

CONCEPTOS Y PROCEDIMIENTOS DEL ANÁLISIS QUÍMICO CONTEMPORÁNEO III. EVALUACIÓN DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA MOLECULAR UV-VIS

Fernando Millán

Instituto Universitario Politécnico “Santiago Mariño” Ampliación Mérida
fcarlosmillan@gmail.com

Resumen

En el presente artículo se realiza una discusión crítica acerca de los métodos espectrofotométricos UV – Visible de análisis químico en base a sus principios fisicoquímicos, potencialidades y características analíticas, así como de algunas de sus aplicaciones representativas en la industria y el control ambiental. Estos métodos de análisis se desarrollaron debido a la necesidad de incrementar características analíticas como sensibilidad, selectividad, límite de detección y rapidez en el análisis, a fin de ser aplicados en el análisis de trazas, donde los métodos clásicos ya no tienen sensibilidad. A pesar de su peor precisión, (1-5 % DER), son comunes los límites de detección menores a 10^{-5} M con capacidades analíticas de decenas de muestras por hora. La rapidez de analítica se puede ver repotenciada hasta por un factor de 10 con acoplamiento FIA, los cuales son necesarios en análisis rutinarios de un gran número de muestras. La gran versatilidad de la metodología espectrofotométrica le permite, entonces, la determinación de gran variedad de analitos en diversidad de matrices con gran exactitud y rapidez. Se concluye que se hace necesario su divulgación y enseñanza a estudiantes y profesionales relacionados con áreas del conocimiento dependientes del análisis químico.

Palabras clave: absorción molecular, análisis espectrofotométrico, espectrofotometría.

CONCEPTS AND PROCEDURES OF CONTEMPORARY CHEMICAL ANALYSIS III. EVALUATION OF MOLECULAR UV - VIS SPECTROPHOTOMETRY

Abstract

In the present article a critical discussion is made about the UV - Visible spectrophotometric methods of chemical analysis based on its physicochemical principles, potentialities and analytical characteristics, as well as some of its representative applications in industry and environmental control. These analysis methods were developed due to the need to increase analytical characteristics such as sensitivity, selectivity, limit of detection and speed in the analysis in order to be applied in the trace analysis, where the classical methods no longer have sensitivity. Despite its worst accuracy (1 - 5% DER), detection limits of less than $10^{-5} M$ are common with analytical capacities of dozens of samples per hour. The analytical speed can be seen re-powered up to a factor of 10 with FIA couplings, which are necessary in routine analyzes of a large number of samples. The great versatility of the spectrophotometric methodology allows, then, the determination of a great variety of analytes in diversity of matrices with great accuracy and speed. It is concluded that it is necessary to disseminate and teach students and professionals related to areas of knowledge dependent on chemical analysis.

Key words: molecular absorption, spectrophotometric analysis, spectrophotometry.

Introducción

En dos artículos previos (Millán, 2008, 2010) se trataron los conceptos involucrados en “El Proceso Analítico Total” cuya función es garantizar un nivel de calidad aceptable en un análisis químico, así como la discusión crítica acerca de las potencialidades y características analíticas de los métodos clásicos de análisis químico.

En esta tercera parte se discuten los principios generales, las características y potencialidades analíticas de la espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta y visible. Tal metodología forma parte de la gran familia de los métodos instrumentales, específicamente dentro del grupo de los métodos ópticos de análisis químico. Su principal diferencia con los métodos clásicos de análisis químico radica en el hecho de que, como metodología instrumental requiere de comparación con patrones conocidos; esto se conoce como calibración (Miller y Miller, 2000).

La espectrofotometría UV–Visible se basa en la medición de propiedades ópticas que derivan de la interacción de la radiación electromagnética con la materia como la absorción y emisión de luz (así como la luminiscencia), entendiéndose como luz aquella porción del espectro electromagnético que se maneja con espejos y lentes, es decir las regiones ultravioleta y visible. Estos métodos se desarrollaron rápidamente a partir de la segunda mitad del siglo 20 debido a la imperiosa necesidad de incrementar características analíticas como sensibilidad, selectividad, límite de detección, así como la rapidez y la capacidad de automatización para el análisis de gran cantidad de muestras en tiempo razonable.

Un ejemplo lo da el control del ambiente que ha forzado a niveles extremos el desarrollo de nuevas técnicas y métodos capaces de realizar nuevos análisis que están presentes en diversas matrices en muy pequeñas cantidades, con pocos o ningún problemas de interferencia en el análisis. Estos métodos son de relativa facilidad de aplicación y ejecución; sin embargo, requieren de cuidados especiales en la forma de operar para garantizar la precisión y exactitud deseadas.

En atención a lo expuesto, el objetivo del presente artículo es mostrar una visión crítica de las potencialidades de la espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta y visible. Igualmente motivar su enseñanza en las Escuelas de Ingeniería Química como base de una formación sólida del ingeniero en el campo del análisis químico en general, pues está establecido que el análisis químico juega un papel importante en el desarrollo de la tecnología, la industria, y la sociedad misma.

No es propósito del presente artículo exponer aspectos detallados sobre las teorías que sirven de base para el desarrollo de la metodología espectrofotométrica, por lo cual se remite al lector a la bibliografía citada. Este artículo está dirigido a profesores y estudiantes de las diferentes ingenierías que quieran compartir una visión renovada en la enseñanza del análisis químico y de sus aplicaciones.

