



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE QUERETARO

Facultad de Química

"ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISIBLE"

TESINA

Que para Obtener el Título de:
QUIMICO BIOLOGO
Presenta

Ma. de los Angeles Rangel López

FACULTAD DE
QUIMICA



BIBLOTECA

Querétaro; Qro. 1990

No. Adq? 150745

No. Titulo? _____

Clas. T5621.3613

R196c

eja

UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE QUERETARO



Facultad de Quimica

ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISIBLE

TESINA

Que para Obtener el Título de:
QUIMICO BIOLOGO
Presenta
Ms. de los Angeles Rangel López

FACULTAD DE
QUIMICA



BIBLIOTECA

Quimica

ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISIBLE

INDICE

1.	INTRODUCCION	1
2.	ESPECTRO DE ABSORCION	3
3.	LEY DE LAMBERT BEER	5
3.1.	Desviaciones de la ley de Beer	8
4.	PASOS A SEGUIR EN UN ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO	
4.1.	Formación de especies que absorban luz	9
4.2.	Selección de la longitud de onda	9
4.3.	Preparación de una curva de calibración	10
4.4.	Medición de la muestra y manejo de las diluciones	11
4.5.	Titulaciones fotometricas	12
5.	EXACTITUD FOTOMETRICA	13
6.	INSTRUMENTACION	17
6.1.	Descripción breve	18
7.	FUENTES LUMINOSAS	
7.1.	Lámpara de Tungsteno	21
7.2.	Lámpara de Deuterio	21
7.3.	Lámpara de arco de Xenón	22
8.	MONOCROMADORES	23
8.1.	Monocromador de prisma	23
8.2.	Monocromador de rejilla	26
9.	CELDAS	28
10.	LAMPARAS ESPECTRALES	31
11.	FILTROS	32
11.1.	Filtro de óxido de holmio	32
11.2.	Filtro de didimio	34

12.	SOLUCIONES ESTANDARES	35
12.1	Solución de dicromato de potasio	35
12.2	Solución de sulfato de cobalto-amonio	35
12.3.	Solución de cromato de potasio	36
13.	OTROS PROCEDIMIENTOS ANALITICOS	
13.1.	Absorciómetros fotoeléctricos	37
13.2.	Colorimetría visual	37
14.	APLICACIONES DE LA ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISIBLE	
14.1.	Aplicaciones químicas	38
14.2.	Análisis cualitativo	41
14.3.	Determinación de la relación ligando-metal de un complejo	45
14.4.	Análisis cuantitativo	48
14.5.	Espectro ultravioleta visible de narcóticos y drogas peligrosas	49
15.	CONFIGURACIONES REPRESENTATIVAS DE LOS INSTRUMENTOS COMERCIALES.	
15.1.	Coleman Junior 6/20	54
15.2.	Bausch and Lomb spectronic 20	55
15.3.	Varian DMS 70, Espectrofotómetro Digital	56
16.	MANTENIMIENTO PREVENTIVO	
16.1.	Repetibilidad fotométrica	57
16.2.	Ruido o deriva	57
16.3.	Ancho de banda.....	58
16.4.	Resolución	58
16.5.	Luz parásita	59
16.6.	Sensibilidad óptica	59
16.7.	Contactos falsos	60
16.8.	Humedad	60
17.	RECOMENDACIONES PRACTICAS PARA EL MANTENIMIENTO PREVENTIVO	61
18.	DEFINICIONES DE LOS PARAMETROS MAS IMPORTANTES	62
19.	BIBLIOGRAFIA	64

ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISIBLE

1. INTRODUCCION.

La materia está compuesta por átomos, los cuales constan de un núcleo alrededor del cual se encuentran los electrones que poseen carga eléctrica negativa. En el núcleo su carga eléctrica está dada por los protones que en cantidad igual a los electrones mantienen su balance neutral de cargas.

Los electrones se encuentran distribuidos en órbitas o capas energéticas alrededor del núcleo y se van distribuyendo según su nivel de energía, Regla de Hund. Cuando la energía incide sobre los electrones, estos pasan de un nivel energético a otro superior acompañado de una absorción de energía y emitiéndola a su vez para regresar a su forma inicial o estado basal, es evidente que la energía absorbida por los electrones será una cantidad exacta dependiendo de cada caso particular. Este fenómeno constituye la base elemental de la espectroscopia.

Hay muchos fenómenos que se producen en la naturaleza y que se pueden explicar suponiendo que la luz se comporta como una onda. La deflexión de la luz al entrar a un medio de índice de refracción distinto puede provocar la descomposición de esta, tal es el caso del arcoiris.

La energía radiante al viajar por el espacio, se considera como una perturbación periódica con componentes eléctricos y magnéticos que pueden interaccionar con la materia. En la figura 1.a. se observa la variación del componente eléctrico de la energía radiante. En la figura 1.b. se observan que las direcciones de vibración en un rayo de luz no polarizado son perpendiculares a la dirección de propagación. La combinación de la vibración y la propagación hace que la energía radiante tenga un movimiento ondulatorio.

Las ondas de energía radiante pueden describirse en términos de longitud de onda o frecuencia según la siguiente ecuación:

$$\text{Ec. 1.a.} \quad \lambda \nu = c$$

donde " λ " es la longitud de onda en centímetros y " ν " es la frecuencia en seg y " c " es la velocidad de la luz, 2.998×10^{10} cm/seg.

El desprendimiento de electrones en la superficie de un metal cuando choca contra ella alguna radiación electromagnética, efecto fotoeléctrico, se explica en términos

de la naturaleza de partículas de energía radiante. Un rayo de energía radiante se considera que está constituido por varias partículas, fotones, y cada fotón tiene una energía igual a $h\nu$.

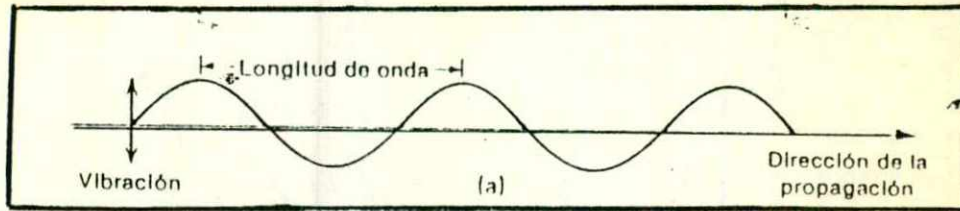


Figura 1.a.
Variación del componente eléctrico de un rayo de luz polarizado.

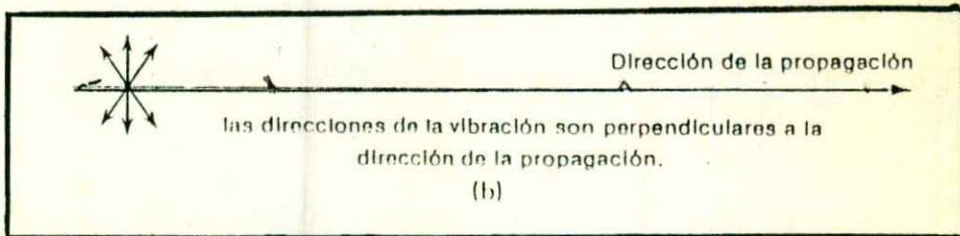


Figura 1.b.
Direcciones de vibración de un rayo de luz no polarizado formado por varias ondas.

2. ESPECTRO DE ABSORCION.

Puesto que la luz es una forma de energía, la absorción de un fotón por una molécula causa un incremento en su contenido energético, este incremento es idéntico a la energía del fotón o sea $\Delta E = h\nu$. Si la molécula se encuentra en su estado basal o fundamental, E_0 , antes de la interacción, el proceso de absorción eleva su contenido energético a un estado superior o excitado, E_1 .

Para que un fotón sea absorbido por una molécula la energía del mismo debe corresponder precisamente a la diferencia entre dos niveles energéticos de la molécula, figura 2.a.

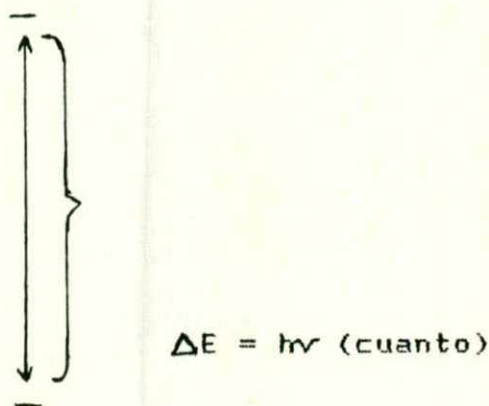


Figura 2.a.

La energía del fotón, $h\nu =$ diferencia de energía ΔE .

La energía potencial de una molécula, excluyendo su energía nuclear, puede considerarse como la suma de sus energías electrónicas, cambio en la energía de los electrones distribuidos alrededor de los átomos de la molécula; vibracionales, cambios en la separación promedio de los núcleos de dos o más átomos; y rotacionales, rotación de un dipolo químico. Las energías electrónicas se asocian con las transiciones de electrones dentro del átomo o molécula. Las energías vibracionales o rotacionales se asocian con las vibraciones y rotaciones de los átomos o grupos de átomos respecto a ellos mismos en la molécula, figura 2.b.

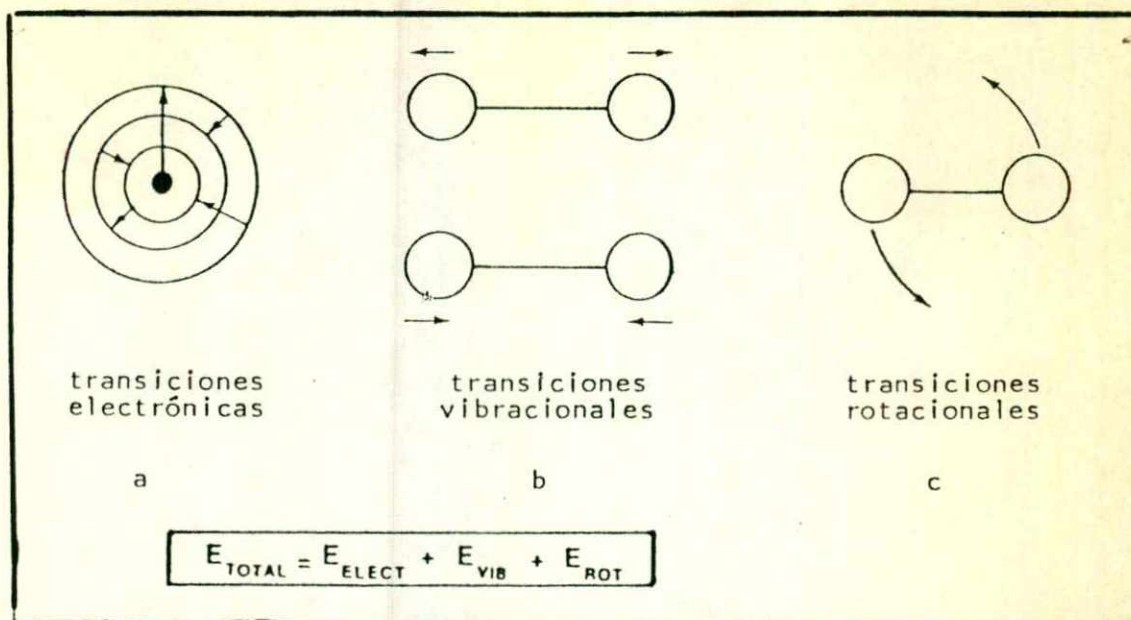


Figura 2.b.

Se muestran las energías electrónicas, vibracionales y rotacionales cuya suma nos da la energía total.
 $E_{total} = E_{elect} + E_{vib} + E_{rot}.$

La diferencia entre los estados energéticos rotacionales de una molécula son relativamente pequeños, mucho menores que las diferencias energéticas entre los niveles electrónicos. Las diferencias energéticas entre estados vibracionales son intermedias por lo que la absorción de la luz asociada con energías rotacionales se halla por lo general en la región de baja energía o longitud de onda larga del espectro electromagnético, esto es, el infrarrojo lejano. Absorciones asociadas con diferencias electrónicas se encontrarán en la región del espectro de alta energía o longitud de onda corta, esto es el uv-visible. Absorciones debidas a diferencias vibracionales se encontrarán entre las dos, principalmente en el infrarrojo cercano.

Cuando se irradia una muestra de solución con luz policromática, luz de muchas longitudes de onda, se absorberá la luz de determinadas longitudes, mientras que la luz de otras longitudes pasará a través de una solución. Con respecto a la región visible, la solución tendrá un color que corresponde a las longitudes de onda que la solución absorbe. Dicho en forma más sencilla el color que vemos es el color complementario de la luz que se absorbe.

Las longitudes de onda aproximadas de los colores de la luz visible se indican en la tabla 2.a.

Color que se absorbe	Rango aproximado de λ en nm	Color que se observa Complementario
Violeta	400 - 465	Verde-amarillo
Azul	465 - 482	Amarillo
Azul-verdoso	482 - 487	Naranja
Azul-verde	487 - 493	Rojo-naranja
Verde-azuloso	493 - 498	Rojo
Verde	498 - 530	Rojo-púrpura
Verde-Amarillento	530 - 559	Púrpura-rojizo
Amarillo-Verde	559 - 571	Púrpura
Amarillo-Verdoso	571 - 576	Violeta
Amarillo	576 - 580	Azul
Naranja-amarillento	580 - 587	Azul
Naranja	587 - 597	Azul-verdoso
Naranja-rojizo	597 - 617	Azul-verde
Rojo	617 - 780	Azul-verde

Tabla 2.a.

Longitudes de onda aproximadas de los colores de la luz visible.

3. LEY DE LAMBERT BEER.

Fué descrita en 1852 y dice "La intensidad de la luz monocromática es proporcional a la concentración de la solución" ó "La proporción de la luz incidente que es absorbida por las moléculas de la solución es directamente proporcional al número de moléculas absorbentes en la solución".

Cuando la luz monocromática pasa a través de una solución coloreada, la cantidad de luz transmitida decrece exponencialmente con el incremento de la concentración de la solución y con el incremento del espesor interno de la celda que contiene la solución.

Supongamos que un rayo de luz de poder radiante "P" se hace pasar a través de una solución que contiene un número "N" de iones o moléculas absorbentes. La cantidad de luz absorbida será directamente proporcional al número de especies absorbentes en la trayectoria de la luz. Si dividimos la solución en varias secciones pequeñas e iguales, la variación

en el poder radiante, "P" dependerá del número de especies absorbentes en cada sección, "N". El poder radiante del rayo que entra a secciones consecutivas estará disminuido por la absorción que se efectuó en las secciones de luz precedentes. La cantidad de luz absorbida por cada sección depende del número de especies absorbentes en dicha sección y es proporcional al poder radiante de la luz que entra a esta sección según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Ec. 3.a.} \quad \Delta P = -KP(\Delta N)$$

$$\text{Ec. 3.b.} \quad \frac{\Delta P}{\Delta N} = -KP$$

donde "K" es una constante de proporcionalidad. El signo menos indica que el poder radiante del rayo disminuye. Si las secciones son infinitamente pequeñas, podemos escribir la ecuación 3.a. en forma diferencial:

$$\text{Ec. 3.c.} \quad -\frac{dP}{P} = K dN$$

Si ordenamos e integramos entre los límites P_0 y P , el poder radiante inicial y final del rayo, y entre cero y N para el número de especies absorbentes en la trayectoria de la luz, obtendremos los siguientes resultados:

$$\text{Ec 3.d.} \quad \int_{P_0}^P \frac{dP}{P} = -K \int_0^N dN$$

$$\text{Ec 3.e.} \quad \ln \frac{P}{P_0} = -KN$$

N dependerá de:

1. La concentración de las especies absorbentes en la solución "c".
2. Del ancho de la solución absorbente que atravieza el rayo de luz "b".

Estas dos características se muestran en la figura 3.a.

$$\text{Ec 3.f.} \quad N = K'bc$$

Si convertimos la ec. 3.d. a logaritmos de base 10 y la combinamos con la ec. 3.e. obtendremos la siguiente expresión

para la ley de Beer:

$$\text{Ec 3.g.} \quad \log \frac{P}{P_0} = -abc$$

donde "a" es una constante de proporcionalidad denominada absorptividad ó absorptividad molar "E" dependiendo de como se exprese "c".

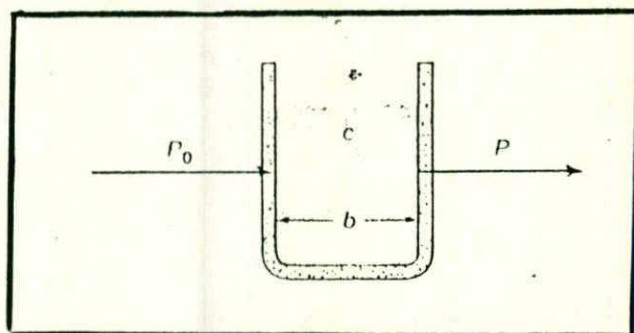


Figura 3.a.

Celda que contiene la solución absorbente, donde:

c: Es la concentración de la solución.

P₀: Poder radiante incidente.

P: Poder radiante transmitido.

b: Longitud interna de la celda o longitud de trayectoria de la muestra, que suele expresarse en cm.

A continuación se dan las dos formas más usuales de la ley de Beer:

$$- \log \frac{P}{P_0} = abc$$

$$\log \frac{P_0}{P} = abc$$

$$- \log T = abc$$

$$A = abc$$

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

$$A = \log \frac{P_0}{P} = \text{Absorbancia}$$

La absorptividad es una propiedad de la sustancia, una propiedad intensiva, mientras que la absorbancia es una propiedad de una muestra particular, propiedad extensiva, y que por lo tanto varía con la concentración y dimensiones del recipiente.

