

# Apuntes de espectrofotometría.

(ver. maig02)

(por Florencio de la Torre)

## Indice

**Introducción. 2**

**El espectro electromagnético. 2**

**Las moléculas absorben radiación electromagnética. 5**

**Cuantificación. 7**

*Ley de Beer. 7*

*Errores de medida. Desviaciones de la ley de Beer. 8*

*Calibración. 9*

*Parámetros de Calidad. 9*

**El espectrofotómetro. 10**

**Tipos de espectrofotometrías. 13**

*Espectrofotometría de absorción molecular VIS-UV. 13*

*Espectrofotometría de absorción molecular IR. 15*

*Espectrofotometría de absorción y de emisión atómica. 16*

*Espectrofotometría con atomizadores electrotérmicos. 18*

*Espectrofotometría de emisión con plasma. 19*

*Espectrofotometría de fluorescencia molecular. 19*

*Otros métodos. 20*

*Resonancia Magnética Nuclear (RMN). 20*

*Espectroscopia de masas (MS). 20*

## Bibliografía.

Fundamentos de química analítica. D.A. Skoog. 4ª ed. Ed. Reverté. 1996

Química analítica . Gary D. Christian. 2ª ed. Ed. Limusa. 1981

Análisis químico cuantitativo. Daniel C. Harris. 2ª ed. Ed. Reverté. 2001

## Introducción.

Si observamos una disolución acuosa de  $\text{Cu}^{2+}$  al trasluz percibimos un color azulado. Esta coloración se debe a la interacción de los iones cobre con la radiación lumínica que atraviesa la disolución. Más concretamente, se debe a la absorción de algunas radiaciones lumínicas que corresponden al "color complementario" (en este caso el amarillo). Las radiaciones no absorbidas son las que atraviesan la disolución sin obstáculo alguno y llegan a nuestro ojo. Estas radiaciones "transmitidas" corresponden al color azul.

Además, si comparamos el color de dos disoluciones de  $\text{Cu}^{2+}$  con diferente concentración, observamos que a mayor concentración corresponde una mayor intensidad del color azul de la disolución. Por lo tanto podemos adivinar la sustancia que hay en una disolución, según el color de esta, y aún más podemos saber la cantidad de esa sustancia, según la intensidad de ese color.

Esta propiedad de interacción de la luz con una gran cantidad de especies químicas nos permitirá identificar y cuantificar analitos, dando lugar a una rama de la Química Analítica denominada **espectrofotometría**.

Espectrofotometría significa "medida del espectro de la luz" y se refiere a la medida del tipo y cantidad de luz que se obtiene de una disolución. A continuación explicamos que es el espectro de la luz y como se produce la interacción con la materia.

## El espectro electromagnético.

La luz se puede explicar como un conjunto de radiaciones que se mueven por todo el espacio. Aquellas detectables por nuestro ojo corresponden a la luz visible, pero la mayoría son invisibles para nosotros.

Estas radiaciones se pueden describir como partículas y como ondas. La descripción como onda se basa en que la luz son campos eléctricos y magnéticos que oscilan perpendicularmente a la dirección de traslación por el espacio dando lugar a ondas transversales.

Una radiación electromagnética (cualquier fenómeno ondulatorio) se define generalmente mediante dos parámetros:

**Longitud de onda** ( $\lambda$ ): distancia recorrida por un ciclo completo. De cresta a cresta de la onda.

**Frecuencia** ( $\nu$ ): número de oscilaciones completas que realiza la onda por segundo.

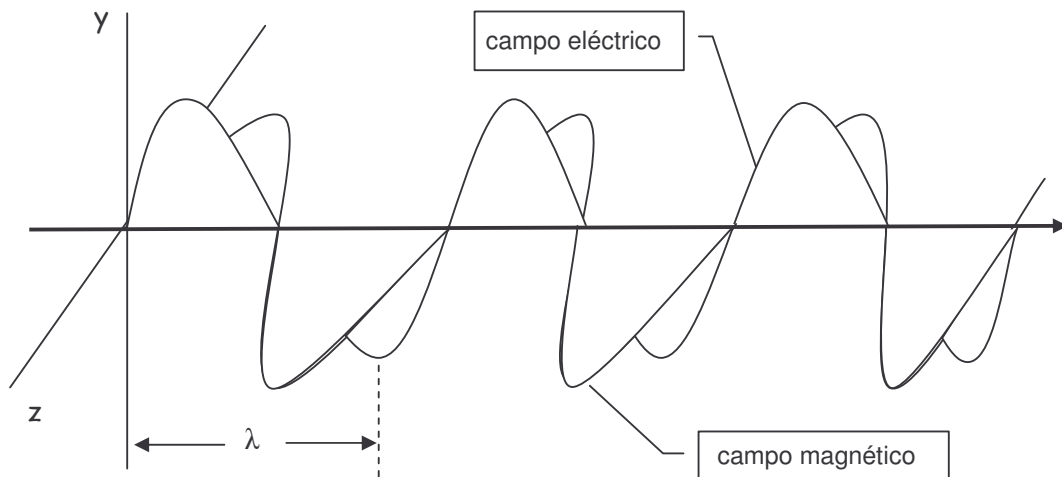


Figura 1. Radiación electromagnética.

En el vacío, el producto de estos dos parámetros es constante e igual a la velocidad de traslación de la luz

$$\lambda \cdot \nu = c$$

donde  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío ( $3 \cdot 10^8$  m/s)

La longitud de onda se expresa en unidades de longitud y varía entre décimas de nanómetro a varios metros. La frecuencia se expresa en ciclos por segundo ( $s^{-1}$ ) o Hertzios (Hz). Un Hz es igual a 1 ciclo/s.