Absorción de Luz por las Moléculas

Toda molécula, tanto en fase gaseosa como en solución, posee una energía cuántica interna compuesta por las energías electrónica, vibracional y rotacional (Chang, 1977; Banwell, 1977). La misma se puede representar como:

$$E_{int} = E_e + E_{vib} + E_{rot}$$

Según la teoría cuántica, en una molécula tales energías son independientes entre sí y están cuantizadas; de manera que pueden tomar sólo ciertos y determinados valores “permitidos” por los perfiles energéticos de las mismas. Por otra parte, la teoría en referencia considera la “luz” como un fenómeno de naturaleza dual (materia – onda), es decir compuesta por unas partículas llamadas fotones que poseen una energía definida por la frecuencia (o longitud de onda) de la onda asociada al fotón según la Ley de Planck (Robinson, 1965; Skoog y West, 2001):

$$E = h\nu = h \times \frac{c}{\lambda}$$

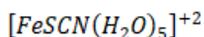
De la expresión anterior se deduce que la energía del fotón varía de manera inversamente proporcional con la longitud de la onda. Esta cantidad de energía que posee el fotón es la que determinará si una especie química molecular absorberá la radiación de esa longitud de onda.

La región UV- Visible del espectro (luz: 190 – 800 nm) interactúa con los electrones de valencia de las moléculas modificando la energía electrónica, pero la cuantización de esta energía electrónica y el contenido definido de energía de los fotones sientan las bases para la selectividad en el proceso de absorción (Ingle y Crouch, 1990).

Espectrofotometría de Absorción Molecular Ultravioleta–Visible

La espectrofotometría UV –Visible se basa en la absorción selectiva de radiación electromagnética en la región ultravioleta y visible del espectro electromagnético (190 – 800 nm) por algunos medios químicos. De esta manera, a través de la medición de una propiedad llamada Absorbancia, a determinada longitud de onda es posible precisar la concentración de un analito dado si se compara con las Absorbancias de soluciones patrón conocidas (Skoog y West, 2001).

Con una apropiada preparación química se pueden analizar gran variedad de analitos en diversas matrices. De esta manera, la Absorbancia de las especies que poseen grupos “absorbentes” en sus moléculas pueden medirse directamente, y las que no son absorbentes hacerse reaccionar con un reactivo apropiado para formar una especie absorbente como por ejemplo un complejo coloreado. Este es el caso de los iones Fe^{+3} el cual forma un complejo rojo, los iones SCN^- :



TiocianopentaacuoferroIII

Especies Absorbentes Orgánicas

Las propiedades espectrales de las moléculas orgánicas dependen del tipo de electrones de valencia, de sus posibilidades cuánticas de absorción de radiación UV - Visible y de la presencia de grupos cromóforos en ellas (Rao, 1970). En la Figura 1 se muestra la estructura del grupo carbonilo donde se ilustran los tipos de electrones de valencia.

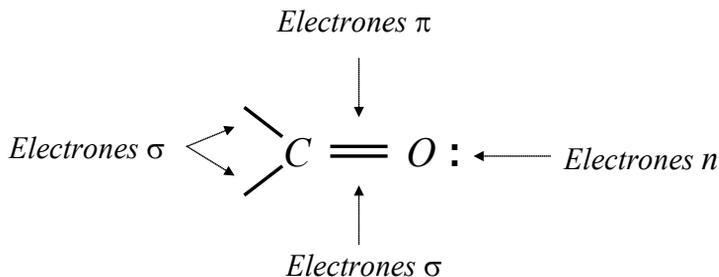


Figura 1.- Estructura del grupo carbonilo y tipos de electrones de valencia

Los electrones σ configuran los enlaces simples saturados u orbitales moleculares de enlace del tipo σ , mientras que los electrones π conforman los enlaces múltiples no saturados u orbitales π . Estos grupos no saturados son los que reciben el nombre *grupos cromóforos*. Por último, los electrones n son pares solitarios que no están enlazados y que ocupan un orbital de no enlace.

La aparición de color en algunas sustancias orgánicas está relacionada con la presencia de uno o varios grupos cromóforos cuyos electrones π son excitados fácilmente por la absorción de radiación de la región ultravioleta cercano y visible (200–800 nm), de energía correspondiente (λ específica) a las posibilidades cuánticas para la transición electrónica. Dos ejemplos clásicos y extremos son la zanahoria y el tomate cuyo color (naranja y rojo) se debe a la presencia de β -carotenos cuyas moléculas contienen una alta conjugación de dobles enlaces (polienos). En el cuadro 1 se muestran las características de absorción de algunos grupos cromóforos.

Por el contrario, las moléculas orgánicas con enlaces saturados (presencia de electrones σ) no presentan color y sus absorciones se ubican en la región del ultravioleta lejano y de vacío (<180 nm).

Cuadro 1.

Características de absorción de algunos cromóforos

Cromóforo	Compuesto	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} ($l\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	Transición
$>C=C<$	$R_2C=CHR$	173 - 189	13300	$\pi \rightarrow \pi^*$
$-C\equiv C-$	$R_1C\equiv CR_2$	187 - 191	10000	$\pi \rightarrow \pi^*$
$>C=C=C<$	$R_1HC=C=CH_2$	225	500	$\pi \rightarrow \pi^*$
$>C=O$	H_3C-COH	186	1000	$\pi \rightarrow \pi^*$
$-N=N-$	$H_3C-N=N-CH_3$	340	5	$\pi \rightarrow \pi^*$

Especies Absorbentes Inorgánicas: Complejos de Metales de Transición

La naturaleza de las transiciones electrónicas de los metales de transición y sus complejos da lugar a una gran variedad de compuestos coloreados debido a la presencia de orbitales tipo “d” incompletos. En el cuadro 2 se enlistan algunos compuestos de metales de transición y sus colores.

