

Universidad de Guanajuato
Facultad de Química

Taller Básico de Espectroscopía UV-VIS

Impartido por:

Q. Fernando Amézquita López
Q. Diana Mendoza Olivares

2008

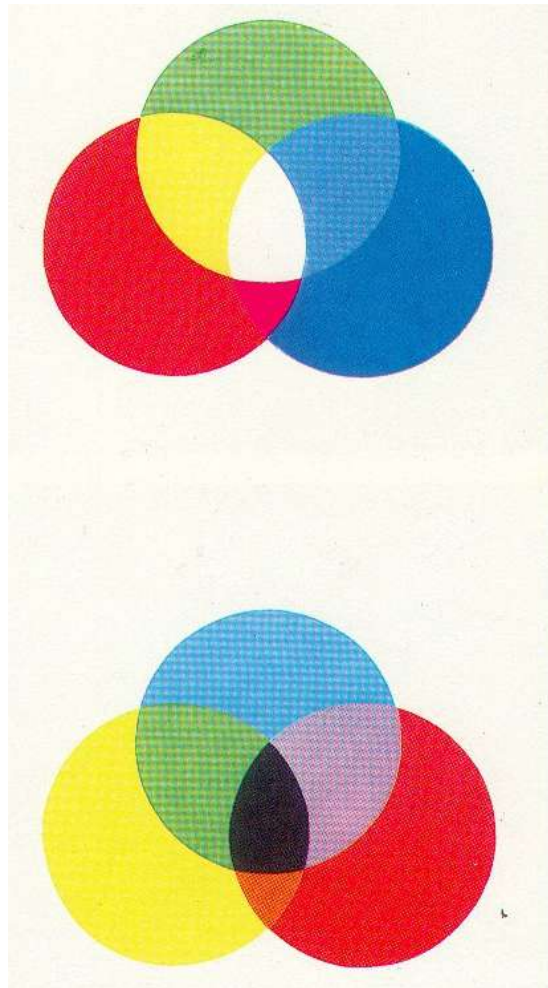
Teoría del Color

Es importante comprender la diferencia entre el color en la luz y el color en la pintura. Cuando se hace pasar la luz blanca por un prisma, ésta se descompone y podemos ver los colores del espectro.

Ahora piensa en una caja de pintura o de lápices de colores. En la pintura, cada color se hace con un pigmento. Los pigmentos son polvos de color que se obtienen moliendo una variedad de materiales como pueden ser diferentes tipos de tierras, rocas, plantas. Todas estas cosas tienen un color natural, pero los colores de los pigmentos no son tan puros como los colores del espectro.

La luz blanca e incolora del Sol o del filamento caliente de una bombilla está constituida por los colores del espectro. Se conocen los tres colores rojo, verde y azul como los colores primarios de la luz. Mezclándolos forman luz *blanca*. Los colores secundarios son el magenta (rojo azulado), el cian (verde azulado) y el amarillo.

Los tres colores primarios de la pintura son el rojo, el azul y el amarillo. Puedes obtener casi cualquier color que quieras usando sólo estos tres colores. Cuando mezclas los tres colores en las proporciones exactas, obtienes negro y no blanco.



Cuando la luz da sobre un objeto, parte del espectro visible se **absorbe** y la otra parte se **refleja**. Las partes que se reflejan se combinan para formar los colores que ven nuestros ojos.

Puede que te preguntes cómo es que vemos algunas cosas como blancas y negras. Si un objeto absorbe todos los colores del espectro, no se refleja nada de luz y lo vemos negro. Si todos los colores se reflejan, no hay ningún cambio en la luz blanca y vemos el objeto blanco.

Vemos los colores gracias a células especiales en nuestros ojos llamados conos. Hay tres tipos de conos y cada uno responde a uno de los tres colores primarios. Nuestro cerebro percibe toda la gama de colores al mezclar las señales que le llegan de cada tipo de cono.

Mezclando luz roja y verde, vemos amarillo. Solo necesitas añadir la cantidad correcta de luz azul a la amarilla para conseguir luz blanca. Decimos que el azul y el amarillo son colores complementarios porque, cuando se juntan, dan luz blanca. Más adelante se mostrarán en una tabla los colores de la radiación visible. Si mezclas colores complementarios, el resultado será siempre luz blanca. La razón de esto es que todos los colores primarios resultan reflejados por cada par de colores complementarios.

En pintura se mezclan los colores de manera diferente, Como seguramente sabes, al mezclar pinturas azul y amarilla, sale verde. La pintura azul aparece azul porque los pigmentos que tiene reflejan la luz azul.

Con las pinturas habrás descubierto que puedes hacer la mayoría de los colores que necesites mezclando azul, amarillo y rojo. Cuando mezclas rojo, azul y amarillo en los tonos y matices exactos obtienes negro. De hecho, es más probable que consigas un marrón grisáceo oscuro, ya que los pigmentos utilizados en la pintura no son puros.

Bases del Color y Colorimetría.

Si la energía absorbida es mayor para algunas longitudes de onda del visible que para otras, el haz emergente aparecerá coloreado. La siguiente tabla, proporciona las longitudes de onda de las bandas designadas con los nombres comunes de los colores, junto con sus complementos. Estas longitudes de onda están tomadas de un estudio iniciado en la Oficina Nacional de Pesas y Medidas y son algo arbitrarias. El color aparente de la solución es siempre el complemento del color absorbido. De modo que una solución que absorba en la región del azul, aparecerá como amarilla; la que absorbe en el verde aparecerá como morada, etcétera.

COLORES DE LA RADIACION VISIBLE		
Rango aproximado de longitud de onda en nm	Color	Complemento
400-465	Violeta	Verde amarillo
465-482	Azul	Amarillo
482-487	Azul verdoso	Naranja
487-493	Azulverde	Rojo-naranja
493-498	Verde azulado	Rojo
498-530	Verde	Rojo púrpura
530-559	Verde amarillento	Púrpura rojizo
559-571	Amarillo verde	Púrpura
571-576	Amarillo verdoso	Violeta
576-580	Amarillo	Azul
580-587	Naranja amarillento	Azul
587-597	Naranja	Azul-verdoso
597-617	Naranja rojizo	Azul-verde
617-780	Rojo	Azul-verde

Al referirnos al color, estamos restringiendo por el momento la discusión a la región del visible del espectro.

Para un químico analítico, la importancia de las soluciones coloreadas descansa en el hecho de que la radiación absorbida es característica del material que efectúa la absorción. Una solución que contenga iones cúpricos hidratados absorberá el ámbar y será transparente al azul, de modo que el cobre podrá determinarse midiendo el grado de absorción de la luz amarilla bajo condiciones previamente uniformadas.

Cualquier material soluble coloreado puede determinarse cuantitativamente en esta forma. Además, es posible determinar una sustancia que sea incolora o muy poco coloreada, al agregar un reactivo que la convierta en un compuesto intensamente coloreado. Por consiguiente, la adición del amoníaco a una solución de cobre produce un color mucho más intenso que el del ion cúprico hidratado, lo que constituye un método analítico más sensible.

El término generalmente empleado en los análisis químicos basados en la medida de la absorción de la radiación es el de *absorciometría*. El término *colorimetría* debe aplicarse solamente en relación a la región del espectro visible. La espectrofotometría es una división de la absorciometría que se refiere específicamente al uso del espectrofotómetro.

Ley de Beer

Introducción.

Muchos compuestos absorben luz ultravioleta (UV) o visible (Vis.). En el siguiente diagrama se muestra un haz de radiación monocromático de poder radiante P_0 dirigido a una solución de muestra. Se efectúa la absorción del haz y al salir de la muestra tiene un poder radiante P .

La cantidad de radiación absorbida puede ser medida en distintas formas:

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

$$\% \text{ Transmitancia, } \%T = 100 T$$

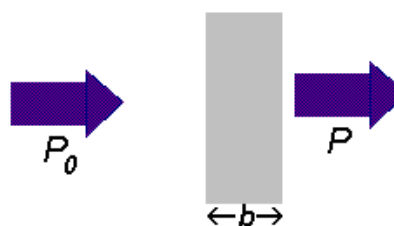
Absorbencia,

$$A = \log_{10} P_0 / P$$

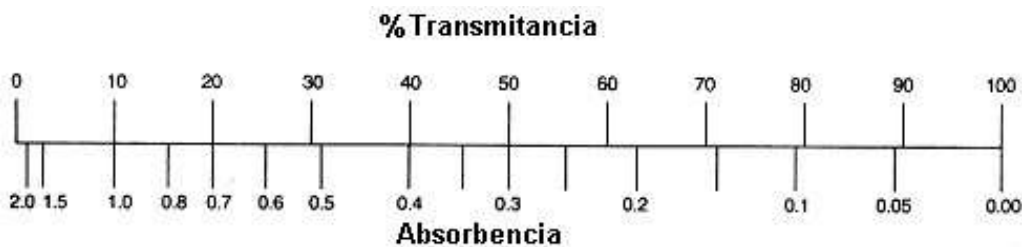
$$A = \log_{10} 1 / T$$

$$A = \log_{10} 100 / \%T$$

$$A = 2 - \log_{10} \%T$$



Es útil recordar la ecuación, $A = 2 - \log_{10} \%T$, porque permite calcular fácilmente la absorbencia a partir de los datos de porcentaje de transmitancia. La relación entre absorbencia y transmitancia se ilustra en el diagrama siguiente:



Así, si toda la luz pasa a través de una solución sin absorción, entonces la absorbencia es cero, y el por ciento de transmitancia es 100%. Si toda la luz es

absorbida, entonces el porcentaje de transmitancia es cero, y la absorción es infinita.

La Ley de *Lambert-Beer*

Ahora veamos la Ley de *Lambert-Beer* y exploremos su significado. Esto es importante porque quien usa la ley a menudo no la entiende, incluso aunque la ecuación que la representa es tan simple como:

$$A = \epsilon bc$$

Donde A es absorbencia, adimensional, puesto que $A = \log_{10} P_0 / P$, y

ϵ es la absortividad molar con unidades de $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$

b es la longitud del paso óptico de la muestra; que es, el espesor de la celda en que la muestra esta contenida y la expresaremos en centímetros.

c es la concentración del compuesto en solución, expresada en mol L^{-1}

La razón por la que se prefiere expresar la ley con esta ecuación es porque así la absorbencia es directamente proporcional a los otros parámetros, cuando la ley es obedecida. Por ahora no consideraremos las desviaciones de la ley de *Lambert - Beer*.

Hagámonos unas preguntas.

Pregunta: ¿Por qué preferimos expresar la ley de *Lambert-Beer* usando absorbencia como una medida de la Absorción en lugar de % T ?

