PRÁCTICA 2
Determinación espectrofotométrica del pK de un indicador

Material

2 matraces aforados de 500 mL
5 matraces aforados de 25 mL
3 matraces erlenmeyer de 250 mL
2 vasos de precipitados de 100 mL
1 pipeta graduada de 25 mL
1 pipeta aforada de 10 mL
1 pipeta graduada de 10 mL
1 pipeta graduada de 2 mL
1 bureta de 50 mL
1 espectrofotómetro
1 varilla de vidrio/ 1 pesasustancias/ 1 cuentagotas/ 1 embudo
4 cubetas de espectrofotómetro
1 propipeta/1 frasco lavador

Productos

Hidróxido de sodio
Disolución de hidróxido de sodio 2M
Disolución de naranja de metilo al 0.002%
Acido clorhídrico
Acido fórmico
Indicador fenolftaleína

Objetivos

1. Obtener el espectro de absorción del naranja de metilo a diferentes pHs.
2. Comprobar que se cumple la ley de Lambert-Beer (absorbancia $\propto$ [naranja de metilo])
3. Determinar el coeficiente de absorción molar del naranja de metilo
4. Localizar el punto isosbéstico.
5. Preparar disoluciones tampón a partir de ácido fórmico y NaOH y determinar su pH.
6. Determinar el pK_a del naranja de metilo a partir de medidas de absorbancia.

Fundamentos teóricos

En general se puede considerar que los indicadores ácido-base son compuestos (ácido o bases **débiles**) que en disolución presentan una forma ácida (protonada) de distinto color que su forma básica (desprotonada). El cambio de estructura, que implica el cambio de color, tiene lugar en un intervalo de pH pequeño (1–2 unidades de pH alrededor del pK del indicador), llamado *"pH de viraje".* En dicho intervalo se encuentran presentes simultáneamente las dos formas del indicador, la ácida y la básica.

El equilibrio de ionización de un indicador se puede representar mediante la ecuación:

$$HIn + H_2O \overset{K_{HIn}}{\longleftrightarrow} In^- + H_3O^+ \qquad (1)$$

en la que HIn representa la molécula de indicador en su forma ácida e In^- la molécula de indicador en su forma básica. La constante de ionización aparente (en función de concentración) vendrá expresada por:

$$K_{HIn} = \frac{[H_3O^+][In^-]}{[HIn]} \qquad (2)$$

Se supone que las disoluciones son los suficientemente diluidas como para que todos los coeficientes de actividad implicados sean muy proximos a la unidad. En estas condiciones es aplicable la **ecuación de Henderson-Hasselbalch** (tomar logaritmos en ecuación 2):

$$pH = pK_{HIn} + log\frac{[In^-]}{[HIn]} \quad (3)$$

por lo que disponiendo del valor de la relación $[In^-]/[HIn]$ para un pH determinado, se podrá conocer el valor del pK del indicador.

En el caso que nos ocupa, determinación del pK del naranja de metilo, el método seguido para el cálculo del cociente de concentraciones consiste en el registro del espectro electrónico de absorción de una serie de disoluciones mediante espectroscopia de absorción molecular en el espectro de radiación visible.

Cuando un haz de luz monocromática (fotones a una longitud de onda) atraviesa una disolución que contiene una sustancia con un grupo cromóforo, parte de la radiación puede ser absorbida por este grupo de átomos de la sustancia. Este proceso de absorción de la radiación electromagnética monocromática está regulado por la **ley de Lambert-Beer**.

Según la ley de Lambert, la intensidad del haz de luz que atraviesa la disolución disminuye a medida que la atraviesa porque parte de los fotones son absorbidos por los grupos cromóforos que va encontrando en su camino. Por lo tanto, la absorbancia es proporcional a la longitud de muestra que atraviesa.

