

Fundamentos de la espectrofotometría UV-Vis

Manual básico





Contenido

1	Principios básicos de la medición por espectrofotometría UV-Vis	3
1.1	El espectro electromagnético	3
1.2	Longitud de onda y frecuencia	3
1.3	Espectros de UV-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 por 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	El rango lineal de un instrumento UV-Vis <105/	19
3.9	Otra información útil	20
3.10	Longitud de onda o centímetros inversos	20
4	Resumen de las principales aplicaciones 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 de color	26
4.6	Cambios estructurales de los compuestos	28
4.7	Temperatura de fusión de proteínas y ácidos nucleicos	28
4.8	Análisis multicomponente	30
4.9	Requisitos de software	32
5	Glosario	34

1. Principios básicos de la medición por espectrofotometría UV-Vis

1.1 El espectro electromagnético

Las radiaciones ultravioleta (UV) y visible son una pequeña parte del espectro electromagnético, que incluye otras formas de radiación tales como ondas de radio, infrarrojos (IR), rayos cósmicos y rayos X.

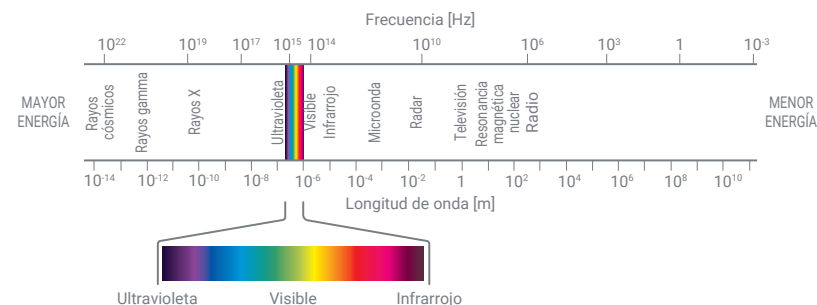


Figura 1. El espectro electromagnético, con la sección de luz visible ampliada.

La energía asociada a la radiación electromagnética se define como sigue:

$$E = h\nu$$

donde E es la energía (en julios), h es la constante de Planck (6.62×10^{-34} Js) y ν es la frecuencia (en segundos).

La espectroscopia permite el estudio de cómo la materia interactúa con la radiación electromagnética o la emite. Existen diferentes tipos de espectroscopia, según el rango de longitud de onda que se esté midiendo. La espectroscopia UV-Vis utiliza las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético. La espectroscopia infrarroja utiliza la parte del espectro infrarrojo de menor energía.

1.2 Longitud de onda y frecuencia

La radiación electromagnética se puede considerar una combinación de campos eléctrico y magnético alternantes que se desplaza por el espacio con un movimiento ondulatorio. Dado que la radiación actúa como una onda, se puede clasificar en términos de longitud de onda o bien de frecuencia, que se relacionan mediante la siguiente ecuación:

$$\nu = c/\lambda$$

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 expresa habitualmente en nanómetros (1 nm = 10^{-9} m). A partir de las ecuaciones, se deduce que la

radiación de menor longitud de onda es la que tiene más energía y, para el caso de la espectroscopia UV-Vis, la luz UV de longitud de onda baja (corta) es la que tiene más energía. En ocasiones, esta energía puede ser suficiente para provocar reacciones fotoquímicas indeseadas al medir muestras fotosensibles.

1.3 Espectros UV-Vis

Cuando la radiación interactúa con la materia, pueden producirse diversos procesos, como reflexión, dispersión, absorción, fluorescencia/fosforescencia (absorción y reemisión) y reacciones fotoquímicas (absorción y rotura de enlaces). Habitualmente, al medir muestras para determinar su espectro UV-visible, se mide la absorbancia.

Dado que la luz es una forma de energía, la absorción de luz por la materia hace que se incremente el contenido energético de las moléculas (o átomos) de la materia. La energía potencial total de una molécula se expresa como la suma de sus energías electrónica, vibracional y rotacional:

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

La cantidad de energía que posee una molécula en cada una de las formas no es un continuo, sino una serie de niveles o estados discretos. Las diferencias de energía entre los distintos estados se dan en este orden:

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

En algunas moléculas y átomos, los fotones incidentes de luz UV y visible tienen suficiente energía como para provocar transiciones entre los diferentes niveles de energía electrónicos. La longitud de onda de la luz absorbida tiene la energía necesaria para mover un electrón desde un nivel de energía inferior a uno superior. En la Figura 2 se muestra un ejemplo de transiciones electrónicas en el formaldehído y las longitudes de onda de la luz que las provocan.

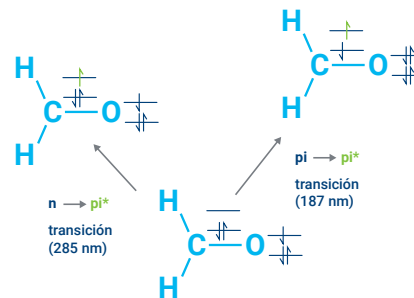


Figura 2. Transiciones electrónicas en el formaldehído. La luz UV de 187 nm provoca la excitación de un electrón del enlace C-O y la luz con una longitud de onda de 285 nm provoca la excitación y transferencia de un electrón desde el átomo de oxígeno al enlace C-O.

Estas transiciones originan bandas de absorción muy estrechas a longitudes de onda muy características de la diferencia en los niveles energéticos de la especie que absorbe. Esto también sucede para los átomos, como se ilustra en la Figura 3.

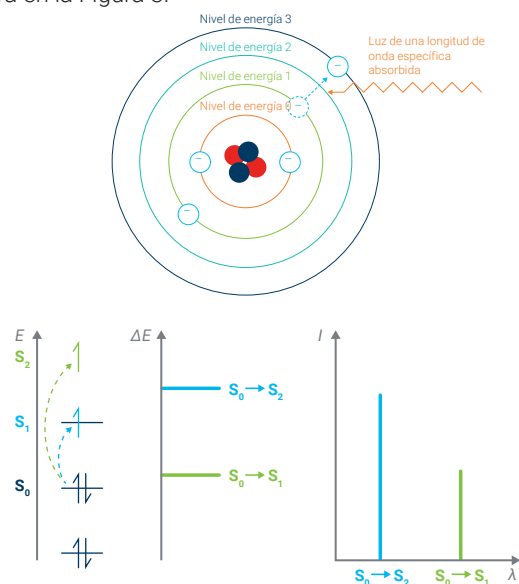


Figura 3. La luz incidente con una longitud de onda específica provoca la excitación de los electrones de un átomo. El tipo de átomo o ion (es decir, el elemento del que se trate) y los niveles de energía entre los que se mueve el electrón determinan la longitud de onda de la luz que se absorbe. Las transiciones pueden ser entre más de un nivel de energía, con más energía (es decir, menores longitudes de onda de la luz) necesaria para alejar más al electrón del núcleo.

Sin embargo, para las moléculas, los niveles de energía vibracionales y rotacionales se superponen sobre los niveles de energía electrónicos. Dado que pueden producirse numerosas transiciones con diferentes energías, las bandas aparecen ensanchadas (consulte la Figura 4). El ensanchamiento es aún mayor en disolución, debido a las interacciones soluto-disolvente.

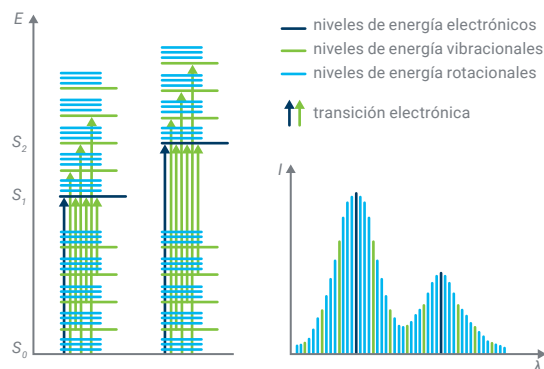


Figura 4. Transiciones electrónicas y espectros UV-visible en moléculas (I es la intensidad y λ , la longitud de onda).

1.4 Transmitancia y absorbancia

Cuando la luz pasa a través de una muestra o es reflejada por esta, 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 como la absorbancia. La transmitancia, o la luz que pasa a través de una muestra, suele darse como fracción de 1 o como porcentaje, y se define como sigue:

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

La absorbancia se define como sigue:

$$A = -\log T$$

En la mayor parte de las aplicaciones se utilizan los valores de absorbancia, pues la relación entre la absorbancia y tanto la concentración como la longitud del paso óptico es normalmente lineal (según la ley de Beer-Lambert, que se describe en la sección 1.9).

1.5 Resumen

- La luz UV y la luz visible forman 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 puede hacer que se produzcan reacciones fotoquímicas.
- La energía procedente de la luz incidente hace que los electrones pasen a niveles de energía diferentes. También se producen transiciones electrónicas entre los niveles de energía vibracionales y rotacionales de las moléculas.
- La absorbancia de la luz se utiliza en la mayoría de las aplicaciones de espectroscopia UV-VIS. Se define como $A = -\log T$, donde T es la transmitancia.

2. ¿Cómo funciona un espectrofotómetro UV/VIS moderno?

Los espectrofotómetros ultravioleta-visible (UV/VIS) utilizan una fuente de luz para iluminar una muestra con luz en el rango de longitudes de onda que va desde el UV hasta el visible (normalmente, de 190 a 900 nm). A continuación, los instrumentos miden la luz absorbida, transmitida o reflejada por la muestra en cada longitud de onda. Algunos espectrofotómetros tienen un rango de longitud de onda extendido, hasta el infrarrojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés) (de 800 a 3,200 nm).

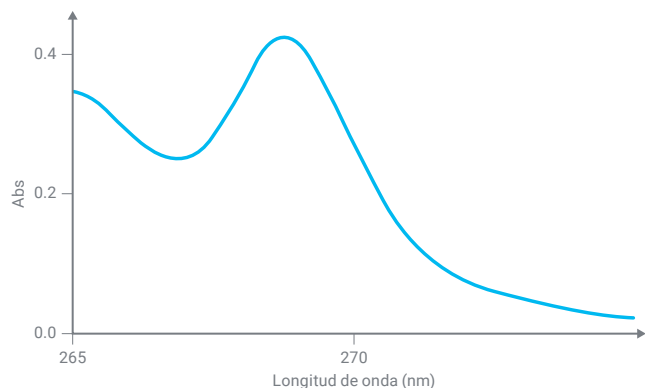


Figura 5. Un espectro de absorbancia UV, que muestra un pico de absorbancia a aproximadamente 269 nm.

A partir del espectro obtenido, como el mostrado en la Figura 5, es posible determinar las propiedades químicas o físicas de la muestra. En general, es posible:

- Identificar moléculas de una muestra sólida o líquida.
- Determinar la concentración de una molécula determinada en una disolución.
- Caracterizar la absorbancia o transmitancia a través 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.

Pueden llevarse a cabo diversos tipos de mediciones al combinar diferentes accesorios y soportes de muestras con el espectrofotómetro UV-Vis. Existen diferentes accesorios para diferentes capacidades de medición y tipos de muestras, por ejemplo, sólidos frente a líquidos, y para diferentes condiciones de medición (Figuras 6 y 7).



Figura 6. Se puede acoplar un accesorio de sonda de fibra óptica a un espectrofotómetro UV-Vis para medir muestras líquidas en distintos recipientes.

La espectrofotometría UV-Vis es una técnica versátil; se ha estado usando durante cerca de un siglo en un amplio abanico de campos. Los espectrofotómetros UV-Vis se utilizan de manera habitual en laboratorios de investigación y análisis de materiales, de química/petroquímica y biotecnológicos/farmacéuticos.

Figura 7. Una muestra sólida, como esta celda solar fotovoltaica policristalina, puede medirse utilizando un espectrofotómetro UV/VIS.



2.1 Diseño de instrumentos

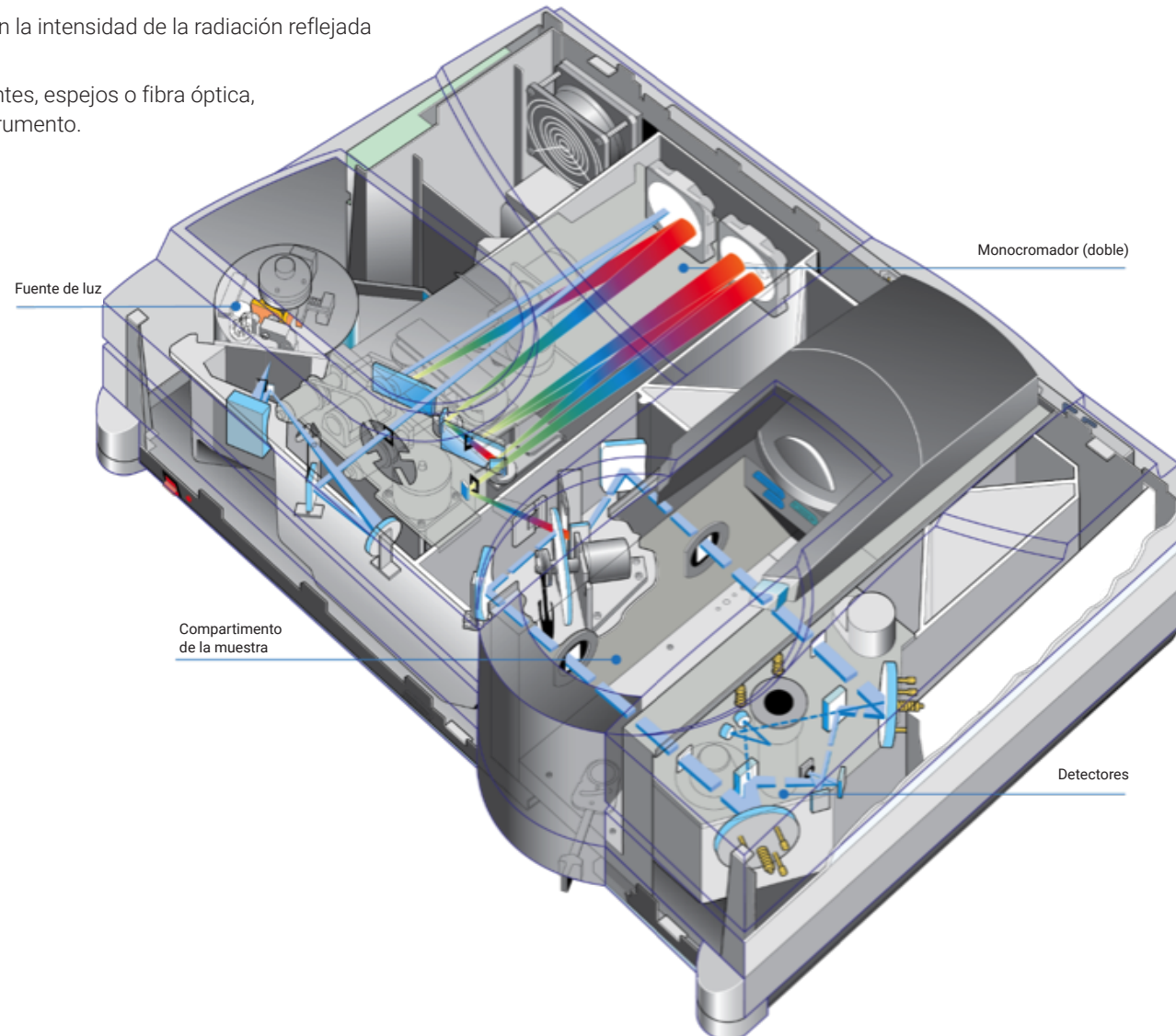
Componentes

Los componentes principales de un espectrofotómetro son:

- Una fuente de luz, que genera una banda ancha de radiación electromagnética en todo el espectro UV-visible.
- Un dispositivo de dispersión, que separa la radiación de banda ancha en longitudes de onda.
- Una superficie de la muestra, donde la luz pasa a través de una muestra o es reflejada por ella.
- Uno o varios detectores, que miden la intensidad de la radiación reflejada o transmitida.

