David Gonzalez y Rubén Varea

APUNTES DE ESPECTROSCOPIA

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Origen

2. RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA (R.E.M.)

2.1. Espectro electromagnético
2.2. Interacción de la radiación electromagnética con la materia

3. INSTRUMENTACIÓN

3.1. Fuente de radiación
3.2. Selectores de longitud de onda o analizadores
3.2.1. Filtros
3.2.2. Monocromadores
3.3. Recipientes para muestras
3.4. Receptores de radiación
3.4.1. Detectores de fotones
3.4.2. Detectores de calor
3.5. Sistemas de salida de datos

4. TIPOS DE ESPECTROSCOPIA

4.1. Espectroscopía molecular de absorción infrarroja
4.2. Espectroscopía molecular de fluorescencia y fosforescencia
4.3. Espectroscopía de absorción atómica
4.4. Espectroscopía atómica de emisión
4.5. Espectroscopía de fluorescencia atómica
4.6. Espectroscopía Raman
4.7. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (R.M.N.)
4.8. Espectroscopía de electrones
4.9. Espectroscopía de rayos X

5. ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE

5.1. Conceptos previos. Ley de Lambert-Beer
5.2. Los electrones absorbentes de la radiación
5.3. Instrumentación de la espectroscopía de absorción UV-V
5.4. Tipos de instrumentación
5.5. Aplicaciones de la espectroscopía molecular de absorción UV-V
5.5.1. Aplicaciones a nivel cualitativo
5.5.2. Aplicaciones a nivel cuantitativo
5.6. Espectroscopía fotoacústica
5.6.1. Aplicaciones de la espectroscopía fotoacústica

6. INSTALACIÓN Y EMPLEO DEL ESPECTROFOTÓMETRO

7. PRÁCTICAS

7.1. Determinación del coeficiente de extinción molar para una sus tancia absorbente
7.2. Determinación de la constante de velocidad de reacción para la oxidación de una sustancia
7.3. Determinación de la constante de disociación de un ácido
7.4. Determinación de la concentración de los componentes de una muestra binaria
7.5. Cálculo del espectro de absorción de un vegetal

8. BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN

En este estudio se intenta mostrar los principios fundamentales de las técnicas instrumentales espectroscópicas así como dar una apreciación de los tipos de espectrofotómetros existentes en el momento, su instrumentación y funciones.

Estas técnicas se basan en una serie de características de un foco luminoso. Los focos luminosos emiten energía radiante que es recogida por una serie de sensores. En el caso del hombre el sensor es la retina, de manera que la radiación va a llegar a ésta produciendo una estimulación que conlleva a una sensación. Para medir las sensaciones en los análisis de sustancias es imprescindible utilizar instrumentos adecuados ya que la sensibilidad del ojo humano está limitada a la región visible del espectro.

Debido a esto se han diseñado y construido los espectroscopios sensibles a cualquier región del espectro de manera que se pueda medir de forma cuantitativa la intensidad de un foco luminoso.

Actualmente los científicos precisan de aparatos como el espectrofotómetro para conseguir información de la materia. Esta técnica es de utilidad en diversos campos como la biología, bioquímica, geología, química, medicina, ingeniería, medio ambiente, física, entre otros.

1.1 Origen.

En los comienzos de la química, la mayoría de los análisis se realizaban separando los componentes de interés de una muestra (analitos) mediante, precipitación, extracción o destilación. En los análisis cualitativos los componentes separados se trataban con reactivos originando productos que podían identificarse por sus colores, punto de ebullición o de fusión, sus solubilidades en una serie de disolventes, sus olores, sus actividades ópticas. En los análisis cuantitativos la cantidad de analito se determinaba por medidas gravimétricas (se determina la masa del analito o de algún compuesto producido a partir de él) y volumétricas (se determina el volumen o el peso de un reactivo estándar que reaccionase completamente con el analito).

Fue a partir de mediados de los años treinta cuando se empezaron a explotar otros fenómenos distintos de los descritos anteriormente para la resolución de los problemas analíticos. Así, empezaron a utilizarse para el análisis de los analitos sus propiedades físicas tales como conductividad, potencial de electrodo, absorción o emisión de la radiación electromagnética y fluorescencia. Estos fenómenos anteriormente citados se conocen desde hace más de un siglo. En 1864 Maxwell propuso que la luz era de naturaleza electromagnética, es decir que une los conceptos de electricidad y magnetismo. Sin embargo, su aplicación se retrasó por falta de una instrumentación sencilla y fiable. Fue con el desarrollo de la industria electrónica cuando se produjo su aprovechamiento.

Los primeros instrumentos espectroscópicos que aparecieron se desarrollaron para utilizarse en la región visible de la radiación electromagnética y por tanto se denominan instrumentos ópticos. Hoy en día este término se ha ampliado con el fin de incluir también a los instrumentos que trabajan con longitudes de onda de la radiación electromagnética distintas de la región visible.

Los espectrofotómetros son aparatos que trabajan con una longitud de la radiación electromagnética determinada que varía según las necesidades del usuario.

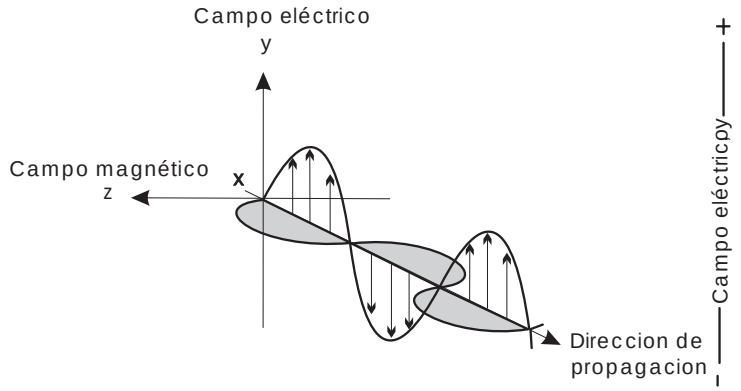
2. RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA (R.E.M.)

Es una forma de energía radiante que se propaga en el espacio a grandes velocidades. A diferencia de otras energías no necesita un soporte material propagándose en el vacío a una velocidad c = 299700 Km/s. Sus manifestaciones más conocidas son la luz y el calor, siendo menos evidentes los rayos X, rayos yyggfdsaeegg, microondas, radiofrecuencias.

Para explicar parte de sus propiedades se la considera como una onda y para explicar su interacción con la materia se considera como un conjunto de partículas altamente energéticas, los fotones. Por lo tanto la radiación electromagnética tiene doble naturaleza onda-partícula.

Modelo ondulatorio: La radiación electromagnética se considera como un onda armónica simple que es un campo eléctrico que lleva asociado perpendicularmente un campo magnético. En este fenómeno ondulatorio se define:

Longitud de onda (g): Distancia entre dos máximos de un ciclo completo del movimiento ondulatorio, sus unidades en el Sistema Internacional de Unidades (SI) es el nanómetro (nm) que es la milésima del micrómetro o milmillonésima del metro.



Frecuencia (u): Número de ciclos por segundo, es inversamente proporcional a la longitud de onda. Sus unidades son el Hertz o 1/s.
u=c/g

Modelo corpuscular: La radiación electromagnética se considera como partículas, fotones, cuya energía según Einstein es proporcional a la frecuencia. E=hu=hc/g

Siendo h la constante de Plank h = 6,62·10 J/s moléc.

2.1. Espectro electromagnético:

Cubre un amplio intervalo de energía radiante que va aumentando desde radio frecuencia hasta rayos g.

RAYOS g	RAYOS X	ULTRAVIOLETA	VISIBLE	INFRARROJO	MICROONDAS
Longitud de onda(nm)	0,1	1 180	390	750	400000

Tabla del espectro electromagnético.

2.2. Interacción de la radiación electromagnética con la materia:

Debido a la interacción entre la radiación electromagnética y la materia se producen una serie de fenómenos como refracción, reflexión, dispersión, absorción y emisión. Siendo estos dos últimos la base de la espectroscopia.

Absorción de radiación: Proceso en el que la energía electromagnética se transfiere a los átomos, iones o moléculas de muestra, promueve a estas partículas desde su estado fundamental a un estado excitado.

Los cambios producidos en las partículas dependen de sus propias características y de la longitud de onda de la energía incidente. Las partículas excitadas tienden a volver a su estado fundamental desprendiendo la energía absorbida en forma de energía cinética, dando calor. Este es el proceso de relajación no radiante.

Tipos:- *Absorción atómica:* La muestra es sometida a una disgregación molecular o atomización, siendo los átomos los que se excitan por la radiación, dando espectros bien definidos.

- *Absorción molecular:* Las moléculas de la muestra son las que se excitan por la radiación, dando espectros con menor definición que los atómicos.

Emisión de radiación: Producido por el mecanismo de relajación radiante que consiste en que las partículas excitadas se relajan a niveles de menor energía en forma de fotones. La emisión se puede dar en forma de espectros continuos (todas las longitudes de onda presentes) o espectros discontinuos (algunas longitudes de onda).

Tipos: -Radiación térmica
-Emisión de radiación de rayos X
-Fluorescencia y fosforescencia

3. INSTRUMENTACIÓN

El conjunto de todas las técnicas instrumentales basadas en la absorción y emisión de la radiación electromagnética se conocen por espectroscopía.

En la actualidad, son muchos los tipos y modelos de espectrofotómetros que existen, esto complica la descripción de sus partes o por lo menos el orden de estas. No obstante aquí seguiremos la clasificación más general.

El espectroscopio consta de cinco partes:

- Fuente de radiación.
- Selector de longitud de onda o analizador.
- Recipiente para contener la muestra
- Detector de energía radiante.
- Sistema de registro de datos.

3.1 Fuente de radiación.

Es la encargada de proporcionar energía radiante que puede ser en forma visible o no visible. Debe generar un haz de radiación con potencia suficiente para ser detectada y medida con facilidad. Además tiene que ser estable y no provocar fluctuaciones.

Las fuentes son de dos tipos: continuas y discontinuas o de líneas.

Fuentes continuas: Emiten radiación en un amplio rango de longitud de onda de la misma potencia o intensidad. Se utiliza sobre todo en absorción molecular. En ultravioleta visible e infrarrojo.