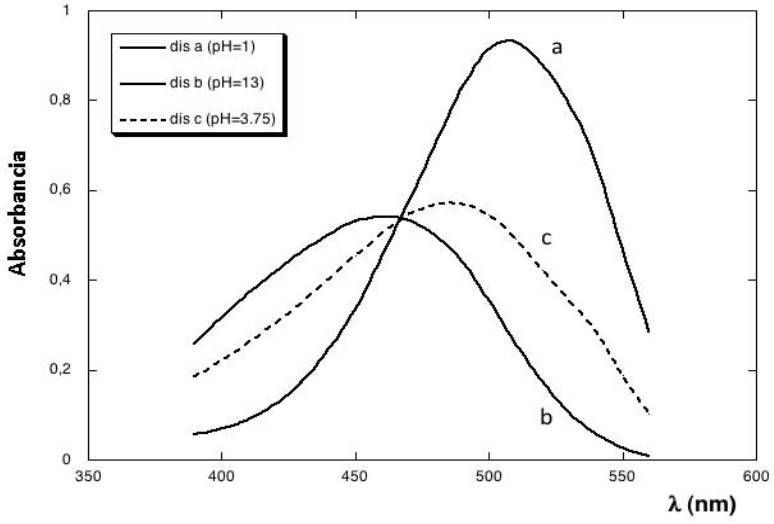
Según la ley de Beer, la intensidad del haz de luz que atraviesa la disolución disminuye a medida que aumenta la cantidad de sustancia absorbente en disolución porque aumenta la probabilidad de que los fotones sean absorbidos por los grupos cromóforos presentes. Por lo tanto, la absorbancia es proporcional a la concentración de sustancia.

La combinación de ambas leyes da como resultado la ley de Lambert-Beer:

$$A^\lambda = \varepsilon^\lambda \, l \, c \quad (4)$$

donde A^λ es la medida de absorbancia que nos da el equipo de espectroscopía a una longitud de onda dada (λ), ε^λ es el coeficiente de absorción molar a esa longitud de onda que nos indica la probabilidad que tiene esa sustancia de absorber fotones (en M^{-1} cm^{-1}), l es camino óptico que es la distancia que recorre el haz de luz a través de la muestra (el ancho de la cubeta en cm) y c es la concentración molar de la sustancia.

La figura muestra un ejemplo de los espectros de absorbancia que podemos obtener en esta práctica



a) Espectro de absorbancia de una disolución que contenga, exclusivamente, el indicador en su forma ácida HIn (roja), para lo cual es necesario que el pH de la disolución sea muy bajo, pH ≈1.

b) Espectro de absorbancia de una disolución que contenga, exclusivamente, el indicador en su forma básica In^- (amarilla). Para garantizarlo se preparará una disolución en un medio fuertemente básico, pH ≈13.

c) Espectro de absorbancia de disoluciones que contengan al indicador en ambas formas simultáneamente, lo que se consigue con disoluciones amortiguadoras o tampón cuyos pH estén en el intervalo en el que se produce el cambio de color del indicador naranja de metilo: 3.2 – 4.4.

La relación del cociente de concentraciones se relaciona con la absorbancia del naranja de metilo aplicando la ley de Lambert-Beer a cada una de las disoluciones y a la misma longitud de onda, λ:

pH = 1 $$A_{HIn} = \varepsilon_{HIn}\, l\, C_0 \quad (5)$$

pH = 13 $$A_{In^-} = \varepsilon_{In^-}\, l\, C_0 \quad (6)$$

pH = 3.8 $$A = \varepsilon_{HIn}\, l\, [HIn] + \varepsilon_{In^-}\, l\, [In^-] \quad (7)$$

donde A_{HIn} y A_{In^-} representan las absorbancias de disoluciones en las que sólo está presente la forma ácida o básica del indicador, respectivamente. "A" es la absorbancia de la disolución en la que coexisten ambas formas del indicador (en nuestro caso, la disolución tampón). ε_{HIn} y ε_{In^-} representan los coeficientes de absorción molar de las formas ácida y básica del indicador, respectivamente. Además, en las disoluciones tampón se cumple que $C_0 = [In^-] + [HIn]$.