3.1. DESVIACIONES DE LA LEY DE BEER.

Están dadas por tres causas principales:

- 1) Las propiedades inherentes del material estudiado.
 - a) Porcentaje superior de soluto-interacciones de soluto, tales como formación de dímero, a concentraciones altas.
 - b) Fluorescencia por causa de la muestra, sintoma similar a la luz extraña o parásita.
 - c) Turbiedad en la muestra que interferirá con la absorción y causa incertidumbre en el paso de luz.
- 2) Limitaciones en el instrumento.
 - a) Carencia de una luz monocromática por:
 - Luz extraña.
 - Ancho de banda espectral.
 - b) Sistema de detección no lineal.
- 3) Errores por el operador tales como:
 - a) Inexactitud en la preparación de las muestras.
 - b) Inapropiado ajuste del instrumento.
 - c) Carencia de limpieza al manejar las cubetas.

4. PASOS A SEGUIR EN UN ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO.

4.1. FORMACION DE ESPECIES QUE ABSORBAN LUZ.

El reactivo que forma color deberá reaccionar en forma selectiva sin formar colores que interfieran con las sustancias extrañas que probablemente estén presentes. La reacción del reactivo con la sustancia que se desea medir deberá ser rápida y cuantitativa, generalmente debe controlarse el pH para que ocurra la reacción con formación de color. En ocasiones es importante el orden en que se añaden los reactivos. Por ejemplo, puede ser mejor añadir el reactivo que forma color a la muestra antes de agregar la solución amortiguadora, porque si se añade primero la solución amortiguadora el pH puede dispararse a un punto donde el ion metálico que se va a determinar se hidrolice y reaccione lentamente y en forma incompleta.

La absorbancia de una muestra puede disminuir si se deja reposar demasiado, ya que puede existir una precipitación.

4.2. SELECCION DE LA LONGITUD DE ONDA.

Cuando no hay interferencias, se escoge para la determinación cuantitativa una longitud de onda donde la absorbancia sea máxima. Un procedimiento es emplear una longitud de onda en la cual el complejo presente una máxima absorción, $\lambda_{\text{máx.}}$, pero donde la absorbancia debido al exceso de reactivo sea cero, o cuando menos sea pequeña.

A menudo un espectro se determina empleando un blanco de reactivo. La absorbancia es negativa o fuera de la escala a longitudes de onda menores, cuando la absorbancia del reactivo es mayor a la del complejo, figura 4.2.a.

No es conveniente realizar análisis cuantitativos en longitudes de onda que se encuentren en bandas de absorción demasiado estrechas, ya que una pequeña variación de la longitud de onda causa variaciones grandes en la absorbancia causando errores en la determinación.

El intervalo de concentración de la muestra que se va a analizar puede influir sobre la longitud de onda que se escoja para el análisis. Supongamos que una serie de muestras contienen una concentración de cierta especie colorida más elevada de tal manera que sobrepasa el rango lineal a una cierta longitud de onda máx. característica. Para poder realizar la determinación, se puede diluir la muestra hasta que la concentración encontrada caiga dentro del rango lineal, o se

puede seleccionar otra longitud de onda máxima que tenga una absorptividad molar más baja. En la siguiente figura se muestra gráficamente la ley de Beer.

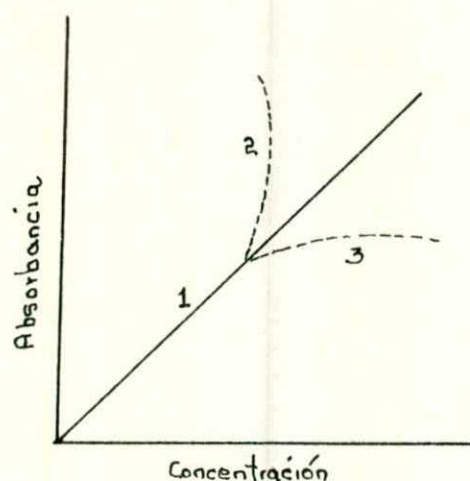


Figura 4.2.a.

Ley de Beer: 1---, se cumple; 2---, desviación positiva y 3---, desviación negativa.

4.3. PREPARACION DE UNA CURVA DE CALIBRACION.

Para preparar una curva de calibración se miden las absorbancias de una solución coloreada a varias concentraciones conocidas. Generalmente se prepara una solución estándar diluida de la sustancia que se desea determinar. Se pipetea cuidadosamente porciones de ésta solución a distinto volumen. Se añaden el reactivo que forma color, y se ajustan las condiciones para que se desarrolle el color en forma óptima. A continuación se diluye cada solución a un volumen determinado en un matraz volumétrico, y se mide la absorbancia de cada solución a la longitud de onda analítica. Al hacer la gráfica,

figura 4.3.a., de absorbancia en función de la concentración deberá obtenerse una línea recta, cuya pendiente es la absorptividad.

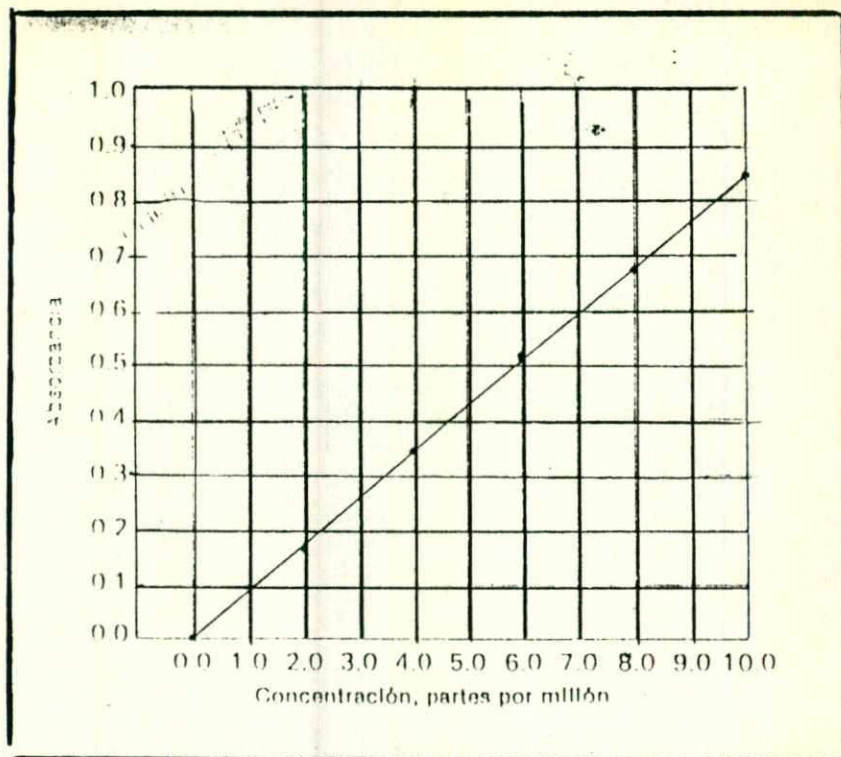


Figura 4.3.a. Curva o gráfica de calibración.

4.4. MEDICION DE LA MUESTRA Y MANEJO DE LAS DILUCIONES.

El color de la muestra se forma bajo las mismas condiciones de los estándares. Midiendo la absorbancia de la solución de la muestra se puede leer directamente su concentración en la curva de calibración.

La concentración de la solución de la muestra, deberá estar ajustada para que, al efectuar la medición en el espectrofotómetro, la absorbancia esté en el intervalo de 0.12 a 1.0 aproximadamente, o la transmitancia sea entre 0.10 y 0.75, % de transmitancia de 10 a 75.

4.5. TITULACIONES FOTOMETRICAS.

Es posible usar la variación de absorbancia de una solución para detectar los cambios de concentración de un constituyente absorbente de luz durante una titulación. La absorbancia es proporcionalmente lineal a la concentración del constituyente absorbente. Esto significa que en una titulación en la que el titulante, el reactivo o el producto de la reacción, sea un material absorbente, la gráfica de la absorbancia en función de la cantidad del titulante consistirá, si la reacción es completa, de dos líneas rectas que se cruzarán en el punto final. Para las reacciones apreciablemente incompletas, la extrapolación de los dos segmentos lineales de la curva de titulación establece la intersección y el volumen del punto final. En la figura 4.5.a. se muestran las posibles formas de las curvas de titulaciones fotométricas. La curva, a, por ejemplo, es típica de una titulación en la que el único absorbente es el titulante, como sucede en la determinación de arsénico III, con bromato-bromuro, donde las lecturas de absorbancia se toman a la longitud de onda, donde solamente absorbe el bromo. La curva, b, es característica de los sistemas en los que el absorbente es el producto de la reacción, como sucede en la titulación de cobre II, con EDTA. Cuando el material analizado se convierte en producto no absorbente -por ejemplo, en la titulación de p-toluidina en butanol con ácido perclórico a 290nm-, se obtiene la curva, c. Cuando el componente analizado exhibe color y se transforma en un producto incoloro al reaccionar con un titulante colorido -por ejemplo, la bromación de un colorante rojo-, se obtiene una curva similar a, e,. Las curvas, d y f, pueden representar la adición sucesiva de ligandos para formar dos complejos sucesivos de diferentes absorbancias.

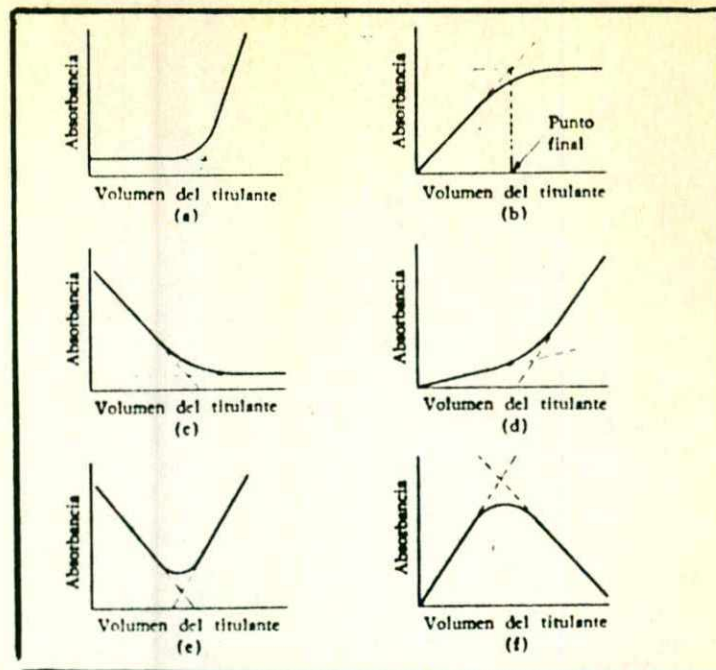


Figura 4.5.a.

Posibles formas de curvas de titulación fotométrica.

5. EXACTITUD FOTOMETRICA.

En concentraciones altas del material absorbente penetra tan poca energía radiante que la sensibilidad del fotómetro resulta inadecuada; por otro lado, en concentraciones bajas el error inherente en la lectura del galvanómetro o registrador es muy grande en comparación con la cantidad que se está midiendo. En muchos instrumentos fotoeléctricos la deflexión del galvanómetro o la colocación de un potenciómetro balanceado, son directamente proporcionales a la potencia de la radiación que llega a la fotocelda. Esto quiere decir que el cambio más pequeño detectable en la potencia P será constante a pesar del valor absoluto de la misma potencia. Sin embargo, para una mayor exactitud en la medida de la absorbancia A , el incremento ΔA correspondiente al cambio de potencia ΔP , debe ser una fracción de la absorbancia real A , tan pequeña como sea posible; en otras palabras, la cantidad $\Delta A/A$ es mínima. Para determinar la transmitancia para la cual $\Delta A/A$ es mínima, es necesario diferenciar dos veces la ley de Beer e igualar a cero la segunda diferencial. Es conveniente reescribir la ley de la siguiente forma:

$$\text{Ec. 5.a.} \quad A = \log P_0 - \log P$$

entonces

$$\text{Ec. 5.b.} \quad dA = 0 - (\log e) \frac{1}{P} dP$$

de la cual

$$\text{Ec. 5.c.} \quad \frac{1}{A} dA = - \frac{0.4343}{AP} dP = - \frac{0.4343}{A} \frac{1}{P_0 10^{-A}} dP$$

Reemplazando las diferenciales por incrementos finitos:

$$\text{Ec. 5.d.} \quad \frac{\Delta A}{A} = - \frac{0.4343 \Delta P}{P_0} \frac{1}{A 10^{-A}}$$

Diferenciando otra vez, P es una constante:

$$\text{Ec. 5.e.} \quad \frac{d(\Delta A/A)}{dA} = - \frac{0.4343 \Delta P}{P_0} \left(\frac{10^A \ln 10}{A} - \frac{10^A}{A^2} \right)$$

La condición para que el valor mínimo de $\Delta A/A$, es que el miembro derecho de la ecuación 5.e. sea cero. Por lo tanto el factor dentro del paréntesis debe ser cero, ó:

$$\text{Ec. 5.f.} \quad \frac{10^A \ln 10}{A} = \frac{10^A}{A^2}$$

de donde:

$$\text{Ec. 5.g.} \quad A = \frac{1}{\ln 10} = 0.4343$$

El error relativo alcanza un mínimo en $0.4343 A$ que corresponde a una transmitancia de 36.8%, esto significa que las lecturas más precisas se obtienen cerca de estos valores según se observa en la figura 5.a. De esta figura se desprende que, a pesar de que el error es mínimo en el punto de 36.8% de transmitancia no puede ser mucho mayor en un rango de transmitancia de 15% a 65% de transmitancia aproximadamente.

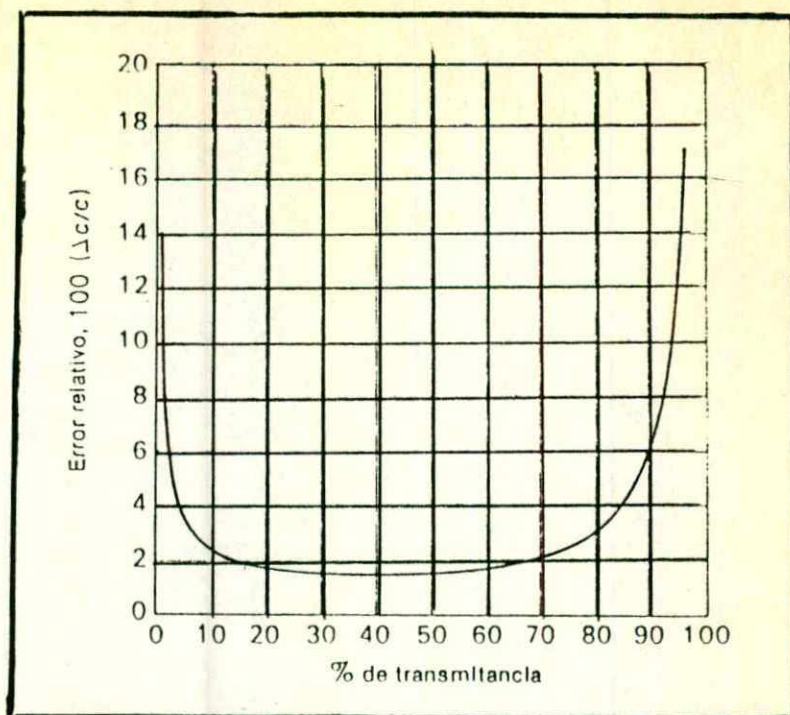


Figura 5.a.

Error relativo de lecturas espectrofotométricas causado por un error absoluto de lectura de $\pm 0.5\%$ de transmitancia.

En la figura 5.b. se muestra la curva obtenida al graficar el % de transmitancia contra el logaritmo de la concentración.

Si se incluye un rango conveniente, resulta siempre una curva en forma de "S", conocida como gráfica de Ringbom. Si el sistema sigue la ley de Beer, el punto de inflexión se presenta a 36.8% de transmitancia; si no lo sigue, la inflexión se encuentra a otro valor, pero la forma general de la curva continúa siendo la misma.

La curva tiene una región considerable en donde es casi recta. La extensión de esta porción recta indica directamente el rango óptimo de concentración para un análisis fotométrico en particular. Es más, la precisión del análisis puede juzgarse con base en la pendiente de la curva, ya que entre más pronunciada sea, mayor será la sensibilidad de la prueba.

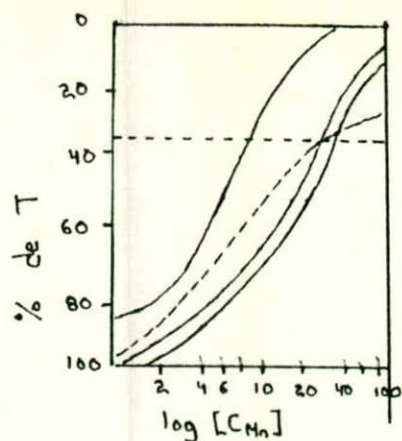


Figura 5.b.

Curvas tipo para permanganato. Las curvas continuas se determinan en un espectrofotómetro de longitud de onda en: 1) 526 nm; 2) 480 nm; y 3) 580 nm. La curva punteada, 4) se realizó con base a los datos tomados con un fotómetro de filtro, cuyo filtro centrado era de 430 nm.

6. INSTRUMENTACION.

Los espectrofotómetros se han convertido en piezas fundamentales de los laboratorios científicos e industriales en todo el mundo y se encuentran entre los instrumentos analíticos más utilizados. En la práctica, proveen datos de absorbancia y transmitancia de un sinúmero de sustancias químicas, información esencial para su caracterización cualitativa y cuantitativa.

Esencialmente un espectrofotómetro produce una banda angosta de radiación espectral, llamada luz monocromática, y luego mide el grado de interacción entre esta radiación y una muestra.

