

Fundamentos de la espectrofotometría UV-vis

Manual de iniciación





Índice

1	Principios básicos de la medición con espectrofotometría UV-vis	3
1.1	El espectro electromagnético	3
1.2	Longitud de onda y frecuencia	3
1.3	Espectros UV y visible	3
1.4	Transmitancia y absorbancia	4
1.5	Resumen	4
2	¿Cómo funciona un espectrofotómetro UV-vis moderno?	5
2.1	Diseño de instrumentos	7
3	Selección de los parámetros óptimos para las mediciones con espectrofotometría UV-vis	13
3.1	Selección de la celda óptica	13
3.2	Termostatación de las muestras	16
3.3	Agitación de la muestra	16
3.4	Mediciones a bajas temperaturas	16
3.5	Transparencia del disolvente	17
3.6	Ancho de banda espectral óptimo	18
3.7	Luz difusa	19
3.8	Rango lineal de un instrumento UV-vis	19
3.9	Información adicional útil	20
3.10	Longitud de onda o centímetros recíprocos	20
4	Resumen de aplicaciones comunes de la espectrofotometría UV-vis	21
4.1	Identificación: espectros y estructura	21
4.2	Confirmación de la identidad	22
4.3	Cuantificación de una molécula	22
4.4	Cinética	24
4.5	Medición del color	26
4.6	Cambios estructurales de los compuestos	28
4.7	Temperatura de fusión de las proteínas y los ácidos nucleicos	28
4.8	Análisis multicomponente	30
4.9	Requisitos de software	32
5	Glosario	34

1. Principios básicos de la medición con espectrofotometría UV-vis

1.1 El espectro electromagnético

La radiación ultravioleta (UV) y visible es una pequeña parte del espectro electromagnético, que incluye otras formas de radiación, como las ondas de radio, los infrarrojos (IR), los rayos cósmicos y los rayos X.

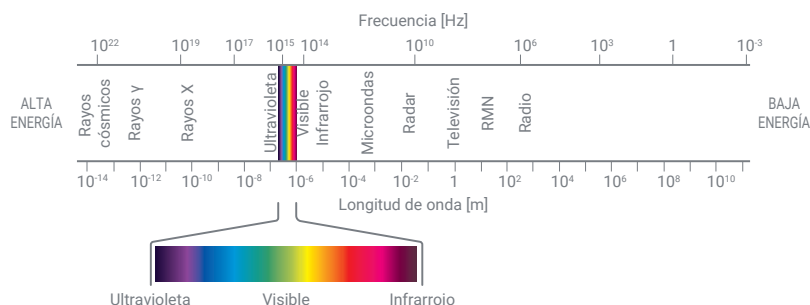


Figura 1. El espectro electromagnético con la región de la luz visible ampliada.

La energía asociada a la radiación electromagnética se define de la forma siguiente:

$$E = h\nu$$

donde E es la energía (en julios), h es la constante de Planck ($6,62 \times 10^{-34}$ Js) y ν es la frecuencia (en segundos).

La espectroscopia permite estudiar la manera en que la materia interactúa con la radiación electromagnética o la emite. Existen diferentes tipos de espectroscopia en función del rango de longitud de onda que se mide. La espectroscopia UV-vis utiliza las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético. Por su parte, la espectroscopia infrarroja emplea la región infrarroja de menor energía dentro del espectro.

1.2 Longitud de onda y frecuencia

La radiación electromagnética puede considerarse una combinación de campos eléctricos y magnéticos alternos que se desplaza por el espacio con un movimiento de onda. Dado que la radiación actúa como una onda, puede clasificarse en función de la longitud de onda o la frecuencia, que están relacionadas por la ecuación siguiente:

$$\nu = c/\lambda$$

donde ν es la frecuencia (en 1/segundo), c es la velocidad de la luz (3×10^8 ms $^{-1}$) y λ es la longitud de onda (en metros).

En la espectroscopia UV-vis, la longitud de onda se suele expresar en nanómetros (1 nm = 10^{-9} m). De las ecuaciones se desprende que la radiación con una longitud de onda más corta tiene mayor energía; en el caso de la

espectroscopia UV-vis, la luz UV con longitud de onda baja (corta) es la que tiene mayor energía. En ocasiones, esta energía puede bastar para provocar reacciones fotoquímicas indeseadas al medir muestras fotosensibles.

1.3 Espectros UV y visible

Cuando la radiación interactúa con la materia, pueden producirse varios procesos, incluidos los siguientes: reflexión, dispersión, absorción, fluorescencia/fosforescencia (absorción y posterior emisión) y reacciones fotoquímicas (absorción y rotura de enlaces). Por lo general, cuando se analizan muestras para determinar su espectro UV-visible, se mide la absorción.

Dado que la luz es una forma de energía, la absorción de luz por parte de la materia provoca un aumento del contenido energético de las moléculas (o átomos) de la materia. La energía potencial total de una molécula se representa como la suma de su energía vibracional y rotacional y de sus electrones:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{electrónica}} + E_{\text{vibracional}} + E_{\text{rotacional}}$$

La cantidad de energía que una molécula posee en cada estado no varía de forma continua, sino conforme a una serie de niveles o estados discretos. Las diferencias de energía entre los distintos estados siguen este orden:

$$E_{\text{electrónica}} > E_{\text{vibracional}} > E_{\text{rotacional}}$$

En algunas moléculas y átomos, los fotones incidentes de la luz UV y visible poseen suficiente energía como para provocar transiciones entre los diferentes niveles de energía de los electrones. La longitud de onda de la luz absorbida posee la energía necesaria para hacer que un electrón pase de un nivel de energía inferior a un nivel de energía superior. La Figura 2 muestra un ejemplo de transiciones electrónicas en el formaldehído y las longitudes de onda de la luz que las provocan.

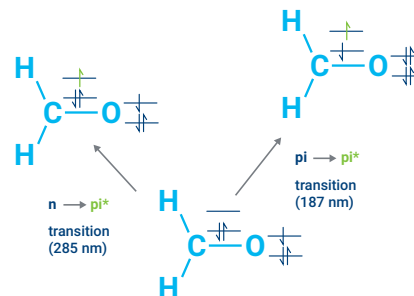


Figura 2. Transiciones electrónicas en el formaldehído. La luz UV a 187 nm provoca la excitación de un electrón en el enlace C-O, mientras que la luz a 285 nm de longitud de onda causa excitación y transferencia de un electrón del átomo de oxígeno al enlace C-O.

Estas transiciones dan como resultado bandas de absorción muy estrechas a longitudes de onda muy características de la diferencia en los niveles de energía de la especie absorbente. Esto también se cumple para los átomos, tal como se muestra en la Figura 3.

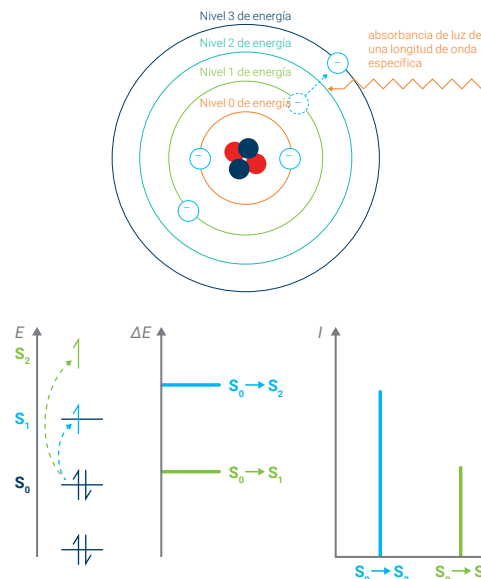


Figura 3. La luz incidente de una longitud de onda específica excita los electrones de un átomo. El tipo de átomo o ion (es decir, el elemento del que se trate) y los niveles de energía entre los que se mueve el electrón determinan la longitud de onda de la luz absorbida. Las transiciones pueden producirse entre varios niveles de energía, de tal forma que se requerirá más energía (es decir, longitudes de onda de luz más bajas) cuanto más haya que alejar el electrón del núcleo.

Para las moléculas, sin embargo, los niveles de energía vibracional y rotacional se superponen a los niveles de energía de los electrones. Dado que pueden producirse numerosas transiciones con diferentes energías, las bandas se ensanchan (consulte la Figura 4). El ensanchamiento es aún mayor en disolución, debido a las interacciones soluto-disolvente.

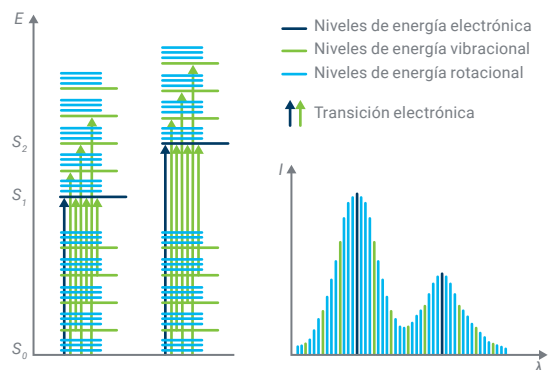


Figura 4. Transiciones electrónicas y espectros UV y visible en moléculas (I es la intensidad y λ es la longitud de onda).

1.4 Transmitancia y absorbancia

Cuando la luz atraviesa una muestra o esta la refleja, la cantidad de luz absorbida es la diferencia entre la radiación incidente (I_0) y la radiación transmitida (I). La cantidad de luz absorbida se expresa en términos de absorbancia. La transmitancia (es decir, la luz que atraviesa la muestra) se suele indicar en forma de fracción de 1 o como porcentaje, tal como se indica a continuación:

$$T = I/I_0; \text{ o } \% T = I/I_0 \times 100$$

La absorbancia se define de la forma siguiente:

$$A = -\log T$$

Se usan valores de absorbancia en la mayoría de las aplicaciones, ya que la relación entre la absorbancia y la concentración y la longitud del camino normalmente es lineal (conforme a la ley de Beer-Lambert, explicada en la sección 1.9).

1.5 Resumen

- La luz UV y visible forma parte del espectro electromagnético.
- En la espectroscopia UV-vis, la longitud de onda se expresa en nanómetros (nm).
- La materia puede reflejar, dispersar, transmitir o absorber la luz y esta, a su vez, puede causar reacciones fotoquímicas.
- La energía de la luz incidente provoca transiciones electrónicas hacia otros niveles de energía diferentes. Las transiciones electrónicas también se producen entre los niveles de energía vibracional y rotacional de las moléculas.
- La absorbancia de luz se utiliza en la mayoría de las aplicaciones de espectroscopia UV-vis. Se define mediante la expresión siguiente:
 $A = -\log T$, donde T es la transmitancia.

2. ¿Cómo funciona un espectrofotómetro UV-vis moderno?

Un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-vis) utiliza una fuente de luz para iluminar una muestra con luz en todo el rango de longitud de onda del espectro UV y visible (habitualmente, entre 190 y 900 nm). Después, el instrumento mide la luz que absorbe, transmite o refleja la muestra en cada longitud de onda. Algunos espectrofotómetros tienen un rango ampliado de longitud de onda y alcanzan el infrarrojo cercano (NIR) (entre 800 y 3.200 nm).

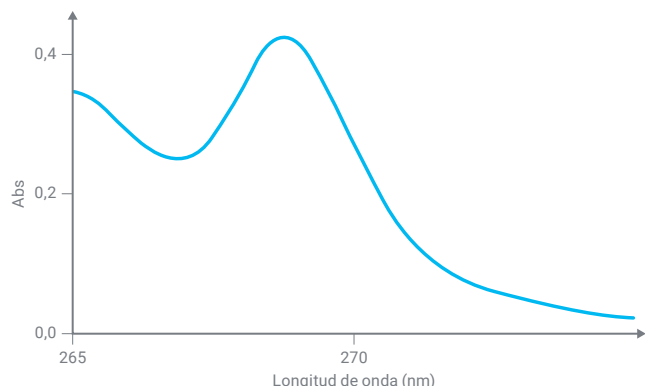


Figura 5. Un espectro de absorción UV que muestra un máximo de unidades de absorbancia de aproximadamente 269 nm.

A partir del espectro obtenido, como el que se muestra en la Figura 5, resulta posible determinar las propiedades químicas o físicas de la muestra. Por lo general, esto permite lo siguiente:

- Identificar las moléculas de una muestra sólida o líquida.
- Determinar la concentración de una molécula específica en disolución.
- Caracterizar la absorbancia o transmitancia de un líquido o sólido en un rango de longitudes de onda.
- Caracterizar las propiedades de reflectancia de una superficie o medir el color de un material.
- Estudiar reacciones químicas o procesos biológicos.

La combinación de diferentes accesorios y soportes de muestras con el espectrofotómetro UV-vis permite realizar diversos tipos de mediciones. Existen diferentes accesorios para distintas capacidades de medición y tipos de muestras (p. ej., sólidos o líquidos) y diferentes condiciones de medición (consulte la Figura 6 y la Figura 7).



Figura 6. Se puede montar una sonda de fibra óptica como accesorio en un espectrofotómetro UV-vis para medir muestras líquidas en diversos recipientes.

La espectrofotometría UV-vis es una técnica versátil y se ha empleado desde hace casi un siglo en una amplia variedad de campos. Los espectrofotómetros UV-vis son instrumentos de uso habitual en la investigación y el análisis de materiales, en las industrias química y petroquímica, y en los laboratorios farmacéuticos y de biotecnología.

Figura 7. Una muestra sólida, como esta célula solar fotovoltaica policristalina, puede medirse con un espectrofotómetro UV-vis.



2.1 Diseño de instrumentos

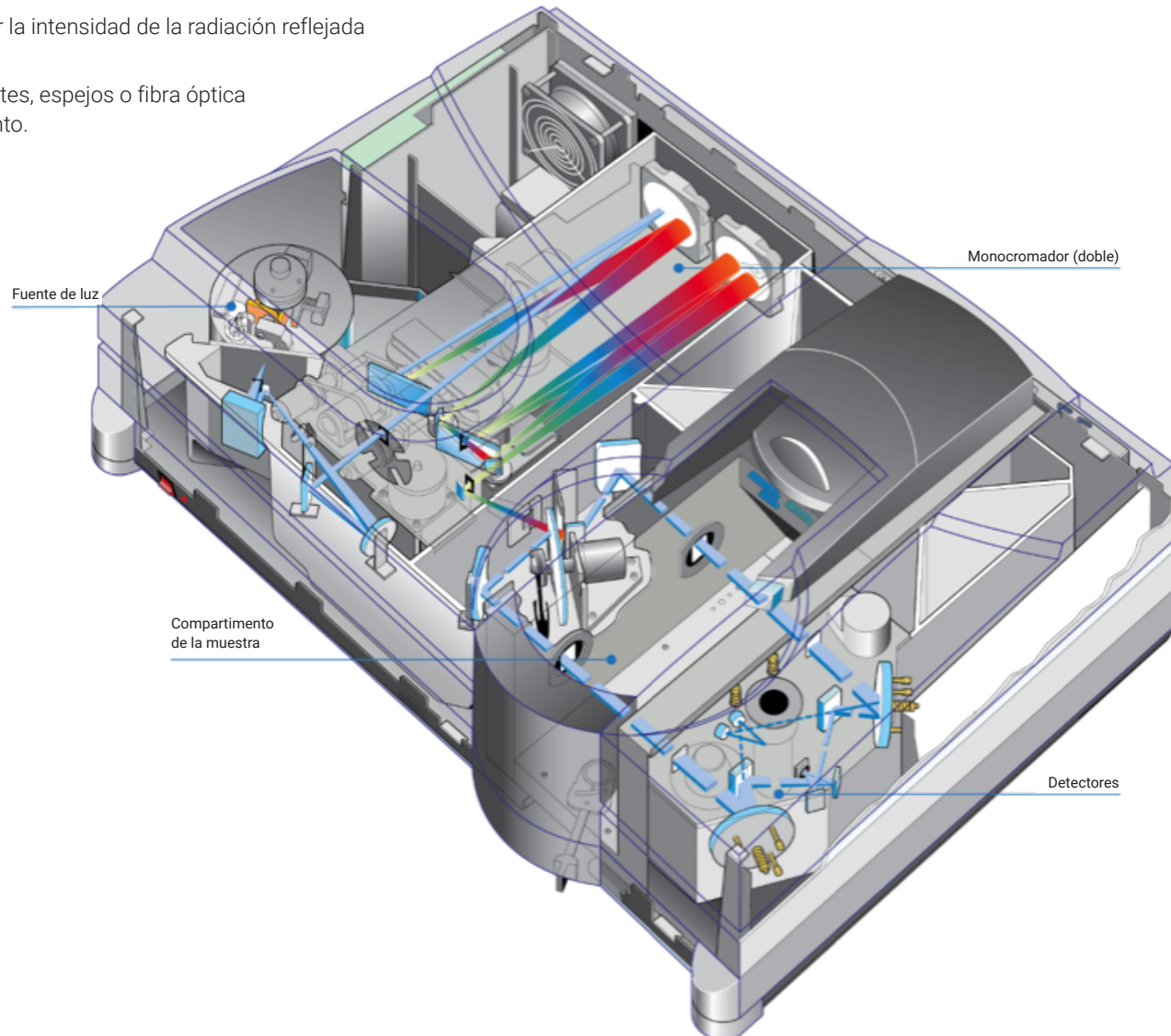
Componentes

Los componentes principales de un espectrofotómetro son los siguientes:

- Una fuente de luz que genera una banda ancha de radiación electromagnética en el espectro UV-visible.
- Un dispositivo de dispersión que separa la banda ancha de radiación en longitudes de onda.
- Un compartimento para la muestra, donde la luz atraviesa la muestra o esta refleja la luz.
- Uno o varios detectores para medir la intensidad de la radiación reflejada o transmitida.