Respuesta: Para empezar, pensemos sobre las ecuaciones...

$$A = \epsilon bc$$

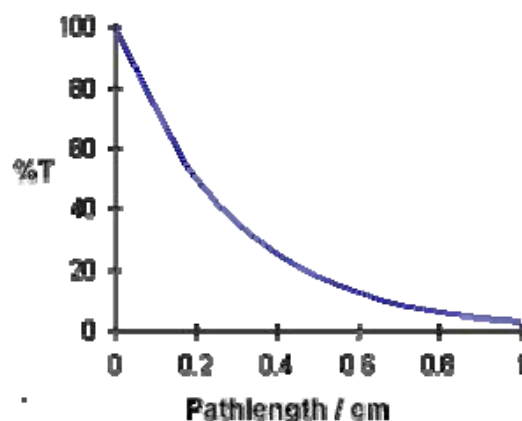
$$\%T = 100 P/P_0 = e^{-\epsilon bc}$$

Ahora, suponga que tenemos una solución de sulfato de cobre (que aparece azul porque tiene una absorción máxima en 600 nm). Si analizamos la forma en la cual

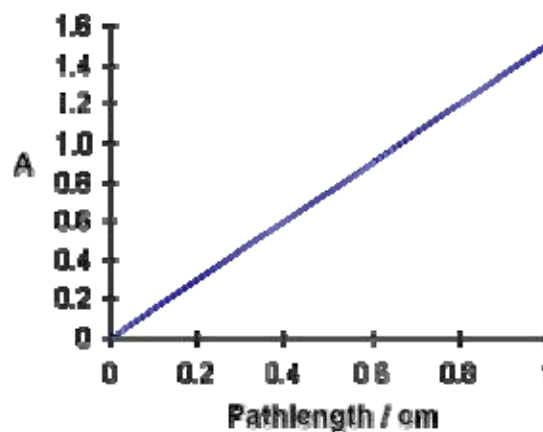
cambia la intensidad de la luz (poder radiante) cuando pasa a través de una celda de un centímetro de espesor, observaremos reducción, cada 0,2 cm según el diagrama de abajo. La Ley de Lambert - Beer dice que la fracción de la luz absorbida por cada capa de solución es la misma. Para nuestro ejemplo, supondremos que esta fracción es de 0,5 para cada "capa" de 0,2 cm y obtendremos los datos siguientes:

<i>Paso óptico</i>	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
<i>%T</i>	100	50	25	12,5	6,25	3,125
<i>Absorbencia</i>	0	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5

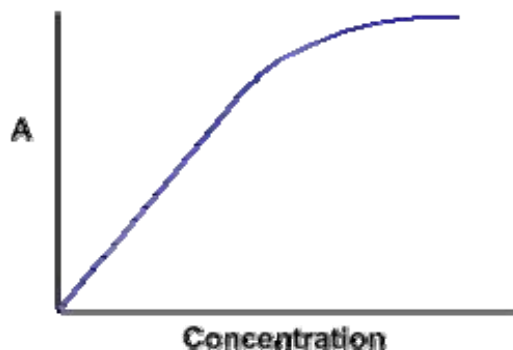
El gráfico de este comportamiento corresponde a la siguiente forma, exponencial:



La expresión $A = \epsilon bc$ nos dice que la absorbencia depende de la cantidad total de compuesto en el paso óptico de la luz a través de la celda. Si graficamos la absorbencia contra concentración, obtenemos una línea recta que pasa a través del origen (0,0).



Observe que la ley no es obedecida a concentraciones altas. Esta desviación de la ley se denomina negativa, cuando la parte curvada es ascendente se la denomina positiva.



Dado que la relación lineal entre concentración y absorbencia es sencilla y se mantiene a bajas concentraciones es la razón por la que preferimos expresar la ley de *Lambert - Beer* usando absorbencia como una medida de la absorción preferentemente a %T.

Pregunta: ¿Cuál es el significado de *absortividad molar*, ϵ ?

Respuesta: Para empezar despejémosla de $A = \epsilon bc$:

$$\epsilon = A / bc$$

En palabras, esta relación define a ϵ , “como la cantidad de luz absorbida por unidad de concentración”, o “la extinción causada por un mol de solución, teniendo en cuenta la concentración expresada en moles/L, lo que le explica el nombre con que también se la conoce, *coeficiente de extinción molar*.”

La *absortividad molar* es una constante para una sustancia particular, así si la concentración de la solución es reducida a la mitad, de igual manera se afectará la absorbencia, que es exactamente lo que usted supondría.

Refirámonos a un compuesto con un valor muy alto de *absortividad molar*, digamos $100\,000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, que está en una celda, con un paso óptico de 1 cm y la lectura de absorbencia es de 1.

$$\varepsilon = 1 / 1 c$$

Por lo tanto, $c = 1 / 100\,000 = 1 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$

Ahora, estudiemos un compuesto con un valor muy bajo de ε , por decir $20\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ que está en solución en un paso óptico de 1 cm y da una absorbencia de 1.

$$\varepsilon = 1 / 1 c$$

Por lo tanto, $c = 1 / 20 = 0,05\text{ mol L}^{-1}$

La respuesta es ahora evidente; un compuesto con una *absortividad molar* alta es muy eficaz absorbiendo luz (de la longitud de onda apropiada), y por tanto los compuestos con una *absortividad molar* alta pueden ser fácilmente identificados.

Pregunta: ¿Cuál es el *absortividad molar* de los iones Cu^{2+} en una solución acuosa de CuSO_4 ?. Es de $20\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ o $100\,000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$

Respuesta: Creemos que usted piensa que el valor más alto es el correcto, porque usted ha visto que las soluciones de sulfato de cobre tienen normalmente un bello color azul brillante. Sin embargo, el valor de la *absortividad* es $20\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

El color azul brillante que se observa es debido a que la concentración de la solución es muy grande.

El β -caroteno es un compuesto orgánico que se encuentra en vegetales y es responsable del color de las zanahorias. Se encuentra en concentraciones sumamente bajas. Usted no debe sorprenderse que la *absortividad molar* del β -caroteno es ¡ $100\,000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$!.

Revisión para aprendizaje:

- * Ahora has comprendido la ley de Beer;
- * Las diferentes formas en que se reporta la absorción, y como se relacionan las variables
- * Además de la importancia de la absorptividad molar y como ésta afecta el límite de detección de un compuesto en particular.

ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN UV-VIS

Principios Teóricos.

Introducción.

Muchas moléculas absorben luz visible o ultravioleta. La absorbencia de una solución aumenta cuando la atenuación del haz aumenta. La absorbencia es directamente proporcional a la longitud del paso óptico, b , y la concentración, c , de las especies absorbentes. La Ley de Beer establece que

$A = \epsilon bc$, donde ϵ es una constante de proporcionalidad, llamada absortividad molar.

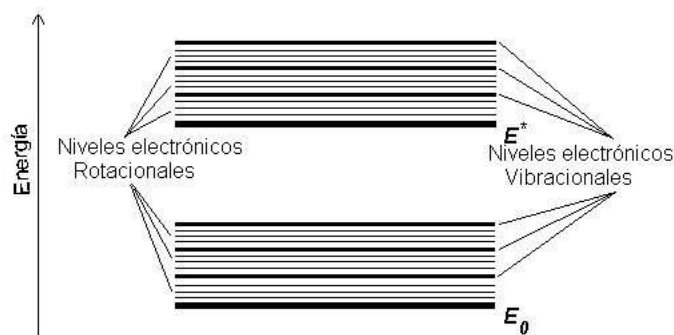
Muchas moléculas absorben radiación a longitudes de onda diferentes. Un espectro de absorción mostrará un número de bandas de absorción correspondientes a grupos estructurales que están dentro de la molécula. Por ejemplo, la absorción que se observa en la región UV para el grupo carbonilo en la acetona es de la misma longitud de onda que la absorción del grupo carbonilo en la dietilcetona.

Transiciones electrónicas

La absorción de radiación UV o visible corresponde a la excitación de los electrones externos. Hay tres tipos de transiciones electrónicas a considerar:

1. Transiciones que involucran electrones π , σ y n .
2. Transiciones que involucran electrones de transferencia de carga.
3. Transiciones que involucran electrones d y f .

Cuando un átomo o molécula absorbe energía, sus electrones son promovidos de su estado basal a un estado excitado. En una molécula los átomos pueden rotar o vibrar con respecto a ellos.



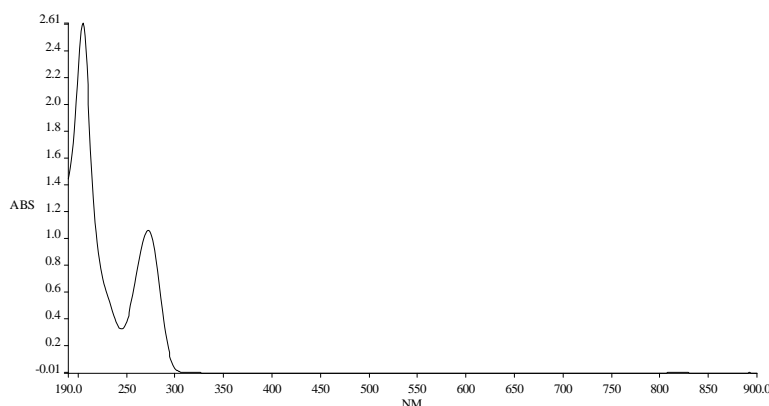
Estas vibraciones y rotaciones también tienen estados de energía discretos, que pueden ser considerados como empacados arriba de cada nivel electrónico.

Especies absorbentes que contienen electrones π , σ y n .

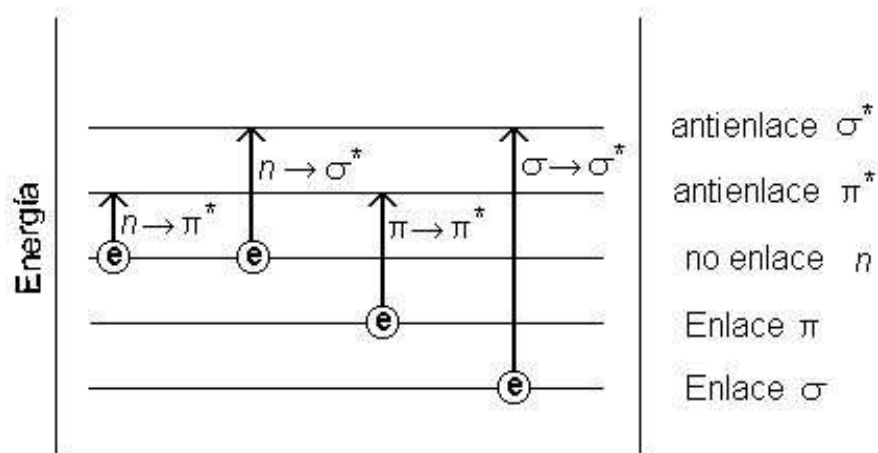
La absorción de radiación ultravioleta y visible en las moléculas orgánicas está restringida a ciertos grupos funcionales (cromóforos) que contienen electrones de valencia de baja energía de excitación. El espectro de una molécula que contiene estos cromóforos es complejo. Esto es debido a la superposición de transiciones rotacionales y vibracionales en las transiciones electrónicas que da una combinación de líneas sobrepuestas. Esto da como resultado una banda de absorción continua.

Espectro de absorción
UV-Vis de la cafeína,
correspondiente a las
transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$

(Proporcionado por D. Mendoza O.)



Las transiciones electrónicas posibles para los electrones π , σ , y n son;



Transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$

Un electrón en un orbital σ es excitado al orbital de antienlace correspondiente. La energía requerida es grande. Por ejemplo, el metano (que solo tiene enlace sencillos C-H, y sus electrones únicamente pueden efectuar transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$) muestra una absorción máxima a 125 nm. La absorción máxima debida a transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$ no se observa en un espectro típico UV-Vis (200 nm a 700 nm).

Transiciones $n \rightarrow \sigma^*$

Los compuestos saturados que contienen átomos con pares de electrones solos (electrones de no enlace) son capaces de efectuar transiciones $n \rightarrow \sigma^*$. Estas transiciones generalmente necesitan menor energía que las transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Pueden ser iniciadas por una radiación de longitud de onda en el rango de 150 nm a 250 nm. El número de grupos funcionales orgánicos con señales $n \rightarrow \sigma^*$ es pequeño.