Para lograr esto, el espectrofotómetro está formado por varios componentes mayores, integrados en un solo sistema. Los componentes principales son: la fuente de radiación, el monocromador, el compartimiento de muestras y referencia, el detector, el amplificador y el indicador. La unión de los tres últimos forma el sistema fotométrico. A continuación se muestra el esquema óptico de un espectrofotómetro.

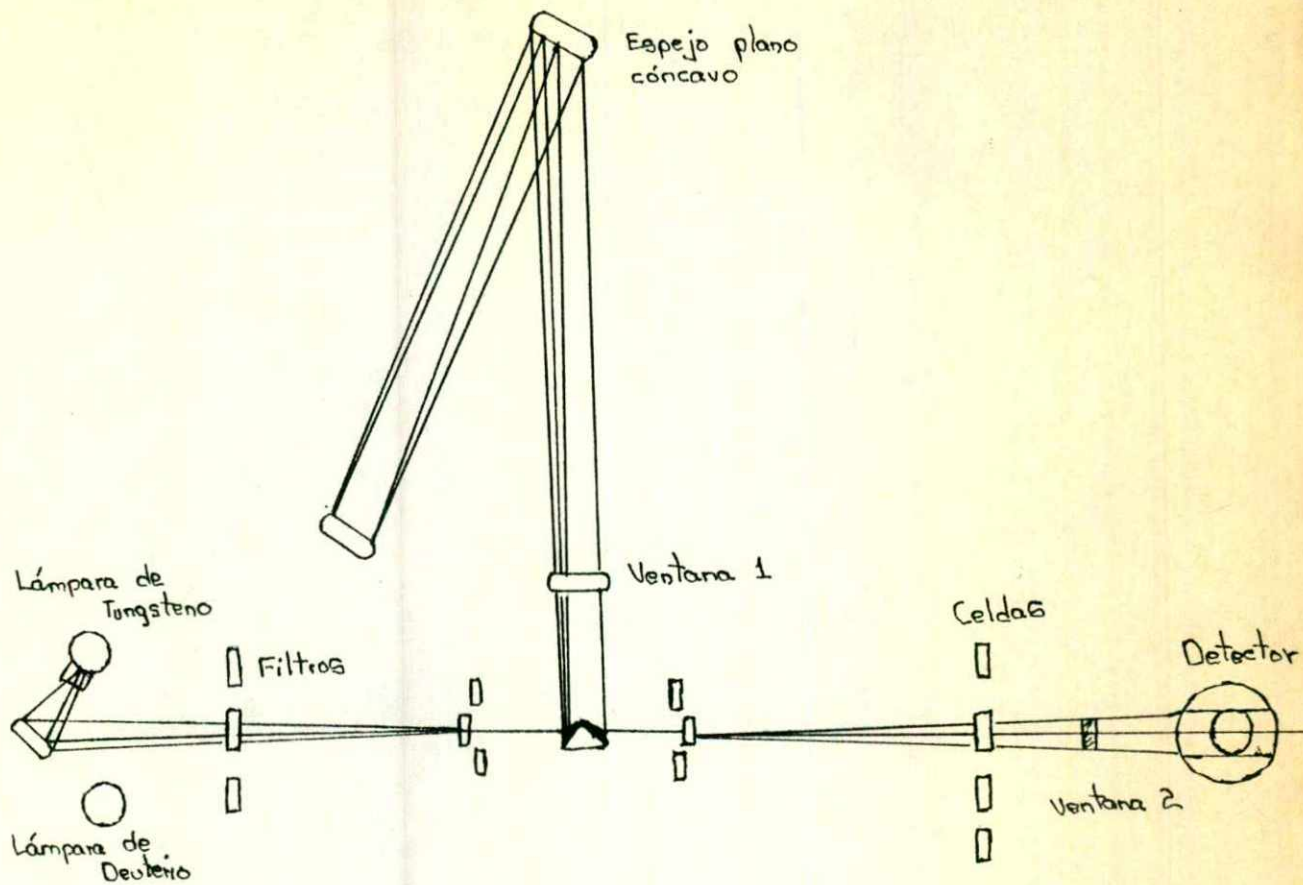


Figura 6.a. Esquema óptico de un espectrofotómetro.

6.1. DESCRIPCION BREVE.

La luz que emana de la fuente penetra al monocromador, el cual aísla una banda espectral angosta y la dirige hacia la muestra. Dependiendo del grado de interacción, proceso de absorción, parte de la radiación es transmitida al detector sensible a la luz, que la convierte en una señal eléctrica proporcional al nivel de potencia de radiación. Esta señal eléctrica es entonces amplificada y registrada por dispositivos de lectura apropiados.

El primero componente por mencionar es la fuente luminosa. En forma ideal las fuentes deben de proveer radiación intensa y estable sobre un rango espectral amplio y con salida comparable para todas las longitudes de onda. También deben ser de tamaño óptimo, durables y económicas. No existe alguna fuente que reúna todos los requisitos, pero hay varios tipos con características aceptables.

La radiación emitida por cualquier fuente está constituida por un grupo de longitudes de onda. La ley de Beer requiere para su cumplimiento que las estimaciones espectroscópicas se lleven a cabo en presencia de radiación monocromática. La propiedad de separar entre sí las diferentes longitudes de onda para subsecuente aislar de manera selectiva una banda angosta de radiación es atributo del sistema monocromador.

Un sistema monocromador consta de:

1. Un elemento dispersor en forma de prismas o rejillas, capaz de separar las longitudes de onda que integran el haz original sin afectar su intensidad.
2. Una serie de ranuras, espejos y lentes, entre cuyas funciones figura la de aislar y dejar pasar hacia la muestra solo las longitudes de onda de interés.

En tercer nivel está el compartimiento de muestras. En los equipos sencillos solo da cabida a una celda de dimensiones adecuadas mientras que en equipos más complejos puede aceptar varias celdas y permitir el desplazamiento del conjunto a fin de situar cada una de ellas en la trayectoria luminosa. Resulta común que exista un dispositivo mecánico que obstruya el paso de la luz hacia el detector en ausencia de celdas en el compartimiento.

Las determinaciones espectrofotométricas son, estimaciones sustractivas de potencia radiante, dado un cierto nivel de potencia emergente a una cierta longitud de onda, se puede conocer el monto de la pérdida sufrida por absorción de la muestra. Esto se logra mediante la incorporación de un cuarto componente: el detector.

Idealmente un detector debe ser capaz de convertir eficientemente la radiación en señal eléctrica, pero para que esta función sea de utilidad real, debe hacerlo de manera rápida sin introducir perturbaciones y mejor aún, si mantiene este comportamiento a través de un amplio intervalo de longitudes de onda.

Sin embargo desde el punto de vista práctico, es necesario considerar el efecto neto de la combinación fuente-detector, dado que la confiabilidad de las medidas depende en buena parte de su grado de compatibilidad. Así, entonces, una correcta elección de la fuente permite compensar las deficiencias en respuesta que caracterizan a algunos detectores.

Por ejemplo, la combinación lámpara de deuterio-tubo fotomultiplicador muestra un buen comportamiento desde aproximadamente 370 nm a poco menos de 200 nm.

La señal eléctrica que genera el detector en respuesta a la radiación recibida necesita ser procesada con objeto de que rinda una información útil. El examen espectroscópico requiere que se produzca una señal en ausencia de la muestra y otra en su presencia. Toca al sistema fotométrico realizar las operaciones pertinentes para lograr una apreciación cuantitativa de la diferencia entre dichas señales.

Los circuitos electrónicos más sencillos solo pueden indicar puntos nulos o de balance de corriente valiéndose de ingeniosos ordenamientos de componentes electrónicos, potenciómetros y un galvanómetro o indicador digital; las lecturas se toman de las escalas graduadas integradas a las perillas de operación.

Las características más importantes del sistema fotométrico son: una respuesta uniforme, estable y libre de perturbaciones.

Los espectrofotómetros manuales requieren de: 1) Un control de longitud de onda, que generalmente es una conexión mecánica que hace rotar el prisma o la rejilla; 2) Un selector de abertura espectral; 3) Un ajustador del cero, generalmente llamado control de corriente oscura que asegura que el indicador marque cero de transmitancia con un detector en la obscuridad; 4) Un control de sensibilidad para ajustar el otro extremo de la escala a un 100% de transmitancia con el disolvente o la referencia en la trayectoria de la luz.

Los espectrofotómetros de registro tienen los controles anteriores con excepción del último además: 1) Un interruptor de inicio, alto y reversa; 2) Un control que permite la selección de la velocidad de barrido de longitud de onda; 3) Controles de registrador que regulan la velocidad del papel, un interruptor del control de la pluma y frecuencia controles de rango que permiten la expansión o contracción de la escala.

7. FUENTES LUMINOSAS.

7.1. LAMPARA DE TUNGSTENO.

La lámpara incandescente de filamento de tungsteno es insuperable como fuente espectrofotométrica para la región del visible y para aquellas partes adyacentes del ultravioleta y del infrarrojo situadas aproximadamente entre 320 nm y 3.5 μ m. esta fuente es la más utilizada, dado su bajo costo, simplicidad de operación y su gran variedad de tamaños en existencia. En su forma comercial más común emplea un filamento enrollado, montado verticalmente y con un consumo entre 20 y 30 watts.

En una lámpara de tungsteno el filamento se evapora y su vapor se fija en la superficie del bulbo de la lámina, por lo tanto la transmisión de la luz desde el bulbo decrece y el filamento se deteriora por gasto de electrones, de tal modo que la energía que se libera de la lámpara se ve disminuída.

Las lámparas de haluro de tungsteno se han desarrollado con el fin de alargar la vida media y evitar el gasto constante de electrones, esta lámpara llamada tungsteno yodo o cuarzo-yodo está provista de una envoltura de sílice vítrea que permite operar con ella a altas temperaturas. El yodo reacciona con el tungsteno vaporizado para formar WI_4 volátil que se piroliza cuando se pone en contacto con el filamento caliente, redepositando los átomos de tungsteno en dicho filamento en vez de dejarlos acumularse en las paredes del bulbo.

7.2. LAMPARA DE DEUTERIO.

Para el trabajo en la región del ultravioleta, la elección más acertada es la lámpara de arco de deuterio ya que emite un espectro continuo que se extiende en el rango de 190 a 315 nm. La lámpara de deuterio provee muchas líneas espectrales en un rango de longitud de onda larga mayor a 400 nm, la energía emitida se concentra satisfactoriamente en forma continua gracias al traslape de gran número de líneas. Las líneas que aparecen más aisladas en longitudes de onda mayores, 486.0 y 615.1 nm solo son útiles para propósitos de calibración y deben evitarse en la práctica común; aún en instrumentos de gran precisión la cercanía de una línea intensa constituye un problema de luz parásita y muy difícil de filtrar.

Los espectros de emisión de las lámparas de deuterio y tungsteno se muestran a continuación.

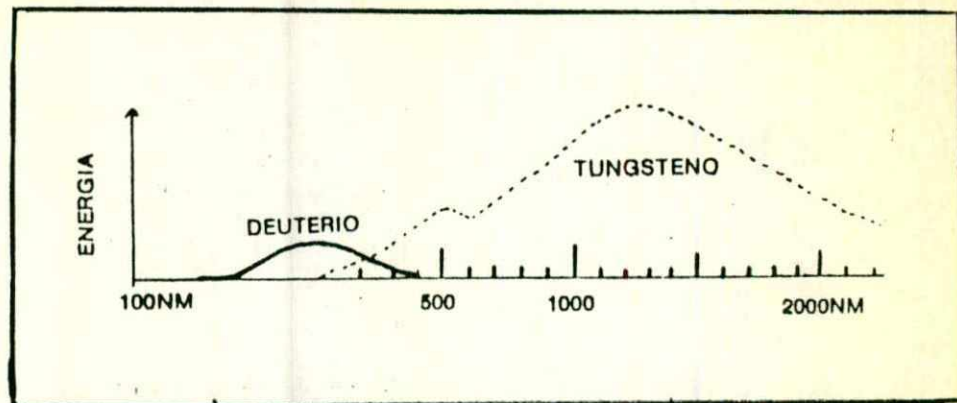


Figura 7.2.a.
Espectros de emisión de las lámparas de deuterio y tungsteno.

7.3. LAMPARA DE ARCO DE XENON.

El espectro del arco de Xenón es prácticamente continuo en el ultravioleta, visible e infrarrojo, con fuertes líneas en la banda de 800 a 1000 nm. La envoltura de las lámparas de Xenón es de sílice fundido, lo cual permite que este opere a altas temperaturas.

Las lámparas de Xenón consisten de un arco candente entre los electrodos de tungsteno en una presión de 2 atm de Xenón puro. las lámparas pueden ser de forma compacta o cilíndrica con el bulbo de forma lineal o casi esférica. Las lámparas compactas de arco de Xenón emplean potenciales de 25 a 75 Kwatts o más.

El final de la vida útil de las lámparas de arco de Xenón viene dada por el gradual obscurecimiento del bulbo, que a su vez ocasiona aumentos excesivos de temperatura.

8. MONOCROMADORES.

Los monocromadores se usan por lo general para aislar una banda de longitudes de onda de una fuente continua, llevando cada longitud de onda de la luz incidente a una misma posición de salida en forma secuencial.

Las partes que lo forman por lo general son: una caja, una rendija o ranura para entrada de la luz, espejos, lentes, un elemento dispersor y una ranura de salida. Estas partes se acomplan mecánicamente en diferentes formas, permitiendo al operador seleccionar la longitud de onda y variar el ancho de las ranuras.

Las características más importantes de los monocromadores son: su ancho de banda, su eficiencia y su geometría, que dependen del elemento dispersor utilizado.

8.1. MONOCROMADOR DE PRISMA.

Los monocromadores de prisma se fabrican de sílica fundida y son los más ampliamente usados hasta hace varios años, ya que el costo de fabricación de las rendijas ha disminuído. La figura siguiente muestra el arreglo óptico de un monocromador de prisma llamado montaje "Littrow"

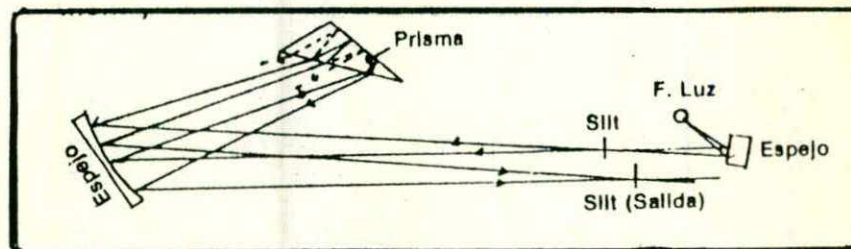


Figura 8.1.a.
Monocromador de prisma de montaje "Littrow"

La luz que emite la fuente luminosa atraviesa la hendidura de entrada para después formar un haz paralelo por el espejo esférico que es dispersado por un prisma de Littrow en un ángulo de 30°. El haz de luz es reflejado por una superficie cubierta de aluminio contenida en el prisma, pasa por el espejo y luego hacia la hendidura de salida resultando un haz de luz monocromática convergente.

El índice de refracción de la sílica fundida utilizada como material del prisma varía con la longitud de onda como se muestra en la siguiente figura:

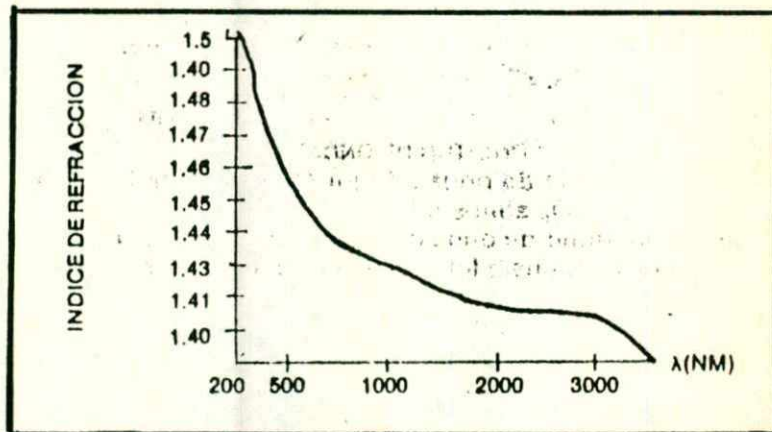


Figura 8.1.b.

Índice de refracción de la sílica fundida graficado contra longitud de onda.

Cuando un haz de luz con una determinada longitud de onda entra al prisma con un índice de refracción "n" del aire, $n_0=1$, a un ángulo incidente "i" y es refractado en un ángulo θ , la siguiente ecuación es válida:

$$\text{Ec. 8.1.a.} \quad \frac{\text{Sen } i}{\text{Sen } \theta} = \frac{n}{n_0} = n$$

La luz a una longitud de onda corta es refractada más que la luz a una longitud de onda larga como se muestra en la siguiente figura:

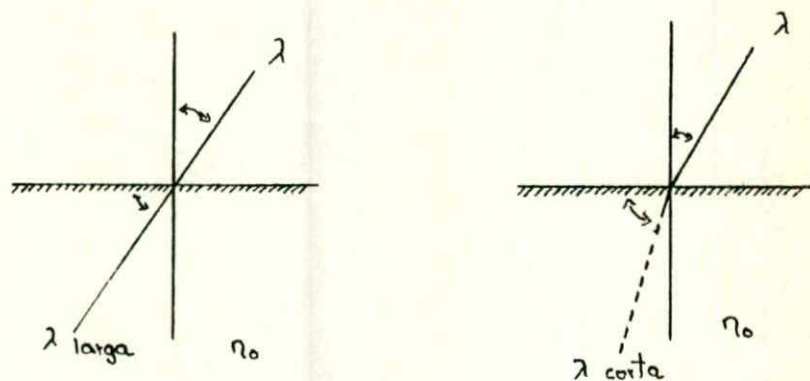


Figura 8.1.c.