Otros componentes ópticos, como lentes, espejos o fibra óptica para guiar la luz a través del instrumento.

Figura 8. Diagrama de la distribución interna de un espectrofotómetro UV-vis-NIR Agilent Cary 5000 en el que se muestran los componentes principales. Téngase en cuenta que es un instrumento de alto rendimiento. Los espectrofotómetros UV-vis para mediciones rutinarias tienen un diseño óptimo más sencillo.



Fuentes de luz

La fuente de luz ideal generaría una intensidad constante en todas las longitudes de onda con un ruido bajo y una salida estable a largo plazo. Desafortunadamente, dicha fuente no existe. Tradicionalmente, se han utilizado dos fuentes de luz diferentes en los espectrofotómetros UV-visibles:

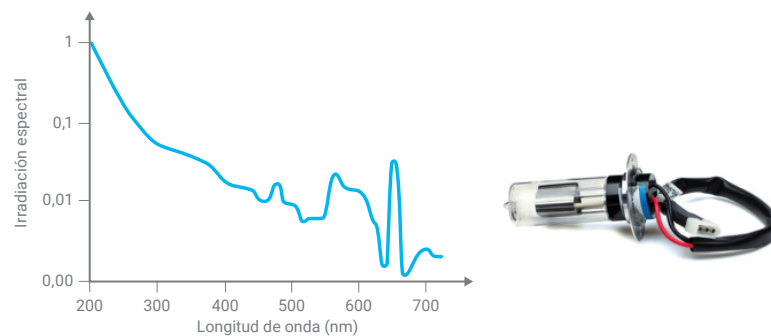
- La lámpara de arco de deuterio, que ofrecía una continuidad adecuada de la intensidad en la región UV y una intensidad útil en la región visible.
- La lámpara halógena de wolframio, que proporcionaba una intensidad adecuada en todo el rango visible y en parte del espectro UV.

En los últimos tiempos, se ha extendido el uso de una única lámpara de destellos de xenón. El uso de una lámpara de destellos de xenón como fuente única ofrece ventajas considerables frente al uso de las dos lámparas convencionales.

Lámpara de arco de deuterio (D_2)

La lámpara de arco de deuterio utiliza una descarga de arco de deuterio y consigue una continuidad adecuada de la intensidad en la región UV y una intensidad útil en la región visible, entre 185 y 400 nm (consulte la Figura 9). Aunque en las lámparas modernas de arco de deuterio la señal de ruido es baja, el ruido de la lámpara es a menudo el factor limitante del rendimiento general del instrumento en cuestión de ruido. Con el paso del tiempo, la intensidad de la luz de una lámpara de arco de deuterio disminuye progresivamente. Estas lámparas suelen tener una vida media (el tiempo transcurrido hasta que la intensidad disminuye hasta la mitad de su valor inicial) de unas 1.000 horas. Esta vida media corta hace que las lámparas de D_2 deban sustituirse con relativa frecuencia.

Figura 9. Espectro de intensidad de la lámpara de arco de deuterio.



Lámpara halógena de wolframio

La lámpara halógena de wolframio incorpora un filamento. Cuando una corriente atraviesa el filamento, este se calienta y emite luz (consulte la Figura 10). La lámpara genera una intensidad adecuada en parte del espectro UV y en todo el rango visible y NIR (entre 350 y 3.000 nm). Este tipo de lámpara genera muy poco ruido y poca deriva, y suele tener una vida útil de 10.000 horas.

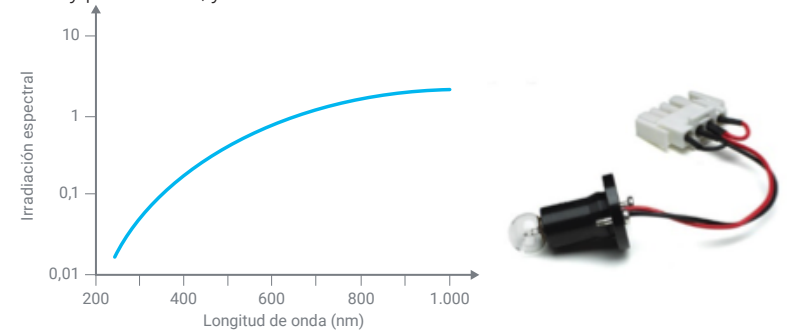


Figura 10. Espectro de intensidad de la lámpara halógena de wolframio.

En los espectrofotómetros UV-vis que emplean una lámpara de D_2 y una lámpara halógena de wolframio, se utiliza un selector de fuente para cambiar de lámpara según proceda, o bien la luz de ambas fuentes se combina para generar una única fuente de banda ancha.

Lámpara de destellos de xenón

A diferencia de las lámparas de D_2 o las lámparas halógenas de wolframio, que son fuentes de luz constantes, una lámpara de destellos de xenón emite luz en forma de destellos durante períodos de tiempo extremadamente cortos. La emisión se produce durante un tiempo muy breve y exclusivamente durante la medición de las muestras, por lo que tiene una vida útil extensa. La muestra únicamente se irradia con luz en el momento de la medición. Este tiempo corto de iluminación hace que la lámpara de destellos de xenón sea apta para medir muestras que puedan ser sensibles al fotoblanqueo. El fotoblanqueo puede producirse en muestras sensibles, debido a una exposición constante y prolongada a una fuente de luz continua. La lámpara de destellos de xenón emite luz de alta intensidad entre 185 y 2.500 nm, lo que hace que no se requiera una fuente de luz secundaria (consulte la Figura 11). La lámpara de destellos de xenón puede utilizarse durante muchos años antes de que deba sustituirse, lo que la convierte en una opción muy popular en comparación con los sistemas que usan lámparas de D_2 o lámparas halógenas de wolframio. Una ventaja adicional es que no requiere tiempo de calentamiento, a diferencia de las lámparas de D_2 o las lámparas halógenas de wolframio.

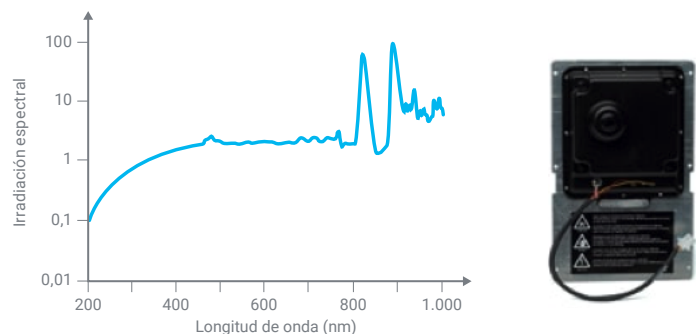


Figura 11. Espectro de intensidad de la lámpara de xenón.

El monocromador

Todas las fuentes de luz generan luz blanca de amplio espectro. Para acotar la luz a una banda de longitud de onda determinada, se pasa a través de un monocromador. Un monocromador consta de los elementos siguientes:

- una rendija de entrada;
- un dispositivo de dispersión para dispersar la luz en diferentes longitudes de onda (como un arco iris) y permitir la selección de una banda de longitudes de onda determinada; y
- una rendija de salida a través de la cual las longitudes de onda seleccionadas pasan y llegan a la muestra.

Una forma sencilla de explicar qué es un monocromador es pensar en una habitación en la que el sol entra a través de una ventana. La luz del sol incide en un prisma que separa la luz blanca y la transforma en un arco iris. Después, el arco iris llega a una ventana situada en el lado opuesto de la habitación. A medida que se gira el prisma, la luz de diferentes colores (es decir, de distintas longitudes de onda) atraviesa la habitación y sale por la ventana.

Idealmente, el producto de un monocromador es luz de una sola longitud de onda. Sin embargo, en la práctica el producto siempre es una banda de longitudes de onda.

La mayoría de los espectrofotómetros que hay actualmente en el mercado incorporan lentes de difracción holográfica como dispositivo de dispersión. Estos componentes ópticos están hechos de vidrio en cuya superficie se graban surcos extremadamente estrechos de forma precisa. Las dimensiones de los surcos son del mismo orden que la longitud de onda de la luz que se dispersará. Por último, se aplica un recubrimiento de aluminio para conseguir una superficie reflectante.

La interferencia y la difracción de la luz que llega a la lente de difracción se reflejan en ángulos diferentes, según sea la longitud de onda. Las lentes de difracción holográfica producen una dispersión angular lineal para la longitud de onda y no son sensibles a la temperatura. No obstante, reflejan la luz en diferentes órdenes que se superponen (consulte la Figura 12). Debido a ello, es necesario utilizar filtros para garantizar que únicamente la luz con el orden de reflexión deseado llegue al detector. Una lente de difracción cóncava dispersa y concentra la luz a la vez.

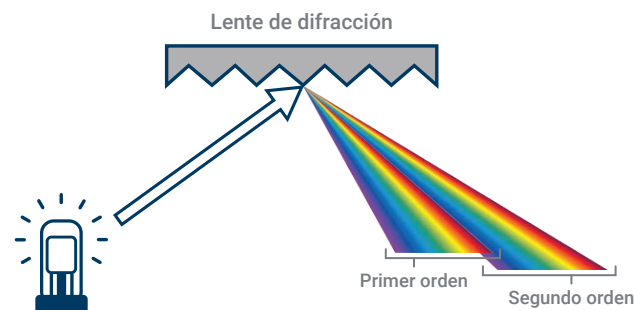


Figura 12. Dispersión de luz blanca en luz de diferentes longitudes de onda mediante una lente de difracción holográfica.

Espectrofotómetros con monocromador simple

Los espectrofotómetros con monocromador simple se utilizan para la espectroscopia general y pueden integrarse en un sistema óptico compacto. La Figura 13 muestra el diagrama de un sistema óptico con monocromador simple. Un espectrofotómetro con monocromador simple no puede seleccionar las longitudes de onda de la luz de forma tan estrecha como un sistema con monocromador doble, pero es posible que esta capacidad no resulte necesaria en muchas aplicaciones; por ejemplo, para medir muestras con picos anchos de absorción.

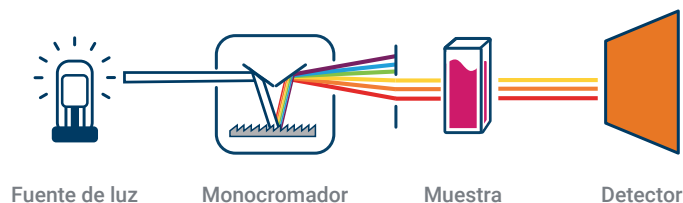


Figura 13. Espectrofotómetro con monocromador simple.



Espectrofotómetros con monocromador doble

El monocromador doble es típico de los instrumentos de alto rendimiento. Los dos monocromadores están dispuestos en serie. El primer monocromador divide la luz de la fuente y, a continuación, el segundo monocromador la divide de nuevo. Esto reduce la luz difusa (las filtraciones de luz en el sistema) e incrementa la precisión espectral (la capacidad de seleccionar de forma precisa una longitud de onda determinada). La Figura 14 muestra el diagrama de un sistema óptico con monocromador doble.

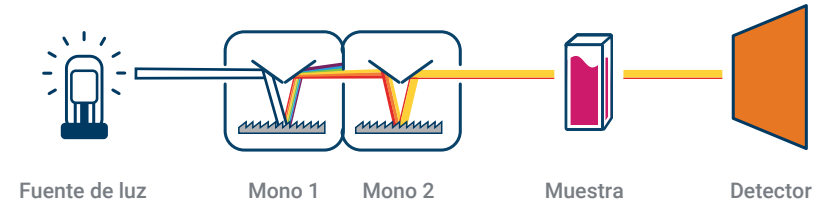


Figura 14. Diagrama de un espectrofotómetro con monocromador doble.

Compartimento de la muestra

En el compartimento de la muestra, esta se sitúa de tal forma que permita que el haz del monocromador la atraviese. Para las mediciones de absorbancia, las muestras líquidas se suelen depositar en una cubeta con una longitud conocida y fija del camino óptico. Una cubeta es un recipiente rectangular para líquidos como el que se muestra en la Figura 15. Está hecha de vidrio, cuarzo, plástico u otro material que transmita la luz UV o visible. Las cubetas estándar tienen una longitud del camino óptico de 10 mm y se fabrican con cuarzo para garantizar una buena transmitancia de las longitudes de onda UV. También pueden utilizarse cubetas de plástico, más económicas; sin embargo, por lo general no transmiten la luz UV y solo resultan útiles si se requiere hacer mediciones en la región de las longitudes de onda visibles. Hay un gran número de cubetas disponibles para aplicaciones especiales: desde cubetas para volúmenes pequeños de líquido hasta otras con longitudes del camino óptico mucho mayores para muestras muy diluidas.



Figura 15. Cubetas para medir muestras líquidas. De izquierda a derecha: Una cubeta estándar de 3 ml con una longitud del camino óptico de 10 mm; una celda ultramicro para medir volúmenes muy bajos y una cubeta con trayecto óptico largo para soluciones diluidas.

Existe la posibilidad de colocar muestras sólidas para hacer mediciones de transmisión sencillas. También se pueden realizar mediciones con diversos ángulos de incidencia. Para mediciones más complejas (por ejemplo, de reflectancia difusa o transmisión), pueden instalarse otros accesorios en el compartimento de la muestra.

Espectrofotómetro de haz simple

El espectrofotómetro UV-vis más sencillo tiene un sistema óptico de haz simple. En un sistema de haz simple, la luz del monocromador atraviesa la muestra y llega al detector. Este diseño sencillo permite usar menos componentes ópticos y reducir el tamaño del instrumento y, por consiguiente, su coste.

Sin embargo, antes de medir una muestra hay que calcular la línea base o analizar una muestra en blanco. Para las mediciones de líquidos, se hace una lectura de la línea base para determinar la absorbancia de la cubeta y el disolvente utilizados. En un sistema de haz simple, la línea base y la muestra deben medirse por separado. Esas lecturas por separado hacen que, si se produce alguna variación de la intensidad de la luz o del rendimiento del sistema óptico entre la línea base y la muestra que se analiza, la medición pueda ser menos precisa. Esta inexactitud es un problema para las mediciones de muestras que requieran mucho tiempo, o bien en las que el blanco pueda variar con el tiempo. En la práctica, esto hace que deban llevarse a cabo mediciones frecuentes y periódicas de la línea base o el blanco durante una sesión de análisis si se usa un sistema de haz simple.

Espectrofotómetro de doble haz

Muchos sistemas UV-vis utilizan un sistema óptico de doble haz. En los sistemas de doble haz, la luz que emite el monocromador se divide en dos haces: un haz de referencia y un haz de muestra. Para dividir la luz se suele usar un componente óptico, como una rueda giratoria con un segmento con espejos, o bien un espejo semiplatedado conocido como divisor de haz. Cada haz entra en la cámara de la muestra a través de pasos de luz independientes. Dado que hay disponibles dos haces con la misma longitud de onda, la referencia o el blanco y la muestra se pueden medir a la vez. Esto significa que la medida de la muestra se puede corregir en tiempo real conforme a las fluctuaciones del instrumento. Esta corrección en tiempo real facilita una medida muy precisa.

