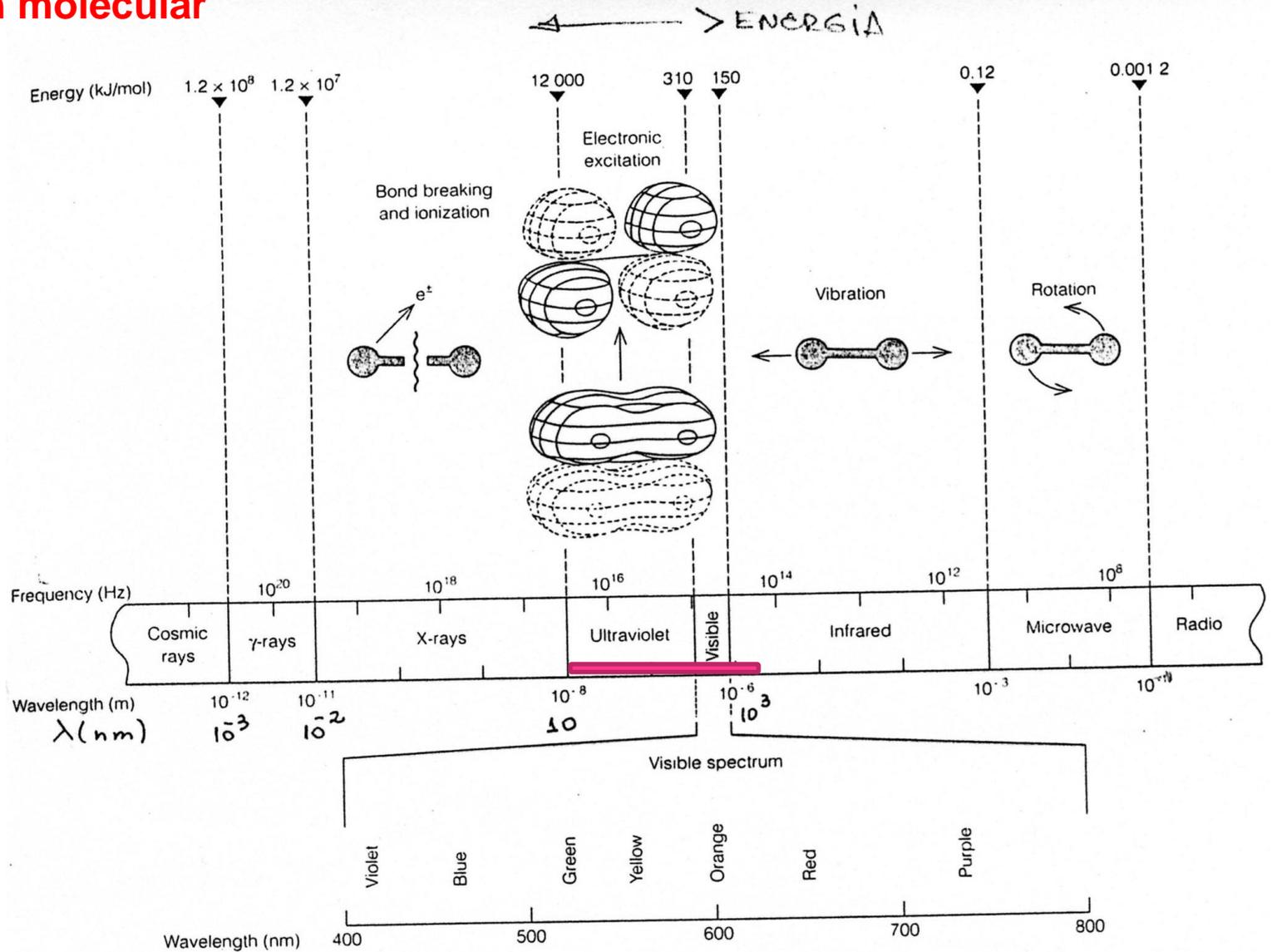


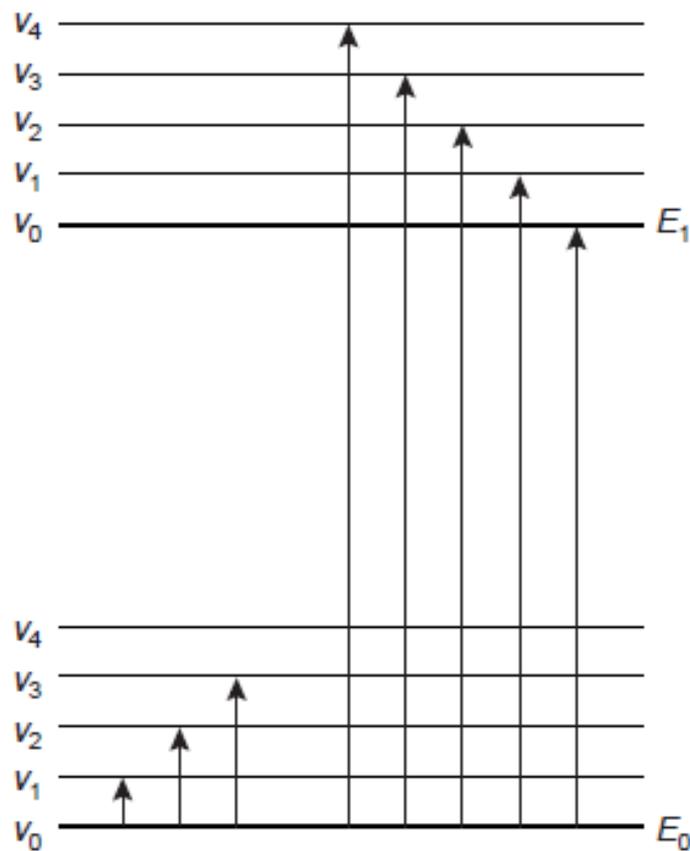
# Introducción a los métodos ópticos

## ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR UV-VIS

# Absorción molecular



Electromagnetic spectrum showing representative molecular processes that occur when light in each region is absorbed. The visible spectrum spans the wavelength range 380 to 780 nanometers (1 nm =  $10^{-9}$  m).



**Figure 10.14**

Energy level diagram showing difference between the absorption of infrared radiation (*left*) and ultraviolet–visible radiation (*right*).

**Table 10.5** Electronic Transitions Involving  $n$ ,  $\sigma$ , and  $\pi$  Molecular Orbitals

Transition	Wavelength Range (nm)	Examples
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	< 200	C—C, C—H
$n \rightarrow \sigma^*$	160–260	H <sub>2</sub> O, CH <sub>3</sub> OH, CH <sub>3</sub> Cl
$\pi \rightarrow \pi^*$	200–500	C=C, C=O, C=N, C≡C
$n \rightarrow \pi^*$	250–600	C=O, C=N, N=N, N=O

Métodos espectroscópicos generales basados en la radiación electromagnética

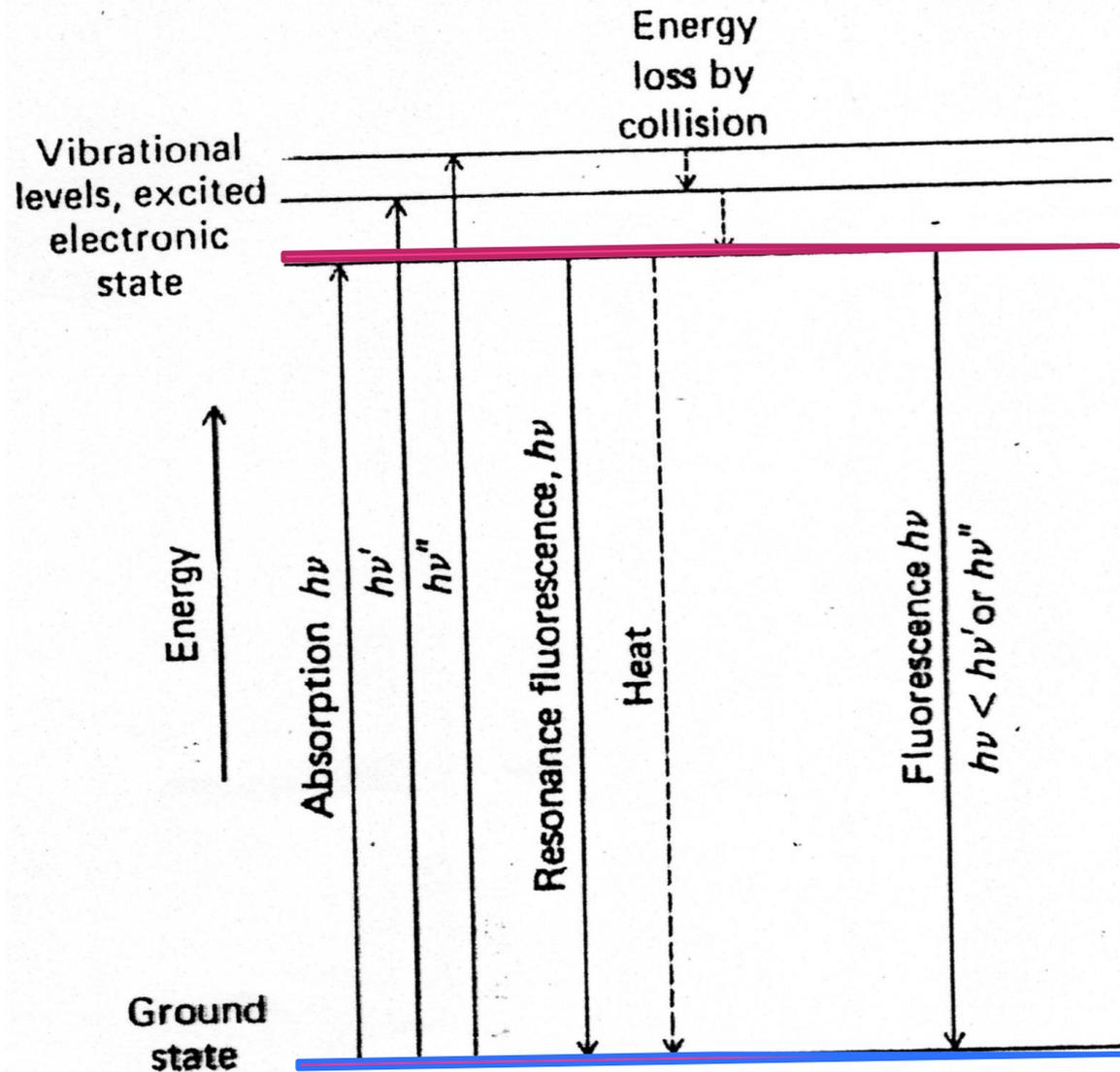
Tipo de espectroscopia	Intervalo habitual de longitud de onda *	Intervalo habitual de número de onda, $\text{cm}^{-1}$	Tipo de transición cuántica
Emisión de rayos gamma	0,005-1,4 Å	—	Nuclear
Absorción, emisión, fluorescencia y difracción de rayos X	0,1-100 Å	—	Electrones internos
Absorción ultravioleta de vacío	10-180 nm	$1 \times 10^6$ a $5 \times 10^4$	Electrones de enlace
Absorción, emisión y fluorescencia ultravioleta visible	180-780 nm	$5 \times 10^4$ a $1,3 \times 10^4$	Electrones de enlace
Absorción y dispersión Raman infrarroja	0,78-300 $\mu\text{m}$	$1,3 \times 10^4$ a $3,3 \times 10^1$	Rotación/vibración de moléculas
Absorción de microondas	0,75-3,75 mm	13-27	Rotación de moléculas
Resonancia de espín electrónico	3 cm	0,33	Espín de los electrones en un campo magnético
Resonancia magnética nuclear	0,6-10 m	$1,7 \times 10^{-2}$ a $1 \times 10^3$	Espín de los núcleos en un campo magnético

\*  $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ nm} = 10^{-8} \text{ cm}$   
 $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m} = 10^{-7} \text{ cm}$   
 $1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m} = 10^{-4} \text{ cm}$

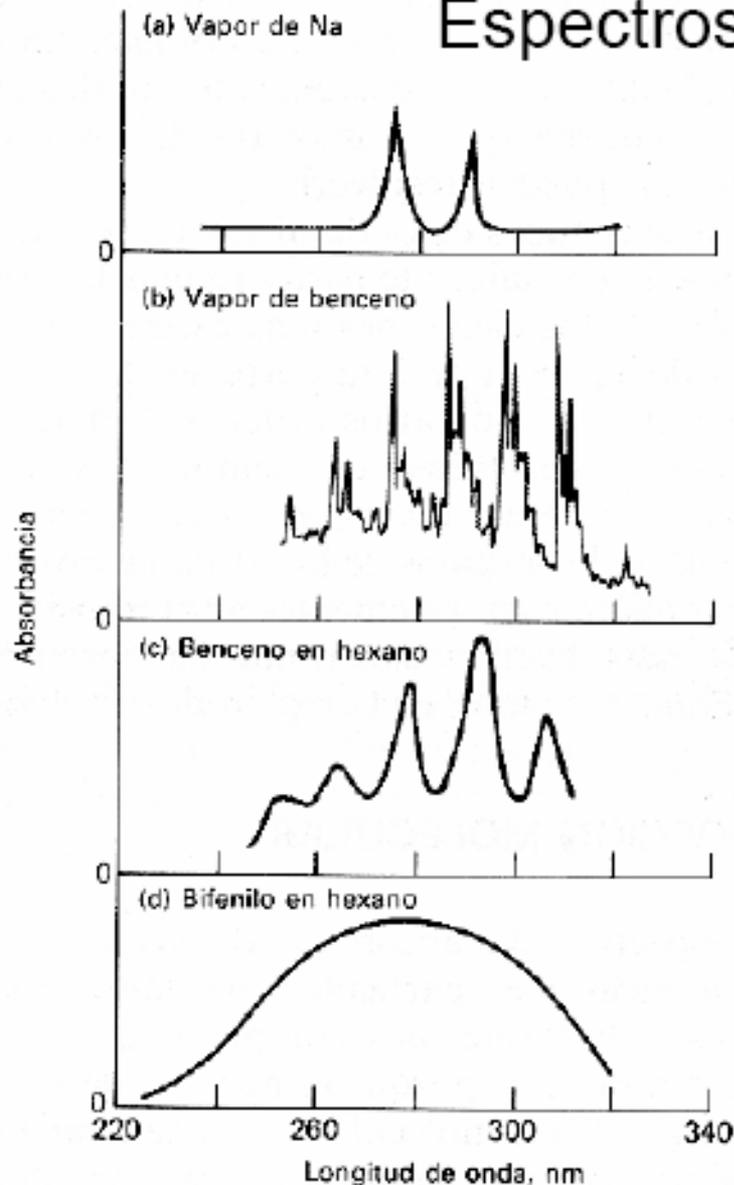
## Clases de técnicas espectrométricas

Clase	Potencia radiante medida	f(C)	Ejemplo de técnica
Emisión	Emitida, $P_e$	$P_e = k.C$	Emisión atómica 
Luminiscencia	Luminiscente, $P_l$	$P_l = k.C$	Fluorescencia atómica Fluorescencia molecular Fosforescencia
Dispersión	Dispersada, $P_d$	$P_d = k.C$	Nefelometría
Absorción	Incidente, $P_o$ Transmitida, $P$	$\log (P_o/P)=k.C$	Absorción atómica  Absorción molecular 

# Absorción de radiación UV-VIS por una molécula



# Espectros de absorción



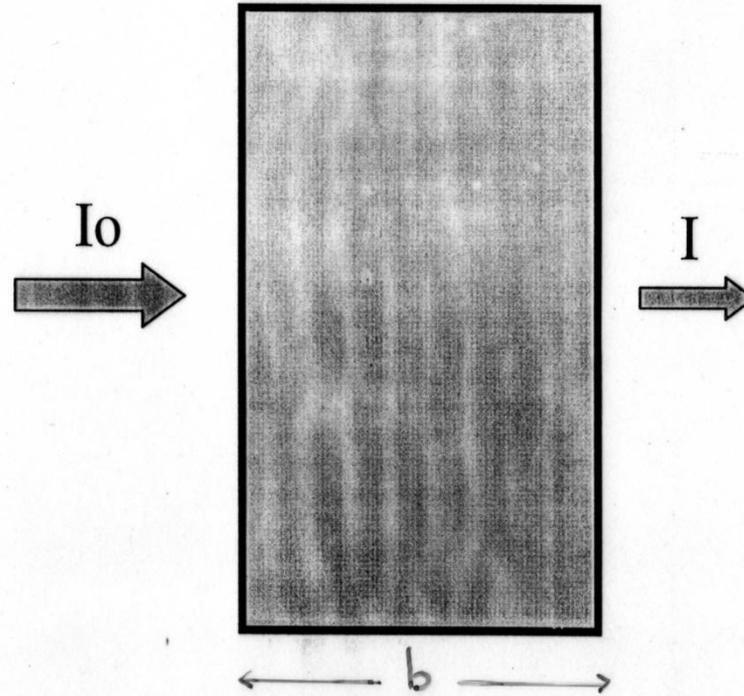
Espectros de absorción de átomos: Picos agudos debido a transiciones electrónicas

Espectros de absorción de moléculas poliatómicas: series de líneas de absorción muy próximas entre sí asociadas a cada transición electrónica, debido a la existencia de numerosos estados vibracionales. Por lo tanto el espectro tiene la forma de una banda de absorción.