En estas gráficas se muestra que la luz a una longitud de onda larga es refractada menos que la luz a una longitud de onda corta.

Los monocromadores de prisma tienen las siguientes ventajas:

1. Con un prisma se cubre un amplio rango de longitudes de onda de 185 nm a 2 500 nm.
2. No requiere de filtros para eliminar otros órdenes de longitud de onda. Estos se requieren en monocromadores de rejilla.
3. Un prisma provee una mayor resolución, principalmente en la región ultravioleta de 185 nm a 300 nm.

Las desventajas son:

1. Es necesario un sistema mecánico complicado para obtener una escala de longitud de onda lineal, ya que la dispersión del prisma varía con la longitud de onda.
2. No se puede obtener una resolución uniforme con un ancho de banda fijo ya que la dispersión del prisma no es lineal.
3. Mala dispersión y resolución en la región visible e infrarrojo cercano que la obtenida con un monocromador de rejilla.

8.2. MONOCROMADOR DE REJILLA.

Una rejilla de difracción tiene una serie de ranuras paralelas, 500- 2000 líneas/mm, alineadas sobre una superficie reflejante. Las ranuras son triangulares y tienen un ángulo de inclinación α , a este ángulo se le llama "ángulo Blaze". En la siguiente figura se muestra un monocromador de rejilla:

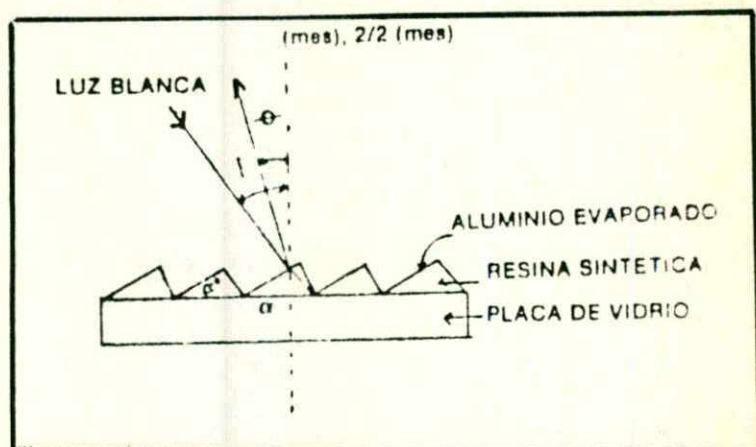


Figura 8.2.a.
Monocromador de rejilla tipo Blaze.

La luz incidente se dispersa respecto a la longitud de onda de acuerdo a la ecuación siguiente:

$$\text{Ec. 8.2.a.} \quad m\lambda = d(\text{sen } i + \text{sen } \theta)$$

donde:

i = Ángulo de incidencia.

θ = Ángulo de difracción.

λ = Longitud de onda.

d = Distancia entre cada rejilla.

m = Número de órdenes de difracción, $D_1 + 1i + 2 \dots \dots$

El ángulo de difracción de primer orden, $m=1$, de una longitud de onda λ , es el mismo que el ángulo de difracción de segundo orden de $1/2$ de la longitud de onda, y del ángulo de difracción de tercer orden de $1/3$ de longitud de onda y así sucesivamente.

Para obtener únicamente la luz difractada de primer orden de longitud de onda λ , será necesario excluir luz difractada de órdenes secundarios y superiores por medio de filtros, como se muestra en la siguiente figura.

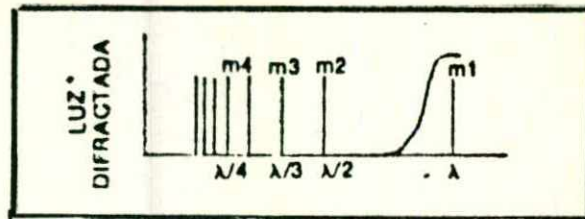


Figura 8.2.b.

Se muestra la obtención de luz difractada de primer orden por medio de filtros.

A las configuraciones de los componentes ópticos de un monocromador de rejilla se les dan nombres de acuerdo a su inventor. Ejemplos típicos de un arreglo óptico se muestran en la figura 8.2.c.

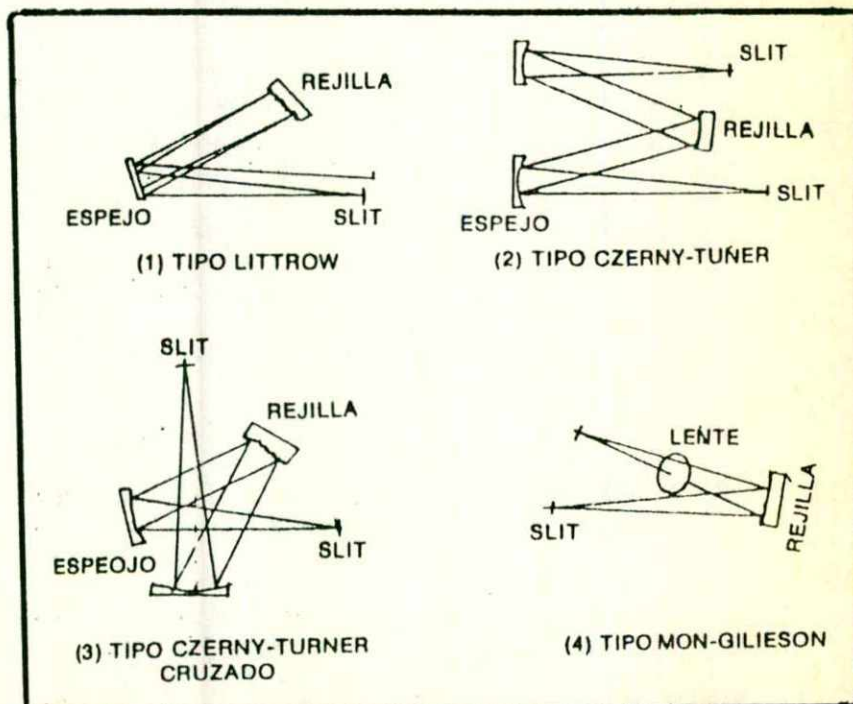


Figura 8.2.c.

Muestra ejemplos típicos de arreglos ópticos de algunos monocromadores.

Las ventajas de los monocromadores de rejilla son:

1. Una rendija da una mejor dispersión, por lo tanto mejor resolución en la región visible y cercano infrarrojo.
2. Una rejilla asegura una exacta longitud de onda, de tal forma que una desviación de longitud de onda por cambios de temperatura será despreciable.
3. A una abertura espectral fija, la resolución es casi constante con respecto a la longitud de onda; esto se debe a que la rejilla provee igual dispersión en un rango amplio de longitudes de onda.
4. La energía y/o resolución se incrementa a medida que aumenta el número de líneas/mm. La anchura de una línea debe ser del orden de la longitud de onda. Por ejemplo 1 440 líneas/mm = 0.694 mm/línea.
5. Una rejilla es más comercial que el prisma, ya que se fabrica a partir de una rejilla maestra en una película de resina sintética cubierta de una placa de vidrio de pequeño coeficiente de expansión, de tal manera que las rejillas se van duplicando.

Las desventajas de los monocromadores de rejilla son las siguientes:

1. La energía se incrementa con la reflectividad.
2. Imperfecciones en la rejilla originan mayor presencia de luz parásita. Las rejillas holográficas ofrecen una mayor energía y por lo tanto baja luz parásita.
3. Debe establecerse un compromiso entre disminuir el ancho de la abertura espectral para obtener mayor resolución y aumentar esta abertura espectral para conseguir mayor energía.

9. CELDAS.

La celda es un recipiente transparente especialmente diseñado para contener la solución prueba o disolvente de referencia durante los estudios espectrofotométricos. Existe una gran variedad de celdas apropiadas al trabajo en las distintas regiones espectrales, algunos de estos tipos de celdas se muestran en la figura 9.a. La elección de cada una de ellas para propósitos particulares se basa en:

1. Sus características de transmisión a la longitud de onda de interés.
2. La longitud interna, espesor óptico, el tamaño y la forma.
3. El costo relativo

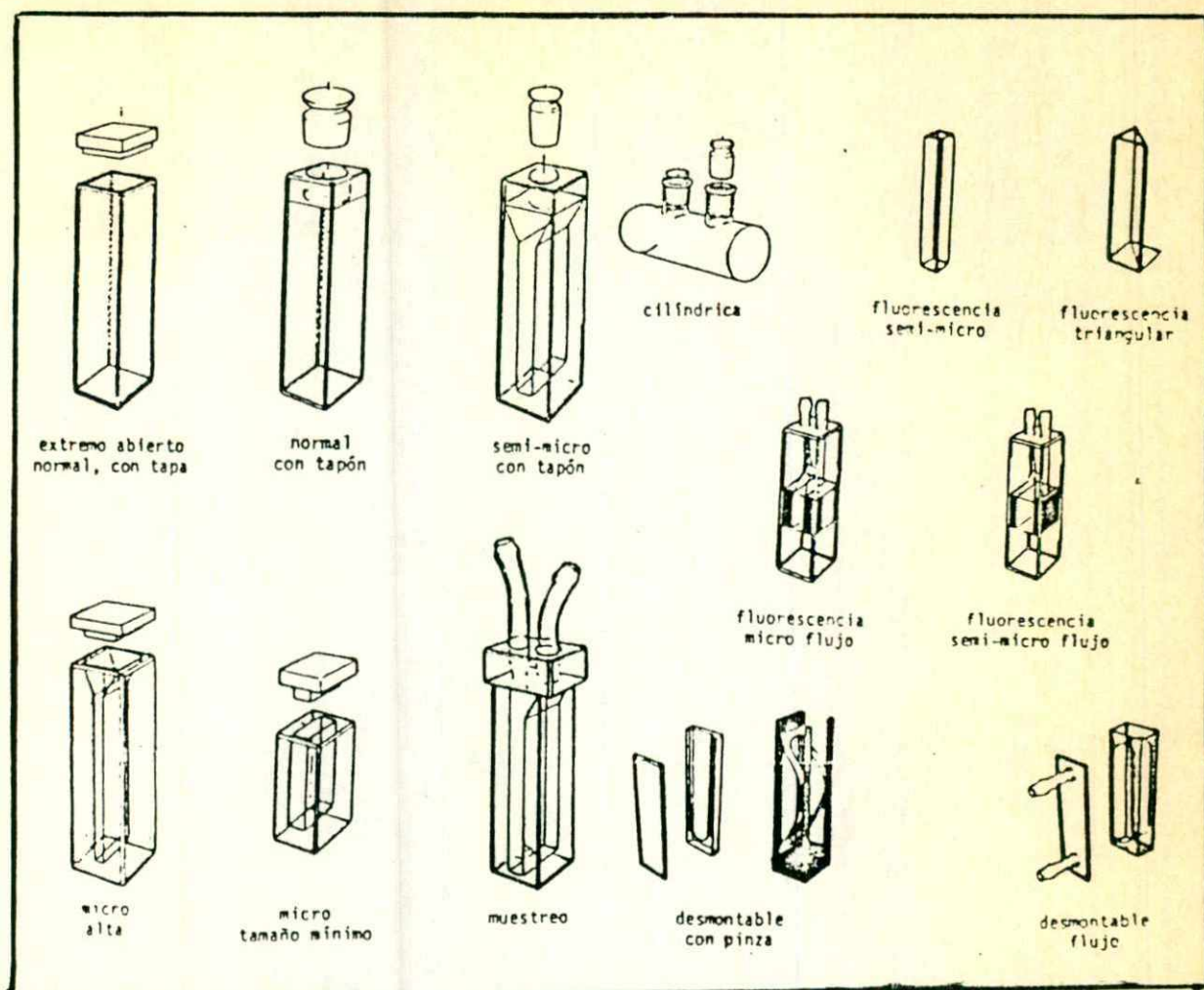


Figura 9.a.
Celdas típicas.

El vidrio o sílica fundida, también llamada cuarzo, se utiliza como material de las celdas.

Las celdas de vidrio se emplean en el rango de 340 a 2 500 nm.

Las celdas de sílica fundida se utilizan en el rango de 180 a 2 500 nm., según se muestra en la figura 9.b.

De acuerdo a la ley de Beer si doblamos el paso de luz de la celda, se duplicará la absorbancia. Cuando la concentración de la muestra es demasiado baja o la absorbancia demasiado pequeña, se recomienda una celda con paso óptico grande.

Se debe seleccionar un par de celdas que tengan igual paso de luz, celdas apareadas, para evitar que se desvien los valores fotométricos.

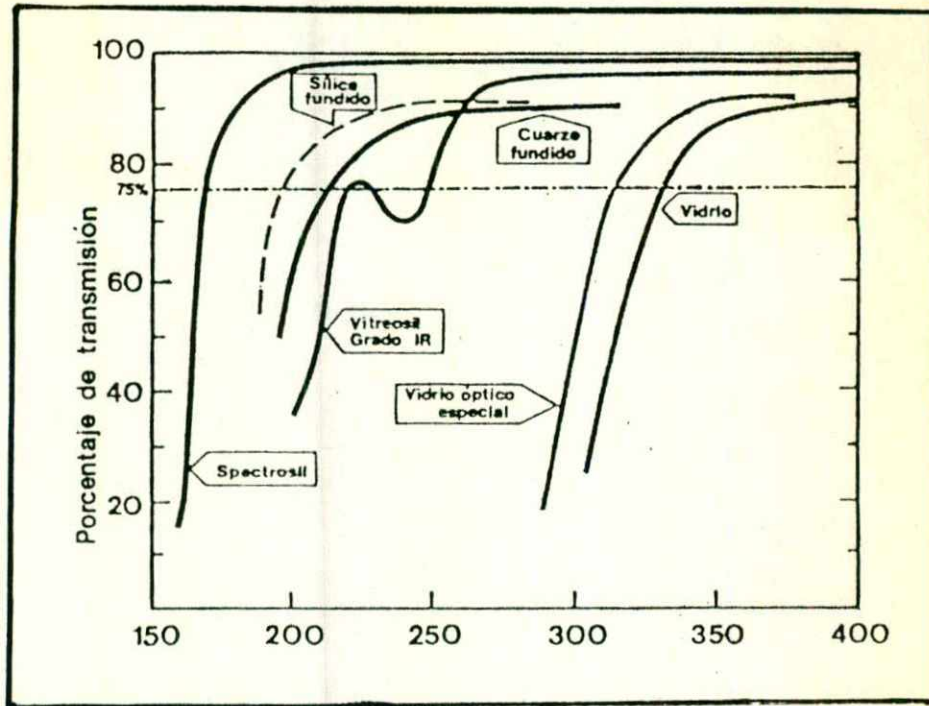


Figura 9.b.
 Espectro de transmisión combinado para materiales comunes de celdas.

10. LAMPARAS ESPECTRALES.

Las llamadas lámparas espectrales contienen un gas inerte o un metal en un tubo de descarga, arco, para producir las características espectrales deseadas. Su cualidad sobresaliente está en que radian los espectros de línea del material de relleno, con un alto grado de constancia y pureza espectral. La tabla 10.a. muestra las bandas de absorción características de lámparas espectrales comunes.

Elemento radiante	Lineas espectrales, nm.
Cadmio	326, 468, 480, 509, 644
Cesio	456/9, 794-921
Helio	588, 668, 707
Mercurio	313, 334, 365
Mercurio	405, 436, 546
Mercurio	578
Potasio	767/70, 776.5
Sodio	589
Rubidio	780/95
Talio	352, 378, 535
Zinc	308, 328-35, 468, 636.

Tabla 10.a.

Lámparas espectrales.

11. FILTROS.

Los filtros son utilizados para revisar la exactitud de la longitud de onda, estos contienen tierras raras como el óxido de holmio o didimio. Los filtros se adquieren directamente en compañías que venden espectrofotómetros de tal forma que solo se requiere insertar el filtro en el adaptador de celdas.

11.1. FILTRO DE OXIDO DE HOLMIO.

El filtro de óxido de holmio proporciona discretas bandas de absorción que son útiles para verificar la longitud de onda correcta del espectrofotómetro. Las bandas también ayudan a detectar la luz parásita. Es recomendable el uso del filtro en la instalación y operación inicial del espectrofotómetro.

El filtro de óxido de holmio tiene una absorbanza máxima discreta a 279.3, 287.6 y 333.8 nm en la región ultravioleta como se observa en la figura 11.1.a. En la región visible la absorbanza máxima es a 360.8, 385.8, 418.5, 453.4 y 637.5 nm como se muestra en la figura 11.1.b. La máxima absorbanza debe ser hallada en la longitud de onda que corresponda a la longitud de onda absoluta. Si el error de la longitud de onda es mucho más grande que el de las especificaciones del instrumento este requiere del servicio técnico. Si el error es pequeño en relación a las especificaciones este se puede corregir. La longitud de onda del selector debe ser ajustada en la propia dirección de la longitud de onda deseada que nos da la verdadera longitud de onda.