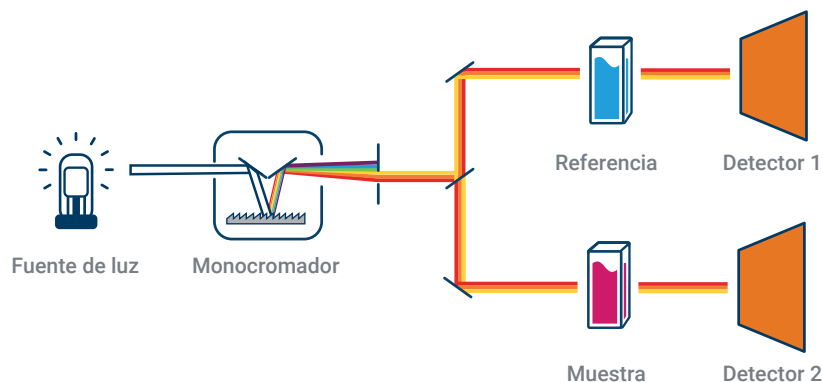


Figura 16. Diagrama de un sistema óptico de doble haz con dos detectores.

Espectrofotómetro de haz dual

Otro diseño de espectrofotómetro más reciente utiliza una configuración óptica de haz dual con un detector para la muestra y otro de referencia. El detector de referencia se utiliza para corregir las fluctuaciones de brillo de la lámpara para cada medición, mientras que el disolvente o blanco (en el caso de las muestras sólidas) se mide en la posición de la muestra y, a continuación, se sustrae del espectro de la muestra después de la adquisición de datos. Gracias a las mejoras del sistema electrónico y el software, este diseño hace que el proceso de medición resulte sencillo y reduce el riesgo de errores del usuario asociados al emparejamiento incorrecto de cubetas o a la colocación incorrecta de la muestra. El diseño de haz dual ofrece el mismo rendimiento que un instrumento de doble haz para análisis rutinarios, mientras que el diseño de doble haz se reserva en la actualidad a los instrumentos de uso investigativo.

Compartimento de la muestra

El compartimento de la muestra de un espectrofotómetro UV-vis suele ser una caja negra con una tapa. El interior del compartimento es de color negro mate, lo que ayuda a absorber la luz difusa que pueda entrar en el compartimento.

En el compartimento de la muestra, esta se sitúa de tal forma que permita que el haz del monocromador la atraviese. Tal como se mencionó anteriormente, para las muestras líquidas se utilizan cubetas de vidrio, plástico o cuarzo (consulte la Figura 15). Las muestras sólidas se mantienen en su sitio gracias a un soporte fijado al fondo del compartimento de la muestra. La luz también se puede extraer del compartimento de la muestra mediante la fibra óptica. La fibra óptica resulta útil a la hora de medir muestras muy grandes, calientes, frías, radioactivas o peligrosas por otros motivos. Tal como se muestra en la Figura 6, se puede extraer la luz del espectrofotómetro mediante una sonda de fibra óptica para medir soluciones fuera del compartimento de la muestra. Otra opción es usar un dispositivo de fibra óptica que permita medir la reflectancia, la fluorescencia o la transmisión luminosa de una muestra sólida.

El detector

Un detector convierte la luz de la muestra en una señal eléctrica. Al igual que la fuente de luz, debe generar una respuesta lineal en un amplio rango de longitud de onda con ruido bajo y alta sensibilidad. Los espectrofotómetros suelen contener un detector de tubo fotomultiplicador o un detector de fotodiodo. Hay sistemas de alto rendimiento que incorporan otros detectores especializados para mejorar la cobertura de longitudes de onda o la sensibilidad.

Cada detector tiene una sensibilidad y un rango de longitud de onda diferentes. En el caso de los sistemas con varios detectores, el sistema seleccionará el detector correspondiente según el rango de longitud de onda necesario para la medición.

Tubo fotomultiplicador (PMT)

El tubo fotomultiplicador (consulte la Figura 17) combina la conversión de señales con varias etapas de amplificación dentro del cuerpo del tubo. La naturaleza del material del cátodo determina la sensibilidad espectral. Un PMT individual ofrece una sensibilidad adecuada en todo el rango UV-visible entre 200 y 900 nm. Un detector PMT ofrece una alta sensibilidad con bajos niveles de luz. En las muestras diluidas, la mayor parte de la luz que incide en la muestra la atravesará y llegará al detector. Para poder detectar de forma precisa pequeñas diferencias entre las medidas del blanco y la muestra, la señal del detector debe tener un bajo nivel de ruido con estos niveles elevados de intensidad.

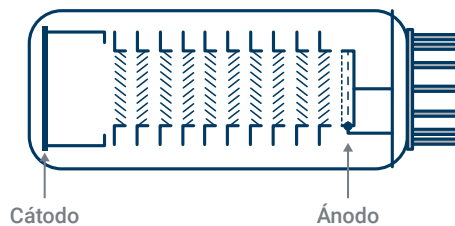
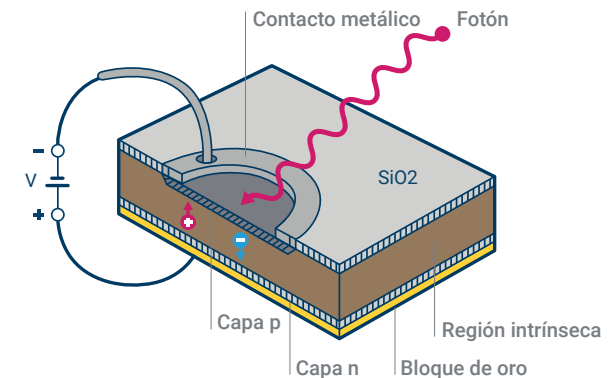


Figura 17. Un detector de tubo fotomultiplicador.

Diodo de silicio (Si)

El uso de detectores de fotodiodo de silicio (consulte la Figura 18) es habitual en los espectrofotómetros modernos. Los detectores de fotodiodo ofrecen un rango dinámico más amplio y son más robustos que los detectores PMT. En un fotodiodo, la luz que llega al material semiconductor permite a los electrones fluir a través de él, descargando un condensador conectado a lo largo del material. La cantidad de carga necesaria para recargar el condensador a intervalos periódicos es proporcional a la intensidad de la luz. Los límites de detección de los detectores con base de silicio son aproximadamente de 170 a 1.100 nm.

Figura 18. Un detector de fotodiodo de silicio.



Fotodiodo de arseniuro de indio y galio (InGaAs)

El detector InGaAs es un detector especializado que ofrece un rendimiento excelente en el rango de longitud de onda visible y NIR. Hay disponibles detectores InGaAs de banda estrecha (de 800 a 1.700 nm) y de banda ancha (de 800 a 2.500 nm). Estos detectores son útiles, debido a su respuesta lineal y su sensibilidad en la región del infrarrojo cercano.

Detector de sulfuro de plomo (PbS)

El detector NIR más común en los espectrofotómetros es el detector PbS. Este detector ofrece sensibilidad entre 1.000 y 3.500 nm. En espectrofotómetros de alto rendimiento con un amplio rango de longitud de onda, el detector PbS se suele combinar con un detector PMT para abarcar el rango UV-visible. Cuando se requiere una alta sensibilidad para las frecuencias NIR bajas, el detector PbS se puede combinar con un detector InGaAs de banda estrecha.

3. Selección de los parámetros óptimos para las mediciones con espectrofotometría UV-vis

La selección de un soporte de muestras, un disolvente y unos parámetros del instrumento idóneos es crucial para realizar las mediciones correctamente.

3.1 Selección de la celda óptica

Las muestras líquidas suelen depositarse en una cubeta, que es otro nombre para una celda óptica (o, simplemente, "celda"). Existen cubetas con diversos diseños en función de la aplicación. Entre estas se incluyen los siguientes:

- Una celda óptica estándar con una longitud del camino óptico de 10 mm (consulte la Figura 15).

La celda tiene una capacidad de unos 3,5 ml y presenta dos ventanas ópticas paralelas entre sí. Por lo general, las otras caras están esmeriladas o ranuradas para indicar que dichas caras deben utilizarse para manipular la celda. Las ventanas ópticas deben mantenerse tan limpias como sea posible y nunca hay que tocarlas. Asimismo, debe evitarse que las superficies ópticas sufran arañazos cuando no se use la celda. También hay disponibles celdas desechables de uso limitado. Se fabrican con poliestireno o polimetacrilato de metilo (PMMA) y no pueden utilizarse a altas temperaturas. El poliestireno no transmite la luz UV, lo que únicamente permite realizar mediciones entre 340 y 800 nm. Las celdas de PMMA permiten hacer mediciones hasta 300 nm.

- Para volúmenes pequeños, de hasta unos 0,5 ml, puede usarse una celda semimicro. Tiene unas dimensiones exteriores similares a las de una celda estándar, pero presenta un canal estrecho en el interior para reducir el volumen necesario de muestra. Además, hay disponibles celdas ultramicro con capacidades tan bajas como 0,5 μ l. El enmascaramiento negro que hay alrededor de la ventana óptica (como se muestra en la Figura 19 y la Figura 20) evita la reflexión interna en la cubeta. Hay que tener cuidado para garantizar que las celdas queden alineadas con la altura óptica del haz del instrumento UV-vis. Esto se conoce como altura z. La altura z es la distancia entre la base de la cubeta y el centro de la longitud del paso de luz.

Las celdas semimicro o ultramicro resultan útiles cuando el volumen de muestra es limitado.

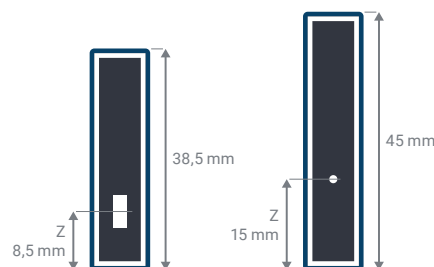


Figura 19. El "enmascaramiento" de las cubetas garantiza que el haz óptico atraviese la muestra. Es esencial garantizar que la altura z de la cubeta sea compatible con el diseño del espectrofotómetro UV-vis.



Figura 20. Celda semimicro de 1,4 ml de volumen con una longitud del camino óptico de 10 mm.

Para medir varias muestras líquidas se puede usar una celda de flujo continuo. Las celdas de flujo continuo también están disponibles con diversos volúmenes internos y longitudes del camino óptico. Las celdas suelen estar conectadas a una bomba peristáltica y también pueden conectarse a un muestreador automático. La bomba impulsa la muestra a través del tubo conectado a ella y llena la celda para realizar la medición. A continuación, se hace pasar una solución de lavado para limpiar la celda antes de bombear la siguiente muestra hasta ella.



Figura 21. Celda de flujo con aberturas rectangulares de 4 x 11 mm y una longitud del camino óptico de 10 mm. En la imagen aparecen los conectores y el tubo.

La mayoría de las celdas ópticas incluyen un tapón o una tapa. La tapa está diseñada para reducir los derrames accidentales y la evaporación de la muestra. Se recomienda encarecidamente usar una tapa cuando haya que medir muestras volátiles o peligrosas.

Longitud del camino óptico de la celda

La longitud del camino óptico es la distancia que la luz incidente recorre a través de la muestra. Hay disponibles cubetas con diferentes longitudes del camino óptico. La longitud del camino óptico que se debe usar depende de la absorbancia de la muestra:

- Las muestras concentradas con una alta absorbancia (> 3 Abs) requieren una cubeta con un camino óptico corto (longitud igual o inferior a 5 mm); otra opción sería diluirlas. También pueden utilizarse cubetas con un camino óptico corto para compensar el efecto de los disolventes que tengan una alta absorbancia.
- Las muestras diluidas con una absorbancia baja ($< 0,2$ Abs) requieren una celda con un camino óptico largo (longitud de hasta 100 mm), lo que incrementará la lectura de absorbancia. Esto también puede ayudar a reducir el nivel de error.

La mayoría de los espectrofotómetros UV-vis incluyen un soporte de cubeta apto para una cubeta estándar con una longitud del camino óptico de 10 mm. Las cubetas cuya longitud del camino óptico sea mayor requerirán un soporte adecuado para dichas celdas.

Hay disponibles celdas con un camino óptico más corto y con las mismas dimensiones que la cubeta estándar con una longitud del camino óptico de 10 mm. Son compatibles con el soporte para celdas estándar incluido con el instrumento. Asimismo, también hay disponibles separadores de celdas para acoplar cubetas cuya longitud del camino óptico sea más corta al soporte de cubeta estándar.

Material

Deben tenerse en cuenta las propiedades ópticas del material de las ventanas de la cubeta. Para obtener el rango más amplio de longitud de onda posible, el material recomendado es el cuarzo. Dado que el vidrio de cuarzo es más caro, se puede usar vidrio óptico o plástico (poliestireno) cuando no sea necesario medir por debajo de 340 nm (poliestireno) o 350 nm (vidrio óptico). Las celdas de poliestireno no son adecuadas para su uso a altas temperaturas. También hay que tener cuidado al usar celdas de poliestireno para garantizar que las muestras y los disolventes no las dañen. A las celdas de poliestireno también se las denomina celdas desechables o de plástico. Sufren arañazos con facilidad y están diseñadas para un solo uso. En la Tabla 1 se indica la capacidad de transmisión de los materiales habituales en el rango de longitud de onda UV o NIR.

Tabla 1. Ventanas de transparencia de los materiales habituales de las cubetas.

Material	Rango adecuado de longitud de onda (nm)
Cuarzo	170-2.700
Cuarzo Infrasil (NIR)	220-3.800
Vidrio óptico	334-2.500
Poliestireno (cubetas desechables)	340-800



Figura 22. Transparencia de los materiales habituales de las celdas ópticas.

Emparejamiento de cubetas

Algunas cubetas se comercializan emparejadas y se emplean para la mayoría de los análisis de rutina con sistemas UV-vis y UV-vis-NIR. El emparejamiento garantiza que ambas cubetas ofrezcan unas lecturas similares de absorbancia o transmisión cuando estén vacías o llenas de agua. El código de emparejamiento es similar a un número de lote. Indica las características de transmisión del lote (material fundido) de materia prima a partir del cual se fabricaron las cubetas.

Para emparejar un par de cubetas, estas deben cumplir la tolerancia aceptable de transmisión a una determinada longitud de onda. Por ejemplo, ambas deben transmitir con una diferencia del 1,5 % respecto a la otra a 200 nm. Los fabricantes de cubetas especifican las tolerancias de transmisión para el emparejamiento a las longitudes de onda medidas para los materiales que suministran.

Los códigos de emparejamiento solo tienen un valor real cuando se comparan celdas nuevas. Las características de transmisión cambian durante el uso, debido a la contaminación de las superficies o el desgaste provocado por los procesos de limpieza o la manipulación incorrecta. Por lo tanto, una celda nueva no podrá emparejarse siempre con una celda usada más antigua que tenga el mismo código de emparejamiento.

Las técnicas modernas de producción y fusión han mejorado la planitud, el paralelismo y las tolerancias de fabricación. Esto, unido a la mayor atención prestada a la garantía de calidad de las materias primas, ha dado lugar a la eliminación casi absoluta de la necesidad de emparejar la transmisión en las celdas estándar de cuarzo de alta calidad.

Limpieza

Los residuos grasos de las huellas dactilares producen una absorción importante en la región UV. La presencia de huellas dactilares en las superficies ópticas puede provocar resultados erróneos. Se deben limpiar todas las huellas dactilares y los contaminantes con un paño suave y limpio antes de usar una celda. Es necesario asegurarse de que el trapo esté libre de detergentes y lubricantes. Los pañuelos de papel para gafas y otros usos contienen a menudo detergentes o lubricantes que pueden afectar a las medidas.

No se debe utilizar un limpiador ultrasónico para limpiar las cubetas de vidrio o cuarzo. Cada baño ultrasónico genera ondas ultrasónicas con una frecuencia diferente y, si el baño funciona a una frecuencia de resonancia de la celda, esta se romperá.

Deben evitarse los ácidos fluorados, como el ácido fluorhídrico (HF), en cualquier concentración, ya que atacarán el cuarzo y el vidrio. Las soluciones básicas fuertes (con un pH igual o superior a 9,0) también degradarán la superficie de las ventanas y acortarán la vida útil de la cubeta.

Después de medir un blanco, no se deben limpiar las ventanas ópticas de la celda. Si es necesario limpiarlas, hay que volver a medir el blanco antes de continuar con el análisis.

Consejos adicionales sobre manipulación de cubetas

Hay algunas acciones sencillas que se pueden llevar a cabo para alargar la vida útil de las cubetas:

- Considerar retirar las muestras de las cubetas justo después de usarlas. Esto evitará que la muestra se seque y se adhiera a la cubeta. Extremar precauciones con las proteínas y los tintes fuertes, ya que se ha comprobado que se adhieren a las superficies interiores de la cubeta. Retirar estas muestras de la celda justo después del análisis y lavar bien la celda con el disolvente entre cada muestra.
- Si es necesario medir una misma muestra durante un período largo de tiempo, esta debe mantenerse tapada y a una temperatura adecuada para minimizar la evaporación. Algunas muestras pueden requerir agitación continua.
- Limpiar bien todas las cubetas al final de cada jornada y:
 - guardarlas en un recipiente adecuado después de secarlas; o,
 - guardarlas en una solución ácida diluida (ácido nítrico o clorhídrico al 1 %) en un vaso de precipitados resistente a los ácidos. Guardar solo una cubeta en cada vaso de precipitados para evitar que la cubeta se astille. Lavar siempre con abundante agua justo antes de volver a usarla.