Finalmente, a partir de las expresiones (5) a (7) se puede deducir que:

$$pH = pK_{HIn} + log\left(\frac{A_{HIn}-A}{A-A_{In^-}}\right) \quad (8)$$

Disoluciones

1. 500 mL de disolución de ácido fórmico 0.1 M, a partir del comercial (en vitrina).
2. 500 mL de disolución de NaOH 0.1 M, a partir del sólido.

Procedimiento experimental

1) Conectar el espectrofotómetro nada más comenzar la sesión de prácticas o al menos 15 minutos antes de medir.

2) Preparar las disoluciones de ácido fórmico y de hidróxido de sodio.

3) Valorar 25 mL de la disolución 0.1 M de ácido fórmico con NaOH 0.1 M, usando fenolftaleina como indicador. Repetir al menos tres veces la valoración.

Nota: Recordad que existen recipientes para desechar los residuos.

4) Registrar los espectros de absorción de naranja de metilo en disoluciones en las que esté(n) presente(s):

- mayoritariamente la forma ácida del indicador
- mayoritariamente la forma básica del indicador
- ambas formas, acida y básica, en proporciones similares; se consigue a partir de disoluciones tampón.

A) REGISTRO DE LOS ESPECTROS EN LOS QUE SOLO SE ENCUENTRA PRESENTE MAYORITARIAMENTE UNA DE LAS FORMAS DEL INDICADOR.

Se registrará la absorbancia de la forma básica, $\mathbf{A_{In^-}}$, y de la forma ácida, $\mathbf{A_{HIn}}$, en este caso para diferentes concentraciones de indicador; esto permitirá comprobar la validez de la ley de Lambert-Beer y determinar coeficientes de absorción molar.

Para ello se preparan disoluciones de indicador de diferente concentración, en la que predomine bien la forma ácida (pH ~1) o la básica (pH ~13) y se registra la absorbancia de estas disoluciones, $\mathbf{A_{HIn}}$ **y** $\mathbf{A_{In^-}}$.

a) Preparación de las disoluciones de naranja de metilo y del blanco.

Preparación del blanco

Se prepara un único blanco, ácido o básico, para el registro de la absorbancia de todas las disoluciones de indicador donde predomine una de sus formas, ácida o básica.

Introducir, en un aforado de 25 mL, en el orden indicado los siguientes componentes:

- Una pequeña cantidad de agua desionizada.
- 4 gotas de HCl concentrado (forma ácida) o 24 gotas de NaOH 2 M (forma básica).
- Agua hasta la línea de aforo.

Con esta disolución **lavar** y llenar una cubeta del espectrofotómetro.

Preparación de la disolución problema de naranja de metilo.

Introducir, en un aforado de 25 mL, en el orden indicado los siguientes componentes:

- El volumen de disolución 0.002 % de naranja de metilo indicado en la tabla 1 **(medido con una pipeta)**.
- 4 gotas de HCl concentrado (forma ácida) o 24 gotas de NaOH 2 M (forma básica).
- Agua hasta la línea de aforo.

Con esta disolución **lavar** y llenar una cubeta del espectrofotómetro.

b) Registro del espectro.

Tras preparar la disolución de naranja de metilo y el blanco correspondiente, se registra la absorbancia en función de la longitud de onda siguiendo las **Instrucciones del Espectrofotómetro Jenway73**. La longitud de onda inicial y final se fija, respectivamente, a **350 nm y 600 nm**.

Para mayor claridad se recomienda etiquetar los ficheros de datos de las muestras "*Sample name*" de forma clara y sistemática. Por ejemplo: NAME_A_V y NAME_B_V, donde NAME hará referencia a los integrantes del grupo, A y B a la disolución ácida o básica y V al volumen de naranja de metilo (tabla 1).

Notas y precauciones:

- La célula del espectrofotómetro debe estar limpia; no se deben tocar las paredes con los dedos y no se debe llenar hasta el borde sino a unos ¾ de su capacidad.

- Para un medio dado, ácido o básico, la LINEA BASE (blanco) es la misma, por tanto, una vez registrado el primer espectro en cada medio, para registrar los siguientes introduzca en el espectrofotómetro la nueva disolución y presione, en el programa Jenway73, *repeat .*

- Para la obtención de las tablas de datos almacenadas en el espectrofotómetro siga las instrucciones.