En presencia de un ligando como el agua (hidratos) estos orbitales pueden separarse energéticamente, y la diferencia de energía respectiva cae dentro del rango visible del espectro (teoría del campo ligando).

Cuadro 2.

Compuestos de metales de transición coloreados

Ion	Cr^{+3}	Cr^{+6}	Cu^{+2}	Mn^{+2}	Mn^{+7}
Compuesto	K_2CrO_4	$K_2Cr_2O_7$	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	$KMnO_4$
Color	Amarillo	Naranja	Azul	Rosado	Violeta

Ley de Lamber y Beer

La ley que rige los aspectos cuantitativos de la absorción de luz es la *Ley de Lambert y Beer*. Esta establece que, bajo ciertas condiciones experimentales fijas como longitud de onda de la radiación, camino óptico, temperatura, entre otras, la Absorbancia de la especie química varía directamente con la concentración según la relación:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = \varepsilon(\lambda) \times b \times C$$

Donde P_0 y P son las potencias lumínicas incidente y emergente del medio químico, $\varepsilon(\lambda)$ es el coeficiente de extinción molar, o absortividad molar ($l \times mol^{-1} \times cm^{-1}$), b es el trayecto óptico (cm) y C la concentración molar (M) (Skoog y West, 2001).

El coeficiente de extinción molar es una característica de la sustancia que depende en mayor grado de las posibilidades cuánticas de transición electrónica de la especie, de la sección transversal de la molécula, así como de la longitud de la onda y en menor grado de la concentración, solvente utilizado y de la temperatura (Hanna, 1985). Para una sección transversal molecular promedio de 10^{-15} cm^2 y una transición electrónica de alta probabilidad ($P \approx 1$), el valor de $\varepsilon(\lambda)$ puede alcanzar un valor máximo del orden de 10^5 (Rao, 1970; Cordos, 2001). Siendo $\varepsilon(\lambda)$ una característica propia de la especie química que bajo ciertas condiciones experimentales permanece constante, al igual que el trayecto óptico, que por lo general es 1 cm , entonces la expresión de la ley se transforma en:

$$A = KC$$

La ecuación indica que bajo condiciones experimentales controladas y determinadas por K , la cual representa la pendiente de la recta, la absorbancia se incrementa de manera proporcional con la concentración. Sin embargo, en las mediciones espectrofotométricas se requiere el uso de blancos (absorbancia de reactivos y solventes, otras interacciones) que se reflejan en un corte “ a ” del eje de la absorbancia, Y , con lo que la ecuación anterior se transforma en:

$$A = a + KC$$

Tal ecuación representa la recta de calibración realizada a partir de patrones de concentración conocida y la misma debe ser calculada a partir del método de los mínimos cuadrados con el que se obtiene la ecuación de la recta más probable que pasa por los puntos determinados (Miller y Miller, 2000). De la misma se obtiene la concentración del analito por la expresión:

$$C = \frac{A - a}{K}$$

Limitaciones de la Ley de Lambert y Beer

La Ley de Lambert y Beer es una ley límite la cual exige condiciones casi ideales, particularmente en lo que concierne a la monocromaticidad de la radiación utilizada, los niveles de concentración inferiores a $0,01M$, y donde no debe haber ningún fenómeno distinto al de absorción de luz con la sustancia a medir.

La condición de monocromaticidad es difícil de realizar experimentalmente y lo que se logra es aislar un rango de longitudes de onda, el cual debe ser lo más estrecho posible. Las mejores condiciones de medición se obtienen cuando se realiza en el máximo de la curva $A = f(\lambda)$. Fuera de estas condiciones exigidas por la Ley se generan

desviaciones de la linealidad, las cuales pueden ser positivas o negativas. Es de acotar que las desviaciones químicas se producen por los cambios de la concentración debido a reacciones del analito con el solvente o la aparición del analito en solución bajo diferentes formas químicas como consecuencia de equilibrios químicos donde intervienen los iones H_3O^+ o un ligando que acompleja el analito. Para los equilibrios ácido base se requiere estabilizar el pH por medio de solución buffer y definir la forma química del analito; tal es el caso de los iones cromo, los cuales pueden estar bajo la forma de dicromato, Cr^{+6} (naranja) o cromato, Cr^{+3} , (amarillo) según:



la posición del equilibrio y, por ende, la concentración relativa de ambas especies de cromo depende del valor del pH de la solución. Debe entonces regularse el pH de manera que el equilibrio esté desplazado hacia una determinada dirección.

Instrumentación Utilizada en la Espectrofotometría Ultravioleta y Visible

Los instrumentos utilizados en la espectrofotometría UV-Visible son los fotómetros y espectrofotómetros, formados por distintos componentes a saber: una fuente de radiación (fuente fotónica), un sistema óptico de lentes y espejos para la colimación y dirección del haz luminoso, un dispositivo seleccionador de la longitud de la onda (monocromador), un porta muestra (celda), el detector de la radiación (detector fotónico) y el procesador de la señal. Finalmente, la señal procesada se puede presentar de manera digital en una pantalla o display (Rubinson y Rubinson, 2000). En la Figura 2 se muestra un esquema general de un sistema espectrofotométrico.

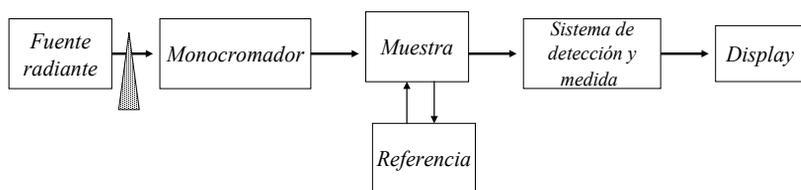


Figura 2. Esquema de un fotómetro de simple haz.