Mediante la fórmula anterior podemos calcular  $\lambda$  a partir de  $\nu$  o viceversa

Ejem. 1. ¿Cuál es la frecuencia de una radiación electromagnética de  $\lambda = 650$  nm que corresponde al color rojo?

$$\nu = \frac{c}{\lambda} = \frac{3 \cdot 10^8 \text{ m/s} \cdot 10^9 \text{ nm}}{650 \text{ nm} \cdot 1 \text{ m}} = 4,6 \cdot 10^{14} \text{ s}^{-1} = 4,6 \cdot 10^{14} \text{ Hz}$$

Por otro lado, la luz se puede describir como una partícula. En este caso se dice que es una partícula de energía llamada **fotón**. También se puede describir como un paquete de energía. La energía que tiene un fotón es proporcional a la frecuencia de la radiación que forma mediante la ecuación

$$E = h \cdot \nu$$

donde  $h$  es la constante de Planck ( $=6,6 \cdot 10^{-34}$  J.s)

y también se puede relacionar con la longitud de onda

$$E = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

Ejem. 2. ¿Cuál será la energía del fotón correspondiente a la radiación roja de  $\lambda = 650$  nm? ¿Y la de un fotón de una radiación ultravioleta de  $\lambda = 50$  nm?

$$E = h \cdot \nu = 6,6 \cdot 10^{-34} \cdot 4,6 \cdot 10^{14} = 3,0 \cdot 10^{-19} \text{ J}$$

$$E = h \cdot \frac{c}{\lambda} = 6,6 \cdot 10^{-34} \cdot \frac{3 \cdot 10^8 \text{ m/s}}{50 \cdot 10^{-9} \text{ m}} = 4,0 \cdot 10^{-18} \text{ J}$$

vemos como las radiaciones ultravioletas (con menor  $\lambda$ ) son más energéticas que las visibles.

Por lo tanto la energía es inversamente proporcional a la longitud de onda y directamente proporcional a la frecuencia. La luz roja (con mayor  $\lambda$  y menor  $\nu$ ) es menos energética que la luz azul (con menor  $\lambda$  y mayor  $\nu$ )

El conjunto de radiaciones electromagnéticas se llama **espectro electromagnético** y es conveniente agruparlas en regiones para poder conocer sus propiedades. En la fig. siguiente se muestran las zonas del espectro según la clasificación más aceptada. Como se puede observar la zona del visible (radiaciones percibidas por nuestro ojo) es muy pequeña en comparación con la gran amplitud del espectro.

Ten en cuenta, también, que aunque hablamos de una radiación determinada ( $\lambda$ ), físicamente es imposible aislar dicha radiación. Siempre podremos obtener un rango de radiaciones pequeño según la exactitud del dispositivo de selección (difractores de radiación y filtros), pero nunca una sola. De la misma manera que no podemos obtener o aislar un punto de una recta, sino un trozo pequeño (un conjunto de puntos)

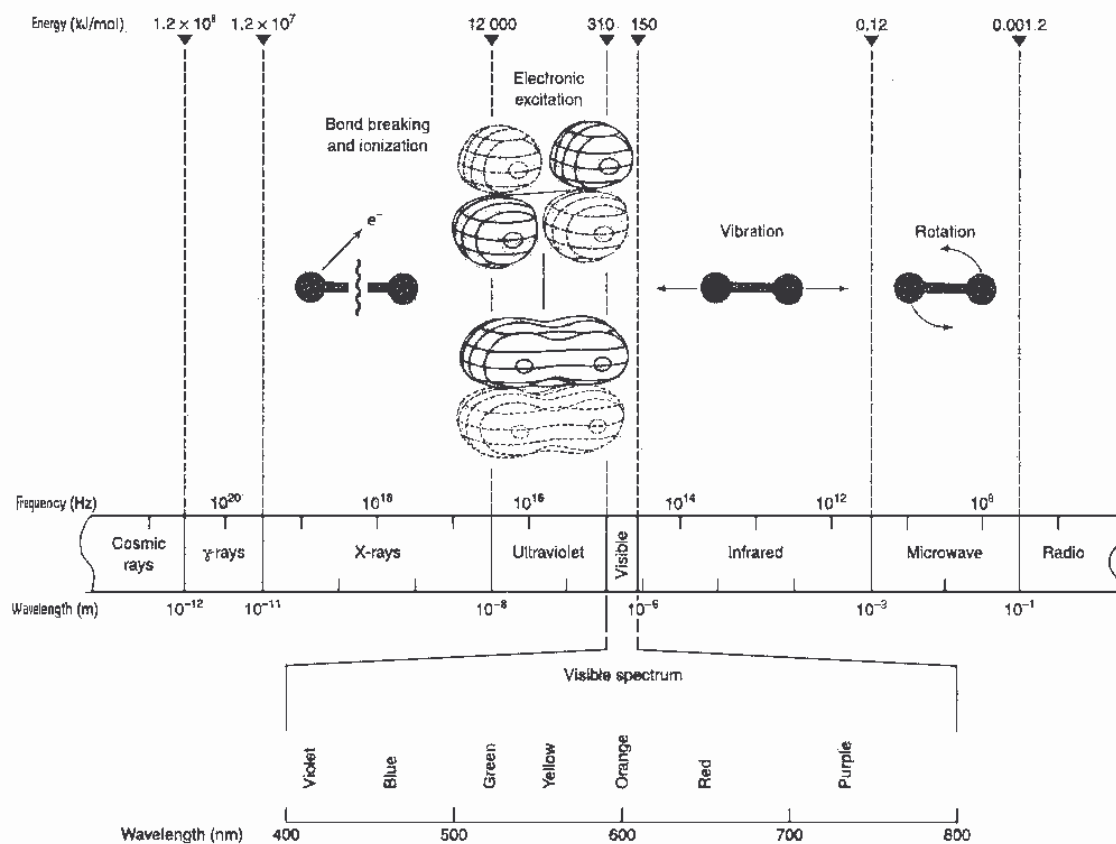


Figura 2. Espectro de radiaciones electromagnéticas.