$$I = N^\circ \text{ de fotones} / (\text{s cm}^2) = P / \text{cm}^2$$

**P**: potencia radiante

**I**: flujo fotónico



**Definiciones**

$$T = I / I_0$$

$$A = - \log T$$

**Lambert**, matemático, siglo XVIII:

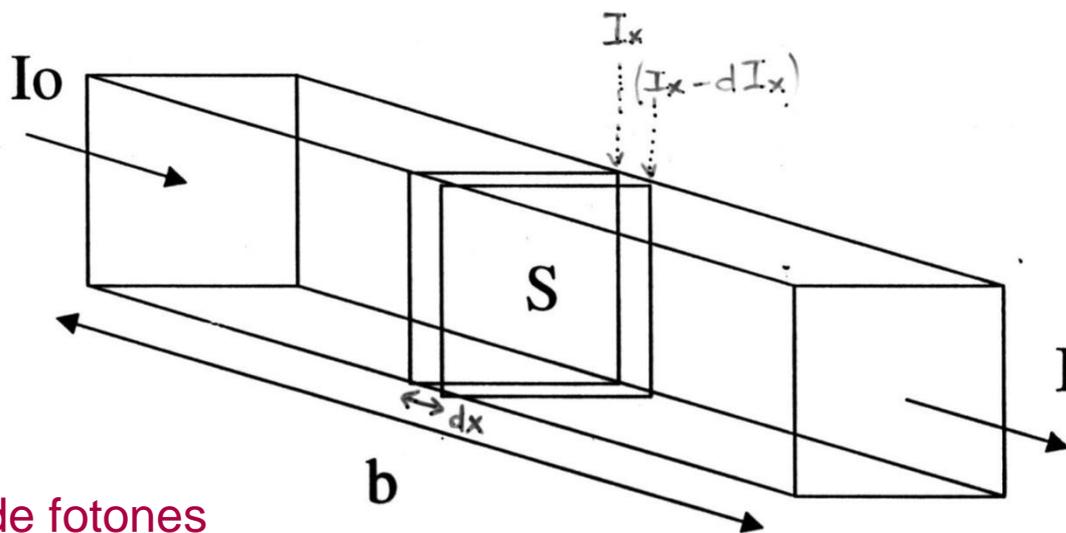
$$I = I_0 \exp(-k b)$$

**Beer**, físico alemán, siglo XIX:

$$I = I_0 \exp(-k' b c)$$

F. C. STRONG  
(1952)

## Ley de Beer



Área de captura de fotones

$$\frac{dS}{S} = \frac{\alpha dn}{S} \text{ Probabilidad de absorción}$$

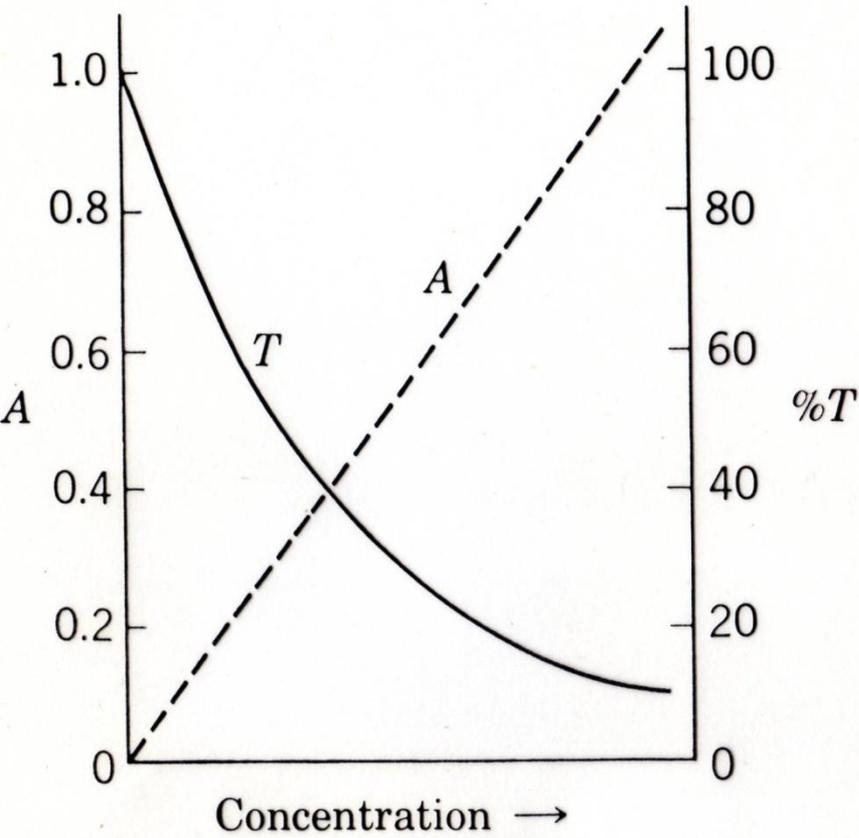
$$\frac{dI_x}{I_x} \text{ Fracción absorbida}$$

$$-\int_{I_0}^I \frac{dI_x}{I_x} = \int_0^n \frac{\alpha dn}{S}$$

$$\text{Log} \frac{I_0}{I} = \frac{\alpha n}{2.303 S} = \epsilon b c = A$$

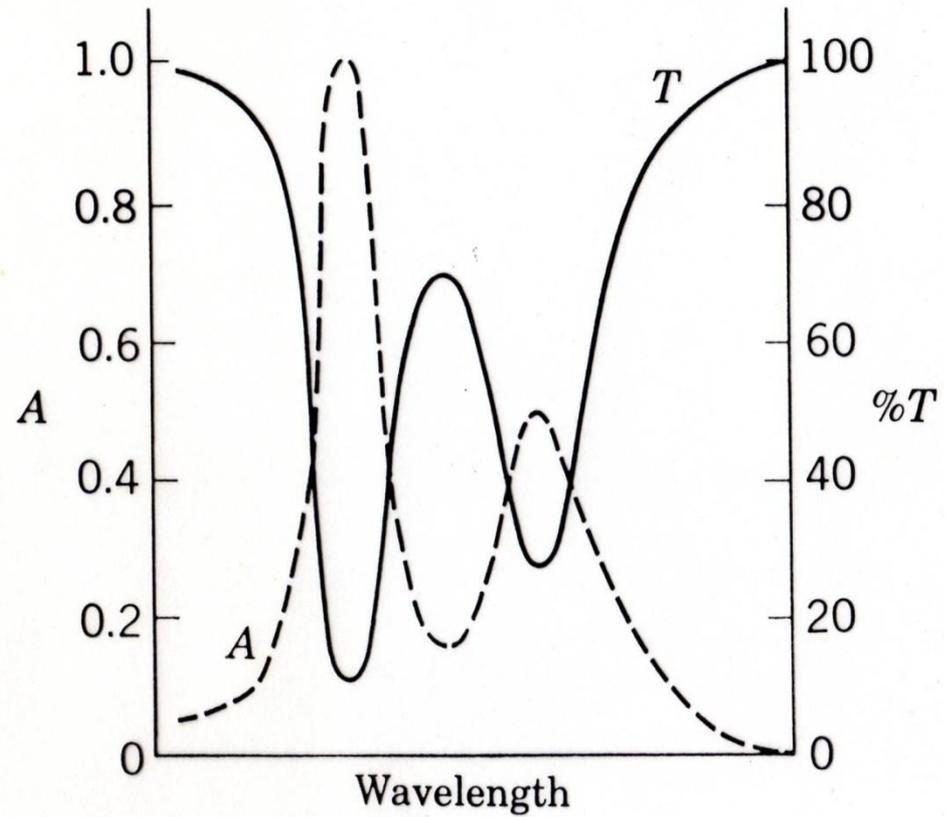
## Curva de calibración

$\lambda$  fija,  $c$  variable

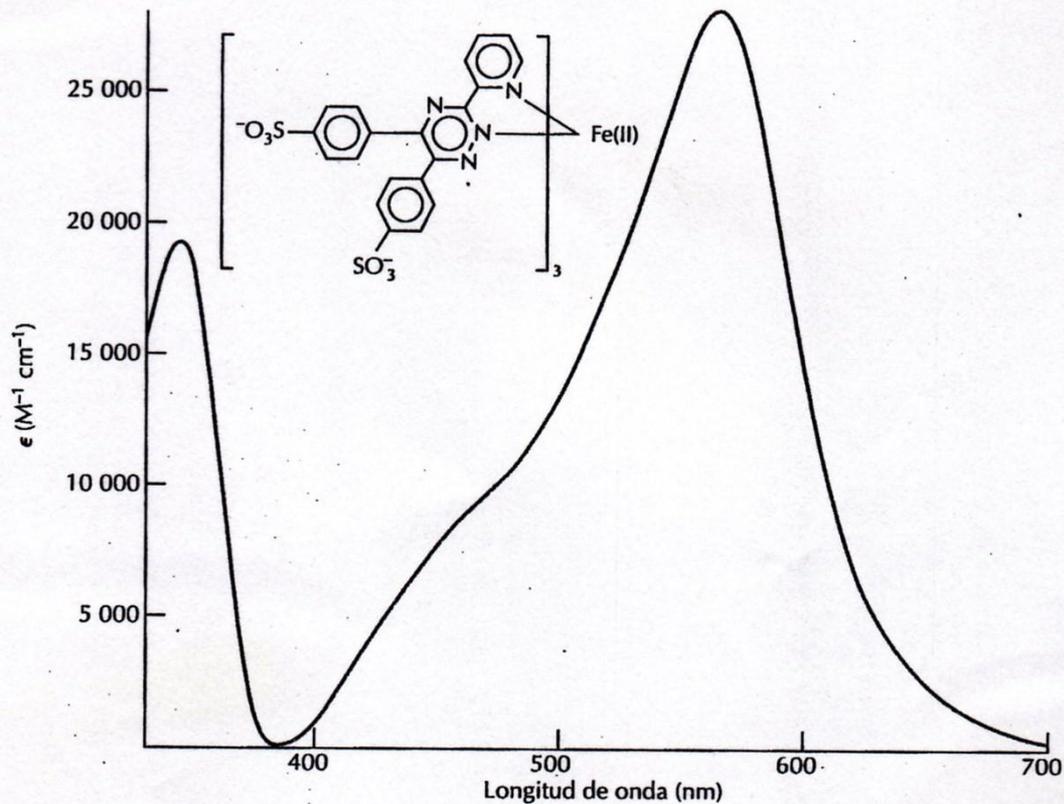
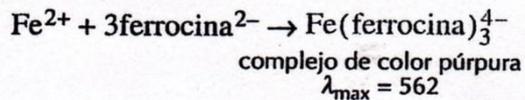


## Espectro

$c$  fija,  $\lambda$  variable

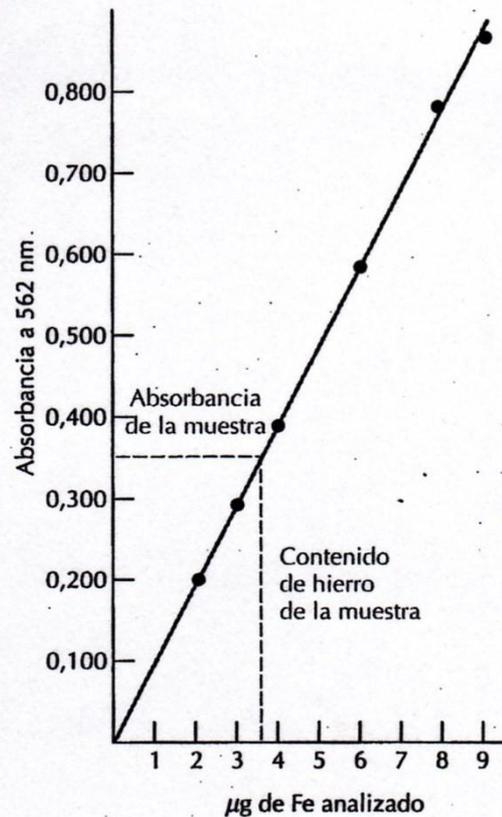


$= c$   
 $\neq b$



Espectro de absorción visible del complejo  $\text{Fe}(\text{II})(\text{ferrocina})_3$  que se utiliza en el análisis colorimétrico del hierro.

La ley de Beer en análisis químico



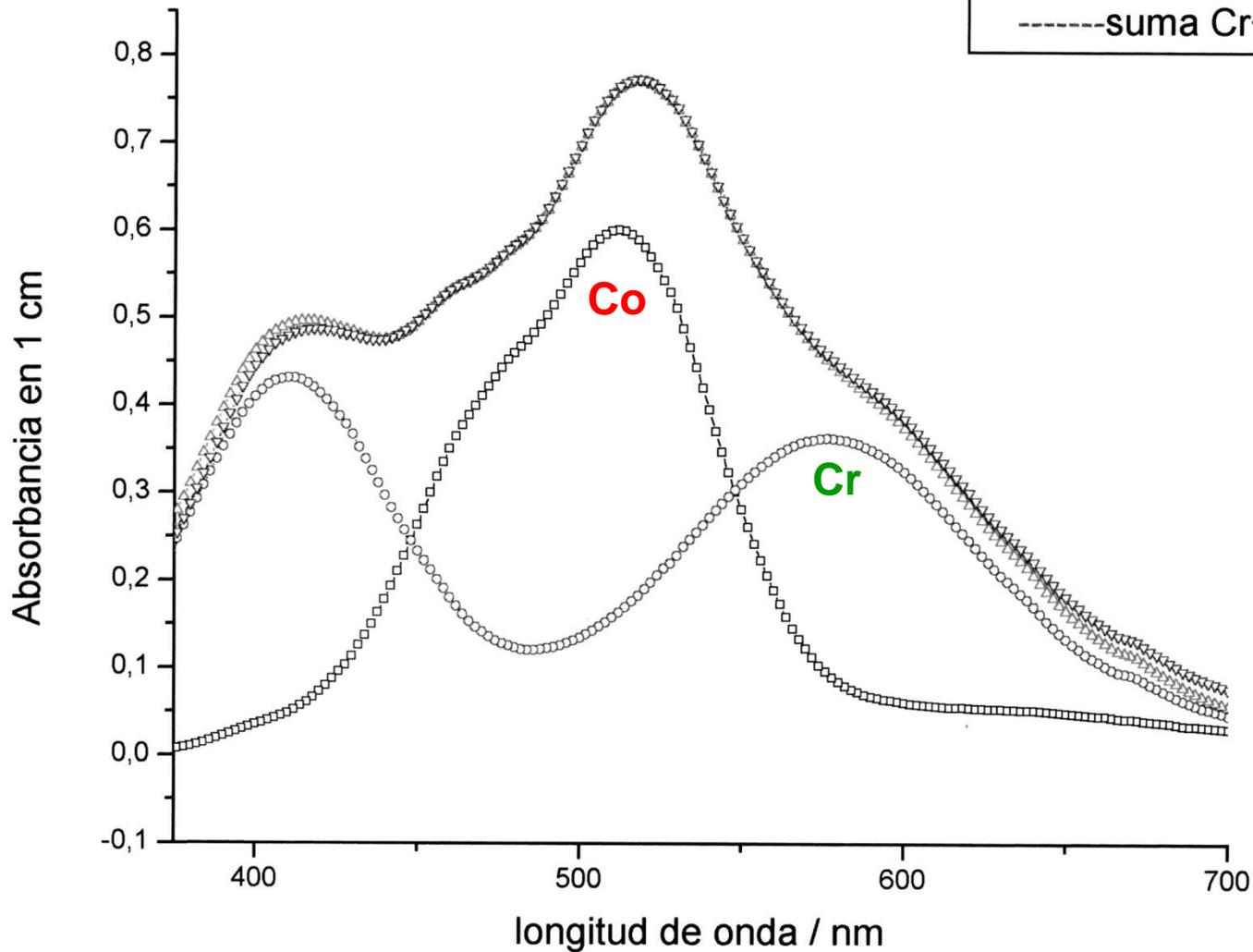
Curva de calibrado que muestra el cumplimiento de la ley de Beer por parte del complejo  $\text{Fe}(\text{II})(\text{ferrocina})_3$  que se utiliza en la determinación de hierro en suero. Todas las muestras se diluyen a un volumen final de 5,00 ml. Por consiguiente,  $1,00 \mu\text{g}$  de hierro equivale a una concentración de  $3,58 \times 10^{-6} \text{ M}$ .

# Aditividad de Absorbancias

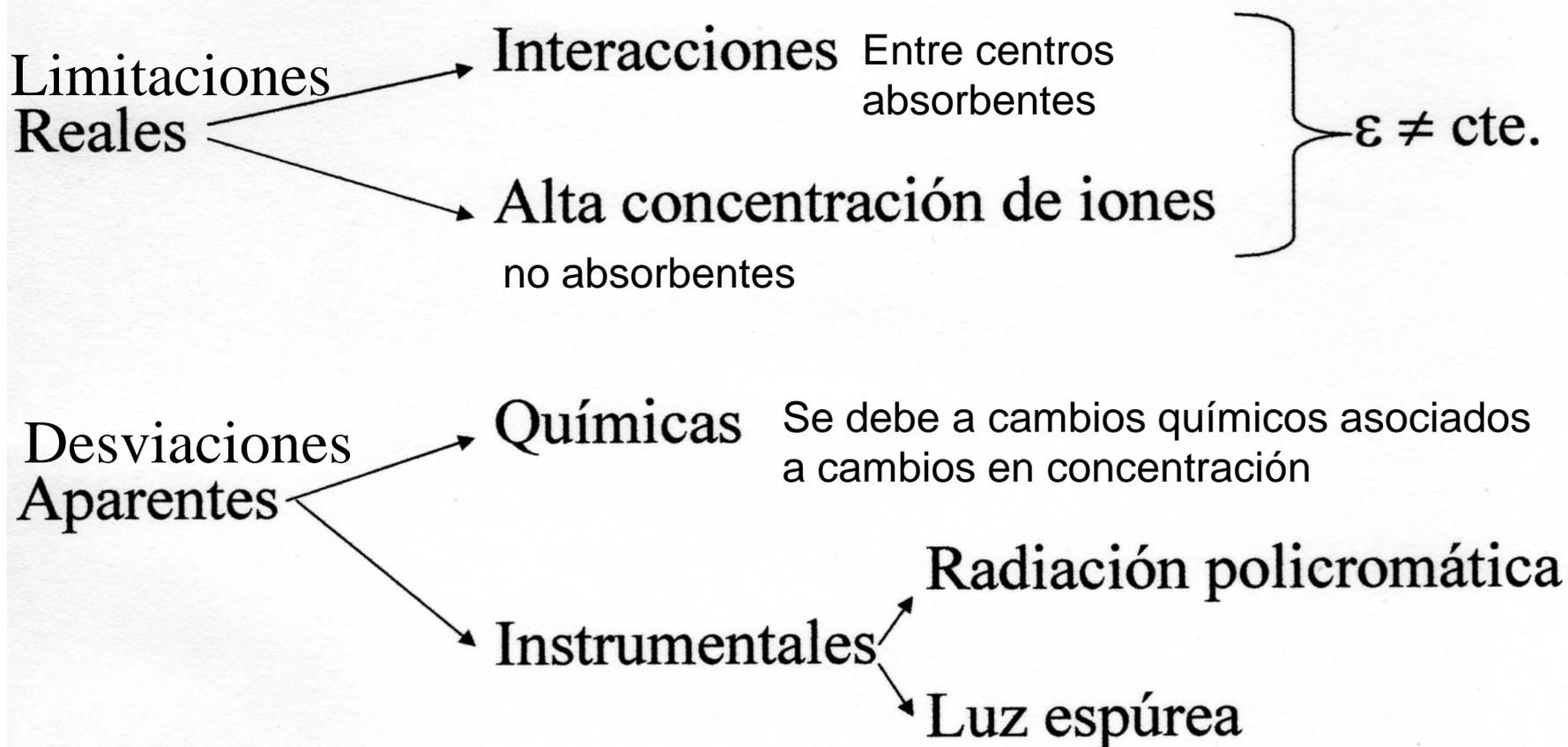
## Co(II), Cr(III) en agua

$$A^\lambda = \epsilon^\lambda_{Co} \cdot b \cdot C_{Co} + \epsilon^\lambda_{Cr} \cdot b \cdot C_{Cr}$$