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

Figura 8. Esquema de la distribución interna de un espectrofotómetro UV-Vis-NIR Cary 5000, donde se muestran los componentes principales. Debe tenerse en cuenta que se trata de un instrumento de gran rendimiento. Los espectrofotómetros UV-Vis para las mediciones rutinarias presentan un diseño óptico más sencillo.



Fuentes de luz

La fuente de luz ideal generaría una intensidad constante en todas las longitudes de onda con ruido bajo y estabilidad de la salida a largo plazo. Lamentablemente, no existe ninguna fuente con estas características. Históricamente se han utilizado dos fuentes de luz diferentes en los espectrofotómetros UV-visible:

- La lámpara de arco de deuterio se utilizaba para proporcionar un buen continuo de intensidades en la región UV e intensidad útil en la región visible.
- La lámpara de halógeno de wolframio conseguía buena intensidad en todo el rango visible y en parte del espectro UV.

Más recientemente, se utiliza ampliamente una sola lámpara de xenón pulsante. El uso de la lámpara de xenón pulsante como única fuente posee ventajas significativas con respecto al uso de las dos lámparas convencionales.

Lámpara de arco de deuterio (D_2)

La lámpara de arco de deuterio utiliza la descarga de arco procedente del deuterio gaseoso y origina un buen continuo de intensidades en la región UV e intensidad útil en la región visible, de 185 a 400 nm (consulte la Figura 9). Aunque las lámparas de arco de deuterio modernas tienen bajo ruido de la señal, el ruido de la lámpara suele ser el factor limitante en el rendimiento total de ruido del instrumento. Con el tiempo, la intensidad de la luz de la lámpara de arco de deuterio se va reduciendo progresivamente. Esta lámpara normalmente presenta una vida media (el tiempo necesario para que la intensidad decaiga a la mitad de su valor inicial) de unas 1,000 horas. Al ser tan reducida esta vida media, es necesario sustituir la lámpara de D_2 con relativa frecuencia.

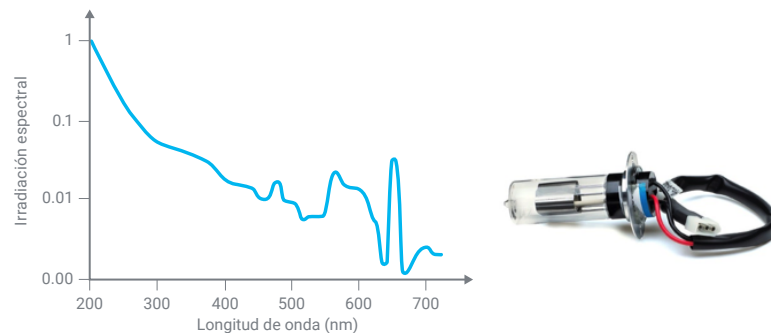


Figura 9. Espectro de intensidad de la lámpara de arco de deuterio.

Lámpara de halógeno de tungsteno

La lámpara de halógeno de tungsteno utiliza un filamento. Cuando pasa una corriente por el filamento, este se calienta y emite luz (consulte la Figura 10). La lámpara presenta una buena intensidad en parte del espectro UV y en todo el rango visible y NIR (350-3,000 nm). Este tipo de lámpara presenta muy bajo ruido y una deriva reducida; normalmente ofrece una vida funcional de 10,000 h.

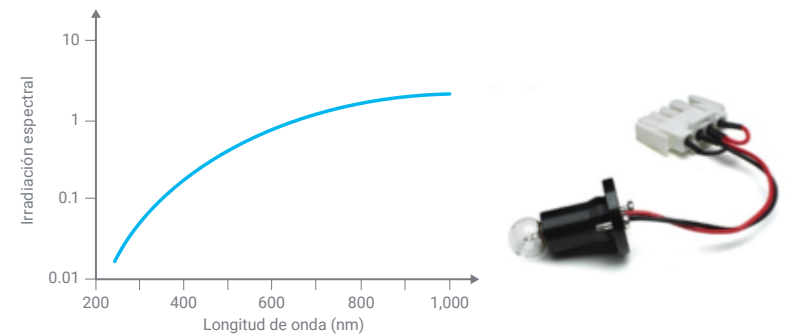


Figura 10. Espectro de intensidad de la lámpara de halógeno de tungsteno.

En aquellos espectrofotómetros UV-visible que utilizan tanto una lámpara de D_2 como una de halógeno de tungsteno, se usa un selector de fuente para cambiar de una lámpara a la otra según corresponda, o bien se mezcla la luz procedente de ambas fuentes para originar una sola fuente de banda ancha.

Lámpara de xenón pulsante

A diferencia de las lámparas de D_2 o de halógeno de tungsteno, que proporcionan una fuente de luz constante, la lámpara de xenón pulsante emite luz durante un período de tiempo extremadamente corto, a impulsos. Dado que solo emite durante un período de tiempo breve y que solo lo hace durante la medición de la muestra, su vida útil es muy prolongada. La muestra solo se irradia con luz en el momento de la medición. Gracias a este corto período de iluminación, la lámpara de xenón pulsante es idónea para medir muestras que puedan ser sensibles a la fotodegradación. Se puede observar fotodegradación en muestras sensibles expuestas, en una prolongada exposición, a una fuente de luz continua. La lámpara de xenón pulsante emite una luz de alta intensidad de 185-2,500 nm, por lo que no se precisa otra fuente de luz secundaria (Figura 11). La lámpara de xenón pulsante se puede utilizar durante muchos años sin necesidad de cambiarla, por lo que se trata de una opción muy popular en comparación con los sistemas que utilizan lámparas de D_2 o de halógeno de tungsteno. Además, presenta la ventaja de que no precisa un tiempo de calentamiento, a diferencia de las lámparas de D_2 o de halógeno de tungsteno.

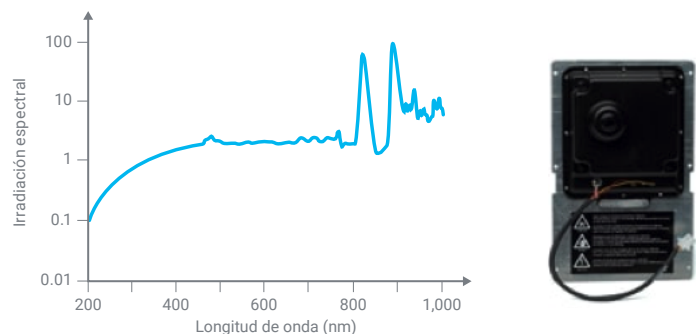


Figura 11. Espectro de intensidad de la lámpara de xenón.

El monocromador

Todas las fuentes de luz producen una luz blanca de amplio espectro. Para estrechar la luz a una banda de longitudes de onda seleccionada, la luz se hace pasar por un monocromador. El monocromador consta de:

- una rendija de entrada;
- un dispositivo de dispersión, que dispersa la luz en las diferentes longitudes de onda (como un arcoíris) y permite la selección de una determinada banda de longitudes de onda; y
- una rendija de salida, por donde pasa la luz de las longitudes de onda elegidas hasta llegar a la muestra.

Se puede comparar un monocromador con una habitación en la que entra la luz del sol por una ventana. La luz del sol atraviesa un prisma que separa la luz blanca en un arcoíris. El arcoíris se dirige a una ventana situada en el lado opuesto de la habitación. Según se gira el prisma, una luz de un color diferente; es decir, de una longitud de onda diferente, sale de la habitación a través de la ventana.

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

La mayor parte de los espectrofotómetros que se comercializan en la actualidad contienen lentes de difracción holográficas como dispositivo de dispersión. Estos componentes ópticos están hechos de vidrio, en cuya superficie se han grabado con precisión surcos extremadamente estrechos. Las dimensiones de los surcos son del mismo orden que la longitud de onda de la luz que se desea dispersar. Finalmente, se aplica un recubrimiento de aluminio para crear una superficie reflexiva.

La interferencia y difracción de la luz que llega a la lente de difracción se refleja en ángulos diferentes, dependiendo de la longitud de onda. Las lentes de difracción holográficas originan una dispersión angular lineal con la longitud de onda y no son sensibles a la temperatura. Sin embargo, reflejan la luz en órdenes diferentes, que se superponen (consulte la Figura 12). Debido a ello, es necesario el uso de filtros para garantizar que solo llegue al detector la luz procedente del orden de reflexión deseado. Una lente de difracción cóncava dispersa y enfoca la luz al mismo tiempo.

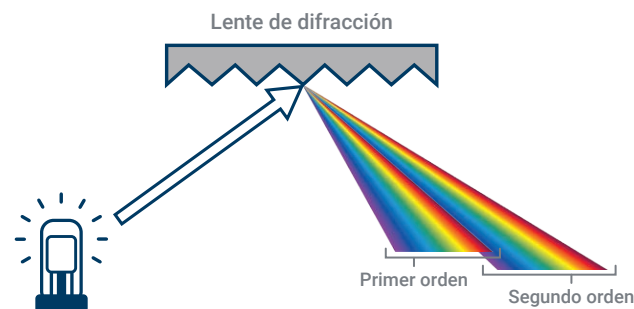


Figura 12. Modo en que una lente de difracción holográfica dispersa la luz blanca en luz de diferentes longitudes de onda.

Espectrofotómetros con un solo monocromador

Para la espectroscopia de uso general se utiliza un espectrofotómetro con un solo monocromador, que puede integrarse en un sistema óptico compacto. En la Figura 13 se muestra un diagrama esquemático de un sistema óptico con un solo monocromador. Los espectrofotómetros con un solo monocromador no pueden seleccionar las longitudes de onda de la luz de forma tan estrecha como los sistemas con doble monocromador; sin embargo, para muchas aplicaciones, como, por ejemplo, para medir muestras que presenten picos de absorción anchos, esta capacidad podría no ser necesaria.

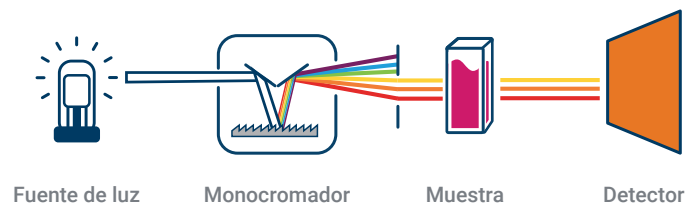


Figura 13. Espectrofotómetro con un solo monocromador.



Espectrofotómetros con doble monocromador

Los monocromadores dobles suelen encontrarse en los instrumentos de gran rendimiento. Los dos monocromadores se disponen en serie. La fuente de luz es dividida por el primer monocromador y, a continuación, vuelve a ser dividida por el segundo. De este modo se reduce la luz difusa (la luz que entra en el sistema de forma indeseada) y aumenta la precisión espectral (la capacidad de seleccionar con precisión una longitud de onda en particular). En la Figura 14 se muestra un diagrama esquemático de un sistema óptico con doble monocromador.

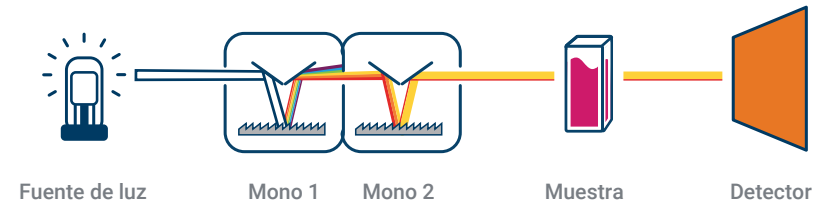


Figura 14. Diagrama esquemático de un espectrofotómetro con doble monocromador.

Compartimento de la muestra

En el compartimento de la muestra, la muestra se coloca de forma tal que el haz procedente del monocromador pase a través de ella. Para la medida de la absorbancia, las muestras líquidas normalmente se colocan en una cubeta con una longitud del camino fija y conocida. Una cubeta es un recipiente rectangular para líquidos, como se muestra en la Figura 15. Las cubetas están hechas de vidrio, cuarzo, plástico u otro material que transmita la luz UV o visible. Las cubetas estándares tienen una longitud del paso óptico de 10 mm y están hechas de cuarzo, para asegurar una buena transmitancia de las longitudes de onda UV. También se pueden usar cubetas de plástico, más económicas, pero en general no transmiten la luz UV, por lo que solo resultan útiles para medidas en la región de la longitud de onda visible. Están disponibles numerosas cubetas para aplicaciones especiales, desde cubetas para volúmenes muy pequeños de líquidos hasta las que cuentan con una longitud del paso óptico más largo para uso en muestras muy diluidas.



Figura 15. Cubetas para medir muestras líquidas. De izquierda a derecha: Una cubeta estándar de 3 ml con una longitud del paso óptico de 10 mm, una celda ultra micro para medir volúmenes muy pequeños y una cubeta de longitud del paso óptico largo para soluciones diluidas.

Las muestras sólidas se pueden mantener en su sitio para mediciones de transmisión sencillas. También se pueden medir con distintos ángulos de incidencia. Para mediciones más complejas, como la transmisión o reflectancia difusa, se pueden instalar otros accesorios en el compartimento de la muestra.

Espectrofotómetro de un solo haz

El espectrofotómetro UV-Vis más sencillo cuenta con un sistema óptico de un solo haz. En los sistemas de un solo haz, la luz procedente del monocromador pasa a través de la muestra y, a continuación, se dirige al detector. Con este sencillo diseño se utilizan menos componentes ópticos y se puede reducir el tamaño del instrumento y, en consecuencia, su costo.

Sin embargo, antes de medir una muestra es necesario medir una línea base o una muestra en blanco. Para las medidas de líquidos, se toma la lectura de la línea base para tener en cuenta la posible absorbancia de la cubeta y del disolvente empleados. En los sistemas de un solo haz es necesario medir la línea base de manera independiente de la muestra. Como las lecturas son independientes, si hubiera una variación en la intensidad de la luz o en el rendimiento del sistema óptico entre la línea base y la muestra que se lee, la medida podría ser menos precisa. Esta imprecisión es un problema para las mediciones de muestras que lleven mucho tiempo o en las que el blanco pueda variar con el tiempo. En la práctica, esto supone que la medición de la línea base o del blanco debe realizarse frecuentemente y de manera periódica durante una sesión de medición si se utiliza un sistema de un solo haz.

Espectrofotómetro de doble haz

Muchos sistemas UV-Vis utilizan un sistema óptico de doble haz. En este tipo de sistemas, la luz emitida desde el monocromador se divide en dos haces: uno de referencia y otro para la muestra. La luz habitualmente se divide con un componente óptico tal como una rueda giratoria que tiene un segmento con espejo, o bien un espejo medio-plateado llamado divisor de haz. Cada haz entra en la cámara de la muestra siguiendo un paso de luz diferente. Dado que están disponibles dos haces de la misma longitud de onda, se pueden medir al mismo tiempo la referencia o el blanco y la muestra. Gracias a ello, la medición de la muestra se puede corregir en tiempo real si se producen fluctuaciones del instrumento. Esta corrección en tiempo real permite obtener medidas muy precisas.