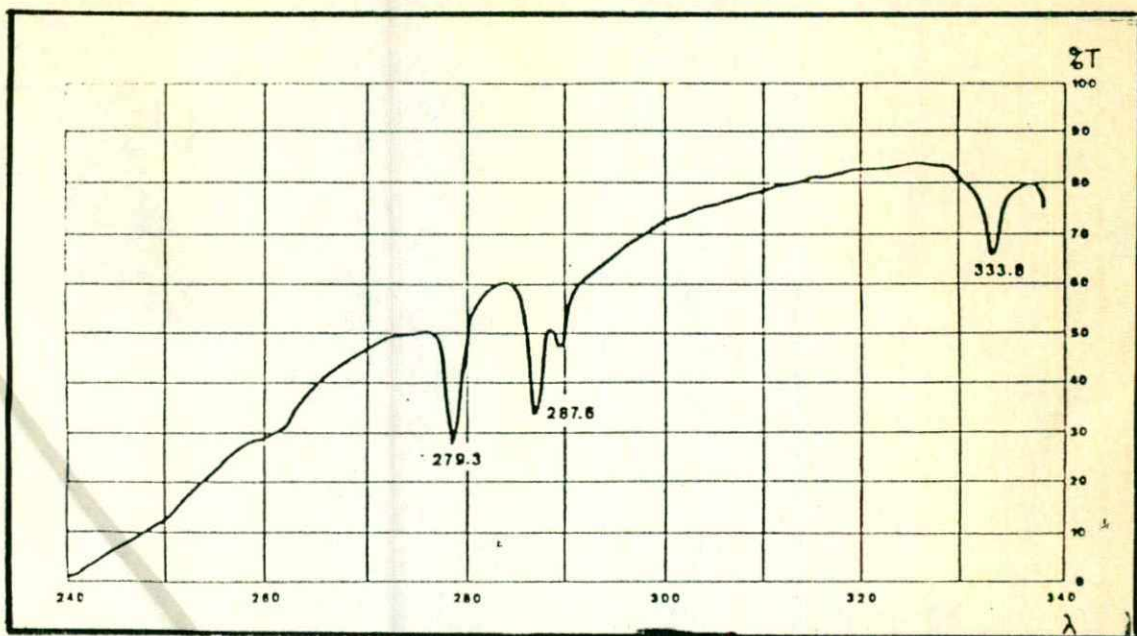


Figura 11.1.a.
Espectro ultravioleta del filtro de óxido de holmio.

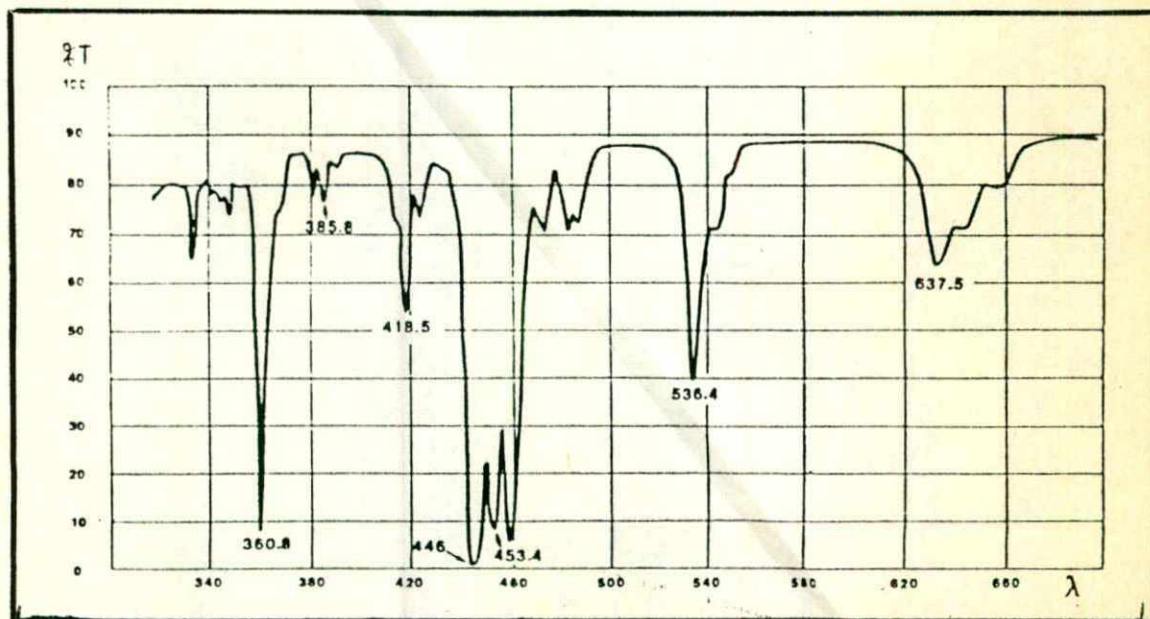


Figura 11.1.b.
Espectro visible del filtro de óxido de holmio.

11.2. FILTRO DE DIDIMIO.

El filtro de didimio es recomendado para instrumentos con aberturas espectrales de 10 nm o superiores y solo se utiliza en la región visible.

Para verificar que se está trabajando con la longitud de onda correcta se barre el espectro de 485 a 505 nm y de 570 a 605 nm en incrementos de 5 nm como se muestra en la figura 11.2.a.

La escala de la longitud de onda estará correctamente calibrada cuando se tenga un % mínimo de transmitancia de 585 ± 3 nm y un máximo de 495 ± 3 nm.

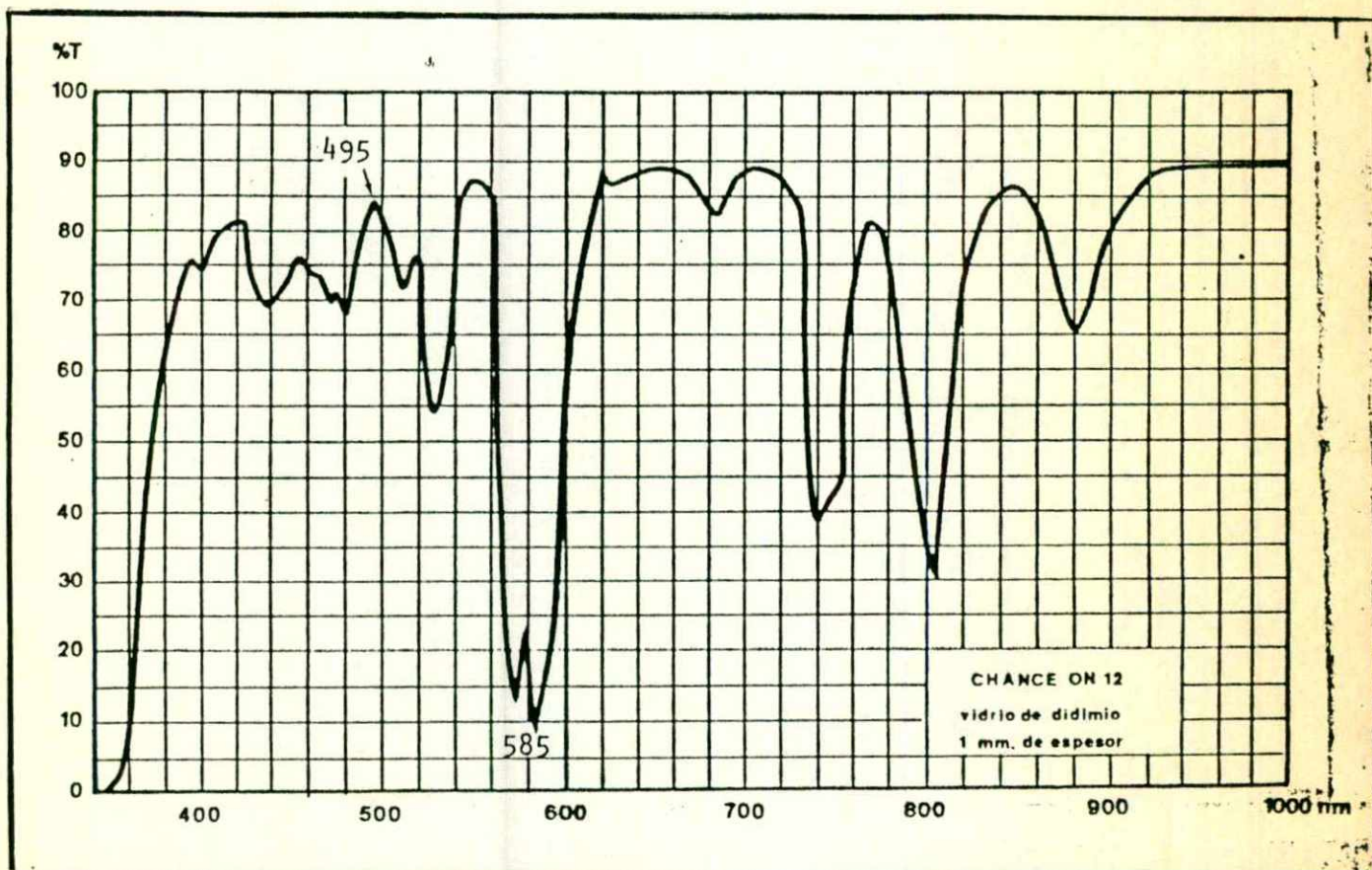


Figura 11.2.a.
Espectro del filtro de didimio.

12. SOLUCIONES ESTANDARES.

Las soluciones estándares se utilizan para verificar la longitud de onda correcta.

12.1. SOLUCION DE DICROMATO DE POTASIO

Esta solución se prepara diluyendo 0.500 gr de dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$ a 100 ml de ácido sulfúrico, H_2SO_4 , 0.01N.

De esta solución se toman 5 ml y se diluyen a 500 ml con H_2SO_4 0.01N en un matraz volumétrico para hacer la solución de trabajo.

Con esta solución leer las absorbancias a 235, 257, 313 y 350 nm. Según la European Brewery Convention, EBC, las absorbancias leídas con celdas de 1 cm deben ser: 0.628, 0.730, 0.245 y 0.537 respectivamente, el espectro de absorción de esta solución se muestra en la figura 12.1.a.

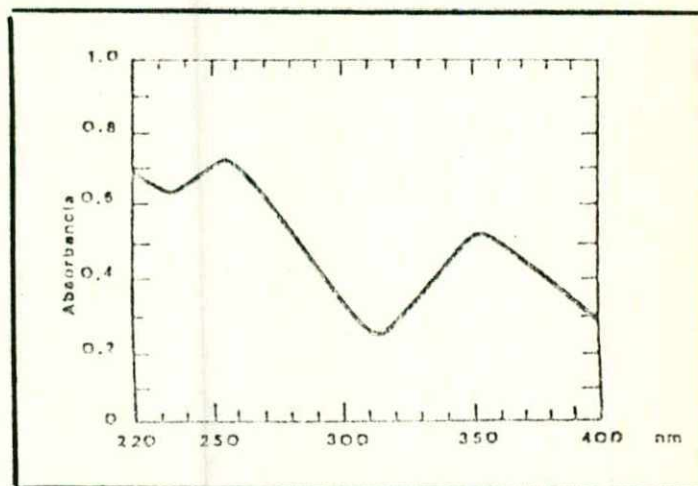


Figura 12.1.a.

Espectro de absorción del dicromato de potasio en ácido sulfúrico 0.01N.

12.2. SOLUCION DE SULFATO DE COBALTO AMONIO.

El sulfato de cobalto-amonio, $CoSO_4(NH_4)_2$, es más usado como estándar que el sulfato de cobalto. Esta solución se prepara disolviendo 1.448 gr de este reactivo en 100 ml de agua destilada que contenga H_2SO_4 al 1% en agua destilada.

Usando esta solución se leen las absorbancias a 430, 435, 520,

530 y 540 nm en la región visible. Las absorbancias leídas según la National Bureau Standards, NBS, usando celdas de 1 cm deben ser: 0.034, 0.043, 0.169, 0.145 y 0.111. El espectro de absorción de esta solución se muestra a continuación.

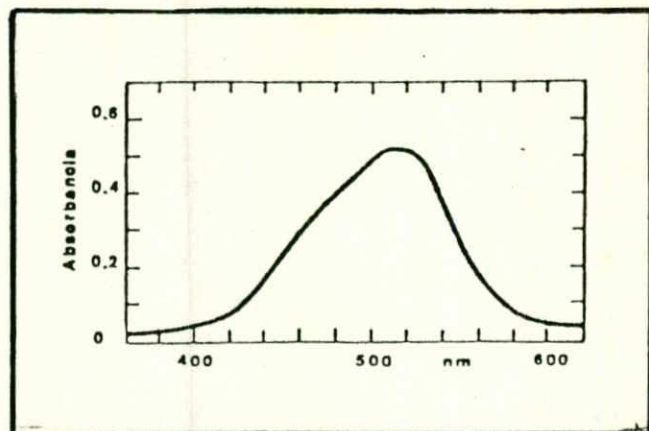


Figura 12.2.1.

Espectro de absorción del sulfato de cobalto-amonio.

12.3. SOLUCION DE CROMATO DE POTASIO.

Para su preparación se pesan 0.40 gr de cromato de potasio y se diluyen a 100 ml con KOH 0.05N, de esta solución se toman 5 ml y se diluyen a 500 ml con KOH 0.05N.

Esta solución se usa para verificar la longitud de onda en la región ultravioleta y visible. Se leen las absorbancias en la región ultravioleta a la longitud de onda de: 250, 260, 280, 290, 340 y 350 nm. Las absorbancias leídas con celdas de 1 cm según la NBS deben ser: 0.496, 0.633, 0.712, 0.428, 0.316 y 0.559. Leer las absorbancias en la región visible a 360, 380, 410 y 430 nm. Las absorbancias leídas según la NBS deben ser: 0.830, 0.932, 0.199 m y 0.084.

13. OTROS PROCEDIMIENTOS ANALITICOS.

13.1. ABSORCIOMETROS FOTOELECTRICOS.

Estos instrumentos tienen la característica de medir la cantidad de luz absorbida mediante un galvanómetro. Los absorciómetros utilizan celdas fotoeléctricas, cuando la luz incide sobre estas celdas se genera corriente eléctrica que es medida por medio del movimiento de una aguja galvanométrica, este movimiento es proporcional a la densidad de la luz.

La luz es absorbida a través de su paso por la solución coloreada. Mientras más luz es absorbida menos luz es transmitida hacia la celda fotoeléctrica, por lo tanto menos electricidad generada.

13.2. COLORIMETRIA VISUAL.

Un procedimiento colorimétrico visual consiste en comparar la solución desconocida con una solución estándar en un instrumento de haz dividido. Aquí las dos soluciones están contenidas en tubos de fondo plano; las longitudes de la trayectoria se modifican por medio de émbolos transparentes ajustables que puedan elevarse y bajarse en las soluciones. Cuando se ha logrado equilibrio visualmente, se miden las longitudes de las trayectorias; la concentración de la solución desconocida puede calcularse de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{Ec. 13.2.a.} & \quad A_x = A_s \\ \text{Ec. 13.2.b.} & \quad \epsilon b_x C_x = \epsilon b_s C_s \\ \text{Ec. 13.2.c.} & \quad C_x = C_s \frac{b_s}{b_x} \end{aligned}$$

donde "x" designa la solución desconocida y la "s" la estándar. Un colorímetro Duboscq se basa en estos principios y contiene un sistema óptico que permite la fácil comparación de los haces que pasan por un ocular con un campo visual dividido.

14. APLICACIONES DE LA ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISIBLE.

14.1. APLICACIONES QUIMICAS.

La absorción de la energía radiante en las regiones espectrales del visible y del ultravioleta depende principalmente del número de arreglos en los electrones de las moléculas o iones absorbentes.

En las sustancias inorgánicas se produce una absorción selectiva cuando un nivel energético electrónico incompleto se halla cubierto o sobrepuesto por un nivel de energía completo, normalmente formado por valencias de coordinación con otros átomos. Como ejemplo de esto consideremos el caso del cobre. El ion simple Cu^{2+} nunca se encuentra en soluciones acuosas debido a que tiene una gran tendencia a formar uniones coordinadas con cualquier molécula o iones disponibles que tengan pares de electrones sin compartir. Estos pares no compartidos están presentes en el agua. Los diversos iones no tienen los mismos colores debido a que la naturaleza del ligando produce un efecto en la energía de los electrones.

Muchos iones y moléculas que tienen dobles ligaduras y que pueden representarse como híbridos de resonancia de distintas estructuras absorben radiación ultravioleta en la región de 200 a 400 nm. Como ejemplo se encuentra el ion nitrato que puede considerarse como híbrido de resonancia de tres estructuras como se muestra a continuación:

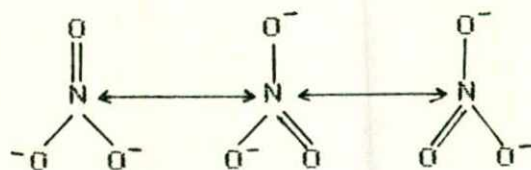


Figura 14.1.a.

Híbridos de resonancia del ion nitrato.

El ion nitrato tiene dos picos de absorción en el ultravioleta: uno a 203 nm y el otro a 300 nm. Se han determinado trazas de nitratos en carbonatos de tierras alcalinas, efectuando mediciones a 203 nm o a 210 nm. El ion carbonato no absorbe la radiación ultravioleta en esta región, lo cual hace posible la determinación de nitratos sin interferencia.

La siguiente tabla muestra la transmisión ultravioleta de los disolventes comunes.

Longitud de onda, nm	Disolvente
180 - 195	Acido sulfúrico 96% Agua Acetonitrilo
200 - 210	Ciclohexano n-hexano Glicerol 2,2,4-trimetilpentano Metanol
210 - 220	Alcohol n-butílico Alcohol isopropílico Ciclohexano Eter etílico
245 - 260	Cloroformo Acetato de etilo Formiato de metilo
265 - 275	Tetracloruro de carbono Sulfóxido de dimetilo Dimetil formamida Acido acético
280 - 290	Benceno Tolueno m-xileno
Arriba de 300	Piridina Acetona Disulfuro de carbono

Tabla 14.1.a.

Límite de la transmisión ultravioleta de los disolventes comunes.