Transiciones $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$

La mayoría de los estudios de espectroscopía de absorción, en la región UV, de compuestos orgánicos está basada en las transiciones de los electrones n y π al estado excitado π^* . Esto es debido a que las bandas de absorción para estas transiciones caen en una región del espectro (200 nm a 700 nm) experimentalmente útil. Estas transiciones necesitan un grupo insaturado en la molécula que proporcione los electrones π .

La absorptividad molar de las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ son relativamente pequeñas, con un rango de $10 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $100 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. En cambio las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ dan absorptividades molares del orden de $1\,000 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $10\,000 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

El disolvente de la muestra también tiene un efecto notable sobre el espectro de absorción. Las bandas de absorción de las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ son desplazadas a longitudes de onda menores (desplazamiento azul o hipsocrómico) cuando se incrementa la polaridad del disolvente. Esto es debido al incremento de la solvatación de los electrones n que da como consecuencia una disminución de la energía de su orbital.

Generalmente (aunque no siempre), el efecto opuesto (el desplazamiento rojo o batocrómico) se observa para las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$. Esto es debido a las fuerzas polares de atracción entre el disolvente y el absorbente, que disminuye la diferencia de energía entre los niveles basal y excitado. Este efecto es mayor para el estado excitado, y así la diferencia de energía entre los estados basal y excitado es ligeramente disminuida, dando como resultado un aumento en la longitud de onda de absorción (desplazamiento rojo o batocrómico). Este efecto también influye en las transiciones $n \rightarrow \pi^*$, pero es eclipsado por el efecto azul que resulta de la solvatación de los pares de electrones solos.

Ejemplos de grupos que absorben en la región ultravioleta:

Absorción Máxima para las Transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de algunos Grupos Funcionales		
GRUPO FUNCIONAL	TRANSICION, nm	
	$\pi \rightarrow \pi^*$	$n \rightarrow \pi^*$
	ABSORCION INTENSA	ABSORCION DEBIL
	170	
	170	
	166	280
	190	300
		340
		500
		665

Absorción Máxima y Absortividad Molar aproximada de la Transición $\pi \rightarrow \pi^*$ en varios Enlaces de Carbono.		
ESTRUCTURA	λ_{\max} nm	ϵ
- C = C -	170	16 000
- C = C - C = C -	220	21 000
- C = C - C = C - C = C -	260	35 000

Absorción Máxima para las Transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de algunos Grupos Funcionales		
GRUPO FUNCIONAL	TRANSICION, nm	
	$\pi \rightarrow \pi^*$	$n \rightarrow \pi^*$
	ABSORCION INTENSA	ABSORCION DEBIL
- C = O	166	280
- C = C - C = O	240	320
- C = C - C = C - C = O	270	350
1,4-Benzoquinona	245	435

Absorción de transferencia de carga

Muchas especies inorgánicas muestran absorción de transferencia de carga y se las llama *complejos de transferencia de carga*. Para que un complejo muestre el comportamiento de transferencia de carga, uno de sus componentes debe tener propiedades de donador de electrones y otro debe ser capaz de aceptar electrones. Así la absorción de radiación involucra la transferencia de un electrón del donador a un orbital asociado con el aceptor.

Las absorptividades molares de transferencia de carga son grandes (mayores de $10\,000\text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Transiciones que involucran electrones *d* y *f*.

Los compuestos y iones de los metales de transición presentan dos tipos de espectros electrónicos. Además de las bandas intensas de absorción por transferencia de carga (ϵ de 10^3 a 10^4) descritas anteriormente, presentan bandas débiles de absorción debidas al campo ligante (con valores de $\epsilon \approx 10^{-1}$ a 10^{-2}). Mientras que las bandas de transferencia de carga ocurren completamente en la región ultravioleta, las bandas de campo ligando, generalmente se encuentran en la zona visible, aún cuando pueden extenderse, ocasionalmente, al cercano infrarrojo o al cercano ultravioleta.

El color característico de los iones y complejos de los metales de transición puede ser atribuido siempre a la absorción del campo ligante. El nombre de campo ligante es debido a que el átomo o ion del metal de transición en el vacío tiene orbitales *d* los cuales están degenerados, o iguales en energía, mientras que la presencia de los ligantes produce un campo electrostático que fracciona los orbitales en niveles de energía diferentes.

Si las subcapas d o f están parcialmente llenas la radiación de longitud de onda puede causar transiciones electrónicas entre estos niveles de diferente energía.

El patrón de los fraccionamientos de los niveles de energía en un campo ligando depende de la simetría del complejo formado, puede tener estructura tetraédrica, octaédrica, tetragonal, o plano cuadrada., y la distribución de energía de los orbitales d será distinta. Y en el caso de que para un mismo metal haya varios compuestos con la misma simetría, los ligantes definirán las diferencias de energía, lo que se llama "*abertura del campo ligante*" y este efecto se apreciará en los espectros de absorción, que servirán para caracterizarlos.

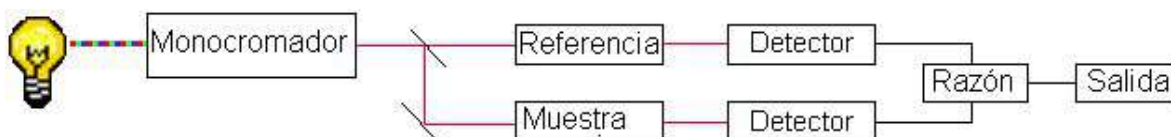
Revisión de aprendizaje

Ahora ya estás enterado de porque las moléculas absorben radiación en las regiones UV-Vis, y porque sus espectros de absorción tienen una forma tan característica.

ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN UV-VIS

Instrumentación.

Este es un diagrama esquemático de un espectrofotómetro UV-VIS de doble haz.



Los instrumentos para medir la absorción de radiación UV o visible constan de los siguientes componentes;

1. Fuentes (UV y visible).
2. Selector de longitud de onda (monocromador).
3. Área de muestra.
4. Detector.
5. Procesador de señal y presentación de lectura.

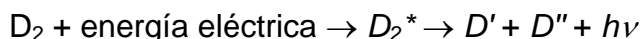
Cada de estos componentes serán considerados a continuación.

Componentes instrumentales.

Fuentes de UV radiación.

Es importante que el poder de la fuente de radiación no cambie bruscamente sobre el rango de longitud de onda.

La excitación eléctrica de deuterio o hidrogeno a baja presión produce un espectro UV continuo. El mecanismo para ésta implica la formación de una especie molecular excitada, D_2^* , que se rompe para dar dos especies atómicas y una fotón ultravioleta. Este puede ser mostrado como;



Las lámparas de deuterio e hidrógeno emiten radiación en el rango 160 nm a 375 nm. Es necesario usar ventanas y celdas de cuarzo, porque el vidrio absorbe radiación de longitud de onda menor que 350 nm.

Fuentes de radiación visible.

La lámpara de filamento de tungsteno se emplea comúnmente como una fuente de luz visible. Este tipo de lámpara es usada en el rango de longitud de onda de 350 nm a 2500 nm. La energía emitida por una lámpara de filamento de tungsteno es proporcional a cuatro veces la potencia del voltaje de operación. Esto significa que para que la energía de salida de la fuente sea estable, es necesario que el voltaje de lámpara sea verdaderamente estable. Para asegurar lo anterior, se usan reguladores de voltaje electrónico o transformadores.

Las lámparas de tungsteno/halógeno contienen una pequeña cantidad de yodo en la coraza de cuarzo, que también contiene el filamento de tungsteno. El yodo reacciona con el tungsteno gaseoso, formado por sublimación, produciendo el compuesto volátil WI_2 . Cuando las moléculas de WI_2 golpean el filamento descompuesto, vuelven a depositar tungsteno sobre en el filamento. El tiempo de vida de una lámpara de tungsteno/halógeno es aproximadamente el doble de una lámpara ordinaria de filamento de tungsteno. Las lámparas de tungsteno/halógeno son muy eficientes y la emisión cubre muy bien la región ultravioleta y visible. Por ello son utilizadas en muchos espectrofotómetros modernos.

Selector de longitud de onda (monocromador).

Todos los monocromadores contienen los siguientes componentes;

- Una rendija de entrada.

- Una lente colimadora.

- Un dispositivo de dispersión (normalmente un prisma o una rejilla).

- Una lente de enfoque.

- Una rendija de salida.

La radiación policromática (radiación de más que una longitud de onda) entra al monocromador a través de la rendija de entrada. El haz es colimado, y entonces llega al elemento de dispersión (rejilla de difracción o prisma) en cierto ángulo. El haz es dividido en sus longitudes de ondas componentes por la rejilla o el prisma. Moviendo el elemento dispersante o la rendija de salida, sale del monocromador la radiación de una longitud de onda particular (monocromática) a través de la rendija de salida.

SELECCIÓN DE ANCHURA DE LAS RENDIJAS

La anchura de banda efectiva de un monocromador depende de la dispersión de la red o del prisma así como de la anchura de las rendijas de entrada y salida.

Cuando se necesita resolver estrechas bandas de absorción o de emisión es preferible usar anchuras de rendija muy pequeñas.

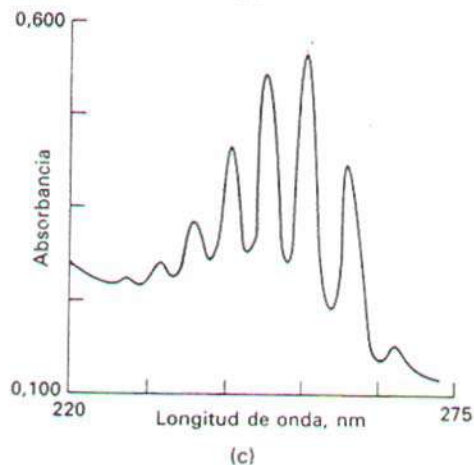
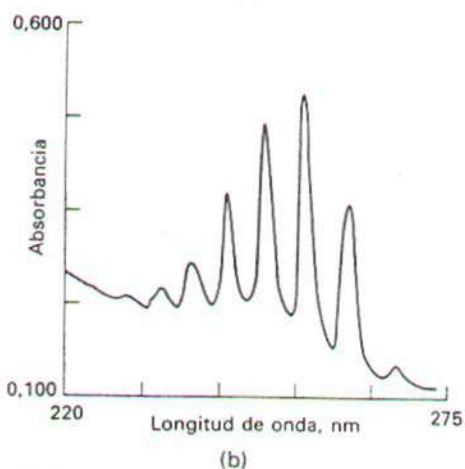
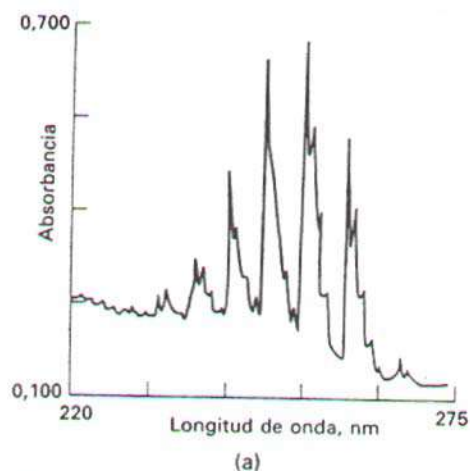
Por otra parte, un estrechamiento de las rendijas origina una disminución pronunciada de la potencia radiante disponible, siendo más difícil realizar mediciones exactas de dicha potencia.

Por lo tanto, las anchuras de rendija amplias pueden usarse más para los análisis cuantitativos que para los trabajos cualitativos, en los que el detalle espectral es importante.