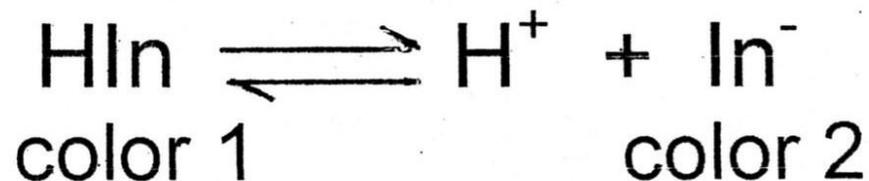
- Co 0,094 M
- Cr 0,025 M
- Cr+Co iguales conc.
- suma Cr+Co



# Desviaciones con respecto a la ley de Beer



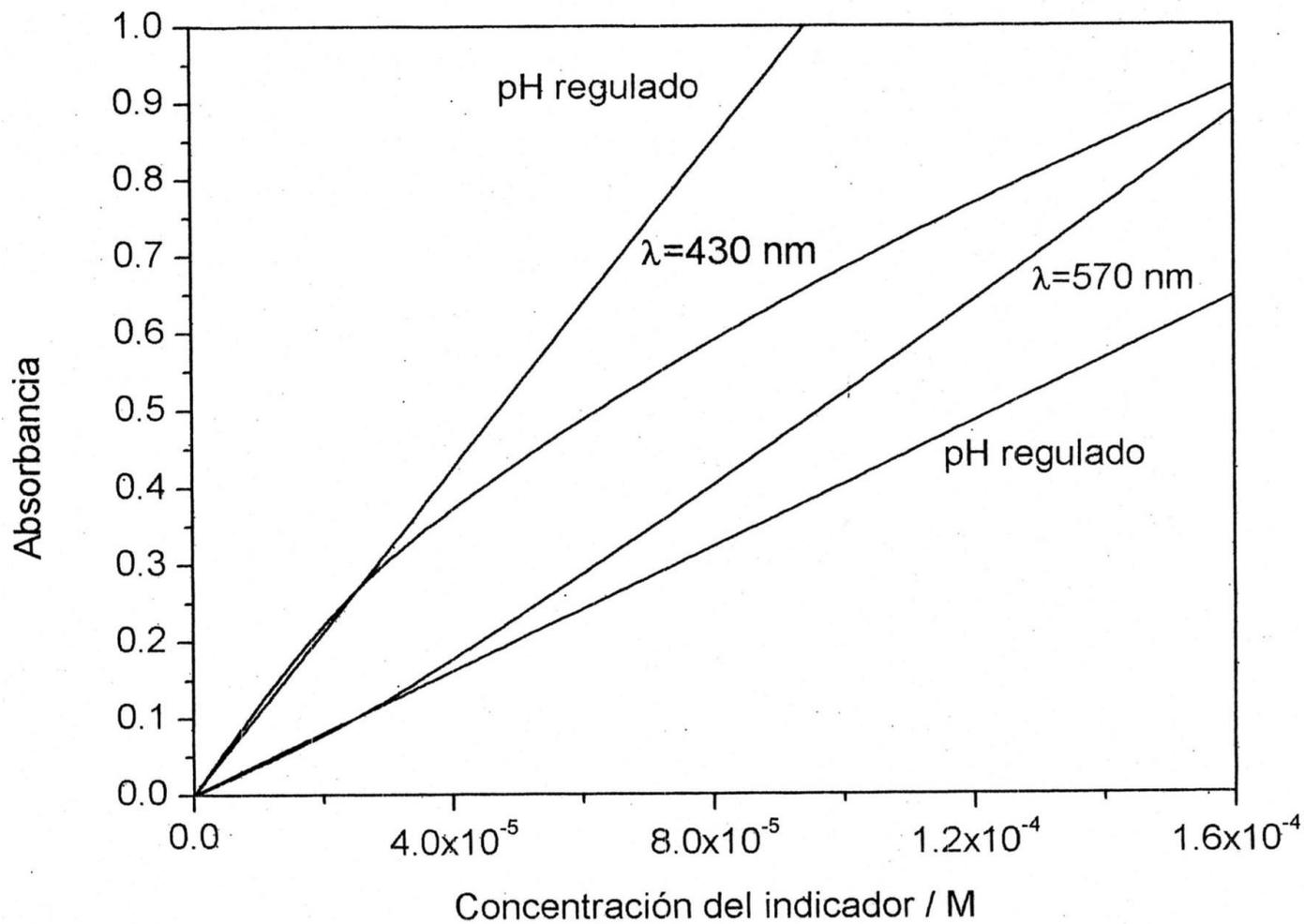
## Desviación de origen químico



Coeficientes de absorción molar /  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

	430 nm	570 nm
HIn	630	7120
In <sup>-</sup>	20600	961

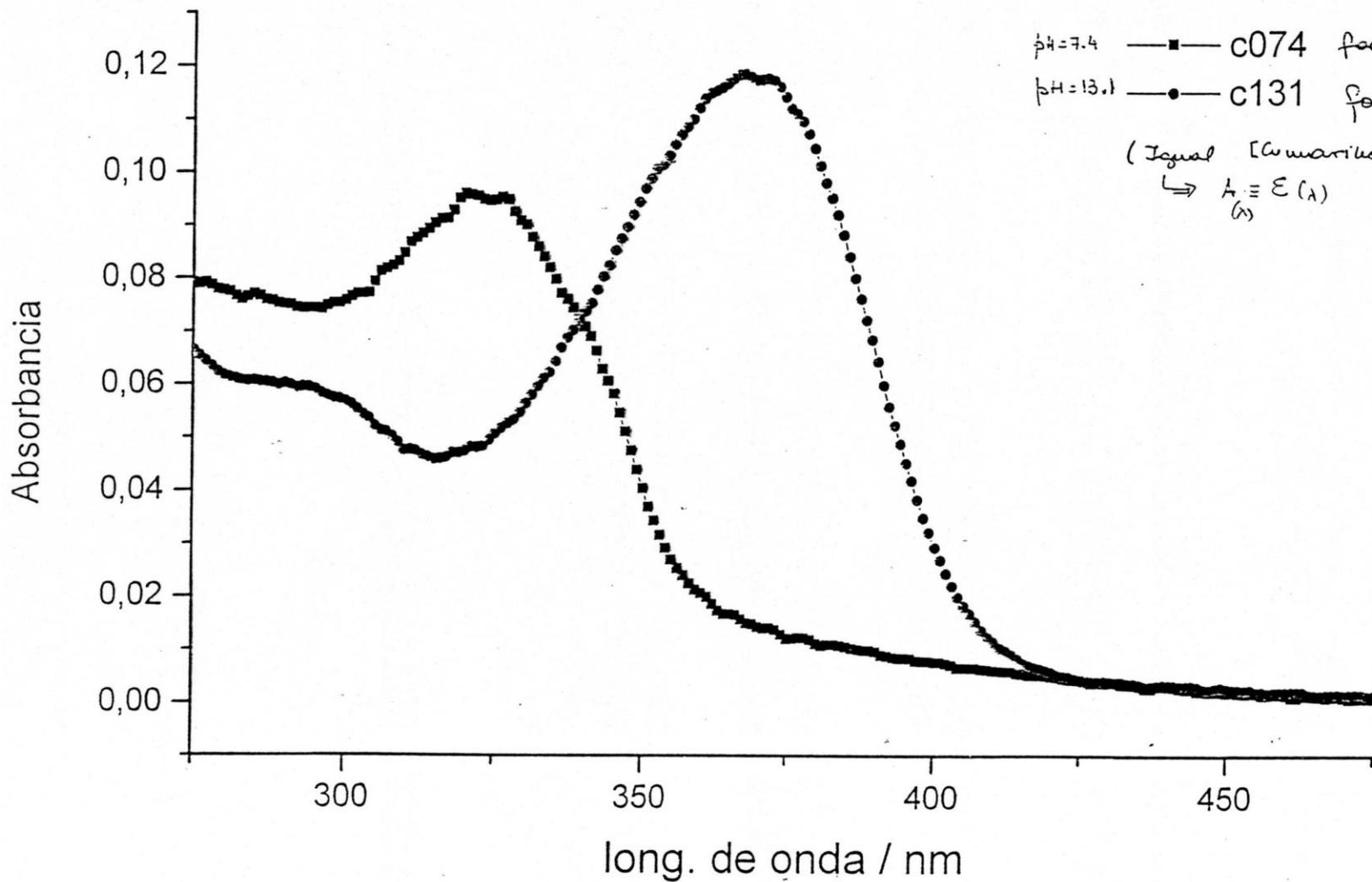
$$A_\lambda (\text{medida}) = A_\lambda (\text{HIn}) + A_\lambda (\text{In}^-)$$



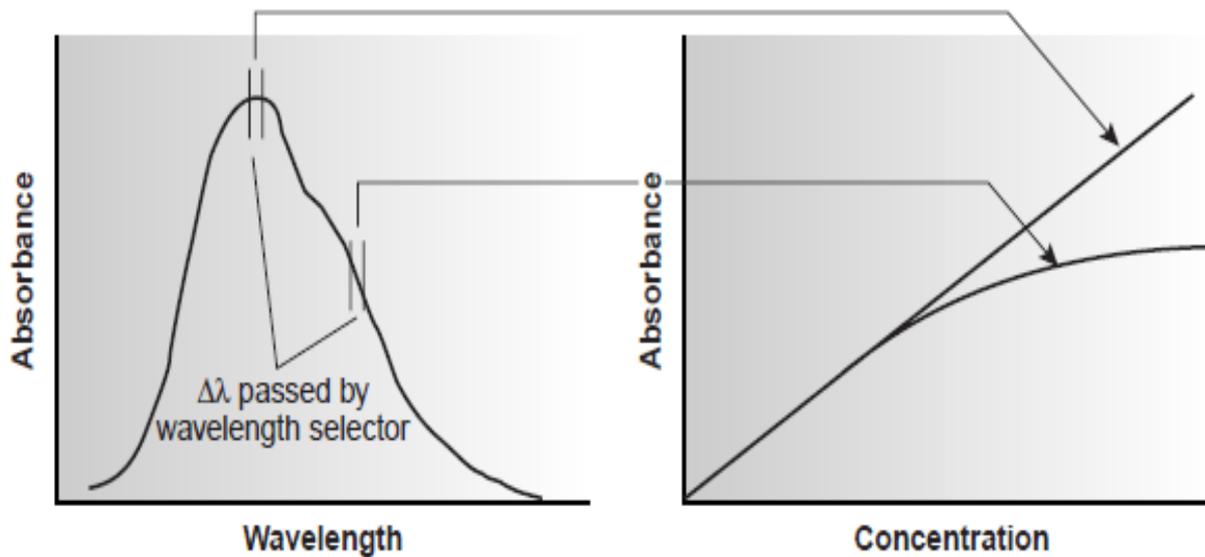
pH regulado:  $\text{pH} = \text{pK}_a = 4,85$

Punto Isosbético

Cumarina en SDS pKa ~ 11



## Efecto de la radiación policromática



**Figure 10.23**

Effect of wavelength on the linearity of a Beer's law calibration curve.

## Efecto de la radiación policromática

Longitudes de onda  $\lambda$  y  $\lambda'$

$$A = \epsilon b c = \text{Log} \frac{I_0}{I}$$

$$I = I_0 10^{-\epsilon b c}$$

$$A' = \epsilon' b c = \text{Log} \frac{I'_0}{I'}$$

$$I' = I'_0 10^{-\epsilon' b c}$$

$$A_m = \text{Log} \frac{I_0 + I'_0}{I + I'} = \text{Log} (I_0 + I'_0) - \text{Log} (I_0 10^{-\epsilon b c} + I'_0 10^{-\epsilon' b c})$$

Supongamos que  $I_0'$  representa una fracción  $r$  de  $I_0$ :  $r = I_0'/I_0$

$$A_m = \log(I_0 (1 + r)) - \log(I_0 10^{-\varepsilon b C} + r I_0 10^{-\varepsilon' b C})$$

$$A_m = \log(1 + r) + \varepsilon b C - \log(1 + r 10^{(\varepsilon - \varepsilon') b C})$$

Am será función lineal de C si

- $r = 0$  realmente monocromático
- $\varepsilon = \varepsilon'$  prácticamente monocromático

$$\frac{dA}{d(bC)} = \varepsilon - \frac{[r (\varepsilon - \varepsilon') 10^{(\varepsilon - \varepsilon') b C}]}{[1 + r 10^{(\varepsilon - \varepsilon') b C}]}$$

Cuando  $(bC) \rightarrow \infty$

- Si  $\varepsilon > \varepsilon'$   $dA/d(bC) \rightarrow \varepsilon'$
- Si  $\varepsilon' > \varepsilon$   $dA/d(bC) \rightarrow \varepsilon$

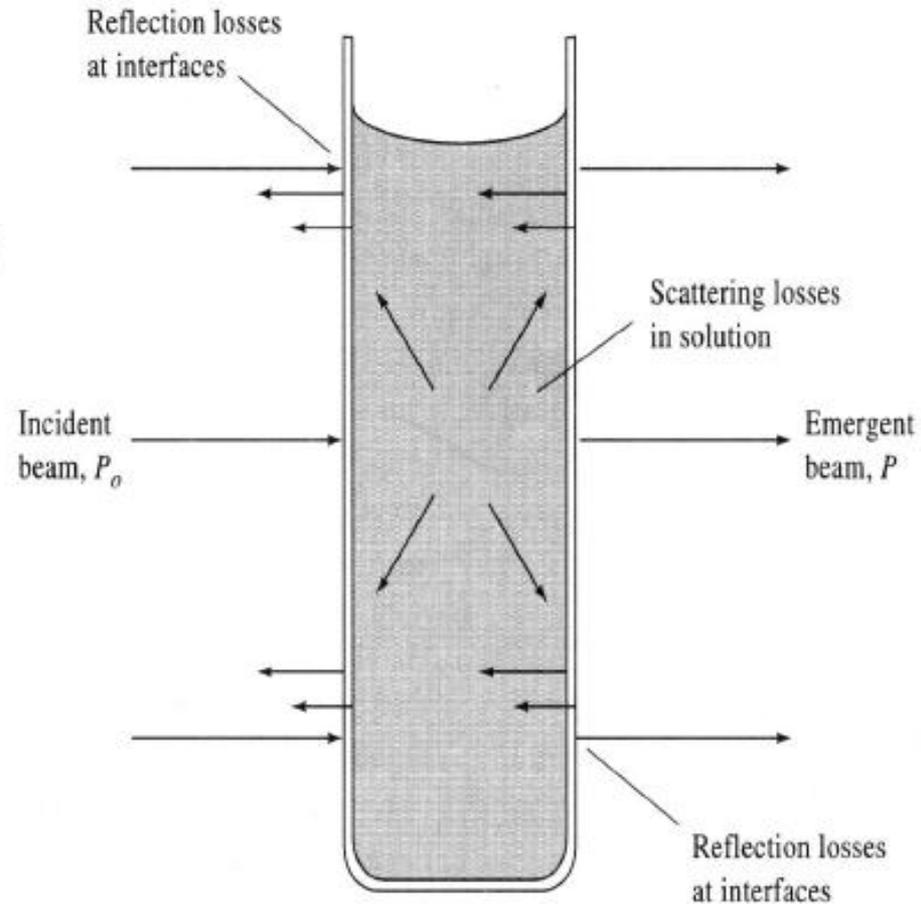
## CUBETAS IDÉNTICAS PARA MUESTRA Y REFERENCIA

### □ Transmittance (T)

$$T = \frac{P}{P_0} \quad \text{and} \quad \%T = T \times 100$$

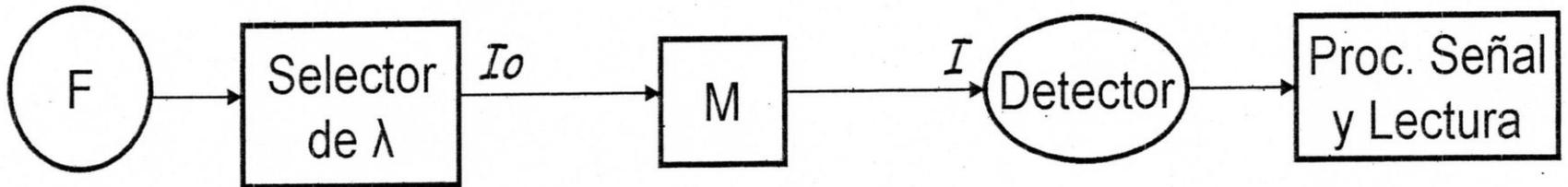
Where:  $P_0$  = Power of incident beam,  
 $P$  = Power of emergent beam