Medida de pantallas de teléfono móvil

Los diseñadores de las pantallas que se usan en los teléfonos móviles, las tabletas, los ordenadores portátiles y los televisores se esfuerzan por conseguir que sean tan finas como resulte posible. Disminuir el grosor solo unas decenas de micras puede marcar importantes diferencias a la hora de reducir el tamaño total de un dispositivo. Estas pantallas utilizan diodos emisores de luz (LED) y pantallas de cristal líquido (LCD) para controlar los colores que aparecen en ellas, así como un retrorreflector de luz que aporta la iluminación. Los retrorreflectores de luz suelen fabricarse con un material polimérico transparente con una película reflectora aplicada en una de las caras. Tienen el aspecto de una lámina de espejo de plástico. La medida de la reflectancia y la transmisión del retrorreflector de luz es un aspecto esencial del desarrollo de nuevos diseños. También es un parámetro de control de calidad importante durante la fabricación. La reflectancia y la transmisión de un retrorreflector de luz se miden con un espectrofotómetro UV-vis. El retrorreflector de luz se coloca en posición vertical en el compartimento de la muestra y se gira respecto a su eje central, lo que permite medir la reflectancia y la transmisión con diferentes ángulos de incidencia.

[Aquí se pueden encontrar los detalles de las mediciones](#)

3.2 Termostatación de las muestras

Muchas muestras pueden analizarse a temperatura ambiente, pero hay determinadas circunstancias en las que las muestras deben calentarse o enfriarse. Entre estas se incluyen las siguientes:

- Enfriamiento de muestras volátiles para reducir la evaporación.
- Calentamiento de muestras viscosas para mejorar la manipulación u homogeneidad de las muestras.
- Muestras sensibles a cambios químicos provocados por el calentamiento.
- Observación de cambios en las muestras durante su calentamiento o enfriamiento.

Los espectrofotómetros UV-vis permiten instalar accesorios para controlar la temperatura de las muestras. Los sistemas de control de la temperatura más sencillos son adecuados para mediciones a temperaturas fijas. Por lo general, estos sistemas utilizan un circulador de agua termostataado para hacer pasar agua caliente a través de un colector sujeto a la cubeta de muestra. Para obtener un control más preciso de la temperatura, se integra un calentador/enfriador Peltier en el colector de muestras. Los dispositivos Peltier mejoran el control de la temperatura y permiten llevar a cabo mediciones con gradientes de temperatura. Un sistema Peltier refrigerado por aire requiere menos mantenimiento que un sistema Peltier refrigerado por agua o un sistema de circulación de agua. Los sistemas de circulación de agua requieren mantenimiento periódico, incluida la revisión de las mangueras de agua en busca de fugas y la reposición de la solución refrigerante. Otra ventaja del sistema Peltier es su funcionamiento silencioso, ya que no requiere bombeo de solución refrigerante.

Si se usa cualquiera de estas opciones de control de la temperatura, el sistema debe permitir la monitorización de la temperatura. Como mínimo, el sistema debe indicarle la temperatura del colector de muestras. Esto es especialmente importante en el caso de los sistemas externos calentados con agua. Pueden producirse pérdidas de calor entre el circulador y el colector de muestras, debido a la temperatura ajustada para el baño de agua. Para los sistemas con control Peltier, la temperatura del colector de muestras se monitoriza con retroalimentación para mantener estable la temperatura.

Cuando el control de la temperatura resulte crucial, tomar medidas directamente de la muestra ofrecerá lecturas más precisas. Para ello, se insertan pequeñas sondas de temperatura en la muestra, en el interior de la cubeta. Las sondas se colocan cuidadosamente para que queden fuera del camino óptico. Al monitorizar la temperatura directamente en las muestras, el software de control UV-vis debe permitir el registro de la temperatura de cada cubeta en cada medición.

3.3 Agitación de la muestra

La agitación de una muestra termostataada es importante y garantiza que se mantenga en todo momento la homogeneidad de la solución y la temperatura. La agitación es especialmente importante para las muestras viscosas, así como para garantizar una mezcla homogénea de las soluciones a la hora de estudiar una reacción química en la cubeta.

La eficacia de la agitación para conseguir la homogeneidad térmica (y química) depende en gran medida de la muestra, el disolvente y la viscosidad de la solución. Es importante tener presente que la viscosidad cambia con la temperatura y esto puede afectar a la eficiencia de la agitación (y a las medidas) cuando la temperatura varía con el tiempo.

Para agitar las soluciones, se coloca una cuenta o estrella agitadora magnética en el fondo de la cubeta de muestra. Hay disponibles cubetas con un diseño especial que incluyen un hueco en la base. Este hueco circular contiene la cuenta agitadora e incrementa la eficiencia de la agitación.

Hay que tener cuidado a la hora de desarrollar el método analítico para garantizar que la velocidad de agitación sea adecuada para las soluciones. Si la velocidad de agitación es demasiado lenta, es posible que la muestra no se mezcle correctamente. Si la velocidad es demasiado alta, podrían quedar burbujas de aire atrapadas en la muestra y producir resultados erróneos.

Se recomienda llevar a cabo pruebas para todas las muestras con el fin de determinar la velocidad óptima de agitación para el experimento. A la hora de medir líquidos cuya viscosidad sea similar a la del agua, una velocidad de agitación de entre 800 y 900 rpm generalmente consigue una uniformidad óptima de la temperatura en las cubetas estándar. Es necesario reducir la velocidad de agitación para las muestras de alta viscosidad e incrementarla para las muestras de baja viscosidad.

3.4 Mediciones a bajas temperaturas

Al medir muestras a temperaturas inferiores a la temperatura ambiente, puede formarse condensación en el exterior de las cubetas. Esto puede interferir con la medición. La condensación puede evitarse si se purga el compartimento de la muestra del espectrofotómetro UV-vis con gas seco y limpio. Algunos sistemas disponen de puertos especiales de purga que permiten la entrada de gas en el compartimento de la muestra sin introducir luz. Una alternativa para medir muestras frías es usar una sonda de inmersión de fibra óptica. Un acoplador de fibra óptica insertado en el compartimento de la muestra dirige la luz desde el sistema a través de un cable de fibra óptica y de una sonda de inmersión introducida directamente en la muestra (tal como se puede observar en la Figura 6). Después, la luz regresa al detector a través de un cable de fibra óptica de retorno. Para conseguir un muestreo de alta productividad, puede ser recomendable usar esta técnica cuando haya que medir varias muestras a una temperatura fija.

3.5 Transparencia del disolvente

A la hora de medir muestras líquidas o disolver muestras sólidas para el análisis UV, hay que tener en cuenta la transparencia del disolvente. Los disolventes se seleccionan en función de la solubilidad de la muestra, la estabilidad, los requisitos de pH y la longitud de onda UV-visible de corte. Para los compuestos hidrosolubles, el agua es una excelente opción porque permite medir en las longitudes de onda UV. El uso de disolventes orgánicos limita el rango efectivo utilizable de longitud de onda UV. Para seleccionar un disolvente, hay que tener en cuenta tanto la solubilidad de la muestra en él como la transparencia del disolvente en el rango de longitud de onda de interés (tal como se muestra en la Figura 23).

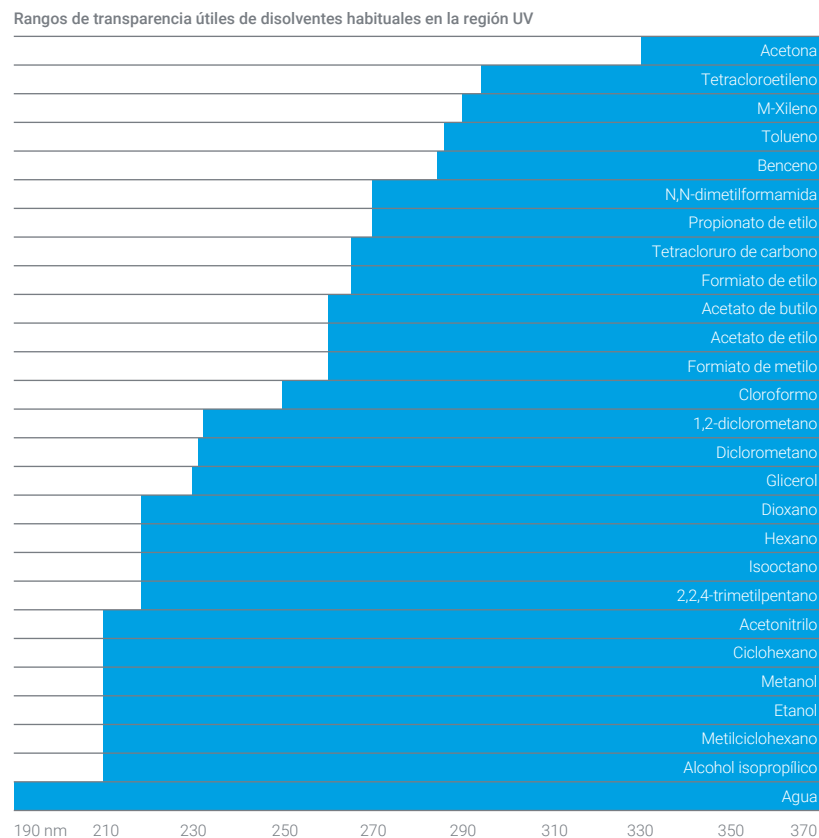


Figura 23. Rangos de transparencia de disolventes habituales en la región UV. Aunque el agua es el disolvente recomendado para el análisis UV, podría ser necesario usar otro disolvente si la muestra no es soluble en agua.



Una molécula con una función muy importante

La protoporfirina es una molécula que constituye la base de la vida para muchos animales y plantas. Los organismos estabilizan la molécula insertando átomos de cinc en su estructura anular en los eritrocitos inmaduros (reticulocitos). A medida que los reticulocitos maduran, se produce la sustitución del cinc por hierro. Después, los eritrocitos maduros se unen a la globina y forman la hemoglobina: la molécula transportadora de oxígeno presente en la sangre de numerosos animales y de las personas.

En las plantas, se inserta magnesio en el anillo de protoporfirina para formar clorofila, uno de los principales compuestos necesarios para la fotosíntesis.

La protoporfirina absorbe luz UV; no es ninguna sorpresa, dada su importancia para la fotosíntesis. Esta molécula también es fluorescente. Estas características hacen que la protoporfirina sea perfecta para el análisis por espectroscopia. De hecho, sirve como base para la prueba principal de cribado de intoxicación por plomo en niños (1).

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Erythrocyte Protoporphyrin Testing; Approved Guideline. Volumen 16, n.º 8, 1996.*

3.6 Ancho de banda espectral óptimo

A la hora de medir una muestra, hay que tener presente la resolución necesaria para la medición. La mayoría de las muestras sólidas o líquidas analizadas por medio de espectroscopia UV-vis presentan picos anchos de forma natural, del orden de 20 nm o más de lado a lado. Una buena práctica es usar un instrumento con un ajuste de ancho de banda espectral (SBW) de alrededor de una décima parte del ancho de banda natural del analito. El ancho de banda espectral del instrumento se define como el ancho de la banda de luz a la mitad del pico máximo (tal como se muestra en la Figura 24), lo que en ocasiones recibe el nombre de anchura total a la mitad del valor máximo del pico (FWHM). El SBW de un espectrofotómetro UV-vis está relacionado con la anchura física de la rendija conforme al diseño del monocromador.

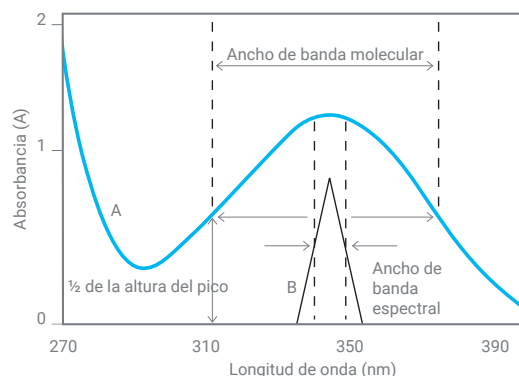


Figura 24. El espectro A presenta un pico máximo próximo a 345 nm. En la imagen se muestra el ancho de banda espectral. La anchura de la rendija espectral del espectrofotómetro UV-vis siempre será menor que el ancho de banda espectral necesario.

En función del diseño del espectrofotómetro, la rendija física puede tener una anchura fija o variable. En la mayoría de los espectrofotómetros UV-vis de gama media, lo habitual es un ancho de banda espectral fijo de 1,5 nm que basta para resolver los picos de la mayoría de la mayor parte de las muestras líquidas y sólidas. El uso de un ancho de banda espectral mayor permite el paso de más luz a través de la muestra y puede generar datos de mejor calidad y menos ruido; sin embargo, no resolverá los picos de la muestra que sean estrechos o estén próximos entre sí. El uso de un ancho de banda espectral menor aportará mayor poder de resolución, pero puede dar lugar a un incremento de los tiempos de adquisición de datos para conseguir una calidad idéntica de los datos, ya que llegará menos luz a la muestra.

Los espectrofotómetros de alto rendimiento o de uso investigativo suelen diseñarse con el fin de permitir que el usuario seleccione la anchura de la rendija y, de esta forma, ajuste la resolución del sistema. Esto resulta útil a la hora de medir muestras más complejas. La anchura de la rendija puede maximizarse para permitir el paso de más luz en las muestras que presenten una alta absorción y en las que no sea necesaria una alta resolución del pico. Al aumentar el paso de luz hacia el detector, mejoran la reproducibilidad de los métodos, la exactitud y la precisión de los resultados. Cuando se requiera una alta resolución, la anchura de la rendija se puede reducir (tal como se muestra en la Figura 25 y la Figura 26).

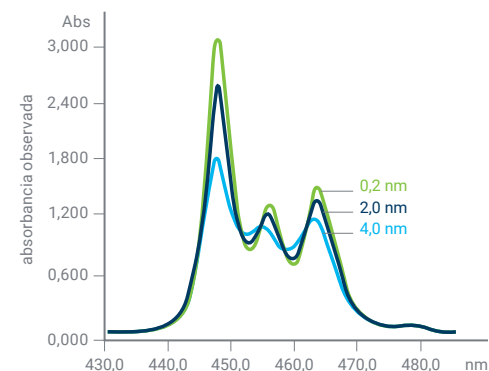


Figura 25. Espectros superpuestos, cada uno de ellos medido con una rendija diferente en el instrumento. A medida que la rendija se ensancha, la relación señal-ruido mejora, pero la resolución disminuye.

Como recomendación, el ancho de banda espectral se debe ajustar a la décima parte del ancho de banda molecular de la muestra (en la Tabla 2 se incluyen ejemplos).

Tabla 2. Ajustes de ancho de banda espectral recomendados para los tipos de medidas de espectroscopia UV-vis habituales.

Compuesto representativo	Pico (nm)	Ancho de banda (nm)	Ancho de banda espectral (SBW) óptimo (nm)
Aminoácidos			
Triptófano	279	45	4,5
Tirosina	275, 195	40, 10	4,0, 1,0
Fenilalanina	258	2,2	0,2
Nucleótidos			
Adenosina	260	28	2,8
Timina	265	30	3
Proteínas			
Citocromo c (oxidado)	410	25	2,5
Rodopsina	500, 278	Aprox. 90, 25	9, 2,5
Ribonucleasa	278	20	2
Pigmentos y tintes			
Beta-caroteno	480	35	3,5
Clorofila a	660	20	2
Coenzimas			
Nicotinamida adenina dinucleótido	260	35	3,5
NADH	340, 260	50, 25	5, 2,5
Compuestos orgánicos simples			
Benceno (vapor)	253	<< 0,1	<< 0,01
Benceno (solución)	253	2	0,2
Antraceno	375	3	0,3

Para optimizar la resolución espectral, también debe tenerse en cuenta el intervalo de adquisición de datos. Como mínimo, se deben tomar tres puntos de datos a lo largo del pico. A pesar de que el acortamiento del intervalo de adquisición de datos puede mejorar la resolución, siempre habrá que llegar a una solución de compromiso entre el tiempo necesario para adquirir datos y el intervalo de datos.