La absorción selectiva entre las moléculas orgánicas está relacionada con la localización de los electrones en la molécula. Los compuestos completamente saturados no muestran una absorción selectiva en las regiones del visible y en las accesibles del ultravioleta lejano, 195 nm para el etileno. Las dobles ligaduras conjugadas producen absorción a mayores longitudes de onda. Entre más extenso sea el sistema conjugado, mayores serán las longitudes de onda a las que se observe la absorción. Si el sistema se extiende demasiado, la absorción penetrará en la región visible y presentará color. Por lo tanto el β -caroteno con 11 dobles ligaduras conjugadas absorbe fuertemente en la región

situada entre 420 y 480 nm, y por lo tanto aparece de color amarillo-verde. Al sistema conjugado completo de un compuesto se le llama cromóforo.

Las longitudes de onda de máxima absorción proporcionan un medio de identificación del cromóforo. Los espectros se modifican por la presencia de varios grupos atómicos, cuando estos sustituyen a los átomos de hidrógeno en los carbonos del cromóforo. Tales sustituyentes tienen el efecto de desplazar las bandas de absorción a longitudes de onda mayores y cambiar los valores de absorbancia. Los sustituyentes que producen estos efectos se conocen como auxocromos.

En la tabla 4.1.b. aparece una lista de compuestos orgánicos que contienen cromóforos típicos junto con las longitudes de onda de su máximo de absorción y sus valores aproximados de absorptividad molar.



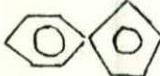
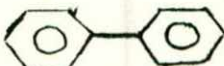
Compuesto	Cromóforo	Disolvente	λ_{\max} . nm	"E"
Octeno	C=C	Hexano	185	3.9
Acetileno	C≡C	Vapor	173	3.8
Acetona	C=O	Hexano	188	2.9
Acetato de diacetil	N=N	Etanol	252 371	3.9 1.1
Butadieno	C=C-C=C	Hexano	217	4.3
Crotonaldehído	C=C-C=O	Etanol	217	4.2
Dimetilglioximo	N=C-C=N	Etanol	226	4.7
Octatri-enol	C=C-C=C-C=C	Etanol	265	4.7
Vitamina A	$[-C=C-]_5$	Etanol	328	3.7
Decatetranol	$[-C=C-]_4$	Etanol	300	4.8
Benceno		Hexano	198 255	3.9 2.4
1,4-Benzoquinona		Hexano	245 285 435	5.2 2.7 1.2
Naftaleno		Etanol	220 275 314	5.0 3.7 2.5
Difenil		Hexano	246	4.3

Tabla 4.1.b.

Cromóforos representativos.

En compuestos aromáticos el anillo bencénico es el cromóforo más simple. Cuando hay dos o más anillos en conjugación, como en

el naftaleno o en el difenilo, la absorción se desplaza nuevamente hacia longitudes de onda mayores. La tabla 4.1.c. muestra los efectos de algunos auxocromos en la absorción del benceno y la figura 14.1.b. muestra el espectro de absorción del benceno en solución de ciclohexano.

Compuesto	Disolvente	Banda etilénica		Banda bencenoide	
		$\lambda_{\text{máx. nm}}$	" ϵ "	$\lambda_{\text{máx. nm}}$	" ϵ "
Benceno	Ciclohexano	198	3.90	255	2.36
Ion anilio	Acido acuoso	203	3.88	254	2.20
Clorobenceno	Etanol	210	3.88	257	2.23
Trofenol	Hexano	236	4.00	269	2.85
Fenol	Agua	210.5	3.79	270	3.16
Anilina	Agua	230	2.93	280	3.16
Ion fenolato	Base acuosa	235	3.97	287	3.42

Tabla 14.1.c.

Efecto de los auxocromos en el anillo cromóforo de benceno.

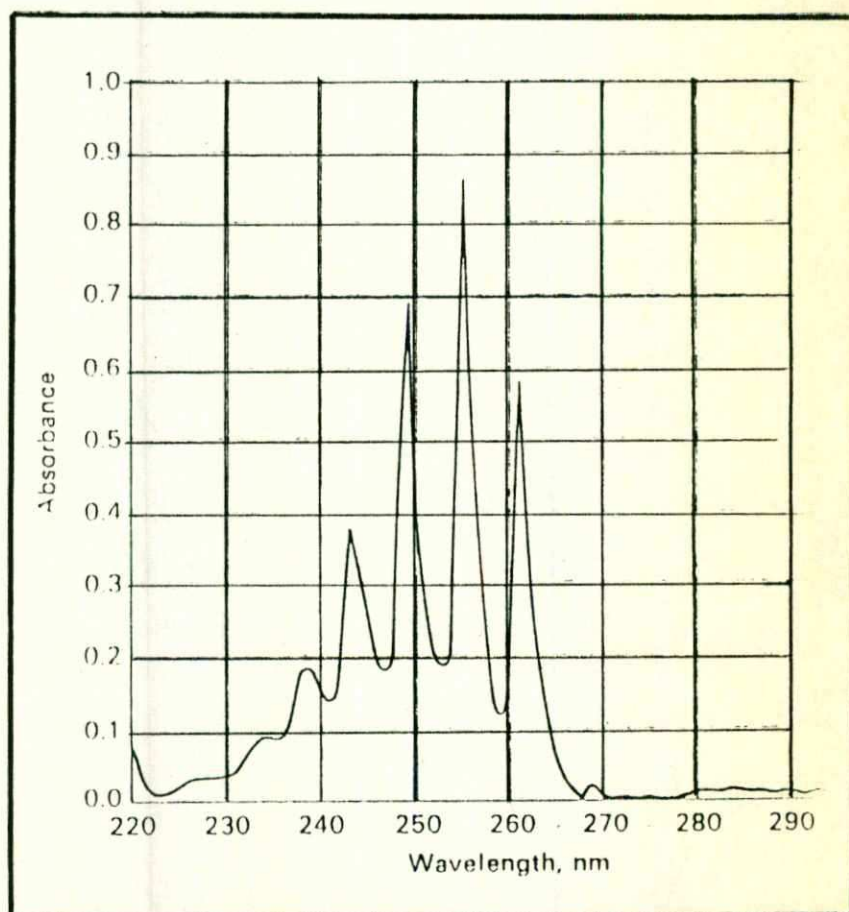


Figura 14.1.b.

Espectro de absorción del benceno en el ultravioleta en solución de ciclohexano.

14.2. ANALISIS CUALITATIVO.

Los espectros de absorción en el ultravioleta y en el visible son de gran utilidad en el conocimiento de las estructuras de compuestos orgánicos, estos compuestos tienen bandas de absorción de distintas formas, localizaciones e intensidades. La identificación y detección de la absorción de grupos es posible usando la región ultravioleta del espectro. La identificación de un compuesto individual es más difícil que la identificación de grupos porque las bandas de absorción son más características para grupos que para la molécula.

La absorción selectiva, por sí sola, rara vez es lo suficientemente apropiada para la identificación de una estructura particular. La falta de una absorción apreciable en la región de 270 a 280 nm es una evidencia inequívoca de que el compuesto no contiene un anillo bencénico. Si no hay absorción desde la región cercana a 210 nm hasta el visible, es seguro que el compuesto contiene una insaturación no conjugada. Si la transparencia se extiende a un nivel tan bajo como 180 nm, se concluye que están ausentes hasta las dobles ligaduras aisladas.

La variación del espectro de absorción de un indicador ácido-base en función del pH proporciona un método para la determinación del valor del pK de un indicador. En la siguiente figura, 14.2.a. están graficadas las curvas de absorción del rojo de fenol para una serie de valores de pH, la absorción a una $\lambda = 610$ nm aumenta, mientras que la absorción más baja a una $\lambda = 430$ nm disminuye. Las diferentes curvas se cruzan en el punto en donde $\lambda = 495$ nm; este punto se denomina punto de isoabsortividad o punto isobéptico y es característico de un sistema que contiene dos cromóforos interconvertibles.

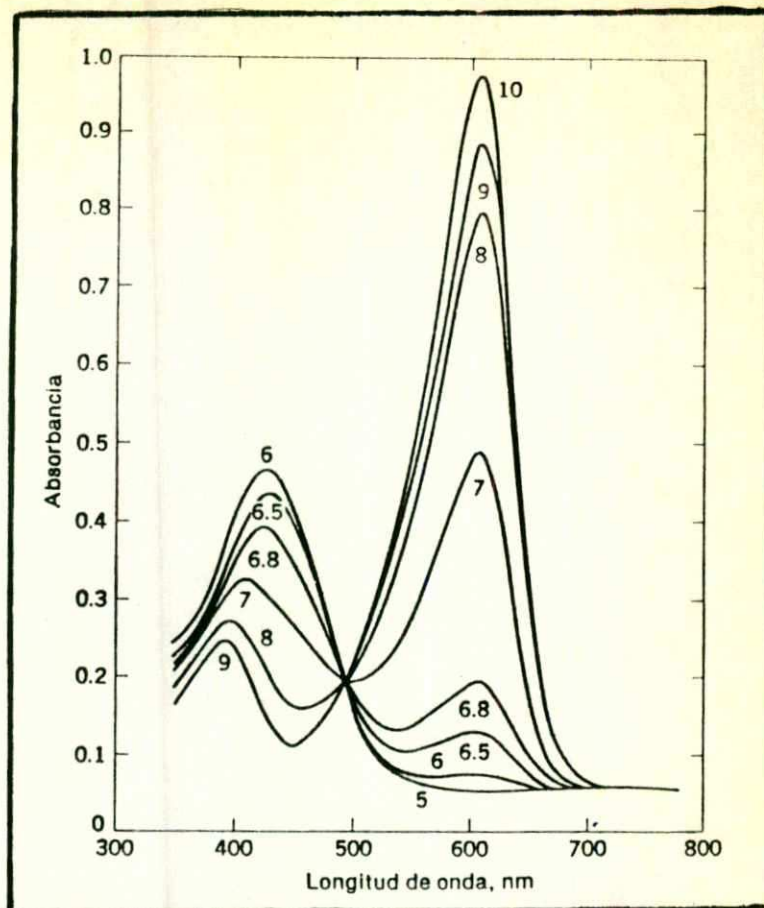


Figura 14.2.a.

Rojo de fenol. Curvas de absorbancia para diferentes valores de pH

Si graficamos la absorbancia a $\lambda = 615 \text{ nm}$ contra el pH, se obtiene una curva en forma de "S", figura 14.2.b. La parte horizontal izquierda corresponde a la forma ácida del indicador, mientras que la parte superior derecha corresponde a la conversión casi total a la forma básica.

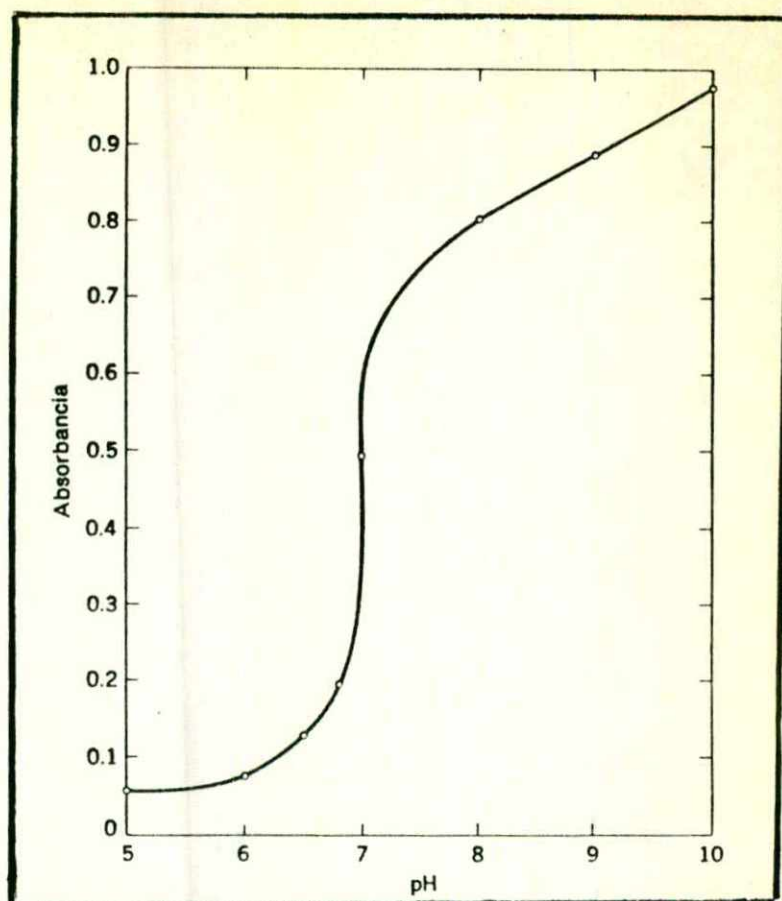


Figura 14.2.b.
 Rojo de fenol. Absorbancia a 615 nm como función del pH.

Las constantes de disociación de los compuestos que absorben más en el ultravioleta que en el visible, se determinan por medio de un proceso similar.

Una técnica usada frecuentemente para identificar compuestos individuales es tomar la relación de absorbancias a dos longitudes de onda diferentes. Esta técnica es usada particularmente para la identificación de barbitúricos y aminoácidos. La presencia de impurezas que absorban en el ultravioleta puede conducir a grandes errores, particularmente cuando el compuesto de interés tiende a absorber débilmente mientras que la presencia de pequeñas cantidades de impurezas absorben fuertemente. Los análisis en la región ultravioleta requieren el uso de cromatografía, extracción selectiva o de otras técnicas de separación.

14.3. DETERMINACION DE LA RELACION LIGANDO/METAL DE UN COMPLEJO.

Debido a que en general los compuestos organometálicos muestran una absorción selectiva en el visible o en el ultravioleta, esta propiedad es ampliamente usada para determinar tanto su composición como sus constantes de estabilidad. La estereoquímica de un compuesto estable se determina por cualquiera de las dos técnicas siguientes: 1) El método de razón molal introducido por Job y 2) El método de variaciones continuas atribuido a Job.

En el método de razón molal se miden las absorbancias para una serie de soluciones que contienen cantidades variables de un constituyente con una cantidad constante de otro, a menudo el ion metálico, figura 14.3.a. Se espera que la gráfica sea una línea recta que vaya desde el origen hasta el punto en donde están presentes cantidades equivalentes de los constituyentes. La curva se vuelve horizontal cuando se usa toda la cantidad de un constituyente y la adición de mayor cantidad de otro constituyente ya no puede producir más complejo absorbente. Si el constituyente que está en exceso absorbe a la misma longitud de onda, después del punto de equivalencia la curva mostrará una pendiente positiva pero de una magnitud más pequeña que la que tenía antes de la equivalencia.

La representación gráfica experimental del complejo 1:1 mostrada en la figura 14.3.a. puede analizarse como sigue.

Las variables experimentales conocidas son la concentración formal del catión F_M , la concentración formal del ligante F_L y la absorbancia medida A . Estas cantidades pueden relacionarse con la concentración en equilibrio de la especie presente, las ecuaciones se muestran a continuación:

$$\begin{array}{lcl} \text{Ec. 14.3.a.} & F_M & = [M] + [ML] \\ \text{Ec. 14.3.b.} & F_L & = [L] + [ML] \\ \text{Ec. 14.3.c.} & A & = \epsilon_M [M] + \epsilon_{ML} [ML] \end{array}$$

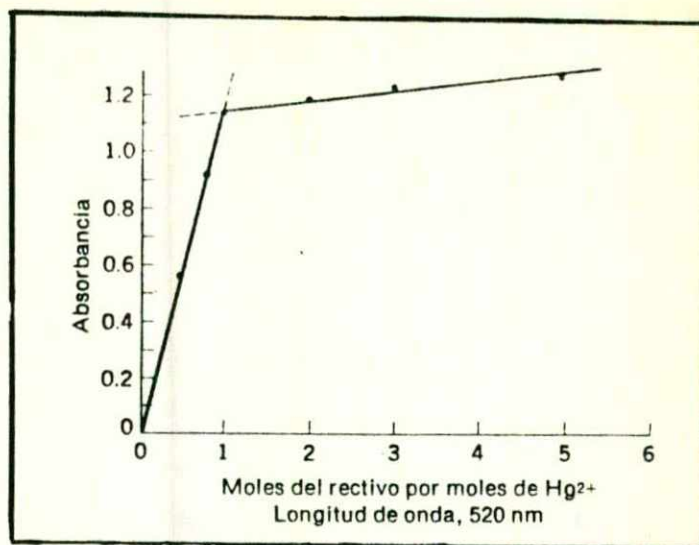


Figura 14.3.a.

Gráfica de Yoe-Jones para el complejo mercurio-difenilcarbazona.

En el método de variaciones continuas se requiere de una serie de soluciones de concentración variable de los dos constituyentes pero cuya suma permanece constante. Se mide la absorbancia de cada solución a una longitud de onda apropiada y se corrige para cualquier absorbancia de la mezcla si no se ha producido reacción.

La absorbancia corregida se puede representar entonces gráficamente contra la fracción volumen, que es igual a la fracción mol, de uno de los reactivos; es decir, $V_M / (V_M + V_L)$, donde V_M es el volumen de la solución catión y V_L el del ligante. Una representación gráfica aparece en la figura 14.3.b.

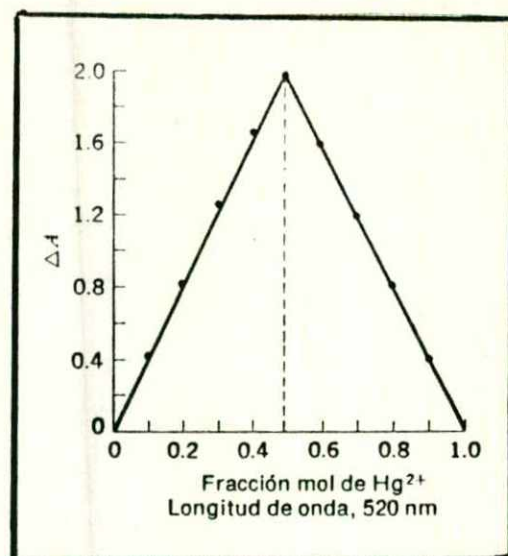


Figura 14.3.b.