Las fuentes continuas más comunes son:

- Lámpara de filamento de tungsteno, para visible y UV próximo.
- Lámpara de filamentos de haluros de tungsteno, emiten con mayor intensidad y la más común es la de yoduro de tungsteno.
- Lámparas de hidrógeno y deuterio, para la región ultravioleta.

Fuentes discontinuas o de líneas: Emiten un número determinado de bandas de radiación, un intervalo determinado de longitudes de onda. Se

emplean en absorción atómica, espectroscopía de fluorescencia y espectroscopía Raman. La más común es la lámpara de vapores de mercurio.

También los láseres son utilizados como fuentes debido a que tienen una gran intensidad, una pequeña anchura de banda y una naturaleza coherente en sus señales de salida.

3.2 Selectores de longitud de onda o analizadores.

En los análisis espectroscópicos es necesario que la radiación este formada por un grupo continuo y limitado de longitudes de onda estrechas, llamado banda. Cuanto menor sea el ancho de banda mayor será la sensibilidad en las medidas.

Existen dos clases de analizadores, los filtros y los monocromadores. Si el aparato utiliza filtros se denomina fotómetro, si utiliza monocromadores se denomina espectrofotómetro.

3.2.1.Filtros.

Los filtros están compuestos por un material que transmite selectivamente una longitud de onda, absorbiendo todas las demás.

Existen dos tipos de filtros:

- Filtros de interferencia: Se basan en las interferencias ópticas, para así proporcionar bandas de radiación estrechas. Constan de un dieléctrico transparente (fluoruro de calcio o de magnesio) que está delimitado por dos películas metálicas semitransparentes. Al incidirle la radiación parte de esta se refleja en las películas metálicas produciéndose interferencias constructivas o destructivas, reforzando o disminuyendo la radiación.

- Filtros de absorción: Absorben una amplia gama de longitudes de onda y deja transmitir el resto. Normalmente se componen de una gelatina coloreada o un vidrio coloreado. Tienen un ancho de banda mayor que los de interferencia. Dentro de estos se encuentran los filtros de corte, que transmiten casi al 100% en una zona del espectro, pero a partir de un determinado valor la transmitancia es igual a cero.

3.2.2. Monocromadores.

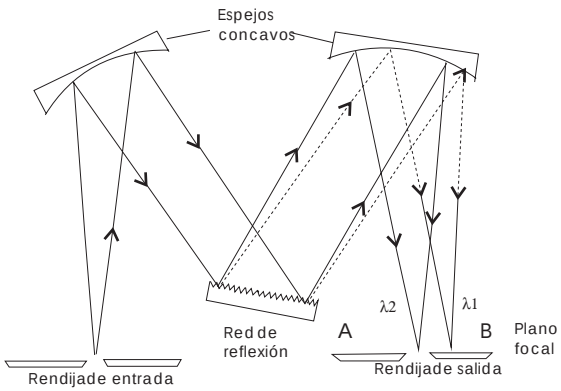
Son capaces de dar bandas espectrales mucho más estrechas que los filtros y además pueden ajustarse fácilmente dentro de la zona del espectro. La calidad de un monocromador depende de la pureza de la radiación de salida, de su capacidad para resolver longitudes de onda adyacentes, de su poder de captación de luz y de su anchura espectral. Tienen diferentes partes:

- Rendija de entrada: Reducen al máximo la luz difusa y evita que la luz dispersa entre en el sistema.
- Lente colimadora: Produce un haz paralelo de radiación electromagnética.
- Prisma o red de difracción, dispersan la radiación en sus longitudes de onda individuales.
- Lente para enfocar la radiación electromagnética.
- Rendija de salida: Impide que la luz difusa atraviese la cubeta.

Tipos: - Monocromadores de red.
- Monocromadores de prisma.

MONOCROMADORES DE RED:

Consiste en una superficie dura, pulida y ópticamente plana, en la que se ha gravado un número de surcos paralelos próximos y a distancias iguales entre si. Al incidir la radiación electromagnética sobre estos se descompone en distintas longitudes de onda, que se reforzarán o no, dependiendo del ángulo de refracción con el que salgan.

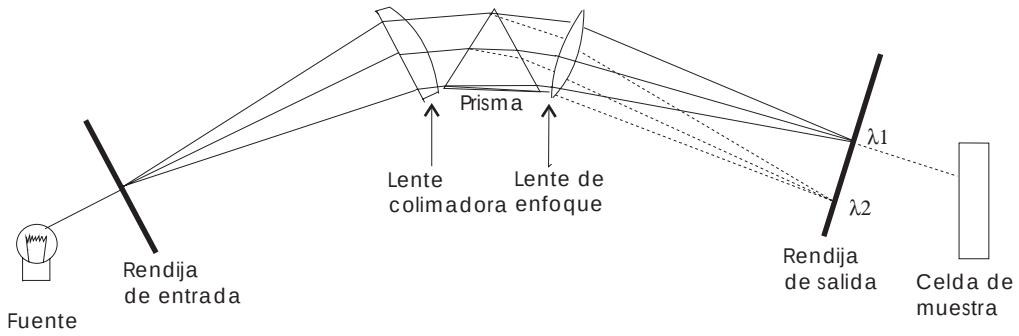


Para las regiones ultravioleta y visible tiene de 300 a 2000 surcos/mm. y para la infrarroja de 10 a 200 surcos/mm.

- Red en escalerilla: Como su nombre indica tiene forma de escalera. Esta geometría proporciona una difracción muy eficiente de la radiación.
- Red en escalera: Similar a la anterior pero con menos surcos.
- Red cóncava: Similar a la anterior pero formada en una superficie cóncava. Este diseño permite un monocromador sin espejos o lentes colimadores y focalizadores.
- Red holográfica: El gravado de los surcos se hace con tecnología láser. (Red Littrow)

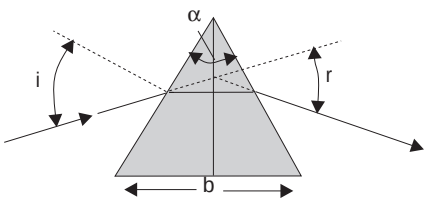
MONOCROMADORES DE PRISMA:

Fragmentos con forma de cuña, de vidrio, cuarzo, cloruro sódico u otro material que permita el paso de la radiación. La radiación que penetra en el prisma se dispersa en mayor o menor medida debido al índice de refracción que este tiene.

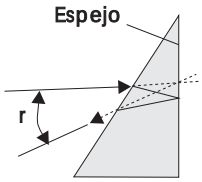


Hay dos tipos de diseño:

- Cornu: Compuesto por dos prismas físicamente unidos, uno es dextrógiro (desvía la radiación hacia la derecha) y otro levógiro (desvía la radiación hacia la izquierda). Debido a esto, el haz paralelo se desdobla en distintas longitudes de onda.



- Littrow: Prisma en el que una cara es un espejo. Cuando le llega la radiación electromagnética hay un cambio de dirección y una reflexión debido al espejo, por lo que la radiación se desdobla en distintas longitudes de onda. Es más pequeño y compacto que el de Cornu.



3.3 Recipientes para muestras.

Exceptuando la espectroscopía de emisión se precisa de recipientes que contengan la muestra en los estudios espectroscópicos. Estos recipientes, cubetas, deben ser de un material que permita el paso de la radiación de la región espectral de interés. Por lo tanto para el estudio en diferentes regiones del espectro se utilizan diferentes materiales:

- cuarzo o sílice fundido para ultravioleta
- vidrios de silicato de 350 a 2000 nm
- cristal óptico y plástico, en el visible
- cloruro de sodio cristalino, en la región infrarroja

Las cubetas suelen tener un espacio interior de 10 mm de espesor, aunque también pueden tener un espacio superior o inferior dependiendo de la muestra con que se trabaje.

Las mejores cubetas tienen ventanas que son perfectamente perpendiculares a la dirección del haz, con estas caras planas minimizan las pérdidas por reflexión. A veces se emplean cubetas cilíndricas para el ultravioleta-visible, en este caso hay que tener cuidado en repetir la posición de la cubeta respecto del haz de radiación.

Existen cubetas con paredes laterales engrosadas para muestras escasas o muy valiosas llamadas cubetas semimicro o micro.

La calidad de los datos de absorbancia dependen de la forma, uso y mantenimiento de las cubetas. Las huellas dactilares, la grasa u otras manchas en las paredes alteran la transmisión a través de la cubeta. Hay espectrofotómetros que poseen portacubetas con varias posiciones, lo que posibilita una mayor rapidez y eficacia en el trabajo.

3.4 Detectores de radiación.

Los primeros detectores fueron el ojo humano y las películas o placas fotográficas, posteriormente se han sustituido por transductores que convierten la energía radiante en una señal eléctrica.

El detector ideal debe responder a un amplio rango de longitudes de onda, tener alta sensibilidad, una elevada relación entre la señal/ruido, una respuesta constante. Además la señal producida debe ser proporcional a la potencia y amplificable.

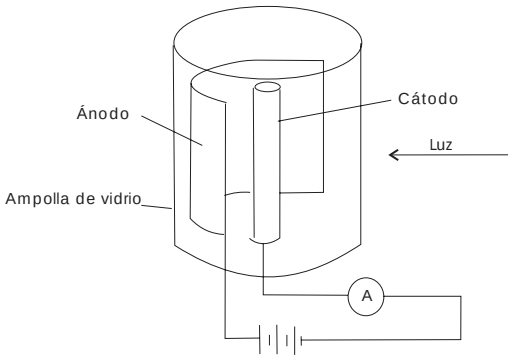
Se utilizan dos tipos de detectores, los que responden a los fotones y los que responden al calor.

3.4.1. Detectores de fotones.

Cuando la radiación incide sobre el detector puede producir un desprendimiento de electrones (efecto fotoeléctrico) o promover electrones a otros niveles energéticos (fotoconducción).

Existen diferentes tipos de detectores de fotones:

- Células fotovoltaicas: Al incidirle la radiación electromagnética al cátodo promueve electrones a niveles energéticos más altos, provocando huecos que favorecen el paso de corriente eléctrica. Se utilizan en la zona visible.