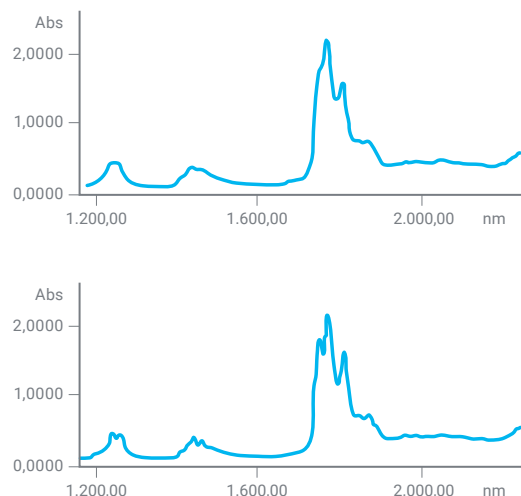


Figura 26. Estos dos espectros demuestran el efecto de la resolución al variar el ancho de banda espectral. Con un ancho de banda espectral de 15 nm (gráfico superior), se observan pocos detalles estructurales en el espectro. Con un ancho de banda espectral de 3 nm (gráfico inferior), los picos aparecen mucho más definidos.

3.7 Luz difusa

La luz difusa o energía radiante difusa (SRE) se define como el porcentaje de la radiación que llega al detector cuyas longitudes de onda están fuera de la banda espectral seleccionada. Se debe a un diseño deficiente del instrumento (filtraciones de luz diurna o del laboratorio en el instrumento a través de aberturas o separación incorrecta de la luz por parte del monocromador), o bien a daños en el instrumento. La mayoría de los sistemas incluyen comprobaciones de rendimiento del instrumento que permiten identificar los problemas de luz difusa. Para ello, se utiliza una solución de prueba. Las soluciones utilizadas para comprobar los niveles de luz difusa no transmiten a las longitudes de onda indicadas (pero sí a otras longitudes de onda), por lo que la transmitancia observada se deberá únicamente a la luz difusa.

La luz difusa reduce las lecturas de absorbancia y produce cambios en la forma de pico observada (tal como se muestra en la Figura 27). Debido a esto, la luz difusa provoca desviaciones respecto a la ley de Beer-Lambert (tal como se muestra en la Figura 28), haciendo que las medidas de concentración sean poco fiables. El rendimiento de un instrumento UV-vis en cuanto a la luz difusa también determina la absorbancia máxima que el instrumento puede medir.

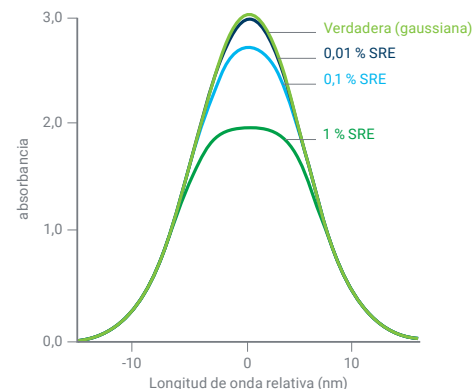


Figura 27. La absorbancia máxima de los picos será menor y la curva se aplanará a medida que la luz difusa aumente en el instrumento.

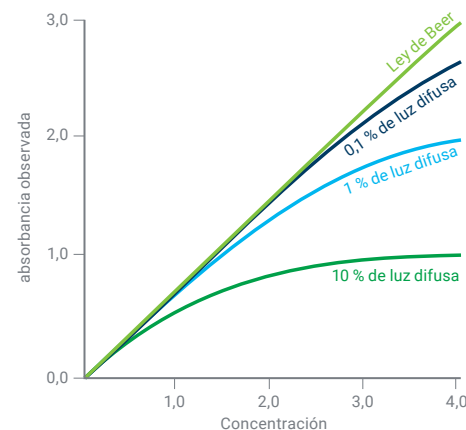


Figura 28. Un sistema UV-vis con un bajo rendimiento en cuanto a la luz difusa presentará desviaciones respecto a la ley de Beer. Esto hará que los cálculos de concentración no sean fiables.

3.8 Rango lineal de un instrumento UV-vis

Tanto el diseño del instrumento como los parámetros de medida utilizados determinarán la absorbancia máxima que un instrumento puede medir a una longitud de onda específica. Con una absorbancia alta, llegará muy poca luz al detector, lo que reducirá la relación señal-ruido (observe el "flequillo" característico del espectro en la Figura 29). Entender los límites del sistema permitirá evitar medir muestras o realizar calibraciones que queden fuera de las capacidades del instrumento. Para las muestras líquidas, la dilución es un método para llevar la medida al rango lineal del instrumento. Otra opción es usar una cubeta con un camino óptico corto.

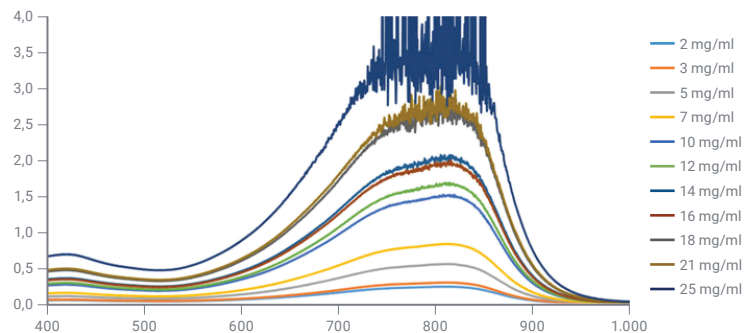


Figura 29. Cuanto más aumenta progresivamente la absorbancia de una muestra, menos luz llega al detector. Esto incrementa el ruido en los resultados y hace que se observe una señal con un gran número de fluctuaciones en el modo de barrido.

3.9 Información adicional útil

En la espectroscopia UV-vis se suele medir la absorbancia (A o Abs), debido a la relación lineal entre la concentración y la absorbancia, conforme a lo descrito por la ley de Beer-Lambert. Para otras aplicaciones, puede que el porcentaje de luz transmitida o absorbida resulte más significativo. Por ejemplo, al comparar las propiedades ópticas de un material puede resultar más útil comparar el porcentaje de transmisión o la diferencia de absorbancia.

La mayoría de los espectrofotómetros UV-vis le permitirán transformar los datos adquiridos de un parámetro de uso habitual a otro. La relación entre estos parámetros se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. La relación entre la absorbancia y el porcentaje de transmisión puede resultar difícil de visualizar. Como se puede observar en la tabla, una muestra con una absorbancia de 7 Abs transmite solo el 0,00001 % de la luz a través de las muestras.

% T	T	Abs	% A	log A
100	1,0	0	0	–
50	0,5	0,3	50	-0,52
10	0,1	1	90	0
1	0,01	2	99	0,3
0,1	0,001	3	99,9	0,48
0,01	0,0001	4	99,99	0,60
0,001	0,00001	5	99,999	0,70
0,0001	0,000001	6	99,9999	0,78
0,00001	0,0000001	7	99,99999	0,85

3.10. Longitud de onda o centímetros recíprocos

La mayoría de las medidas de espectroscopia UV-vis se relacionan con longitudes de onda medidas en nanómetros (1×10^{-9} m). En algunas referencias bibliográficas más antiguas, se utiliza la longitud recíproca o número de onda (cm^{-1}). El número de onda se usa a menudo en las medidas de espectroscopia infrarroja (IR). Utilizar una escala de número de onda resulta útil, ya que refleja el cambio en los niveles de energía de la radiación incidente. Una longitud de onda baja dará lugar a un número de onda y una energía altos (tal como se muestra en la Tabla 4).

El uso del número de onda para la espectroscopia infrarroja también permite visualizar más fácilmente las diferencias espectrales a medida que la longitud de onda se acorta progresivamente.

Para la espectroscopia UV-vis se suele usar preferentemente la longitud de onda, ya que ofrece una forma cómoda de visualizar el espectro a lo largo de un rango espectral.

La mayoría de los espectrofotómetros UV-vis permitirán adquirir un espectro mediante la longitud de onda o el número de onda.

Tabla 4. Conversión entre longitud de onda (nm) y número de onda (cm^{-1}).

λ (nm)	cm^{-1}
3.300	3.030
3.000	3.300
2.500	4.000
2.000	5.000
1.500	6.666
1.000	10.000
800	12.500
600	16.667
400	25.000
200	50.000
175	57.143

4. Resumen de aplicaciones comunes de la espectrofotometría UV-vis

4.1 Identificación: espectros y estructura

Los espectros UV y visible generalmente solo presentan un máximo de unidades de absorbancia. En comparación con técnicas como la espectroscopia infrarroja, que genera muchos picos estrechos, la espectroscopia UV-visible aporta una cantidad limitada de información cualitativa. Con solo unos pocos picos anchos, resulta difícil identificar un compuesto a partir de un espectro característico.

La mayoría de la absorción por parte de compuestos orgánicos procede de la presencia de enlaces π (es decir, insaturados). Un cromóforo es un grupo molecular que generalmente contiene un enlace π . Cuando se inserta en un hidrocarburo saturado (que no muestra un espectro de absorbancia UV-visible), se produce un compuesto que presenta absorbancia entre 185 y 1.000 nm. La Tabla 5 incluye algunos cromóforos y las longitudes de onda de sus valores máximos de absorbancia.

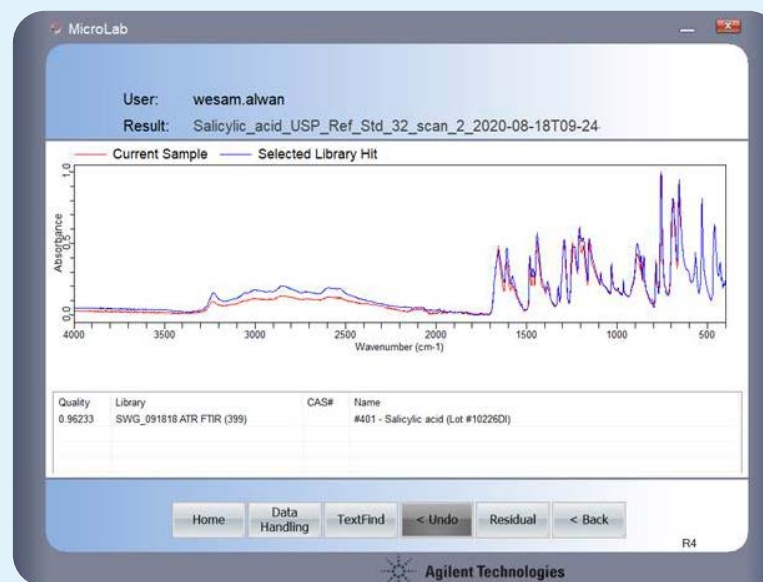
Tabla 5. Cromóforos específicos y longitudes de onda de sus valores máximos de absorbancia.

Cromóforo	Fórmula	Ejemplo	λ máx. (nm)
Carbonilo (cetona)	$RR'C=O$	Acetona	271
Carbonilo (aldehído)	$RHC=O$	Acetaldehído	293
Carboxílico	$RCOOH$	Ácido acético	204
Amida	$RCONH_2$	Acetamida	208
Etileno	$RCH=CHR$	Etileno	193
Acetileno	$RC=CR$	Acetileno	173
Nitrilo	$RC=N$	Acetonitrilo	< 160
Nitro	RNO_2	Nitrometano	271

La existencia de una banda de absorbancia en una longitud de onda específica suele ser un buen indicador de la presencia de un cromóforo. Sin embargo, la posición de la longitud de onda correspondiente al valor máximo de absorbancia no es fija, sino que depende en parte del entorno molecular del cromóforo y del disolvente en el que la muestra esté disuelta. Otros parámetros, como el pH y la temperatura, también pueden provocar cambios en la intensidad y la longitud de onda de los valores máximos de absorbancia.

Los espectros FTIR pueden utilizarse para identificar compuestos

Los espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) contienen muchos más datos que los espectros UV y visible. Un espectro como el que se muestra aquí (en rojo) puede cotejarse con una biblioteca de espectros FTIR para identificar el compuesto. En este caso, se trata de un compuesto farmacéutico: ácido salicílico (el espectro correspondiente de la biblioteca aparece en azul).



La conjugación del enlace doble con otros enlaces dobles incrementa la intensidad y la longitud de onda de la banda de absorción. Para algunos sistemas moleculares, como los hidrocarburos conjugados o los carotenoides, la relación entre la intensidad y la longitud de onda se ha investigado de forma sistemática. Los iones de los metales de transición también tienen niveles de energía electrónica que provocan absorción de 400 a 700 nm en la región visible.

4.2 Confirmación de la identidad

A pesar de que los espectros UV y visible no permiten la identificación absoluta de una especie desconocida, se utilizan para confirmar la identificación de una sustancia mediante la comparación del espectro medido con un espectro de referencia. En aquellos casos en los que los espectros son muy similares, pueden utilizarse espectros derivados. Tal como se muestra en la Figura 30, el número de bandas aumenta cuanto mayor sea el orden de las derivadas. Estos espectros derivados complejos pueden resultar útiles para el análisis cualitativo, ya sea para caracterizar materiales o para fines de identificación. Por ejemplo, el espectro de absorbancia de la testosterona, un esteroide, presenta una banda única, ancha y no característica centrada alrededor de los 330 nm, mientras que la segunda derivada tiene seis picos diferenciados. Este efecto de mejora de la resolución también puede ser útil para identificar especies desconocidas. La Figura 30 muestra una simulación por ordenador. Cuando se añaden dos bandas gaussianas con un ancho de banda espectral natural (NBW) de 40 nm, separadas por 30 nm, en el modo de absorbancia, se forma una banda única con un área máxima central entre las bandas de los dos componentes. Eso impide la resolución de ambos componentes. Mediante la cuarta derivada del espectro, estas dos bandas resultan claramente visibles, con los máximos centrados cerca del valor $\lambda_{\text{máx}}$ de las bandas de los componentes.

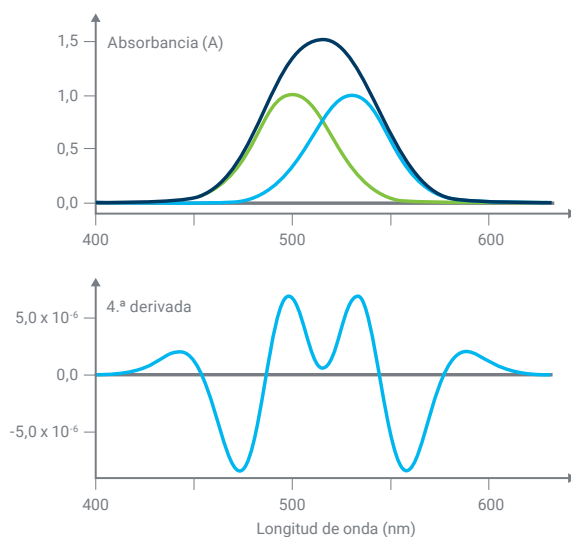


Figura 30. Mejora de la resolución mediante el análisis de derivadas. Los picos originales superpuestos generan un único pico ancho. Al usar la cuarta derivada del espectro, se obtiene un espectro que ofrece una resolución mucho mayor de los picos.

4.3 Cuantificación de una molécula

Ley de Beer

Si 100 fotones de luz entran en una cubeta y solo 50 salen por el otro lado, la transmitancia será igual a 0,5 (es decir, el 50 %). Si, a continuación, estos 50 fotones atraviesan otra cubeta idéntica, solo 25 saldrán de ella y así sucesivamente. La Figura 31 muestra un gráfico de transmitancia frente a la longitud del camino de la cubeta.

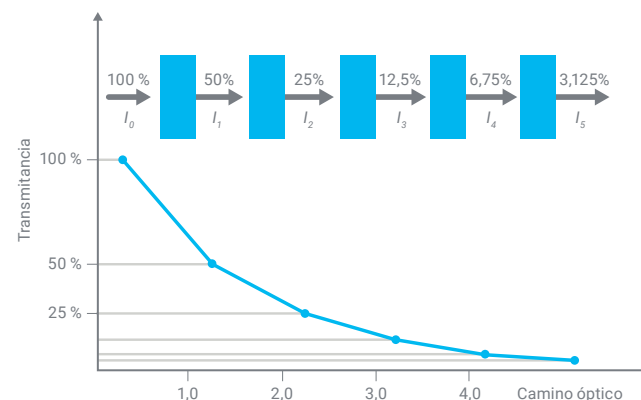


Figura 31. Transmitancia y longitud del camino: ley de Bouguer-Lambert.