La Fuente Fotónica Continua

La fuente de radiación debe proporcionar una salida luminosa potente, constante y uniforme sobre una amplia región espectral. Las lámparas incandescentes como el filamento de wolframio - halógeno se usan para el caso del rango visible ($\lambda > 350 \text{ nm}$) mientras que para el rango ultravioleta ($190 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$) se utiliza una lámpara de deuterio o de hidrógeno. Muchos espectrofotómetros están dotados de ambos tipos de lámparas a fin de cubrir todo el rango útil de la porción ultravioleta y visible del espectro.

El Monocromador

El monocromador es parte fundamental de un espectrofotómetro, pues su tarea es seleccionar un haz de radiación con un ancho de banda y potencia definidos. En el caso de los fotómetros, la λ de trabajo se puede aislar por medio de filtros coloreados; sin embargo, los anchos de banda aislados son amplios, lo que puede incidir en la precisión de la medición.

En caso de espectrofotómetros, la selección se realiza mediante un monocromador; éste es un dispositivo óptico contentivo de diversos componentes como rendijas de entrada y salida (reglables o fijas), espejos colimadores y focalizadores, y un elemento dispersor que puede ser un

prisma o una red de difracción plana. El prisma como elemento dispersor fue sustituido hace mucho tiempo por las redes de difracción planas, ya que para obtener un buen poder de resolución se requiere de prismas grandes, además de presentar otros inconvenientes.

La red de difracción plana, Figura 3, es una superficie pulida donde se graban un número “*N*” determinado de surcos paralelos, espaciados una distancia *d* e inclinados un ángulo γ .

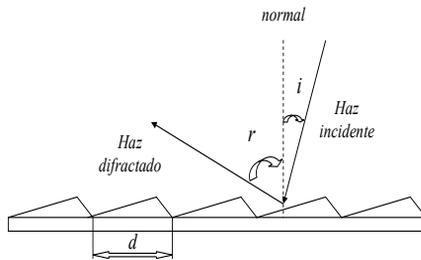


Figura 3.– Difracción sobre una red de difracción plana

Para la región UV-VIS las redes de difracción planas pueden contener entre 500 y 2000 ranuras por milímetro. La misma selecciona la longitud de onda por interferencias constructivas o destructivas al variar su ángulo con respecto al haz de luz incidente, según la Ley: (Guiñon y García, 1992).

$$m\lambda = d \times (\text{sen}(1) - \text{sen}(r))$$

donde *m* puede tomar sólo valores enteros y representa el orden espectral, *i* es el ángulo de incidencia y *r* el ángulo de difracción, con respecto a la normal de la superficie. De la expresión anterior se puede ver que para un mismo *r* es posible obtener diferentes longitudes de onda dependiendo del valor de *m*, correspondiendo pues a diversos órdenes espectrales.

La gran mayoría de espectrofotómetros clásicos (Varian, Perkin Elmer) disponen de un monocromador con un montaje Czerny-Turner mostrado

en la figura 4.

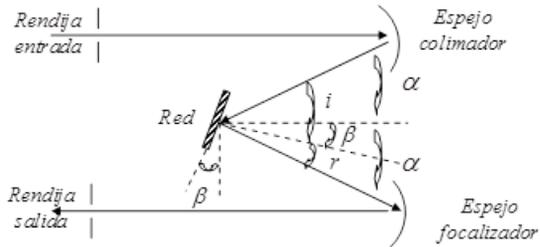


Figura 4.– Esquema de un monocromador con montaje Czerny-Turner

Las rendijas de entrada y salida se pueden calibrar entre 0,2 y 2 nm y la suma de los ángulos ($i + r$) se fija en $2a = 20^\circ$ y la red posee 1276 ranuras por milímetro ($d = 780$ nm). Siendo $i = a + \beta$ y , la ley de la red se convierte en:

$$m\lambda = d[\text{sen}(\alpha + \beta) - \text{sen}(\alpha - \beta)] = 2d \times \cos \alpha \times \text{sen} \beta$$

Utilizando el espectro de primer orden ($m = 1$) y siendo $a = 10^\circ$ se tiene la longitud de la onda seleccionada en función del ángulo de la red β

$$\lambda(\text{nm}) = 1538 \text{nm} \times \text{sen} \beta$$

si el ángulo de la red β se varía entre 0° y 36° , las longitudes de onda de salida se pueden calcular fácilmente con la expresión anterior. En el Cuadro 3 se muestran algunos valores de λ según el ángulo de la red.

Cuadro 3.

Longitudes de onda en nm según el ángulo de la red β

β	5	10	20	30	35
λ (nm)	134	268	528	772	885

La selección de la longitud de la onda es parte crítica del instrumento ya que el dispositivo selector debe ser capaz de aislar, de una fuente continua, un haz de luz de alta pureza espectral a una λ determinada. Por lo tanto, su característica más importante es el *poder de resolución espectral*, R , el cual mide la capacidad del dispositivo selector de separar dos longitudes de onda adyacentes (Skoog, Holler y Nieman, 2001).

$$R = \frac{\bar{\lambda}}{\Delta\lambda}$$

En la expresión anterior $\bar{\lambda}$ es la longitud de onda promedio y $\Delta\lambda$ la diferencia entre las longitudes de onda contiguas. El poder de resolución de una red de difracción plana es muy superior al del prisma y con un dispositivo de poco tamaño se obtiene una mejor calidad de dispersión espectral, la cual es lineal sobre el plano focal. Esta se mide por medio de la dispersión lineal recíproca que indica los nm por cada mm en el plano focal.

$$\frac{d\lambda}{dx} = \frac{d}{n \times f} \times \cos(r)$$

si r es pequeño, entonces: $\cos(r) \approx 1$ y

$$\frac{d\lambda}{dx} = \frac{d}{n \times f}$$

lo que significa que la dispersión lineal es constante cuando el ángulo r es constante.