Tabla 1.

Volúmenes de naranja de metilo, HCl, NaOH, y agua utilizados en la preparación de las disoluciones de naranja de metilo cuando solo está presente una de las formas del indicador, ácida (HIn) o básica (In^-).

Forma de NM	**V(NM) mL**	**V(HCl conc.) gotas**	**V(NaOH 2M) gotas**	**V(H_2O)**
HIn	**10**	**4**	**--**	**Aforar**
HIn	**8**	**4**	**--**	**Aforar**
HIn	**6**	**4**	**--**	**Aforar**
HIn	**4**	**4**	**--**	**Aforar**
In^-	**10**	**--**	**24**	**Aforar**
In^-	**8**	**--**	**24**	**Aforar**
In^-	**6**	**---**	**24**	**Aforar**
In^-	**4**	**---**	**24**	**Aforar**

B) **REGISTRO DE LOS ESPECTROS DE DISOLUCIONES EN LAS QUE SE ENCUENTRA, EN PROPORCIONES SIMILARES, AMBAS FORMAS DEL INDICADOR.**

En una disolución de indicador, para garantizar que las concentraciones de ambas formas del indicador son similares, la disolución se prepara en un medio cuyo pH sea próximo al pK del indicador. Estos pH se consiguen, y se garantiza su estabilidad, preparando las disoluciones de indicador en un medio tamponado, en este caso, utilizando disoluciones tampón de un ácido débil (ácido fórmico) cuyo pK es próximo al del naranja de metilo. De esta forma: $pH \sim pK_{HFor} \sim pK_{HIn}$

Se preparan cinco disoluciones tampón y se registrarán los espectros correspondientes.

a) Preparación de las disoluciones tampón.

Las disoluciones tampón se preparan en un Erlenmeyer de 250 mL neutralizando, parcialmente con sosa, los moles de ácido fórmico valorado.

Introducir en el erlenmeyer 25 mL de ácido fórmico, **medido con una pipeta**, y añadir, **desde la bureta**, el volumen de NaOH correspondiente para cada tampón (tabla 2).

Previo a la preparación de las disoluciones tampón, determine los volúmenes de sosa (tabla 2) correspondientes a los porcentajes del volumen de equivalencia determinado en la valoración del ácido fórmico. Complete, en su cuaderno, esta tabla. Recoja en esta tabla también el pH teórico de cada disolución; posteriormente lo calculará.

b) Preparación de las disoluciones de naranja de metilo y blanco

Para cada una de las disoluciones tampón, introducir en un aforado de 25 mL, en el orden indicado, los siguientes componentes para el blanco y para la disolución de naranja de metilo .

Preparación del Blanco.

- 10 mL de agua desionizada **(medidos con una pipeta).**
- **Disolución tampó**n hasta la línea de aforo.

Con esta disolución lavar y llenar una cubeta del espectrofotómetro.

Preparación de la disolución problema de naranja de metilo.

- 10 mL **(medidos con una pipeta)** de disolución 0.002 % de naranja de metilo.
- **Disolución tampón** hasta la línea de aforo.

Con esta disolución lavar y llenar otra cubeta del espectrofotómetro.

Tabla 2.
Porcentaje del volumen de sosa del punto de equivalencia. Volumen de sosa utilizado en la preparación de la disolución tampón y pH de la disolución tampón.

TAMPÓN	Porcentaje V_{Equi}	$V_{NaOH\ (mL)}$	pH
1	20		3.15
2	30		3.38
3	40		3.57
4	50		3.75
5	60		3.93

c) Registro del espectro.

Una vez preparada cada disolución de indicador y su blanco, se registrarán su espectro siguiendo las Instrucciones del Espectrofotómetro Jenway73 (pasos 5 a 11).

Se recomienda etiquetar los ficheros de datos de las muestras "*Sample name*" de forma clara y sistemática. Por ejemplo: NAME_T_N, donde N (1 a 5) hará referencia al tampón utilizado (tabla 2).