Gráfica de Job para el complejo mercurio-difenilcabazona. La coordenada vertical representa la diferencia entre la absorbancia de la solución mixta y la suma de la absorbancia que los reactivos mostrarían si no hubieran reaccionado.

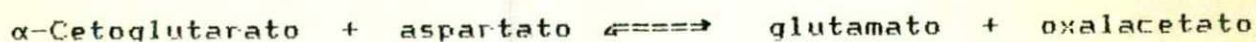
14.4. ANALISIS CUANTITATIVO.

El análisis de una sustancia absorbente puede llevarse a cabo directamente a través de la ley de Beer. En los laboratorios clínicos se realizan un gran número de análisis en suero para determinar: glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, bilirrubinas, colesterol, proteínas totales, calcio fósforo, TGO, TGP, DHL, CPK, fosfatasa ácida, fosfatas alcalina, etc.

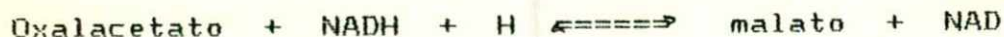
Un ejemplo de lo anterior sería la determinación de TGO, transaminasa glutámica oxalacética, en suero. A continuación se muestra el fundamento de la técnica:

- Fundamento:

La glutamato-oxalacetato-transaminasa, TGO, cataliza el transporte de nitrógeno desde el glutamato al oxalacetato según la siguiente ecuación:



Para la determinación cuantitativa de TGO se deja actuar el suero problema en solución amortiguadora sobre cetoglutarato y aspartato. El oxalacetato producido se transforma enzimáticamente en malato, en presencia de malato-deshidrogenasa.



La velocidad de consumo de NADH puede medirse por la disminución de la absorción en la región del ultravioleta cercano. Sus valores son directamente proporcionales a la actividad de la TGO.

14.5. ESPECTRO ULTRAVIOLETA DE NARCOTICOS Y DROGAS PELIGROSAS.

La espectrofotometría ultravioleta fué usada para la identificación de narcóticos y drogas en 1884. La clasificación y codificación sistemática del espectro de absorción de los narcóticos detectables por medio de la absorción ultravioleta comenzó desde la década de los 50's. Uno de los mejores catálogos fué publicado por la Ottawa Food and Drug Laboratories.

Algunos de los problemas a los cuales se enfrentan los laboratorios criminológicos por medio de la Federal and State Narcotics and Dangerous Drug Laboratories es la identificación de concentraciones muy pequeñas de drogas mezcladas con otros compuestos que absorben en la región ultravioleta.

Las drogas que pueden ser detectadas en la región ultravioleta son: cocaína, dextro y levo metadona, isometadona, pipidona, narcotina, ácido opiánico, codeína, morfina, etc.

14.5.1. DETERMINACION DE BARBITURICOS Y SALICILATOS POR ABSORCION ULTRAVIOLETA.

- Introducción:

La toxicología y algunos laboratorios clínicos deben ser capaces de extraer barbitúricos y salicilatos de fluidos del organismo humano así como para protegerlo de la presencia de éstos. Los análisis cuantitativos son hechos a una longitud de onda de 260 nm.

- Principio:

Los barbitúricos son extraídos del material biológico con cloroformo. La droga es removida de este solvente con hidróxido de sodio, NaOH, y la curva de absorbancia del ultravioleta es leída en el espectrofotómetro. Todos los barbitúricos existen en dos formas ionizadas dependiendo del pH. Una forma se obtiene cuando se trabaja a un pH de 14 en donde la curva muestra un máximo de absorción a 255 nm y un mínimo a 235-237 nm. Otra forma se obtiene cuando se trabaja a un pH de 10 y se obtiene una curva cuya absorción máxima es a 240 nm. El punto isobéptico ocurre a 225-235 nm y a 245-250 nm.

- Reactivos:

1. Cloruro de amonio al 16%.
2. Hidróxido de sodio 0.45 N.
3. Solución saturada de NaH_2PO_4 .
4. Cloroformo A.R., agente reactivo.

- Procedimiento:

1. Colocar la longitud de onda del aparato a 260 nm en el rango ultravioleta.
2. Colocar 1 ml de suero, o de otro fluido del organismo, en un embudo de separación y a este agregar 1 ml de solución saturada de NaH_2PO_4 y 25 ml de cloroformo.
3. Agitar por tres minutos.
4. Retirar el extracto de cloroformo, fase inferior, filtrarlo a través de papel Whatman # 1 y pasar el filtrado a un segundo embudo de separación.
5. Adicionar 5.0 ml de NaOH 0.45 N al cloroformo contenido en el segundo embudo.
6. Agitar por tres minutos.
7. Retirar la capa de cloroformo y descartarla.
8. Transferir la capa de NaOH 0.45 N que queda a un tubo de ensaye de 10 ml y centrifugar a 3 000 rpm durante 5 minutos.
9. Transferir la capa de NaOH a un segundo tubo de ensaye y aplicar succión por un minuto.
10. Colocar 3.0 ml del extracto de NaOH a una cubeta del espectrofotómetro, la cubeta debe ser de cuarzo.
11. Añadir 3.0 ml de NaOH 0.45 N a otra cubeta del espectrofotómetro, introducirla en el aparato y ajustarlo a cero de absorbancia usando una longitud de onda de 260 nm.
12. Reemplazar la cubeta que contiene la solución de NaOH y recorrer la absorbancia de 220 nm a 350 nm empleando la solución de NaOH como referencia, figura 14.5.1.a., curva A.
13. Adicionar a los 3.0 ml de muestra 0.5 ml de solución de cloruro de amonio al 16%, mezclar por inversión.
14. Insertar la cubeta con la muestra en el espectrofotómetro y recorrer la absorbancia en el mismo rango que la anterior, figura 14.5.1.a., curva B.

- Cálculos:

$$\text{mg\%} = \left(\frac{\text{A} - 7/6 \text{ a } 260}{\text{curva A}} \right) \times \text{factor}$$

La fracción 7/6 es requerida para corregir la dilución doble del volumen adicionado de cloruro de amonio. El factor representa los mg% de barbitúrico en particular asociado con una absorbancia a 260 nm = 1.0. El factor difiere para cada uno de los barbitúricos.

Algunos ejemplos se presentan en la tabla 14.5.1.a.

	Factor
Barbital	25
Fenobarbital	29
Secobarbital	35
Pentobarbital	35
Factor general	35

cuando el barbitúrico específico es desconocido.

Tabla 14.5.1.a.

Ejemplos de algunos barbitúricos comunes.

- Notas:

1. La presencia de burbujas o manchas en la cubeta para blanco o muestra puede introducir serios errores en los resultados. Cada cubeta debe ser inspeccionada antes y después de introducirla en el espectrofotómetro.
2. Curvas estándares. Las curvas estándares son preparadas por los mismos procedimientos conocidos para barbitúricos de la misma manera que se describe para sangre. Coloque 100 gr de sal de sodio de un derivado del ácido barbitúrico dado en un matraz volumétrico de 1 000 ml, disuelva con agua destilada y diluya al volumen indicado. Esta solución nos da una concentración de 10 mg%. La diferencia de absorbancia de la curva A y B a 260 nm es proporcional a la concentración del barbitúrico, el factor utilizado es de 3.5.
3. Todos los barbitúricos son reportados como sales monosódicas.

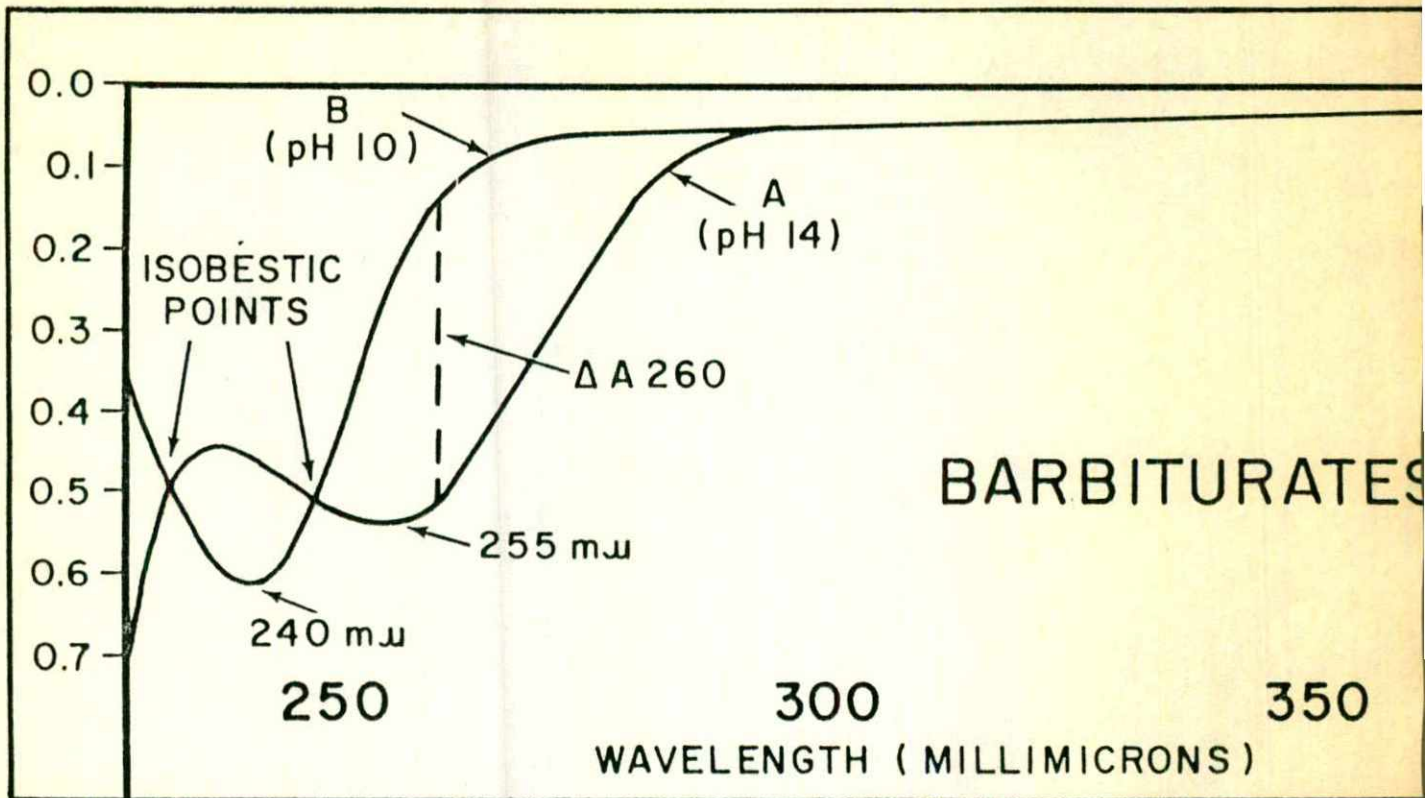


Figura 14.5.1.a.
Curva de absorbancia de los barbitúricos.

- Interpretación:

Los valores de 0.0 a 1.0 mg% son dudosos y pueden ser reportados como negativos o menores a 1.0 mg% de barbitúrico. Los valores arriba de 1.0 mg% pueden considerarse como indicativos de la presencia de barbitúricos. La siguiente tabla, 14.5.1.b. resume la correlación de barbitúricos en la sangre de pacientes clínicos, y la tabla 14.5.1.c. muestra la proporción de desaparición de los barbitúricos en la sangre.

Barbitúricos	Etapas clínicas				
	1	2	3	4	5
Fenobarbital	3.5	4.4	6.5	10.0	15.0
Amobarbital	1.5	2.5	4.7	6.2	8.6
Secobarbital	0.8	2.0	3.0	4.0	5.0

Tabla 14.5.1.b.
Correlación de barbitúricos en la sangre de pacientes clínicos.

- Etapa 1 Individuo despierto, tranquilo, competente.
- Etapa 2 Individuo tranquilo, presenta reflejos, prefiere dormir, responde a preguntas con ánimo.
- Etapa 3 Individuo presenta reflejos y un estado comatoso.
- Etapa 4 El individuo entra en estado comatoso y no presenta reflejos.
- Etapa 5 Estado comatoso, con dificultad circulatoria y respiratoria.

Barbitúrico	Vida media	Decremento diario %
Fenobarbital	72 horas	21
Amobarbital	25 horas	48
Pentobarbital	20 horas	57
Seconal	20 - 40 horas	(50?)

Tabla 14.5.1.c.
 Proporción de desaparición de los barbitúricos de la sangre.

15. CONFIGURACIONES REPRESENTATIVAS DE LOS INSTRUMENTOS COMERCIALES.

15.1. COLEMAN JUNIOR 6/20

Este modelo incorpora adicionalmente un sistema modulador/demodulador y un amplificador logaritmico para la escala lineal de absorhancia, y en algunos casos, un galvanómetro para lectura directa. El objeto del sistema modulador/demodulador es el de trabajar la amplificación en corriente alterna. Para mayor exactitud, en un principio se utilizaron frecuencias de 35 ciclos por segundo y posteriormente 60 para minimizar las interferencias de la línea de alimentación. En este equipo al seleccionar un filtro ya sea para el ultravioleta o el infrarrojo cercano, la ganancia del amplificador se incrementa 5 veces para compensar la respuesta del detector. La siguiente figura representa el diagrama del Coleman Junior 6/20:

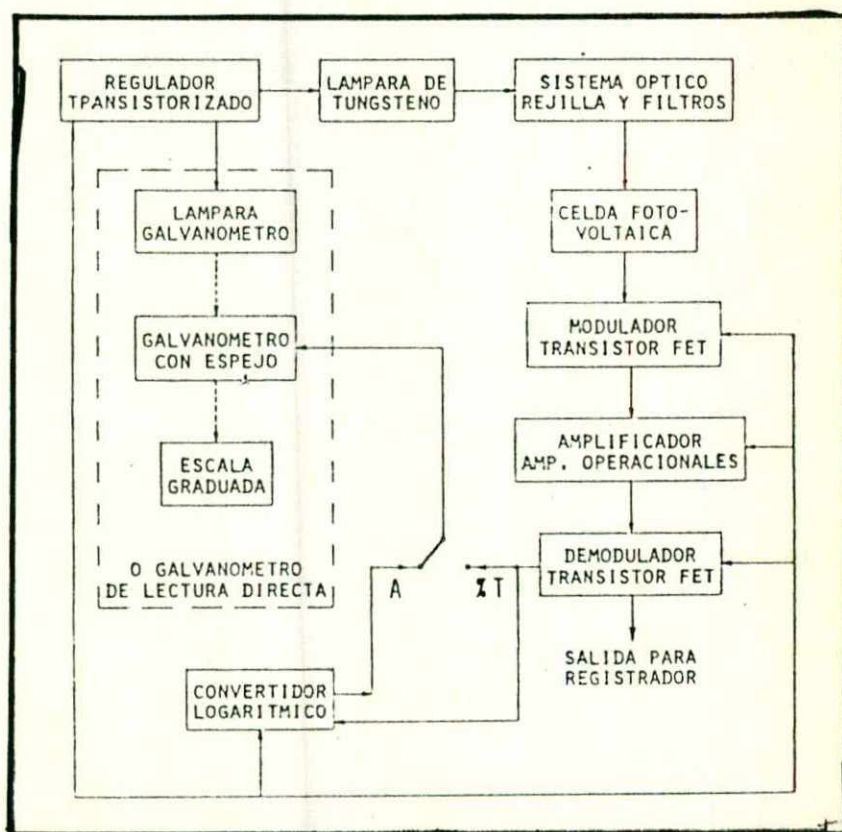


Figura 15.1.a.

Diagrama de bloques del Coleman Junior 6/20

15.2. BAUSH AND LOMB SPECTRONIC 20.

Este aparato relativamente simple, utiliza solamente una lámpara de tungsteno como fuente luminosa. El elemento dispersor es una rejilla y la detección fotoeléctrica se logra mediante un fototubo, aunque se ofrece como opción otra para extender la respuesta hacia el infrarrojo cercano. Las lecturas se obtienen directamente del galvanómetro graduado en % de transmitancia ó de absorbancia. Para mayor precisión puede añadirse un fototubo de referencia con un regulador extra, con lo que se minimiza el efecto de los cambios de intensidad de la lámpara sobre las lecturas. En los primeros modelos se emplearon diodos al vacío, reguladores de gas y triodos dobles. Posteriormente se fueron haciendo cambios graduales hacia rectificadores de silicio, diodos zener, transistores y amplificadores operacionales, manteniéndose el mismo sistema óptico y la apariencia externa, en la siguiente figura se observa el diagrama del Spectronic 20.

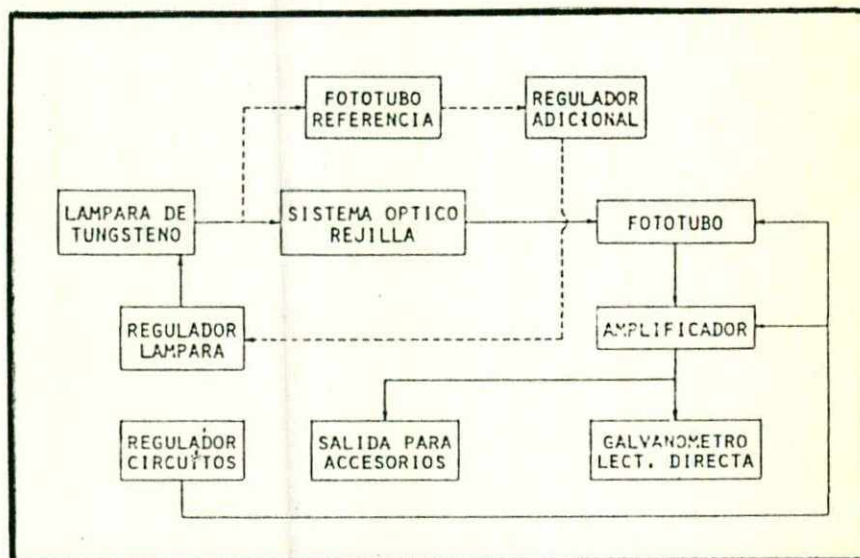


Figura 15.2.a.