$$T = P_{\text{solution}} / P_{\text{solvent}}$$



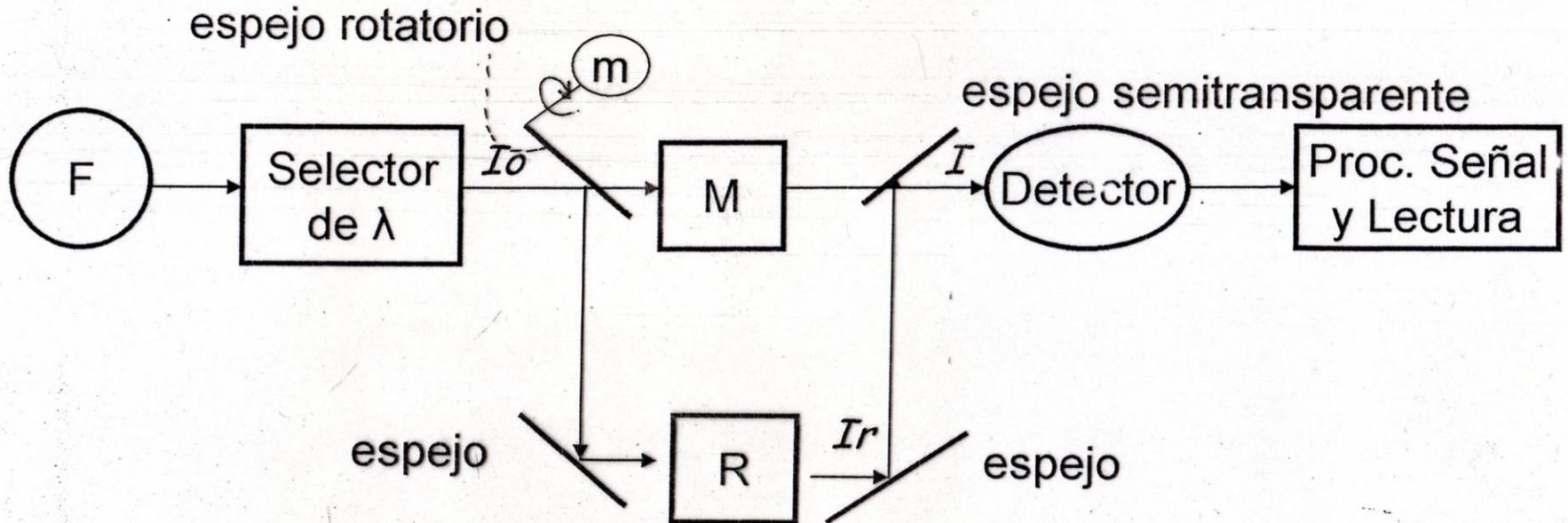
# ESPECTROFOTÓMETRO DE ABSORCIÓN

## SIMPLE HAZ



# ESPECTROFOTÓMETRO DE ABSORCIÓN

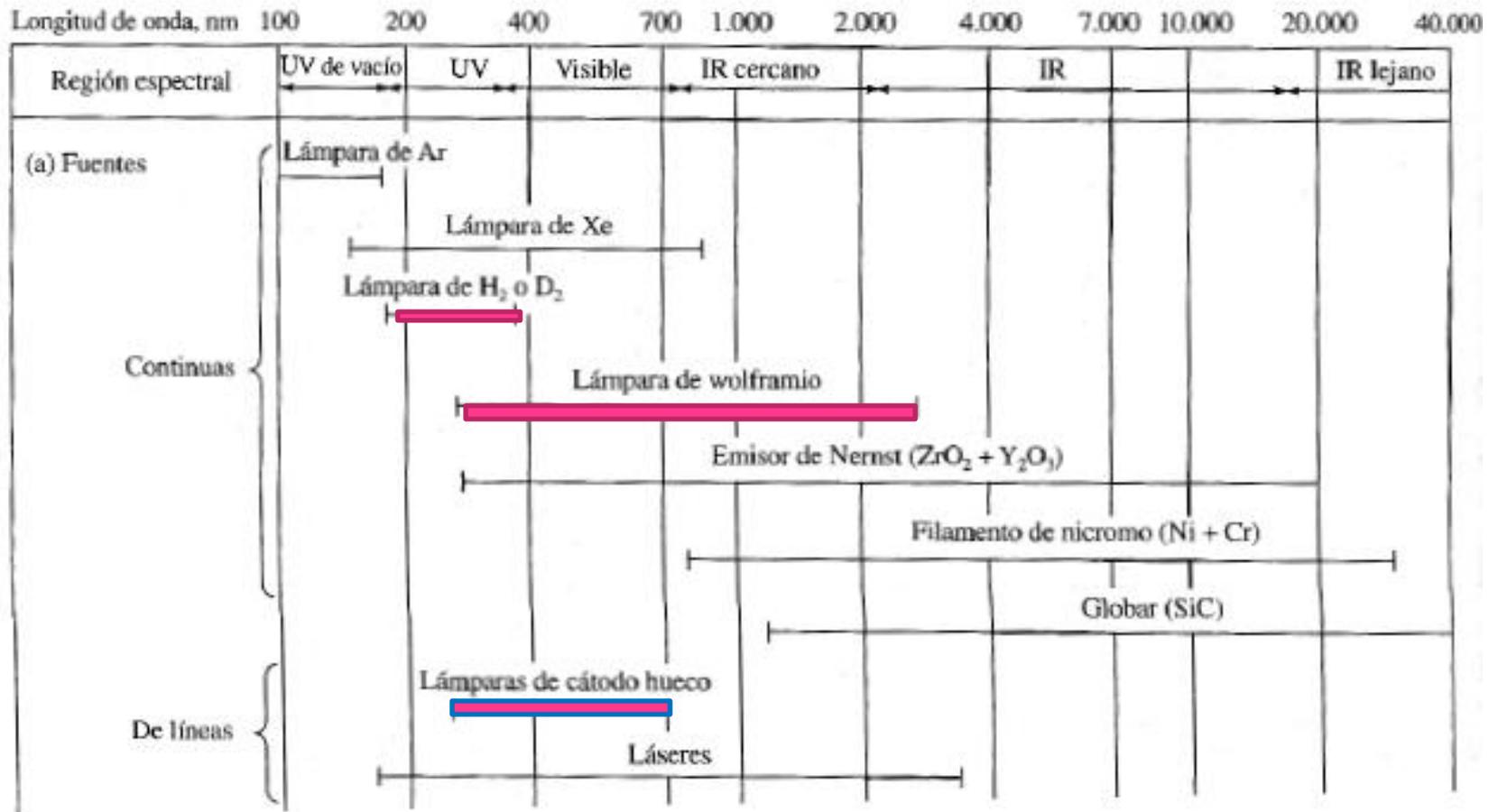
## DOBLE HAZ



$$A = \log (I_r/I)$$

- Suficiente energía radiante en el intervalo de long. de onda utilizado
- $I = cte$  durante la medición

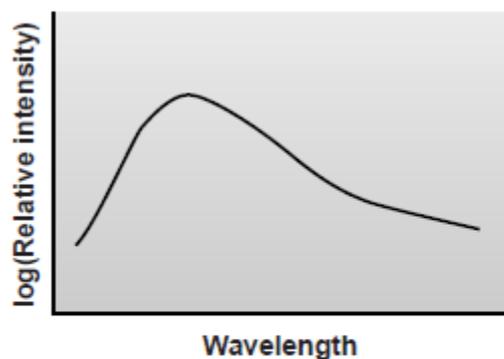
## Fuentes



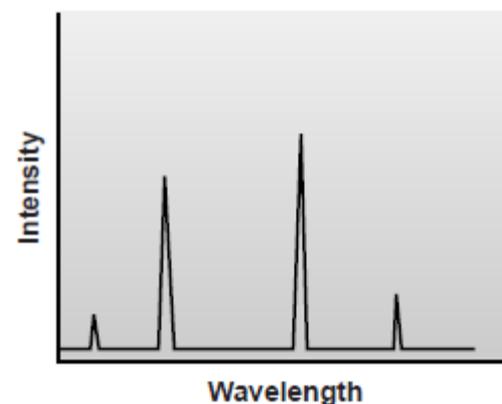
**Table 10.3** Common Sources of Electromagnetic Radiation for Spectroscopy

Source	Wavelength Region	Useful for
H <sub>2</sub> and D <sub>2</sub> lamp	continuum source from 160–380 nm	UV molecular absorption
tungsten lamp	continuum source from 320–2400 nm	Vis molecular absorption
Xe arc lamp	continuum source from 200–1000 nm	molecular fluorescence
Nernst glower	continuum source from 0.4–20 $\mu\text{m}$	IR molecular absorption
globar	continuum source from 1–40 $\mu\text{m}$	IR molecular absorption
nichrome wire	continuum source from 0.75–20 $\mu\text{m}$	IR molecular absorption
hollow cathode lamp	line source in UV/Vis	atomic absorption
Hg vapor lamp	line source in UV/Vis	molecular fluorescence
laser	line source in UV/Vis	atomic and molecular absorption, fluorescence and scattering

Abbreviations: UV: ultraviolet; Vis: visible; IR: infrared.

**Figure 10.8**

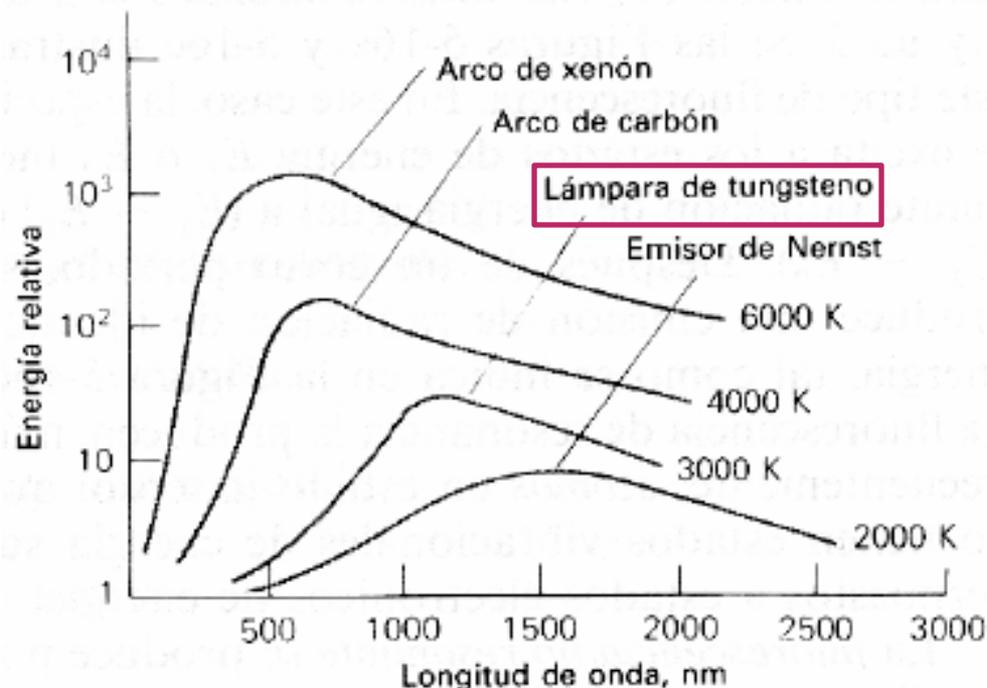
Emission spectrum from a typical continuum source.

**Figure 10.9**

Emission spectrum from a typical line source.

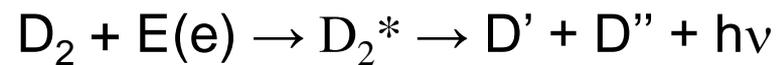
# Fuentes de radiación

**Fuentes continua:** emiten radiación que varía de forma gradual con la longitud de onda. Lámpara de deuterio, lámparas de arco de Ar, Xe o Hg (región UV). Filamento de W (visible). Sólidos calentados a 1500-2000 K.



**Fuentes de líneas:** emiten un número limitado de líneas o bandas cada una abarca un intervalo limitado de longitudes de onda. Lámparas de vapor de Hg y Na brindan pocas líneas agudas en el UV-visible. Las lámparas de cátodo hueco y las lámparas de descarga sin electrodos son las fuentes de líneas más importantes para los métodos de absorción atómica y fluorescencia. Los láseres tienen elevada intensidad, ancho de banda muy angosto (<0.1 nm), señal coherente y se los utiliza en las regiones infrarrojo UV, visible

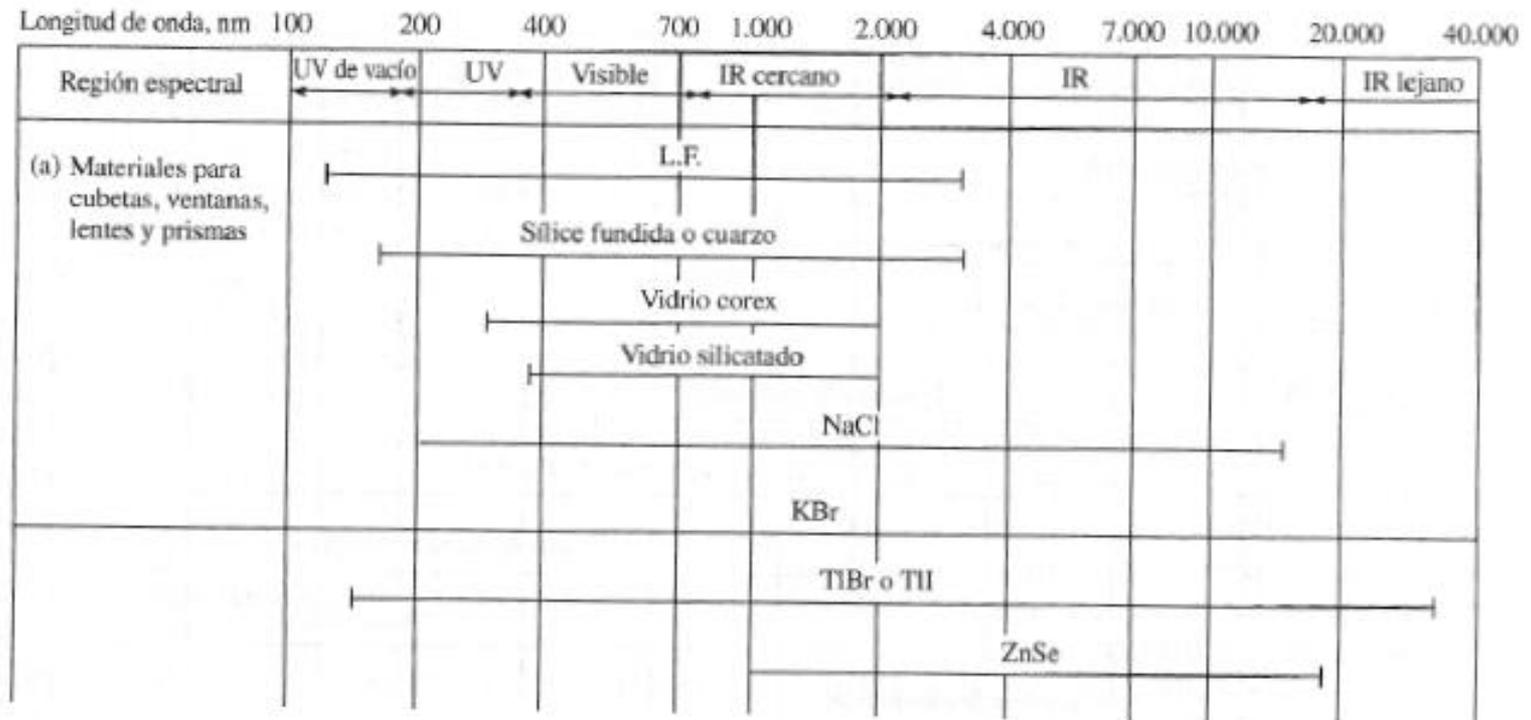
# LÁMPARAS DE DEUTERIO (UV) gas a baja presión



$$E(e) = E(D_2^*) = E(D') + E(D'') + E(h\nu)$$

(E cinética)                      (entre 160 y 360 nm)

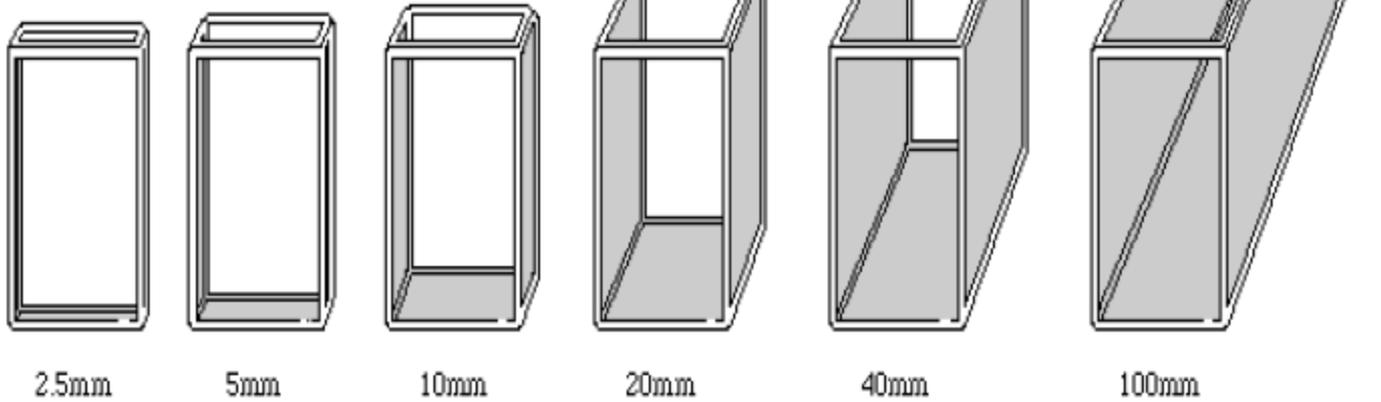
# Recipientes para muestras



Al igual que los elementos ópticos de los monocromadores, las celdas que contienen las muestras se deben fabricar de un material que sea transparente a la radiación de la región espectral de interés.

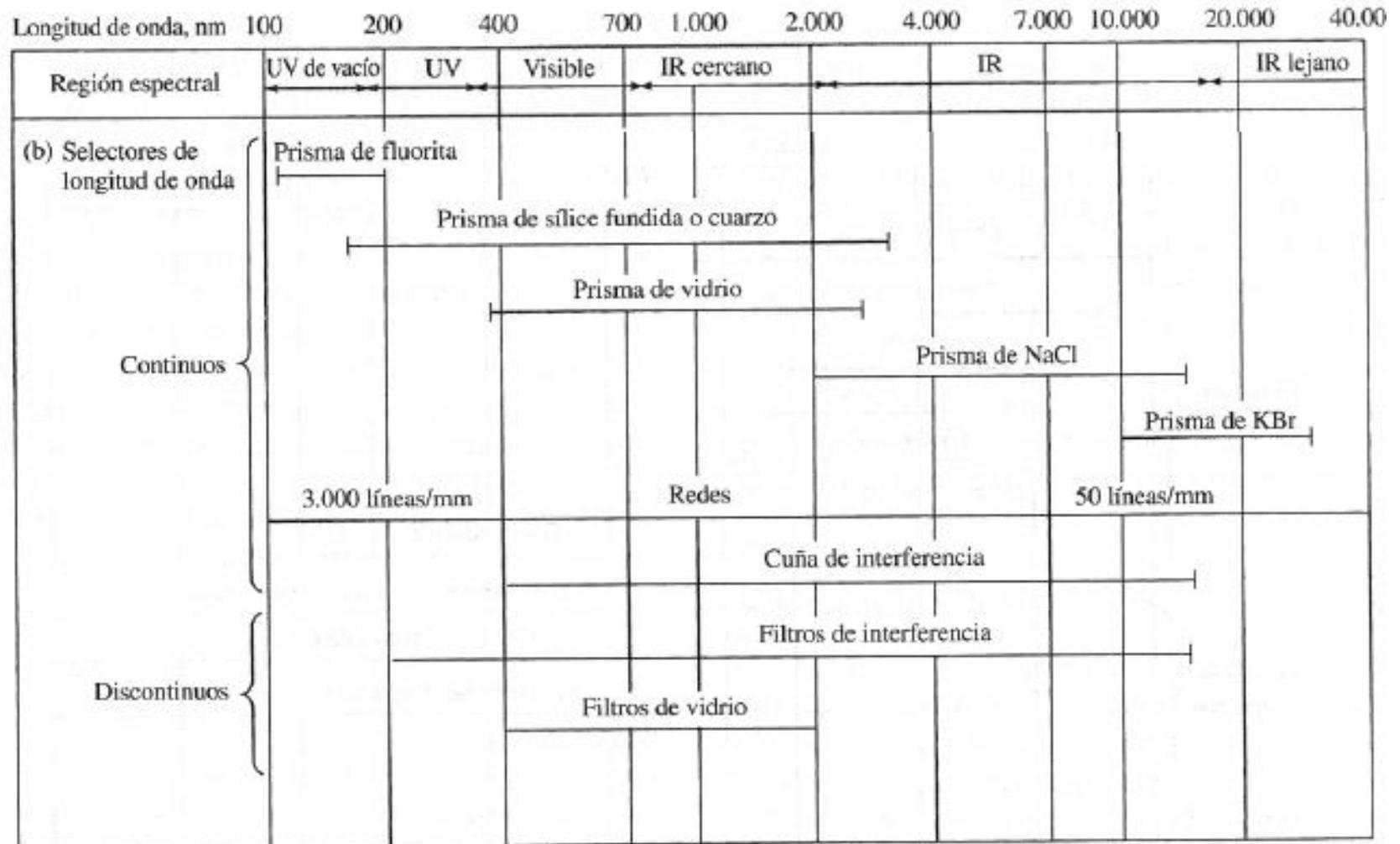


Volumen reducido



Camino óptico variable

# Selectores de longitud de onda

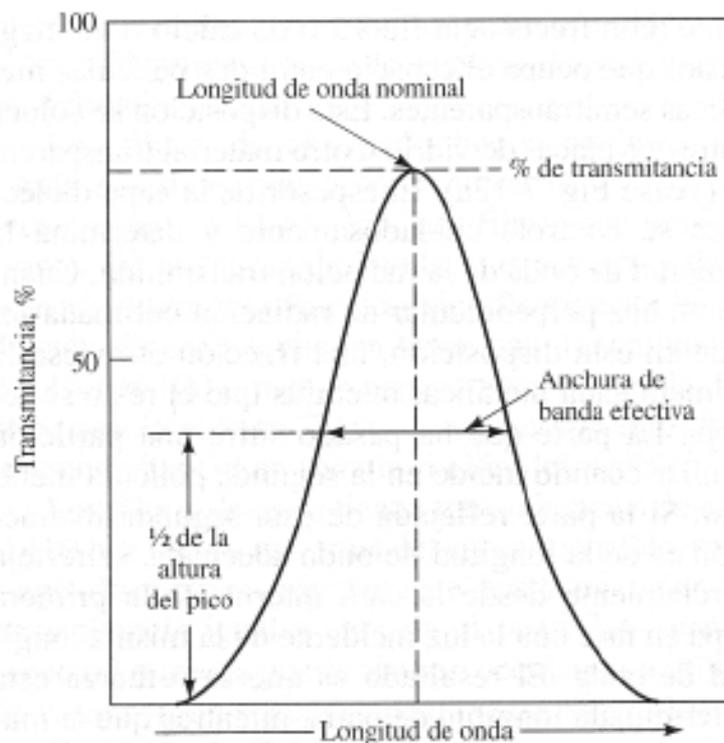


# Selectores de longitud de onda

Banda: grupo continuo y limitado de longitudes de onda.