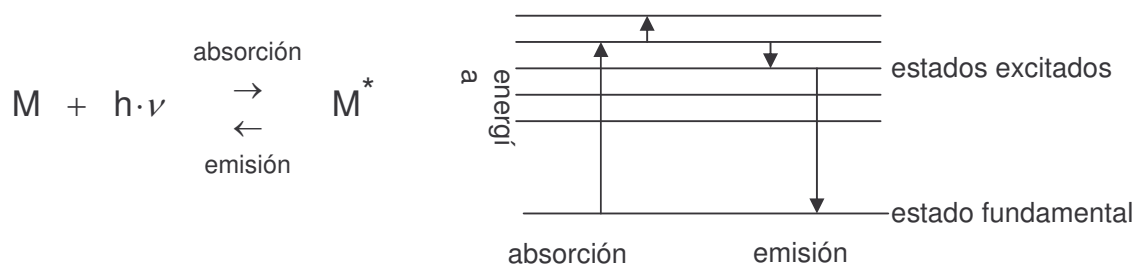
Las radiaciones más importantes con aplicación al análisis químico son:

|                   |                            |                                 |
|-------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Rayos X           | 0,1-10 nm                  | fluorescencia                   |
| Ultravioleta (UV) | 10-380 nm                  | absorción/emisión               |
| Visible (VIS)     | 380-780                    | absorción/emisión/colorimetrías |
| Infrarrojo (IR)   | 780 nm- 300 $\mu\text{m}$  | infrarrojos                     |
| Microondas        | 300 $\mu\text{m}$ - 0,01 m |                                 |
| Radio             | 0,01 - 10 m                | resonancia electrónica /nuclear |

## Las moléculas absorben radiación electromagnética.

Cuando una molécula absorbe un fotón su energía interna aumenta y pasa a un estado inestable, por lo que rápidamente vuelve a liberar esa energía "sobrante" y vuelve al estado inicial que es más estable. El estado inicial se denomina **estado fundamental** y el estado más energético se llama **estado excitado**. La absorción de radiación produce un paso del estado fundamental al excitado (excitación) y en el proceso contrario (llamado relajación) hay una liberación de energía. Esta energía liberada en la relajación puede ser en forma de calor o en forma de radiación electromagnética otra vez. Este último proceso de desprendimiento de radiación se llama **emisión**.

Estos procesos se pueden representar como una reacción química y en un diagrama de energía



## ¿Que le pasa a la molécula al absorber una radiación electromagnética?

El aumento del nivel energético interno de la molécula produce unos cambios en los enlaces intramoleculares y/o en el movimiento de los electrones alrededor del átomo. Estos cambios se llaman transiciones y se clasifican en tres tipos:

|                                   |                   |                        |
|-----------------------------------|-------------------|------------------------|
| <b>transiciones electrónicas</b>  | átomos            | ↑<br>energía requerida |
| <b>transiciones vibracionales</b> | moléculas o iones |                        |
| <b>transiciones rotacionales</b>  | moléculas o iones |                        |

Así, las radiaciones más energéticas (VIS, UV y mayores) comunican suficiente energía como para alterar el movimiento orbital de los electrones, tanto alrededor de un átomo sólo como de los orbitales de enlace entre dos átomos. Las radiaciones menos energéticas (IR) producen cambios en los movimientos de vibración y rotación de la molécula.

Estas últimas son muy específicas de cada enlace y por lo tanto de cada molécula por lo que se utilizan como técnica de identificación.

Para realizar una identificación generalmente se hace incidir sobre la sustancia estudiada radiaciones electromagnéticas de diferente energía. Normalmente se estudia un rango de radiaciones y se va aumentando (o disminuyendo) la longitud de onda de las radiaciones incidentes desde un extremo del rango hasta el extremo opuesto. Así se obtiene un **espectro de absorción** de la sustancia, que se puede representar gráficamente como se muestra en la figura.

Cada uno de los picos del espectrograma corresponde aproximadamente a una transición energética de un enlace molecular, por lo tanto el espectro es único de cada molécula. Es como una huella digital de esa molécula donde quedan registrados todos los enlaces y sus transiciones correspondientes. Entonces, si tenemos el espectro de absorción de una molécula podemos identificarla con bastante exactitud.

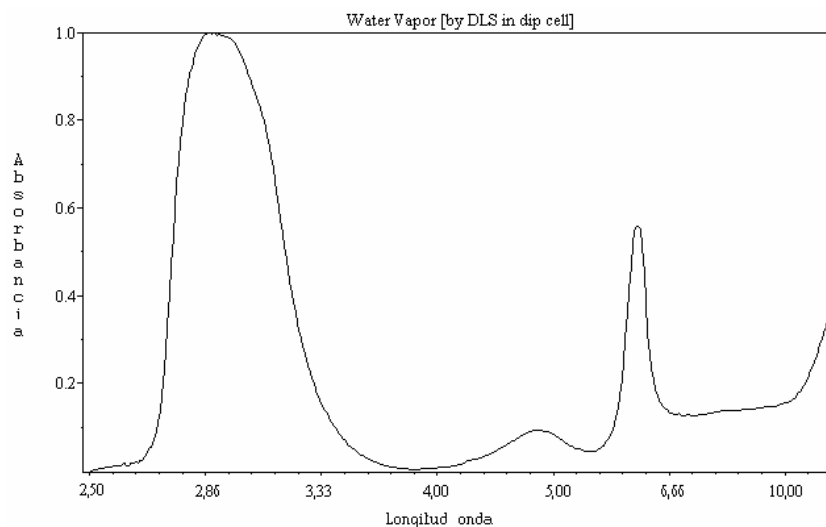


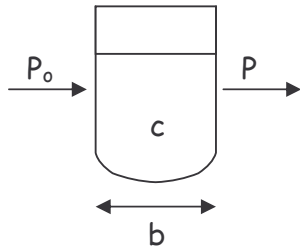
Figura 3. Espectro de infrarojos del agua pura.

## Cuantificación.

### Ley de Beer.

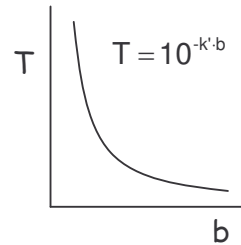
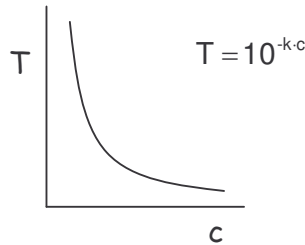
La cantidad de radiación electromagnética absorbida por un analito se puede relacionar cuantitativamente con la concentración de dicha sustancia en disolución.

Se define la **transmitancia (T)** como la fracción de radiación incidente transmitida por la disolución. Si la potencia radiante que incide sobre la disolución es  $P_0$  i  $P$  la potencia radiante que sale, entonces



$$T = \frac{P}{P_0}$$

Además se observa que la potencia de la energía transmitida disminuye geoméricamente (exponencialmente) con la concentración  $c$  y con la distancia  $b$  recorrida a través de la disolución.



donde  $k$  y  $k'$  son ctes de proporcionalidad, y combinando ambas y aplicando logaritmos

$$T = 10^{-a \cdot b \cdot c}$$

$$\boxed{-\log T = a \cdot b \cdot c = A}$$

que es la expresión matemática de la Ley de Beer y que indica la relación directa entre la absorbancia de un analito y su concentración en disolución.