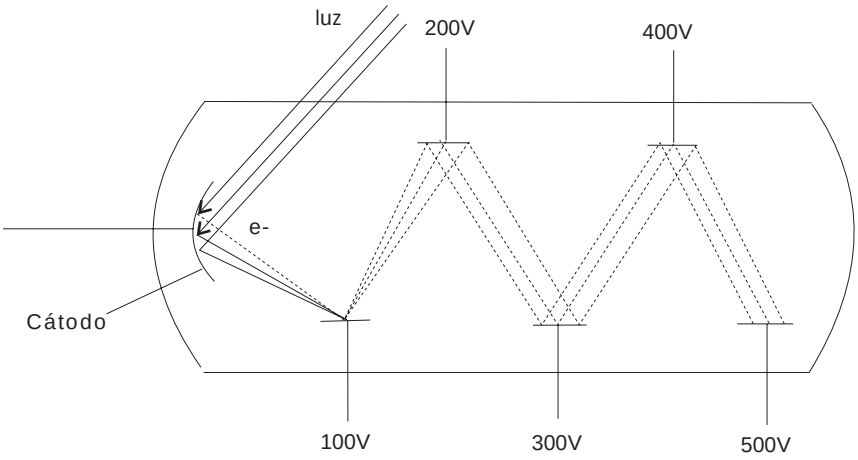


Célula fotoeléctrica

- Detectores semiconductores: Al igual que los anteriores se basan en la fotoconducción. Sensibles al infrarrojo cercano.

- Fototubos: Constan de un cátodo semicilíndrico y un ánodo. Cuando le llega la radiación al cátodo se desprenden electrones. Aplicando una diferencia de potencial entre el cátodo y el ánodo se crea una corriente eléctrica. Se utilizan en la región ultravioleta-visible.

- Fotomultiplicadores: Como los anteriores se basan en el efecto fotoeléctrico. Llevan cátodos adicionales llamados dínodos que vuelven a emitir más electrones amplificando la señal.



Fotomultiplicador

3.4.2. Detectores de calor.

Son detectores térmicos compuestos por un cuerpo negro que absorbe toda la radiación que le llega aumentando su temperatura que es lo que medimos. Se utiliza sobre todo en el infrarrojo.

Existen varios tipos de detectores de calor:

- Termopar: Consiste en dos metales unidos por dos puntos, uno protegido de la radiación electromagnética y otro expuesto a ella por lo que aumenta su temperatura. Entre la dos uniones se genera un potencial que varia dependiendo de la diferencia de temperatura.

- Bolómetro o termómetro de resistencia: Compuesto por materiales que forman un puente eléctrico y presentan un cambio de resistencia relativamente grande con los cambios de temperatura.

- Células de Golay o termómetro de gas: Compuesto por un gas encerrado en un compartimento de pared elástica, al llegar la radiación el gas aumenta su temperatura y por lo tanto aumenta el volumen provocando cambios en la pared elástica. Esto hace que se modifique el haz de radiación sobre un espejo y eso es lo que se mide.

3.5. Sistemas de salida de datos.

El procesador de señales es un dispositivo electrónico donde se reflejan en sistemas de lectura y presentación de datos la señal eléctrica del detector. Los sistemas de lectura pueden ser: de lectura directa que van aplicados a aparatos con detectores de tipo fotocélula o pueden producir una amplificación previa de la señal como ocurre en los aparatos con fototubos.

La mayoría de las señales analíticas son señales analógicas. Los transductores de los instrumentos convierten normalmente las señales analógicas químicas en señales analógicas eléctricas, viéndose en un formato analógico o digital. Las visualizaciones analógicas se representan mediante la posición de una aguja en un medidor de escala, una imagen en la pantalla de un tubo de rayos catódicos o la posición de una bombilla en un registrador de papel. Una visualización digital se representa a través de una escala de números.

Actualmente existen unos dispositivos de salida que permiten una unión con un ordenador, de manera que el usuario puede ampliar el rango de operaciones realizadas con los datos obtenidos.

4.TIPOS DE ESPECTROSCOPÍA.

A continuación ofrecemos a modo de esquema las más importantes técnicas espectroscópicas dependiendo de la región del espectro con la que se trabaje, su reacción ante la radiación electromagnética (absorción y emisión), y si la muestra está en estado atómico o molecular.

- Espectroscopía molecular de absorción de infrarrojo.
- Espectroscopía molecular de absorción de ultravioleta visible.
- Espectroscopía molecular de fluorescencia y fosforescencia.
- Espectroscopía atómica de absorción.
- Espectroscopía atómica de emisión.
- Espectroscopía atómica de fluorescencencia.
- Espectroscopía Raman.
- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.
- Espectroscopía de electrones.
- Espectroscopía de rayos X.

Antes de entrar con las características de los métodos espectroscópicos, vamos a ver los distintos tipos de aparatos atendiendo a la disposición de los componentes fotométricos. Según esto pueden clasificarse espectrofotómetros de haz simple o de doble haz en el espacio y en el tiempo.

- Espectrofotómetros de haz simple: Constan de una fuente de radiación que pasa a través de analizador el cual selecciona la longitud de onda deseada, unas rendijas de entrada y salida que evitan la luz difusa, una cubeta que contiene la muestra y un detector de la radiación no absorbida por la muestra.

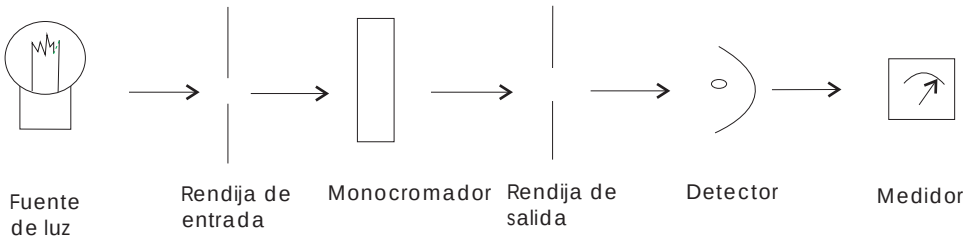
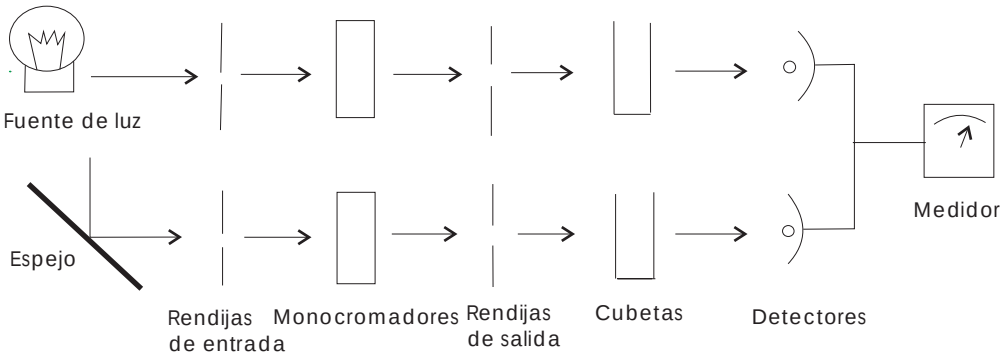
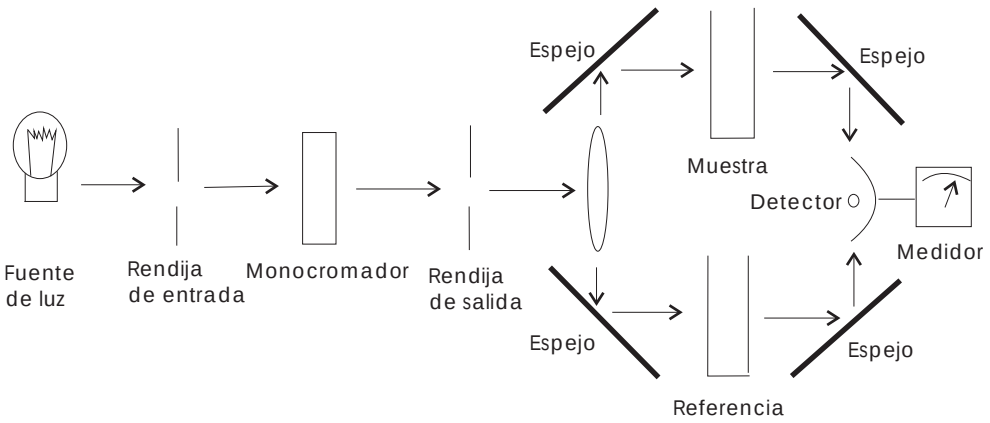


Fig.: 7. Espectrofotometro de haz simple

- Espectrofotómetro de doble haz en el espacio: Todos los componentes del espectrofotómetro simple aparecen por duplicado excepto la fuente de luz. Dos haces de luz pasan al mismo tiempo a través de los diferentes componentes separados en el espacio.



- Espectrofotómetro de doble haz en el tiempo: Suele utilizar los mismos componentes de un instrumento de haz simple. En estos dos haces de luz pasan a través de los mismos componentes, pero no al mismo tiempo por la acción de un instrumento rotativo del haz luminoso llamado chopper. El chopper está colocado a continuación de la rendija de salida y un sistema de espejos se encarga de dirigir la porción de radiación hacia una cubeta de referencia o hacia la muestra. Así el detector ve alternativamente el haz de luz procedente de la muestra y el de referencia.



Otra característica diferenciadora de los espectroscopios es que en los de emisión la fuente de radiación suele estar colocada de forma perpendicular al detector en vez de en paralelo como en la de absorción. Con esto se evita la interferencia entre la emisión de la fuente y la de la muestra. Así el detector solamente registra la emisión de la muestra.

A continuación describiremos brevemente las distintas técnicas espectroscópicas salvo la correspondiente a ultravioleta-visible que será descrita posteriormente con mayor amplitud debido a su mayor utilidad e importancia.

4.1.Espectroscopía molecular de absorción infrarroja.

Se basa en los cambios que se producen en los niveles de vibración y rotación de las moléculas. Es conveniente subdividir el espectro de infrarrojo en tres regiones: cercano, medio y lejano.

En cuanto a la instrumentación cabe destacar que como fuente de radiación utiliza un sólido que se calienta y se lleva a incandescencia (Lámpara incandescente de Nerst, fuente Globar y filamento incandescente).Utiliza detectores sensibles al calor como termopares, bolómetros y células de Golay.