Menores Ancho de Banda proporcionan selectividad en los métodos de absorción y emisión

Se representa el porcentaje de radiación de determinada longitud de onda, incidente en el selector que es transmitida en función de la longitud de onda.

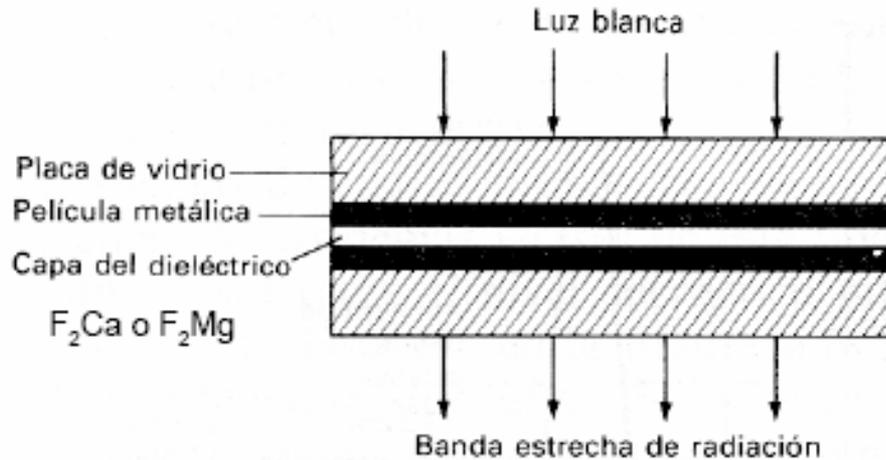


La anchura de banda efectiva es una medida inversa de la calidad del selector de longitudes de onda

Dos clases de selectores:

1. Filtros
  - 1.1 Filtros de interferencia (operan en el UV, visible e infrarrojo)
  - 1.2 Filtro de absorción (operan en el visible)
- 2 Monocromadores
  - a. Prisma
  - b. Red

# Filtros de interferencia



(a)

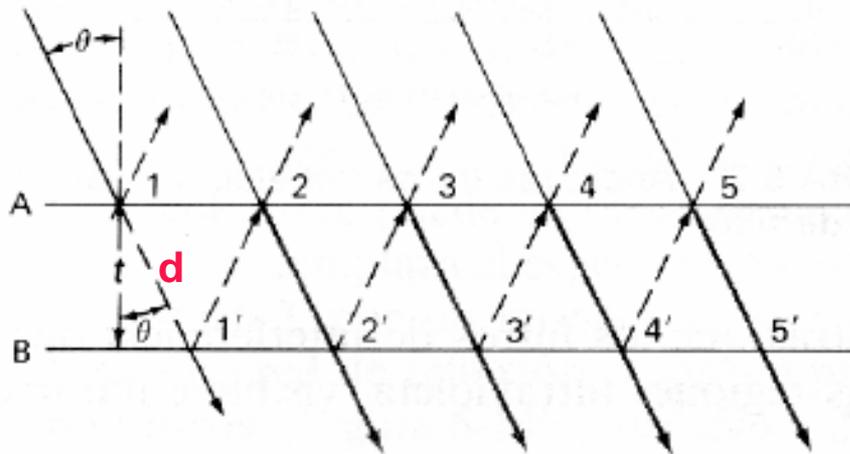
espesor del material central

$$n\lambda' = \frac{2t}{\cos \vartheta}$$

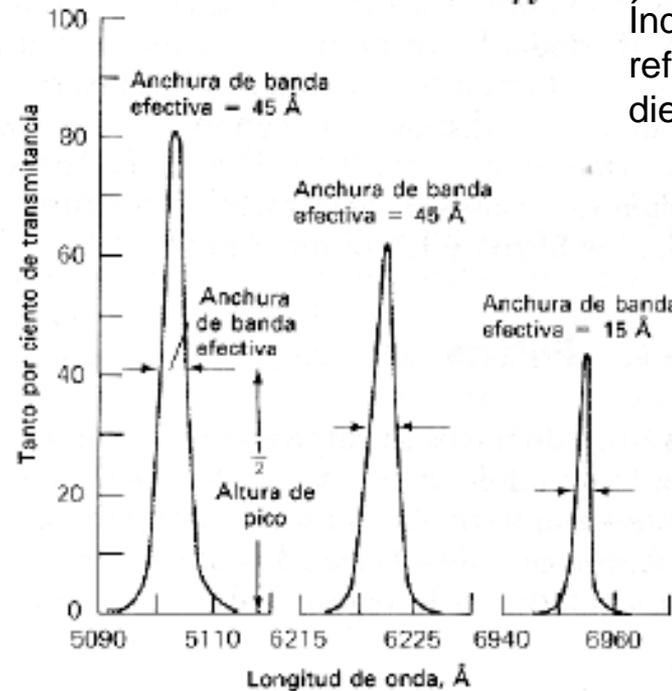
$$\vartheta \approx 0 \rightarrow n\lambda' \approx 2t$$

$$\lambda = \lambda' \eta \rightarrow \lambda \approx \frac{2t\eta}{n}$$

Índice de refracción del dieléctrico



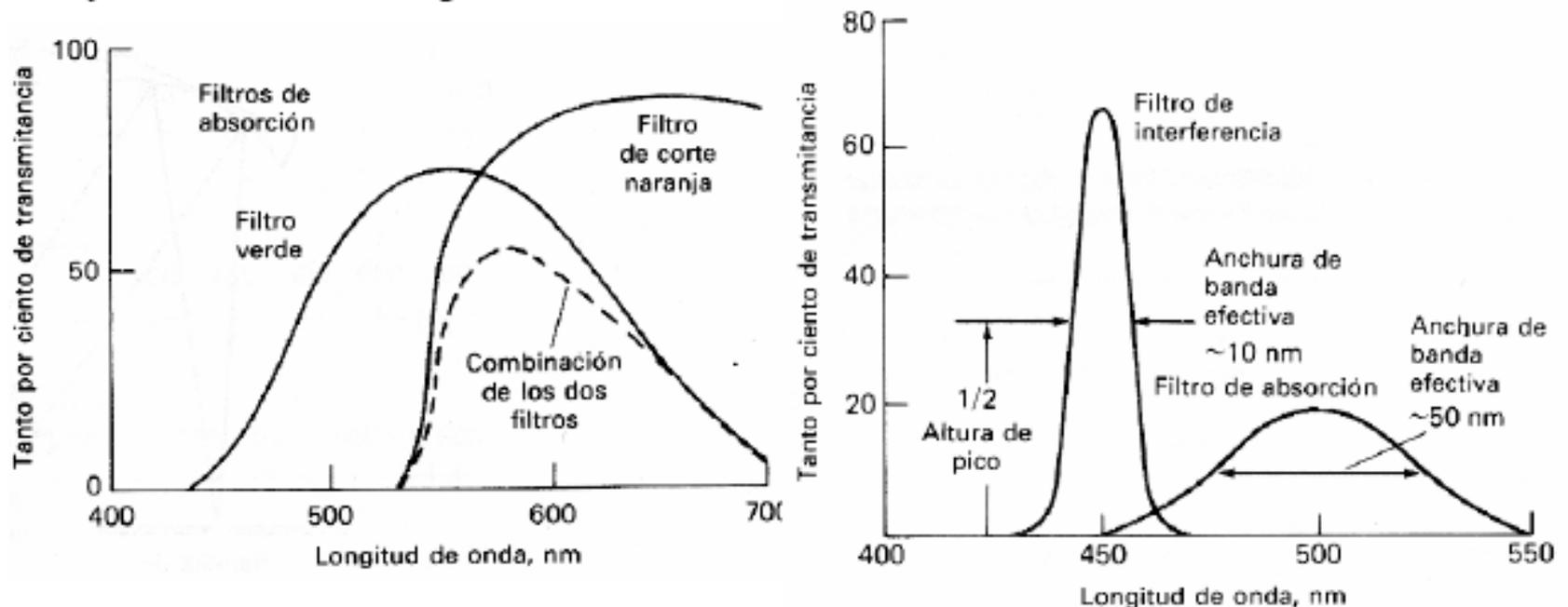
$$n\lambda' = 2d$$



# Filtros de absorción

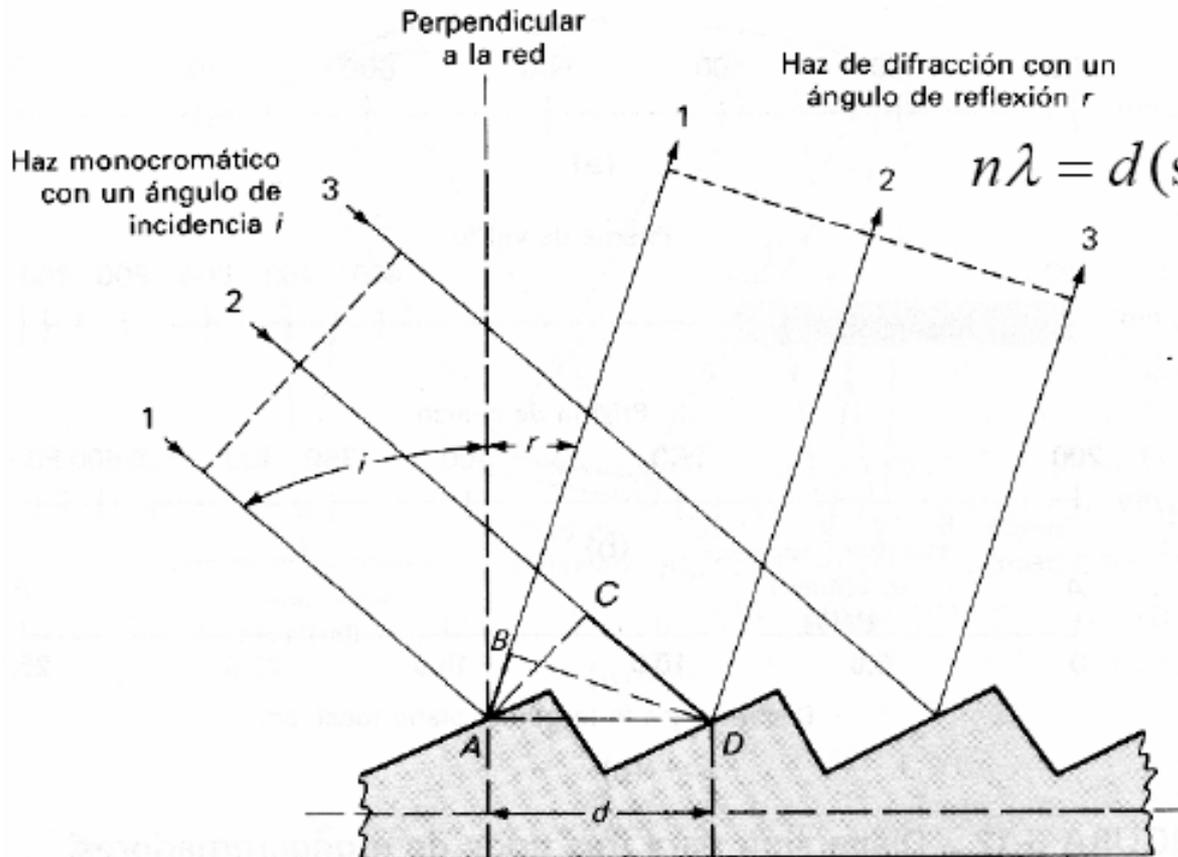
**Absorción:** Construidos con un material que posee una banda de absorción (vidrio coloreado). Funcionan absorbiendo ciertas zonas del espectro. Tienen anchuras entre 30 y 250 nm y pueden tener una transmitancia de ~ 10% o menos.

**Corte:** Los filtros de corte tiene transmitancias del 100% en una zona del espectro visible que decae a cero en el resto. El acoplamiento de un filtro de corte y uno de absorción genera una banda espectral estrecha



Elemento dispersor: red de difracción

## Monocromadores de red



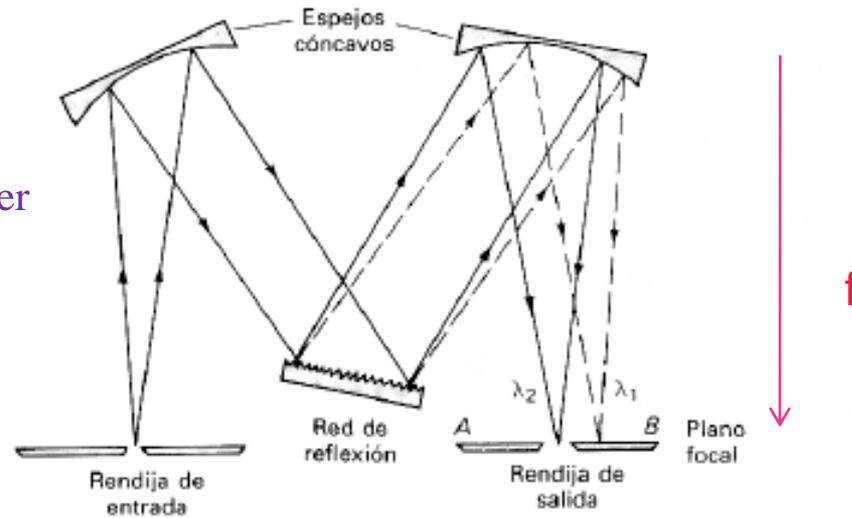
$$n\lambda = d(\sin i + \sin r)$$

+ :  $i$  y  $r$  de igual lado de la  $\perp$  a la red

# Monocromadores

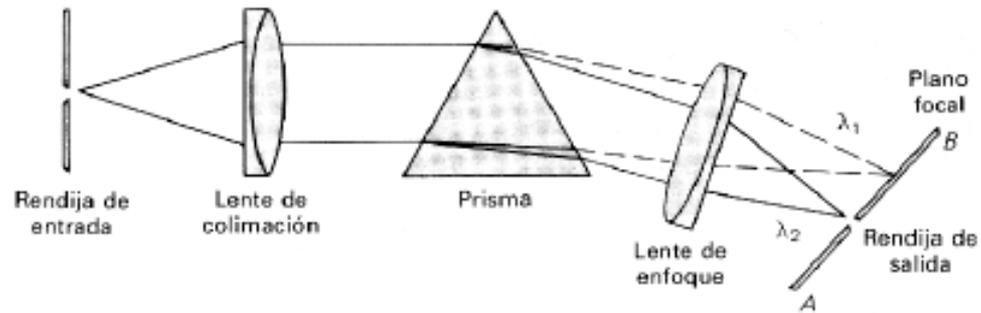
Monocromador de red

Montaje Czerny-Turner

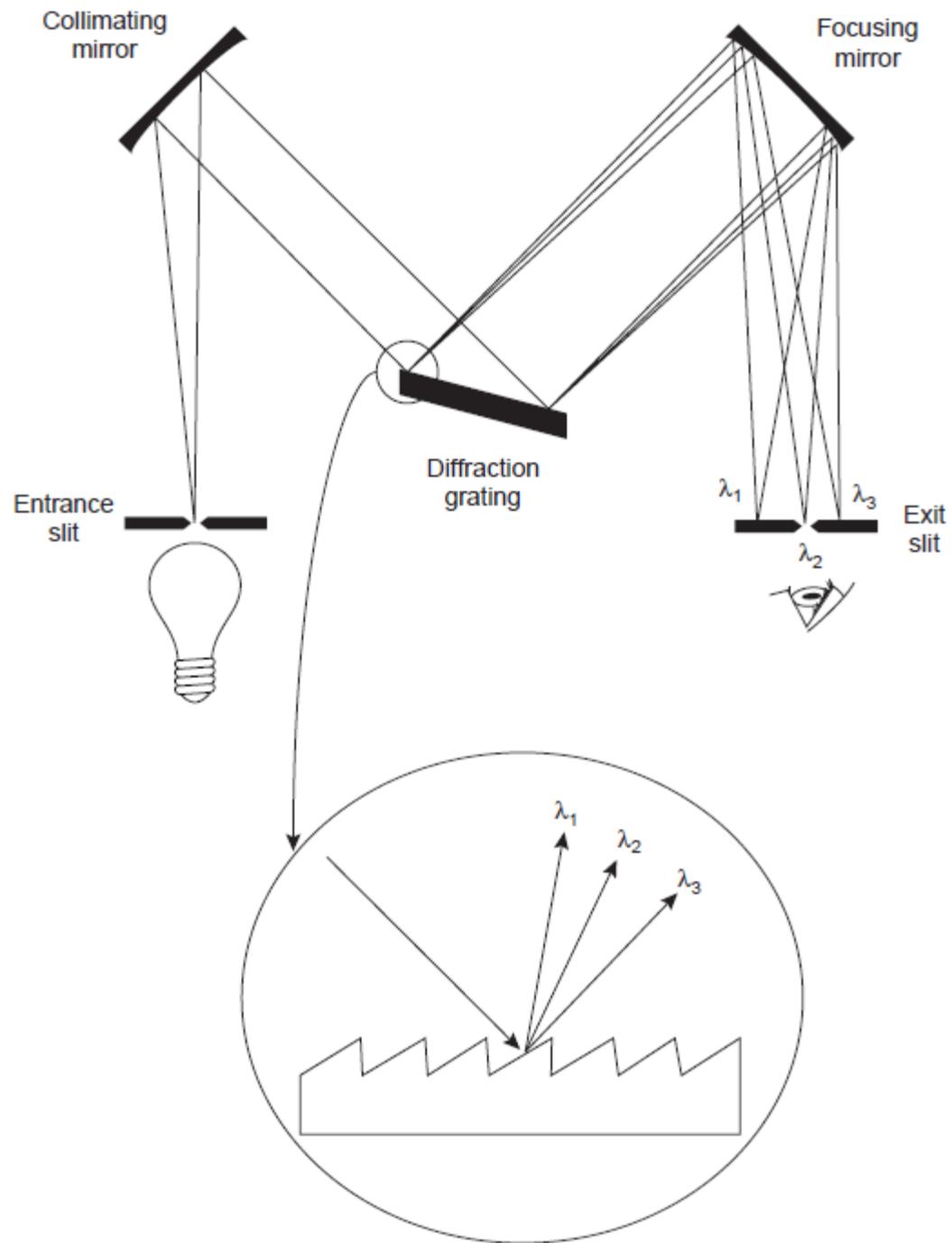


(a)