$a$  es la absorptividad. Es una constante  $e$  indica la absorción de cada analito por unidad de concentración y unidad de distancia recorrida por el haz. Cuando se usan unidades molares se llama absorptividad molar ( $\epsilon$ ) y se expresa en L/mol.cm

Ejemplo:

Cual será la transmitancia y la absorbancia de una disolución de 1,00 mg de Fe en 100 mL en una celda espectrofotométrica de 1 cm. Absortividad del Fe es 15,5 L/g.cm

$$A = a \cdot b \cdot c = 15,5 \frac{\text{L}}{\text{g} \cdot \text{cm}} \cdot 1 \text{ cm} \cdot 0,01 \frac{\text{g}}{\text{L}} = 0,155 \text{ unidades de absorbancia}$$

$$T = 10^{-A} = 10^{-0,155} = 0,70 \text{ unidades de transmitancia}$$

En la práctica esta ley no se cumple exactamente y para determinar la concentración de un analito a partir de las medidas de absorbancia, es preciso realizar un proceso de **calibración**.

### **Errores de medida. Desviaciones de la ley de Beer.**

#### **Errores instrumentales:**

Hay dos errores de lectura inherentes al detector espectrométrico. El primero se produce cuando hay una gran cantidad de analito y, por lo tanto, una gran absorbancia de radiación. Al detector llega muy poca potencia radiante y se encuentra en la zona límite de detección, con lo que no responde bien a pequeñísimas variaciones de absorbancia.

El segundo se produce cuando hay muy poco analito y, por tanto, muy poca absorbancia. Esto implica que casi toda la potencia incidente atraviesa la disolución y llega al detector. Entonces, el detector espectrométrico está en la zona de saturación y no aprecia bien pequeñas variaciones en la absorción.

En la gráfica se muestra el error (en %) que se calcula matemáticamente para toda la escala del espectro.

En la figura se observa que hay un error mínimo entre el 20 y el 65% de T (0,200 a 0,700 unidades de absorbancia). Los espectrofotómetros más sensibles permiten medidas con un error aceptable entre 0,100 y 1,500 unidades de absorbancia.

Otros errores relacionados con el aparato son los debidos a que los espectrofotómetros no

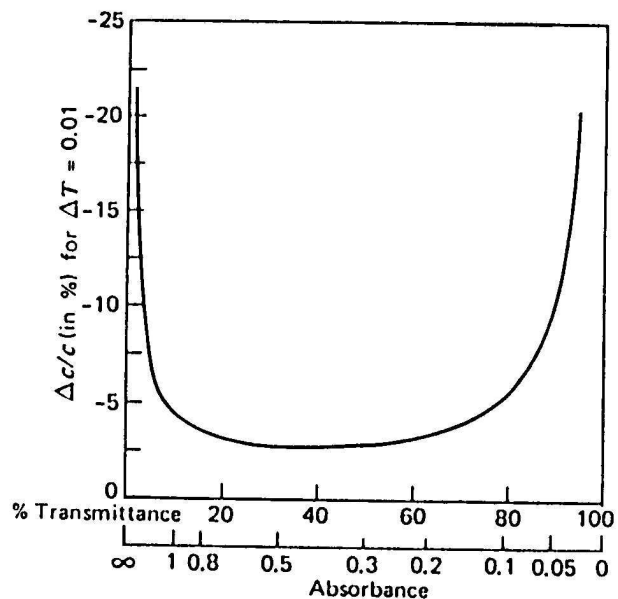


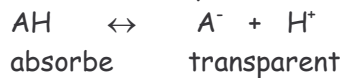
Figura 4. Error relativo del espectrofotómetro.



pueden seleccionar una radiación de una única  $\lambda$ , sino un rango. Esto introduce un error ya que hay interacciones con otras absorciones. En la medida que el aparato sea más exacto en la selección de la  $\lambda$ , este error se minimiza.

### **Errores químicos:**

Hay analitos que tienen una ionización parcial y la especie ionizada puede tener diferente absorbancia que la especie molecular. Esto condiciona la absorbancia al desplazamiento del equilibrio



En este caso el error se puede evitar fijando el pH de la disolución con un tampón.

Otro error está relacionado con las variaciones en el índice de refracción de la disolución. Este efecto es significativo en disoluciones de elevada concentración.

En estos casos una manera de evitar el error es realizar la calibración de la técnica con patrones que se mezclan con la disolución problema. Ver el método de Calibración mediante Adiciones Múltiples. De esta manera los efectos afectan por igual al analito que a los patrones.

### **Calibración.**

Dado que hay una serie de fenómenos que no permiten la aplicación de la ley de Beer, en la práctica se realiza siempre una calibración de la técnica de medida, con la cual obtenemos una relación matemática entre la concentración y la absorbancia. El procedimiento de la calibración se basa en medir la absorbancia de varias disoluciones patrón (de concentración conocida), en las mismas condiciones que se mide la absorbancia de la disolución problema, y se hace una interpolación.

En los apuntes de la asignatura: *Métodos de Cuantificación en Espectrofotometrías*, se describe con detalle todo el procedimiento y se incluyen problemas numéricos de ejemplo.

### **Parámetros de Calidad.**

La calidad de una técnica espectrofotométrica expresada en términos de incertidumbre, se basa esencialmente en tres parámetros: sensibilidad, límite de detección y rango de linealidad.

**Sensibilidad:** Es la concentración requerida para dar un 1% de absorbancia (99% de transmitancia) o lo que es lo mismo 0,0044 unidades de absorbancia. A medida que esta concentración es menor, la sensibilidad de la técnica es mayor porque es necesaria menos concentración para producir una señal en el detector.

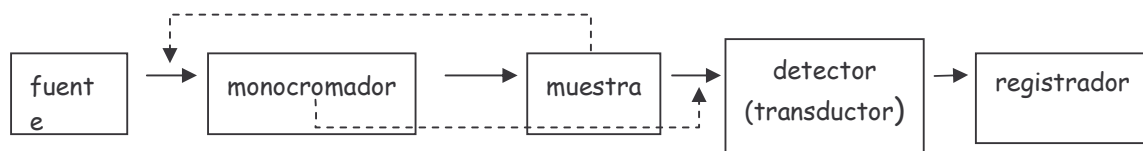
**Límite de detección:** Es la mínima concentración que se puede medir con la técnica y con un elevado nivel de certidumbre. Está relacionado con el ruido de fondo del aparato, es decir la señal que mide el aparato cuando se introduce un blanco. Una manera de calcularlo es multiplicar por tres la señal correspondiente al ruido de fondo.