Tiene gran aplicación en el análisis cualitativo y cuantitativo:

- Determinación de sustancias. Cada sustancia da un espectro característico en el infrarrojo como si fueran huellas dactilares.
- Determinación de estructuras químicas (grupos funcionales)
- Determinación de la concentración de sustancias.
- Determinación de parámetros físico-químicos.

4.2. Espectroscopía molecular de fluorescencia y fosforescencia.

Cuando alguna sustancia es irradiada con radiación ultravioleta-visible se excita y al volver a su estado fundamental emite fotoluminiscencia.

La diferencia entre fluorescencia y fosforescencia es que a la primera le cuesta menos tiempo pasar del estado excitado al fundamental.

En cuanto a la instrumentación se utiliza un espectrofluorímetro o fluorímetro. Estos aparatos disponen de dos filtros o monocromadores, uno anterior al compartimento de la muestra y otro posterior. Normalmente son instrumentos de doble haz. Como fuente se utiliza la lámpara de arco y como detector un fotomultiplicador.

Existen una serie de factores que afectan a la fluorecencia:

- Estructura química de la muestra: los enlaces que dan fluorescencia son los p (dobles espacios de compuestos aromáticos).

- Temperatura y disolvente. Al aumentar la temperatura disminuye la fluorescencia y al aumentar la viscosidad del disolvente aumenta la fluorescencia.

- El pH.
- El oxígeno disuelto, que actúa de quencher o amortiguador disminuyendo la fluorescencia.

- Rigidez estructural, a mayor rigidez mayor fluorescencia.

- Concentración de la muestra, la fluorescencia está en relación lineal con la concentración. Al aumentar la concentración aumenta la fluorescencia.

La fluorescencia es una técnica muy sensible y selectiva, puede aplicarse al estado sólido, líquido y gaseoso. Pero tiene la desventaja de que no todas las sustancias presentan este fenómeno de fluorescencia.
Las aplicaciones más importantes son las siguientes:

- Determinación de especies orgánicas e inorgánicas.
- Medidas y cálculos del tiempo de vida de las sustancias.

4.3. Espectroscopía de absorción atómica.

La característica principal de la espectroscopía atómica es la atomización de la muestra. La atomización se realiza a través de un atomizador de llama que consta de un nebulizador y de un quemador. Los atomizadores utilizan dos gases uno combustible y otro oxidante que variarán según los elementos que se vayan a analizar.

Es muy importante controlar la temperatura de la llama para evitar que se produzca una ionización en vez de una atomización.

Con esta técnica se obtienen espectros más precisos de líneas discretas, que pueden tener cierta anchura debido al movimiento de los átomos (efecto Doppler) o al choque de los átomos (efecto de presión).

Hay otros sistemas para atomizar la muestra como son el arco y la chispa.

Estos son materiales conductores que se calientan calcinando la muestra y llevándola a estado atómico.

Las fuentes de espectroscopía atómica difieren de las de espectroscopía molecular ya que son discontinuas en vez de continuas. La lampara más utilizada es la de cátodo hueco, donde se coloca como fuente de radiación el mismo elemento que se va analizar.

Utiliza dos monocromadores uno anterior a la muestra y otro posterior. Uno de ellos hace que la radiación de la llama llegue continua al detector, así se podrá diferenciar de la procedente de la muestra que llega de forma alterna.

Sus principales aplicaciones son:

- Determinación de metales pesados.
- Determinación cuantitativa de más de 60 elementos metálicos o metaloides.
- Empleado también en toxicología y determinación de metales en agua.

4.4. Espectroscopía atómica de emisión.

La muestra puede estar en estado sólido, líquido o gaseoso.

Para atomizar la muestra se emplean la técnica de llama, el arco o la chispa.

La temperatura de la llama debe ser mayor que en espectroscopía atómica de absorción pero teniendo la precaución de que no se de ionización. El sistema de atomización de la muestra se emplea a su vez como sistema excitador de la misma. Posteriormente se mide lo que la muestra emite al relajarse del estado excitado.

Como detector se utilizan detectores fotográficos y fotomultiplicadores.

Cuando se utiliza la llama para la atomización se denomina fotometría de llama y se aplica para:

- Determinar en líquidos y tejidos biológicos: Li, Na, K, Ca.
- Determinación de Na y Ca en suero sanguíneo.
- Análisis de suelos, cemento, vidrio y agua.

Existe otra forma de atomizar y excitar la muestra denominada espectroscopía de emisión de plasma. El plasma es un gas fuertemente ionizado compuesto por electrones, iones positivos y átomos. Se alcanzan altas muestra. El plasma se genera por corriente continua, por radiofrecuencias y microondas.

Esta técnica tiene gran precisión detectando cantidades como partes por millón (ppm) y partes por billón (ppb).

Las aplicaciones de esta técnica son:

- Análisis cuantitativo y cualitativo de muchos elementos del sistema periódico.
- Análisis de metales tóxicos en muestras biológicas.

4.5. Espectroscopía de fluorescencia atómica.

Se basa en la excitación de los átomos de una muestra con la radiación electromagnética y medir la radiación que emiten esos átomos al volver a su estado fundamental.

Como fuente de radiación electromagnética se utiliza una fuente continua (lámpara de arco, lámpara de cátodo hueco, lámpara de vapor de xenon y lámpara láser). Para atomizar la muestra se utiliza la llama o los hornos de grafito y de carbón.

Sus aplicaciones son:

- Determinación de elementos traza en materiales biológicos (sangre, suero, orina, tejidos)
- Determinación de elementos en suelos , fertilizante, residuos, minerales, cementos.

4.6 Espectoscopía Raman.

En 1928, el físico hindú C. V. Raman descubrió que la longitud de onda de una fracción de la radiación dispersada por ciertas moléculas, difiere de la longitud de onda de la radiación incidente y que estos desplazamientos de la longitud de onda dependen de la estructura química de las moléculas responsables de la dispersión.

En esto consiste la espectroscopía Raman. Al irradiar una muestra con una fuente láser de radiación monocromática visible o infrarroja se produce una dispersión de la radiación. Con un espectrofotómetro adecuado se registra la radiación dispersada a un cierto ángulo que suele ser de 90 º. La intensidad máxima de las líneas Raman es el 0,001% de la intensidad de la fuente, por lo que su detección y medición resulta difícil.

El espectro de dispersión Raman y el espectro de absorción de infrarrojo suelen parecerse mucho para algunas especies determinadas. La principal ventaja de los espectroscopios Raman respecto a la de infrarrojo, es que el agua no interfiere, por lo que en Raman se pueden obtener espectros de disoluciones acuosas. Esto es muy importante para sistemas biológicos, inorgánicos y estudios relacionados con la contaminación del agua.

Los instrumentos para espectroscopía Raman constan de tres componentes: una fuente láser que suele ser de helio/neón, un sistema de iluminación de la muestra y un espectrofotómetro adecuado que suele emplear un doble monocromador para evitar que la radiación parasitaria alcance al detector.

La aplicaciones de esta técnica son:

- Análisis cualitativos y cuantitativos de sistemas inorgánicos, orgánicos y biológicos.

- Gracias a la sensibilidad del láser se ha utilizado para determinar analitos de células bacterianas simples, aerosoles atmosféricos y especies en inclusiones microscópicas en minerales.

4.7. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (R.M.N.)

Se basa en la medida de la radiación electromagnética en la región de radiofrecuencias, en este proceso de absorción están implicados los núcleos de los átomos. Hay que colocar la muestra en un campo magnético de manera que aparece la energía en los núcleos que hace posible la absorción.

En la actualidad existen dos tipos de espectrómetros de resonancia magnética nuclear, los de onda continua (cw) y los de impulsos o transformado de Fourier (F.T.N.M.R.). En la actualidad estos últimos son los más utilizados.

Cabe destacar un componente fundamental que es el imán, encargado de generar el campo magnético.

Las aplicaciones de esta técnica espectroscópica son:

- Identificación estructural de moléculas orgánicas, organometálicas y bioquímicas.
- Calculo de la concentración de las sustancias.
- Análisis de mezclas multicomponentes.
- Análisis de la estructura elemental (concentración de un tipo de núcleo magnético)

4.8. Espectroscopía de electrones.

La señal producida por excitación del analito es un haz de electrones. Se mide la potencia del haz en función de la energía.

La excitación de la muestra se lleva a cabo por irradiación con un haz de rayos X.

Se pueden diferenciar tres tipos: la más común es con irradiación de rayos X monocromáticos llamada espetroscopía de electrones para análisis químicos (ESCA) o espectroscopía fotoeléctrica de rayos X (XPS).El segundo tipo es la espectroscopía de electrones Auger (AES) donde el espectro se

excita por un haz de electrones. El último tipo es la espectroscopia fotoeléctrica ultravioleta (UPS).

La espectroscopía de electrones se ha aplicado con éxito en gases y sólidos.

Se utiliza para:

- Análisis cualitativo de sólidos (metales, aleaciones, semiconductores, catalizadores).
- Análisis cuantitativo (muy limitado).

4.9. Espectroscopía de rayos X.

Se producen saltos electrónicos desde las capas internas del átomo de manera que quedan huecos que son rellenados por electrones de capas externas.

Los rayos X se pueden obtener de tres formas: bombardeando un metal con electrones acelerados (esto es lo que ocurre en el tubo Coolidge), irradiando una sustancia con rayos X puede que emita rayos X (fluorescencia de rayos X) y a través de un cuerpo radiactivo. Estas tres formas constituyen las distintas fuentes existentes en la instrumentación. Hay dos tipos de detectores, los de ionización y los de centelleo.

Los espectros de absorción de rayos X dan lugar a líneas características para cada elemento, tienen lugar a nivel atómico, pero no es necesario atomizar la muestra. Se utiliza en determinaciones biológicas de elementos pesados, un ejemplo es la determinación del calcio en los huesos.

En fluorescencia de rayos X el espectro que se produce es característico para cada sustancia. Se utiliza para la identificación de elementos pesados.

La difracción de rayos X se utiliza para determinar la estructura cristalina en la que se ordenan los distintos átomos. Se consigue determinar distancias entre los átomos y la ordenación en el espacio de estos.

5. ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA VISIBLE.

Las moléculas absorben luz. La longitud de onda absorbida y la cantidad de ésta, dependen tanto de la estructura de la molécula como del medio en el que se halla.