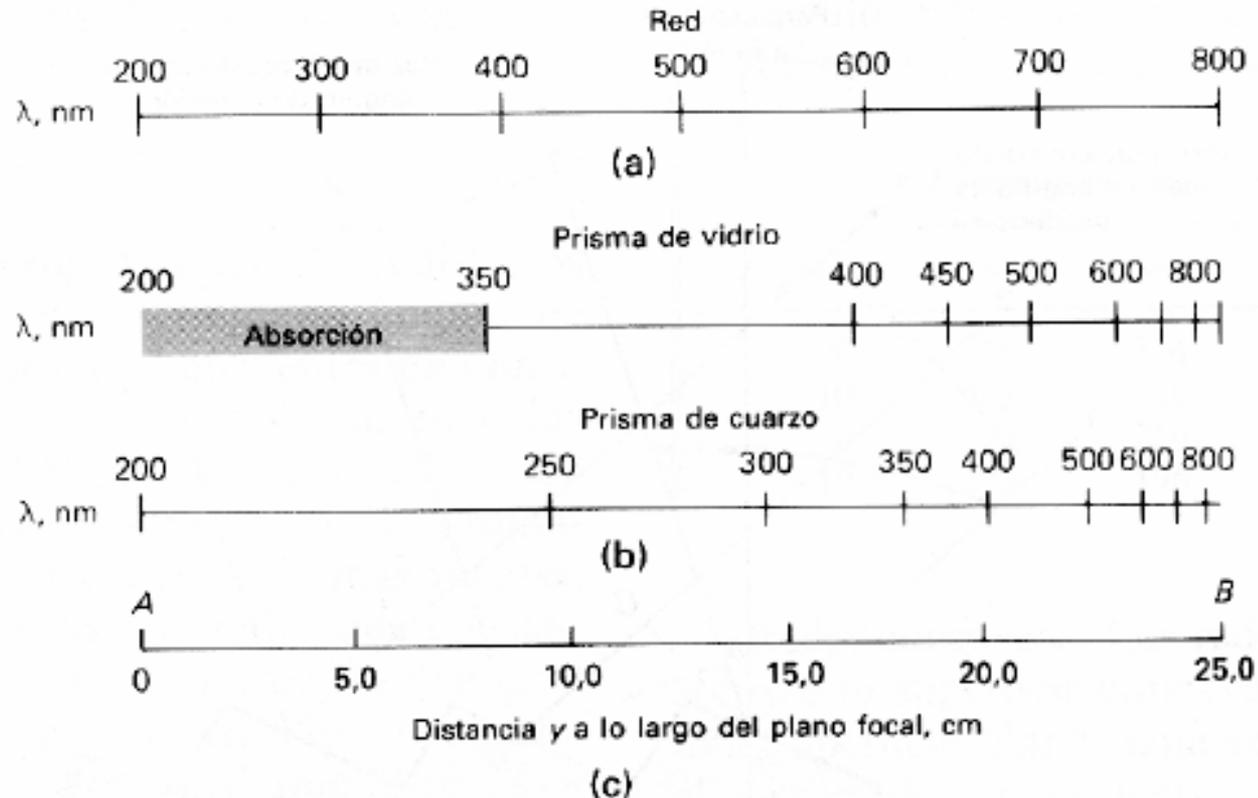
Monocromador de prisma



(b)

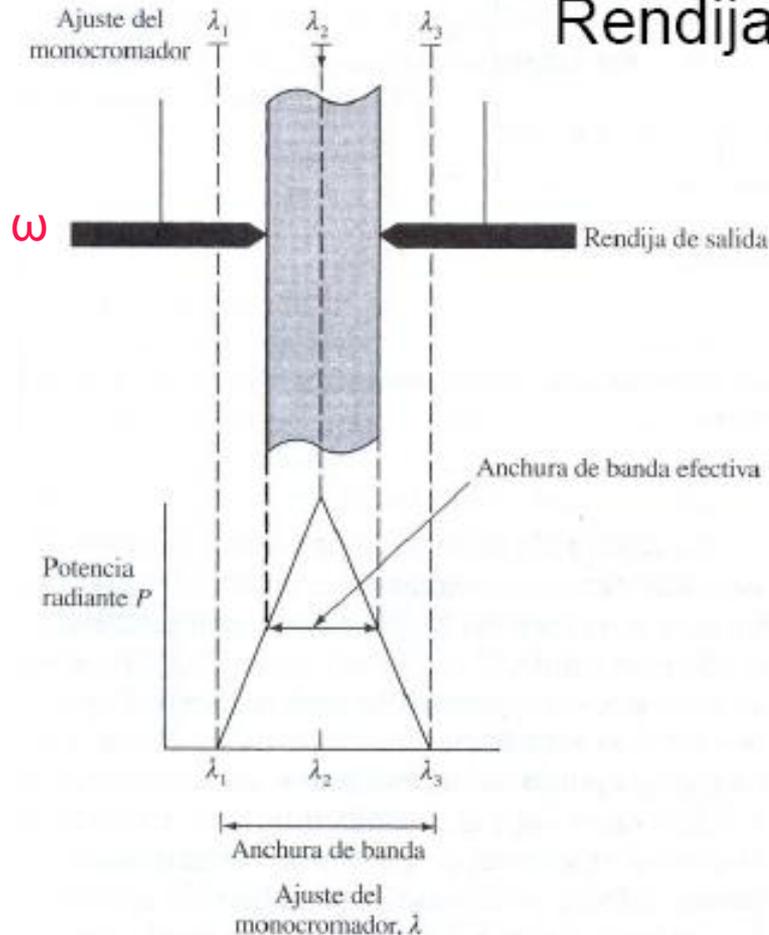


# Dispersión de los monocromadores de prisma y red



$D$  = dispersión lineal (mm/nm)  
mm de plano focal ocupado por  
1 nm de radiación

## Rendijas del monocromador



**Figura 7-22.** Iluminación de una rendija de salida por una radiación monocromática  $\lambda_2$  para distintos ajustes del monocromador. Las rendijas de entrada y de salida son idénticas.

Al controlar el diámetro del orificio de salida se controla directamente el ancho de banda efectivo y por lo tanto el ancho de la banda espectral

Ancho de banda efectivo:  $\Delta\lambda_{\text{eff}}$

$$\Delta\lambda_{\text{eff}} = D^{-1} \cdot \omega \quad (\text{SBW})$$

$D$  = dispersión lineal (mm/nm)  
 mm de plano focal ocupado por  
 1 nm de radiación

**Resolución (separación completa sobre línea de base)  $\Delta\lambda = 2 \text{ SBW}$**

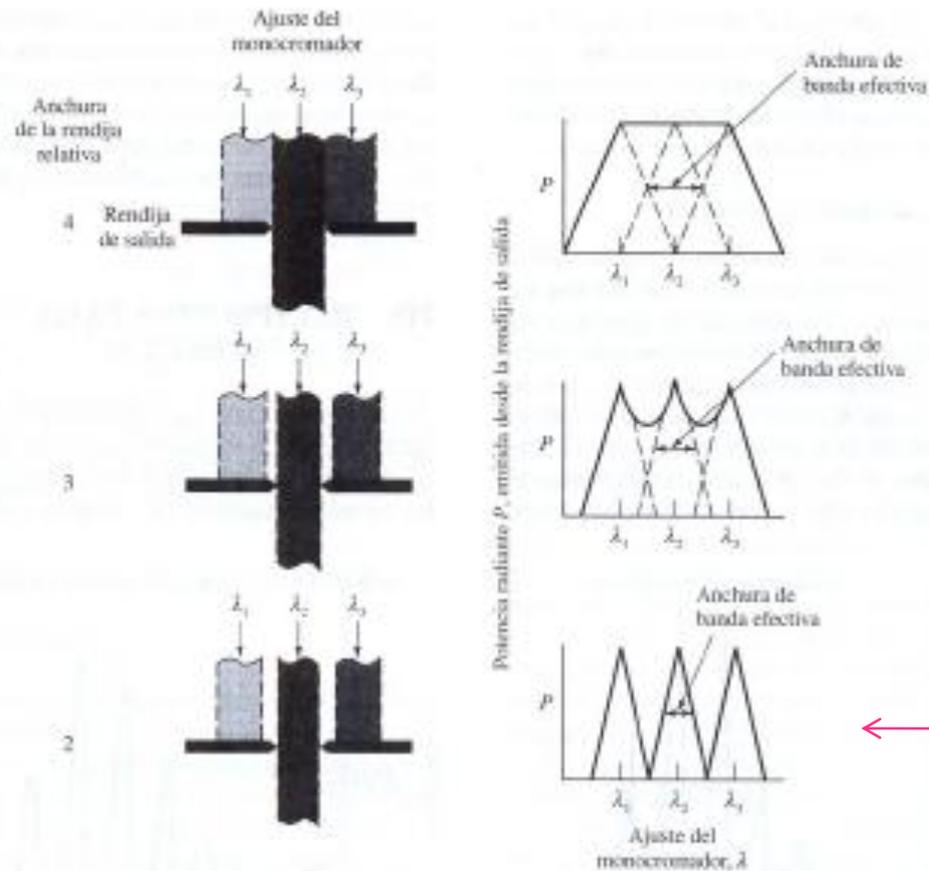
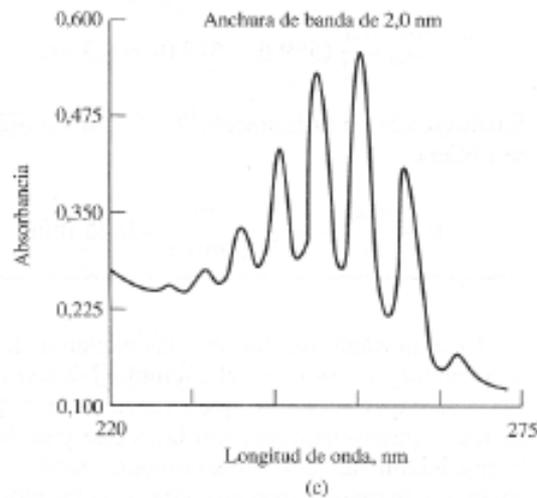
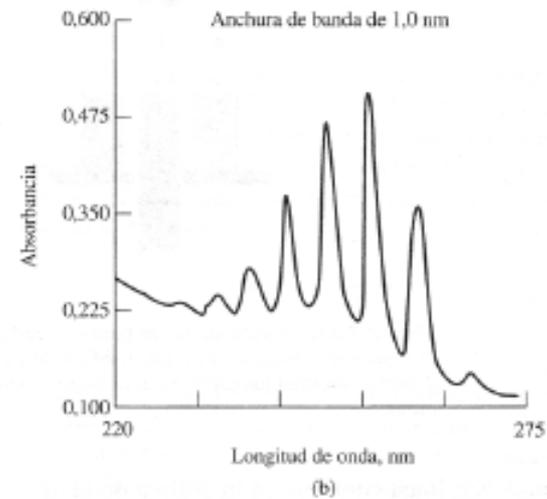
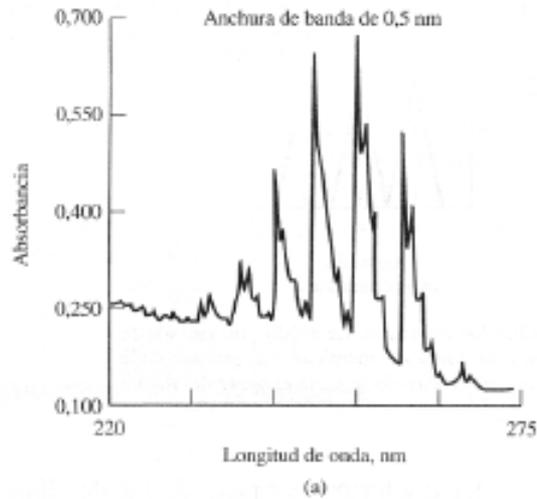


Figura 7-23. Efecto de la anchura de rendija sobre los espectros. La rendija de entrada se ilumina sólo con  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  y  $\lambda_3$ . Las rendijas de entrada y de salida son idénticas. Las gráficas de la derecha muestran los cambios en la potencia radiante emitida cuando se varía el ajuste del monocromador.

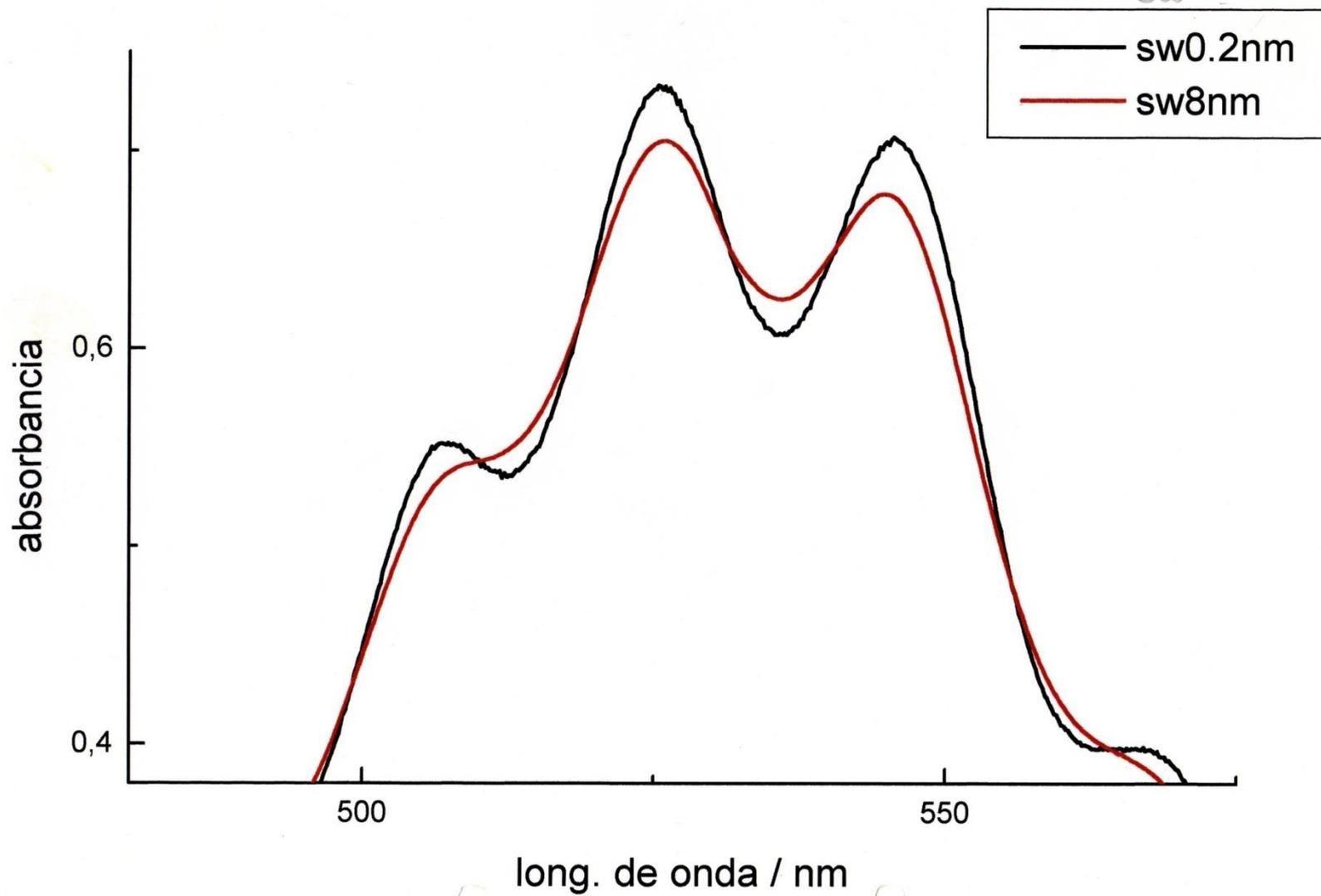
← Resolución completa  
 $\Delta\lambda_{\text{eff}} = (\lambda_2 - \lambda_1) / 2$