**Rango de linealidad:** Es el intervalo de concentraciones dentro del cual podemos medir una muestra problema con un elevado nivel de certidumbre. Generalmente a partir del valor máximo de este rango, la señal (absorbancia) deja de tener una relación lineal con la concentración y la curva se hace horizontal, tendiendo a un valor máximo de absorbancia. Las muestras o patrones que están fuera de este rango no se pueden medir con seguridad con la técnica empleada.

## El espectrofotómetro.

Es el nombre genérico de todos los aparatos basados en esta técnica. A este término se le añaden los adjetivos adecuados a la subtécnica adecuada, ej. "espectrofotómetro de absorción atómica".

El espectrofotómetro tiene un generador de radiación lumínica (policrómica), un separador para obtener la radiación adecuada y luego mide la potencia radiante obtenida. Los componentes fundamentales que tienen todos los espectrómetros son:



**Fuente:** es el dispositivo emisor de radiación electromagnética. Generalmente emite una banda muy amplia de radiaciones continuas alrededor de la  $\lambda$  deseada. Según la zona del espectro que emite hay tres tipos:

Visible: Lámparas de filamento de Tungsteno incandescente o de Wolframio (halógeno). Son similares a las bombillas comunes.

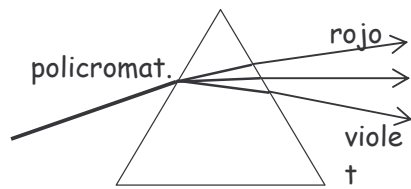
Ultravioleta: Tubo de hidrógeno o de descarga de deuterio. A veces están refrigerados con agua para disipar el elevado calor que producen.

Infrarojos: Fuentes especiales de óxidos de tierras raras (disproseo, holmio, erbio...) o carburos (de silicio). Estos emiten radiación en IR (1,5 a 2,0  $\mu\text{m}$ ) a elevadas temperaturas (1000-2000°C).

**Monocromador** o selector de  $\lambda$ : tiene como objetivo controlar la pureza de la radiación emitida consiguiendo el menor ancho de banda de longitud de onda posible. Consta de un conjunto de lentes, espejos y rendijas para dispersar y separar, enfocar y restringir la radiación no deseada.

Los componentes de los monocromadores son:

**PRISMAS**: producen la refracción de la luz, siendo el ángulo de refracción mayor cuanto menor es la  $\lambda$  de la radiación.

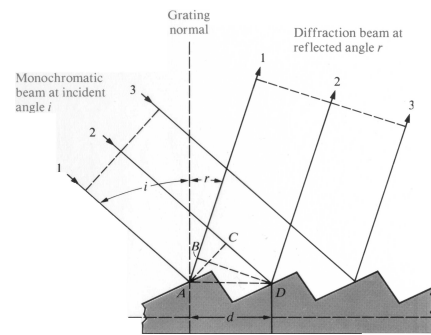


PRISMA

Después del prisma hay una rendija por donde se hace pasar la radiación deseada.

Según el tipo de radiaciones se usan prismas de vidrio (VIS), cuarzo o sílice (UV) y cristales de NaCl para IR.

**REDES DE DIFRACCION**: Es una lámina metálica (Al) altamente pulida sobre la que se han hecho una gran cantidad de estrías (líneas paralelas). Estas estrías actúan como centros de dispersión de todas las radiaciones incidentes. Hay una dispersión lineal de las  $\lambda$  de una determinada banda cromática, por lo tanto se puede usar en todas las regiones del espectro. Funciona mejor que el prisma en el IR.



**Celdas para la muestra**: recipientes donde se coloca la muestra a analizar. Varían mucho según la técnica a utilizar, pero como característica común deben ser transparentes en la región de  $\lambda$  que se va a medir.

VIS y UV - cubetas cuadradas de vidrio, cuarzo de 1 cm de lado.

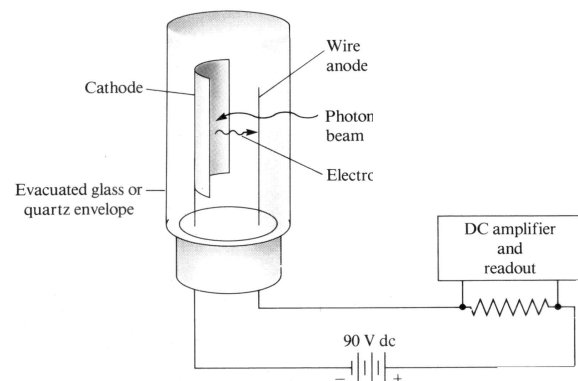
IR - cubetas de NaCl, AgCl.

**Detector (transductor)**: Produce una señal eléctrica cuando recibe un fotón. Esta señal eléctrica luego es convertida en unidades de potencia radiante transmitida o absorbida.

Los detectores también dependen de la región de  $\lambda$  en la que se trabaja:

**FOTOTUBO**. Para la zona del VIS y UV. Con el mismo principio de funcionamiento que la célula fotoeléctrica.

Al golpear un fotón en el cátodo, este emite un electrón hacia el ánodo, lo cual provoca un flujo de corriente eléctrica que es medida por un voltímetro. La respuesta



del material fotoemisor depende de la  $\lambda$ , por tanto se usan diferentes tipos de fototubos según la  $\lambda$  en la que se trabaja.

Cuando se utilizan radiaciones de baja intensidad la señal eléctrica es muy débil y sujeta a un gran error. En este caso se utiliza el "TUBO FOTOMULTIPLICADOR", que incluye varios fototubos en serie. En este caso, el choque de un fotón forma una cascada de electrones que dan una señal más intensa.

#### FOTODIODO ARRAY:

Sobre un semiconductor se fabrican diodos en serie paralelos, de manera que al incidir sobre él una radiación difractada, se puede tener una señal instantánea para un amplio rango de  $\lambda$ .