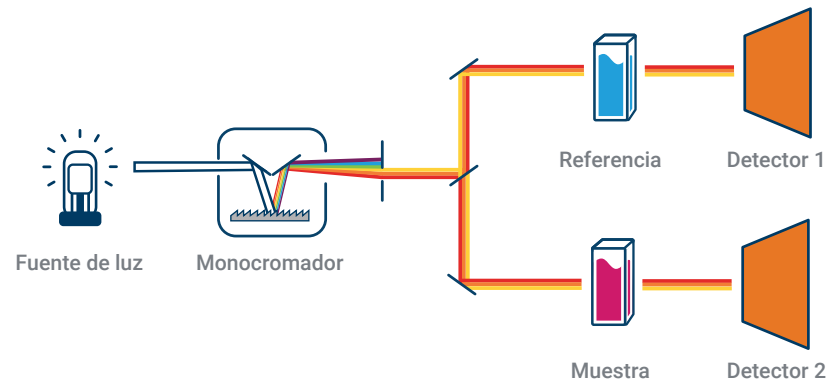


Figura 16. Diagrama esquemático de un sistema óptico de doble haz, con detectores duales.

Espectrofotómetro de haz dual

En otro diseño de espectrofotómetro más reciente se utiliza una disposición óptica de haz dual con un detector de la muestra y uno 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 el blanco (para el caso de una muestra sólida) se miden en la posición de la muestra y posteriormente se restan del espectro de la muestra tras su adquisición. Con mejoras en la electrónica y en el software, este diseño ofrece un proceso de medición sencillo y reduce la posibilidad de errores del usuario por usar una cubeta errónea o por colocar la muestra incorrectamente. El diseño de haz dual tiene el mismo rendimiento que el de los instrumentos de haz doble de rutina, mientras que el diseño de doble haz está reservado normalmente para instrumentos de investigación.

Compartimento de la muestra

El compartimento de la muestra de un espectrofotómetro UV-Vis normalmente es una caja de color negro con una tapa de cierre. El negro mate situado en el interior del compartimento ayuda a absorber la luz difusa que pueda entrar en el compartimento.

En el compartimento de la muestra, la muestra se coloca de forma tal que el haz procedente del monocromador pase a través de ella. Como se ha comentado anteriormente, se emplean cubetas de vidrio, plástico o cuarzo (Figura 15) para las muestras líquidas. Las muestras sólidas se sostienen en su posición mediante un soporte acoplado a la parte inferior del compartimento de la muestra. La luz también puede salir del compartimento de la muestra mediante fibra óptica. La fibra óptica resulta útil cuando se miden muestras muy grandes, calientes, frías, radioactivas o peligrosas. Como se muestra en la Figura 6, la fibra óptica puede conducir la luz procedente del espectrofotómetro a través de una sonda de fibra óptica con el fin de medir soluciones fuera del compartimento de la muestra. Como alternativa, se puede emplear un dispositivo de fibra óptica que permita la medida de la reflectancia, fluorescencia o transmisión de la luz a través de una muestra sólida.

El detector

El 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 habitualmente contienen un detector de tubo fotomultiplicador o bien uno de fotodiodos. Los sistemas de gran rendimiento incluyen otros detectores especiales para mejorar la cobertura de longitudes de onda o la sensibilidad.

Cada detector posee una sensibilidad y un rango de longitud de onda diferentes. En el caso de los sistemas con varios detectores, el sistema cambiará al detector correspondiente en el rango de longitud de onda necesario para la medición.

Tubo fotomultiplicador (PMT)

El tubo fotomultiplicador (Figura 17) combina la conversión de señal con varias etapas de amplificación dentro del cuerpo del tubo. La naturaleza del material del cátodo determina la sensibilidad espectral. Un solo tubo fotomultiplicador proporciona una buena sensibilidad en todo el rango UV-visible, de 200 a 900 nm. El detector de tubo fotomultiplicador proporciona alta sensibilidad a bajos niveles de luz. Para las muestras diluidas, la mayor parte de la luz que incide en la muestra pasa por el detector. Para detectar con precisión pequeñas diferencias entre las mediciones del blanco y de la muestra, el detector debe tener baja señal a ruido a estos niveles de alta intensidad de luz.

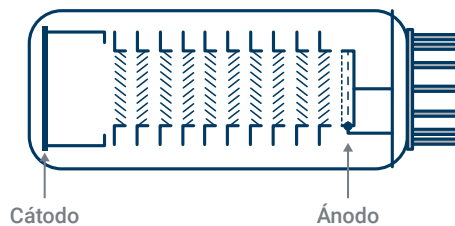


Figura 17. Un detector de tubo fotomultiplicador.

Diodo de silicio (Si)

En los espectrofotómetros modernos se emplean habitualmente detectores de fotodiodos de silicio (Figura 18). Los detectores de fotodiodos tienen un rango dinámico más amplio y son más robustos que los de tubo fotomultiplicador. En el fotodiodo, la luz que llega al material semiconductor permite a los electrones fluir a través de él, y por lo tanto se descarga el condensador conectado a lo largo del material. La cantidad de carga necesaria para recargar el condensador a intervalos regulares es proporcional a la intensidad de la luz. Los límites de detección para los detectores de silicio son de aproximadamente 170 a 1,100 nm.

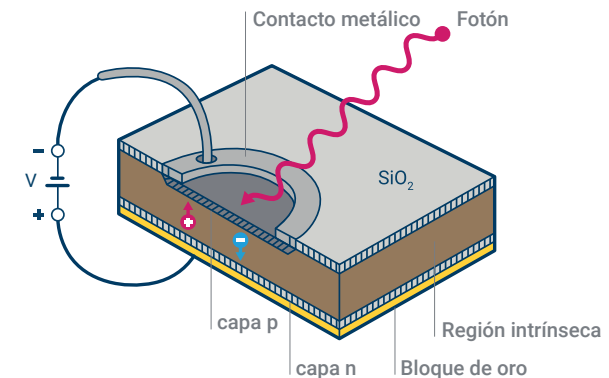


Figura 18. Un detector de fotodiodos de silicio.

Fotodiodo de arseniuro de indio y galio (InGaAs)

El detector de InGaAs es un detector especializado que proporciona un rendimiento excelente para el rango de longitud de onda visible y NIR. Los detectores de InGaAs están disponibles en las opciones de banda estrecha (de 800 a 1,700 nm) y banda ancha (de 800 a 2,500 nm). Estos detectores resultan útiles para su respuesta lineal y sensibilidad en la región de infrarrojo cercano.

Detector de sulfuro de plomo (PbS)

El detector NIR más usado en los espectrofotómetros es el detector de PbS. Este detector es sensible entre 1,000 y 3,500 nm. En espectrofotómetros de rango amplio de longitud de onda y gran rendimiento, el detector de PbS se combina con frecuencia con un detector de tubo fotomultiplicador para la cobertura UV-visible. Si se precisa una alta sensibilidad en las bajas frecuencias de NIR, un detector de PbS podría combinarse con un detector de InGaAs de banda estrecha.

3. Selección de los parámetros óptimos para las mediciones por medidas UV-Vis

La selección del soporte de muestras, el disolvente y los parámetros del instrumento más adecuados es esencial para el éxito de la medición.

3.1 Selección de la celda óptica

Las muestras líquidas suelen estar contenidas en una cubeta (que es otro nombre para una celda óptica, o simplemente "celda"). Las cubetas están disponibles en una gran variedad de diseños para adaptarse a la aplicación. Entre estas se incluyen las siguientes:

- Una celda óptica "estándar" de 10 mm de longitud del paso óptico (consulte la Figura 15). Con una capacidad de unos 3.5 ml, la celda tiene dos ventanas ópticas, paralelas entre sí. Normalmente, las otras caras están esmeriladas o presentan surcos, para indicar que son estas caras las que deben usarse para manipular la celda. Las ventanas ópticas deben mantenerse lo más limpias posibles y no tocarse en ningún momento. Evite arañar las superficies ópticas cuando no se utilicen. También están disponibles celdas desechables de uso limitado. Estas se fabrican con poliestireno o metacrilato de polimetilo (PMMA) y no se pueden usar a temperaturas elevadas. El poliestireno no transmite la luz UV, por lo que solo se pueden realizar mediciones entre 340 y 800 nm. Las celdas de PMMA se pueden usar desde 300 nm.
- Para volúmenes pequeños, hasta unos 0.5 ml, se puede usar una celda semi-micro. Esta celda presenta dimensiones externas similares a las de una celda estándar, pero tiene un canal más estrecho en su parte interior para reducir el volumen de muestra requerido. También están disponibles celdas ultra micro, con un volumen de tan solo 0.5 μ l. El color negro que enmascara cualquiera de las caras de la ventana óptica (como se muestra en la Figura 19 y en la Figura 20) evita el reflejo interno dentro de la cubeta. Es necesario tener cuidado para asegurarse de que las celdas estén alineadas con la altura óptica del haz en el instrumento UV-Vis. Esto se denomina la altura Z. La altura Z es una medida desde la base de la cubeta hasta el centro de la longitud del paso óptico.

Las celdas semi o ultra micro son útiles cuando el volumen de muestra es limitado.

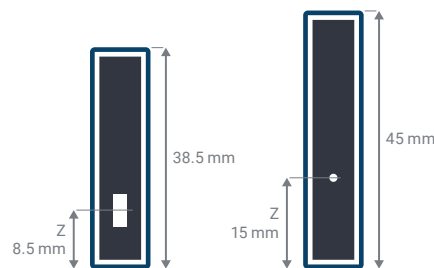


Figura 19. Las cubetas "enmascaradas" aseguran que el haz óptico pase a través de la muestra. Es esencial asegurar que la altura Z de la cubeta sea compatible con el diseño del espectrofotómetro UV-Vis.



Figura 20. Una celda semi-micro de 1.4 ml de volumen y 10 mm de longitud del paso óptico.

Para medir múltiples muestras líquidas, se puede usar una celda de flujo continuo. Las celdas de flujo continuo también están disponibles en una gran variedad de volúmenes internos y longitudes del paso óptico. Las celdas habitualmente están conectadas a una bomba peristáltica y se pueden conectar a un muestreador automático. La bomba empuja la muestra a través de los tubos conectados a la celda, llenando la celda para la medición. A continuación se empuja una solución de lavado para limpiar la celda antes de que se bombee la siguiente muestra a la celda.



Figura 21. Celda de flujo, con aberturas rectangulares de 4 x 11 mm y longitud del paso óptico de 10 mm. Se muestra con conectores y tubos.

La mayoría de las celdas ópticas se proporcionan con una tapa. La tapa está diseñada para reducir tanto el derrame accidental como la evaporación de la muestra. Es muy recomendable usar una tapa al medir muestras volátiles o peligrosas.

Longitudes del paso óptico de la celda

La longitud del paso óptico es la distancia que recorre la luz incidental a través de una muestra. Se encuentran disponibles cubetas con diferentes longitudes del paso óptico. La longitud del paso óptico que debe usar depende de la absorbancia de la muestra:

- Las muestras concentradas con alta absorbancia (>3 Abs) necesitan una cubeta de longitud del paso óptico corto (menor o igual que 5 mm); de lo contrario, deberán diluirse. Las cubetas de longitud del paso óptico corto también se pueden usar para compensar los disolventes con absorbancia alta.
- Las muestras diluidas con baja absorbancia (<0.2 Abs) necesitan una celda de longitud del paso óptico largo (hasta 100 mm), lo que aumentará la lectura de absorbancia. Esto también puede ayudar a reducir el nivel de error.

La mayoría de los sistemas de espectrofotómetros UV-Vis se proporcionan con un soporte de cubeta adecuado para una cubeta estándar con una longitud del paso óptico de 10 mm. Las cubetas de mayor longitud del paso óptico precisarán un soporte adecuado para celdas de longitud del paso óptico largo.

Están disponibles celdas de longitud del paso óptico más corto con las mismas dimensiones que la cubeta estándar de 10 mm de longitud del paso óptico. Estas se adaptan al soporte para celdas estándar suministrado con el instrumento. También están disponibles espaciadores de celdas para ajustar de manera segura una cubeta de longitud del paso óptico más corto.

Material

Es necesario tener en cuenta las propiedades ópticas del material usado en las ventanas de la cubeta. Para el rango de longitud de onda más amplio, se prefiere el vidrio de cuarzo. Como el vidrio de cuarzo es más caro, se puede usar vidrio óptico o plástico (poliestireno) si no se requieren mediciones por debajo de 340 nm (poliestireno) o 350 nm (vidrio óptico). Las celdas de poliestireno no son adecuadas para su uso a temperaturas elevadas. También se debe tener cuidado al usar celdas de poliestireno para asegurar que las muestras o los disolventes no dañen las celdas. Las celdas de poliestireno suelen denominarse desechables, o celdas de plástico. Se arañan con facilidad y están diseñadas para un solo uso. En la Tabla 1 se muestra la transmisión de materiales habituales sobre el rango de longitud de onda UV a NIR.

Tabla 1. Ventanas de transparencia para materiales de cubeta habituales.

Material	Longitud de onda adecuada (nm)
Cuarzo	170-2,700
Cuarzo Infrasil (NIR)	220-3,800
Vidrio óptico	334-2,500
Poliestireno (cubetas desechables)	340-800

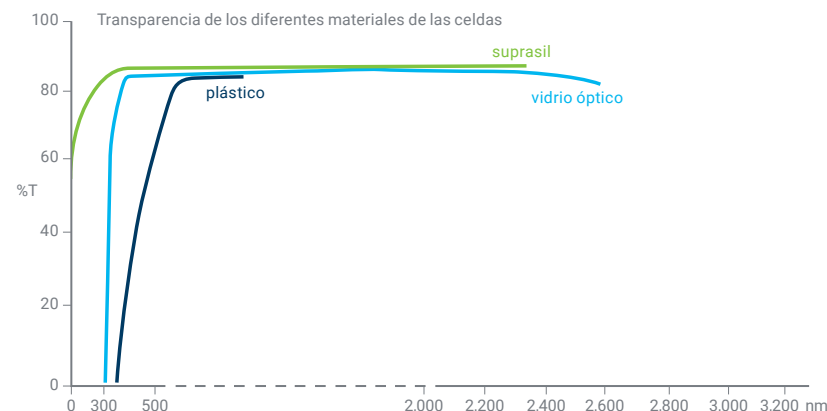


Figura 22. Transparencia de los materiales habituales de las celdas ópticas.

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 proporcionen lecturas similares de absorbancia o transmitancia cuando estén vacías o llenas con agua. El código de emparejamiento es similar a un número de lote. Refleja las características de transmisión del lote (fundición) de la materia prima a partir de la cual se fabrican las cubetas.

Para que un par de cubetas esté emparejado, debe estar dentro de la tolerancia de transmisión aceptable a una longitud de onda determinada. Por ejemplo, un par debe transmitir con una diferencia máxima del 1.5 % entre sí a 200 nm. Los fabricantes de cubetas especifican las tolerancias de emparejamiento de transmisión a las longitudes de onda medidas para los materiales que suministran.

Los códigos de emparejamiento únicamente tienen valor real cuando se comparan celdas nuevas. Las características de transmisión cambian durante el uso por la contaminación de superficies o por el desgaste debido a los procesos de limpieza o a una manipulación inadecuada. En consecuencia, una celda nueva no se emparejará necesariamente con una celda usada antigua que presente el mismo código de emparejamiento.

Las técnicas modernas de fabricación y fundición han mejorado las tolerancias en cuanto a carácter plano, paralelismo y construcción. Sumado a que se presta mayor atención a la garantía de calidad de las materias primas, esto ha eliminado virtualmente la necesidad de emparejamiento de la transmisión en las celdas de cuarzo estándar de alta calidad.