Diagrama de bloques del Spectronic 20.

15.3. VARIAN DMS 70, Espectrofotómetro digital.

El espectrofotómetro DMS 70 es un instrumento de doble haz avanzado, con una rejilla holográfica, un sistema de espejos de corte, un compartimiento cerrado para el manejo de celdas para muestra y estándar. Provee poco ruido, una alta estabilidad fotométrica y proporciona resultados de absorbancia, % de transmitancia o concentración.

El equipo DMS 70 incluye el cálculo automático para la conversión de los resultados obtenidos. Efectúa el análisis automatizado de 175 muestras por tanda.

- Óptica:

Doble haz, rejilla monocromática holográfica, sistema de espejos de corte, tubo fotomultiplicador, luz parásita menor al 0.02% a 220 nm, abertura espectral del orden de 2 nm.

- Fuentes:

Utiliza una lámpara de cuarzo halógeno y deuterio, el cambio de la fuente de la región ultravioleta a visible es automático, este cambio se da a la longitud de onda de 350 nm.

- Longitud de onda:

Rango de longitud de onda de 200 a 800 nm.

- Lectura fotométrica:

Microprocesador con pantalla de cuatro dígitos, proporciona lectura en absorbancia, % de transmitancia y concentración. El cero es automático.

- Rangos fotométricos:

De -0.5 a 2.5 de absorbancia ó a 400% de transmitancia, hasta 9999 de concentración, con expansión arriba de 100x.

16. MANTENIMIENTO PREVENTIVO.

16.1. REPETIBILIDAD FOTOMETRICA.

Este parámetro representa la capacidad del sistema fotométrico de reproducir el mismo valor en sucesivas determinaciones. Todas las mediciones deben ser hechas continuamente en el mismo espectrofotómetro usando los mismos materiales.

La repetibilidad fotométrica es determinada efectuando diez mediciones de la misma muestra en absorbancia o en transmitancia.

- Procedimiento:

1. Encender el instrumento, seleccionar la lámpara y el filtro adecuado.
2. Seleccionar la longitud de onda apropiada.
3. Seleccionar la transmitancia o absorbancia.
4. Insertar el estándar en el compartimiento de muestras. Siempre orientando la celda en la misma dirección.
5. Repetir el paso 4 diez veces.
6. Calcular el promedio de las diez lecturas y calcular la diferencia de cada lectura respecto al promedio.

16.2. RUIDO O DERIVA.

La posición del cero debe ser constante antes de pretender hacer estimaciones correctas. Si se observa el indicador por un minuto, puede detectarse la presencia de ruido, fluctuación o deriva, desviación continua a uno de los lados. Cuando los efectos de cualquiera de ellos va más allá de ciertos límites de tolerancia es necesario corregir la falla antes de proseguir.

Algunos de los espectrofotómetros más sencillos tienden a mostrar una posición más estable de 0% que de 100% de transmitancia; en estos casos también se sugiere probar el ajuste de 100% de transmitancia en previsión a la presencia de ruido y/o deriva.

Los instrumentos de barrido recogen automáticamente las variaciones debidas a ruido y/o deriva durante las pruebas preliminares. Algunos de estos instrumentos se someten a dichas pruebas por lapsos de 8 a 15 horas.

El ruido y/o deriva puede ser casi totalmente achacado a una de cuatro posibles causas: humedad, conexiones eléctricas defectuosas, superficies fotodetectoras fatigadas o saturadas y láminas envejecidas o inútiles.

16.3. ANCHO DE BANDA.

Los instrumentos varían considerablemente en sus anchos de banda, ya sea porque el instrumento tenga una rendija fija, y por lo tanto un ancho de banda relativamente fijo, una rendija variable o un programa a elegir.

El concepto general es que mientras más angosta sea la abertura de la rendija, más exacta la selección de la longitud de onda máxima. Sin embargo, no es válido ajustar la distancia entre las hojas, o mandíbulas de la rejilla y suponer que el ajuste sea exactamente el indicado en el control. El ancho de banda puede modificarse a causa de alguna anomalía física de las mandíbulas o de algún cambio en el sistema óptico tal que aumente la dispersión de la luz.

La forma más sencilla de detectar un aumento en el ancho de banda estriba en examinar si ha habido una disminución en la resolución, en este caso se hace revisión usando siempre el mismo estándar, filtro de óxido de holmio, etc.

16.4. RESOLUCION.

La resolución de un instrumento es una medida del grado al cual puede separar picos de absorbancia o transmitancia que ocurren a longitudes de onda cercanas entre sí. Puesto que la resolución es una función del ancho de rendija, la elección de una abertura de rendija es una operación crítica. A menor distancia entre las mandíbulas de la rendija, mayor resolución, pero esto se acompaña de una reducción de energía.

Existen dos procedimientos simples para realizar la inspección de la resolución de un instrumento:

1. El espectro de vapor de benceno tiene un pico menor a 259.6 nm que puede ser resuelto de la banda principal si el instrumento tiene una abertura espectral de rendija de menos 0.5 nm. Se coloca una gota de benceno en una celda de 1 cm con tapa y se espera a que se equilibre con la temperatura ambiente. La presión de vapor es tal que la absorbancia a la longitud de onda será 0.8 de absorbancia.
2. El perfil de la línea de emisión a 656.1 nm de la lámpara de deuterio del propio instrumento puede ser medida pasando a la función de energía o haz único del equipo. La aparente anchura de la banda a la altura de medio pico se toma como la abertura espectral de rendija del instrumento. La abertura espectral representa el ancho de banda mínimo de un compuesto que puede ser medido a esa longitud de onda con cierto grado de confianza.

16.5. LUZ PARASITA.

La energía radiante que llega al detector por otras longitudes de onda que no son las ajustadas por el monocromador y a toda la energía radiante que llega al detector sin haber pasado por la muestra, se le considera radiación extraña o parásita. La radiación extraña se expresa en forma de porcentaje.

Hay muchas fuentes que originan la radiación extraña, algunas pueden deberse al no tapar el compartimiento de muestras o a la carencia de protección del detector, a estas fuentes se les considera de tipo externo.

Existen otras fuentes de tipo interno, es decir, que el propio instrumento origina la radiación extraña, como puede ser una lámpara en mal estado. Esta contribución de la radiación extraña dependerá de la edad de la lámpara. A medida que vaya disminuyendo el poder de radiación aumentará la radiación extraña. El efecto de envejecimiento de la lámpara se puede detectar por una respuesta no lineal al estar verificando la linealidad de la respuesta del detector.

La principal fuente que origina la radiación extraña es el monocromador donde puede suceder una desviación de la luz debido a que la superficie óptica está sucia o en mal estado, puede suceder una reflexión en los bordes de la rendija, o en los espejos.

El criterio a seguir para eliminar la radiación extraña incluye: verificar la calibración de la longitud de onda, salida de la energía del fototubo, alineación de los componentes del instrumento y limpieza de las superficies ópticas. Algunas veces la radiación extraña puede ser reducida a base de filtros que absorben a ciertas longitudes de onda donde la luz extraña se ve aumentada.

Las soluciones de carbonato de litio son usadas frecuentemente en pruebas de luz extraña en el rango de 210 a 225 nm, pero la concentración de la solución saturada depende de la temperatura, motivo por el cual se estima mucho su uso.

16.6. SENSIBILIDAD OPTICA.

La sensibilidad óptica, energía, del instrumento declina después de un cierto tiempo debido a pérdidas de emisión de la lámpara, contaminación de la óptica o envejecimiento de fotodetectores, así como el polvo del ambiente. El problema se hace aparente cuando hay necesidad de mayor abertura de rendija de salida o valores creciente de ganancia del amplificador.

El deterioro "aceptable" en la sensibilidad óptica en la mayoría de los casos es una reducción hasta del 50% sobre la escala de transmitancia, 30% de resolución.

Una pérdida de consideración en sensibilidad óptica puede ser rectificada mediante sustitución de la lámpara. En caso de que la falla no se corrija, deberá sospecharse de un problema en el fotodetector o en la óptica.

16.7. CONTACTOS FALSOS.

En tabletas impresas los contactos falsos de los componentes pueden ser detectados usando un borrador eléctrico de dibujante como prueba de perturbación y puede usarse cualquier aparato vibrador que genere mucha estática.

16.8. HUMEDAD.

Tanto los sistemas ópticos como los electrónicos son seriamente afectados por la humedad ambiente. Algunos equipos tienen cámaras desecantes en los compartimientos del monocromador y de la fuente luminosa. Si el instrumento no la incorpora puede introducirse una bolsita de tela con desecante a manera de protección. La silica gel con indicador de humedad es ideal para estos casos. Un cambio de color de azul a rosado indica que ha habido absorción de humedad. El desecante puede ser vuelto a usar después de que haya estado un tiempo en el horno, 80°C a 100°C, y recuperado el color azul. Otro desecante más económico pero efectivo es el cloruro de calcio.

Si, por alguna causa, no es posible usar un desecante, la solución consiste en encender la lámpara del instrumento con cierta periodicidad, pero debe cuidarse que la luz no alcance el fotodetector.

17. RECOMENDACIONES PRACTICAS PARA EL MANTENIMIENTO PREVENTIVO.

1. Opere el instrumento en un laboratorio cuyo medio ambiente sea limpio.
2. No opere el instrumento en ambientes con alta temperatura, humedad o donde exista la presencia de ácidos volátiles o sustancias químicas corrosivas.
3. Conectar el instrumento dentro de una línea de alimentación correcta sin interferencias.
4. No colocar el instrumento en un lugar donde existan vibraciones.
5. No bloquear la ventilación del instrumento y cubrirlo parcialmente durante su operación.
6. Evitar dejar huellas digitales en la fuente luminosa o en las superficies ópticas, limpiar la cubierta antes de su instalación y manipular la fuente luminosa por medio de su base.
7. Limpiar las superficies ópticas del instrumento con una brocha de pelos de camello o bien con papel óptico.
8. No colocar los dedos en la celda, ni permitir que el reactivo se derrame hacia los lados de la celda. Limpie la celda antes de colocarla dentro del instrumento.
9. Cambie la lámpara cuando disminuya el rendimiento de esta y no esperar a que se funda. El vidrio que envuelve a las lámparas de tungsteno se oscurece con el uso, que se traduce en una disminución de energía.
10. El tiempo de vida de la lámpara se incrementa apagándola cuando no esté en uso y manteniendo el instrumento encendido.

18. DEFINICIONES DE LOS PARAMETROS MAS IMPORTANTES.

Absorbancia.- Es el logaritmo de base 10 del recíproco de la transmitancia. Generalmente para solventes puros es el material de referencia.

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

Banda de absorción.- Es una región del espectro de absorción en donde el paso de absorbancia es máximo.

Absortividad "a".- Es la absorbancia dividida por el producto de la concentración de la sustancia y la longitud interna de la celda.

$$a = A/bc$$

La absortividad tiene las dimensiones de $lt/gr-cm$, cuando la longitud interna de la celda "b" se expresa en cm y la concentración "c" en gr/lt .

Absortividad molar "E".- Si las unidades de concentración son moles/lt, la absortividad recibe el nombre de absortividad molar.

Transmitancia.- Es la relación de la potencia radiante transmitida por la muestra a la potencia incidente en la muestra.

Curva analítica.- Es la representación gráfica de la relación entre la potencia radiante y la concentración de la sustancia que emite o absorbe.

Ley de Beer.- La absorbancia de una muestra homogénea que contenga sustancias absorbentes es directamente proporcional a la concentración de las sustancias absorbentes.

Concentración.- Cantidad de sustancia contenida en una determinada cantidad de muestra.

Filtro.- Es un elemento que bloquea a ciertas longitudes de onda que llegan al detector de una manera definitiva con respecto a la distribución espectral.

Cromóforo.- Es un átomo o grupo de átomos o electrones de una molécula que son los principales responsables de una banda de absorción.

Punto de isoabsortividad.- Es una longitud de onda en donde las absortividades de dos o más sustancias son iguales.

Angstrom Å.- Unidad de longitud de onda y es igual a 10^{-10} cm.

Frecuencia.- Número de ciclos por unidad de tiempo.

Hertz (Hz).- La unidad de frecuencia es igual a un ciclo/seg.

Micrómetro (μm).- Unidad de longitud de onda igual a 10^{-6} mts.

Milimicrón ($\text{m}\mu$).- Unidad de longitud de onda igual a 10^{-3} μ , ó nanómetro.

Dispersión lineal.- Es la derivada $dx/d\lambda$, donde "x" es la distancia a lo largo del espectro y " λ " es la longitud de onda.

Longitud de onda precisa.- Esta medida es la desviación de la longitud de onda leída del pico de una banda de absorción o línea de emisión de un estándar conocido.

Longitud de onda.- Es la distancia entre cresta a cresta, o alternativamente valle a valle, medida a lo largo de la línea de propagación.

Número de onda ν .- Es el recíproco de la longitud de onda, significa el número de ondas que podrían acomodarse en una unidad de longitud de onda usualmente 1 cm, consecuentemente sus unidades son cm^{-1} .

Ancho de banda natural.- Es el ancho de media altura del pico de absorción de la muestra, este ancho está dado por las características intrínsecas de la muestra.

Energía radiante.- Energía transmitida por las ondas electromagnéticas.

Potencia radiante.- Propagación en que la energía es transportada en un haz de energía radiante.

19. BIBLIOGRAFIA.

- 1) Stuart A. Hoening, Daphne H. Scott
Aparatos Médicos Electrónicos
Edit. Limusa
México, 1987
Segunda edición
Cap. 17 "Espectrofotómetro"
Pag: 265 a 267

- 2) F. J. Baker, R. E. Silverton
Introduction to Medical Laboratory Technology
Edit Butterworths
Printed by Robert Hartnoll 1986
Sixth edition
Cap. 6 "Analytical procedures"
Pag: 61 a 69 y 74 a 77

- 3) A. Begner's Guide
The Principales of Biomedical Instrumentation
Edit. Year Book Medical Publishers Inc
Chicago-London 1986
Cap 4. "Instrumentation Theory and Practice"
Pag: 65 a 74

- 4) Handbook of Laboratory
Health and Safety Measures
Edit. by S. B. Pal
1985
Cap. 14 "Ultraviolet Radiation Safety"
Pag: 255 a 257 y 280 a 293

- 5) J. R. Edisburg
Practical Hints on Absorption Spectrometry Ultraviolet
and Visible
Edit. Plenum Press
New York 1986
Second impression
Cap. 11 "Preventive maintenace"
Pag: 143 a 150

- 6) Chapman and Hall C. Burgess A. Knowles
Standards in Absorption Spectrometry
Ultraviolet Spectrometry Group
Edit. Second Published 1988 by Chapman and Ltd
Printed in London
Cap. 7 "Wavelength calibration"
Pag: 111 a 119

- 7) G. W. Ewing
Métodos Instrumentales de Análisis Químicos
Edit. Mc Graw Hill
1986
Cap. 3 "Absorción de la radiación ultravioleta-visible"
Pag: 79 a 87

- 8) Paul Ander y Anthony J. Sonnessa
Principios de Química
Edit. Limusa
México. Reimpresión 1986
Cap. 2 "Estructura atómica"
Pag: 81 a 83

- 9) A. Knowles C. Burgess
Practical Absorption Spectrometry
Ultraviolet Spectrometry Group
Second published 1988 by Chapman and Hall Ltd
Printed in London
Cap. 9 "Measuring the Spectrum"
Pag: 132 a 137

- 10) Beckman Acta CIII UV-Visible
An Introduction to Ultraviolet Spectrophotometry
Irvine California 92664
Copyright 1986
Writer Allan Prince
Cap 3.7. "Applications of Ultraviolet Spectrophotometry"
Pag: 14 a 16
Cap. 6.4. "Stray Light Effects"
Pag: 38 a 49
Cap. 8 "Definitions"
Pag: 59 a 63

- 11) Beckman Instructions 1506-A
96157 Holmium Oxide Filter
1986

- 12) Morales Arias Octavio Saul .
Espectroscopía de Ultravioleta-Visible
Estudio preparado en Perkin Elmer de México
México 1987
Cap. 5 "Instrumentación"
Pag: 23 a 33

- 13) Milton Roy Company
Index of Selected Quantitative Methodologies from the
Analytical
Analytical Products Division
Fomenty a division of Bausch an Lomb
USA 1986

- 14) Pearse B. F.
Basic Instrumental Analysis
Edit. D. Van Nostrand
N. Y. 1986
Cap. 5 "Spectrophotometry Analysis"
Pag: 93 a 115

- 15) Robinson J. W.
Under Graduate Instrumentation
Edit. Marcel Dekker
N. Y. 1987
3rd Edition
Cap. 2 "Colorimeters and Spectrophotometers"
Pag: 62 a 79

- 16) Perkin Elmer
Soluciones para todas las necesidades de su laboratorio
Perkin Elmer de México S.A.
Apartado Postal 19-333
México C. P. 03900 D. F. 1988
Cap. 1 "Técnicas instrumentales aplicadas a la química
forense"
Pag: 1 a 7