#### INFRAROJOS.

Los detectores de infrarojos se basan en la propiedad térmica de estas radiaciones y traducen el calor asociado a la radiación transmitida en una señal eléctrica. Los más utilizados son los TERMOPARES y BOLOMETROS, formados por metales cuya resistencia eléctrica cambia con la temperatura.

**Registrador:** En los instrumentos más antiguos la señal se mostraba en un medidor de aguja que tenía una escala en unidades de transmitancia y de absorbancia. Los instrumentos más modernos tienen un display digital, en el que aparece el valor numérico de absorbancia o el valor de concentración cuando puede realizar automáticamente los cálculos de calibración. En el caso de obtener el espectro de absorción (en un intervalo de  $\lambda$ ) de una sustancia, el registrador nos muestra un gráfico con el valor de  $\lambda$  en abcisas y la absorbancia en ordenadas.

## Tipos de espectrofotometrías.

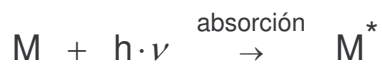
En la tabla siguiente se muestra una clasificación de los principales tipos de espectrofotometrías agrupados según el tipo de interacción luz-molécula (absorción o emisión) y según la zona del espectro en la que se trabaja. Y a continuación se describen las características principales de cada tipo, los instrumentos utilizados y las aplicaciones analíticas más importantes.

### Clasificación

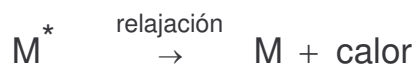
|           |   |           |  |
|-----------|---|-----------|--|
| ABSORCION | } | molecular | UV - VIS<br>IR<br>RMN  |
|           |   | atómica   | llama (EAA)<br>electrotérmica (GF)   |
| EMISION   | } | atómica   | llama (EEA)<br>plasma (ICP)  |
|           |   | molecular | fluorescencia (FS, XRF)  |
| OTROS     | } |           | turbidimetria<br>refractometria<br>polarimetria<br>espectroscopia masas (EM) |

### **Espectrofotometria de absorción molecular VIS-UV.**

Hay un proceso de absorción de radiación por parte de las moléculas pasando a un estado excitado.



y en un tiempo muy breve se produce la relajación con emisión de energía en forma de calor



El aumento de energía interna conlleva transiciones electrónicas. Estas transiciones son de electrones compartidos que forman enlaces o de electrones de orbitales atómicos externos (no compartidos).

Los principales tipos de moléculas que experimentan este fenómeno son:

- compuestos orgánicos con grupos no saturados (dobles y triples enlaces), donde hay electrones de enlace que pueden saltar a otros orbitales de enlace. Estos grupos funcionales que absorben en VIS o UV se llaman  **cromóforos** .
- compuestos de coordinación (complejos) de metales de transición. Ej.  $\text{Fe}(\text{SCN})_2$ - rojo intenso.
- iones de metales de transición, de lantánidos y de actínidos. Ej. color azul de la disolución de  $\text{Cu}^{2+}$

Generalmente la absorción de estos compuestos se produce en varias  $\lambda$  o amplias bandas de absorción, por lo que no hay picos bien definidos. Sobre todo cuando hay interacciones con el disolvente. Esto confiere poca selectividad a la técnica para identificación de especies, siendo más útil en análisis cuantitativo.

El instrumento utilizado en la técnica es el **espectrofotómetro visible-ultravioleta**. Que permiten trabajar con una gran cantidad de  $\lambda$ , incluso hay algunos que hacen un barrido en una región del espectro dando un gráfico del espectro de absorción de una sustancia. Estos aparatos constan de un selector de  $\lambda$ , y una cubeta transparente de 1 cm de lado y 3 cm de alto donde se coloca la disolución a medir. Normalmente hay dos huecos para dos cubetas, uno para la muestra y otra para una disolución de referencia o blanco, frente a la cual se hacen todas las medidas.

Cuando la especie química a medir absorbe en el visible (y la disolución tiene color) la técnica se llama vulgarmente **colorimetría**. Y los aparatos utilizados se llaman **colorímetros**. También se comercializan kits de análisis rápidos que tienen unas tablas de comparación de colores (o disoluciones preparadas y de color estable) en lugar de un aparato como el descrito. La disolución problema se mezcla con los reactivos adecuados en un pequeño tubo de ensayo y se compara con la tabla de colores. En esta tabla está asignada la concentración de analito que corresponde a cada color, con lo cual se puede determinar la concentración en el problema. Este método no tiene una gran exactitud pero en muchas aplicaciones es suficiente (cloro en piscinas, nitratos en aguas de embalses,  $\text{NaCl}$  en aguas para riego, etc).

En muchos casos la especie estudiada no absorbe en el VIS-UV, pero sí un complejo formado con otro compuesto. Por ej. el ión fosfato no absorbe en el VIS, pero forma un complejo con el ión molibdato y el vanadato (fosfomolibdovanadato) que tiene una gran intensidad de absorción a 430 nm (azul), y se emplea para análisis de fósforo en aguas, suelos, etc. En estos casos la determinación espectrométrica no es directa, sino que previamente se hace reaccionar la muestra con unos reactivos adecuados (**reacción colorimétrica**) y posteriormente se mide la absorbancia de la mezcla.

Especies químicas determinadas:

|                    |                                 |                              |
|--------------------|---------------------------------|------------------------------|
| P, B               | mediante formación de complejos | aguas, suelos, fertilizantes |
| nitritos, nitratos | directamente, o con complejos   | aguas                        |
| Fe, Co, Mo         | con $\text{SCN}^-$              | suelos                       |
| Ti, Va, Cr         | con $\text{H}_2\text{O}_2$      | contaminantes                |
| Bi, Pd, Te         | con $\text{I}^-$                | contaminantes                |
| Cu, Pb, Ni, Fe     | con complejos                   | suelos                       |

Ventajas y aplicaciones.

- gran aplicabilidad, ya que hay muchas especies absorbentes y posibilidades de formar complejos con las que no lo son
- elevada sensibilidad, se pueden determinar conc hasta  $10^{-5}$  M
- selectividad media, interacciones cuando hay grupos que absorben a la misma  $\lambda$
- permite automatización del proceso, se usa en sistemas de análisis en continuo
- sistema no destructivo en medidas directas

Como principal desventaja de la técnica las interacciones por partículas que interfieran el paso de luz. Las disoluciones han de ser exentas de sólidos en suspensión.

