquema que representa el fenómeno de dispersión de un haz de luz que se propaga a través de una suspensión

Los métodos instrumentales que se basan en medir la luz dispersada por las partículas presentes en la muestra son la **turbidimetría** y la **nefelometría**.

### ¿En qué se diferencian la turbidimetría y la nefelometría?

En la turbidimetría se mide la disminución de la intensidad de la luz luego de atravesar la muestra turbia. Para ello, es necesario que el haz de luz incidente y el detector del equipo estén en la misma dirección (Figura 2.18). En este método se cuantifica la **luz transmitida**, por lo tanto, se mide indirectamente la luz dispersada. La sensibilidad de la turbidimetría está limitada por la exactitud y sensibilidad del instrumento utilizado ya que depende de la capacidad del detector del equipo para registrar pequeños cambios en la intensidad de la luz. El equipo específico utilizado para este método se denomina turbidímetro; en el mercado se encuentran dos versiones: portátil y de mesada. Sin embargo, generalmente se utiliza el espectrofotómetro UV-visible para medir la dispersión de luz de manera indirecta, ya que en su configuración tiene el detector en la misma dirección que el haz de luz incidente (ver Figura 2.10).



**Figura 2.18.** Esquema comparativo entre la medición turbidimétrica y nefelométrica. En turbidimetría el detector se encuentra en la misma dirección que la luz incidente, mientras que en nefelometría el detector se encuentra en un ángulo diferente al plano, en este esquema se ubica a 90°.

En la nefelometría se mide la **luz dispersada** en una dirección determinada (en general se define a 90°) por las partículas presentes en la suspensión (Figura 2.18). Por lo tanto, se mide directamente la luz dispersada y resulta un método más sensible que la turbidimetría, por lo que es recomendado para mezclas con muy baja turbidez. Para la nefelometría es necesario emplear un equipo con características específicas, que recibe el nombre de nefelómetro. En este equipo la unidad de medición se llama Unidad de Turbidez Nefelométrica (UTN). En la Figura 2.19 se presenta un nefelómetro portátil.



**Figura 2.19.** Imagen de Nefelómetro portátil C-102 HANNA Instruments y sus cubetas. La flecha indica la cavidad donde se debe ubicar la cubeta con la solución a medir.

## Descripción del equipo

Un nefelómetro portátil está compuesto por una fuente de luz (pueden ser lámparas de tungsteno, láser, LEDs), la cubeta (recipiente generalmente prismático o cilíndrico, que puede tener diferentes tamaños), el detector (fototubo) y el procesador y lector de la señal.

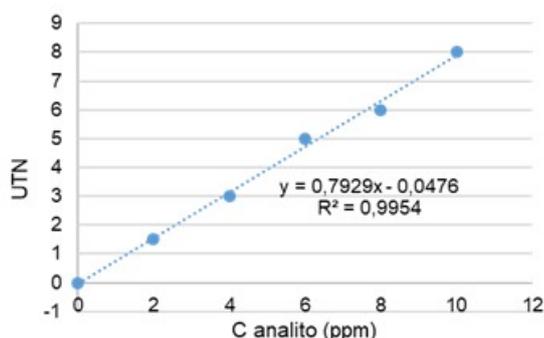
Fuentes de error del nefelómetro portátil:

- Cubetas: cualquier agente externo a la solución en estudio, que se encuentre dentro o fuera de la cubeta, altera el trayecto de la luz hacia el detector (cubetas defectuosas, rayadas, polvo o grasa adheridos a las paredes de las mismas).
- Interferencias: la presencia de algún contaminante microbiano o burbujas pueden elevar la intensidad de la dispersión. Los compuestos fluorescentes que al ser excitados por la luz incidente provocan lecturas erróneas y elevadas de la densidad de dispersión.
- Conservación de los reactivos: la temperatura inadecuada del sistema podría causar condiciones adversas al estudio y podría generar la presencia de reactivos turbios o con precipitados.
- Fluctuaciones en la potencia eléctrica: para evitar que la luz incidente sea una fuente de error se recomienda chequear la carga de la batería para tener un haz de luz uniforme.