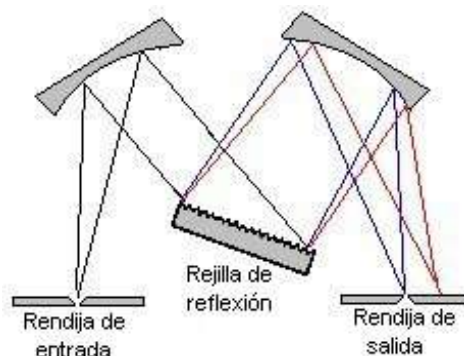
Efecto de la anchura de banda en los detalles espectrales:

(a) 0,5 nm; (b) 1,0 nm; (c) 2,0 nm.

(De V. A. Kohler, Amer. Lab., **1984** (11), 132. Copyright 1984 por International Scientific Communications, Inc.)



Monocromador del tipo
Czerney - Turner, con rejilla de
difracción.



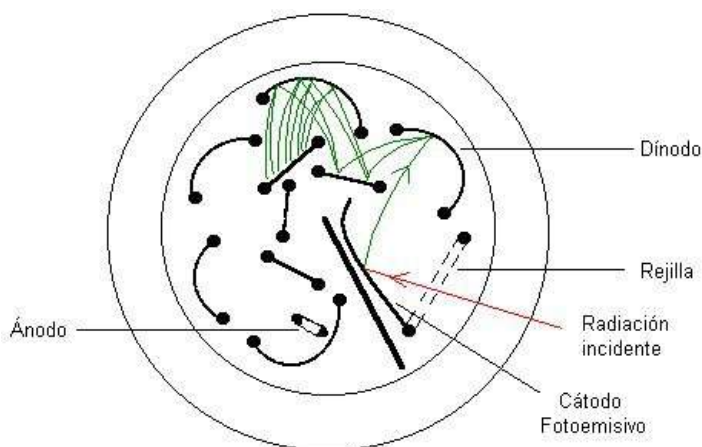
Celdas.

Los recipientes para la muestra y la solución de referencia deben ser transparentes a la radiación que pasará a través de ellas. Para espectroscopía en la región ultravioleta se requieren de cuarzo o sílice fundida. Estas celdas también son transparentes en la región visible. Aunque, en ella, pueden utilizarse vidrios de silicato para la fabricación de celdas transparentes entre 350 nm y 2 000 nm.

Detectores.

El tubo fotomultiplicador es el detector comúnmente utilizado en espectroscopia UV - Vis.

Consiste de un cátodo fotoemisor (un cátodo que emite electrones cuando es alcanzado por fotones de radiación), varios dínodos (que emiten varios electrones por cada electrón que choca con ellos) y un ánodo.



Sección transversal de un tubo fotomultiplicador

Un fotón de radiación entra al tubo y choca sobre el cátodo, causando la emisión de varios electrones. Estos electrones son acelerados hacia el primer dínodo (que es 90 V más positivo que el cátodo). El choque de los electrones sobre el primer dínodo, causa la emisión de varios electrones por cada electrón incidente. Éstos son entonces acelerados hacia el segundo dínodo, para producir más electrones que son acelerados hacia el tercer dínodo y así sucesivamente. Finalmente, los electrones son recogidos en el ánodo. En ese momento, cada fotón original ha producido $10^6 - 10^7$ electrones, la corriente resultante es amplificada y medida.

Los fotomultiplicadores son muy sensibles a la radiación UV y visible. Tienen tiempos de respuesta rápida. La luz intensa daña los fotomultiplicadores por ello están limitados a medir radiación de baja potencia.

El arreglo lineal de fotodiodos es un ejemplo de un detector multicanal de fotones. Este detector es capaz de medir todos los elementos de un haz de radiación dispersada simultáneamente.

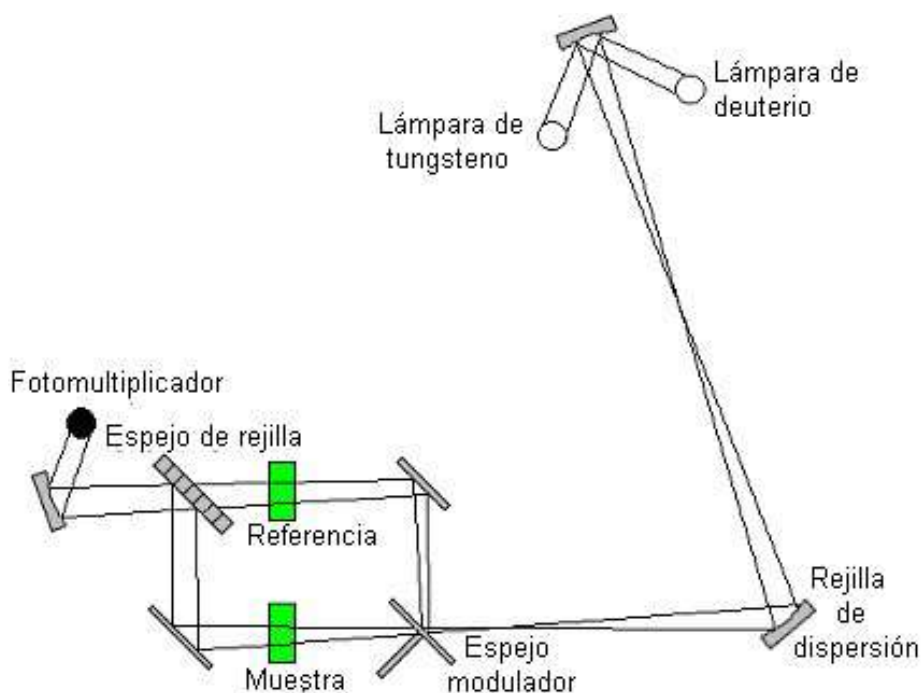
Un arreglo lineal de fotodiodos consta de muchos fotodiodos de silicio pequeños dispuestos en un chip sencillo de silicio. Donde puede haber entre 64 a 4 096 elementos sensores, los más comunes son de 1 024 fotodiodos. Por cada diodo hay también un capacitor de almacenaje y un conector. El circuito individual diodo-capacitor puede ser examinado secuencialmente.

Cuando se usa. el arreglo de fotodiodos está posicionado en el plano focal del monocromador (después del elemento dispersante) de tal manera que el espectro llega sobre el arreglo de diodos. Este detector es útil para registrar rápidamente espectros de absorción en UV-Vis de muestras, cuando la radiación pasa a través de una celda de flujo, tal como en un detector de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Dispositivo acoplados de carga (CCDs). Es similar al detector de arreglo de diodos, pero en lugar de diodos consisten de un arreglo de fotocapacitores.

Revisión para aprendizaje.

Ahora habrás comprendido sobre los componentes que constituyen un espectrofotómetro, y como se disponen en un instrumento manual de doble haz (de la Hitachi 100 - 60), observa que el haz pasa simultáneamente a través de ambas celdas.



¿Entiendes que hace cada componente?

A continuación observarás el exterior de un equipo de un solo haz, identifica cada parte con el diagrama superior.



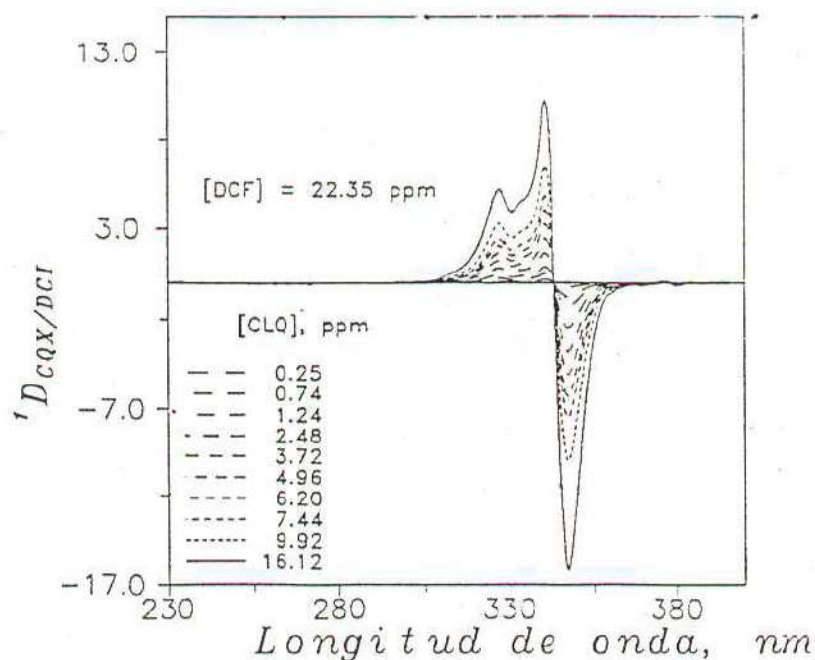
Esta es una ilustración de un espectrofotómetro de doble haz.



TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA DE DERIVADAS

Se da la denominación de la derivada de un espectro a la representación gráfica en un intervalo dado de longitudes de onda, del cociente diferencial $dA/d\lambda$, donde "A" representa la Absorbancia de un espectro normal y " λ " la longitud de onda. Dicho de otro modo, se trata de la representación gráfica de la pendiente del espectro normal a cada longitud de onda en el intervalo medido.

La representación gráfica del cociente diferencial mencionado se le conoce como la primera derivada del espectro, cabe mencionar que matemáticamente es posible la representación de derivadas de orden superior de A respecto a la longitud de onda, originándose así la segunda derivada de los espectros ($d^2A/d\lambda^2$) y, en general, la n-ésima derivada de los espectros, o de orden "n", ($d^n A/d\lambda^n$).



VENTAJAS DE LA ESPECTROSCOPÍA DE DERIVADAS

1. Medida exacta de λ_{MAX} . La primera derivada de un espectro resulta muy útil para determinar la posición exacta de sus máximos de absorción, ya que estas λ_{MAX} vienen determinadas por el punto de corte de la curva con el eje de las abscisas, o en otras palabras, el máximo de la derivada de un espectro se da en aquella(s) longitud(es) de onda en que el valor de la derivada es igual a cero.

2. Mejor Resolución de los Espectros. Una ventaja importante es la mejor resolución en que aparece la estructura fina que, en ocasiones, es complicado ver en un espectro normal.

En este caso, conviene más emplear la segunda derivada, ya que los máximos y mínimos del espectro convencional y de la segunda derivada parecen prácticamente a las mismas longitudes de onda y la estructura fina se manifiesta mejor en la segunda derivada.

3. Análisis de Muestras turbias. Las disoluciones turbias presentan, en general, un aumento continuo de absorbancia hacia longitudes de onda más cortas, no observándose variación espectral importante en la primera y segunda derivada. Por tanto, en el registro de la derivada de los espectros en presencia de turbidez, se elimina el efecto de la absorción de fondo debido a ésta.

4. Determinaciones Cuantitativas en sistemas de dos o más componentes. Esta es la aplicación más importante y extensa de la espectroscopía de derivadas, se hace imprescindible en el caso en que se presenta gran solapamiento entre los espectros de absorción de los componentes a determinar.

En espectroscopía convencional, estos picos sólo pueden ser utilizados aceptando grandes errores sistemáticos. Por el contrario, la espectroscopía de derivadas permite su utilización con errores sistemáticos pequeños e incluso despreciables.

A continuación se muestran en la Figura 1 los espectros de absorción de la ampicilina sódica (a), la dicloxacilina sódica (b) y de la mezcla (c). Observe la sobreposición de los espectros de (a) y (b) en la porción aproximada a 200 nm, además de que (b) tiene una mayor absorción en toda la zona espectral utilizada, por lo que no podríamos realizar estudios cuantitativos ni una caracterización confiable.