Limpieza

La grasa de las huellas dactilares es muy absorbente en la región UV. Las huellas dactilares que se dejan en las superficies ópticas pueden provocar resultados erróneos. Limpie todas las huellas dactilares y contaminantes con un paño suave limpio antes de usar una celda. Asegúrese de que el paño esté libre de detergentes o lubricantes. Los pañuelos de papel para gafas y otros usos contienen a menudo detergentes o lubricantes que pueden afectar las medidas.

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

Deben evitarse los ácidos fluorados, como el ácido fluorhídrico (HF), en todas sus concentraciones, pues atacan el cuarzo y el vidrio. Las soluciones de base fuerte (pH 9.0 y superiores) también degradan la superficie de las ventanas y reducen la vida útil de la cubeta.

Una vez medido un blanco, evite limpiar las ventanas ópticas de la celda. Si es necesario limpiarlas, lleve a cabo una nueva medición del blanco antes de continuar con la medición.

Otras sugerencias para la manipulación de cubetas

Se pueden realizar otros sencillos pasos para prolongar la vida útil de las cubetas:

- Recuerde retirar las muestras de las cubetas inmediatamente tras su uso. Así evitará que la muestra se seque y quede adherida a la cubeta. Tenga cuidado en particular con las proteínas y los colorantes fuertes, pues se sabe que se adhieren a las superficies internas de la cubeta. Retire este tipo de muestras de la celda inmediatamente después de su análisis y lave a fondo con disolvente entre una muestra y otra.
- Si va a medir la misma muestra durante un período de tiempo prolongado, mantenga la muestra tapada y a una temperatura adecuada para minimizar la evaporación. Algunas muestras precisan una agitación constante.
- Limpie todas las cubetas exhaustivamente al final de cada día y:
 - consérvelas en un recipiente adecuado después de secarlas, o bien,
 - consérvelas húmedas en una solución ácida suave (ácido nítrico o ácido clorhídrico al 1 %) en un recipiente resistente a los ácidos. Para evitar astillar las cubetas, solo debe guardar una cubeta en cada recipiente. Lave siempre con agua abundante inmediatamente antes de su siguiente uso.



Medición de las pantallas de los teléfonos celulares

Los diseñadores de las pantallas que se utilizan en teléfonos celulares, tablets, computadoras portátiles y televisores se esfuerzan en hacerlas lo más finas posibles. Reducir el grosor incluso en decenas de micrones puede suponer una diferencia significativa en la reducción del tamaño global de un dispositivo. Estas pantallas utilizan diodos emisores de luz (LED) y pantallas de cristal líquido (LCD) para controlar los colores de la pantalla, con un reflector de retroiluminación que aporta la iluminación. Los reflectores de retroiluminación habitualmente se fabrican con un material polimérico transparente al que se aplica una película reflectora en una superficie. Se parecen a una lámina de espejo de plástico. Medir la reflectancia y transmisión del reflector de retroiluminación es una parte esencial para el desarrollo de un diseño nuevo. También es una importante medida de control de calidad durante su fabricación. La reflectancia y transmisión de un reflector de retroiluminación se miden con un espectrofotómetro UV-VIS. El reflector de retroiluminación se monta verticalmente en el compartimento de la muestra y se gira alrededor de su eje central, permitiendo la medida de su reflectancia y transmisión con diferentes ángulos de incidencia.

[Aquí puede consultar los detalles de la medida](#)

3.2 Termostatación de las muestras

Muchas muestras pueden medirse a temperatura ambiente, pero hay ciertas circunstancias que requieren que las muestras se calienten o se enfríen. Entre estas se incluyen las siguientes:

- Enfriamiento de muestras volátiles para reducir la evaporación.
- Calentamiento de muestras viscosas para mejorar la manipulación o la homogeneidad de las muestras.
- Muestras sensibles a cambios químicos cuando se calientan.
- Observación de los cambios en las muestras cuando se calientan o enfrían.

Los espectrofotómetros UV-Vis pueden estar equipados con accesorios que permiten controlar la temperatura de las muestras. Los sistemas de control de la temperatura más sencillos son adecuados para las medidas a temperatura fija. Normalmente, estos sistemas utilizan un circulador de agua termostatación para hacer pasar agua caliente a través de un colector que sostiene la cubeta de la muestra. Para un control más preciso de la temperatura, un calentador/refrigerador Peltier se incorpora en el colector de muestras. Los dispositivos Peltier permiten un mayor control de la temperatura; también permiten realizar mediciones en rampas de temperatura. Un sistema Peltier refrigerado por aire requiere menos mantenimiento que uno refrigerado por agua o que un sistema de circulación de agua. Los sistemas con agua circulante precisan mantenimiento periódico, como comprobar si hay fugas en las mangueras de agua y rellenar la solución refrigerante. Otra ventaja del sistema Peltier es que su funcionamiento es silencioso, pues no es necesario bombear solución refrigerante.

Cuando utilice cualquiera de las opciones para el control de la temperatura, el sistema deberá proporcionarle la monitorización de temperatura. Como mínimo, el sistema debe informar la temperatura del colector de muestras. Esto es particularmente importante para un sistema calentado con agua externa. Pueden producirse pérdidas de calor debido a la temperatura ajustada en el baño de agua entre el circulador y el colector de muestras. Para los sistemas controlados mediante Peltier, la temperatura del colector de muestras se monitoriza y proporciona información para mantener la temperatura estable.

Cuando el control de la temperatura resulte esencial, tomar medidas de la muestra directamente proporciona una lectura más precisa. Se insertan pequeñas sondas de temperatura en la muestra, dentro de la cubeta. Las sondas se colocan cuidadosamente fuera del paso de luz. Al monitorizar la temperatura directamente en las muestras, el software de control UV-Vis debe permitirle registrar la temperatura de cada cubeta en cada medida.

3.3 Agitación de la muestra

La agitación de una muestra termostatación es importante y asegura que se mantenga siempre homogénea la temperatura de las soluciones. La agitación cobra particular importancia en el caso de las muestras viscosas o para asegurar la mezcla homogénea de una solución si se estudia una reacción química dentro de la cubeta.

La eficacia de la agitación para conseguir la homogeneidad térmica (y química) depende principalmente de la muestra, del disolvente y de la viscosidad de la disolución. Es importante recordar que la viscosidad cambia con la temperatura, y que esto puede afectar la eficiencia de la agitación, así como las mediciones, cuando se realizan rampas ascendentes de temperatura con el tiempo.

Para agitar disoluciones, se coloca un agitador magnético en el fondo de la cubeta de la muestra. Se encuentran disponibles cubetas especialmente diseñadas con una base ahuecada. Este hueco circular contiene el agitador y aumenta la eficiencia de la agitación.

Debe tenerse cuidado al desarrollar el método analítico para garantizar que la velocidad de la agitación sea adecuada para las disoluciones. Si la velocidad de agitación es demasiado baja, la muestra podría no mezclarse correctamente. Si es demasiado alta, podrían quedar atrapadas burbujas de aire en la muestra, originando resultados erróneos.

Se recomienda llevar a cabo experimentos de prueba en todas las muestras hasta encontrar la velocidad de agitación óptima para el experimento. Cuando se miden líquidos de viscosidad similar a la del agua, las velocidades de agitación de 800 a 900 rpm suelen producir la mejor uniformidad de temperatura en las cubetas estándar. Reduzca la velocidad de agitación para las muestras de mayor viscosidad y aumentela para las de menor viscosidad.

3.4 Mediciones a bajas temperaturas

Cuando se miden muestras a una temperatura inferior a la del ambiente, puede formarse condensación en la parte 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 un gas limpio y seco. Algunos sistemas disponen de puertos de purgado especiales que permiten la entrada del gas en el compartimento de la muestra sin que penetre luz. Una alternativa para medir muestras frías es usar una sonda de fibra óptica de inserción directa. Se inserta un acoplador de fibra óptica en el compartimento de la muestra; el acoplador dirigirá la luz desde el sistema a través de un cable de fibra óptica, mediante una sonda de inserción insertada directamente en la muestra (como se indica en la Figura 6). A continuación, la luz es dirigida hacia el detector a través de un cable de fibra óptica de retorno. Para el muestreo de alta productividad, esta técnica puede ser preferible si se miden varias muestras a una temperatura fija.

3.5 Transparencia del disolvente

Cuando se miden muestras líquidas, o muestras sólidas disueltas para su análisis UV, es necesario 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 de corte UV-visible. Para los compuestos hidrosolubles, el agua es una excelente elección, pues permite la medida en todas las longitudes de onda UV. El uso de disolventes orgánicos limita el rango útil de longitud de onda UV. A la hora de seleccionar un disolvente, se debe considerar tanto la solubilidad de la muestra en el disolvente como la transparencia de este en el rango de longitud de onda de interés (como se indica en la Figura 23).

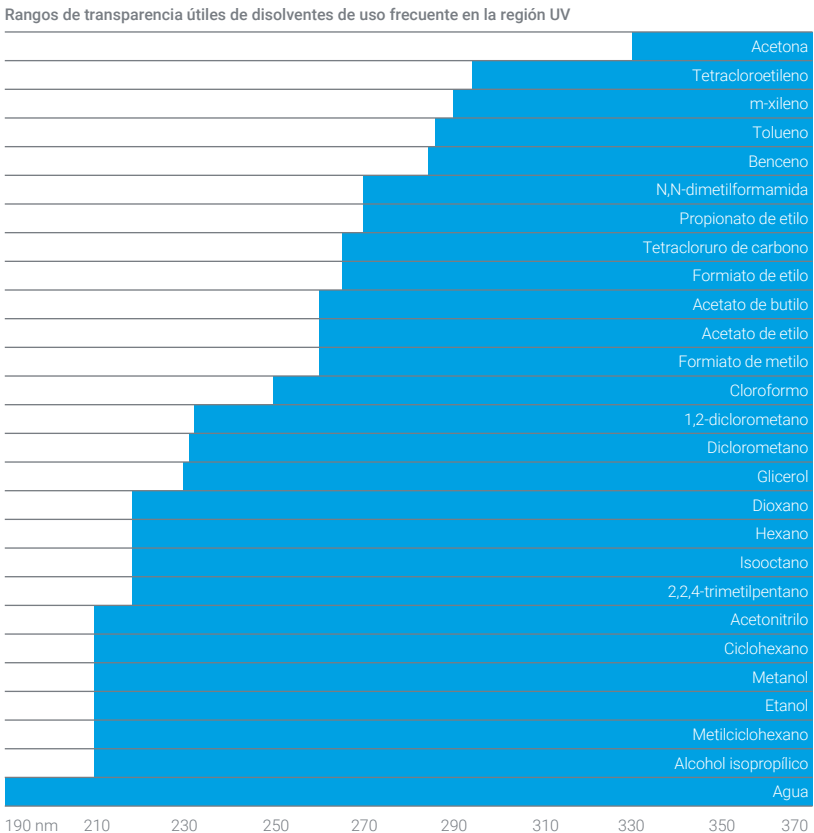


Figura 23. Rangos de transparencia de disolventes de uso frecuente en la región UV. Aunque se prefiere el agua para el análisis UV, podría ser necesario emplear otro disolvente si la muestra no es soluble en agua.



Una molécula con una función muy importante

La molécula de protoporfirina es la base de la vida de muchas plantas y animales. El organismo estabiliza la molécula insertando átomos de cinc en su estructura de anillo en hematíes inmaduros (reticulocitos). Cuando los reticulocitos maduran, el cinc es sustituido por hierro. Posteriormente, los hematíes maduros se combinan con la globina formando hemoglobina, la molécula que transporta el oxígeno por la sangre de muchos animales y de los seres humanos.

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 la luz UV, lo que no resulta sorprendente, dada su importancia para la fotosíntesis. Esta molécula también fluoresce. Debido a estas características, la protoporfirina resulta ideal para su análisis mediante espectroscopia. De hecho, forma la base de las pruebas de cribado primarias para el envenenamiento por plomo en la infancia (1).

1. Clinical and Laboratory Standards Institute, Erythrocyte Protoporphyrin Testing; Approved Guideline, Volume 16, No. 8, 1996

3.6 Ancho de banda espectral óptimo

Al medir una muestra, debe tenerse en cuenta la resolución requerida para la medición. La mayoría de las muestras sólidas o líquidas analizadas mediante espectroscopia UV-Vis tienen picos anchos por naturaleza, del orden de 20 nm o más de un lado al otro. Es conveniente usar un instrumento con una configuración de ancho de banda espectral (SBW) de aproximadamente la décima parte del ancho de banda natural del analito. El SBW del instrumento se define como el ancho de la banda de luz a la mitad del máximo del pico (como se indica en la Figura 24), y en ocasiones se denomina ancho total a la mitad del valor máximo (FWHM). El SBW del espectrofotómetro UV-Vis está relacionado con el ancho de la rendija física del diseño del monocromador.

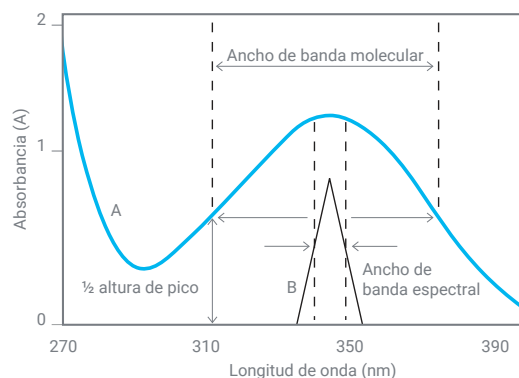


Figura 24. El espectro A presenta un máximo del pico próximo a 345 nm. Se muestra el ancho de banda espectral. El ancho de rendija espectral del espectrofotómetro UV-Vis siempre será menor que el ancho de banda espectral requerido.

En función del diseño del espectrofotómetro, la rendija física puede ser de ancho fijo o variable. Para la mayoría de los espectrofotómetros UV-Vis de calidad media, es habitual un ancho de banda espectral de 1.5 nm, suficiente para resolver picos de la mayor parte de las muestras líquidas y sólidas. Si se usa un SBW mayor, pasará más luz a través de la muestra y se pueden obtener datos de mayor calidad y menos ruido, pero no se resolverán los picos estrechos o próximos de la muestra. Si se usa un SBW menor, aumentará el poder de resolución, pero puede aumentar el tiempo de adquisición de datos para conseguir datos de la misma calidad por llegar menos luz a la muestra.

Los sistemas de espectrofotómetros de alto rendimiento o de nivel de investigación están diseñados habitualmente de un modo tal que el usuario pueda seleccionar el ancho de rendija y así ajustar la resolución del sistema. Esto resulta útil cuando se miden muestras más complejas. El ancho de la rendija puede maximizarse para permitir que pase más luz por muestras muy absorbentes si no es necesaria una alta resolución del pico. Si llega más luz al detector, mejorará la reproducibilidad, exactitud y precisión de los resultados. Cuando se precisa alta resolución, se puede reducir el ancho de la rendija (como se muestra en las Figuras 25 y 26).

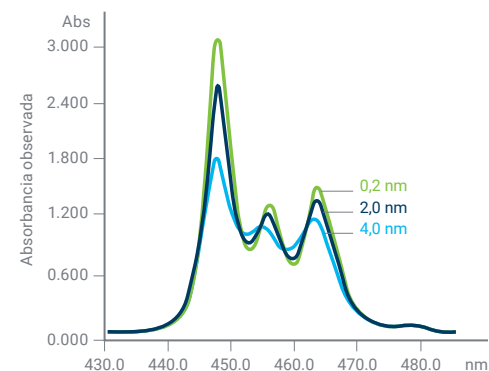


Figura 25. Barridos superpuestos, medido cada uno de ellos con una rendija diferente del instrumento. Según se ensancha la rendija, mejora la relación señal-ruido, pero disminuye la resolución.