Nota: Una vez finalizada la experiencia asegurese que ha guardado todas las tablas de datos y apague los equipos siguiendo las instrucciones.

Resultados experimentales: presentación de los datos

1. Tabular los datos (masas o volúmenes) necesarios para la preparación de las disoluciones de ácido fórmico y sosa; tanto calculados como reales.
2. Tabular en una tabla los datos de la valoración del ácido fórmico con sosa y calcular el valor medio del volumen de equivalencia con su error aleatorio.
3. Tabular los volumenes de indicador señalados en la tabla 1 junto con la concentración molar de indicador correspondiente.
4. Presentar en el cuaderno la tabla 2 del guion con los volumenes de sosa correspondientes a los porcentajes del volumen de equivalencia indicados en esta tabla.
5. Tabular las absorbancias registradas, forma ácida, $A_{HIn,}$ y básica, A_{In^-}, en función de la longitud de onda para las diferentes concentraciones de indicador (tabla 1).
6. Tabular las absorbancias registradas en función de la longitud de onda para las disoluciones con la misma concentración de indicador (V(NM) = 10 mL) de indicador en la que que está presente solo una de las formas de indicador, A_{HIn} y A_{In^-}, o ambas (disoluciones tampón), A.

Tratamiento y Discusión de Resultados

1. Construir una tabla con las absorbancias en función de la longitud de onda, para la forma básica (A_{In^-}; pH = 13) y ácida (A_{HIn}; pH = 1) para diferente concentración de indicador.

   Representar y analizar estos espectros.
2. Construir una tabla con las absorbancias en función de la longitud de onda, para la forma básica (A_{In^-}; pH = 13), ácida (A_{HIn}; pH = 1) y para las disoluciones tampón, A, para la misma concentración de indicador; V(NM) = 10 mL.

   Representar y analizar estos espectros.

3. Indicar la longitud de onda del punto isosbéstico, λ_{Isosb} y demostrar que en dicho punto los coeficientes de absorcion molar de las formas ácidas y básicas del indicador tienen el mismo valor.

4. Analizar la validez de la ley de Lambert-Beer.

   Si se cumple la ley de Lambert-Beer debe observarse un comportamiento lineal de la absorbancia en términos de la concentración y cuya pendiente, para una celda unidad de 1 cm de base y la concentración expresada como concentración molar, proporciona el coeficiente de extinción molar a una longitud de onda dada, ε^{λ}.

   $$A^{\lambda} = \varepsilon^{\lambda}\, l\, c$$

   Para ambas formas del indicador, ácida y básica, construya una tabla con su absorbancia, a la longitud de onda de su máximo, $A_{HIn}^{\lambda \max HIn}$ y $A_{In^-}^{\lambda \max In^-}$, en función de la concentración molar de indicador.

   Para determinar la concentración molar del indicador tenga en cuenta que sus disoluciones se preparan en un aforado de 25 mL y se utiliza el volumen de naranja de metilo (0,002 % (m/V)) indicado en la tabla 1; M_r (NM) = 327,33.

   Representar, para ambas formas del indicador, la absorbancia en función de la concentración molar de indicador.

   Analice si se observa un comportamiento lineal en el rango de concentraciones de indicador.

5. Determinar coeficientes de absorción molar.

   A partir de la ecuación del ajuste lineal de las representaciones de la absorbancia en función de la concentración molar de indicador realizadas en el apartado anterior, determine los coeficientes de absorción molar de la forma ácida y básica del indicador a la longitud de onda de sus máximos, $\varepsilon_{HIn}^{\lambda \max HIn}\ y\ \varepsilon_{In^-}^{\lambda \max In^-}$.

   Para otras longitudes de onda, determine los coeficientes de absorción molar de ambas formas del indicador, $\varepsilon_{HIn}^{\lambda}\ y\ \varepsilon_{In^-}^{\lambda}$.

   Construya una tabla con dichos coeficientes, represéntelos en la misma gráfica y analice su evolución.

6. Determinar el pK del indicador.

   A partir de los espectros registrados, **para una misma concentración de indicador (V(NM) = 10 mL)** y diferente pH, el pK del naranja de metilo puede determinarse mediante procedimientos analíticos o gráficos.