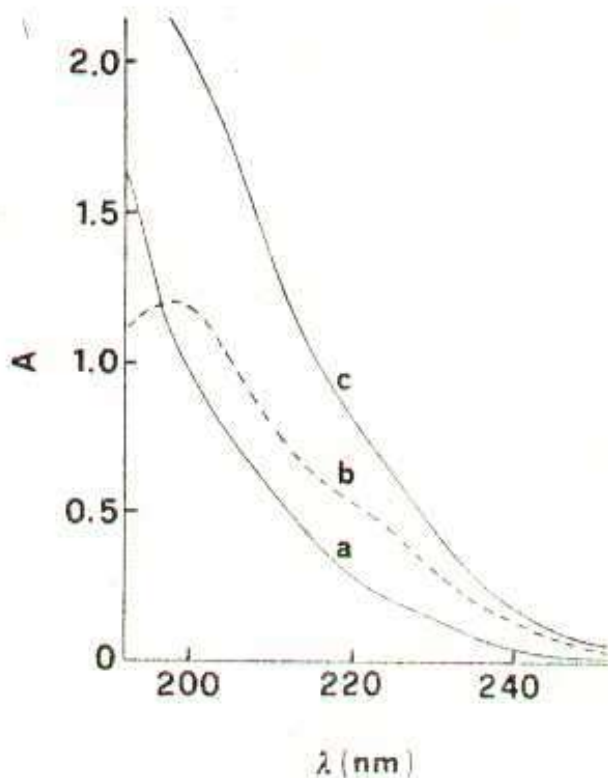


Figure 1—Absorption spectra of (a) ampicillin Na (16 $\mu\text{g/mL}$), (b) dicloxacillin Na (12 $\mu\text{g/mL}$), and (c) mixture of ampicillin Na and dicloxacillin Na (16 plus 12 $\mu\text{g/mL}$, respectively). The reference was water.

0022-3549 88/1200-1042\$01.00/0
© 1988, American Pharmaceutical Association

Si obtenemos la primera derivada de los espectros, Figura 2, se aprecian diferencias, puesto que ya se empiezan a resolver mejor. Finalmente en la segunda derivada de los espectros es notoria la estructura fina que nos permite diferenciar para este caso los puntos de *cruce en cero* para la ampicilina sódica en 248,8 nm y para la dicloxacilina sódica en 215,2 nm y 221,6 nm que nos servirían para realizar estudios cuantitativos además de los mínimos notoriamente definidos que nos ayudan a su caracterización.

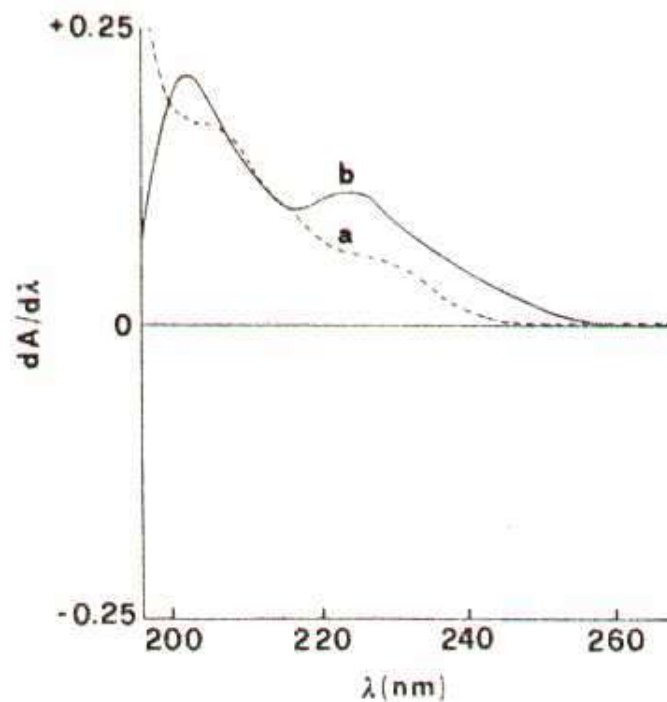


Figure 2—First-derivative spectra of (a) ampicillin Na (16 $\mu\text{g/mL}$) and (b) dicloxacillin Na (12 $\mu\text{g/mL}$). The reference was water.

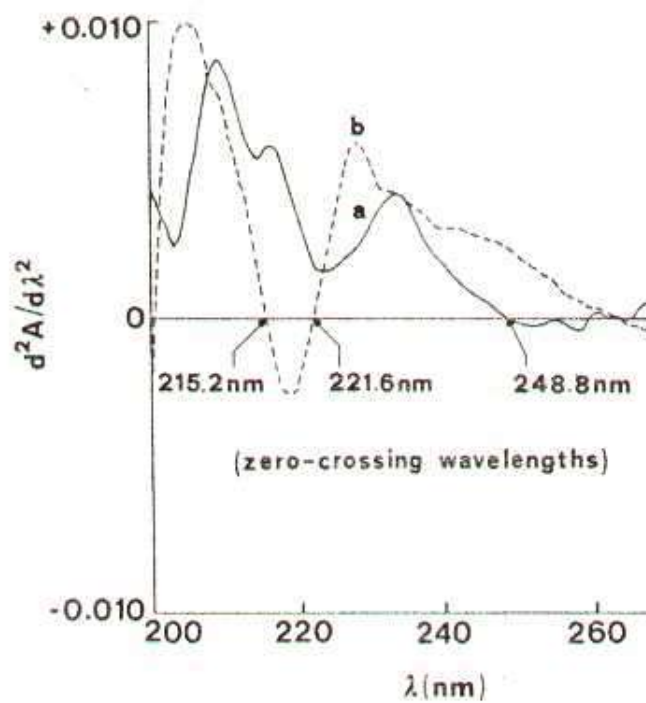


Figure 3—Second-derivative spectra of (a) ampicillin Na (16 $\mu\text{g/mL}$) and (b) dicloxacillin Na (12 $\mu\text{g/mL}$). The reference was water.

CRITERIOS PARA SELECCIONAR METODOS ANALITICOS

CRITERIO	PARÁMETRO DE CALIDAD
1.- Precisión	Desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, coeficiente de variación, varianza.
2.- Exactitud	Error absoluto sistemático, error relativo sistemático.
3.- Sensibilidad	Sensibilidad de calibración, sensibilidad analítica.
4.- Límite de detección	Blanco más tres veces la desviación estándar del blanco.
5.- Intervalo de concentración	Concentración entre el límite de cuantificación (<i>LOQ</i>) y el límite de linealidad (<i>LOL</i>).
6.- Selectividad	Coeficiente de selectividad.

1. *Precisión*: Es el grado de concordancia mutua entre los datos que se han obtenido de una misma forma. La precisión mide el error aleatorio, o indeterminado, de un análisis. Para fines analíticos es recomendable expresarlo en términos de repetibilidad y reproducibilidad, siendo el primero referido al trabajo de un analista en un día y el segundo al trabajo de varios analistas en diferentes días aplicando en mismo método.

Términos para expresar la Precisión	Definición
Desviación estándar absoluta, s	$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$
Desviación estándar relativa, (RSD)	$RSD = \frac{s}{\bar{x}}$
Desviación estándar de la media, s_m	$s_m = \frac{s}{\sqrt{N}}$
Coeficiente de variación, CV	$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$
Varianza	s^2
<ul style="list-style-type: none"> x_i = valor numérico de la iésima medida. $\bar{x} = \text{media de N medidas} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$	

2.- Exactitud. Indica la proximidad de una medida a su valor aceptado y se expresa en términos de error. La exactitud mide el error sistemático, o determinado, de un método analítico. A mayor concordancia mayor exactitud.

$$E = x_i - x_t \quad x_i \text{ Valor observado; } x_t \text{ Valor aceptado}$$

En general, al desarrollar un método analítico, todos los esfuerzos se dirigen hacia la identificación de la fuente de error y a su eliminación o corrección mediante el uso de blancos y la calibración del instrumento.

Análisis de errores.

Tipos de Errores Experimentales.

Errores Sistemáticos: son por lo general de un solo signo. Pueden en principio ser eliminados.

Errores Aleatorios: son fluctuaciones tanto positivas como negativas. Las fuentes de este tipo de error no siempre se pueden identificar.

Los errores sistemáticos pueden ser de cuatro tipos:

1. Instrumentales: Equipos o instrumentos no calibrados.
 2. Observacionales: Por ejemplo errores de paralaje al tomar las lecturas en una escala.
 3. Del medio ambiente: Fluctuaciones impredecibles en las condiciones en las que se realiza el experimento; temperatura, humedad, alimentación eléctrica, que afectan los valores de las lecturas haciéndolos consistentemente más bajos o altos del valor verdadero.
 4. Teóricas: Simplificaciones del modelo o aproximaciones en las ecuaciones que lo describen. Por ejemplo no incluir los efectos de fuerzas de fricción en un modelo mecánico.
-
3. Sensibilidad. La sensibilidad de un instrumento o de un método mide su capacidad de discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito.
Dos factores limitan la sensibilidad: la pendiente de la curva de calibración y la reproducibilidad o precisión del sistema de medida.

Sensibilidad de calibración (IUPAC) *Union of Pure and Applied Chemists*.

$$S = mc + S_{bl}$$

S señal medida, c es la concentración del analito, S_{bl} es la señal instrumental para un blanco y m es la pendiente de la línea recta. En dichas curvas, la sensibilidad de calibración es independiente de la concentración c y simplemente es igual a m .

Sensibilidad Analítica (J. Mandel y R.D. Stiehler, *J. Res. Natl. Burd. Std.*, **1964**, A53, 155)

$$\gamma = \frac{m}{s}$$

m es la pendiente de la curva de calibración
 s es la desviación estándar de las señales

4. *Límite de Detección*. La definición cualitativa más aceptada del límite de detección viene dada por la concentración o el peso mínimo de analito que pueden detectarse para un nivel de confianza dado. Este límite depende de la relación entre la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones estadísticas de la señal del blanco.

La mínima señal analítica distinguible S_m se toma por tanto como la suma de la señal media del blanco S_{bl} más un múltiplo k de la desviación estándar del mismo. Esto es:

$$S_m = S_{bl} + kS_{bl} \quad k = 3,3$$

Experimentalmente S_m se puede determinar realizando 20 ó 30 medidas del blanco, preferiblemente a lo largo de un período de tiempo extenso. A continuación, los datos se tratan estadísticamente para obtener S_{bl} y s_{bl} . Al final se sustituye S_m en la ecuación de la recta de calibración y se reordena para dar:

$$LD = \frac{3,3 s_{bl}}{m}$$

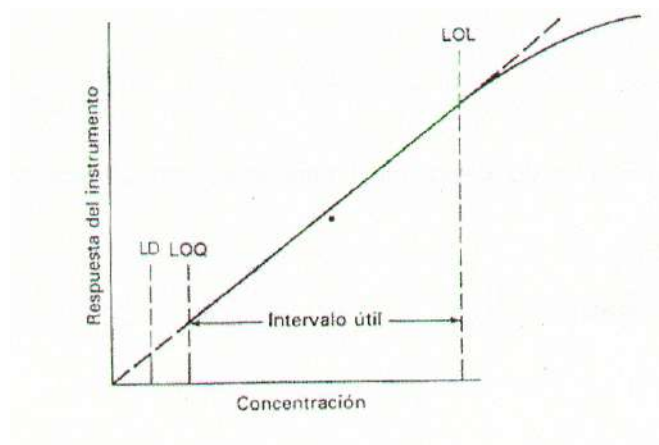
Donde s_{bl} es la desviación estándar de las señales del blanco.

