

PRACTICA 2

DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE LA CONCENTRACIÓN DE RODAMINA B EN AGUAS

INDICE

1. OBJETIVOS

2. FUNDAMENTO TEORICO

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

- **REACTIVOS**
- **DISOLUCIONES**
- **MATERIAL Y APARATOS**

3.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.4.1 Cálculo de la excitación y emisión óptimas

- Cálculo de la anchura de rendija óptima
- Cálculo de la temperatura óptima para el proceso fluorescente
- Cálculo de la curva de calibrado
- Estudio de la reproducibilidad del método y cálculo del límite de detección y cuantificación
- Cálculo de la concentración en la muestra problema

4. RESULTADOS

- **RESULTADO DEL CÁLCULO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS**
- **CONSTRUCCION DE LA CURVA DE CALIBRADO**
- **ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO Y CÁLCULO DEL LÍMITE DE DETECCIÓN CUANTIFICACION**
- **CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN EN LA MUESTRA**

5. CONCLUSIONES

- **OBJETIVOS**

El objetivo de esta práctica es la determinación de la concentración del trazador Rodamina B en aguas mediante un método fluorimétrico, previa realización de una curva de calibrado y posterior interpolación del valor de la muestra en ésta.

- **FUNDAMENTO TEORICO**

En esta práctica la técnica utilizada es la fluorimetría. Esta es una técnica basada en las propiedades de ciertos analitos para emitir una radiación tras ser excitados mediante un proceso previo.

En este caso, el analito es un compuesto coloreado debido a que para su excitación hay que irradiarle con una longitud de onda que esta en la región del visible.

Con ello conseguimos que el analito pase de un estado electrónico fundamental a un estado electrónico excitado, dentro del cual puede estar en diferentes estados vibracionales. Estos estados vibracionales tienen una vida media mas corta que los estados electrónicos y por ello, en un primer momento se desexcita al nivel electrónico excitado mediante un proceso no radiante en el cual se desprende calor. Posteriormente decae al estado electrónico fundamental emitiendo fluorescencia con una longitud de onda mayor que la de excitación, ya que ha habido una perdida de energía debido al proceso no radiante.

Por tanto esta técnica solo se puede aplicar a ciertos compuestos que cumplan esas características, como es el caso de la Rodamina B o la fluoresceína, que presentan fluorescencia de forma natural.

Estas sustancias son utilizadas como trazadores para conocer el curso de aguas subterráneas o un río por ejemplo.

- **DESARROLLO EXPERIMENTAL**
- **Reactivos**

El único reactivo utilizado en esta práctica es la Rodamina B. La casa comercial de este reactivo es Laboratorio J.Suñol Tintore.

- **Disoluciones**

En esta práctica se utilizaron únicamente disoluciones de Rodamina B. Todas las utilizadas se indican en la tabla 1.

Tabla 1. Disoluciones utilizadas en la práctica.

DISOLUCIÓN	CONCENTRACION	VOLUMEN	MODO DE PREPARACION
Rodamina 1	1000 ppm	100 mL	0.1 g de rodamina en 100 mL
Rodamina 2	10 ppm	100 mL	1 mL de la dlón 1 en 100 mL
Rodamina 3	0.1 ppm	100 mL	1 mL de la dlón 2 en 100 mL
Rodamina 4	0.08 ppm	25 mL	20 mL de la dlón 3 en 25 mL
Rodamina 5	0.068 ppm	25 mL	17 mL de la dlón 3 en 25 mL
Rodamina 6	0.048 ppm	25 mL	12.5 mL de la dlón 3 en 25 mL
Rodamina 7	0.032 ppm	25 mL	8 mL de la dlón 3 en 25 mL
Rodamina 8	0.02 ppm	25 mL	5 mL de la dlón 3 en 25 mL
Rodamina 9	0.012 ppm	25 mL	3 mL de la dlón 3 en 25 mL

- **Material y aparatos**

A continuación se detalla un listado del material necesario para la realización de la práctica:

- Vasos de precipitados (100, 250, 400 y 500 mL)
- Matraces aforados (25, 50, 100 y 250 mL)
- Pipetas aforadas (1, 2, 3, 5 y 10 mL)
- Pipetas Pasteur
- Succionadores
- Vidrio de reloj
- Frasco lavador

El aparato utilizado para las medidas fluorimétricas fue el espectrofluorímetro RF-540 Shimadzu, y el

registrador fue el Shimadzu DR-3.