Aunque normalmente se atribuye a Lambert (1760) la primera expresión matemática de este efecto, parece que Bouguer fue el primero que la propuso en 1729. La ecuación es la siguiente:

$$T = I/I_0 = e^{-kb}$$

Donde:

- I_0 es la intensidad incidente.
- I es la intensidad transmitida.
- e es la base los logaritmos naturales.
- k es una constante.
- b es la longitud del camino (habitualmente en centímetros).

La ley de Beer es idéntica a la ley de Bouguer, salvo por el hecho de que se expresa en términos de concentración. La cantidad de luz absorbida es proporcional al número de moléculas absorbentes que la luz atraviesa. La Figura 32 muestra un gráfico de transmitancia frente a la concentración.

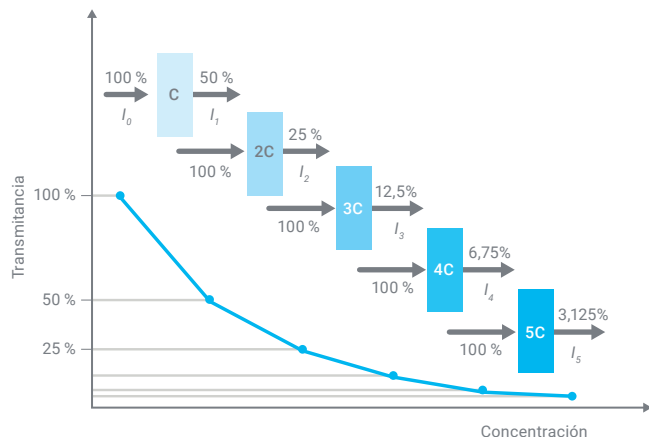


Figura 32. Transmitancia y concentración: ley de Beer.

La combinación de ambas leyes da lugar a la ley de Beer-Bouguer-Lambert:

$$T = I/I_0 = e^{-kbc}$$

Donde c es la concentración de la especie absorbente (expresada habitualmente en gramos o miligramos por litro). Esta ecuación puede transformarse en una expresión lineal si se elimina el logaritmo y suele expresarse en forma decimal:

$$A = -\log T = -\log(I/I_0) = \log(I_0/I) = \epsilon bc$$

Donde A es la absorbancia y ϵ es el coeficiente de absorbancia molar o extinción. Esta expresión se conoce comúnmente como ley de Beer. La Figura 33 muestra un gráfico de absorbancia frente a la concentración.

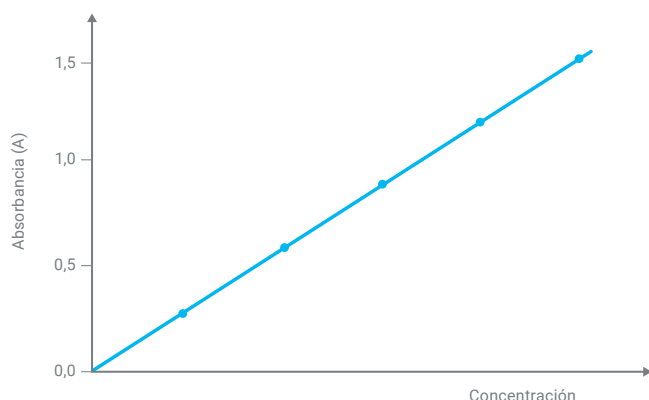


Figura 33. La ley de Beer-Bouguer-Lambert indica una relación lineal entre la absorbancia de luz incidente y la concentración de la molécula.

El coeficiente de extinción (ϵ) es característico de cada sustancia en un conjunto muy específico de condiciones (por ejemplo, longitud de onda, disolvente y temperatura). En la práctica, el coeficiente de extinción medido también depende en parte de las características del instrumento utilizado. Por estos motivos, no se usan valores predeterminados del coeficiente de extinción para el análisis cuantitativo. En su lugar, se genera una curva de calibración o trabajo para la sustancia que haya que analizar, usando para ello una o varias soluciones patrón con concentraciones conocidas del analito.

Para las transiciones electrónicas, la diferencia de energía entre el estado fundamental y los estados excitados es relativamente grande. Por lo tanto, es muy probable que, a temperatura ambiente, todas las moléculas estén en el estado electrónico fundamental. La absorción y el retorno al estado fundamental son procesos rápidos, y el equilibrio se alcanza con gran rapidez. Por lo tanto, la absorción de luz UV-visible es muy precisa a escala cuantitativa. La sencilla relación lineal entre la absorbancia y la concentración y la relativa facilidad de la medida de la luz UV-visible han convertido la espectroscopia UV-visible en la base de miles de métodos analíticos cuantitativos. Suponiendo que la ley de Beer se cumpla para el espectro de orden cero, existirá una relación lineal similar entre la concentración y la amplitud para los espectros derivados de todos los órdenes:

Orden cero: $A = \epsilon bc$

Primera derivada: $dA/d\lambda = (d\epsilon/d\lambda)bc$

Derivada de orden "n": $d^n A/d\lambda^n = (d^n \epsilon/d\lambda^n)bc$

A la longitud de onda λ , donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de extinción, b es la longitud del camino y c es la concentración de la muestra.

Para la cuantificación de compuestos individuales, la selección de las longitudes de onda resulta más compleja para los espectros derivados que para los espectros de absorbancia, ya que existen picos positivos y negativos. Las derivadas de orden par tienen un pico máximo o mínimo en el mismo valor $\lambda_{\text{máx}}$ que el espectro de absorbancia; sin embargo, para las derivadas de orden impar, esta longitud de onda se corresponde con una intersección con el eje x. Utilizar la diferencia entre el máximo más alto y el mínimo más bajo ofrece una relación señal-ruido (S/N) óptima, pero puede incrementar la sensibilidad a las interferencias de otros compuestos.

Para obtener resultados precisos, la muestra que se analizará debe contener únicamente el compuesto absorbente para el que se haya llevado a cabo la calibración. Si la muestra es una solución, se debe usar una muestra pura de disolvente como blanco. La presencia de un compuesto interferente podría corregirse con una segunda longitud de onda.

Medidas de concentración

Una de las aplicaciones más habituales de un espectrofotómetro UV-vis es la cuantificación simple de la concentración. Si se acopla una sonda de inmersión de fibra óptica como accesorio, se puede usar un espectrofotómetro UV-vis para efectuar medidas directamente en el recipiente de la muestra, sin necesidad de decantar el contenido en una cubeta.

[Aquí puede encontrar más información.](#)



4.4 Cinética

El análisis de la cinética de las reacciones resulta esencial para entender cómo se producen las reacciones químicas y bioquímicas. La espectrofotometría UV-vis es una técnica idónea para esta aplicación, ya que no destruye la muestra. Puede utilizarse cuando el cambio en el reactivo o los productos modifique la absorbancia a una determinada longitud de onda en función del tiempo. Mediante un sistema UV-vis de barrido rápido, pueden efectuarse múltiples barridos durante la reacción para permitir visualizar esta y facilitar la selección de las longitudes de onda para el cálculo de la velocidad.

Cinética de un solo punto

El análisis cinético de un solo punto es el método más sencillo para determinar la velocidad de una reacción. Se selecciona una única longitud de onda (generalmente, la correspondiente al valor máximo de absorbancia del analito de interés) y, tras iniciar la reacción, se monitoriza continuamente la absorbancia a esa longitud de onda. Esto genera un gráfico de absorbancia en función del tiempo, tal como se observa para cuatro muestras en la Figura 34. La monitorización del cambio de la absorbancia en función del tiempo permite estudiar una reacción: cuando la absorbancia deja de cambiar, eso suele indicar que la reacción ha finalizado. En la Figura 34 se representan cuatro muestras diferentes a lo largo de 30 minutos.

La ventaja de la medida de un solo punto es que posibilita la adquisición de datos casi continuos para las reacciones rápidas, ya que el sistema no necesita cambiar de longitud de onda durante la medición. La velocidad de adquisición de datos del instrumento y el tiempo de cálculo de la media de la señal son los factores limitantes respecto a la cantidad de datos que se puede adquirir.

También se pueden monitorizar varias longitudes de onda para medir la cinética. Esto puede aportar información acerca de la formación de un producto de reacción a una determinada longitud de onda y su destrucción a otra longitud de onda.

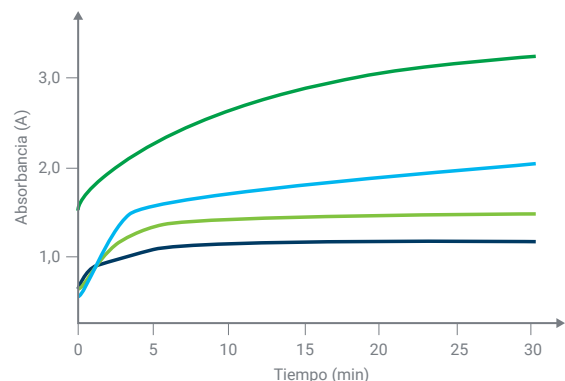


Figura 34. La monitorización del cambio de la absorbancia en función del tiempo permite estudiar una reacción: cuando la absorbancia deja de cambiar, eso suele indicar que la reacción ha finalizado. Este gráfico representa las medidas para cuatro muestras diferentes a lo largo de 30 minutos.

Barrido cinético

Hacer un barrido de un rango de longitud de onda en función del tiempo puede aportar información adicional al realizar medidas de la cinética. Además de proporcionar una representación visual de la reacción según esta se produce (tal como se muestra en la Figura 34), esta medida aporta la flexibilidad de seleccionar cualquier número de longitudes de onda dentro del rango de barrido para calcular la velocidad de reacción. Esto puede incluir el análisis del consumo de reactivos o la formación de productos de reacción a medida que la reacción avance. A la hora de realizar barridos cinéticos, es importante garantizar que el sistema UV-vis pueda barrer el rango de longitud de onda seleccionado rápidamente. Si el barrido es lento, eso limitará la cantidad de datos adquiridos a una determinada longitud de onda durante la reacción.

Cinética de mezcla rápida

Para monitorizar la velocidad de reacción de dos soluciones que reaccionen con rapidez, cabe la posibilidad de usar un accesorio especial de mezcla rápida o flujo detenido. Estos accesorios, si se montan en un espectrofotómetro UV-vis, permiten alimentar de forma precisa dos o más soluciones a una celda de flujo situada en el interior del instrumento UV-vis, donde se producirá la mezcla. El accesorio de flujo detenido activará el sistema UV-vis para que inicie el análisis en cuanto las soluciones se hayan mezclado en la celda de flujo. Entre las opciones disponibles están la capacidad de cambiar la relación de mezcla de las soluciones y de termostatar tanto la celda de flujo como los reactivos. Dado que la velocidad de adquisición es esencial, es importante seleccionar un sistema UV-vis con una velocidad de adquisición de datos lo suficientemente rápida como para registrar un conjunto de puntos de datos dentro del intervalo de tiempo de reacción. El ejemplo de la Figura 36 muestra una reacción monitorizada a lo largo de tres segundos.

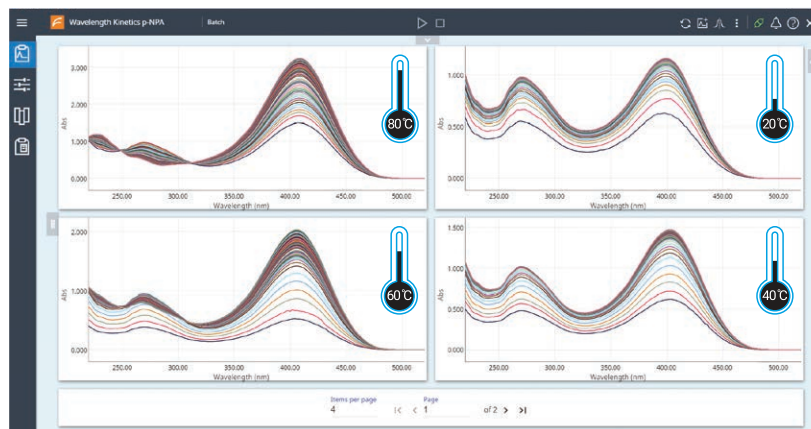


Figura 35. Barrido cinético: los espectrofotómetros UV-vis ofrecen información valiosa sobre los aspectos químicos de una reacción. El efecto de la temperatura en las reacciones químicas se puede observar de forma rápida y sencilla mediante un barrido rápido a varias temperaturas. [Aquí puede ver un experimento de barrido cinético.](#)

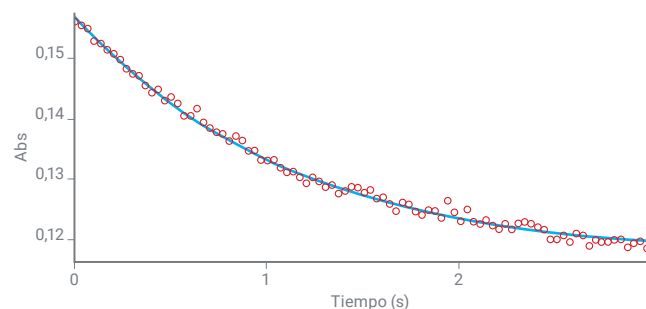


Figura 36. El uso de un espectrómetro UV-vis moderno y un accesorio de mezcla rápida permite medir las reacciones a lo largo del tiempo en un intervalo de tiempo de solo unos segundos. [Aquí puede ver un experimento de ejemplo.](#)

Consideraciones acerca de la medida de la cinética

La temperatura puede influir en la velocidad de una reacción. Por este motivo, puede ser importante mantener la muestra a una temperatura constante; por ejemplo, para las reacciones biológicas se suele seleccionar la temperatura corporal (37 °C). Resulta habitual usar cubetas refrigeradas/calentadas por efecto Peltier o soportes de cubetas termostatizados con agua en los sistemas UV-vis para estos fines. Estos accesorios pueden mantener la muestra a una temperatura específica o modificar la temperatura en función del tiempo (gradiente).

La precisión y la reproducibilidad de la temperatura deben considerarse cuidadosamente, ya que pequeñas variaciones de la temperatura o de la velocidad de cambio de la temperatura pueden producir efectos sensibles en los resultados. Algunos sistemas permiten medir la temperatura de las muestras directamente en el interior de la cubeta (en lugar de medir simplemente la temperatura del soporte de la cubeta). Esto, combinado con la retroalimentación del sistema de control de la temperatura, suele mejorar el control de la temperatura de la muestra. Las sondas de temperatura en la muestra también pueden utilizarse para registrar la temperatura de la muestra, además de datos de absorbancia.

También es importante que la agitación de las muestras sea homogénea y reproducible. A la hora de medir reacciones a temperatura ambiente, la agitación garantiza la mezcla homogénea de los reactivos durante la reacción. Para las muestras termostatizadas, la agitación garantiza que no existan gradientes de temperatura en la muestra.

Para medir sistemas complejos, puede ser recomendable usar una sonda de fibra óptica. Un cable de fibra óptica permite dirigir la luz del espectrofotómetro UV-vis hacia una muestra situada fuera de él. Esto puede resultar útil para las medidas en procesos de fabricación en los que exista flujo, cuando la muestra esté sometida a temperaturas o presiones extremas, o bien cuando no se pueda colocar la muestra físicamente en el interior del compartimento de la muestra del espectrofotómetro.

En el sitio web agilent.com, se puede ver una [demostración de experimentos de cinética](#).

4.5 Medición del color

El color es una propiedad importante de los materiales. El color de la materia está relacionado con la absorción o la reflectancia de determinadas longitudes de onda de la luz. El ojo humano ve el color complementario del color absorbido, tal como se muestra en la Figura 37 y la Figura 38.

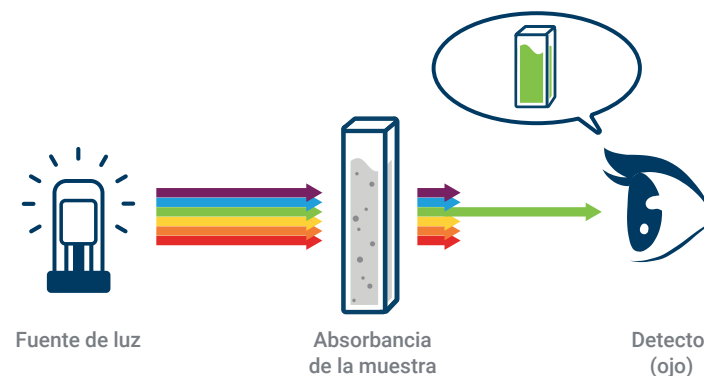


Figura 37. Transmisión y color. De forma muy similar a lo que sucede con el detector del espectrofotómetro, el ojo humano ve la luz transmitida a través de una superficie o reflejada en ella. Eso es lo que percibe el ser humano como el color del objeto en cuestión.