5. Límite de cuantificación.

Es la concentración más pequeña con la que puede realizarse medidas cuantitativas.

Puede ser expresado de la siguiente manera:

$$LD = \frac{10 s_{bl}}{m}$$



En la figura se aprecia el intervalo útil de un método analítico, representado como la porción de la recta comprendida entre LOQ (límite de cuantificación) y LOL (límite de respuesta lineal), LD es el límite de detección.

5. Selectividad. La selectividad de un método analítico denota el grado de ausencia de interferencias debidas a otras especies contenidas en la matriz de la muestra.

Otras características a tener en cuenta en la elección del método.

1. Velocidad
2. Facilidad y comodidad
3. Habilidad del operador
4. Coste y disponibilidad del equipo
5. Coste por muestra

RESUMEN PARA EL TRATAMIENTO DE INCERTIDUMBRES ALEATORIAS

1. Repita las mediciones N veces.
2. Calcule x_{prom} , la desviación estándar s, y la desviación estándar del promedio s_m . Reporte los resultados como:

$$X_{prom} \pm s_m$$

O bien puede reportar, calculando el coeficiente de variación (CV o % RSD)

$$X_{prom} \pm CV \quad \text{o} \quad X_{prom} \pm \%RSD$$

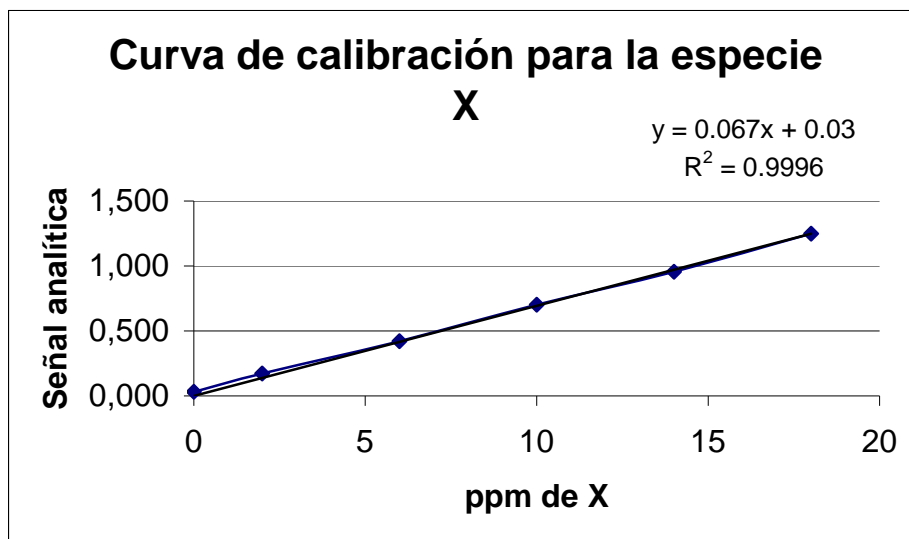
Ejercicio para el Cálculo de Sensibilidad y Límite de Detección.

Los siguientes datos de calibración se obtuvieron por medio de un método instrumental para la determinación de la especie X en solución acuosa.

Conc. de X C_x ppm	No. de repeticiones	Media de la señal analítica,	Desviación estándar
0,00	25	0,031	0,0079
2,00	5	0,173	0,0094
6,00	5	0,422	0,0084
10,00	5	0,702	0,0084
14,00	5	0,956	0,0085
18,00	5	1,248	0,0110

- Calcule la sensibilidad de calibración.
- Calcule la sensibilidad analítica a cada concentración.
- ¿Cuál es el límite de detección del método?
- Calcule el coeficiente de variación para la media de cada serie de repeticiones.

Respuesta



- $m = 0,067 \text{ ppm}^{-1}$
- y d)

C_x	$\gamma = m/s_x$	CV
2,00	71	5,4 %
6,00	80	2,0
10,00	80	1,2
14,00	79	0,89
18,00	61	0,88

- $LD = 0,39 \text{ ppm}$

USO DE LOS DISOLVENTES EN LAS DETERMINACIONES ANALÍTICAS.

Los disolventes utilizados en espectrofotometría deben de cumplir con ciertos requisitos para asegurar resultados exactos y precisos.

- a) El disolvente escogido debe disolver la muestra y debe de ser compatible con los materiales de las celdas.
- b) El disolvente también debe ser relativamente transparente en la región espectral de interés.
- c) Para evitar una pobre resolución y dificultades en la interpretación de los espectros, un disolvente no debe ser utilizado para mediciones cerca o debajo de su longitud ultravioleta de corte, esto es, la longitud de onda en la cual la absorbencia del disolvente solo se aproxima a una unidad de absorbencia.
- d) La curva de absorbencia de un disolvente tal como se suministra, no debe de tener picos de impurezas extrañas en la región de interés. Por lo que se recomienda para análisis con un límite de detección bajo, utilizar disolventes grado espectroscópico.

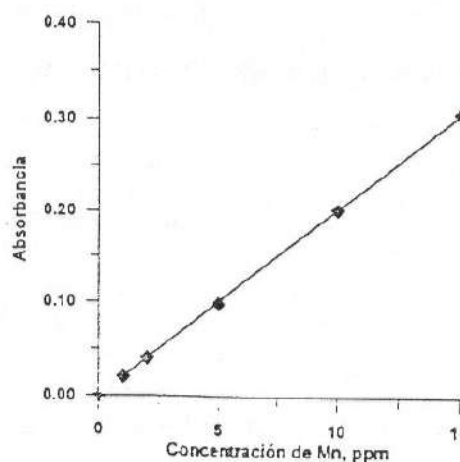
DISOLVENTES GRADO ESPECTROSCÓPICO CON SU LONGITUD DE ONDA DE CORTE EN EL RANGO ULTRAVIOLETA.

DISOLVENTE	λ (nm)
Acido Acético	260
Acetona	330
Acetonitrilo	190
Cloroformo	245
Ciclohexano	210
Etanol	210
Metanol	210
Tolueno	286
Metil-etil cetona	330
Agua	191

RESUMEN DE PASOS PARA REALIZAR UN ANÁLISIS CUANTITATIVO.

1. Seleccione la longitud de onda adecuada para realizar el análisis.
2. Prepare estándares de diferentes concentraciones, dentro del rango lineal.
3. Lea absorbencia de los estándares a la longitud de onda seleccionada.
4. Construya un gráfico absorbencia en función de la concentración.
5. Determine la absorbencia de la muestra problema.
6. Auxiliado con algún programa como Lotus 123, Excel, etc., realice una regresión lineal para calcular la ecuación de la recta. Calcule la concentración de la muestra problema con los datos obtenidos de la ecuación de la recta.
7. En caso de haber realizado dilución, calcule la concentración real de la muestra.

Curva de calibración
para manganeso en forma
de ion permanganato por
espectrofotometría
UV-VIS. ($\lambda = 545 \text{ nm}$)



Características de la determinación de manganeso obtenidas por espectrofotometría UV-VIS.

Función de calibración	$y = 0.02046 X - 0.00105$
Coeficiente de correlación R^2	0.9999
Límite de detección	$0.21 \mu\text{g mL}^{-1}$
Límite de cuantificación	$0.70 \mu\text{g mL}^{-1}$
Precisión (CV, %) $c = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$	7.4%
Precisión CV, (%) $c = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$	0.7%

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN ESPECTROFOTOMETRIA DE ULTRAVIOLETA-VISIBLE.

- Verifique el espectrofotómetro una vez a la semana, utilizando el material de referencia de óxido de holmio para verificar la escala de longitud de onda. En caso de alguna desviación de los parámetros revisados con el material de referencia, solicite el servicio del proveedor para su revisión.
- Antes de encender el espectrofotómetro verifique que el compartimento de muestras está vacío.
- Recuerde que el equipo es de doble haz por lo que el ajuste a cero se realiza colocando en la celda de atrás y en la del frente la solución de referencia.
- Tome las celdas siempre de la parte esmerilada para evitar dejar manchas de grasa de las manos por donde atraviesa la luz.
- Mantenga las celdas limpias, después de usarlas se deben limpiar con metanol y dejarlas secar.
- Seque las celdas con un pañuelo desechable suave humedecido con metanol, si se encuentran muy sucias emplee jabón líquido al 20% v en agua destilada y límpielas con un cotonete, después enjuague abundantemente para eliminar totalmente el detergente y enjuague con agua deionizada, al final con metanol.
- Procure colocar las celdas siempre hacia el mismo lado. Generalmente traen unas letras en la parte superior, éstas pueden tomarse como referencia para mantener siempre la misma posición.
- Nunca sacuda las celdas para eliminar los restos de líquido, mejor permita que escurran sobre un papel absorbente.
- Cuando se analicen sustancias volátiles utilice las celdas con tapa.
- Nunca introduzca las celdas en el portamuestras del espectrofotómetro con restos de líquido en la parte externa.
- Las celdas deben llenarse a $\frac{3}{4}$ de su capacidad, el volumen equivale a 3 mL.

CALIBRACIÓN DEL ESPECTROFOTÓMETRO ULTRAVIOLETA-VISIBLE

I. Caracterización del Espectrofotómetro.

1.1 Caracterización de la escala de longitud de onda.

1.1.1 Caracterización de la longitud de onda con el uso del óxido de holmio.

1.1.2 Caracterización de la longitud de onda con el uso de la lámpara de mercurio.

1.1.3 Caracterización de la longitud de onda con el uso de óxido de didymio (neodimio y praseodimio).

1.2 Caracterización de la escala fotométrica.

1.2.1 Caracterización de la escala fotométrica con el uso de filtros.

II. Pruebas Espectrofotométricas.

2.1 Linealidad de la escala fotométrica.

2.2 Ruido fotométrico.

2.3 Estabilidad fotométrica.

2.4 Línea base plana.

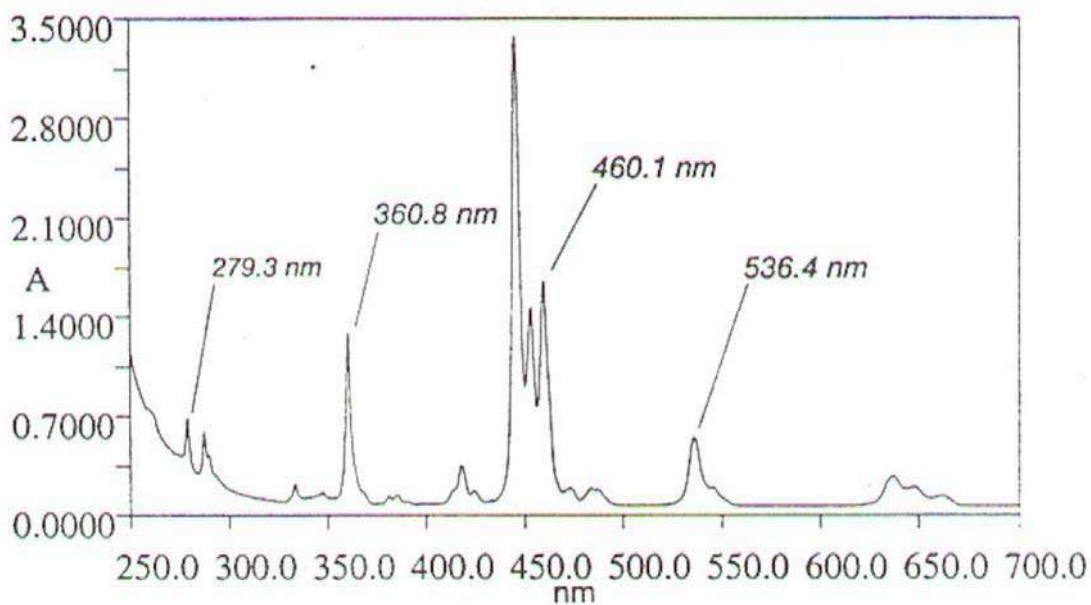
2.5 Confirmación de ancho de banda espectral.