En la espectroscopía de absorción de ultravioleta visible, la muestra absorbe radiación electromagnética de una fuente, la cantidad absorbida va relacionada con la concentración de la sustancia que se desea analizar en disolución.

En este tipo de espectroscopía se suele hablar de longitudes de onda, en el orden de 200 a 800 nm. De 100 a 200 nm es la región ultravioleta lejano, de 200 a 400 la de ultravioleta próximo y de 400 a 800 luz visible.

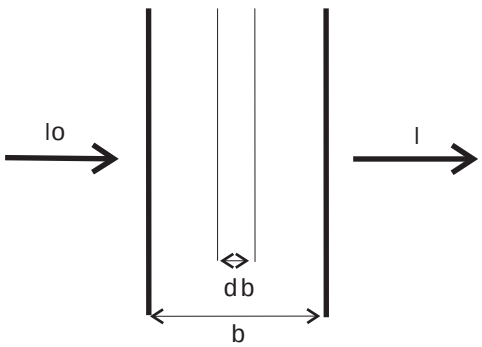
Esta técnica es la más utilizada por su sencillez instrumental y sus diversas aplicaciones en distintos campos de investigación.

5.1. Conceptos previos. Ley de Lambert-Beer.

Antes de detallar las características de esta espectroscopía es necesario explicar como interacciona la luz con la materia.

Cuando una radiación incide sobre un medio homogéneo (que absorbe luz a una determinada longitud de onda), es parcialmente absorbida y parcialmente transmitida. Así el haz de luz que sale tras atravesar el medio tiene una intensidad menor que la del haz incidente.

La relación incidente y la transmitancia fue estudiada por Lambert y extendida por Beer en el caso de disoluciones.



Sea una disolución de concentración C contenida en un recipiente de espesor b. Si sobre dicha disolución incide una radiación monocromática de intensidad Io, y parte de la radiación se ha absorbido, la intensidad que se transmite I, será inferior a Io.

La ley de Lambert-Beer establece que la disminución de la intensidad de la radiación es proporcional a la intensidad, a la concentración y al espesor atravesado. Para un elemento de espesor db se cumplirá:

$$-dI = K\ I\ C\ db$$

Donde K es una constante de proporcionalidad, un coeficiente de absorción de la sustancia en disolución. Integrando y haciendo operaciones queda:

$$dI/I = -K\ C\ db \quad ''' \quad dI = -K\ C\ '' db$$

$$\ln I/Io = -K\ C\ b \ ; \quad \log I/Io = (-K/2{,}302)\ C\ b = a\ b\ C$$

$$\log Io/I = a\ b\ C$$

Donde a es un nuevo coeficiente de absorción denominado absortividad.

Un concepto muy importante es la absorbancia (A) que es la fracción de la luz absorbida por la disolución.

$$A = \log Io/I$$

La absorbancia va a depender de la naturaleza del medio, es decir de la composición y de la longitud de la trayectoria de la luz en el medio.

Otro parámetro es la transmitancia (T) que se define como la relación entre la luz incidente y la luz transmitida, es decir la fracción de luz transmitida por la disolución.

$$T = I/Io$$

En la practica se utiliza el porcentaje de transmitancia (%T)

$$\%T = 100\ T = 100\ I/Io$$

Tanto la absorbancia como la transmitancia son parámetros adimensionales y por lo tanto no llevan unidades.

Estos parámetros descritos se relacionan entre si de la siguiente forma:

$$A = \log Io/I = -\log T = -\log \%T/100$$

$$A = 2 - \log\%T$$

Por lo tanto la absorbancia es la relación logarítmica entre la intensidad incidente y la intensidad transmitida, la ley de Lambert-Beer queda de la siguiente forma:

$$A = a\ b\ C$$

Su representación gráfica se ajusta a una línea recta que pasa por el origen de coordenadas. Si la concentración C se expresa en mol/litro, el coeficiente a se denomina absortividad molar o coeficiente de extinción molar representado por e. La ley de Lambert-Beer queda entonces:

$$A = e\ b\ C$$

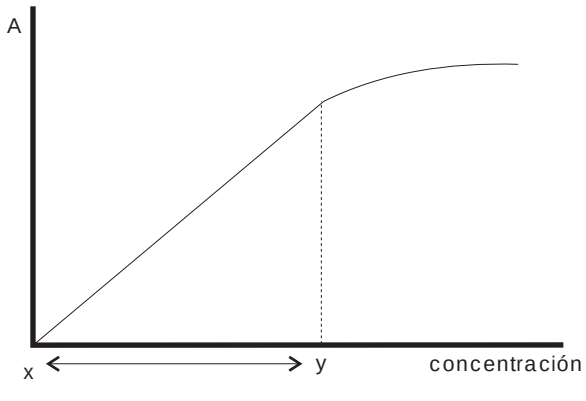
Normalmente el espesor de la cubeta b se mide en centímetros.

La relación entre la concentración de una solución y su transmitancia es inversa y logarítmica, mientras que la relación entre la absorbancia y la concentración es directamente proporcional.

Si la sustancia transmite toda la radiación, I = Io y por lo tanto la transmitancia es igual a 1, el %T es igual a 100 y la absorbancia es igual a 0.

Si la sustancia absorbe toda la radiación que le llega I = 0 y por tanto la transmitancia es igual a 0, el %T es igual a 0 y la absorbancia es igual a infinito .

La representación gráfica en un eje de coordenadas de la absorbancia (ordenadas) frente a la concentración (en el eje de abcisas) se denomina curva de calibración.



Curva de calibración con los límites de linealidad

Para obtener la curva de calibración se ensayan varias soluciones de concentraciones conocidas, y se determinan sus absorbancias.

Así se construye la curva de calibración, que debe ser una recta, representando las concentraciones frente a las absorbancias gráficamente. De este modo para calcular la concentración de una muestra problema sólo tenemos que hallar la absorbancia de la disolución problema y extrapolarla en la curva de calibrado.

Esta técnica sólo es válida si la muestra cumple la ley de Lambert-Beer y si las soluciones estándar y las problema son leídas en las mismas condiciones. En las determinaciones espectrofotométricas se cumple la ley de Lambert-Beer cuando la curva de calibrado sigue la llamada linealidad, que es el intervalo de concentraciones de la muestra entre las cuales existe una relación lineal entre concentración y absorbancia.

La ley de Lambert-Beer tiene una serie de limitaciones; sólo es aplicable para la luz monocromática y las soluciones utilizadas para el análisis, en teoría, no deben tener concentraciones inferiores a 0,01M (moles/litro), aunque en la práctica se trabaja sin problemas con concentraciones más bajas. Otras posibles fuentes de error que originan desviaciones en la curva de calibrado y por ello en la ley de Lambert-Beer son:

- las altas concentraciones de la muestra

- que los lados de la cubeta estén rayados o con algo de suciedad

- si la muestra se disocia, asocia o reacciona con la solución

- longitudes de onda parásitas

- incertidumbres o ruido asociado al instrumento

5.2. Los electrones absorbentes de la radiación

La absorción de la radiación ultravioleta o visible se puede considerar que es un proceso en dos etapas, primero hay una excitación electrónica y posteriormente se produce una relajación.

La absorción de la radiación ultravioleta o visible proviene de la excitación de los electrones enlazantes, la espectroscopia de absorción molecular es por tanto valiosa para la identificación de los grupos funcionales de una molécula. Pero son más importantes las aplicaciones de la espectroscopia de absorción ultravioleta y visible para la determinación cuantitativa de compuestos.

Todos los compuestos orgánicos son capaces de absorber radiación electromagnética ya que contienen electrones de valencia que pueden ser excitados. La absorción de radiación ultravioleta y visible de longitud de onda larga se restringe a un grupo funcional llamado cromóforo. Los electrones que intervienen en la absorción de las moléculas orgánicas son los que se encuentran en la formación de enlaces entre los átomos y los electrones localizados alrededor del átomo y que no participan en la formación de enlaces. Las regiones entre los átomos en las que se encuentran los electrones enlazantes se denominan orbitales moleculares. Al conbinarse dos orbitales atómicos se forma un orbital molecular enlazante de baja energía o un orbital molecular antienlazante de alta energía.

Los orbitales moleculares que se encuentran asociados a los enlaces sencillos se llaman orbitales sigma, s al igual que los electrones que los constituyen. Los dobles enlaces de las moléculas orgánicas poseen dos tipos de orbitales moleculares, uno de ellos es p y el otro es un orbital molecular pi, (asociado al anterior. Además de estos existen los orbitales sigma y pi antienlazantes, con mayor energía s* y p*.

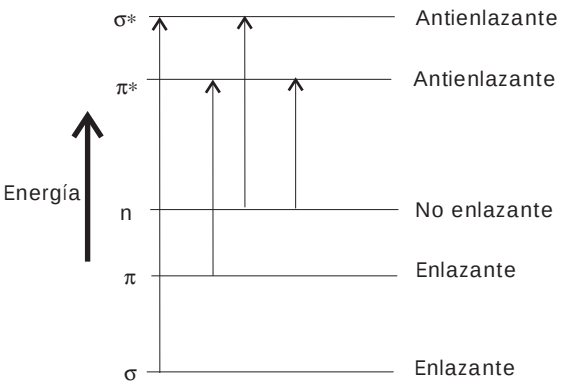
Ocurre también que muchos compuestos orgánicos tienen electrones no enlazantes n, cuyo nivel de energía está entre los orbitales enlazantes y antienlazantes pi y sigma.

De esta forma al absorber la radiación se producen una serie de transiciones electrónicas:

- Transiciones s s*. Es una transición que requiere gran cantidad de energía y que corresponde con la región del ultravioleta de vacío. Esta transición la presentan moléculas alifáticas, que tienen enlaces sencillos.

- Transiciones n s*. Requieren menor energía que las anteriores, se producen en la zona entre 150 y 250 nm.

- Transiciones p p* y n p*. La mayor parte de las aplicaciones de la espectroscopía de absorción en compuestos orgánicos se basa en estas transiciones que se dan en la región de 200 a 700 nm. Estas son las transiciones que requieren los grupos cromóforos. Cuando hay varios de estos grupos cromóforos próximos entre sí pueden dar lugar al efecto de conjugación.