# Selección de la anchura de banda

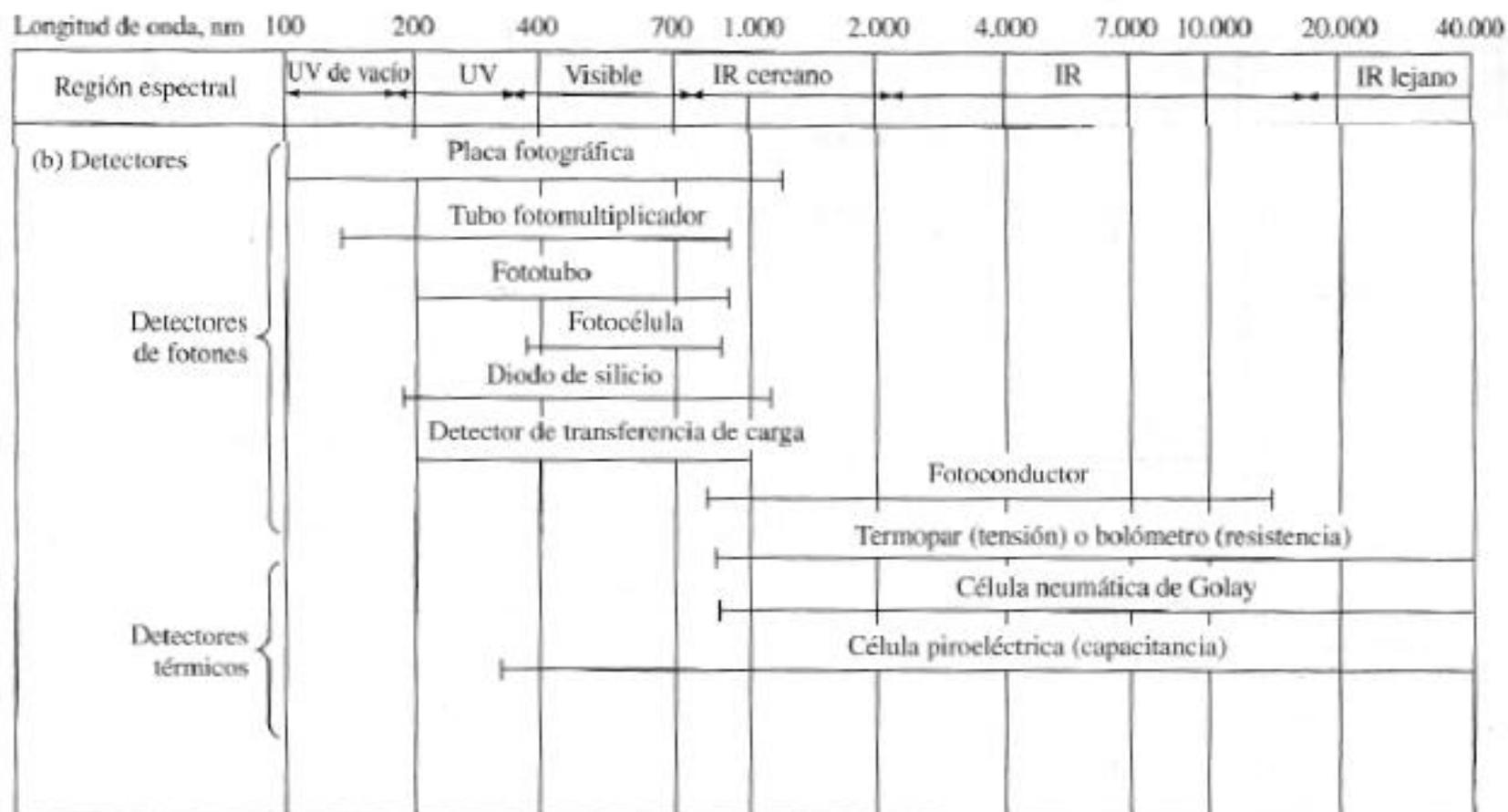


**Figura 7-24.** Efecto de la anchura de banda sobre los detalles del espectro del vapor de benceno: (a) 0,5 nm; (b) 1,0 nm (c) 2,0 nm. (De V. A. Kohler, Amer. Lab., 1984 (11), 132. Copyright 1984 International Scientific Communications Inc.)

## KMnO<sub>4</sub> en agua



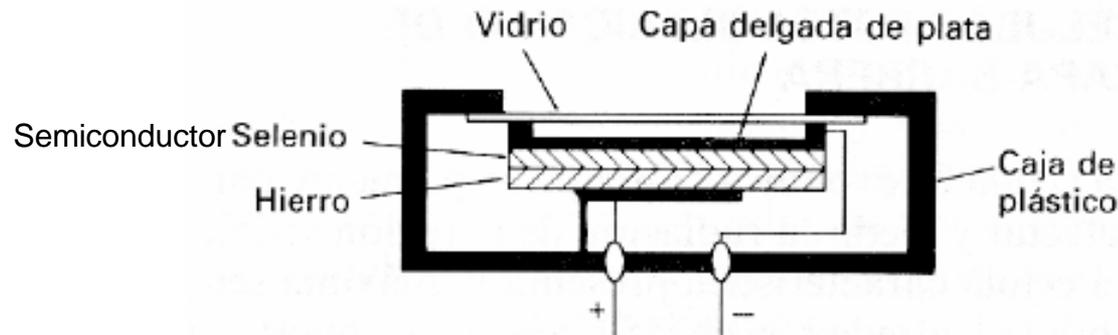
# Detectores de Radiación



**Table 10.4** Characteristics of Transducers for Optical Spectroscopy

Detector	Class	Wavelength Range	Output Signal
phototube	photon	200–1000 nm	current
photomultiplier	photon	110–1000 nm	current
Si photodiode	photon	250–1100 nm	current
photoconductor	photon	750–6000 nm	change in resistance
photovoltaic cell	photon	400–5000 nm	current or voltage
thermocouple	thermal	0.8–40 $\mu\text{m}$	voltage
thermistor	thermal	0.8–40 $\mu\text{m}$	change in resistance
pneumatic	thermal	0.8–1000 $\mu\text{m}$	membrane displacement
pyroelectric	thermal	0.3–1000 $\mu\text{m}$	current

# Celda fotovoltaica



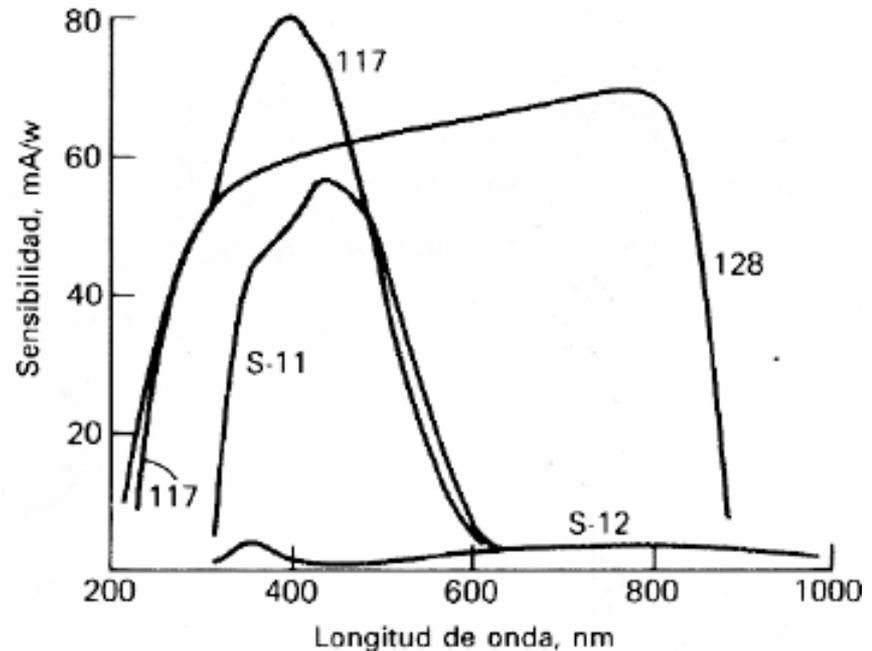
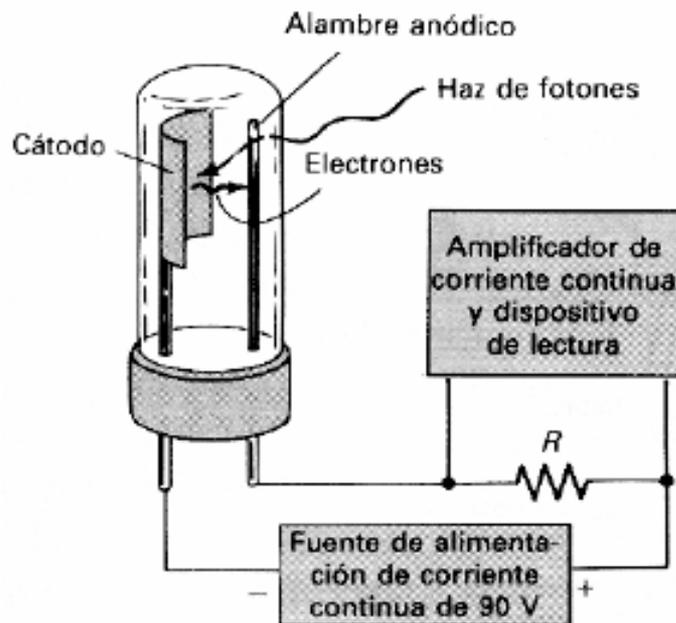
**Uso:** Región Visible

**Señal:** corriente del orden de 10 a 100  $\mu\text{A}$

**Ventajas:** Sencillo, robusto, bajo costo, no requiere fuente eléctrica externa

**Desventajas:** Respuesta varía con la longitud de onda, experimenta fatiga a niveles de iluminación altos y no responde bien a niveles de iluminación bajos

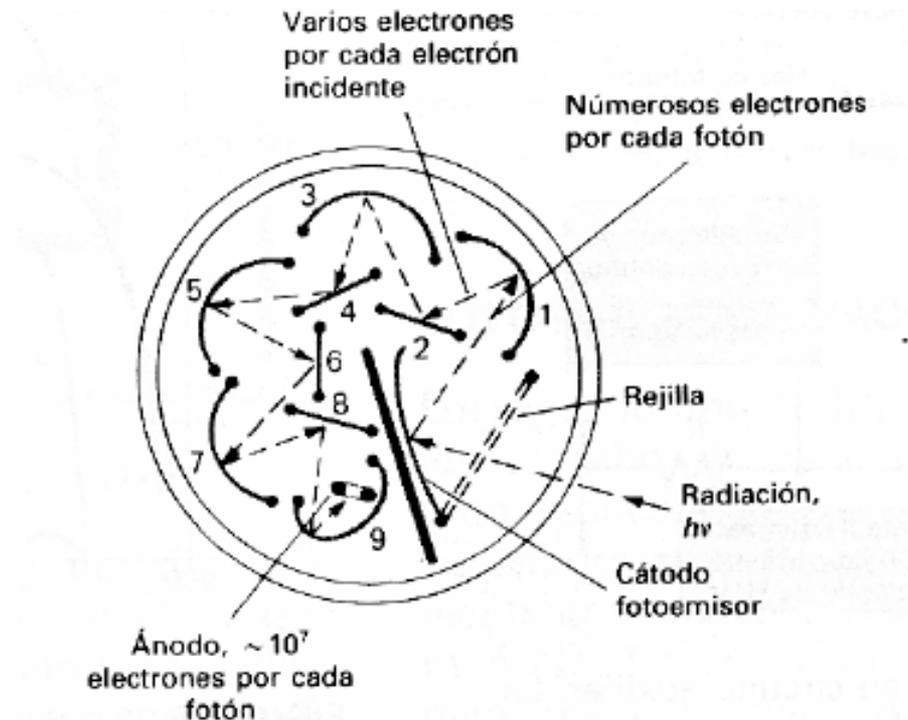
# Fototubo de vacío



Superficies fotoemisoras: K/Cs/Sb (117) Ag/O/Cs (S-11) Ga/As (128)

**Efecto fotoeléctrico:**  $h c / \lambda = E + \phi$  (Einstein, 1905)

# Tubos fotomultiplicadores



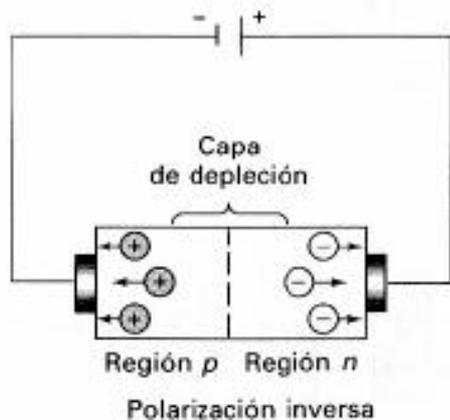
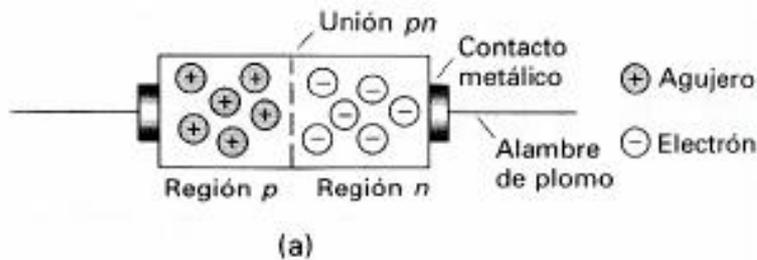
**Ventajas:** Altamente sensible (pueden detectar un solo fotón). Tiempo de respuesta extremadamente rápido.

**Desventajas:** Corriente oscura (debido a electrones emitidos térmicamente, entonces enfriar por debajo de  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

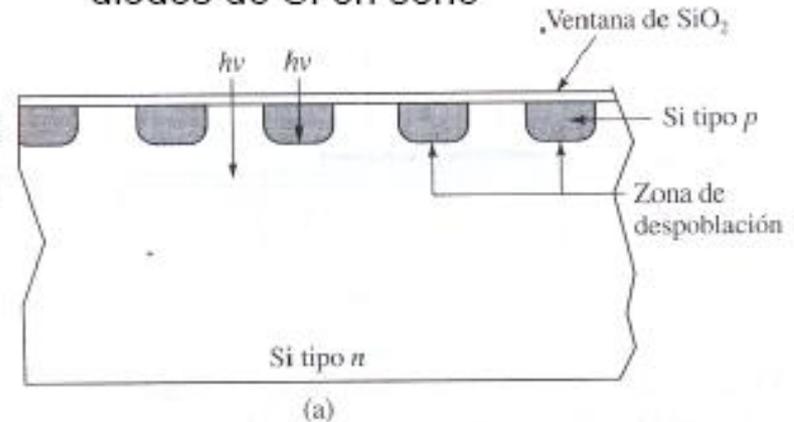
Silicio tipo n: dopado con P (que reemplaza a 1 Si), exceso de e- libres  
 Silicio tipo p: dopado con Al, exceso de huecos

## Diodos de Si

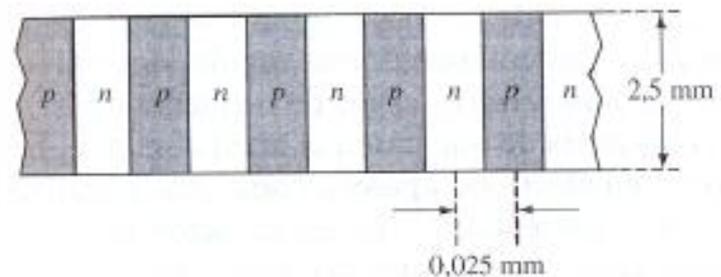
Unión pn polarizada inversamente



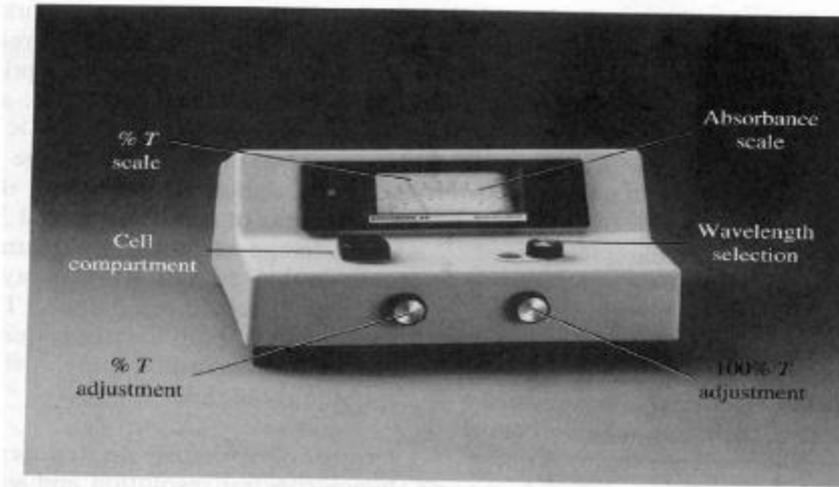
diodos de Si en serie



Los fotones aumentan la conductancia a través de una unión pn polarizada inversamente.