### ¿Cómo se puede determinar la concentración de un analito utilizando la turbidimetría?

Para determinar la concentración de un analito (C) por esta técnica, independientemente de si se trabaja con un espectrofotómetro UV-visible o un nefelómetro, se debe utilizar el método de la curva de calibración explicado en el Capítulo 1 (Figura 2.20).

C analito (ppm) (X)	UTN (Y)
0	0,0
2	1,5
4	3,0
6	5,0
8	6,0
10	8,0



**Figura 2.20.** Ejemplo de tabla de datos de pares ordenados (x,y) y curva de calibración. UTN (Unidad de Turbidez Nefelométrica).

## Ejemplos de aplicación de turbidimetría

### Determinación turbidimétrica de sulfato en fertilizantes inorgánicos

El azufre, junto al calcio y el magnesio, es uno de los tres nutrientes secundarios que requieren las plantas para un crecimiento normal y saludable. Las plantas adquieren azufre del sustrato como sulfato. Cuando un cultivo presenta deficiencias en el crecimiento compatibles con un déficit de nutrientes, aun cuando se aplica un plan de fertilización adecuado, se hace necesario analizar la composición de los fertilizantes utilizados. En este contexto surge la necesidad de controlar el aporte de azufre (S) de los fertilizantes utilizados.

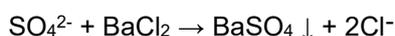
### Procedimiento analítico basado en el trabajo de Carrillo de Cori y col. (2010)

**Preparación de la muestra:** se pesa 1 g de muestra (si el producto a analizar contiene más de 10 % de S ó 2 g si contiene menos de 10 %). Se transfiere a un vaso de precipitado, se añaden

15 mL de HCl concentrado y se hierve por 5 a 10 min en plancha eléctrica bajo campana extractora de gases. A continuación, se añaden 100 mL de agua destilada caliente (40-50 °C), se mezcla, se trasvasa a un matraz aforado de 250 mL, se deja enfriar a temperatura ambiente, se enrasa y se filtra. Se diluye una alícuota de 5 mL de este extracto a un volumen total de 100 mL con agua destilada. Asimismo, se prepara un blanco de reactivos en el cual el volumen de muestra se sustituye por agua destilada sometida al mismo tratamiento preliminar y se procede de igual forma que con la muestra.

**Reacción turbidimétrica:** se transfieren 25 mL de esta última solución a un erlenmeyer y se agregan 5 mL de HCl 2 M, 1 mL de solución de clorhidrato de hidroxilamina 5 % (m/v) y 0,5 g de BaCl<sub>2</sub> previamente pulverizado. Se agregan 2 mL de solución de goma arábica 0,25 % (m/v). Se agita. Se deja en reposo 30 min.

La reacción se basa en la precipitación del S presente en el fertilizante en forma de sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), mediante la adición de cloruro de bario (BaCl<sub>2</sub>) para formar sulfato de bario (BaSO<sub>4</sub>), que al precipitar dará la turbidez. Con el agregado de goma arábica ese precipitado se mantendrá en suspensión.



**Curva de calibración:** como patrón, se utiliza una solución madre de 100 mg·L<sup>-1</sup> (ppm) de sulfato como K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (PM:174,259 g·mol<sup>-1</sup>) grado analítico, previamente secado en estufa a 105 °C por 1 h. A partir de esta solución madre, se procede a preparar las soluciones patrones que formarán la curva de calibración. Se preparan las soluciones en matraces de 25 mL de concentraciones 0; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00 y 5,00 ppm de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Se homogeneizan y se pasan a erlenmeyers. Se continúa con la reacción turbidimétrica.

**Medición y obtención de resultados:** se utiliza un espectrofotómetro UV-visible por lo que se debe seleccionar la longitud de onda de trabajo, en este caso 420 nm. Se comienza midiendo los puntos de la curva de calibración. Se registran los valores de absorbancia. Antes de medir el blanco y la muestra, se debe enjuagar la cubeta con agua destilada y con una porción de las mismas, según corresponda. Se ajusta el espectrofotómetro con el blanco de reactivos y se mide la absorbancia de la muestra a la longitud de onda seleccionada. Registrar los valores de absorbancia. Se debe revisar que el valor de absorbancia para la muestra ingrese en el rango de medidas comprendido en la curva de calibración. En caso de que supere el rango se debe preparar una solución más diluida.