Figura 38. Longitudes de onda de la luz asociadas a diferentes colores (izquierda) y colores de la luz absorbida y colores complementarios que el ojo humano ve (derecha).

En la práctica, tanto la generación como la sensación de color son muy complejas y dependen de numerosos factores, incluidos los siguientes:

- El espectro de la luz que incide en el objeto (un ejemplo es la diferencia de colores que se observa entre el atardecer y el mediodía).
- La estructura superficial de un material sólido (las escamas de un pez o las plumas de un ave son dos ejemplos en los que la estructura física de la superficie modifica el color observado).
- El ángulo de visión (algunas superficies, como las acabadas con pinturas perladas, cambian de color en función del ángulo desde el que se observe la superficie).

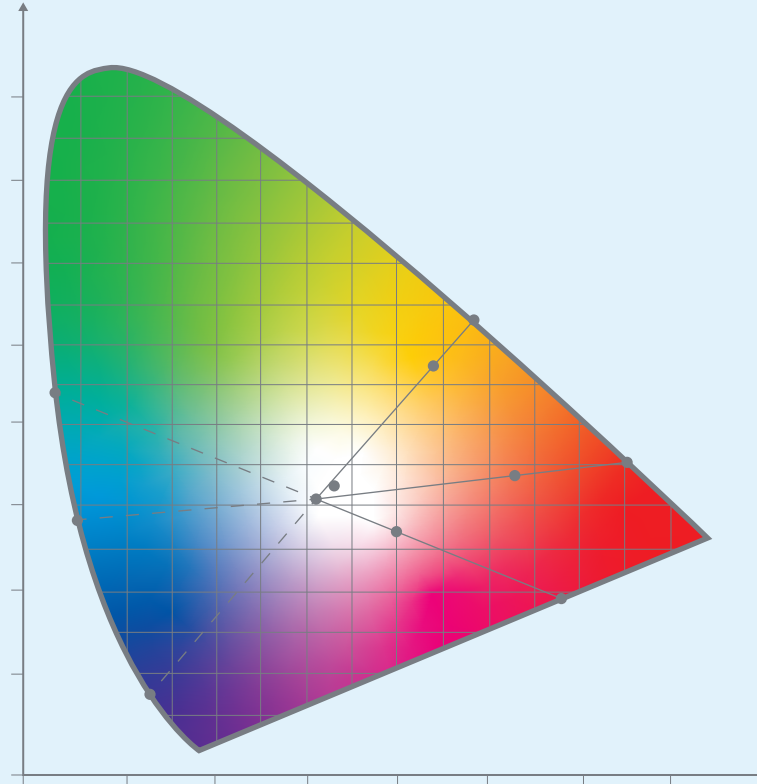
Se han desarrollado instrumentos y sistemas específicos de medición del color, como el sistema CIE L^*a^*b . Si cuentan con el software adecuado, la mayoría de los espectrofotómetros pueden utilizarse para medir el color. En la percepción del color también influyen la superficie y su capacidad de producir reflectancia especular (similar a un espejo) o difusa (dispersión). Debido a estos factores, la medición del color puede requerir accesorios especiales que permitan registrar y observar la reflectancia especular y difusa con diferentes ángulos de visión.

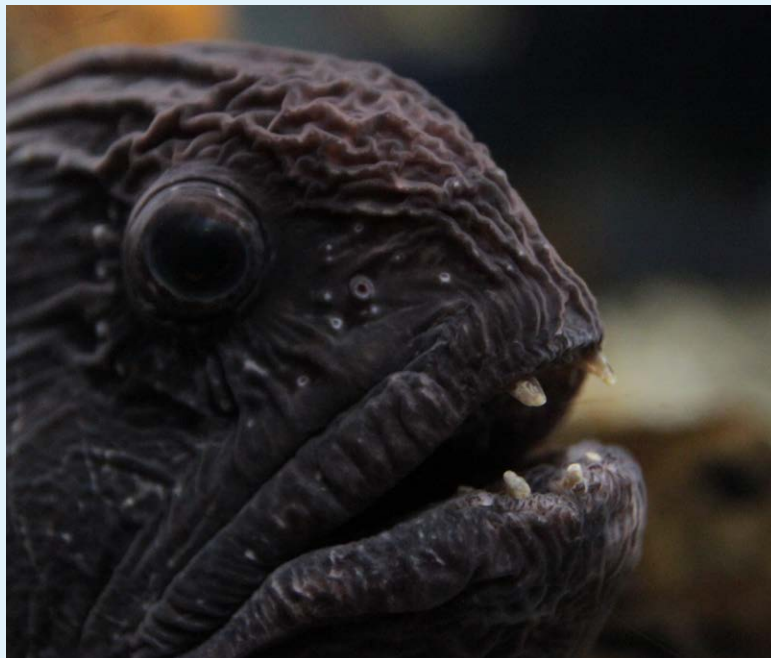
Un instrumento de medida del color tomará el espectro UV-vis de una muestra y lo transformará en tres coordenadas que ubicarán el color en un espacio de color tridimensional (consulte la imagen del panel lateral). Las tres coordenadas definen el brillo, la saturación y el matiz del color. El brillo es una medida de la claridad u oscuridad de un color; la saturación es una medida de la "pureza" del color; y el matiz es el color espectral dominante (es algo similar a los colores que se observan en un arco iris).

Además de utilizarse para medidas de correspondencia de color (p. ej., para medir colores de pintura en un objeto fabricado), un espectrofotómetro UV-vis también se puede usar para medir el cambio de color en una solución. Las medidas por espectrofotometría UV-vis se suelen usar para ese propósito, con el fin de evaluar si una reacción ha terminado o está en curso, sin necesidad de inspección visual. Los ensayos de colorimetría son una de las aplicaciones más extendidas de la espectrofotometría UV-vis.

Medida del color

Los espectrofotómetros UV-vis se utilizan para medir el color de los líquidos y los sólidos. La medida de la luz visible que se transmite a través de una solución o material, o bien de la luz reflejada por una superficie, permite calcular el color del líquido o material en cuestión. Se utiliza una serie de tres números para indicar las coordenadas del color medido en un "espacio de color". [Aquí puede encontrar más información.](#)





¿Cómo de negro es el negro? Pregúntele a un pez abisal

Los investigadores han encontrado muchos peces abisales con una piel ultranegra, que refleja menos del 0,5 % de la luz incidente. Los peces aprovechan su piel ultranegra para que sus presas no puedan detectarlos mientras intentan cazarlas. En las profundidades abisales, las criaturas marinas usan a menudo la bioluminiscencia como ayuda para ver a sus presas o depredadores. La piel ultranegra absorbe la luz de la bioluminiscencia, lo que permite a los peces permanecer camuflados.

Los investigadores del Museo Nacional de Historia Natural de la Institución Smithsonian y de la Universidad de Duke midieron la reflexión de la piel de los peces, y absorbe un 99,5 % de la luz. El valor es similar al de las excepcionales aves del paraíso (99,95 %) y al del material más negro fabricado hasta la fecha: el Vantablack, que absorbe el 99,96 %.

El mecanismo que utilizan esos peces para absorber la luz podría tener aplicaciones en paneles solares, telescopios, cámaras y sistemas de camuflaje.

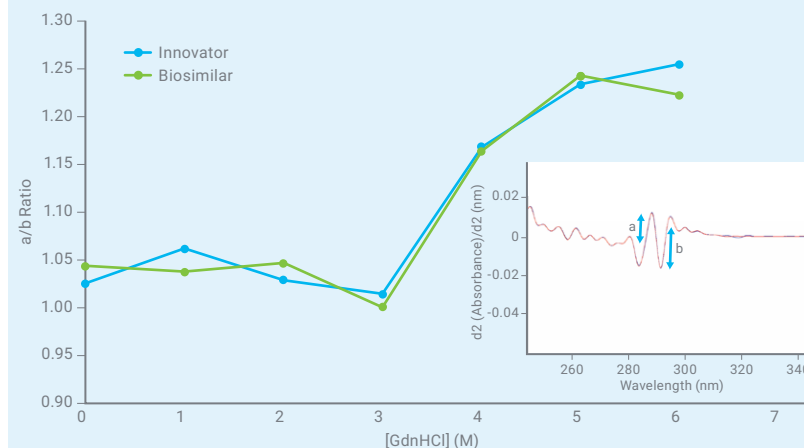
[Lea los resultados del estudio.](#)

4.6 Cambios estructurales de los compuestos

La espectroscopia UV-visible puede utilizarse para determinar numerosas características fisicoquímicas de los compuestos. Estas medidas pueden identificar un compuesto o determinar propiedades específicas.

Estudios conformacionales

La espectroscopia UV-vis puede proporcionar información sobre la estructura de las proteínas. La espectrofotometría UV-vis es un método no destructivo, lo que evita la destrucción de las preciosas muestras. Esto convierte la espectrofotometría UV-vis en una técnica idónea para su uso antes del análisis mediante técnicas como la LC o la espectroscopia de masas. Esto queda patente en la comparación de un par de anticuerpos monoclonales: uno original y otro biosimilar. [Aquí puede encontrar más información.](#)



4.7 Temperatura de fusión de las proteínas y los ácidos nucleicos

La espectroscopia UV-vis se usa a menudo en el campo de las ciencias de la vida para el análisis de moléculas como proteínas y ácidos nucleicos. Los espectros de absorbancia de las proteínas se deben a la absorbancia de ciertos aminoácidos aromáticos: el triptófano, la tirosina y la fenilalanina. El análisis multicomponente puede utilizarse para determinar la cantidad de cada aminoácido aromático presente en una proteína intacta.

A temperatura ambiente, una proteína tiene una conformación o estructura terciaria específica que, a la vez, genera un determinado entorno electrónico para los aminoácidos aromáticos. Otra aplicación de la espectroscopia UV-vis consiste en la exposición de las proteínas a calor o desnaturizantes químicos. Esto, a determinadas temperaturas o concentraciones, hará que la proteína se despliegue o funda y pierda su estructura. En este proceso, el entorno electrónico de los aminoácidos aromáticos cambia, lo que dará lugar a cambios o desplazamientos espectrales.

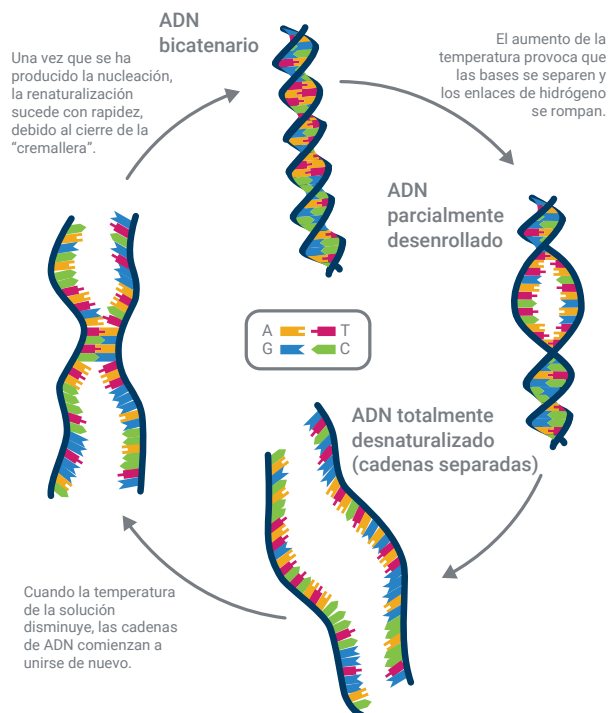


Figura 39. Las cadenas de la doble hélice del ADN se separan al calentar el ADN. Esto incrementa la absorbancia de luz UV a 260 nm. Cuando el ADN se enfría, las cadenas se vuelven a unir.

En su estado natural, el ácido desoxirribonucleico (ADN) está compuesto por dos cadenas de moléculas de desoxirribosa enrolladas helicoidalmente alrededor de un eje común. Las cadenas están unidas por enlaces de hidrógeno entre las bases purina y pirimidina: la adenina está unida a la timina (A-T) y la guanina, a la citosina (G-C). Estas bases son las responsables principales de la absorbancia UV del ADN y los otros tipos de ácidos nucleicos, con un pico máximo a 260 nm. Como en cualquier sistema multicomponente, la absorbancia observada de cualquier molécula de ácido nucleico debe ser igual a la suma de las absorbancias individuales:

$$A_{ADN} = A_{adenina} + A_{guanina} + A_{citosina} + A_{timina}$$

Sin embargo, la absorbancia observada es siempre sensiblemente inferior a la esperada, debido a que los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases sufren modificaciones en su entorno electrónico. Al calentar una molécula, los enlaces de hidrógeno se rompen, la hélice doble se desenrolla y la absorbancia aumenta, de tal modo que se aproxima al valor esperado, igual a la suma de los valores de todas las bases (consulte la Figura 39). Este proceso de desnaturalización se conoce como fusión o fusión térmica. En un experimento de fusión térmica, la temperatura de una solución de ácido nucleico de doble cadena se incrementa de forma escalonada, y la absorbancia a 260 nm para cada temperatura se mide y representa como una curva de fusión (tal como se muestra en la Figura 40). El punto medio del rango de temperatura en el que se produce la fusión es el valor T_m . El valor T_m de una muestra de ácido nucleico determinada depende principalmente del porcentaje de pares G-C en la muestra, cada uno de los cuales contiene tres enlaces de hidrógeno (en cambio, cada par A-T contiene dos enlaces de hidrógeno). Cuanto mayor sea el porcentaje de pares G-C en la muestra, mayor será el valor T_m observado.

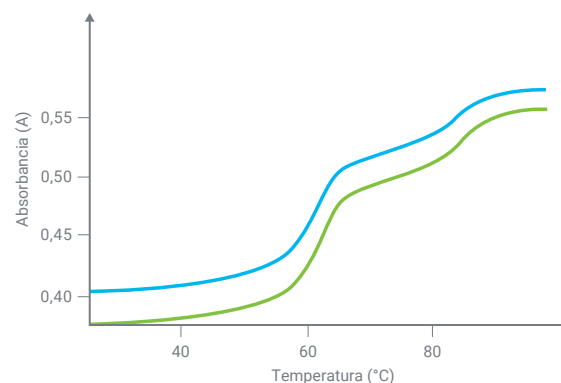


Figura 40. La medida de la absorbancia a 260 nm acompañada de un aumento de la temperatura genera este gráfico característico de una fusión de ADN. El cambio de absorbancia indica las múltiples transiciones a medida que la hélice de ADN se desenrolla.

Para llevar a cabo análisis de fusión de proteínas y ADN, el espectrofotómetro UV-vis debe disponer de algún medio para modificar la temperatura de la muestra de forma precisa y reproducible. Los recientes avances en los instrumentos espectrofotométricos ofrecen reducciones importantes de los tiempos transcurridos para las medidas de fusión térmica, así como una precisión de la temperatura que es mayor de lo que era posible anteriormente. Hay disponibles sistemas de análisis UV-vis de fusión térmica que incorporan sondas de temperatura en la cubeta, que pueden utilizarse para controlar con precisión la temperatura de las soluciones durante el experimento. A esto se le añade la agitación en la cubeta para garantizar el calentamiento homogéneo de las muestras. Cuando sea necesario analizar un gran número de muestras, el instrumento incluirá o permitirá integrar un soporte

multicelda. La mayoría de los accesorios de control de la temperatura por efecto Peltier requieren un baño de agua circulante para refrigerar los elementos Peltier. También en este caso, las recientes innovaciones han permitido usar dispositivos Peltier refrigerados por aire en el bloque de la celda. El rango de temperatura requerido suele ser de entre 0 y 110 °C; esto, junto con la monitorización integrada de la temperatura y la agitación, ofrece la posibilidad de aplicar gradientes de temperatura durante el análisis de la forma más rápida posible.

Análisis de fusión térmica de ácidos nucleicos

El control de la temperatura de la muestra es un requisito esencial del sistema UV-vis de fusión térmica. El uso de una sonda de temperatura en la cubeta puede facilitar un calentamiento rápido y reproducible. [Aquí puede encontrar más información.](#)



4.8 Análisis multicomponente

Los análisis multicomponente mediante espectros UV y visible se han realizado desde hace tanto tiempo como los análisis monocomponente. Sin embargo, las técnicas utilizadas en el análisis multicomponente generan a menudo resultados incorrectos, por lo que su uso no está tan extendido. Un espectrofotómetro UV-vis moderno y bien diseñado genera datos más precisos; además, las modernas técnicas de ajuste de curvas proporcionan resultados más precisos y, lo que quizá es aún más importante, indican en qué casos los resultados son incorrectos.