Celdas Porta Muestra

Las cubetas porta muestras son en general de base cuadrada de un cm de lado y paredes perfectamente paralelas y perpendiculares entre sí. Dos paredes paralelas funcionan como “*las ventanas*” y las mismas deben ser transparentes en el rango espectral de trabajo, para el rango visible son confeccionadas de vidrio o plástico y de cuarzo para el rango ultravioleta.

Las celdas de medición pueden ser la causa de algunas interferencias físicas como dispersión de luz por ralladuras o absorción parcial del haz de luz por grasa o sucio en las paredes. Igualmente, el mal posicionamiento de las mismas impide que el haz incida realmente perpendicular a la ventana de la celda, lo hace $b \neq 1 \text{ cm}$. Algunos fotómetros están equipados con celdas redondas; las mismas tienen la desventaja de que pueden quedar mal posicionadas con respecto al haz de luz y el camino óptico disminuye, por lo que la Absorbancia medida también será menor (Burgues y Knowles, 1981).

Se pueden encontrar en el mercado gran diversidad de celdas para distintas aplicaciones como técnicas de flujo continuo, termostatzadas, celdas desmontables, celdas para gases.

El Detector Fotónico y el Procesador de la Señal

El detector fotónico es un traductor óptico electrónico que convierte el impulso lumínico en un impulso eléctrico, cuya intensidad debe ser proporcional a la intensidad luminosa que incide sobre él. Éste debe poseer alta sensibilidad, tener una respuesta lineal en un amplio rango espectral, producir una señal que se pueda amplificar, y tener bajo nivel de ruido. La respuesta del mismo puede representarse por:

$$\frac{dI}{dx} = \frac{d}{n \times f} \times \cos(r)$$

Donde i representa la corriente oscura (termoelectrones), k es la sensibilidad y P_0 la potencia luminosa incidente. El detector fotónico más utilizado en los espectrofotómetros modernos es el tubo fotomultiplicador, aunque algunos están provistos con arreglo de diodos (detector multicanal). Sin embargo, el primero presenta mejores características de sensibilidad y rango lineal. La ventaja del espectrofotómetro multicanal (Figura 6), radica en la velocidad con la que se pueden obtener los espectros en todo el dominio espectral, con respecto a los instrumentos secuenciales

clásicos (Jones, 1985).

Los espectrofotómetros de nueva generación están equipados con un computador cuyo software gobierna todas las funciones del instrumento y puede procesar los datos, para lo que se requiere la conversión de señales analógicas en señales digitales. Así, estas señales procesadas pueden ser almacenadas en el sistema de cálculo.

Gracias a los desarrollos de la computación y de los instrumentos multicanal, se está popularizando el uso de las derivadas de diferentes órdenes para el procesamiento de espectros complejos, mejorando la selectividad así como la sensibilidad de los análisis. Esta técnica de procesamiento de los datos espectrales tiene especial aplicación en la determinación simultánea de diversos analitos en una mezcla (James, 1987).

Arreglos Instrumentales

La óptica de los fotómetros está diseñada con un sistema mono haz, (Figura 1), mientras que en los espectrofotómetros lo está con un sistema de doble haz (Figura 5), de los cuales uno funciona como haz de referencia y permite corregir los efectos por variaciones en la intensidad luminosa.

Un espejo divisor rotativo (hélice) divide el haz luminoso en el tiempo (o en el espacio) de manera sincronizada, y la óptica lo hace pasar una vez por la muestra y la siguiente por la referencia. Finalmente, a través de un sistema de espejos los haces son dirigidos hacia el sistema de detección y procesamiento.

Por último, la señal saliente del detector debe ser trabajada. El sistema de medida y procesamiento de los datos depende del tipo de instrumento, modus operandis, detector, y la forma final que debería tomar la señal procesada. El procesamiento puede comprender diferentes transformaciones como amplificación, división de tensión, conversiones corriente – tensión o analógico – digital, operaciones matemáticas como

integración, logaritmación, diferenciación (Cordos, 2001).

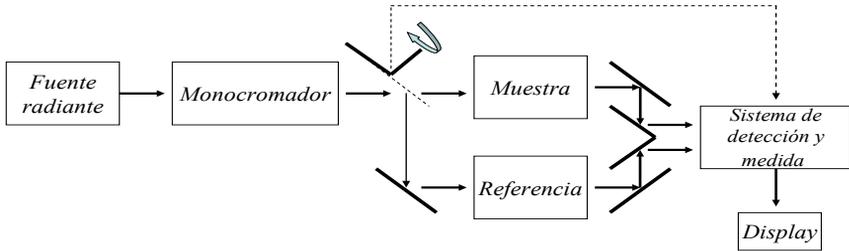


Figura 5.– Esquema de un espectrofotómetro de doble haz

Un espectrofotómetro multicanal tiene una configuración óptica inversa (Figura 6), donde una radiación continua se hace pasar por la muestra en la celda y luego es dirigida hacia un polycromador el cual dispersa la luz sobre un detector multicanal como un arreglo de diodos lineal (Jones, 1985). Los mecanismos de monocromatización y barrido del espectro ya no son necesarios; con el espectrofotómetro multicanal, un espectro completo entre los 190 y 1100 nm puede ser registrado de manera simultánea.