2.6 Energía radiante extraviada.

2.7 Angulo de incidencia.

CALIBRACIÓN DE UN ESPECTROFOTÓMETRO ULTRAVIOLETA-VISIBLE.

El equipo se calibra obteniendo el espectro de una solución de nitrato de holmio o de un cristal de óxido de holmio comparando los picos obtenidos con lo reportado para la calibración.



Espectro de Absorción del cristal de óxido de holmio

Sesión Práctica

1. Se mostrarán los diferentes equipos de Espectroscopía Uv-vis y su funcionamiento.

Coleman

Lambda 4b

Lambda 40

2. Identifique los diferentes tipos de celdas y las fuentes de Deuterio y de tungsteno.

3. Se mostrará el cristal de Oxido de Holmio y de Didimio y obtenga su espectro para la verificación del equipo.

4. Obtenga el espectro de la celda de plástico y de vidrio para ver su rango de transparencia.

5. Obtenga los espectros de los disolventes más comunes (ciclohexano, cloroformo, acetona, metanol, etanol, ácido clorhídrico 0,1N, hidróxido de sodio 0,1 N y agua).

6. Obtenga los espectros de fenol y anilina para observar cambios del espectro con el pH.

7. Determinación espectrofotométrica de fierro con 1,10 fenantrolina.

Construya curva de calibración.

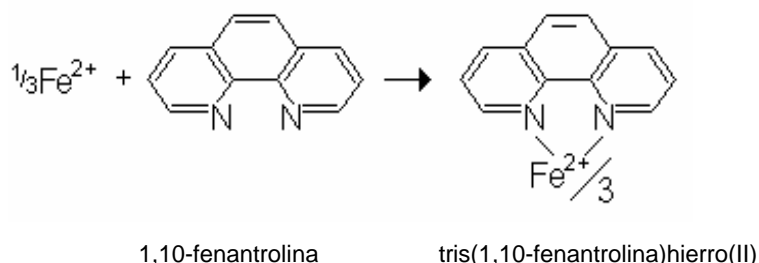
Calcule límite de detección

Calcule límite de cuantificación

DETERMINACION ESPECTROFOTOMÉTRICA DE HIERRO

TEORIA: Se forma un complejo de hierro (II) con 1,10-fenantrolina $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{2+}$, y con un espectrofotómetro se mide la absorbancia de esta solución colorida. Se grafica el espectro para determinar el máximo de absorción. Se añade hidroxilamina (como clorhidrato para aumentar la solubilidad) para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} y mantenerlo en este estado.

ECUACIONES:



SOLUCIONES Y PRODUCTOS QUIMICOS QUE SE NECESITAN:

1. *Solución estándar de hierro (II).* Prepare una solución estándar de hierro pesando 0.0702 g de sulfato férrico amónico, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Transfiera cuantitativamente la muestra pesada a un matraz volumétrico de un litro y añada suficiente agua para disolver la sal. Añada 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, afore exactamente hasta la marca con agua destilada y mezcle a la perfección. Esta solución contiene 10,0 mg de hierro por litro (10 ppm); si se pesa una cantidad distinta a la indicada, calcule la concentración.
2. *Solución de 1,10 fenantrolina.* Disuelva 100 mg de monohidrato de 1,10-fenantrolina en 100 ml de agua.
3. *Solución de cloruro de hidroxilamonio.* Disuelva 10 g de cloruro de hidroxilamonio en 100 ml de agua.

4. *Solución de acetato de sodio.* Disuelva 10 g de acetato de sodio en 100 ml de agua.

PROCEDIMIENTO: Añada con pipeta a una serie de matraces volumétricos de 25 mL, 0,2 mL, 1,5 mL, 2,5 mL, 5 mL y 6,5 mL de la solución estándar de hierro. Coloque 12,5 mL de agua destilada en otro matraz volumétrico de 25 mL para emplearla como blanco. La muestra problema también debe colocarse en un matraz volumétrico de 25 mL. A cada matraz (incluyendo el problema) añada 0,3 mL de solución de cloruro de hidroxilamonio y 1,5 mL de solución de 1,10-fenantrolina. Amortigue cada solución añadiendo 2,0 mL de acetato de sodio hasta que se produzca el color rojizo de la 1,10-fenantrolina ferrosa (el complejo de hierro (II)) y la fenantrolina se forma a un pH de 2 a 9. El acetato de sodio neutraliza el ácido presente y ajusta el pH a un valor al que se puede efectuar la formación del complejo. Antes de efectuar las mediciones de absorbancia, deben transcurrir por lo menos 15 minutos después de haber añadido los reactivos, para que el color del complejo se desarrolle en su totalidad. Una vez desarrollado, el color es estable durante varios días. Diluya cada solución a 25 mL exactamente. Los estándares corresponden a 0,08, mg/L 0,6 mg/L, 1, 2 mg/L y 2,6 mg/L de hierro, respectivamente.

Obtenga el espectro de absorción de la solución de 2,6 mg/L midiendo la absorbancia de 400 nm a 700 nm aproximadamente (o el ámbito que abarque el instrumento). Tome lecturas a intervalos de 25 nm hasta llegar cerca del máximo de absorción, en cuyo caso deben tomarse lecturas a intervalos de 5 nm o 10 nm. Siga las indicaciones del instructor para manejar el aparato. La solución de referencia será el blanco. Haga un gráfico de la absorbancia en función de la longitud de onda y elija la longitud de absorción máxima. Basándose en la concentración molar de la solución de hierro y en la longitud de la celda, calcule la absorptividad molar del complejo de hierro (II)-fenantrolina en el máximo de absorción.

Prepare una curva de calibración midiendo la absorbancia de cada una de las soluciones estándar a la longitud de onda de máxima absorbancia. Mida el problema del mismo modo. Haga un gráfico de la absorbancia de los estándares en función de las concentraciones en mg/l. A partir de esta grafica y la absorbancia del problema, determine la concentración final de hierro en la solución problema.

Calcule el **límite de detección y cuantificación** preparando 5 soluciones blanco (agua, solución de 1,10 fenantrolina, solución de acetato de sodio, corrija la línea de fondo con agua. Realice las lecturas de las soluciones de los blancos a la misma longitud de onda de máxima absorción del complejo de hierro (II)-fenantrolina. Calcule la desviación estándar de las lecturas de absorbancia y emplee las ecuaciones para calcular el límite de detección y de cuantificación.

GLOSARIO DE TÉRMINOS UTILIZADOS EN ESPECTROSCOPIA

Absorbencia: Medida de concentración del material presente: \log (de base 10) negativo de la Transmitancia ($-\log T$) del producto de coeficiente de extinción, paso óptico y la concentración escrito como $A = \epsilon bc$ y en función de T , $A = \log(1/T)$. La absorbencia es adimensional.

Absortividad: Probabilidad de absorber la luz a una longitud de onda particular por un analito específico bajo condiciones específicas, por ejemplo, pH, disolvente y temperatura. Así una cantidad específica de material a condiciones determinadas absorberá una fracción específica de la luz que chocó con él.

Absortividad es abreviado por una ϵ o por una a . Se usa ϵ cuando la concentración se expresa en Moles/L y sus unidades son $\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a es para cuando las unidades de concentración son en cualquier otro tipo y se hace el ajuste que corresponda a la expresión $A/b(\text{cm})$ Concentración.

Ajuste: Es la selección de las condiciones apropiadas para el funcionamiento adecuado de un instrumento, o de un sistema de medición.

Alcance de medición: Conjunto de valores del mensurando, para los cuales se supone que el error de un instrumento de medición se encuentra entre límites especificados.

Analito: El material particular o cualidad a ser determinada en un análisis.

Anchura de Rendija: Tamaño de la abertura de la rendija a través de la cual emerge la luz. El tamaño depende del rango de la longitud de onda, habilidad de separación del selector de longitud de onda y aislamiento deseado de longitud de onda específica. Generalmente fijada o programada automáticamente.

Calibración: Conjunto de operaciones que establecen, bajo condiciones especificadas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o un sistema de medición o los valores representados por una medida materializada y los valores correspondientes realizados por los patrones o materiales de referencia.

Colorímetros: Los colorímetros utilizan el ojo humano como detector y el cerebro como transductor. Los métodos colorimétricos requieren siempre la utilización de uno o más patrones en el momento en el que se realiza el análisis.

Concentración: La cantidad de un soluto en un volumen determinado de solución, Ej., moles por litro.

Corte de Disolvente: La longitud de onda en la cual el disolvente absorbe una porción significativa de la luz, causando una pérdida de la señal e inhabilidad para ejecutar un análisis. En otras palabras, el disolvente se vuelve opaco a las longitudes de onda usadas. Esto es común en el ultravioleta, raro en la zona visible. En forma práctica es la longitud de onda que corresponde a un absorbencia de uno, utilizando una celda de 1 cm de paso óptico.

Cubeta o celda: Receptáculo transparente en el cual las soluciones de muestra son introducidas en la senda de la luz del espectrómetro. Generalmente cuenta con dos lados iguales Ej., 1 cm, 1 cm mientras que la tercera dimensión es alargada posiblemente tan grande como 15 cm. Para trabajos en ultravioleta, el material es cuarzo. El trabajo en zona visible permite utilizar celdas de vidrio o plástico.

Curva de Calibración: Los resultados de una calibración cuando son graficados, generalmente en coordenadas Cartesianas, Ej., concentración (en molaridad) contra la absorbencia.

Detector: Dispositivo usado para detectar la intensidad de la radiación de la muestra de los haces de la muestra o referencia. Generalmente un diodo de silicio sencillo o un tubo fotomultiplicador más sensible.

Disolvente: Líquido usado para disolver la muestra a analizar. Comúnmente agua o metanol de alta pureza. Generalmente designado, especialmente o purificado para trabajo en ultravioleta , Ej., "Spectro-Quality" o "Spectro-Grade".

Espectro: Series de longitudes de onda de la radiación, pertenecientes a una porción específica del electromagnético continuo, Ej. El espectro visible, donde los "colores" son examinados aumentando la longitud de onda. Para la porción visible del continuo, los colores son rojo, anaranjado, amarillo, verde, azul, índigo y violeta.

Espectrofotómetro de Doble Haz: Es un instrumento en el cual el haz se divide para permitir la comparación de la muestra y el disolvente (o reactivo que sirve como blanco) al mismo tiempo. Por lo general, la operación de este aparato está muy automatizada.

Espectrofotómetro de Simple Haz (Un solo haz): Es un instrumento que tiene una trayectoria óptica. La muestra y el disolvente puro (o el reactivo que funciona como blanco) se examinan por separado para establecer P y P_0 y realizar las mediciones de absorbencia. Por lo general, se opera en forma manual.

Error aleatorio: Es el resultado de una medición menos la media de un número infinito de mediciones del mismo mensurando, efectuadas éstas en condiciones de repetibilidad.

Error de medición: Es el resultado de una medición menos un valor convencionalmente verdadero del mensurando.

Error sistemático: Es la media que resultaría de un número infinito de mediciones del mismo mensurando, efectuadas bajo condiciones de repetibilidad, menos un valor verdadero del mensurando.

Estándar de Referencia: Analito en que la pureza está documentada, usado para construir la curva de calibración.