Para el cálculo de resultados, primero se debe verificar el ajuste de la curva de calibración a una ecuación lineal. Se deberá graficar la curva de calibración a partir de los datos registrados de absorbancia y la concentración de los patrones. Una vez realizado el gráfico, se debe obtener la ecuación de la recta, a partir de la cual se despejará el valor de concentración para la muestra, utilizando el correspondiente valor de absorbancia. Una vez obtenido ese valor en ppm, se procede a realizar los cálculos para expresar el resultado en % m/m, teniendo en cuenta las diluciones realizadas y la alícuota de muestra utilizada. Fórmula de cálculo de la concentración de S-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en el fertilizante:

$$\text{Concentración } S - SO_4^{2-} \left( \% \frac{m}{m} \right) = \frac{Ac - b}{m} \cdot \frac{Vd \text{ (mL)}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{D} \cdot \frac{100}{PS \text{ (g)}}$$

donde  $Ac$ : absorbancia corregida ( $A_{muestra} - A_{blanco}$ ),  $b$ : ordenada al origen de la ecuación de la recta,  $m$ : pendiente de la ecuación de la recta,  $Vd$ : volumen de disolución de muestra (250 mL, en este caso),  $D$ : factor de dilución en las muestras que sea necesario para preparar una dilución,  $PS$ : peso de la muestra de fertilizante.

**Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos utilizados:** durante el desarrollo del protocolo para realizar estas mediciones, hay varias cuestiones de seguridad a tener en cuenta. Respecto a los reactivos utilizados, se deben tomar medidas de precaución en la manipulación del ácido clorhídrico concentrado, ya que corresponde a un ácido fuerte, corrosivo, comburente y tóxico por inhalación, riesgo de quemadura por contacto. Se debe trabajar bajo campana extractora de gases y con el equipo de protección personal (guardapolvo, guantes y gafas).



Ácido clorhídrico

### Determinación turbidimétrica de ceras en aceites vegetales

Los aceites vegetales, por ejemplo, aceite de girasol, contienen ceras, las que se eliminan durante el proceso de refinación (descerado o winterización). Si el contenido de ceras es elevado afectará a la calidad del aceite. En general una elevada turbidez se asocia tanto a una baja eficiencia en el proceso de refinación como a condiciones inadecuadas de almacenamiento de las semillas de girasol. Por lo tanto, una práctica frecuente en las refinerías de aceites es la medida del contenido de ceras por turbidimetría.

### Procedimiento analítico basado en los trabajos de Martini (2003) y Martini S. y Añón M.C. (2000)

**Preparación de la muestra:** las muestras de aceite de girasol comercial (refinado) se calientan por 90 min a 110 °C para asegurar la fusión completa de las ceras, si es que las hay. Luego se enfrían en un baño de agua-hielo hasta 21 °C.

**Curva de calibración:** como patrones se utilizan soluciones conocidas de diferentes concentraciones de ceras en aceite. Para ello, primero se centrifuga aceite crudo de girasol a 3000 xg por 60 min a 0 °C para obtener un aceite libre de ceras. De esta manera, se eliminan por precipitación las ceras que cristalizan a 0 °C. Segundo, el remanente de las ceras se purifica por filtración del aceite a través de un embudo Buchner. El residuo sólido obtenido se lava varias veces con éter de petróleo a 0 °C. Las ceras obtenidas se purifican con sucesivas extracciones con hexano en caliente, luego se centrifugan a 3000 xg por 30 min a 0 °C. Por último, esas ceras se pesan y se disuelven en el aceite libre de ceras para obtener soluciones de concentraciones

conocidas de ceras en el orden de 0 a 1.000 mg·L<sup>-1</sup>. Cada mezcla (patrones) se calienta por 90 min a 110 °C y finalmente, se enfrían en baños de agua-hielo hasta los 21 °C.

**Medición y obtención del resultado:** se realiza en Unidades de Turbidez Nefelométrica (UTN) usando un nefelómetro con fuente de luz de tungsteno. El equipo se calibra con una solución estándar de formazina estabilizada, como lo indica el fabricante. Luego se procede a obtener los valores de UTN que se corresponden con un valor de concentración en ppm de las soluciones patrones de ceras, dando origen así a la curva de calibración.