Principio aditivo

Según la ley de Beer, la absorbancia es proporcional al número de moléculas que absorben radiación a la longitud de onda especificada. Este principio se cumple cuando hay presentes varias especies absorbentes. Todos los métodos cuantitativos de análisis multicomponente se basan en el principio de que la absorbancia de una mezcla a cualquier longitud de onda es igual a la suma de las absorbancias de los componentes de la mezcla a dicha longitud de onda.

Este sencillo enfoque del análisis multicomponente se basa en medidas realizadas a diversas longitudes de onda (un número idéntico al número de componentes de la mezcla). Las longitudes de onda seleccionadas suelen las correspondientes al valor máximo de absorbancia de cada componente. Para la calibración, se mide la absorbancia de patrones de compuestos puros

y concentración conocida para determinar el coeficiente de extinción de cada componente para cada longitud de onda seleccionada. La absorbancia de la mezcla en cada longitud de onda es la suma de las absorbancias de los componentes en dicha longitud de onda, que a la vez depende del coeficiente de extinción y la concentración de cada componente. Por lo tanto, para dos componentes (x e y) las ecuaciones son las siguientes:

$$A'_{(x+y)} = A'_x + A'_y = e'_x bc_x + e'_y bc_y$$

y

$$A''_{(x+y)} = A''_x + A''_y = e''_x bc_x + e''_y bc_y$$

Donde:

- A' es la absorbancia a la longitud de onda '.
- A'' es la absorbancia a la longitud de onda ''.
- e' es la absorción molar a la longitud de onda '.
- e'' es la absorción molar a la longitud de onda ''.
- c es la concentración.
- b es la longitud del camino.

Estas ecuaciones pueden resolverse fácilmente para determinar la concentración de cada componente. Si las medidas siempre fuesen perfectas, se podrían obtener resultados precisos y perfectos incluso para mezclas complejas de componentes con espectros muy similares. No obstante, en la práctica siempre se producen errores de medida. Dichos errores pueden influir sensiblemente en la precisión de los resultados si existe una superposición espectral importante. La Figura 41 muestra una simulación de una mezcla bicomponente sin superposición de los espectros en el valor máximo de absorbancia.

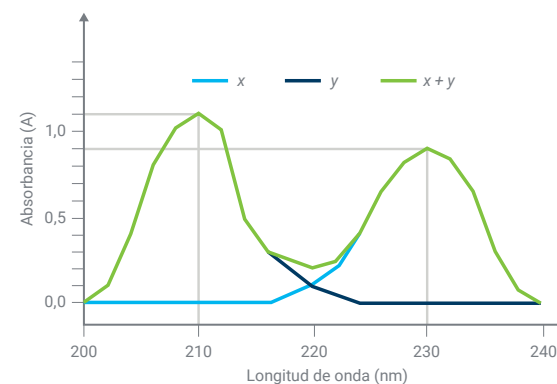


Figura 41. Una mezcla bicomponente con una superposición espectral escasa.

En cambio, la Figura 42 muestra una simulación de una mezcla bicomponente con una superposición significativa de los espectros en el valor máximo de absorbancia.

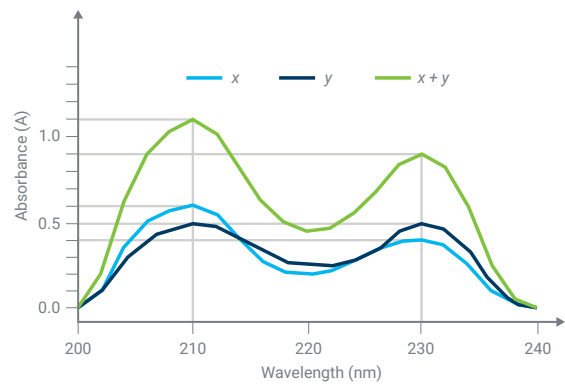


Figura 42. Una mezcla bicomponente con una superposición espectral significativa.

Con superposición espectral escasa	Con superposición espectral sustancial
$A'(x+y) = 1,1 + 0,0 = 1,1$	$A'(x+y) = 0,6 + 0,5 = 1,1$
$A''(x+y) = 0,0 + 0,9 = 0,9$	$A''(x+y) = 0,4 + 0,5 = 0,9$

Para una mezcla de x e y donde $c_x = c_y = 1$, las absorbancias medidas deben ser las siguientes:

Si se produce un error del 10 % en la medida de $A'_{(x+y)}$ y $A''_{(x+y)}$, es decir, $A'_{(x+y)} = 0,99$ (- 10 %) y $A''_{(x+y)} = 0,99$ (+ 10 %), los cálculos cuantitativos darán los resultados que se muestran en la Tabla 6:

Tabla 6. Comparación de los resultados del análisis multicomponente para ejemplos con superposición espectral escasa y sustancial.

Compuesto	Concentración nominal	Concentración calculada	Superposición espectral escasa		Superposición espectral sustancial	
			% error		Concentración calculada	% error
x	1	0,9	-10 %		0,0	-100 %
y	1	1,1	+10 %		1,98	+98 %

Método de los mínimos cuadrados

El efecto del ruido aleatorio puede reducirse mediante el uso de información espectral adicional; es decir, se puede usar un conjunto de puntos de datos para la cuantificación, en lugar de solo dos puntos. En este sistema, denominado sobredeterminado, un ajuste de mínimos cuadrados de los espectros del patrón de la muestra medida generará resultados cuantitativos (1,2). La Figura 43 muestra un espectro de la mezcla bicomponente que se presenta en la Figura 42 con un error aleatorio del 10 % en cada punto de medida.

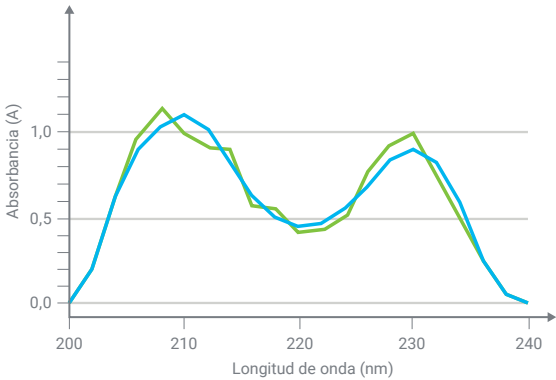


Figura 43. Espectro de una mezcla con un error aleatorio del 10 % en cada longitud de onda.

Con 21 puntos de datos (intervalos de 2 nm entre 200 y 240 nm), los resultados cuantitativos del método de los mínimos cuadrados tendrán un error < 1 %, en comparación con el error de alrededor del 100 % de las medidas habituales a las dos longitudes de onda, tal como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Comparación de los resultados del análisis multicomponente para los métodos de las ecuaciones simultáneas simples y de los mínimos cuadrados.

Compuesto	Concentración nominal	Concentración calculada	Solo para 210 y 230 nm		Para 200-240 nm	
			% error		Concentración calculada	% error
x	1	0,0	-100 %		1,003	+0,3 %
y	1	1,98	+98 %		0,995	-0,5 %

Este método posibilita el análisis de muestras más complejas y de mezclas sencillas de componentes con espectros similares. El residuo del cálculo de los mínimos cuadrados es un buen indicador de la bondad del ajuste de los espectros del patrón de la muestra; y, por lo tanto, un buen indicador de la precisión probable de los resultados.

Un ejemplo de análisis multicomponente es la cuantificación de cinco hemoglobinas en sangre con una preparación mínima de las muestras (3). La Figura 44 muestra los espectros de absorción de derivados de la hemoglobina. Este análisis se realizaba anteriormente mediante diversas técnicas analíticas, incluidas la espectroscopia y la valoración.

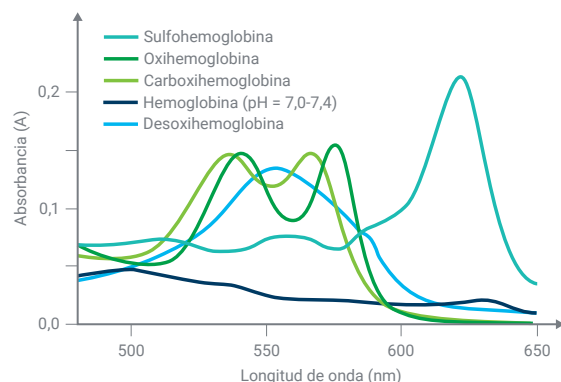


Figura 44. Espectros de absorción de derivados de la hemoglobina.

Otros métodos

Entre otros posibles enfoques estadísticos del análisis multicomponente se incluyen el método de los mínimos cuadrados parciales (PLS), la regresión sobre componentes principales (PCR) y el método de los mínimos cuadrados múltiples (MLS). En teoría, estos métodos ofrecen algunas ventajas frente a los descritos anteriormente; sin embargo, el proceso de calibración puede ser mucho más complejo.

Requisitos de las muestras

Los métodos de las ecuaciones simultáneas simples y los mínimos cuadrados ofrecen resultados precisos únicamente si la calibración se lleva a cabo con patrones puros o mezclas de patrones para cada componente de la muestra que contribuya al espectro UV-visible. Las muestras desconocidas no deben presentar ningún tipo de capacidad adicional de absorción.

Requisitos de los instrumentos

La cuantificación monocomponente se suele realizar por medio de la medición con un mismo instrumento un patrón o un conjunto de patrones y, a continuación, una muestra desconocida. Este proceso de calibración debe eliminar el sesgo instrumental, haciendo que la precisión absoluta de la longitud de onda y la precisión fotométrica absoluta sean relativamente poco importantes. Por otra parte, la reproducibilidad fotométrica resulta esencial para obtener resultados precisos. Si las medidas se llevan a cabo únicamente para el valor máximo de absorbancia, la reproducibilidad de la longitud de onda también tendrá escasa importancia, ya que la tasa de cambio de la absorbancia en función de la longitud de onda es baja. No obstante, si se utiliza una longitud de onda en el extremo de la banda, la reproducibilidad de las longitudes de onda será especialmente importante. Por último, el rango lineal del instrumento es crucial, ya que el proceso de calibración se basa en una relación lineal. Para que los análisis multicomponente sean precisos, se requiere una excelente relación señal-ruido, sobre todo si se utiliza el método de las ecuaciones simultáneas simples. En el método de los mínimos cuadrados, los datos de los lados de las bandas de absorbancia se incorporan al cálculo, lo que hace que sea igualmente necesaria una excelente reproducibilidad de las longitudes de onda. Asimismo, debido a que se requieren más datos, el barrido debe ser rápido por motivos de productividad.

4.9 Requisitos de software

Hay disponible software especial para análisis multicomponente para ayudar a crear modelos de datos para analizar los datos adquiridos. Estos paquetes de software pueden integrarse en el software de control instrumental y generación de informes o usarse como paquetes independientes. La mayoría de los sistemas UV-vis disponibles pueden exportar datos en un formato estándar que puede importarse en un paquete de software de análisis multicomponente para su procesamiento.

Referencias:

1. Kisner, H.; Brown, W.; Kavarnos, G. Multiple analytical frequencies and standards for the least-squares analysis of serum lipids. **Anal. Chem.** **1983**, *55*, 1703.
2. Maris M.; Brown, C.; Lavery, D. Nonlinear multicomponent analysis by infrared spectrophotometry. **Anal. Chem.** **1983**, *55*, 1694.
3. Zwart, A.; van Kampen, E.; Zijlstra, W. Multicomponent analysis of hemoglobin derivatives with a reversed-optics instrument. **Clin. Chem.**, **1984**, *30*, 373.



5. Glosario

absorbancia: 1. Característica de una sustancia que hace que absorba luz.
2. Unidad de absorbancia lumínica, representada por A o Abs.

arco (lámpara): Un arco eléctrico o voltaico genera luz en una atmósfera de gas inerte.

blanco: Disolvente o sustrato de la muestra, sin las especies absorbentes. A la hora de medir muestras líquidas, consistirá en una cubeta llena del disolvente (generalmente, agua). Después, la absorbancia del blanco se podrá sustraer de la absorbancia de la muestra para determinar la absorbancia asociada estrictamente a la muestra.

carotenoides: Cromóforos vinculados a la fotosíntesis en algunas plantas, algas y bacterias.

cero: Equivale a la función de tara en las básculas; hace que la lectura del instrumento pase a ser 0 Abs.

CRM: Abreviatura. Material de referencia certificado. Término que hace referencia a los patrones suministrados que se hayan certificado con un patrón primario con fines de comparación.

cromóforo: Parte de una molécula que absorbe luz.

cualitativa (medición): Medida que ofrece un resultado que permite definir o describir algo. P. ej., la identificación de una molécula en una solución.

cuantitativa (medición): Medida que genera un valor numérico (p. ej., una concentración).

cubeta: Una cubeta, también conocida comúnmente como celda, es un recipiente que contiene muestras líquidas. Hay disponibles cubetas con diferentes volúmenes y longitudes del camino óptico. El material de la cubeta determina su transparencia óptica.

dispersión: En el campo del diseño óptico, hace referencia a la capacidad de un dispositivo óptico para dividir la luz en sus longitudes de onda constituyentes. P. ej., la luz blanca que llega a un prisma forma un arco iris, debido a la dispersión.

dispersión: Efecto de rebote de la luz contra una superficie con ángulos aleatorios.

espectro: plural: espectros Rango de longitudes de onda. El espectro electromagnético. También hace referencia a una representación normalmente gráfica de la longitud de onda en función de la intensidad (o de la absorbancia, medida por un espectrofotómetro).

fluorescencia: Una forma de luminiscencia y una característica de algunas moléculas que absorben luz a una frecuencia y emiten luz de otra longitud de onda durante un breve período de tiempo.

GMP: Abreviatura. Buenas prácticas de fabricación. Se suele usar habitualmente en la industria farmacéutica y otras industrias reguladas dedicadas a la fabricación.

holográfica (óptica): Las ópticas holográficas se crean grabando un patrón de interferencia en una superficie óptica. Las ópticas holográficas pueden utilizarse en lugar de lentes, espejos y otros dispositivos ópticos. Su diseño hace que sean pequeñas, ligeras y fáciles de replicar de forma precisa.

farmacopea: Documento reglamentario en el que se recogen datos farmacéuticos y procedimientos de ensayo exigidos o recomendados para la industria farmacéutica.

fosforescencia: Una forma de luminiscencia relacionada con la fluorescencia. Algunas moléculas presentan la característica de que absorben luz a una frecuencia y emiten luz de otra longitud de onda con un cierto retardo.

fotoquímica (reacción): Reacción química provocada por la absorción de luz.

fotosensibilidad: Sensibilidad de una sustancia que hace que reaccione tras exponerla a la luz.

GC/CC: Abreviatura. Garantía de calidad y control de calidad.

línea base: Medida obtenida con los mismos parámetros que la medida de la muestra, pero sin añadir la muestra. Se suele utilizar un blanco para la medida de la línea base, ya que permite sustraer las contribuciones del instrumento, el disolvente, la cubeta, etc., de la medida de la muestra final.

óxidos de tierras raras: Los organismos de normalización y las farmacopeas indican el uso de óxidos de holmio, didimio y samario para medidas de validación de longitudes de onda.

Peltier: Es un dispositivo de calentamiento/enfriamiento accionado por un acoplamiento termoeléctrico. El dispositivo transfiere calor de uno de sus lados al otro. Puede permitir un control preciso de la temperatura de una muestra.

reflexión: Describe el fenómeno de rebote de la luz contra una superficie con un ángulo idéntico al de incidencia.

ruido: En términos espectrofotométricos, el ruido hace referencia a la señal eléctrica de fondo generada por el propio instrumento. Si es demasiado grande, puede ensombrecer la señal de la medida, haciendo que resulte difícil diferenciar entre ambas señales. Una forma sencilla de explicarlo es cuando uno mira las estrellas desde la ciudad, en vez de desde un lugar remoto. La luz de fondo ("ruido") generada por las luces de la ciudad dificulta ver las estrellas. En un lugar remoto apenas hay luz de fondo, por lo que la luz de las estrellas puede verse con facilidad.

SOP: Abreviatura. Procedimiento operativo estandarizado. Documento escrito para garantizar que las medidas puedan realizarse de forma segura y reproducible.

SST: Abreviatura. Pruebas de idoneidad del sistema. Pruebas para determinar la idoneidad del sistema para su uso.

transmitancia: Porcentaje de la luz incidente que se transmite a través de una muestra.

Más información:

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

Tienda en línea:

www.agilent.com/chem/store

Obtenga respuestas a sus preguntas técnicas y acceda a recursos en la Comunidad Agilent:

community.agilent.com

España

901 11 68 90

customercare_spain@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Asia-Pacífico

inquiry_lsca@agilent.com

DE-008895

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2025
Publicado en EE. UU., 19 de agosto de 2025
5980-1397ES