Exploración: El proceso en donde el rango de longitud de onda del sistema es inspeccionado en orden, generalmente de la longitud de onda más baja a la más alta. Esto generalmente ocurre cuando la red de dispersión es rotada sobre su eje.

Extinción/Coeficiente de Extinción: Sinónimo para la absorbencia y la absortividad, respectivamente.

Fotómetro: Es un dispositivo sencillo relativamente barato para los análisis por absorción. El equipo utiliza una lámpara de filamento de tungsteno, lentes para proporcionar un haz paralelo de radiación, un obturador, un filtro, un atenuador de haz en forma de cuña y un detector (microamperímetro).

Fototubo: Es un detector fotoeléctrico común para las regiones ultravioleta-visible e infrarrojo cercano y se encuentra en los instrumentos más baratos.

Frecuencia: El número de veces por unidad de tiempo que la magnitud de una onda electromagnética va de un máximo a un mínimo y posteriormente regresa a la amplitud máxima. La unidad para el número de ondas por segundo es el hertz (Hz).

Fuente: También conocida como "lámpara". Este es el origen de la luz utilizada en el espectrómetro, y puede ser una fuente incandescente para la zona visible o una lámpara de descarga de gas de deuterio para el ultravioleta.

Incertidumbre de medición: Parámetro asociado al resultado de una medición, el cual caracteriza la dispersión de los valores que se podrían atribuir razonablemente al mensurando.

Lámpara de Tungsteno: Es una lámpara de luz, eléctrica, que tiene un filamento calentado por electricidad y que es tungsteno metálico. Al igual que otros sólidos incandescentes, el filamento da una longitud de onda continua que se aproxima a la "radiación de cuerpo oscuro". En condiciones normales de operación, la lámpara es adecuada como una fuente para la región visible del espectro y es útil sólo para distancias cortas en las regiones ultravioleta e infrarrojo.

Ley de Beer: Relación entre la cantidad de luz absorbida por un analito y su concentración, paso óptico (b) y absorptividad (a), expresada en gramos por 100 mL o molaridad, escrito como $A=\epsilon bc$.

Ley de Bouguer: Algunas veces se le llama ley de *Lambert*. Dividamos un medio absorbente homogéneo en capas imaginarias de igual espesor. Cada capa absorbe la misma fracción de radiación monocromática que choca contra ella. Con todas las demás sucede lo mismo y la absorbencia es directamente proporcional a la longitud de la trayectoria del haz a través del medio.

Ley de Bouguer-Beer: Es una combinación de las leyes de *Bouguer* y de *Beer*. Con frecuencia se escribe como $A=\epsilon bc$, en donde A =absorbencia, ϵ =absorptividad molar y b =longitud de la trayectoria de haz (paso óptico) a través de una solución con una concentración molar de soluto igual a c .

Líneas de Franhoufer: Son las líneas oscuras en el espectro del sol y que son ocasionadas por la absorción de la envoltura solar que está más fría que la superficie. Es de especial interés histórico para la espectrofotometría de absorción atómica.

Límite de Cuantificación: Es la concentración más pequeña con la que pueden realizarse medidas cuantitativas, en base a la desviación estándar y la pendiente de la curva de calibración, puede expresarse como $LC=10\sigma/S$ donde σ es la desviación estándar de las lecturas de la referencia y S es la pendiente de la curva de calibración

Límite de Detección: La cantidad, más pequeña de analito que puede ser vista sobre el nivel de ruido del instrumento, esto es lo que puede detectarse para un nivel de confianza dado. Está determinado por el análisis de muestras con concentración desconocida de analito y por el establecimiento del nivel mínimo al cual puede ser detectable. Basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración se expresa $LD=3\sigma/S$, donde σ es la desviación estándar de las lecturas de la referencia y S es la pendiente de la curva de calibración.

Lineal: Línea recta: En el contexto, esto significa que para el doble de concentración del analito la señal de absorbencia será duplicada. Esto permite la predicción de la concentración utilizando la curva de calibración.

Linealidad: Un experimento que demuestra que la respuesta de un instrumento cambia de una manera previsible con el incremento de analito.

Longitud de Onda: La distancia de una cresta, de una onda electromagnética a la misma posición en la onda subsecuente. Distancia pico a pico, generalmente medida en nanómetros.

Luz Extraviada (luz parásita): Cualquier radiación que llega al detector que no es emitida por la muestra a la longitud de onda seleccionada.

Magnitud (Medible): Atributo de un fenómeno, de un cuerpo o de una sustancia, el cual es susceptible de ser identificado cualitativamente y determinado cuantitativamente.

Material de referencia: Material o sustancia para el cual uno o varios, de los valores de una o varias, de sus propiedades son lo suficientemente homogéneos y bien establecidos para ser utilizados en la calibración de un instrumento, en la evaluación de un método de medición, o para asignar valores a las propiedades de otros materiales

Material de referencia Certificado: Material de referencia, acompañado de un certificado, para el cual uno o varios, de los valores de una o varias, de sus propiedades están certificados por medio de un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la que se expresa el valor de cada propiedad. Cada valor certificado se especifica con su incertidumbre respectiva.

Matriz: Medio en el que se encuentra el analito.

Mensurando: Magnitud particular sujeta a medición.

Monocromador: En los espectrofotómetros es un instrumento que aísla una banda estrecha de longitud de onda de toda la energía radiante que llega hasta él. Sus partes principales son un elemento dispersante (un prisma o una rejilla de difracción) y un sistema de rendijas.

nanómetro, nm: Antiguamente milimicrón o milimicra, mμ. Es una unidad común para la longitud de onda, en particular para la región ultravioleta-visible. $1\text{ nm}=10^{-9}\text{ m}$.

Paso Óptico: La distancia por la que pasa la luz a través de la muestra y su contenedor. En términos prácticos la dimensión de la cubeta o celda.

Patrón de Medición: Medida materializada, instrumento de medición, material de referencia o sistema de medición, destinado a definir, realizar, conservar o reproducir una unidad o uno o varios valores de una magnitud para servir de referencia.

Razón Señal/Ruido: La razón numérica de la señal total a 100 por ciento de Transmitancia al ruido del instrumento.

Red de Dispersión: Una superficie de reflexión cubierta con ranuras microscópicas uniformemente espaciadas, cuyo propósito es separar las

longitudes de onda individuales de la luz blanca. La distancia entre las ranuras y el ángulo de las caras está determinado por las longitudes de onda a separar. La red de dispersión (excepto para arreglo de diodos) es rotada a una velocidad determinada y la longitud de onda deseada es emitida a través de una rendija de salida sobre la muestra o el estándar.

Referencia. (Blanco): En el contexto, todo lo que está en el paso de luz de la muestra excepto el analito de interés: cubeta, disolvente y cualquier buffer o matriz para preparar la muestra.

Región Ultravioleta: Es una porción del espectro electromagnético que se encuentra entre el final de la longitud de onda larga de la región de los rayos X, aproximadamente a 40 nm (400 Å), y el límite violeta de la región visible, cerca de los 400 nm (4000 Å). Los químicos emplean de rutina bandas de absorción entre 200 y 400 nm.

Ruido: Cualquier señal generada por el detector que no responde directamente a la luz transmitida en la longitud de onda requerida.

Selectividad: La selectividad de un método analítico denota el grado de ausencia de interferencias debidas a otras especies contenidas en la matriz de la muestra.

Sensibilidad: La sensibilidad de un instrumento o de un método analítico mide su capacidad de discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito. Dos factores la limitan, la pendiente de la curva de calibración y la reproducibilidad o precisión del sistema de medida. La *sensibilidad de calibración* es la pendiente de la curva de calibración a la concentración de interés. La *sensibilidad analítica* se expresa como $\gamma = S/\sigma$, donde S es la pendiente y σ la desviación estándar de las mediciones.

Sensor: Elemento de un instrumento de medición o de cadena de medición, que está directamente afectado por el mensurando.

Señal: La salida del detector debida a su respuesta a la luz emergente del contenedor de la muestra o de referencia.

Titulación Fotométrica: Es una titulación en la cual el punto final se detecta por medio de mediciones de absorbencia.

Transmitancia, T: Es la fracción de la energía radiante incidente que transmite o emite la muestra. $T = P/P_0$. A menudo se expresa como un porcentaje: $\%T = (P/P_0) \times 100$.

Trazabilidad: Propiedad del resultado de una medición o de un patrón de medición, por medio de la cual estos pueden relacionarse a referencias establecidas, generalmente patrones nacionales o internacionales, por medio de

una cadena ininterrumpida de comparaciones teniendo todas ellas incertidumbres determinadas.

Tubo de Descarga de Hidrógeno: (Con frecuencia es de deuterio.) Es una fuente para la espectrofotometría de ultravioleta en la cual las líneas de emisión del gas de relleno (H_2 o D_2) tienen un ensanchamiento de presión suficiente para proporcionar una longitud de onda continua a través de la región ultravioleta.

Tubo Fotomultiplicador: Es un detector fotoeléctrico común para las regiones ultravioleta-visible e infrarrojo cercano; más sensible que los fototubos ordinarios, se encuentra en los mejores instrumentos.

Transmitancia: Razón del poder radiante transmitido por una muestra al poder radiante transmitido por una referencia, en una celda equivalente o por algunos medios de compensación para la absorción, pérdidas por reflexión, etc. Se relaciona con A mediante $T=1/10^A$ y se expresa en tanto por ciento.

Validación: Confirmar objetivamente el cumplimiento de requisitos particulares par un uso específico propuesto.

Verificar: Confirmar objetivamente el cumplimiento de requisitos para el funcionamiento de un instrumento o de un sistema de medición.

Visible: La porción del espectro electromagnético detectable por el ojo humano. La porción del espectro desde 350 780 nm.

Bibliografía:

- (1) Bauer/Christian/O'Reilly, (543.08 INS), *Instrumental Analysis*, Allyn & Bacon Inc., Boston, 1978.
- (2) B.N. Figgis, *Introduction to Ligand Field*, Interscience Publishers, New York, 1966.
- (3) Christian Gary D., (543 CHR), *Química Analítica*, Segunda Edición, Editorial Limusa, México, 1981.
- (4) Dyer, (547.346 DYE), *Aplicaciones de Espectroscopía de Absorción en Compuestos Orgánicos*, Prentice-Hall Internacional, España, 1973.
- (5) Ewing Galen, (544.EWI), *Instrumental Methods of Chemical Analysis*, Fifth Edition, McGraw-Hill, New York, 1985.
- (6) Olsen Eugene D., *Modern Optical Methods of Analysis*, McGraw-Hill Book Co., New York, 1975.
- (7) Silverstein/Bassler/Morril, (547.346 SIL), *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, Fifth Edition, John Wiley & Sons, New York, 1991.
- (8) Skoog/West, (543.08 SKO), *Análisis Instrumental*, 4ta. Edición, McGraw-Hill, España, 1992.
- (9) Skoog/West, (546 SKO), *Química Analítica*, 6ta. Edición, McGraw-Hill, México, 1995.
- (10) Strobel Howard A., (543.08 STR), *Chemical Instrumentation*, 2nd. Edition, Addison-Wesley Publishing Co., Menlo Park, Calif., 1973.
- (11) Willard/Merritt/Dean, (543.08), *Métodos Instrumentales de Análisis*, 7ma. Edición, Grupo Editorial Iberoamérica, México, 1991.
- (12) Amézquita L. Fernando, *Fundamentos de la Espectroscopia Aplicada a la Instrumentación Química*, Segunda reimpresión de la cuarta edición, Universidad de Guanajuato, México, 2007, ISBN 978-968-864-363-1