### ***Espectrofotometría de absorción molecular IR.***

La absorción molecular de radiaciones de esta zona del espectro produce transiciones vibracionales y rotacionales. Por lo tanto, todas las moléculas absorben en IR, excepto algunas diatómicas ( $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{Cl}_2$ ) de elevada simetría.

Las bandas de absorción son muy estrechas y corresponden a enlaces muy específicos, y a menudo dependen de los átomos más próximos. Un espectro de IR es como una "huella dactilar" de la molécula y esto implica que es una técnica idónea para identificar compuestos orgánicos o inorgánicos puros, pero no es tan adecuada para cuantificar.

Los instrumentos más utilizados son:

Espectrofotómetros IR. Similares al VIS-UV, pero con componentes diferentes. Hacen un barrido de  $\lambda$  y recogen el espectro. Los más utilizados son los llamados NIR (near infrared) que trabajan con zonas del espectro en el infrarrojo cercano.

Espectrometros de transformada de Fourier. Recoge datos de una zona del espectro simultáneamente y en varias pasadas, posteriormente por un proceso matemático muy complejo se resuelven los picos del espectro con una gran sensibilidad. Son los más usados actualmente.

Fotómetros de filtro. Con un filtro adecuado se selecciona una  $\lambda$  deseada. Sirven para monitorizar la concentración de una especie química en un punto fijo. Se usan mucho para contaminantes atmosféricos: CO, nitrobenzeno, cloruro de vinilo, HCN, piridina, etc. En algunos instrumentos se usan para determinar CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, etc.

Aplicaciones. Se usa en la identificación de compuestos en investigación de medicamentos, bioquímica, biología, fisiología. En la industria farmacéutica, pesticidas, alimentación, contaminantes, etc.

### ***Espectrofotometría de absorción y de emisión atómica.***

Permite la determinación (cuantificación) de unos 70 elementos químicos en concentraciones que oscilan entre ppb a ppm. La medida de los elementos químicos se hace en estado atómico mediante una atomización de la muestra en estado gaseoso.

Estos átomos experimentan absorción, emisión o fluorescencia de radiaciones VIS, UV o rayos X, debidas a transiciones electrónicas entre orbitales atómicos. Esta técnica no da información sobre enlaces moleculares en absoluto y nos da información específica sobre un elemento químico.

La principal diferencia con las otras espectrometrías es la **atomización**, proceso por el cual la muestra se introduce en un mechero, junto con el combustible, y se quema a elevada temperatura. Las moléculas del analito se rompen totalmente liberando los elementos químicos en estado atómico, y estos pueden experimentar fenómenos de absorción, emisión o fluorescencia. En la figura siguiente se muestra un esquema de estas posibilidades.

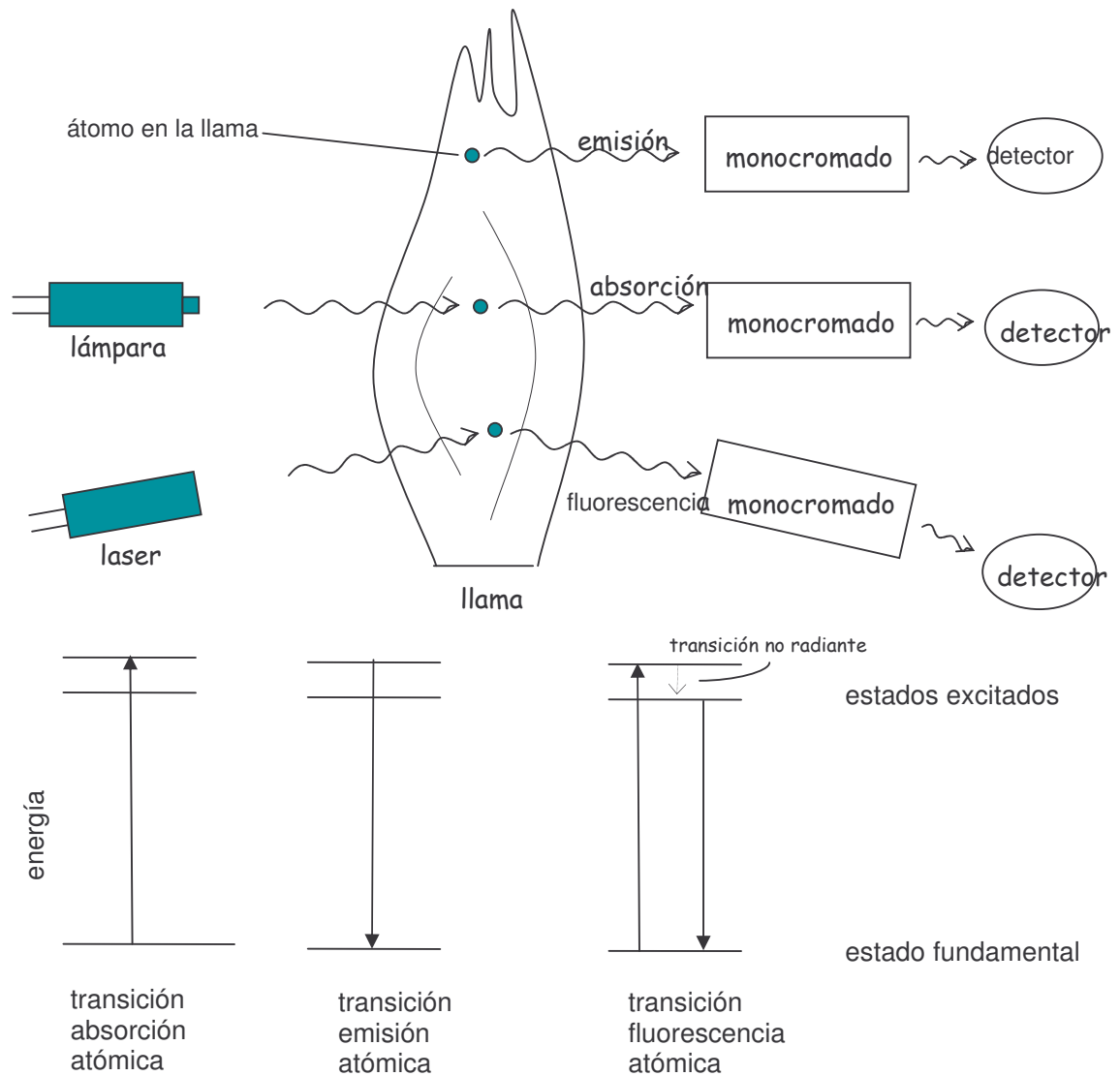
Según el sistema de atomización, y la temperatura a la que se produce, se tienen los siguientes métodos de espectrofotometría atómica: llama, electrotérmico, plasma, arco voltaico y chispa eléctrica.