Niveles de energía moleculares eectrónicos

5.3. Instrumentación de la espectroscopía de absorción UV-V

Los componentes de los espectrofotómetros en general ya los hemos tratado en el punto 3, pero cabe ampliar brevemente las características de los instrumentos que trabajan en esta región.

- Fuentes de radiación. Se utilizan fuentes continuas que deben emitir a alta intensidad sin que se produzcan fluctuaciones. Son de dos tipos, lámparas de arco y fuentes de incandescencia.

Lámparas de arco: Constituidas por un gas que está en el interior de un recipiente al que se le somete una descarga eléctrica y emite radiación electromagnética. La excitación eléctrica puede ser a baja presión (lampara de deuterio e hidrógeno), o a alta presión (lámpara de xenón).

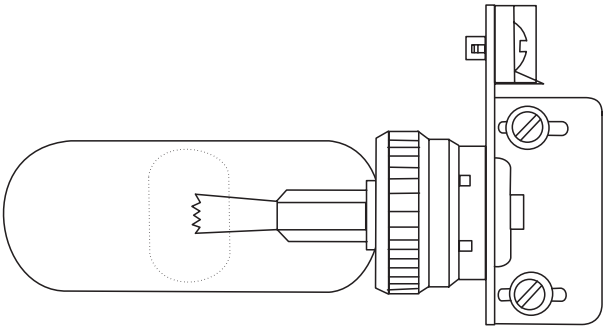
Lámpara de deuterio e hidrógeno: El mecanismo anteriormente citado supone la formación de una especie molecular excitada, que posteriormente se disocia dando dos especies atómicas más un fotón ultravioleta. Como resultado se produce un espectro continuo desde unos 160 nm hasta el inicio de la región visible.

Con estas lámparas suelen usarse ventanas de cuarzo ya que el vidrio absorbe fuertemente longitudes de onda menores de los 350 nm.

Lámpara de xenón: Al pasar una corriente a través de una atmósfera de xenón se produce una intensa radiación. El espectro producido va desde 250 a 600 nm teniendo un máximo en los 500 nm.

Fuente incandescente:

Constan de un sólido calentado a alta temperatura. Para la zona visible del espectro (400-800 nm) se utiliza un filamento de tungsteno colocado en el interior de una ampolla de vidrio. En la zona del UV se usan lámparas halógenas o de yoduro-tunsteno.



Lámparas de filamento de tungsteno. La distribución de energía de esta lámpara depende de la temperatura. Se utiliza para la región espectral que va desde 350 a 2500 nm. Para que la fuente sea estable se requiere un estricto control del voltaje

Los aparatos que emiten en la zona del UV-visible tienen dos lámparas distintas, una de arco y otra de incandescencia. El paso de una lámpara a otra puede ser manual o automático.

- Analizador: Se utilizan filtros, prismas y redes de difracción. (ya descritos en el punto 3).

Los prismas más utilizados son los de tipo Littrow, en cuanto a filtros se utilizan los de absorción sobre todo en la región visible.

- Compartimento para la muestra: Como ya se ha comentado para el visible basta con que sean de vidrio, pero para la región del ultravioleta deben de ser de cuarzo. Pueden tener forma prismática o circular.

- Detector: Normalmente se utilizan las fotocélulas o los fotomultiplicadores. Suele ser un cátodo revestido de un metal que liberará electrones que son conducidos hacia el ánodo.

5.4. Tipos de instrumentos

El instrumento más sencillo es el de haz simple, en el que el selector de la longitud de onda es o un filtro o un monocromador. La determinación de la transmitancia de la muestra supone tres pasos; primero, un ajuste del 0% de transmitancia, segundo, ajuste al 100% de transmitancia con el disolvente solo, y por último la medición del % de transmitancia de la muestra colocada. Si existe alguna fluctuación en la fuente realizaremos una lectura no exacta de la muestra.

También existen aparatos de doble haz, en los que un espejo rotatorio dirige la radiación procedente del filtro o monocromador alternativamente a una cubeta de referencia y a la cubeta de la muestra. En estos instrumentos si hay alguna fluctuación en la fuente se afecta por igual a la muestra y a la referencia, por lo tanto el error es menor.

Un tercer tipo de aparato es aquel que se basa en una serie de diodos. Precisan de una óptica sencilla; una fuente de radiación electromagnética y una red de refracción que dirija la radiación a la serie de diodos. Estos instrumentos se diferencian de los anteriores en que la muestra se coloca entre la fuente y el analizador.

En el mercado existen gran variedad de modelos disponibles con distintas calidades, costes y diseños. Pueden ser fotómetros o espectrofotómetros, ambos de haz simple o doble que pueden estar o no controlados por ordenador. Pueden ser de doble dispersión con el fin de mejorar la resolución espectral que llevan dos prismas o redes.

5.5. Aplicaciones de la espectroscopía molecular de absorción UV-V

En el trabajo con esta técnica se encuentran unas extensas aplicaciones tanto en las determinaciones cualitativas como en las aplicaciones cuantitativas de especies moleculares.

5.5.1. Aplicaciones a nivel cualitativo

- La aplicación principal es la determinación de los grupos funcionales o estructuras químicas de las sustancias analizadas. Sobre todo se detecta la presencia de ciertos grupos funcionales que actúan como cromóforos. Una

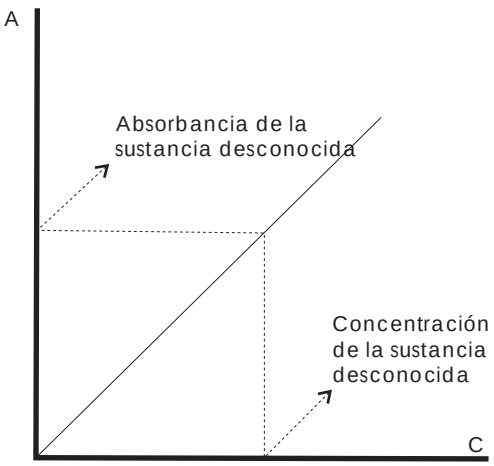
sustancia en unas determinadas condiciones tiene un espectro característico que la identifica pero siempre en unas condiciones fijas; tipo de disolvente, pH, concentración, etc. Es muy utilizado en el control de calidad.

5.5.2. Aplicaciones a nivel cuantitativo

- Son muchos los campos que se sirven de esta técnica para la resolución de sus problemas de información química cuantitativa. Un claro ejemplo de esto es que el 95% de las determinaciones cuantitativas llevadas a cabo en el campo de la sanidad se realizan por espectrofotometría ultravioleta-visible.

- Determinación cuantitativa de una sustancia.

Lo primero que tenemos que realizar es un espectro para determinar a que longitud de onda vamos a trabajar. Siempre trabajaremos en un máximo de longitud de onda donde la sensibilidad es mayor y se produce una menor desviación de la ley de Lambert-Beer. Viendo la absorbancia de distintas concentraciones de la sustancia hacemos una recta de calibrado. Como sabemos que A = abC, a partir de la recta de calibrado y el valor de absorbancia obtenemos la concentración.



Una técnica aproximativa para calcular una concentración problema a partir de una concentración y absorbancia conocida es:

$$Ar/Ax = Cr/Cx$$

Siendo Ar la absorbancia de la muestra referencia , Cr la concentración de dicha muestra referencia, Ax la absorbancia de la muestra problema y Cx la concentración problema.

- Determinación de varios componentes de una muestra. La absorbancia total de una disolución es igual a la suma de las absorbancias de los constituyentes individuales de una mezcla. Supongamos una muestra donde tenemos dos componentes A y B, con espectros de absorción diferentes, un análisis de ambos es imposible en una única medida. Pero podemos hallar las absorbancias de la muestra a dos longitudes de onda distintas l y l'. De manera que podemos expresar:

$$A' = \varepsilon'_A \, b \, C_A + \varepsilon'_B \, b \, C_B \qquad (a\ l)$$

$$A'' = \varepsilon''_A \, b \, CA_A + \varepsilon''_B \, b \, C_B \qquad (a\ l')$$

Las absortividades molares pueden obtenerse a partir de disoluciones estándar individuales de A y de B o a partir de las pendientes de sus representaciones de la ley de Beer. Las absorbancias se determinan experimentalmente al igual que la anchura de la cubeta. Sabiendo estos datos nos queda resolver este sistema de dos ecuaciones en el que hay dos incógnitas que son CA y CB que son las concentraciones de cada componente.

De esta forma se pueden analizar muestras con más de dos componentes si se hacen más medidas de la absorbancia para cada componente añadido. Pero las indeterminaciones en los resultados obtenidos son cada vez mayores.

- Medidas de constantes de equilibrio: Es posible la determinación de las constantes de disociación o de equilibrio de indicadores ácido-base mediante espectrofotometría de absorción uv-visible, ya que los espectros de esas sustancias varían con el pH del medio.

Un indicador AH se puede disociar según la siguiente ecuación:

$$AH \ \$ \ A^- + H^+$$

Al trabajar con una disolución la constante de equilibrio sería:

$$Ka = [H^+][A^-]/[HA]$$

Siendo [ ] concentración en moles/litro

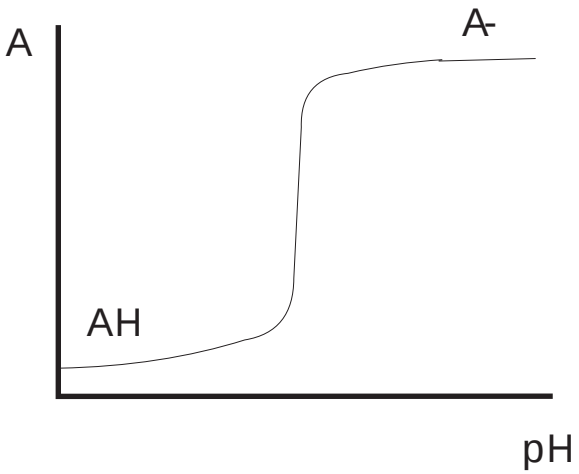
Tomando logaritmos queda de la siguiente manera:

$$pH = pKa + \log [A^-]/[HA]$$

La relación entre la concentración de las formas iónica y no iónica se puede conocer a partir de sus absorbancias, ya que representando estas frente al pH, a una longitud de onda seleccionada (la correspondiente a un máximo), se obtendrá una gráfica en forma de S, es decir una curva sigmoidea.