- **Procedimiento experimental**

3.4.1. Cálculo de la excitación y emisión óptimas

Tras preparar una disolución 10ppm de Rodamina B, ésta fue utilizada para el cálculo de las longitudes de onda de excitación y emisión óptimas. En un primer momento fue realizado el espectro de emisión del compuesto entre los límites de 200 a 700 nm, fijando la excitación a 200 nm.

Posteriormente, fijando ahora la emisión al valor máximo obtenido anteriormente, obtenemos el espectro de excitación entre los límites de 200 a 700 nm.

Repetimos el espectro de emisión y excitación sucesivamente hasta obtener valores de I_{max} constantes.

3.4.2. Cálculo de la anchura de rendija óptima

Una vez calculadas las longitudes de onda para las que la intensidad es máxima, calculamos la anchura de rendija óptima para la cual la intensidad es máxima.

Para el cálculo de la anchura de rendija de excitación óptima fijamos I_{max} de emisión y la anchura de rendija de emisión a 5 nm, mientras que hacemos un barrido de excitación de 200 a 700 nm para diferentes valores de anchura de rendija de excitación (2, 5 y 10 nm).

Para el cálculo de la anchura de rendija de emisión óptima se realiza el mismo procedimiento pero fijando los valores de excitación y variando los de emisión.

3.4.3. Cálculo de la temperatura óptima para el proceso fluorescente

En este caso fijamos I_{max} de excitación y emisión y las anchuras de rendija óptimas de excitación y emisión y vamos variando la temperatura de un valor de 15°C a 50°C mediante un baño para obtener el valor al que la intensidad de fluorescencia es máxima.

3.4.4. Cálculo de la curva de calibrado

Una vez conocidos los valores de optimización se procede a la medida de intensidad de fluorescencia en las diferentes disoluciones de concentración conocida para la elaboración de la curva de calibrado. Las disoluciones utilizadas son las de Rodamina 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 presentes en la tabla 1.

3.4.5. Estudio de la reproducibilidad del método y cálculo del límite de detección y cuantificación.

Para el cálculo de la reproducibilidad del método y del límite de detección y cuantificación se eligen tres puntos de la recta de calibrado que cumplan la linealidad. Uno de esos puntos ha de estar cerca del límite inferior de linealidad, otro cerca del límite superior y el otro en un punto medio. Los valores seleccionados en este caso fueron 0.012 ppm, 0.048 ppm y 0.1 ppm.

Se preparan 5 disoluciones de cada uno de estos puntos y se procede a la medida de la intensidad de fluorescencia. Los datos obtenidos son:

Tabla 2. Datos para cálculo de la reproducibilidad del método

CONCENTRACIÓN (ppm)	INTENSIDAD
---------------------	------------

0.012	1.0, 1.0, 1.1, 1.0, 0.9
0.048	3.7, 3.7, 3.7, 3.8, 3.7
0.1°	7.7, 8.1, 8.1, 8.4, 8.4

Nota: es necesario tener en cuenta que la escala de ordenadas utilizada para obtener estos datos es de .

3.4.6. Cálculo de la concentración en la muestra problema

No fue necesario un tratamiento de la muestra. Se midió la intensidad de fluorescencia en dos muestras problema para el cálculo de la concentración de Rodamina B mediante interpolación de la curva de calibrado.

Los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos para la muestra 1–3420 fueron 0.9 y 0.9. Y los valores obtenidos para la muestra 1–3453 fueron 5.9 y 5.9.

• RESULTADOS

• Resultados del cálculo de las condiciones óptimas

- El valor de longitud de onda de excitación para el cual la intensidad es máxima resultó ser de 315 nm. El espectro se muestra en la figura 1.
- El valor de longitud de onda de emisión para el cual la intensidad es máxima resultó ser de 589 nm. El espectro se muestra en la figura 2.
- El valor de la anchura de rendija de excitación para el cual la intensidad es máxima resultó ser de 10 nm, igual que para la emisión.
- Según los datos de la tabla 3, la temperatura a la que la absorbancia es máxima es a 15°C, y por tanto esta será la temperatura óptima.