Para el cálculo de resultados primero se debe verificar el ajuste de la curva de calibración a una ecuación lineal. Se deberá graficar la curva de calibración a partir de los datos registrados de UTN y la concentración de los patrones. Una vez realizado el gráfico, se debe obtener la ecuación de la recta, a partir de la cual se despejará el valor de concentración para la muestra, utilizando el correspondiente valor de UTN obtenido. Obtendremos el resultado en ppm, es decir, mg de ceras por litro de aceite refinado.

**Cuestiones de seguridad relacionadas con los reactivos y la muestra:** durante el desarrollo del protocolo para realizar estas mediciones, hay varias cuestiones de seguridad a tener en cuenta. Respecto a los reactivos utilizados, se deben tomar medidas de precaución en la manipulación. El éter de petróleo es muy inflamable e irritante y tóxico por inhalación. El hexano es inflamable, corrosivo e irritante, se usa caliente y por lo tanto desprende gases y vapores. En ambos casos, se debe trabajar bajo campana extractora de gases y con el equipo de protección personal (guardapolvo, guantes y gafas). Máxima precaución al desechar los residuos ya que son tóxicos para el medioambiente. Respecto a la muestra, debemos tener cuidado con su manipulación en caliente.



Éter de petróleo /hexano

## Publicaciones científicas donde se aplicaron los métodos estudiados en el capítulo

**An exogenous source of nitric oxide modulates zinc nutritional status in wheat plants.** (2014) A. Buet, J.I. Morinconi, G.E. Santa-María, M. Simontacchi. *Plant Physiology and Biochemistry* 83:337-345.

El efecto de la adición del dador de óxido nítrico, S-nitrosoglutatión (GSNO) sobre el estado nutricional de zinc fue evaluado en plantas de trigo (*Triticum aestivum* cv. Chinese Spring) cultivadas hidropónicamente. La adición de GSNO en plantas deprivadas en Zn no modificó la acumulación de biomasa, pero aceleró la senescencia foliar en un modo concomitante con la disminución acelerada de la distribución de Zn a vástago. En plantas con nutrición adecuada, la concentración de Zn tanto en raíces como vástago disminuyó debido a la exposición prolongada a

GSNO. La evaluación adicional de la tasa neta de absorción de Zn durante la recuperación de la privación prolongada de Zn reveló que el aumento de la acumulación de Zn fue parcialmente bloqueado cuando el GSNO estaba presente en el medio de absorción. Este efecto sobre la absorción fue asociado mayormente al cambio en la translocación de Zn a vástago. Nuestros resultados sugieren un rol para el GSNO en la modulación de la absorción y translocación a vástago de Zn durante la transición de suministro de Zn de niveles deficientes a adecuados.

En este trabajo, la aplicación del método de absorción atómica permitió determinar la concentración de Zn en los diferentes órganos y su distribución en plantas de trigo cultivadas en hidroponía con niveles suficientes y deficientes de Zn. La cuantificación de este elemento en los diferentes órganos permitió calcular la tasa neta de absorción y translocación en experimentos de recuperación, donde plantas privadas de Zn fueron traspasadas a un medio con niveles óptimos de este micronutriente.

**Nitrogen fertilization increases ammonium accumulation during senescence of barley leaves. (2016). N. Rolny, M. Bayardo, J. Guiamet, L. Costa. *Acta Physiologia Plantarum* 38:89-100.**

La senescencia de hojas es una etapa del desarrollo caracterizado por dos eventos: 1- la completa degradación de los cloroplastos, y 2- la removilización del nitrógeno hacia otras partes de la planta. Durante la senescencia las proteínas de los cloroplastos son degradadas en aminoácidos y amonio. La mayor parte del amonio es re-asimilado en aminoácidos para exportarse desde las hojas senescentes hacia otras partes de la planta, mientras que una menor porción se pierde como amoníaco emitido desde las hojas. El contenido de amonio emitido depende del amonio acumulado en la cavidad subestomática de las células del mesófilo, el cual es continuamente suministrado con amonio desde el citoplasma. La acumulación de amonio en los tejidos podría incrementar la posibilidad de perder nitrógeno como amoníaco emitido. Los resultados sugirieron que durante la senescencia de hojas de cebada la degradación de proteínas estuvo acompañada por la acumulación transitoria de amonio en ambos estadios de desarrollo. El pico de acumulación de amonio ocurrió inmediatamente después de la mayor degradación de proteínas en todas las muestras analizadas, después de eso los niveles de amonio cayeron sustancialmente. Un incremento significativo del pico de concentración de amonio fue observado cuando las dosis de fertilizante nitrogenado se incrementaron, principalmente en el estado reproductivo.