Cuando trabajemos con la longitud de onda máxima de la forma básica, la absorbancia mínima representa la medida de la forma no ionizada HA, mientras que el valor de absorbancia máxima corresponderá a la forma disociada A-.

La absorbancia media obtenida de la semisuma de las absorbancias mínima y máxima, corresponde a la semidisociación donde las concentraciones de HA y A- son iguales, de manera que el logaritmo de HA/A- es igual a cero. De esta forma el pH será igual al pKa, de forma que podremos calcular Ka, es decir la constante de equilibrio.



- Calculo de la constante de reacción: La constante de una reacción se puede calcular fácilmente conociendo la concentración inicial de un reactivo y la concentración de dicho reactivo a un tiempo t desde que empezó la reacción:

$$\ln Cr/Cro = - Kt$$

Siendo t el tiempo de reacción, Cr la concentración del reactivo al tiempo t y Cro la concentración inicial y K la constante de reacción.

Pero como sabemos podemos expresar la concentración en función de la absorbancia de manera que la expresión quedaría:

ln At-A$/Ao-A& = -Kt

Siendo t el tiempo de reacción, At la absorbancia de la muestra a ese tiempo, Ao la absorbancia antes de que se de la reacción, A(la absorbancia después de la reacción y K la constante. De esta manera conociendo los datos de absorbancia podemos calcular fácilmente la constante de la reacción.

-Valoraciones fotométricas: Las medidas espectrofotométricas pueden utilizarse con el fin de encontrar el punto de equivalencia de una valoración, siempre que en ésta algún elemento absorba la radiación. Para ello se emplean curvas de valoración fotométricas que son una representación de la absorbancia con respecto al volumen de la sustancia valorante. La representación consta de dos zonas de líneas rectas con diferente pendiente, una al principio de la valoración y otra cuando se ha pasado el punto de equivalencia. El punto final es el de la intersección de ambas líneas. Para poder utilizar esta técnica es necesario que el elemento o elementos que absorben la radiación cumplan la ley de Lambert-Beer y también hay que corregir la absorbancia frente a los cambios de volumen.

Las valoraciones se realizan en un espectrofotómetro modificado para permitir que el recipiente donde se da la valoración esté en la zona de paso de radiación.

Los resultados obtenidos suelen ser más precisos puesto que se realizan varias medidas. Una ventaja que tiene es que se pueden valorar soluciones muy diluidas.

5.6. Espectroscopía fotoacústica.

Esta espectroscopía se desarrolló en 1970, y proporciona un medio para la obtención de espectros de absorción ultravioleta y visible de líquidos turbios, semisólidos y sólidos. Esta técnica supuso un gran avance ya que hasta entonces era muy difícil debido a problemas que aparecía con la dispersión y reflexión de la radiación.

La técnica se basa en el efecto de absorción de la luz, lo podemos ver cuando un gas que se encuentra en una celda es irradiado con un haz de radiación intermitente de una longitud de onda que absorbe el gas, esto produce una serie de fluctuaciones regulares de la presión del gas en el interior

de la cámara. Si la intermitencia corresponde al intervalo de la frecuencia acústica los pulsos de presión pueden ser detectados por un micrófono.

La muestra se pone en una celda cerrada que contiene aire u otro gas que no absorbe la radiación y un micrófono sensible. El efecto fotoacústico se observa cuando la radiación es absorbida por la muestra, la potencia del sonido que se obtiene está relacionada con el grado de absorción. Este método tiene la ventaja de que la radiación dispersada o reflejada por la muestra no tiene efecto en el micrófono.

Existen instrumentos de haz simple y de doble haz, que en general tienen la fuente de radiación, el monocromador, la celda fotoacústica, amplificadores y el analizador.

5.6.1. Aplicaciones de la espectroscopía fotoacústica.

En la espectroscopía convencional, incluso haciendo diluciones muy diluidas de sangre se produce la dispersión de la luz. Con la espectroscopía fotoacústica permite estudios de la sangre sin necesidad de una separación preliminar de las moléculas que la componen.

Otras aplicaciones del método incluyen el estudio de minerales, algas marinas, tejidos de animales, baños de superficies, superficies catalíticas, semiconductores, etc.

6. INSTALACIÓN Y EMPLEO DEL ESPECTROFOTÓMETRO.

En este tema vamos a tener en cuenta las consideraciones generales en cuanto a la disposición y el empleo de cualquier tipo de espectrofotómetro UV VIS.

El espectrofotómetro es un instrumento óptico de precisión, de forma que debe ser tratado de forma suave y sin brusquedades, no se deben desmontar las piezas ópticas ni manipular incorrectamente las partes mecánicas.

Para evitar errores en el funcionamiento o que llegue a estropearse, el espectrofotómetro debe ser colocado sobre una mesa plana, en posición horizontal, manteniéndolo alejado del polvo, del calor, de la humedad y las vibraciones. Hay que evitar las corrientes de aire sobre el aparato ya que si se produce este fenómeno la lampara emitirá la radiación de forma inestable. Previamente a su utilización es conveniente familiarizarse con sus principios básicos y saber para que sirven las diferentes funciones de los controles. Además por seguridad es conveniente revisar el aparato previo a su utilización.

Una vez encendido el aparato se selecciona la longitud de onda deseada. Es conveniente esperar al menos unos veinte minutos para que el instrumento pueda estabilizarse. Pasado este tiempo se realiza el ajuste de 0% de transmitancia con el control de ajuste a 0, después colocaremos una cubeta con disolvente (sin muestra) y se realiza el ajuste del 100% de transmitancia mediante el control de ajuste de 100. Debemos tener en cuenta que existen instrumentos que pueden realizar el ajuste a 0, el ajuste a 100, o ambos ajustes de manera automática si necesidad de que empleemos ningún control. Existen varios niveles de ajuste de sensibilidad, siempre emplearemos el nivel menor posible, que nos permita alcanzar empleando el control de ajuste a 100 cuando estemos realizando un blanco. Después de ajustar a 0 y a 100 se introduce la cubeta con la muestra y se mide la transmitancia o la absorbancia.

Cada vez que se haga un cambio de la longitud de onda es necesario ajustar de nuevo a 0 y a 100. Si la longitud de onda es modificada considerablemente será necesario esperar durante un tiempo después del ajuste a 0 y a 100.

Como blanco se puede emplear aire, agua destilada, soluciones coloreadas, filtros neutros.

Es conveniente conforme se va utilizando el aparato (tras utilizar el aparato en largos periodos) comprobar la longitud de onda para asegurarnos de su exactitud.

Una vez que finalicemos el trabajo el aparato debe ser desconectado y cubierto con una funda de plástico para evitar una contaminación por polvo u otras partículas.

Para un análisis espectrofotométrico preciso es necesario el uso de cubetas de buena calidad. Es necesario calibrarlas de forma regular para comprobar y detectar las diferencias que pueden surgir por ralladuras y desgaste. Es muy importante también el uso de técnicas adecuadas de limpieza y de secado. Para el limpiado de las caras externas de las cubetas Erickson y Surles propusieron la siguiente técnica de limpiado:

- Las superficies de la celda se limpian con un papel para lentes empapado con metanol, el papel se debe coger con una pinza.

- Después de la limpieza el etanol se evapora dejando las superficies de las cubetas quedan libres de contaminantes.

Esta técnica evita que no queden hilos ni películas de papel, que suelen quedar cuando se limpian las cubetas con el papel para lentes seco.

Como hemos podido comprobar la utilización de estos instrumentos requiere una cierta comprensión de cómo es su funcionamiento, de cuales son sus partes, cual es el modo de trabajar con ellos , que aplicaciones y limitaciones tienen, etc. Esperamos que haya podido ofrecer cierta información para el usuario con el fin de que se interese más por este tema. A continuación mostraremos una serie de prácticas sencillas para realizar con el espectrofotómetro con el fin de ilustrar mejor lo citado anteriormente y conseguir una mayor compresión en las aplicaciones que tienen las técnicas espectroscópicas.

7. PRÁCTICAS.

Las prácticas descritas a continuación son una selección arbitraria que pretende mostrar algunas de las aplicaciones que tiene la espectroscopía de absorción ultravioleta y visible, técnica que sin lugar a dudas es la más empleada y expandida actualmente.

7.1. Determinación del coeficiente de extinción molar para una sustancia absorbente.

Con esta práctica se permite comprobar la ley de Lambert-Beer para una disolución y a partir de ella determinar el coeficiente de absorción molar de la sustancia absorbente, en la longitud de onda en la que se opere.
Un ejemplo de sustancia absorbente puede ser una disolución acuosa de ferricianuro potásico, Fe(CN)6 K3, que absorbe a una longitud de onda de 420 nm.

Realización de la practica:

- Preparar 250 ml de disolución 5·10 molar de ferrricianuro potásico mediante pesada (masa molar 329,3).

- A partir de esta disolución y mediante disoluciones adecuadas, preparar 10 ml de las siguientes concentraciones molares:

- $4{,}5 \cdot 10^{-4}$ M
- $4{,}0 \cdot 10^{-4}$ M
- $3{,}5 \cdot 10^{-4}$ M
- $3{,}0 \cdot 10^{-4}$ M
- $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ M
- $2{,}0 \cdot 10^{-4}$ M
- $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ M
- $1{,}0 \cdot 10^{-4}$ M
- $0{,}5 \cdot 10^{-4}$ M

- Ahora se miden en el espectrofotómetro las absorbancias de cada una de estas disoluciones, a la longitud de onda de 420 nm.

- Construir en papel milimetrado una gráfica de absorbancias (ordenadas), frente a concentraciones molares (abcisas). Si se cumple la ley de

Lambert-Beer se debe obtener una línea recta que pase por el origen de coordenadas.

- De la pendiente de la recta y mediante mínimos cuadrados, determinar el coeficiente de extinción molar del ferricianuro potásico, a la longitud de onda indicada.

7.2. Determinación de la constante de velocidad de reacción para la oxidación de una sustancia.

Vamos a calcular la constante de velocidad, para la reacción correspondiente a la oxidación del ion ferrocianuro con el peroxidisulfato.

La velocidad de una reacción se define con la variación de la concentración de una de las sustancias, reactivo o producto en el tiempo.