Figura 1. Espectro de excitación de la rodamina B.

Figura 2. Espectro de emisión de la rodamina B.

Tabla 3. Datos de optimización de temperatura

TEMPERATURA (°C)	INTENSIDAD
15	7.0
20	6.3
30	5.8
40	4.7
50	3.9
60	3.0

• Construcción de la curva de calibrado

Fueron realizadas tres curvas de calibrado diferentes y los puntos obtenidos en ellas tres fueron utilizados para la construcción de una única gráfica. Estos valores se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Datos para la curva de calibrado

CONCENTRACIÓN (ppm)	INTENSIDAD	CONCENTRACIÓN (ppm)	INTENSIDAD
---------------------	------------	---------------------	------------

0.012	0.9	0.048	3.8
0.016	1.2	0.06	4.7
0.016	1.3	0.064	5.0
0.02	1.4	0.068	5.1
0.02	1.5	0.068	5.2
0.032	2.7	0.08	5.9
0.032	2.5	0.08	6.1
0.4	3.1	0.096	7.1
0.048	3.4	0.1	8.1

La representación de la curva de calibrado se da en la Figura 1.

Figura 3. Curva de calibrado

Los datos de estimación lineal para estos puntos se indican en la tabla 5.

Tabla 5. Datos de estimación lineal para la curva de calibrado

76,7115272	-0,00224303
1,54911287	0,08844275
0,99351753	0,18113363
2452,19573	16
80,4550497	0,52495026

La ecuación de la recta de calibrado en base a estos datos es:

para 16 grados de libertad y un 95% de confianza. El coeficiente de correlación es de 0.9935.

• Estudio de la reproducibilidad del método y calculo del limite de detección y cuantificación.

Con los valores de la tabla 2, calculamos la reproducibilidad del método:

Nivel 1: C= 0.012 ppm

%RSD= 7.07

Nivel 2: C= 0.048 ppm

%RSD= 1.2

Nivel 3: C= 0.1 ppm

%RSD= 3.54

Ahora calculamos el límite de detección y cuantificación:

LOD: $-0.00 + 30.18 = 0.54$

X= $7.0 \cdot 10^{-3}$ ppm

$$\text{LOQ: } = -0.00 + 100.18 = 1.8$$

$$X = 0.0235 \text{ ppm}$$

• *Calculo de la concentración en la muestra*

A partir de los datos expresados en el apartado 3.4.6 calculamos las concentraciones en las muestras interpolando de la curva de calibrado, y las expresamos con sus correspondientes errores de interpolación.

$$\text{Muestra 1-3420: } I = 0.9$$

$$C = 0.012 (1.962.510^{-3}) \text{ ppm} = 0.0120.005 \text{ ppm}$$

$$\text{Muestra 1-3453: } I = 5.9$$

$$C = 0.077 (1.962.4610^{-3}) \text{ ppm} = 0.077 0.005 \text{ ppm}$$

• *CONCLUSIONES*

Como se ha podido comprobar con los datos del apartado 4.1 cuanto menor sea la temperatura mayor será la intensidad de fluorescencia, la reacción de fluorescencia se vera favorecida.

Cabe señalar también, el hecho de que el valor de intensidad máximo corresponde con la mayor anchura de rendija utilizada, algo lógico ya que a mayor anchura de rendija es mayor la potencia que deja pasar y por ello la intensidad y la relación S/N será mayor.

Como se puede observar en la recta de calibrado este tipo de método presenta linealidad en un amplio rango de valores de concentración y de intensidad.

Respecto a la reproducibilidad cabe destacar que es mejor para valores de concentración intermedios, ni muy elevados ni cercanos al limite de detección.

El limite de detección es relativamente bajo mientras que el limite de cuantificación en nuestra opinión es un poco alto. Así la primera de nuestras muestras seria detectable pero no cuantificable, por tanto podríamos concluir que dicha muestra presenta Rodamina B pero no podríamos asegurar el valor exacto de concentración.