En este trabajo, la aplicación de la espectrofotometría de absorción molecular permitió cuantificar el contenido de proteínas y amonio en hojas, aportando resultados que permitieron el estudio del efecto de la fertilización nitrogenada en el metabolismo del nitrógeno durante la senescencia de hojas de cebada en dos estadios de desarrollo, el vegetativo y el reproductivo.

## Referencias

- Buet A., Moriconi J. I., Santa-María G. E. y Simontacchi M. (2014). An exogenous source of nitric oxide modulates zinc nutritional status in wheat plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 337-345.
- Carrillo de Cori C., Ruiz M., Aular M., Mora R., Castillo L., Arrieché I., Díaz T., Fernández S., Noguera R., Martínez A. y Tovaret M. (2010). Un método turbidimétrico para determinar azufre en fertilizantes inorgánicos. *Venesuelos*, 18, 6-15. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/303920880\\_Un\\_metodo\\_turbidimetrico\\_para\\_determinar\\_azufre\\_en\\_fertilizantes\\_inorganicos](https://www.researchgate.net/publication/303920880_Un_metodo_turbidimetrico_para_determinar_azufre_en_fertilizantes_inorganicos)
- Durguti, V., Aliu, S., Laha, F., y Feka, F. (2020). Determination of Iron, Copper and Zinc in the Wine by FAAS. *Emerging Science Journal*, 4(5), 411-417.
- García Salgado, S., Quijano Nieto, A. y Bonilla Simón, M. (2009). Análisis multielemental mediante ICP-AES de plantas autóctonas procedentes de la zona minera de Bustarviejo (Madrid). *V IBEROLAB, Requisitos Técnicos 0074*, 361-364.
- Kitson, R. E., y Mellon, M. G. (1944). Colorimetric determination of phosphorus as molybdivanadophosphoric acid. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 16(6), 379-383.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
- Martini S. (2003). *Cristalización de ceras en aceite de girasol* (Tesis de doctorado). Recuperada de Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de La Plata SEDICI.
- Martini S. y Añón M.C. (2000). Determination of wax concentration in sunflower seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 1087-1092.
- Olives Barba, A. I., Cámara Hurtado, M., Sánchez Mata, M. C., Fernández Ruiz, V. y López Sáenz de Tejada, M. (2006). Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and b-carotene in vegetables. *Food Chemistry*, 95, 328-336.
- Ramos-Artuso F., Galatro A., Buet A., Santa-María G. y Simontacchi M. (2018). Key acclimation responses to phosphorus deficiency in maize plants are influenced by exogenous nitric oxide. *Journal of Plant Physiology*, 222, 51-58.
- Rolny, N., Bayardo, M., Guiamet, J. J., y Costa, L. (2016). Nitrogen fertilization increases ammonium accumulation during senescence of barley leaves. *Acta physiologiae plantarum*, 38, 89-100.
- Rolny, N., Costa, L., Carrión, C. y Guiamet, J. J. (2011). Is the electrolyte leakage assay an unequivocal test of membrane deterioration during leaf senescence? *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 1220-1227.
- Rubinson K. y Rubinson J. (2001). *Química Analítica Contemporánea*. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A.
- Sadzawka, R.A., Carrasco, M.A.R., Demanet, R.F., Flores, H.P., Grez, R.Z., Mora, M.L.G., Neaman, A. (2007). *Métodos de análisis de tejidos vegetales*. INIA.

- Samar Raza, M. A., Farrukh Saleem, M., Mustafa Shah, G., Jamil, M. y Haider Khan I. (2013). Potassium applied under drought improves physiological and nutrient uptake performances of wheat (*Triticum Aestivum* L.). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(1), 175-185.
- Skoog, D. A., West, D.M., Holler, F.J. y Crouch, S.R (2015). *Fundamentos de química analítica*. Cengage Learning.