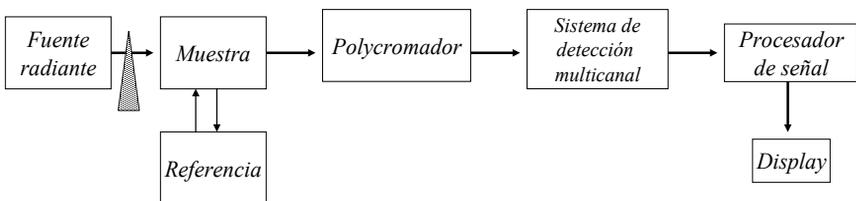


Figura 6.– Esquema de un espectrofotómetro multicanal

Acoplamiento FIA – Espectrofotometría UV-VIS

El término FIA “*Flow Injection Analysis*” se refiere a una modalidad operatoria para el análisis químico instrumental desarrollado por Ruzicka

y Hansen en 1975. Su principal aplicación está en la automatización de preparación e introducción de la muestra en el instrumento de medición. Las muestras se introducen secuencialmente en un flujo de solución vector que las transporta hacia la celda de medición, permitiendo el análisis sucesivo de un número grande de muestras relativamente rápido, ahorrando tiempo, dinero y esfuerzo.

Las técnicas FIA se acoplan perfectamente al análisis espectrofotométrico y se amoldan al caso particular de estudio. Estos sistemas pueden tener diversos grados de complejidad, dependiendo de los pretratamientos que se deban realizar sobre la muestra.

El dispositivo FIA más elemental se muestra en la Figura 7. Consiste en una bomba peristáltica que garantiza un flujo constante de la solución vector (y/o reactivos) hacia el sistema de inyección (y/o reacción). La bomba peristáltica puede ser mono o multicanal de velocidad única o variable ($0,5 - 2,5 \text{ ml min}^{-1}$), las más sofisticadas tienen canales de velocidad variable, independientes entre sí.

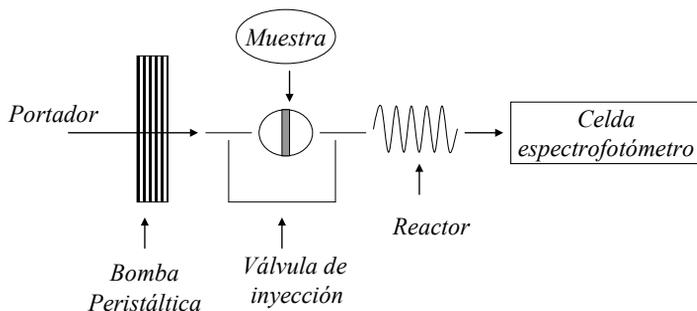


Figura 7.– Acoplamiento básico FIA – Espectrofotómetro UV-VIS

El transporte se realiza por medio de tuberías de Tygon o Solvaflex hidrófobas de diversos diámetros que van desde 0,1 hasta 2 mm. La válvula de inyección rotativa asegura la introducción de volúmenes discretos y constantes de muestra de manera electrónica o neumática; se puede

realizar la introducción de manera manual pero es menos preciso. Las bobinas de reacción permiten tiempo de reacción y de homogeneización de la mezcla antes de la medición espectrofotométrica, y su largo se debe optimizar al poner a punto la técnica. Los sistemas FIA de dos o más canales se utilizan cuando se requiere un control de los reactivos, o cuando su mezcla se vuelve inestable.

La aplicación de sistemas FIA al análisis espectrofotométrico trae ciertas ventajas que los hace muy competitivos frente a los modos operando clásicos: consumen poco reactivo y requieren cantidades de muestra que van desde 10 hasta 100 μl , comparado con los 1 a 10 ml en la modalidad clásica y se adaptan muy bien a secuencias de muestreo rápidas. Estos aspectos son importantes en laboratorios de análisis rutinarios y cuando las cantidades de muestra son limitadas.

Debido a que se usan cantidades más pequeñas de muestra, el sistema es limpiado constantemente por la solución vector, evitando efectos de memoria. Otra consecuencia es que el factor productividad se incrementa, pudiéndose analizar unas 100 muestras o más por hora de trabajo, frente a las 50 en promedio por los procedimientos convencionales.

Aplicaciones de la Espectrofotometría UV-VIS

La espectrofotometría UV-VIS es una de las metodologías analíticas cuantitativas más utilizada para la determinación de especies químicas, a nivel de trazas. Esto se debe a que muchas de estas especies, tanto orgánicas como inorgánicas, poseen características espectrales de absorción en esta región del espectro electromagnético. En el Cuadro 4 se muestran ejemplos específicos.

Las aplicaciones de esta metodología se encuentran en diversos campos y dominios de la actividad social y económica, procesos industriales, agricultura, medicina y ciencias de la salud, ingeniería ambiental, ciencia de los alimentos, ciencia de suelos, investigación básica y aplicada, entre otros (Babko y Pilipenko, 1976). Su uso permite la determinación

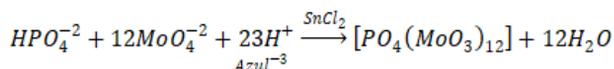
cuantitativa de muchas sustancias químicas que pueden ir desde metales hasta fármacos y sustancias orgánicas de interés biológico, la realización de estudios cinéticos de reacciones lentas en solución, la determinación de curvas de titulación. Por otro lado, la recopilación de espectros de absorción en bases de datos posibilita la identificación de sustancias y la determinación de su grado de pureza.

Cuadro 4.