Como valor guía, el SBW debe ajustarse en la décima parte del ancho de banda molecular de la muestra (ejemplos en la Tabla 2).

Tabla 2. Configuración de ancho de banda espectral recomendada para tipos de medición UV-Vis habituales.

Compuesto representativo	Pico (nm)	Ancho de banda (nm)	Óptimo (SBW) (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 colorantes			
β-caroteno	480	35	3.5
clorofila a	660	20	2
Coenzimas dinucleótido de nicotinamida y adenina			
NADH	340, 260	50, 25	5, 2.5
Compuestos orgánicos sencillos			
benceno, vapor	253	<<0.1	<<0.01
benceno, disolución	253	2	0.2
Antraceno	375	3	0.3

A la hora de optimizar la resolución espectral, también es necesario tener en cuenta el intervalo de datos de la adquisición. Deberán adquirirse al menos tres puntos de datos en el pico. Aunque un intervalo de datos pequeño puede aumentar la resolución, hay que buscar un equilibrio entre el tiempo necesario para la adquisición de datos y el intervalo de datos.

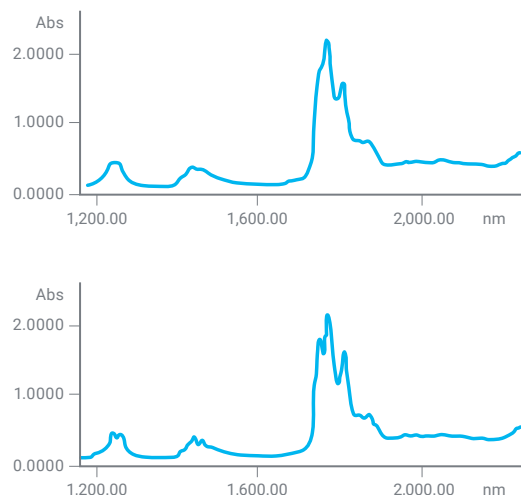


Figura 26. Estos dos barridos demuestran el efecto que tiene el SBW sobre la resolución. Con un SBW de 15 nm (gráfico superior), se observan pocos detalles estructurales en el espectro. Con un SBW de 3 nm (gráfico inferior), los picos están mucho más definidos.

3.7 Luz difusa

La luz difusa, o energía radiante difusa (SRE), se define como el porcentaje de radiación que llega al detector y cuyas longitudes de onda están fuera de la banda espectral seleccionada. Se debe a un mal diseño de instrumentos (entra luz en el instrumento de las luces del laboratorio o de la luz natural a través de las ventanas, o bien la luz no es bien separada por el monocromador) o a una avería del instrumento. La mayor parte de los sistemas se proporciona con comprobaciones del rendimiento del instrumento que identifican los problemas de luz difusa. Esto se realiza con una solución de prueba. Las soluciones usadas para probar los niveles de luz difusa no transmiten a las longitudes de onda indicadas (sí lo hacen a otras longitudes de onda), de modo que la transmitancia observada se debe solamente a la luz difusa.

La luz difusa reduce las lecturas de absorbancia y cambia la forma observada del pico (como se muestra en la Figura 27). Como resultado, la luz difusa provoca una desviación con respecto a la ley de Beer-Lambert (como se muestra en la Figura 28), que hace que las medidas de concentración pierdan fiabilidad. El rendimiento de la luz difusa de un instrumento UV-Vis también determina la absorbancia máxima que puede medir el instrumento.

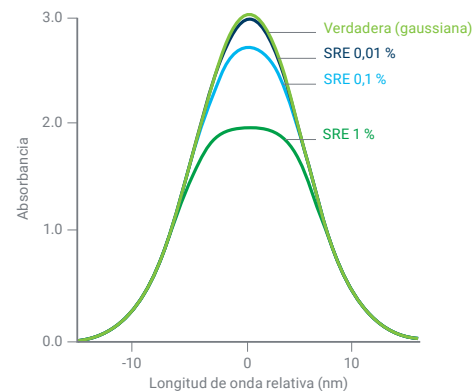


Figura 27. La absorbancia máxima de los picos será menor y la curva se aplanará cuando aumenta la luz difusa en el instrumento.

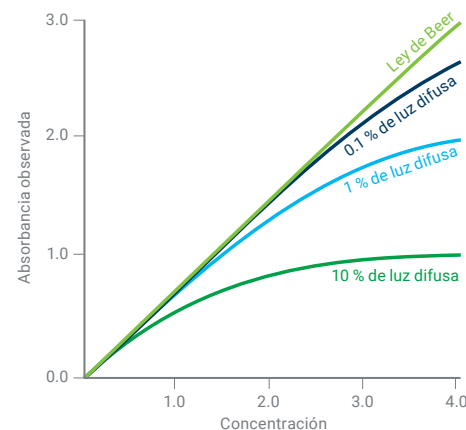


Figura 28. Un sistema UV-Vis con escaso rendimiento de luz difusa presentará desviaciones con respecto a la ley de Beer. Esto hace que los cálculos de concentraciones sean poco fiables.

3.8 El rango lineal de un instrumento UV-Vis

Tanto el diseño del instrumento como los parámetros de medición usados determinarán la absorbancia mínima que podrá medir un instrumento a una longitud de onda específica. Si la absorbancia es muy alta, al detector le llegará muy poca luz, lo que reduce la relación señal-ruido (observe el clásico "flequillo" del espectro en la Figura 29). Si conoce los límites del sistema, podrá evitar medir muestras o realizar calibraciones que estén fuera de las capacidades del instrumento. Para muestras líquidas, diluir la muestra es un modo de lograr que la medición esté dentro del rango lineal del instrumento. Como alternativa, puede usar una cubeta de longitud del paso óptico corto.

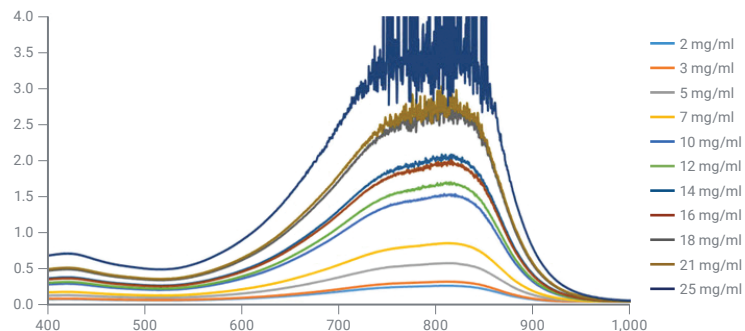


Figura 29. A medida que aumenta progresivamente la absorbancia de la muestra, llegará menos luz al detector. Esto aumenta el ruido en los resultados y se observará una evidente señal con puntas en el modo de barrido.

3.9 Otra información útil

La absorbancia (A o Abs) se mide con frecuencia en la espectroscopia UV-Vis debido a la relación lineal entre concentración y absorbancia, como describe la ley de Beer-Lambert. Para otras aplicaciones, el porcentaje de luz transmitida o absorbida podría ser más significativo. Al comparar las propiedades ópticas de un material, por ejemplo, podría resultar más significativo comparar el porcentaje de transmisión o la diferencia de absorbancia.

La mayoría de los sistemas de espectrofotómetro UV-Vis permiten convertir los datos adquiridos entre los parámetros más usados. La relación entre estos parámetros se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. La relación entre el porcentaje de transmisión y la absorbancia puede resultar difícil de visualizar. La tabla indica que una muestra que presente una Abs = 7 transmite tan solo un 0.00001 % de la luz a través de las muestras.

%T	T	Abs	%A	LogA
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 inversa de centímetros

La mayoría de las mediciones UV-Vis se reportan contra las longitudes de onda medidas en nanómetros (1×10^{-9} m). En ciertas publicaciones más antiguas se utiliza el inverso de la longitud o número de onda (cm^{-1}). El número de onda suele utilizarse en las medidas de espectroscopia infrarroja (IR). El uso de una escala en número de onda resulta útil, pues transmite el cambio en niveles energéticos de la radiación incidente. Una longitud de onda menor proporciona un número de onda mayor y una energía también mayor (como se muestra en la Tabla 4).

El uso del número de onda para la espectroscopia infrarroja también permite visualizar mejor las diferencias espectrales, puesto que la longitud de onda disminuye progresivamente.

Para la espectroscopia UV-Vis, suele preferirse la longitud de onda como forma práctica de visualizar el espectro mostrado en todo un rango espectral.

La mayoría de los sistemas de espectrofotómetros UV-Vis permite adquirir el espectro en términos de longitud de onda o de 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 las principales aplicaciones UV-Vis

4.1 Identificación: espectros y estructura

Los espectros UV-visible generalmente solo muestran unos pocos picos de absorbancia anchos. En comparación con técnicas como la espectroscopia infrarroja, que produce muchos picos estrechos, la espectroscopia UV-visible proporciona una cantidad limitada de información cualitativa. Con tan solo unos cuantos picos anchos, es difícil identificar un compuesto basándose en un espectro característico.

La mayoría de la absorción por los compuestos orgánicos procede de la presencia de enlaces π (es decir, no saturados). 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 de UV-visible), se produce un compuesto con una absorción entre 185 y 1,000 nm. En la Tabla 5 se indican algunos cromóforos y las longitudes de onda de sus valores máximos de absorbancia.

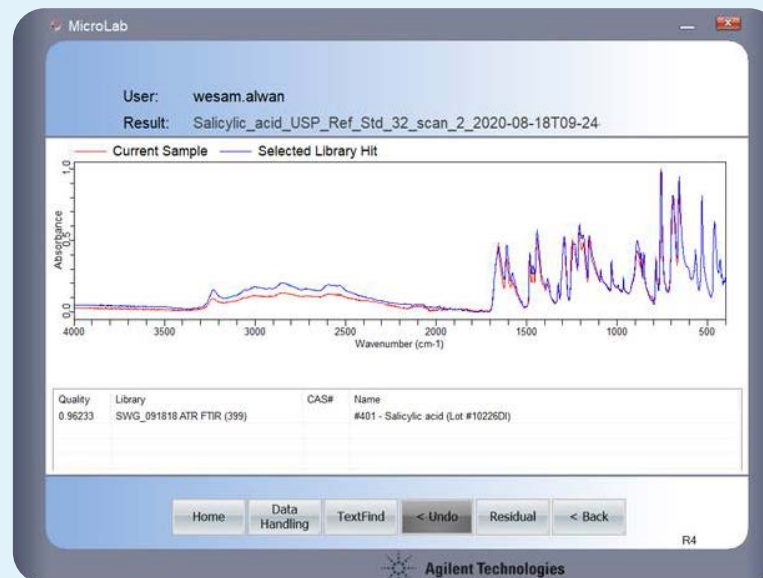
Tabla 5. Algunos cromóforos y la longitud de onda de sus valores máximos de absorbancia.

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	$RC\equiv CR$	Acetileno	173
Nitrilo	$RC\equiv N$	Acetonitrilo	< 160
Nitro	RNO_2	Nitrometano	271

La presencia de una banda de absorbancia a una determinada longitud de onda suele ser un buen indicador de la presencia de un cromóforo. Sin embargo, la posición de la longitud de onda del valor máximo de absorbancia no es fija, sino que depende en parte del entorno molecular del cromóforo y del disolvente en el que está disuelta la muestra. Otros parámetros, como pH y temperatura, también pueden producir cambios tanto en la intensidad como en la longitud de onda de valor máximo de absorbancia.

Los espectros FTIR se pueden usar para identificar compuestos

Los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) pueden contener muchos más detalles que los espectros UV-Vis. Un espectro como el aquí mostrado (en rojo) se puede comparar con una biblioteca de espectros FTIR para identificar el compuesto. En este caso, un producto farmacéutico, el ácido salicílico (cuyo espectro de biblioteca se muestra en azul).



Si el doble enlace está conjugado con otros dobles enlaces aumentan tanto la intensidad como la longitud de onda de la banda de absorción. Para algunos sistemas moleculares, como los hidrocarburos conjugados o los carotenoides, se ha investigado de manera sistemática la relación entre intensidad y longitud de onda. Los iones de los metales de transición también presentan niveles de energía que producen absorción a 400-700 nm en la región visible.

4.2 Confirmación de la identidad

Aunque los espectros UV-visible no permiten la identificación absoluta de una sustancia desconocida, se utilizan para confirmar la identidad de una sustancia mediante comparación del espectro medido con uno de referencia. Si los espectros son muy similares, se pueden usar espectros derivados. Como se muestra en la Figura 30, el número de bandas aumenta con los órdenes de las derivadas. Estos complejos espectros derivados pueden resultar útiles en el análisis cualitativo, bien para la caracterización de materiales o bien con fines de identificación. Por ejemplo, el espectro de absorbancia del esteroide testosterona presenta una sola banda ancha sin otros rasgos, centrada alrededor de 330 nm, mientras que la segunda derivada muestra seis picos distintos. El efecto de mejora de la resolución puede ser útil asimismo en la identificación de sustancias desconocidas. En la Figura 30 se muestra una simulación por computadora. Cuando se suman dos bandas gaussianas con un ancho de banda espectral (NBW) natural de 40 nm, separadas por 30 nm, en el modo de absorbancia, se origina una sola banda con un máximo a mitad de camino entre las bandas de los dos componentes. Los dos componentes no se resuelven. Utilizando la cuarta derivada del espectro, estas dos bandas aparecen claramente visibles, con los máximos centrados próximos a la $\lambda_{\text{máx}}$ de las bandas de los componentes.

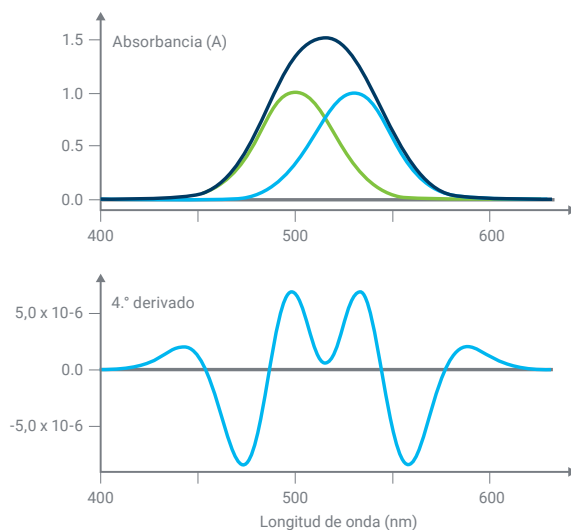


Figura 30. Mejora de la resolución empleando el análisis de de las derivadas. Los picos superpuestos originales producen un solo pico ancho. Si se toma la 4ª derivada del espectro, se consigue un espectro con una resolución de los picos muy superior.

4.3 Cuantificación de una molécula

Ley de Beer

Si 100 fotones de luz entran en una cubeta y solamente 50 salen por el otro lado, la transmitancia es de 0.5, o bien del 50 %. Si posteriormente estos 50 fotones se hacen pasar por una cubeta idéntica, solo 25 saldrán, y así sucesivamente. En la Figura 31 se presenta el gráfico de transmitancia frente a la longitud del paso óptico de la cubeta.