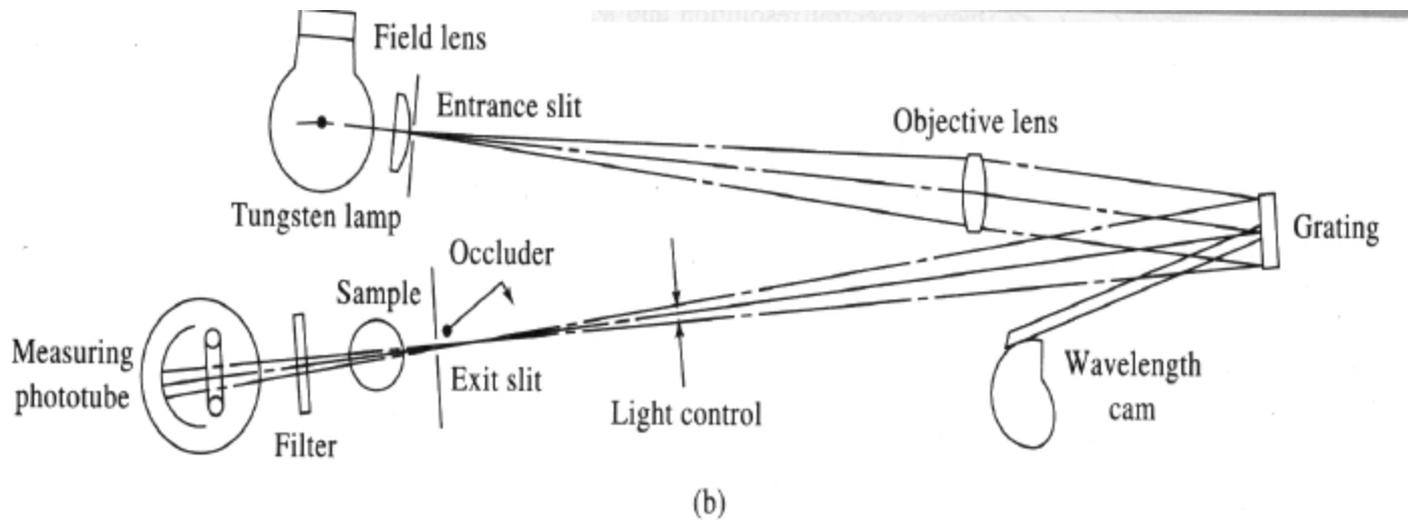
Son más sensibles que el fototubo de vacío pero menos que el fotomultiplicador  
 190 a 1100 nm



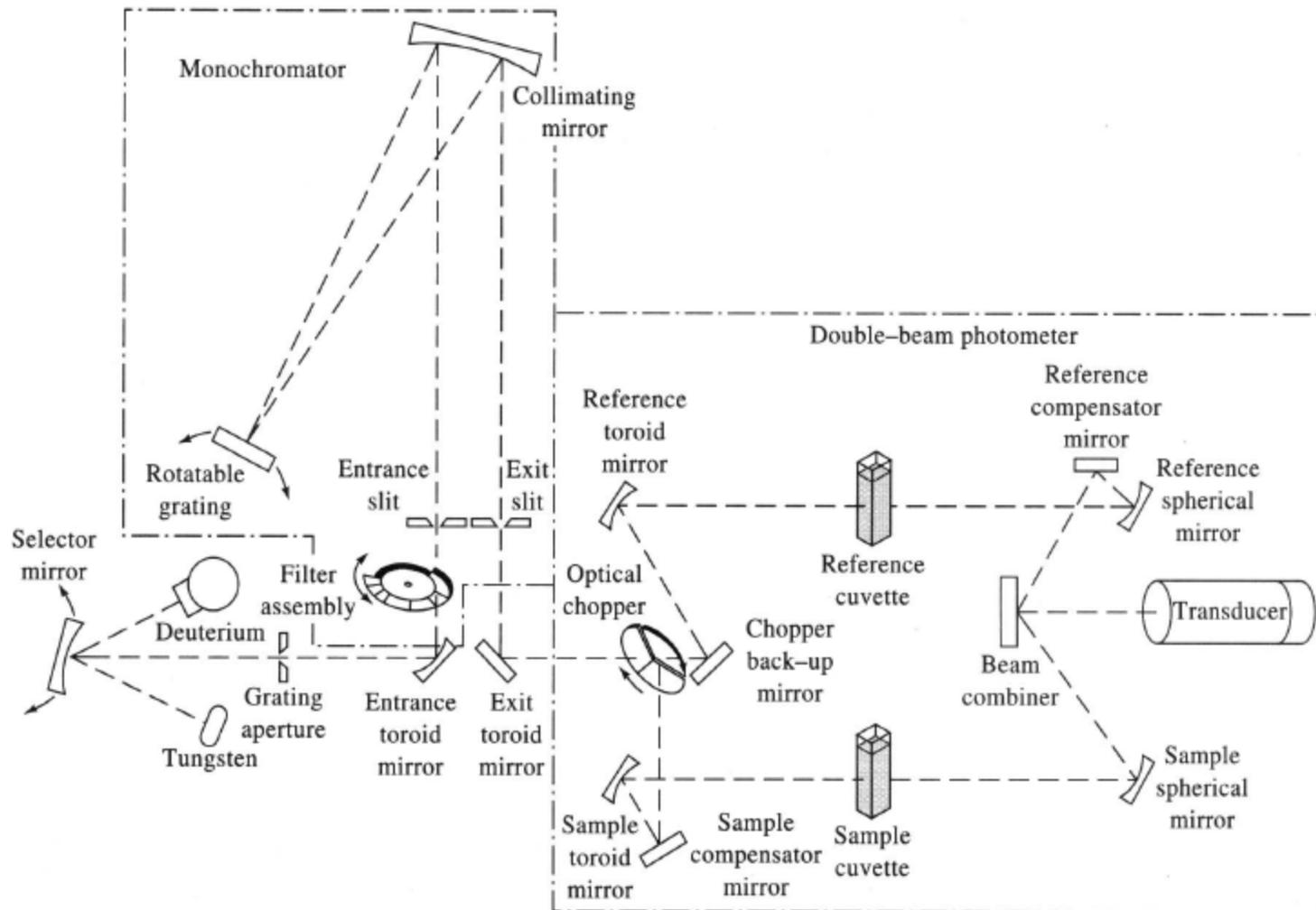
## SPECTRONIC 20

de 340 a 625 nm  
 (fototubo accesorio hasta 950 nm)

Ancho de banda: 20nm



# UV-VIS DOBLE HAZ



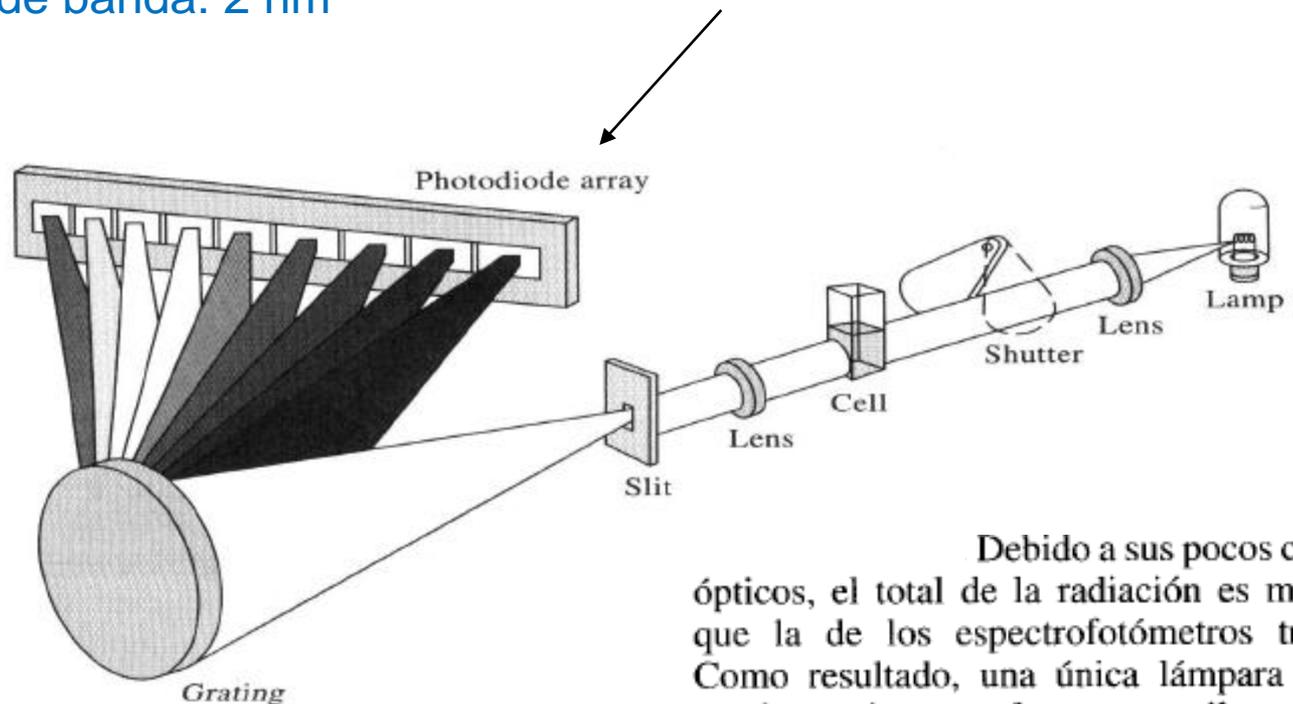
# Detector de arreglo de diodos

- Un arreglo de diodos (DAD) es un dispositivo con una distribución lineal de fotodiodos, sobre un circuito integrado.
- Se coloca en el plano focal de un espectrómetro para permitir la **detección simultánea de un ámbito de longitudes de onda**. En este aspecto, **puede pensarse como una versión electrónica de una placa fotográfica**.
- Los DAD son especialmente útiles para registrar rápidamente el espectro de absorción UV-Vis, ya que realiza un espectro completo en aproximadamente un segundo (promediando unos 10 espectros).
- Esta característica los hace especialmente útiles para la detección de especies en aplicaciones cinéticas y en celdas de flujo de HPLC.

## ESPECTROFOTÓMETRO MULTICANAL HP8452A

- Barrido en aprox. 0,1 s
- de 200 a 820 nm
- Ancho de banda: 2 nm

**Transductor: arreglo de diodos**

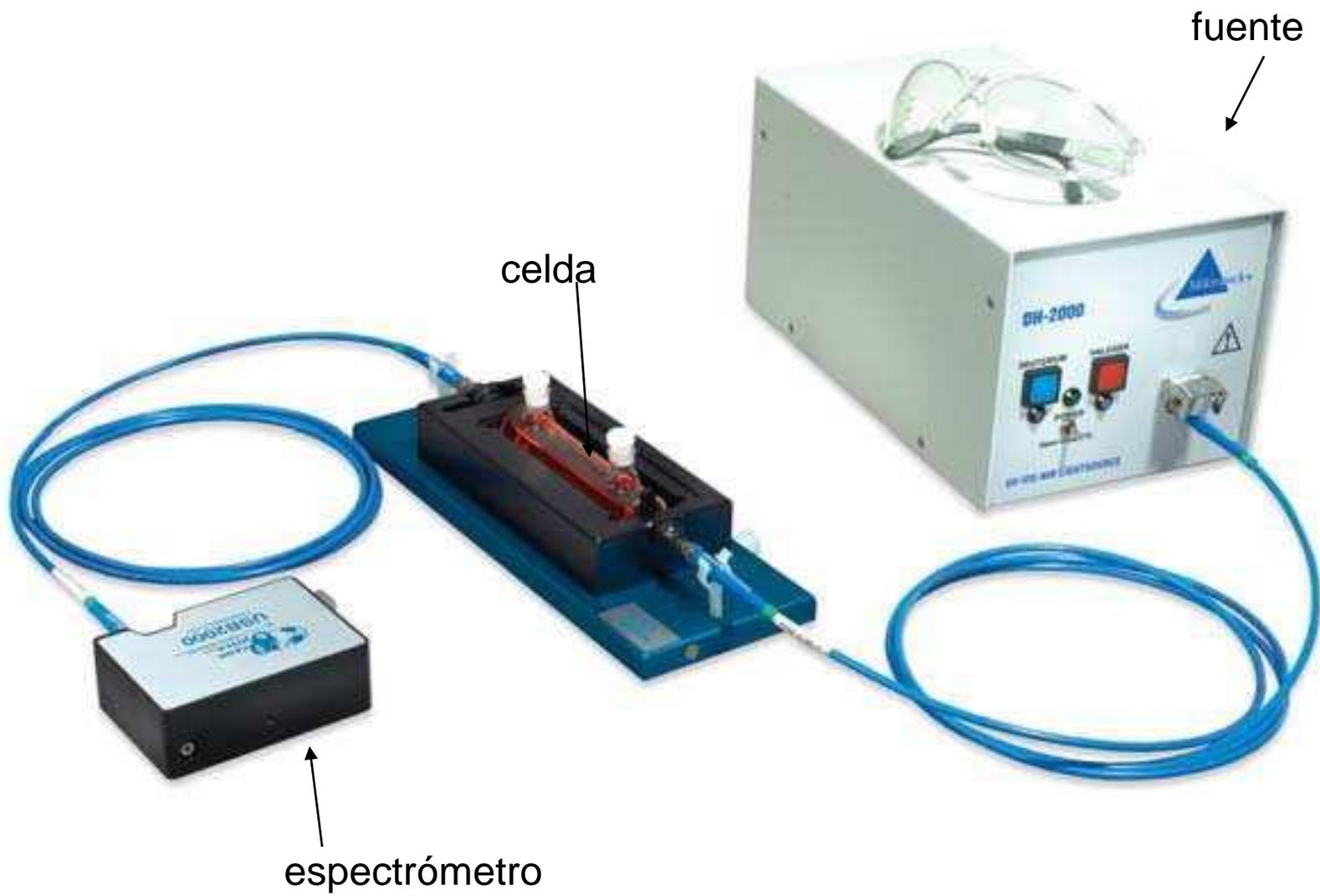


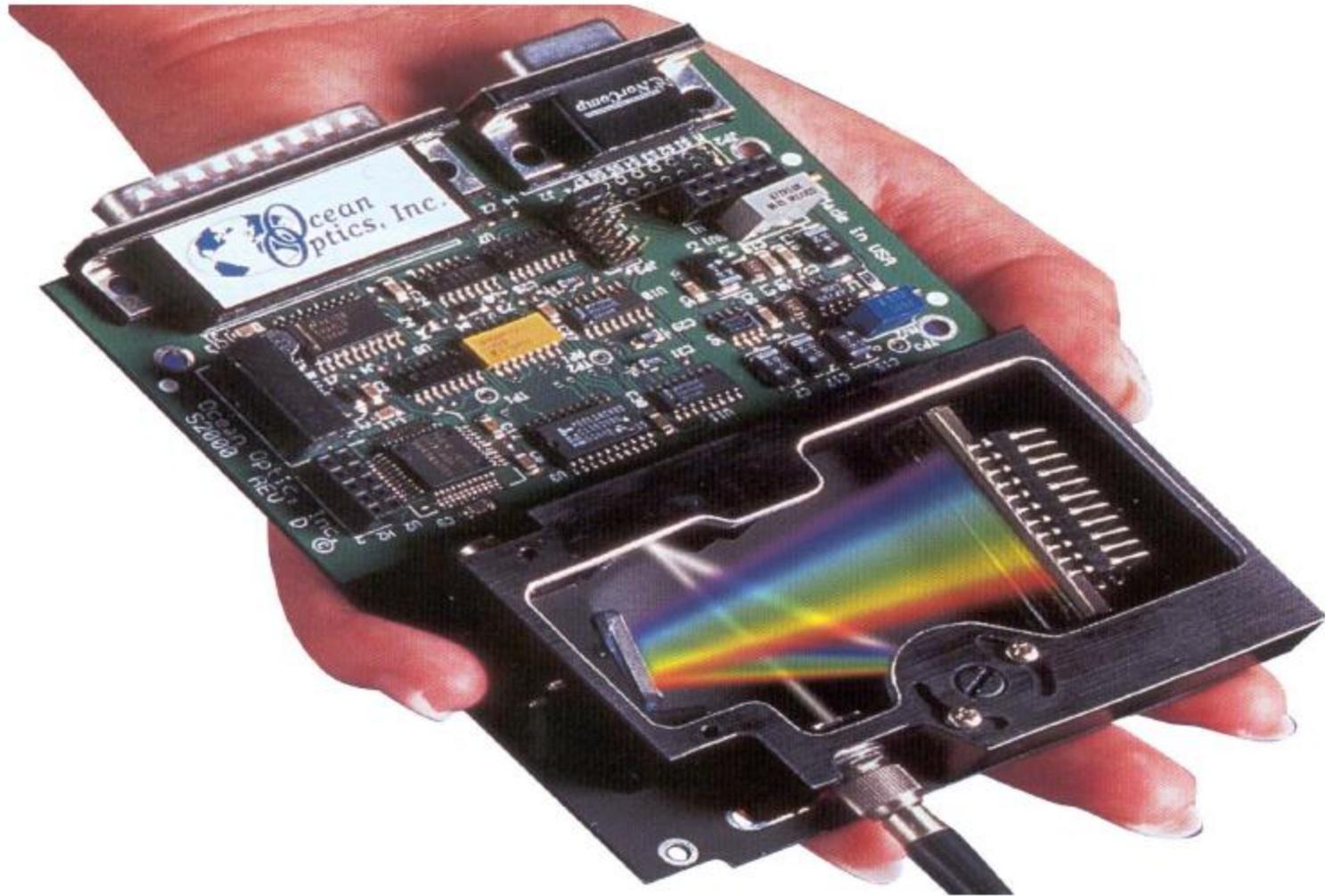
Debido a sus pocos componentes ópticos, el total de la radiación es mucho mayor que la de los espectrofotómetros tradicionales. Como resultado, una única lámpara de deuterio puede servir como fuente, no sólo para la región ultravioleta sino también para la visible (hasta 820 nm)

fuente

celda

espectrómetro





**Table 10.6** Selected Examples of the Application of UV/Vis Molecular Absorption to the Analysis of Waters and Wastewaters

Analyte	Method	$\lambda$ (nm)
<i>Trace Metals</i>		
aluminum	reaction with Eriochrome cyanide R dye at pH 6 produces red to pink complex	535
arsenic	reduce to AsH <sub>3</sub> using Zn and react with silver diethyldithiocarbamate to form red complex	535
cadmium	extraction into CHCl <sub>3</sub> containing dithizone from sample made basic with NaOH; pink to red complex	518
chromium	oxidize to Cr(VI) and react with diphenylcarbazide in acidic solution to give red-violet product	540
copper	react with neocuprine in neutral to slightly acid solution; extract into CHCl <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub> OH to give yellow solution	457
iron	react with <i>o</i> -phenanthroline in acidic solution to form orange-red complex	510
lead	extraction into CHCl <sub>3</sub> containing dithizone from sample made basic with ammoniacal buffer; cherry red complex	510
manganese	oxidize to MnO <sub>4</sub> <sup>-</sup> with persulfate	525
mercury	extraction into CHCl <sub>3</sub> containing dithizone from acidic sample; orange complex	492
zinc	reaction with zincon at pH 9 to form blue complex	620
<i>Inorganic Nonmetals</i>		
ammonia	reaction with ammonia, hypochlorite, and phenol produces blue indophenol; catalyzed by manganous salt	630
cyanide	convert to CNCl by reaction with chloramine-T, followed by reaction with a pyridine-barbituric acid to form red-blue dye	578
fluoride	reaction with red Zr-SPADNS lake results in formation of ZrF <sub>6</sub> <sup>2-</sup> and decrease in concentration of the lake	570
chlorine (residual)	oxidation of leuco crystal violet to form product with a bluish color	592
nitrate	reduction to NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> by Cd, colored azo dye formed by reaction with sulfanilamide and <i>N</i> -(1-naphthyl)-ethylenediamine	543
phosphate	reaction with ammonium molybdate followed by reduction with stannous chloride to form molybdenum blue	690
<i>Organics</i>		
phenol	reaction with 4-aminoantipyrine and K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> to form antipyrine dye	460

**Table 10.7** Selected Examples of the Application of UV/Vis Molecular Absorption to the Analysis of Clinical Samples

Analyte	Method	$\lambda$ (nm)
total serum protein	reaction with protein, NaOH, and $\text{Cu}^{2+}$ produces blue-violet complex	540
serum cholesterol	reaction with $\text{Fe}^{3+}$ in presence of isopropanol, acetic acid, and $\text{H}_2\text{SO}_4$ produces blue-violet complex	540
uric acid	reaction with phosphotungstic acid produces tungsten blue	710
serum barbiturates	barbiturates are extracted into $\text{CHCl}_3$ , and then into 0.45 M NaOH	260
glucose	reaction with o-toluidine at 100 °C produces blue-green complex	630
protein-bound iodine	decompose protein to release iodide; $\text{I}^-$ determined by its catalytic effect on redox reaction between $\text{Ce}^{4+}$ and $\text{As}^{3+}$	420