Algunas aplicaciones del análisis espectrofotométrico al análisis de aguas

Analito	Método	λ_{nm}
Al	Formación de complejo rosado por reacción con cianuro de eriocromo R a pH 6.	535
Fe	Formación de complejo rojo naranja con o-fenantrolina a pH 3	510
NO ₂ (g)	Formación de colorante azo con N-(1-naphthyl)-ethylenediamine y ácido sulfanílico	540
NO ₃ ⁻	Formación de colorante azo por reacción con sulfanilamida y N-(1-naftil)-etilendiamina, después de reducción por Cd ⁺²	543
Fenoles	Formación de colorante de antipirina por reacción con 4-aminoantipirina y K ₃ Fe(CN) ₆	460

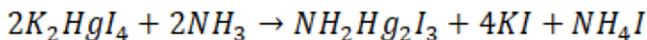
El análisis de fosfatos es importante para el caso de estudios de fertilidad de suelos (aplicación agrícola) o de calidad de aguas (estudios ambientales), el cual se realiza por el método del azul de molibdeno según la reacción siguiente:



Los iones ortofosfato reaccionan con los iones molibdatos en medio ácido para formar el complejo fosfomolibdico (VI) amarillo, el cual es reducido por el cloruro estanoso a un complejo fosfomolibdico (V) azul

cuya absorbancia se puede medir a los 700 nm, ($\varepsilon(\lambda)=20000$).

Otro ejemplo clásico es la determinación de por el método de Nessler, publicado por su autor en 1856. El mismo se basa en el hecho de que una solución alcalina de HgI_2 y KI (reactivo de Nessler), reacciona con el nitrógeno amoniacal para formar un coloide de color pardo, cuya absorbancia se puede medir a los 375 nm ($\varepsilon(\lambda)=2100$).



Análisis Multicomponente

El análisis espectrofotométrico se puede aplicar a mezclas multicomponentes siempre y cuando los componentes no reaccionen entre sí. Esto es posible ya que las absorbancias, a una l_i dada, son aditivas y para una mezcla de n componentes, la Ley de Lambert y Beer toma la forma:

$$A_T(\lambda_i) = \sum_{i=1}^n A_i = \sum_{i=1}^n \varepsilon(\lambda_i) \times b \times C_i$$

Se requerirán entonces tantas ecuaciones como componentes presentes en la mezcla. Conociendo los coeficientes de extinción molar a partir de patrones se puede resolver el sistema de ecuaciones resultante.

Evaluación de la Espectrofotometría Ultravioleta Visible

El análisis espectrofotométrico UV-VIS es aplicable al análisis de trazas que se encuentran a niveles de concentración entre 10^{-4} y $10^{-5} M$, pudiéndose determinar inclusive trazas a niveles de hasta $10^{-7} M$. Para determinaciones cuantitativas de calidad se requiere de instrumentos de calidad y de mucha rigurosidad en el tratamiento de la muestra y los patrones.

Exactitud y Precisión

El error de exactitud puede estar entre el 1 y 5 % y depende básicamente de la calidad del blanco y los patrones de calibración. Igualmente, partículas sólidas en suspensión causan dispersión de la radiación.

La presencia de interferentes que reaccionen con el analito y/o los reactivos pueden causar un error sistemático de carácter positivo o negativo, en caso de que las especies formadas sean absorbentes. Igualmente el interferente puede impedir que el analito reaccione, por lo que el error sistemático producido será negativo.

La precisión está determinada por los errores aleatorios que pueden provenir de la resolución de la lectura de la Tramitancia, el ruido del detector, las fluctuaciones de la intensidad de la fuente luminosa, la preparación de los patrones y de la colocación de la celda porta muestra en el instrumento (celda redonda). De acuerdo con la Ley de Lambert y Beer, la concentración se puede expresar como:

$$C = -\frac{1}{\varepsilon(\lambda)b} \log T$$

donde T es la tramitancia (10^{-A}). La incertidumbre absoluta sobre la concentración es:

$$S_C = -\frac{0,434}{\varepsilon(\lambda)b} \times \frac{S_T}{T}$$

donde S_T es la incertidumbre absoluta sobre la tramitancia. De manera que la incertidumbre relativa sobre la concentración será:

$$\frac{S_C}{C} = \frac{0,434}{T} \times \frac{S_T}{\log T}$$

Por lo tanto, si se conoce S_T se podrá calcular a cualquier tramitancia, la incertidumbre relativa sobre la concentración. Para una escala analógica,

S_T puede estar en el orden del 0,2 al 0,3 %, mientras que para una escala digital está en $\pm 0,001$ %.

De la ecuación anterior se puede deducir que la incertidumbre relativa sobre la concentración se incrementa tanto para transmitancias bajas (alta Absorbancia) como para transmitancias altas (baja Absorbancia), y el mínimo de la curva se encuentra a una Absorbancia de 0,434. De esta manera, para que la incertidumbre relativa sobre la concentración se ubique en el rango de $\pm 1 - 2$ %, la Absorbancia debe mantenerse entre 0,1 y 1.

La incertidumbre relativa sobre la transmitancia, asociada al ruido de los fotodetectores, es una función de la transmitancia. En este caso, la incertidumbre relativa sobre la concentración es importante a Absorbancias bajas, pero es menos afectada por Absorbancias mayores, alcanzando un mínimo cuando la Absorbancia es de 0,960.

Cuando hay fluctuaciones de la intensidad luminosa y/o mal colocación de la celda porta muestra, los valores de S_T son directamente proporcionales a la transmitancia y el efecto sobre la incertidumbre en la concentración es importante a Absorbancias bajas.