   A) Procedimiento analítico.

   Conocidas, **a una determinada longitud de onda**, las absorbancias de disoluciones de indicador, **con igual concentración**, que contengan exclusivamente, bien la forma ácida A_{HIn} (pH=1), la básica A_{In^-} (pH=13) o, simultáneamente, ambas formas del indicador A(pH tampón), la ecuación (7) permite determinar el pK del indicador.

$$pH = pK_{HIn} + \log\left(\frac{A_{HIn} - A}{A - A_{In^-}}\right)$$

Tenga en cuenta el análisis realizado de los espectros en el punto 2 en el cálculo el pK.

Presente en una tabla, los valores de pK obtenidos para cada disolución tampón a diferentes longitudes de onda. Compare, y comente, los valores de pKs obtenidos a longitudes de onda próximas al máximo de absorbancia de la disolución ácida con los valores de pKs obtenidos en otras zonas del espectro, por ejemplo, en las proximidades del punto isosbéstico.

A partir de este análisis, exprese el valor medio del pK con su error.

B) Procedimiento gráfico 1.

A partir de la ecuación 3,

$$pH = pK_{HIn} + \log\frac{[In^-]}{[HIn]}$$

se infiere que cuando [HIn] = [In^-], el pK coincide con el pH de la disolución, pK_{HIn} = pH.

La aplicación de esta condición en la ecuación 8

$$pH = pK_{HIn} + \log\left(\frac{A_{HIn} - A}{A - A_{In^-}}\right)$$

implica que $log\frac{(A_{HIn}-A)}{(A-A_{In^-})}$ =0

La determinación analitica del pK del naranja de metilo, nos habrá permitido concluir que la zona óptima para determinar el pK es en las proximidades del máximo de absorbancia de la forma ácida del indicador, (λ_{HIn}^{max}).

De la tabla de los espectros registrados (ver punto 2) extraiga, para λ_{HIn}^{max}, los datos de absorbancias en función del pH: A_{HIn} (pH=1), A_{In^-} (pH=13) y A (tampón 1 a 5) y construya con ellos una tabla que contenga también la columna $log\frac{(A_{HIn}-A)}{(A-A_{In^-})}$.

Represente $log\frac{(A_{HIn}-A)}{(A-A_{In^-})}$ en función del pH y a partir de la recta ajustada (y = a x + b), obtenga el valor del pH que se corresponde con: y = 0 = a x + b

C) Procedimiento gráfico 2 (opcional)

El pH en que coinciden las absorbancias registradas a las longitudes de onda de los máximos de absorbancia de la forma ácida y de la forma básica del indicador: A(λ_{HIn}^{max}) = A($\lambda_{In^-}^{max}$) se cumple que pH = pK, lo que permite determinar el pK del indicador.

De la tabla de los espectros registrados (ver punto 2) extraiga, para λ_{HIn}^{max} y $\lambda_{In^-}^{max}$ los datos de absorbancias en función del pH para las diferentes disoluciones tampón A (tampón 1 a 5) y construya con ellos una tabla.

Represente A(λ_{HIn}^{max}) y A($\lambda_{In^-}^{max}$) en función del pH y realice, para cada longitud de onda, un ajuste lineal con los datos que presenten una tendencia lineal en la zona de cruce.

Iguale dichas ecuaciones y determine el valor de x (pH) del punto de intersección de las rectas que se corresponde con pK = pH.

7. Comparar y analizar los valores de pK obtenidos análiticamente y gráficamente en la cuestión anterior. Comparar estos valores con el pK teórico del naranja de metilo.
8. Calcular los pHs de las disoluciones amortiguadoras y comprobar que coinciden con los indicados en el texto. Para ello, buscar el valor bibliográfico del pK_a del ácido fórmico a 25 ºC.
9. ¿Qué condiciones se han de cumplir para que sea aplicable la ecuación (3)? Indicar las aproximaciones realizadas en su deducción.
10. Demostrar la ecuación (8).