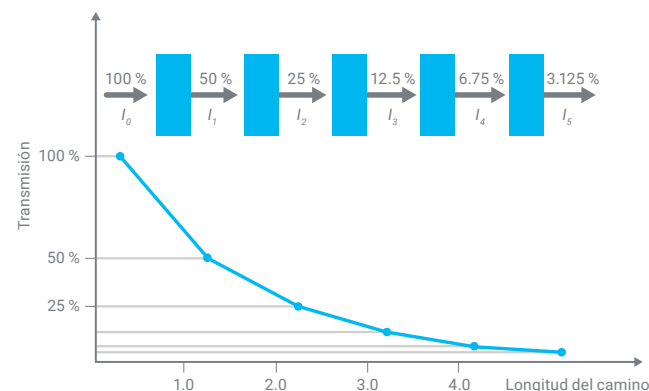


Figura 31. Transmitancia y longitud del paso óptico: la ley de Bouguer-Lambert.

Se suele atribuir a Lambert (1760) la primera expresión matemática de este efecto, aunque ahora parece que Bouguer la enunció en 1729. La ecuación es:

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

Donde:

- I_0 es la intensidad incidente.
- I es la intensidad transmitida.
- e es la base del logaritmo natural.
- k es una constante.
- b es la longitud del paso óptico (normalmente en centímetros).

La ley de Beer es idéntica a la de Bouguer, salvo que se enuncia en términos de concentración. La cantidad de luz absorbida es proporcional al número de moléculas absorbentes a través de las cuales pasa la luz. En la Figura 32 se muestra un gráfico de la transmitancia frente a la concentración.

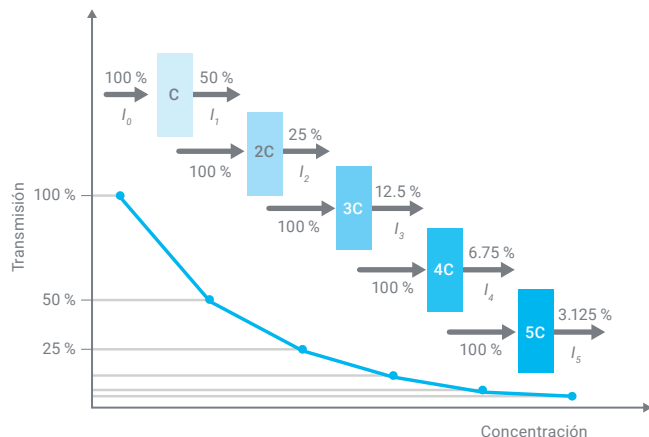


Figura 32. Transmitancia y concentración: ley de Beer

La combinación de las dos leyes forma la ley de Beer-Bouguer-Lambert:

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

Donde c es la concentración de las especies absorbentes (normalmente expresada en gramos por litro o miligramos por litro). Esta ecuación se puede transformar en una expresión lineal tomando el logaritmo, y suele expresarse en forma decimal:

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

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

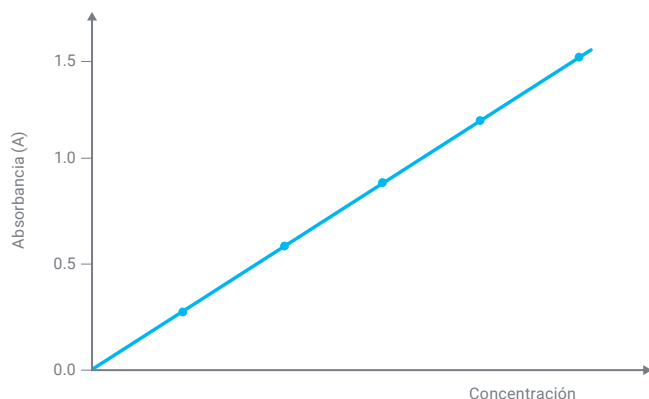


Figura 33. La ley de Beer-Bouguer-Lambert describe una relación lineal entre la absorbancia de la luz incidente y la concentración de la molécula.

El coeficiente de extinción (ϵ) es característico de una sustancia dada en un conjunto de condiciones meticulosamente definido, como longitud de onda, disolvente y temperatura. En la práctica, el coeficiente de extinción medido también depende parcialmente de las características del instrumento usado. Por estos motivos, para el análisis cuantitativo no se utilizan normalmente valores predeterminados para el coeficiente de extinción, sino que, en su lugar, se construye una curva de trabajo para la sustancia que se desea analizar a partir de una o varias soluciones patrón con concentraciones conocidas del analito.

Para las transiciones electrónicas, la diferencia de energía entre los estados base y excitado es relativamente grande. En consecuencia, a temperatura ambiente es muy probable que todas las moléculas se encuentren en el estado electrónico base. La absorción y la vuelta al estado base son procesos rápidos, y el equilibrio se alcanza muy pronto. En consecuencia, la absorción de la luz UV-visible es muy precisa cuantitativamente. La sencilla relación lineal entre la absorbancia y la concentración, así como la relativa facilidad de las medidas de la luz UV-visible, han convertido a la espectroscopia UV-visible en la base de miles de métodos analíticos cuantitativos. Suponiendo que la ley de Beer se sigue para el espectro de orden cero, existe una relación lineal similar entre concentración y amplitud para todos los órdenes de los espectros derivados:

Orden cero: $A = \epsilon bc$

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

Derivada enésima: $d^n A/d\lambda^n = (d^n \epsilon/d\lambda^n)bc$

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

Para la cuantificación de un solo componente, la selección de longitudes de onda es más difícil con los espectros derivados que con los de absorbancia, puesto que están presentes picos tanto positivos como negativos. Las derivadas de orden par tienen un pico máximo o mínimo en la misma $\lambda_{\max}$ que el espectro de absorbancia, pero para las derivadas de orden impar, esta longitud de onda es un punto de cruce por cero. Si se toma la diferencia entre el máximo más alto y el mínimo más bajo se obtiene la mejor relación señal a ruido (S/N), pero puede aumentar la sensibilidad a las interferencias producidas por otros componentes.

Para obtener resultados precisos, la muestra que se va a analizar solo debe contener el componente que absorbe y para el cual se ha realizado la calibración. Si la muestra es una disolución, deberá usarse como blanco una muestra pura del disolvente. Podría ser posible corregir un componente que interfiera con una segunda longitud de onda.

Medidas de concentración

Una de las aplicaciones más usadas del espectrofotómetro UV-Vis es la simple cuantificación de la concentración. Junto con un accesorio de sonda de inmersión de fibra óptica, se puede usar un espectrofotómetro UV-Vis para tomar medidas directamente en el recipiente para muestras, sin necesidad de decantar en una cubeta. [Más información.](#)



4.4 Cinética

El análisis de la cinética de reacciones es fundamental para conocer cómo se producen las reacciones en química y bioquímica. La espectrofotometría UV-Vis es una técnica ideal para esta aplicación, puesto que la muestra no se destruye. Se puede usar cuando el cambio en reactivos o productos produce un cambio en la absorbancia a una longitud de onda específica a lo largo del tiempo. Con un sistema UV-Vis de barrido rápido se pueden realizar varios barridos durante la reacción para permitir que esta se visualice y así se ayude a elegir las longitudes de onda seleccionadas para el cálculo de velocidad.

Cinética de un solo punto

El análisis de cinética de un solo punto es el método más sencillo para determinar una velocidad de reacción. Se selecciona una única longitud de onda, normalmente la de máxima absorbancia del analito de interés y, una vez iniciada la reacción, se monitoriza la absorbancia de forma continua a dicha longitud de onda. De este modo se origina un gráfico de absorbancia en función del tiempo, como se indica para cuatro muestras en la Figura 34. La monitorización del cambio en la absorbancia con el tiempo permite estudiar una reacción: cuando la absorbancia deja de cambiar, normalmente significa que la reacción ha terminado. En la Figura 34 se presentan cuatro muestras diferentes a lo largo de 30 minutos.

La ventaja de la medida de un solo punto es que, para las reacciones rápidas, se pueden adquirir datos casi continuos, dado que no es necesario llevar el sistema a otra longitud de onda durante la medida. La velocidad de adquisición de datos del instrumento y el tiempo promedio de la señal son los factores limitantes en la cantidad de datos que se puede adquirir.

También se pueden monitorizar varias longitudes de onda para las medidas de la cinética. Así se obtiene información sobre la creación de un producto de reacción a una longitud de onda y el agotamiento a otra.

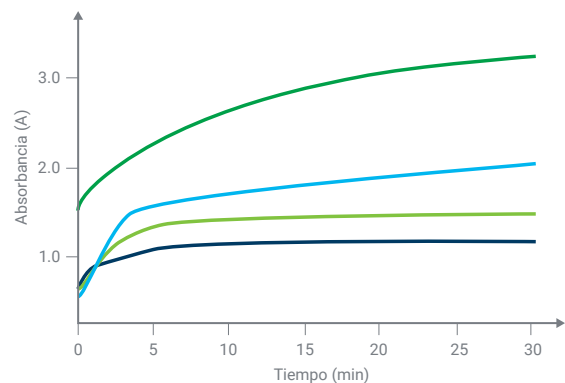


Figura 34. La monitorización del cambio en la absorbancia con el tiempo permite estudiar una reacción: cuando la absorbancia deja de cambiar, normalmente significa que la reacción ha terminado. Este gráfico presenta cuatro muestras diferentes a lo largo de 30 minutos.

Cinética de barrido

Realizar un barrido de un rango de longitud de onda con el tiempo puede proporcionar información adicional al realizar medidas de la cinética. Aparte de proporcionar una impresión visual de la reacción mientras tiene lugar (como se muestra en la Figura 34), esta medida ofrece la flexibilidad de seleccionar cualquier número de longitudes de onda en el rango de barrido para realizar un cálculo de la velocidad de reacción. Esto puede incluir el análisis del consumo de reactivos o la formación de los productos de la reacción según progresa la reacción. Al realizar una cinética de barrido, es importante asegurarse de que el sistema UV-Vis pueda realizar un barrido rápido del rango de longitudes de onda seleccionado. Un barrido más lento limitará la cantidad de datos adquiridos a cualquier longitud de onda durante la reacción.

Cinética de mezcla rápida

Para monitorizar la velocidad de reacción o dos disoluciones de reacción rápida, podría ser necesario el uso de un accesorio especial de mezclado rápido o de flujo detenido. Cuando se acoplan a un espectrofotómetro UV-Vis, estos accesorios proporcionan la administración precisa de dos o más soluciones en una celda de flujo dentro del sistema UV-Vis, donde tiene lugar la mezcla. El accesorio de flujo detenido activa al sistema UV-Vis para que inicie el análisis en cuanto las soluciones se mezclan en la celda de flujo. Existen opciones para cambiar la relación de mezclado 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 adquisición de datos lo suficientemente rápida como para adquirir una serie de puntos de datos dentro del intervalo del tiempo de reacción. En el ejemplo mostrado en la Figura 36 se presenta una reacción monitorizada durante tres segundos.

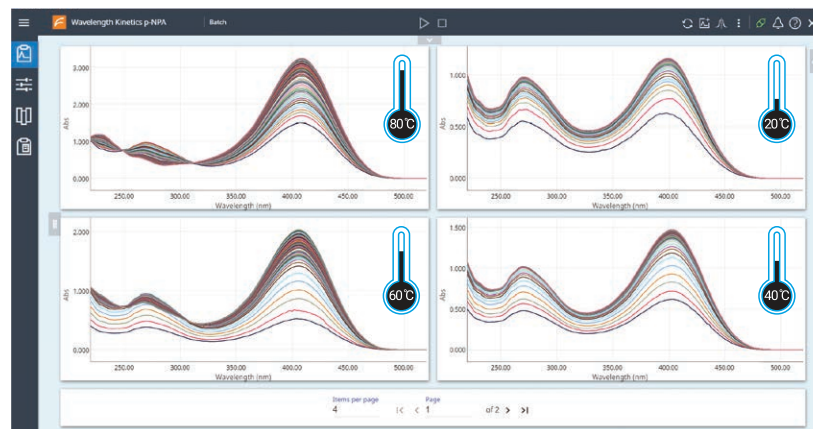


Figura 35. Cinética de barrido: los espectrofotómetros UV-Vis proporcionan mucha información sobre la química de la reacción. La influencia de la temperatura en las reacciones químicas se puede observar de manera rápida y sencilla con un barrido rápido a varias temperaturas. [Aquí se muestra un experimento de cinética de barrido.](#)

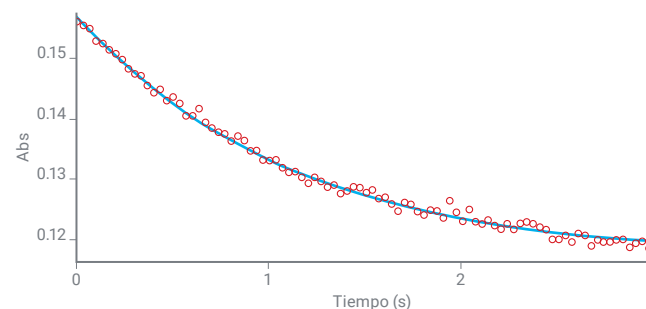


Figura 36. El uso de un espectrofotómetro UV-Vis moderno y un accesorio de mezclado rápido permite la medida de reacciones en lapsos de tiempos de tan solo unos segundos. [Aquí se puede ver un experimento de ejemplo.](#)

Consideraciones sobre la medición de cinética

La velocidad de una reacción puede verse afectada por la temperatura. Por este motivo, puede ser importante mantener las muestras a temperatura constante; por ejemplo, para las reacciones biológicas suele seleccionarse la temperatura corporal (37 grados). Con este fin se utilizan frecuentemente cubetas refrigeradas/ calentadas por efecto Peltier o soportes de cubetas termostatizados con agua con un sistema UV-Vis. Estos accesorios permiten mantener la muestra a una temperatura específica o bien cambiar la temperatura con el tiempo (rampa).

Es necesario considerar cuidadosamente la precisión y reproducibilidad de la temperatura, pues ligeras variaciones en esta o en la velocidad del cambio de temperatura pueden afectar significativamente los resultados. Algunos sistemas proporcionan la posibilidad de medir la temperatura de las muestras directamente desde el interior de la cubeta (en lugar de limitarse a medir la temperatura del soporte de cubeta). Cuando se combina con información del sistema de control de temperatura, suele proporcionarse un mejor control de la temperatura de la muestra. También se pueden usar sondas de temperatura en la muestra para registrar la temperatura de la muestra junto con los datos de absorbancia.

También es importante una agitación uniforme y reproducible. Cuando se miden reacciones a temperatura ambiente, la agitación asegura que los reactivos se mezclen uniformemente durante la reacción. Para muestras termostatizadas, la agitación asegura que no exista un gradiente de temperatura en la muestra.

A la hora de medir sistemas complejos, puede ser preferible el uso de una sonda de fibra óptica. Un cable de fibra óptica permite dirigir la luz desde el espectrofotómetro hasta una muestra situada fuera del espectrofotómetro UV-Vis. Esto puede resultar útil para la medición de un proceso de fabricación de flujo en el que la muestra se encuentra a temperaturas o presiones extremas, o cuando la muestra no cabe físicamente dentro del compartimento de la muestra del espectrofotómetro.

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

4.5 Medida del color

El color es una propiedad importante de los materiales. El color de la materia está relacionado con su absorptividad o reflexividad de longitudes de onda de luz específicas. El ojo humano ve el color complementario del color que se ha absorbido, como se muestra en la Figura 37 y en la Figura 38.