Sensibilidad

La sensibilidad del análisis por absorción UV-VIS viene dada por la pendiente de la recta de calibración, la cual se expresa como:

$$\frac{dA}{dc} = \varepsilon(\lambda)b$$

de donde se deduce que para mejorar la sensibilidad se debe aumentar el trayecto óptico o se debe buscar una longitud de onda donde $\varepsilon(\lambda)$ sea mayor, y las variaciones de $\varepsilon(\lambda)$ en función de λ sea mínima. Esto se logra al seleccionar λ en el máximo de la banda espectral.

Selectividad

La selectividad de la espectrofotometría UV-VIS no es un problema importante, pues casi siempre se puede encontrar una λ donde sólo absorbe el analito. Igualmente se puede hacer uso de reacciones de formación de compuestos coloreados del analito a objeto de garantizar una absorción selectiva de éste. Cuando otra especie presente contribuye a la absorbancia, es posible realizar un análisis multicomponente.

Tiempo de Análisis y Costo

De todo el proceso analítico a realizar en un análisis espectrofotométrico, los pasos de preparación de la muestra y de los patrones son los que más consumen tiempo. Si se debe derivatizar el analito por no ser absorbente, el tiempo se incrementa.

Una vez cumplidos estos pasos, el análisis propiamente dicho puede ser relativamente rápido y variar entre 15 minutos a dos horas, dependiendo del número de muestras.

Existe una gran variedad de fotómetros y espectrofotómetros cuyos precios varían desde unos 2.000 dólares para el Espectronic 20 hasta unos 5.0000 dólares para un Perkin Elmer totalmente equipado y automatizado.

Conclusiones

Hasta principios del siglo XX el análisis químico dependía básicamente de la volumetría y la gravimetría que, aunque muy exactas, tenían la limitación de la falta de sensibilidad a concentraciones de trazas. La espectrofotometría ultravioleta y visible se desarrolló para ampliar los dominios de detección y cuantificación a niveles mil veces menores que los correspondientes a los métodos clásicos.

Hoy en día esta metodología goza de un alto desarrollo tecnológico. Esto permite aplicarla a una amplísima gama de muestras, así como

satisfacer las necesidades de análisis químico en muchas de las especialidades del saber humano, especialmente en las áreas de la ingeniería y de la tecnología en general. Pudiendo afirmarse que más del 70 % de los análisis químicos realizados en el planeta son llevados a cabo por métodos espectrofotométricos. Por este motivo, el análisis espectrofotométrico debe ser pilar fundamental en la formación analítica del ingeniero del siglo XXI, para que sea capaz de afrontar los retos futuros del desarrollo de la sociedad.

Referencias

- Babko, A. K. y Pilipenko, A. T. (1976). *Photometric analysis: Methods of determining non-metals*. Moscow: Mir Publisher.
- Banwell, C. N. (1977). *Fundamentos de espectroscopia molecular*. Madrid: Ed. Del Castillo.
- Burguess, C. y Knowles, A. (1981). *Standards in absorption spectrometry: UV spectrometry group*. London: Chapman and Hall.
- Chang, R. (1977). *Principios básicos de espectroscopia*. Madrid: Ed. AC.
- Cordos, E. (2001). *Analiza prin spectrometrie de absorbtie moleculara in ultraviolet – vizibil*. Bucuresti: Institut National de Optoelectronica, INOE.
- Guiñón, J. L. y García-Antón, J. (1992). Experimental study of monochromators in UV-VIS and IR spectrophotometers. *Journal of Chem. Educ.*, 69 (1), 77 - 78.
- Hanna, M. W. (1985). *Mecánica cuántica para químicos*. México: Fondo Educativo Interamericano.
- Harvey, D. (2002). *Química analítica moderna*. España: McGraw Hill Interamericana.
- Ingle, J. D. y Crouch, S. R., (1990). *Spectrochemical analysis*. New Jersey: Prentice Hall.
- James, G. E. (1987). Les progrès en spectroscopie UV/visible. *Analisis*, 15 (8), 77 – 83.

- Jones, D. G. (1985). Photodiode array detectors in UV – VIS spectroscopy: Part I. *Anal. Chem.* 57, (9), 1057A – 1072A.
- Millán, F. (2008). Conceptos y procedimientos del análisis químico contemporáneo I: el proceso analítico total, PAT. *Revista de Ciencia, Tecnología e Innovación, CITEIN*, 1 (1), 107 – 125.
- Millán, F. (2010). Conceptos y procedimientos de la química analítica contemporánea II: evaluación de los métodos clásicos de análisis. *Revista de Ciencia, Tecnología e Innovación, CITEIN*, 3, (5), 151 – 172.
- Miller, J. C. y Miller, J. N. (2000). *Estadística y quimiometría para química analítica*. Madrid: Ed. Pearson.
- Rao, C. N. (1970). *Espectroscopia ultravioleta y visible*. Madrid: Ed. Alhambra, S.A.
- Robinson, J. W. (1965). The nature of light. Part I: a physical model of the photon. *Anal. Chem. Acta* 32, 262 – 268.
- Rubinson, J. F. Y Rubinson, K. A., (2000). *Química analítica contemporánea*. México: Ed. Pearson Educación y Prentice may.
- Ruzicka, J y Hansen, E. H. (1975). Flow injection analysis, part I. A new concept of flow continuous flow analysis. *Anal. Chim. Acta*, 78, 145 – 157.
- Skoog, D.A.; Holler, F.J. y Nieman, T.A. (2001). *Principios de análisis instrumental* (quinta edición). Madrid, España: McGraw Hill/ Interamericana de España, S.A.U.
- Skoog, D. A. y West, D. M. (2001). *Química analítica*. (7ma edición). España: McGraw Hill Interamericana.