Sea la reacción:

$$A+B+ C+....= D+E+F+....$$

La velocidad de la reacción se puede expresar de la forma:

$$-[A]/dt ; -[B]/dt ; -[C]/dt ; [D]/dt ; [E]/dt ; [F]/dt ; .....$$

Las expresiones para los reactivos llevan signo negativo porque sus concentraciones disminuyen con el tiempo, las de los productos llevan signos positivos porque aumentan; así la velocidad es siempre positiva.

Si la reacción tiene diferentes coeficientes estequiométricos, la velocidad de reacción, así definida, depende del componente elegido. Si se quiere que sea independiente de la estequiometria, se debe de tener en cuenta los citados coeficientes. Así para la reacción:

$$aA+bB+cC+.....= dD+eE+fF+ .....$$

La velocidad en este caso será:

$$-1/a*[A]/dt = -1/b*[B]/dt = 1/d*[D]/dt = 1/e*[E]/dt$$

En este caso la reacción que se pretende estudiar es la siguiente:

$$2\ Fe(CN)_6^{-4} + S_2O_8^{-4} \ \$ \ 2\ Fe(CN)_6^{-3} + 2\ SO_4^{-2}$$

Al partir de una concentración inicial de ferrocianuro a , de peroxidisulfato b y la concentración de ferrocianuro que ha reaccionado es x, la ecuación de velocidad quedaría de la siguiente forma:

$$-1/2*d(a-x)/dt = K*(a-x)*(b-x)/2$$

Cuando consideramos que la concentración de peroxidisulfato es mucho mayor que la de ferrocianuro (b-x)/2 quedaría constante por lo tanto la ecuación de velocidad sería:

$$dx/dt = K\ (a-x)\ 2b = K'\ (a-x)$$

Integrando la ecuación:

$$\$\ dt/a-x = \$\ K'dt \ ; \ ln\ a/a-x = K'\ t \ ; \ ln(a-x) = lna - K't$$

Toda esta cinética se puede seguir de un modo muy sencillo espectrofotométricamente, puesto que el ferricianuro, que es uno de los productos absorbe a 420 nm. Lo que se realiza entonces es medir la absorbancia a intervalos de tiempo determinados. La concentración de ferricianuro que existe en cada momento coincide con la que desaparece x, por lo tanto podemos escribir:

$$A = e\ b\ x$$

en este caso b es el espesor de la cubeta y (el coeficiente de extinción molar que se puede determinar siguiendo las instrucciones de la práctica 7.1.

De esta forma la ecuación quedaría de la siguiente manera:

$$1/(a-A/eb) = 1/a + K\ t$$

La parte experimental consiste en preparar 100 mililitros de una disolución $2*10^{-3}$ M de ferrocianuro potásico, debemos saber que cristaliza con 3 moléculas de agua $Fe(CN)_6K_4 * 3H_2O$, que la masa molar es 422,41.

Por otro lado se prepara una disolución de 100 mL 10^{-2} M de peroxidisulfato cuya masa molar es 270,33.

Tomamos 25 mL de cada disolución y se vierte la disolución de ferrocianuro sobre la de peroxidisulfato. Pondremos en marcha el cronómetro y medimos la absorbancia a 420 nm a determinados tiempos:5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 y 60 minutos.

Representando gráficamente 1/(a-A/eb) frente al tiempo se debe obtener una recta cuya pendiente es la constante de velocidad. Tenemos que tener en cuenta que la concentración inicial de ferrocianuro es 10^{-3} M en vez de $2*10^{-3}$ M ya que al principio se mezclaron las dos disoluciones iniciales.

7.3. Determinación de la constante de disociación de un ácido.

Esta practica la realizaremos con el ácido azul de bromofenol mediante la técnica de especroscopía ultravioleta-visible.

Es posible determinar la constante debido a que el espectro de esta sustancia varía con el pH del medio. De esta manera se puede determinar y relacionar las distintas concentraciones de las distintas especies químicas de un equilibrio en disociación.

- A partir de una solución stock al 0,002% de azul de bromofenol preparar una disolución ácida tomando 5 ml de la solución stock, añadiendo 4 ml de ácido sulfúrico 0,5 molar y 1 ml de agua destilada.

- Por otro lado preparar una solución alcalina de azul de bromofenol, tomando 5 ml de la solución stock, añadiendo 0,5 ml de hidróxido sódico 0,5 normal y 4,5 ml de agua destilada.

- Se preparan también las siguientes soluciones tampón:

100ml de una solución de ácido cítrico 0,1 M

100ml de una solución de PO4HNa2 0,2 M

A partir de estas soluciones prepararemos las siguientes:

1. 1,5 ml de ácido cítrico + 18,5 ml de PO_4HNa_2
2. 5,0 ml de ácido cítrico + 15,0 ml de PO_4HNa_2
3. 6,5 ml de ácido cítrico + 13,5 ml de PO_4HNa_2
4. 8,0 ml de ácido cítrico + 12,0 ml de PO_4HNa_2
5. 9,0 ml de ácido cítrico + 11,0 ml de PO_4HNa_2
6. 10,0 ml de ácido cítrico + 10,0 ml de PO_4HNa_2
7. 11,0 ml de ácido cítrico + 9,0 ml de PO_4HNa_2
8. 19,5 ml de ácido cítrico + 0,5 ml de PO_4HNa_2

- Medimos el pH de las disoluciones anteriormente preparadas soluciones tampón, solución ácida de azul de bromofenol y solución alcalina de bromofenol.

- En 8 tubos de ensayo se hacen las siguientes disoluciones: Tomaremos 4 ml de cada una de las soluciones tampón, se le añade 5 ml de azul de bromofenol (solución stock) y un ml de agua destilada.

- Finalmente se miden las absorbancias de las disoluciones preparadas a una longitud de onda de 590nm que es la zona del máximo de absorción de indicador. Posteriormente se realiza una representación gráfica de la absorbancia frente al pH.

Donde hay máxima absorbancia, el indicador estará en forma [A-], donde hay mínima absorbancia estará en forma [HA]. Calculando la media de ambas absortividades podremos extrapolar de la representación gráfica el pH, que en este caso coincide con el pKa. A partir de el cual podemos calcular el valor de Ka que es la constante de disociación del ácido.

Según la formula: $pH = pKa + \log[A^-]/[HA]$ en condiciones de absorbancia media, $[A^-] = [HA]$, el $pH = pKa$.

7.4. Determinación de la concentración de los componentes de una muestra binaria.

Dado que las absorbancias son aditivas, la absorbancia total de una disolución a una determina longitud de onda es la suma de las absorbancias

de cada componente de la disolución .

El objetivo de la práctica es calcular las concentraciones de Ni^{2+} y el Co^{2+} , en una disolución que contiene a los complejos de ambos iones.

Se parte de tres disoluciones stock : 0,2 M de Cl_2Co, de Cl_2Ni y una disolución de HCl 1 M.

Se preparan dos series de disoluciones patrones deCl_2Ni y Cl_2Co de las siguientes concentraciones, 0,04 -0,05 - 0,06 - 0,08 - 0,10 M Tomando los volúmenes necesarios de las disoluciones estándar y añadiendo de la disolución de HCl 1 M hasta completar 10 ml. Se añade el HCl para asegurar la formación de un complejo único de cloro.

Medir la absorbancia de todas las disoluciones a 400 y 525 nm y representar dichas absorbancias frente a las concentraciones correspondientes. Como patrón blanco utilizaremos el HCl 1 M.

A partir de las rectas obtenidas calcular gráficamente y por ajuste de mínimos cuadrados calcularlas absortividades molares para cada componente a las longitudes de onda.

Conociendo las absortividades molares de cada elemento y a cada longitud de onda podremos calcular las concentraciones de una mezcla problema de ambos componentes al medir la absorbancia.

Para ello nos basamos en la siguiente ecuación:

$$A' = e'_m \, b \, C_m + e'_n \, b \, C_n$$

$$A'' = e''_m \, b \, C_m + e''_n \, b \, C_n$$

Siendo m Cl_2Ni y n Cl_2Co. A’ es la absorbancia a 400 nm y A” absorbancia a 525 nm.

7.5. Cálculo del espectro de absorción de un vegetal.

En primer lugar obtendremos un estracto de pigmentos de una hoja ya que son éstos los que realizan la absorción de la luz. Los pigmentos más importantes son las clorofilas y los carotenos, aunque también hay otros

como las xantofilas que ayudan a majorar la captación.

Para ello se macera en un mortero 0,1 gramos de hoja de alubia, maíz, o cualquier otra planta que se desee, con 10 ml de acetona al 80%. Tras permanecer toda una noche en la nevera, el estrato se filtrará a través de un filtro millipore, enrasando a continuación hasta 10 ml con acetona al 80%.

Para realizar un espectro de absorción se mide en un espectrofotómetro en todas las longitudes de onda (en pasos de 20 nm) desde 740 a 400nm.

Los resultados del espectro de absorción obtenidos de los pigmentos de las hojas frescas maceradas se representan gráficamente relacionando longitudes de onda con la absorbancia. Se obtienen dos picos máximos de absorción uno sobre los 400 nm y el otro a unos 710 nm que corresponden con los carotenos y las clorofilas respectivamente.

Para comparar, se puede realizar un espectro de absorción de un estracto feofitinizado (tratado con HCl), donde se han destruido las clorofilas (por el intercambio del átomo de magnesio por un protón) y se han formado feofitinas que son pigmentos pardos.

8. BIBLIOGRAFÍA.

- Douglas A. Skoog; James J. Leary: Análisis instrumental. Editorial McGraw-Hill./Interamericana de España, S.A. 1994.

- Santiago Prieto; Silvia Amich; Maria Luisa Salve: Laboratorio clínico. Principios generales. Editorial McGraw-Hill / Interamericana de España S.A. 1993.

- Antonio Martín Pérez: Métodos fisicoquímicos de análisis.

- Benito del Castillo; Oriol Valls: Técnicas instrumentales de farmacia y técnicas de salud.

- Erving: Material instrumental de análisis químico.

- Diccionario enciclopédico Labor.

- Departamento de química y edafología, facultad de ciencias, Universidad de Navarra: Prácticas de técnicas instrumentales.

- Enciclopedia general Argos.

- Luis y. García González; Manuel J. García Sanz; Manuel e. Rodríguez González: Tecnología General. Editorial Everest, S.A.