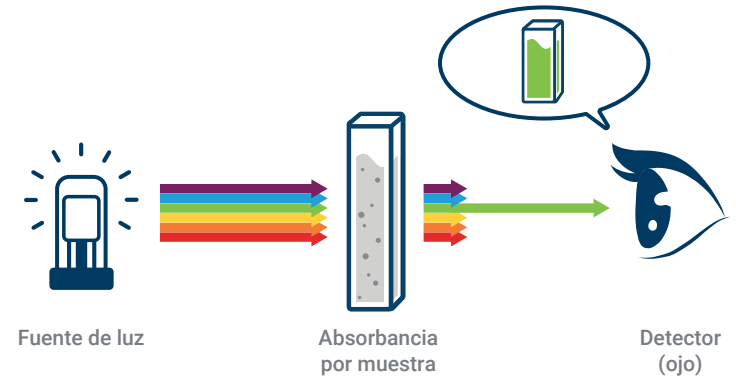


Figura 37. Transmisión y color. De forma muy similar al detector del espectrofotómetro, nuestros ojos ven la luz transmitida por una superficie o rebotada desde ella. Percibimos esto como el color del objeto.



Figura 38. Las longitudes de onda de la luz asociadas a los diferentes colores (izquierda) y el color de la luz absorbida y el color complementario asociado que ve el ojo humano (derecha).

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

- El espectro de la luz que cae sobre el objeto (considere la diferencia en los colores apreciados durante el crepúsculo y a medio día).
- La estructura superficial de un material sólido (las escamas de un pez o las plumas de un pájaro son dos ejemplos en los que la estructura física de la superficie cambia el color que se aprecia).
- En ángulo de visión (algunas superficies, como las pinturas perladas, cambian de color cuando lo hace el ángulo de visualización de la superficie).

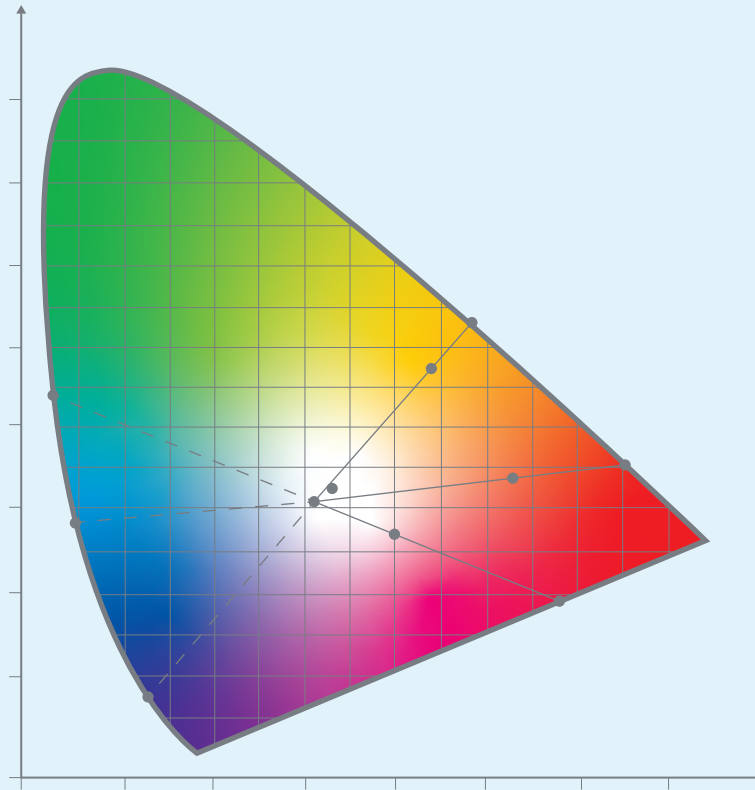
Se han desarrollado sistemas especiales de medida del color, como CIE L^*a^*b e instrumentos para medir el color. Cuando están equipados con el software adecuado, la mayoría de los espectrofotómetros se pueden usar para medir el color. La percepción del color también se ve afectada por la superficie y su capacidad de producir una reflectancia especular (como un espejo) o difusa (dispersión). Debido a estos factores la medida del color puede precisar accesorios especiales que permitan coleccionar y observar la reflectancia especular y difusa con diferentes ángulos de visualización.

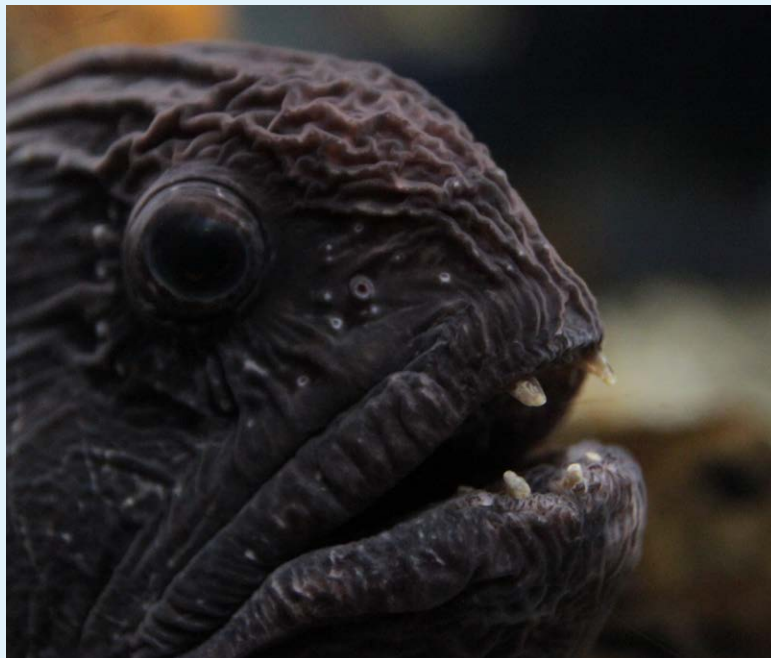
Un instrumento de medida de color tomará el espectro UV-Vis de una muestra y lo convertirá en coordenadas de tres colores que localicen el color en el espacio de color tridimensional (consulte la imagen del panel lateral). Las tres coordenadas definen la luminosidad, croma y tono de la muestra. La luminosidad es una medida de lo claro u oscuro que es un color. El croma es una medida de la "pureza del color", mientras que el tono es el color espectral dominante (similar a los colores que se ven en un arcoíris).

Además de usarse para la medición la coincidencia de color; por ejemplo, la medición de los colores de la pintura en un producto manufacturado, también se puede usar un espectrofotómetro UV-Vis para medir el cambio de color en una disolución. Las mediciones de UV-Vis se utilizan frecuentemente con este fin, para evaluar si una reacción ha tenido lugar o está produciéndose, sin necesidad de inspección visual. Los ensayos basados en el color son una de las aplicaciones más usadas de la espectrofotometría UV-Vis.

Medida del color

Los espectrofotómetros UV-Vis se utilizan para medir el color de líquidos y sólidos. Al medir la luz visible que se transmite a través de una disolución o de un material, o bien la luz que se refleja desde una superficie, se puede calcular el color del líquido o del material. Se utiliza una serie de tres números para indicar las coordenadas del color medido en un "espacio de colores". [Más información.](#)





¿Qué tan negro es el negro? Pregunte a un pez de las profundidades abisales

Los investigadores han observado a muchos peces de las profundidades abisales con una piel ultranegra, que refleja menos del 0.5 % de la luz incidente. Los peces usan su piel ultranegra para permanecer indetectados mientras buscan presas. En las profundidades, las criaturas oscuras del mar con frecuencia usan el brillo de la bioluminiscencia para ver a sus presas o a sus atacantes. La piel ultranegra absorbe la luz de la bioluminiscencia, permitiendo a los peces permanecer fuera del alcance de la vista.

Los investigadores del Smithsonian National Museum of Natural History y de la Duke University midieron la reflexión de la piel del pez, que absorbe un 99.5 % de luz. Este valor es comparable con el del ave del paraíso (99.95 %) y con el del material más negro jamás creado, el Vantablack, que absorbe un 99.96 %.

El mecanismo empleado por el pez para absorber la luz podría tener aplicaciones en paneles solares, telescopios, cámaras y sistemas de camuflaje.

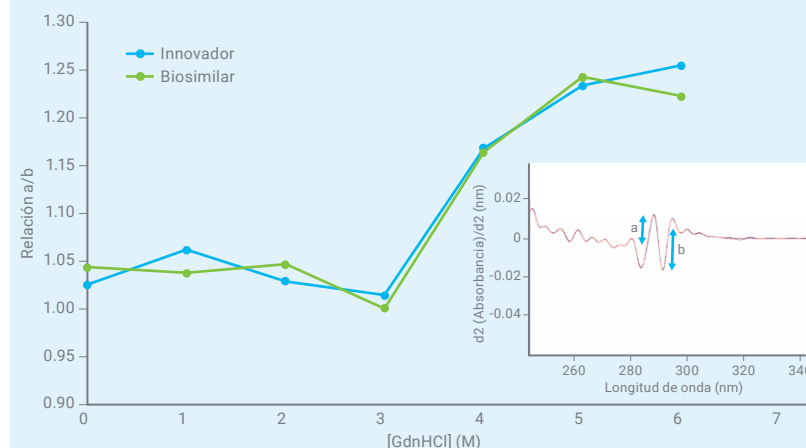
[Lea los resultados de la investigación.](#)

4.6 Cambios estructurales de los compuestos

La espectroscopia UV-Vis se puede usar para determinar muchas características fisicoquímicas de los compuestos. Estas medidas pueden identificar un compuesto o determinar propiedades específicas.

Estudios conformacionales

La espectroscopia UV-VIS puede aportar información sobre la estructura de las proteínas. Además, la espectrofotometría UV-VIS es no destructiva, por lo que no se consumen las muestras valiosas. Por este motivo, UV-Vis es ideal para su uso antes del análisis mediante técnicas tales como LC o espectroscopia de masas. Esto se demuestra en la comparación de una pareja de anticuerpos monoclonales: un innovador y un biosimilar. [Más información.](#)



4.7 Temperatura de fusión de proteínas y ácidos nucleicos

La espectroscopia UV-Vis se utiliza con frecuencia en las biociencias para el análisis de biomoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos. Los espectros de absorbancia de las proteínas se deben a la absorbancia de los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina. Se puede usar el análisis multicomponente para determinar la cantidad de cada uno de los aminoácidos aromáticos que está presente en una proteína intacta.

Una proteína a temperatura ambiente posee una determinada estructura terciaria o conformación que, a su vez, crea un entorno electrónico específico para los aminoácidos aromáticos. Otra aplicación de la espectroscopia UV-Vis expone las proteínas al calor o a desnaturizantes químicos. Esto, a una determinada temperatura o concentración, provocará que la proteína se desdoble o funda y pierda su estructura. En este proceso, el entorno electrónico de los aminoácidos aromáticos cambia, lo que a su vez provoca cambios o desplazamientos espectrales.

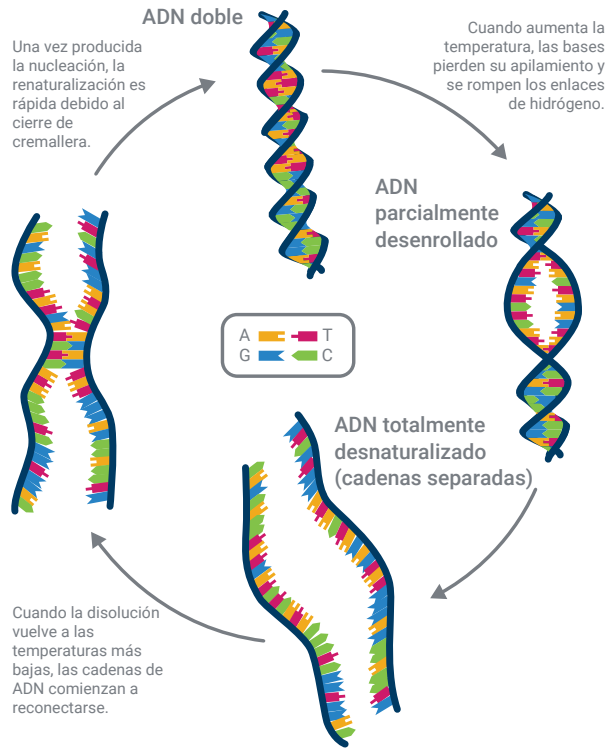


Figura 39. Las cadenas de la doble hélice del ADN se desenrollan cuando se calienta el ADN. Esto aumenta la absorbancia de la luz UV a 260 nm. Según se enfría el ADN, las cadenas vuelven a unirse.

El ácido desoxirribonucleico (ADN) en su estado nativo está formado por dos cadenas de moléculas de desoxirribosa enrolladas helicoidalmente alrededor del mismo eje. Las cadenas están unidas por enlaces de hidrógeno entre las bases purina y pirimidina (la adenina se une a la timina [A-T] y la guanina se une a la citosina [G-C]). Estas bases son principalmente responsables de la absorbancia UV del ADN y de otros tipos de ácidos nucleicos, con un pico máximo a 260 nm. Al igual que sucede en cualquier sistema multicomponente, la absorción 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 siempre es significativamente menor que la esperada, pues los enlaces de hidrógeno entre las bases cambian su entorno electrónico. Cuando se calienta una molécula, el enlace de hidrógeno se rompe, la doble hélice se desenrolla y la absorbancia aumenta de modo que se aproxima al valor esperado debido a la suma 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 disolución de ácidos nucleicos de doble cadena aumenta de manera escalonada; se mide la absorbancia a 260 nm a cada temperatura y se representa como una curva de fusión (como se muestra en la Figura 40). El punto medio del rango de temperatura sobre el cual se produce la fusión es el valor de T_m . El valor de T_m de una determinada muestra de ácido nucleico depende principalmente del porcentaje de parejas G-C en la muestra, cada una de las cuales contiene tres enlaces de hidrógeno, mientras que cada pareja A-T solo contiene dos pares de enlaces de hidrógeno. Cuanto mayor sea el porcentaje de parejas G-C en la muestra, mayor será el valor de T_m observado.

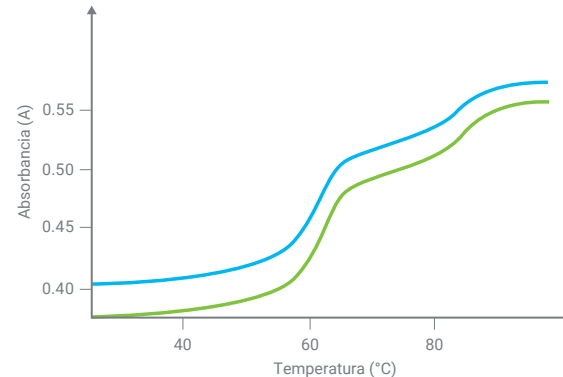


Figura 40. Al medir la absorbancia a 260 nm, mientras se aumenta la temperatura origina esta gráfica característica de "fusión" de ADN. El cambio en la absorbancia indica las múltiples transiciones mientras se desenrolla la hélice de ADN.

Para llevar a cabo los análisis de fusión de proteínas y ADN, el espectrofotómetro UV-Vis debe tener un medio para cambiar la temperatura de la muestra de manera precisa y reproducible. Los recientes avances en la instrumentación espectrofotométrica ofrecen reducciones importantes en los tiempos transcurridos para la medición de fusión térmica, así como precisión en la temperatura más alta de lo que era posible anteriormente. Se encuentran disponibles sistemas de análisis de fusión térmica UV-Vis con sondas de temperatura integradas en la cubeta, que se pueden usar para controlar con precisión la temperatura de las disoluciones durante el experimento. También se proporciona agitación en la cubeta para asegurar que las muestras se calientan de forma homogénea. Si hay números elevados de muestras para su análisis, se integra un soporte multicelda en el instrumento o se

proporciona con el mismo. La mayoría de los accesorios de temperatura manejados por Peltier requieren de un baño de agua circulante para enfriar los elementos del sistema Peltier. También en este caso, recientes innovaciones permiten el uso de sistemas Peltier refrigerados por aire en el bloque de la celda. El rango de temperatura requerido está habitualmente entre 0 y 110 °C y, junto con la monitorización de temperatura y la agitación incorporadas, proporcionan la posibilidad de realizar rampas de temperatura de la muestra durante el análisis lo más rápido posible.

Análisis de fusión térmica de ácidos nucleicos

El control de la temperatura de la muestra es un requisito esencial del sistema de fusión térmica UV-Vis. El calentamiento rápido y reproducible puede ser ayudado por el uso de una sonda de temperatura dentro de la cubeta. [Más información.](#)



4.8 Análisis multicomponente

Se han estado realizando análisis multicomponente mediante espectros UV-visible desde hace casi tanto tiempo como los análisis de un solo componente. Sin embargo, como las técnicas empleadas en el análisis multicomponente con frecuencia daban resultados incorrectos, no se habían aplicado ampliamente. Un espectrofotómetro UV-Vis moderno y bien diseñado proporciona datos más precisos, mientras que las actuales técnicas de ajuste de curvas ofrecen resultados más exactos y (lo que quizás es más importante) indican cuándo son incorrectos los resultados.

Principio de aditividad

Según la ley de Beer, la absorbancia es proporcional al número de moléculas que absorben radiación a la longitud de onda especificada. Este principio también se cumple si se encuentra presente más de una especie absorbente. Todos los métodos cuantitativos multicomponente se basan en el principio de que la absorbancia a una longitud de onda dada de una mezcla es igual a la suma de las absorbancias de cada componente en la mezcla a dicha longitud de onda.

Este sencillo abordaje para el análisis multicomponente se basa en medidas a tantas longitudes de onda como componentes haya en la mezcla. Las longitudes de onda elegidas normalmente son las que presentan el valor máximo de absorbancia de cada componente. Para la calibración, se mide la absorbancia de

patrones de concentraciones conocidas de componentes puros para determinar el coeficiente de extinción para cada componente a cada longitud de onda seleccionada. La absorbancia de la mezcla a cada longitud de onda es la suma de las absorbancias de cada componente a dicha longitud de onda, que a su vez depende del coeficiente de extinción y de la concentración de cada componente. Por lo tanto, para dos componentes x e y, las ecuaciones son:

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

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 absorptividad molar a la longitud de onda '.
- e'' es la absorptividad molar a la longitud de onda ''.
- c es la concentración.
- b es la longitud del paso óptico.

Estas ecuaciones se resuelven fácilmente para determinar la concentración de cada componente. Si las medidas siempre fueran perfectas, se podrían obtener resultados precisos incluso para mezclas de componentes complejas con espectros muy similares. Sin embargo, en la práctica siempre se producen errores en la medición. Estos errores pueden afectar significativamente a la exactitud de los resultados si hay una importante superposición espectral. En la Figura 41 se muestra una mezcla simulada de dos componentes sin superposición de los espectros en los valores máximos de absorbancia.

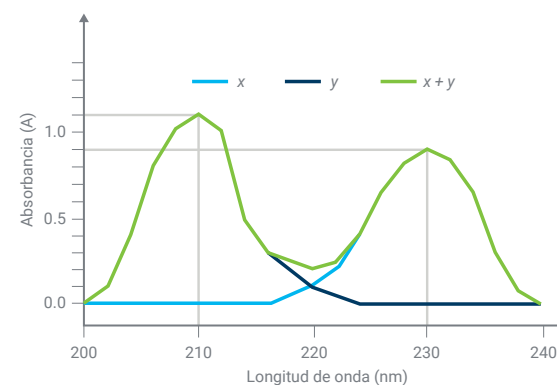


Figura 41. Una mezcla de dos componentes con una escasa superposición espectral.

Por otro lado, en la Figura 42 se muestra una mezcla simulada de dos componentes con una significativa superposición de los espectros en los valores máximos de absorbancia.

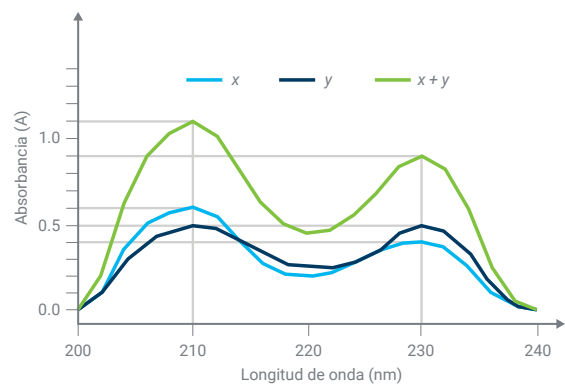


Figura 42. Una mezcla de dos componentes con una significativa superposición espectral.

Con escasa superposición espectral	Con significativa superposición espectral
$A'(x+y) = 1.1 + 0.0 = 1.1$	$A'(x+y) = 0.6 + 0.5 = 1.1$
$A''(x+y) = 0.0 + 0.9 = 0.9$	$A''(x+y) = 0.4 + 0.5 = 0.9$

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

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 %), el cálculo cuantitativo da los resultados que se muestran en la Tabla 6:

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

Componente	Concentración nominal	Concentración calculada	Escasa superposición espectral	Sustancial superposición espectral	
			% de error	Concentración calculada	% de error
X	1	0.9	-10 %	0.0	-100 %
Y	1	1.1	+10 %	1.98	+98 %

Método de mínimos cuadrados

El efecto del ruido aleatorio se puede reducir si se utiliza información espectral adicional; es decir, se puede usar una serie de puntos de datos para la cuantificación en lugar de solo dos. En este sistema, conocido como sobredeterminado, un ajuste por mínimos cuadrados de los espectros estándar con respecto al espectro de la muestra medida produce resultados cuantitativos (1,2) En la Figura 43 se presenta un espectro para la muestra de dos componentes ilustrada en la Figura 42 con un error aleatorio del 10 % en cada punto de medida.

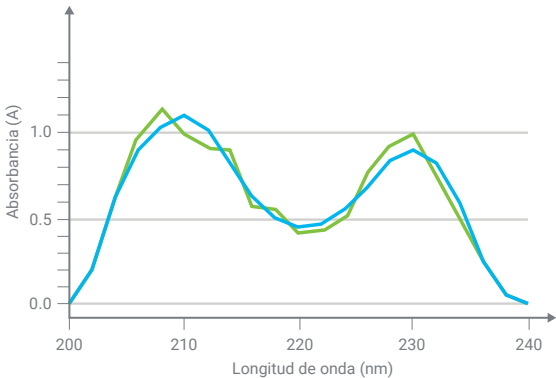


Figura 43. Espectro de una mezcla con un error aleatorio del 10 % en cada longitud de onda.

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

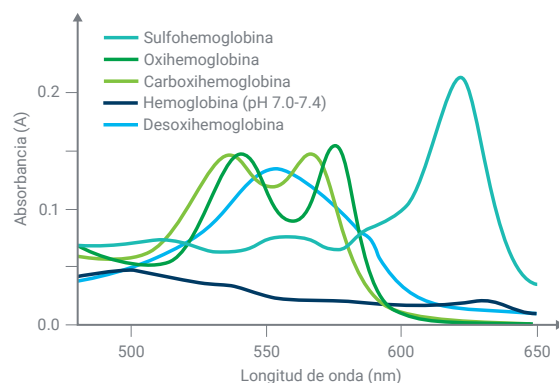
Tabla 7. Comparación de los resultados del análisis multicomponente a partir de los métodos de sistemas de ecuaciones sencillas y de mínimos cuadrados.

			Usando tan solo 210 y 230 nm	Usando 200-240 nm	
Componente	Concentración nominal	Concentración calculada	% de error	Concentración calculada	% de error
X	1	0.0	-100 %	1.003	+0.3 %
Y	1	1.98	+98 %	0.995	-0.5 %

Este método permite el análisis de mezclas más complejas y de mezclas simples de componentes con espectros similares. El residuo del cálculo de mínimos cuadrados es un buen indicador del ajuste de los espectros estándar en los espectros de la muestra y, en consecuencia, es un buen indicador de la probable exactitud de los resultados.

Un ejemplo del análisis multicomponente es la cuantificación de cinco hemoglobinas en sangre con una mínima preparación de muestras (3). En la Figura 44 se muestran los espectros de absorción de la hemoglobina con derivada. Este análisis se llevó a cabo anteriormente utilizando diversas técnicas analíticas, incluidas espectroscopia y valoraciones.

Figura 44. Espectros de absorción de la hemoglobina con derivada.



Otros métodos

Otros abordajes estadísticos para el análisis multicomponente incluye los métodos de mínimos cuadrados parciales (PLS), la regresión por componentes principales (PCR) y mínimos cuadrados múltiples (MLS). En teoría, estos métodos ofrecen ciertas ventajas sobre los descritos anteriormente; sin embargo, el proceso de calibración puede ser mucho más complejo.

Requisitos de las muestras

Los métodos de ecuaciones simultáneas sencillas y de mínimos cuadrados ofrecen resultados precisos únicamente si se lleva a cabo la calibración con patrones puros o mezclas de patrones para cada componente de la muestra que contribuya al espectro UV-visible. La muestra desconocida no debe tener ninguna capacidad de absorción adicional.

Requisitos de instrumentos

La cuantificación de un solo componente se realiza habitualmente midiendo con el mismo instrumento un patrón o una serie de patrones y, a continuación, una sustancia desconocida. El proceso de calibración debe eliminar el sesgo instrumental, lo que hace que la exactitud absoluta de la longitud de onda y la exactitud fotométrica absoluta sean relativamente poco importantes. Por otro lado, la reproducibilidad fotométrica es esencial para que los resultados sean precisos. Si las medidas se realizan solo en el valor máximo de absorbancia, la reproducibilidad de longitudes de onda también tiene poca importancia, pues la tasa de cambio de la absorbancia con la longitud de onda es baja. Sin embargo, si se utiliza una longitud de onda situada en el lateral de la banda, la reproducibilidad de la longitud de onda es particularmente importante. Finalmente, el rango lineal del instrumento es crítico, puesto que el proceso de calibración se basa en una relación lineal. Los análisis multicomponente precisos requieren una excelente relación señal a ruido, en especial si se emplea el método de sistemas de ecuaciones sencillas. En el método de mínimos cuadrados, los datos de los laterales de las bandas de absorbancia se incorporan al cálculo, por lo que también resulta esencial que la reproducibilidad de la longitud de onda sea excelente. Además, dado que se requieren más datos, es necesaria una mayor velocidad de barrido para que no decaiga la productividad.

4.9 Requisitos de software

Se encuentra disponible software especializado multicomponente para ayudar en la creación de modelos de datos para analizar los datos recopilados. Estos paquetes de software pueden estar incorporados en el software de control instrumental e informes, o bien pueden ser paquetes independientes. La mayor parte de los sistemas UV-Vis disponibles pueden exportar datos en un formato estándar que a su vez se puede importar en un paquete de software 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 para absorber luz 2. Unidad de absorbancia de luz, representada por A o Abs.

arco (lámpara): Crea luz mediante un arco eléctrico o voltaico a través de un gas inerte.

blanco: El disolvente o sustrato de la muestra, sin la especie absorbente. Al medir muestras líquidas, será el disolvente (habitualmente, agua) en una cubeta. A continuación, se podrá restar la absorbancia del blanco a la de la muestra para determinar la absorbancia debida exclusivamente a la muestra.

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

CRM: abreviatura en inglés. Material de referencia certificado. En referencia a los estándares suministrados que han sido certificados con un estándar primario para su comparación.

cromóforo: Parte de una molécula que absorbe luz.

cualitativa (medición): Medición que proporciona una medición que define o describe la misma. P. ej., identificar una molécula en disolución.

cuantitativa (medición): Medición que produce un valor numérico. P. ej., concentración.

cubeta: También denominada celda, la cubeta es el recipiente que aloja muestras líquidas. Las cubetas están disponibles en diferentes volúmenes y longitudes del paso óptico. El material de la cubeta determina su transparencia óptica.

dispersión: En diseño óptico, hace referencia a la capacidad del dispositivo óptico de dividir la luz en sus longitudes de onda constituyentes. P. ej., la luz blanca en un prisma crea un efecto arcoíris debido a la dispersión.

dispersión: Efecto de rebote de la luz desde una superficie en ángulos aleatorios.

espectro: Rango de longitudes de onda. El espectro electromagnético. También hace referencia a una representación, normalmente gráfica, de longitudes de onda frente a intensidad (o absorbancia, medida por un espectrofotómetro).

fluorescencia: Una forma de luminiscencia y característica que presentan algunas moléculas de absorber luz a una frecuencia y emitir luz de corta duración a otra longitud de onda.

GMP: abreviatura en inglés. Buenas prácticas de fabricación. Se utiliza habitualmente en la industria farmacéutica y en otras industrias de fabricación reguladas.

holográfica (óptica): La óptica holográfica se crea mediante el grabado de un patrón de interferencia sobre una superficie óptica. La óptica holográfica se puede usar en lugar de lentes, espejos y otros dispositivos ópticos. Su diseño facilita una réplica exacta, además de pequeña y ligera.

farmacopea: Documento normativo con la información farmacéutica y los procedimientos de ensayo requeridos o recomendados para la industria farmacéutica.

fosforescencia: Forma de luminiscencia relacionada con la fluorescencia. Es característica de algunas moléculas la absorción de luz a una frecuencia y la emisión demorada de luz a otra longitud de onda.

fotoquímicas (reacciones): Reacción química causada por la absorción de luz.

fotosensibilidad: Sensibilidad de una sustancia para reaccionar cuando son expuestas a la luz.

línea base: Es una medición obtenida con los mismos parámetros que la medida de la muestra, pero sin la muestra. Habitualmente se usa un blanco para la medición de la línea base, pues esto permite restar las contribuciones del instrumento, del disolvente, de la cubeta, etc. a la medición final de la muestra.

óxidos de tierras raras: Los óxidos de holmio, didimio y samario son referenciados por las organizaciones de normalización y por las farmacopeas para su uso en la validez de las mediciones de longitud de onda.

peltier: Un Peltier es un dispositivo de calentamiento/refrigeración operado por un acoplamiento termoelectrónico. El dispositivo transfiere calor desde un lado del dispositivo hasta el otro. Puede proporcionar un control preciso de la temperatura de una muestra.

puesta a cero: Equivale a la función “Tara” en las balanzas. Ajusta la lectura del instrumento a 0 Abs.

QA/QC: abreviatura en inglés. Control de calidad o Garantía de calidad.

reflexión: Describe la ruta de luz de una muestra, desviada en el ángulo de incidencia.

ruido: En términos del espectrofotómetro, el ruido hace referencia a la señal eléctrica de fondo a la que contribuye el propio instrumento. Si es demasiado grande, puede eclipsar la señal medida, dificultando la diferenciación de las dos señales. El efecto es comparable al de mirar las estrellas desde una ciudad y hacerlo desde el campo. La luz de fondo (el “ruido”) debido a las luces de la ciudad dificulta ver las estrellas. En el campo, hay poca luz de fondo, por lo que la luz de las estrellas se puede ver fácilmente.

SOP: abreviatura en inglés. Procedimiento operativo estandarizado. Documento redactado para asegurar que la medición puede tomarse de manera segura y reproducible.

SST: abreviatura en inglés. Pruebas de idoneidad del sistema. Prueba para determinar que el sistema es adecuado para su aplicación.

transmitancia: Porcentaje de la luz incidente que es transmitida a través de una muestra.

Más información:

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

Compre on-line:

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
5980-1397SPL