Espectrofotometría de absorción atómica con llama.

Es el método más utilizado de la espectrofotometría atómica. Muy adecuado para la determinación de ppm de Fe, Cd, Au, Pb, Zn, Cu, Mn en disoluciones acuosas de aguas, fertilizantes, suelos, extractos vegetales, etc.

Los átomos en la llama absorben radiación de determinadas  $\lambda$  (VIS y UV) según su naturaleza, por lo que es una técnica muy específica para cada elemento. La absorción en la llama sigue la ley de Beer, pero en la práctica es necesario hacer un





calibrado con disoluciones patrón de las que se obtienen valores de absorbancia y que permiten calcular la recta de calibrado.

El instrumento se denomina Espectrofotómetro de Absorción Atómica (EAA). En inglés: Flame Atomic Absorption Spectrophotometer (F)AAS.

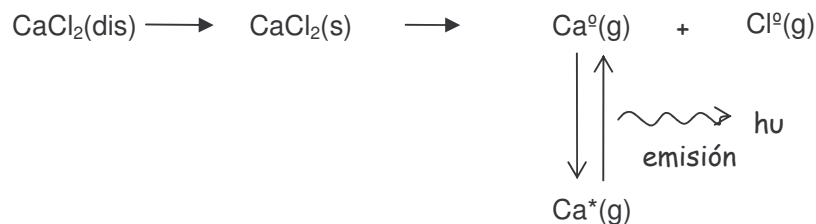
Como fuente de radiación se usa una lámpara de cátodo hueco que contiene el mismo metal que se va a analizar y que emite una radiación con una banda de  $\lambda$  entorno a la que se va a absorber.

En lugar de una cubeta o recipiente para poner la muestra lleva un mechero donde se produce la llama con la que se atomiza la muestra. Esta llama suele ser de propano, acetileno o hidrógeno y oxígeno o óxido nítrico ( $N_2O$ ). Las temperaturas que alcanza varían entre 1500 y 3000°C.

### Espectrofotometría de emisión atómica con llama.

Es una técnica muy utilizada para la determinación de metales alcalinos y alcalinotérreos: Na, K, Li, Ca, etc, en concentraciones del orden de ppm. Se utiliza con los mismos materiales ya comentados: aguas, fertilizantes, suelos, material vegetal, alimentos, contaminantes, etc.

Se basa en el mismo principio que la absorción, pero en este caso la temperatura de la llama es suficiente para que haya una excitación atómica y una emisión posterior.



Los instrumentos utilizados en esta técnica se denominan Espectrofotómetros de Emisión Atómica (EEA) y en inglés con las siglas AES. A diferencia de los anteriores (absorción) no tienen fuente de radiación. El resto de componentes es igual, así como el procedimiento de calibración y cálculo de resultados.

### **Espectrofotometría con atomizadores electrotérmicos.**

Se utiliza para determinar concentraciones muy pequeñas (ppb) de metales contaminantes: Pb, Cd, Cr, Zn, Cu, Co, Mn, Pt, Hg, etc.

En las técnicas anteriores el rendimiento de la atomización (moléculas atomizadas con respecto al total) es muy bajo: aprox del 0,1%. Esto hace que la sensibilidad de la técnica sea baja. El atomizador electrotérmico consta de un pequeño minihorno, que es un cilindro de grafito de 50mm·10mm  $\phi$ , que se calienta con una resistencia eléctrica hasta 3000°C. Con una pequeña cantidad de muestra (varios  $\mu\text{L}$ ) se obtiene una gran cantidad de partículas atomizadas (eficiencia del 100%) y una gran señal que da una gran sensibilidad a la técnica. Por el contrario la precisión no es tan buena y hay un gran número de interferencias. El proceso de calibrado es muy delicado y solo es útil en determinaciones de concentraciones muy bajas de algunos metales.

El instrumento utilizado se llama Espectrometría con Horno de Grafito o GFS (Graphit Furnace Spectrometry).

### ***Espectrofotometría de emisión con plasma.***

Se consigue una llama de altísima temperatura que transforma la mezcla de combustible y muestra al estado de plasma: una mezcla gaseosa con una concentración muy alta de cationes y electrones. Esto permite una elevada eficiencia en la atomización, una intensa emisión de los átomos y la determinación de una gran cantidad de elementos químicos metálicos (y algunos no metales) con algo menos de sensibilidad que el Horno de Grafito, pero con más precisión. Además la combinación de esta técnica con un sistema informático potente, permite la determinación de la concentración de varias decenas de elementos químicos en unos segundos.

Los diferentes aparatos se basan en la fuente de energía para obtener el plasma en el mechero. Los más comunes son:

- DCP: plasma generado por una corriente continua.
- ICP: (induced coupled plasma) plasma acoplado por inducción de un generador de radiofrecuencias.
- plasma generado por frecuencias de microondas.

Entre los no metales que pueden ser determinados por esta técnica se encuentra el P y el B. Se obtienen límites de detección entre 0,1 y 100 ppm, y el acoplamiento de esta técnica con otras muy sensibles permite llegar hasta 1 ppb. Ej. ICP-EM o ICP-espectrometro de masas.

### ***Espectrofotometría de fluorescencia molecular.***

Se basa en el fenómeno que experimentan algunas moléculas de absorber una radiación determinada y en el proceso de relajación, liberar parte de la energía como calor (radiación térmica) y otra parte como radiación electromagnética de una longitud de onda mayor a la incidente. Este fenómeno se produce en un intervalo de tiempo muy pequeño después de la absorción ( $10^{-5}$  s) a diferencia de la fosforescencia que puede durar minutos y horas.

Este fenómeno permite una técnica muy sensible ya que no todas las moléculas fluorescen y las  $\lambda$  pueden cambiar según las condiciones. Los límites de detección son inferiores a la absorción molecular VIS-UV.

El instrumento más usado es el espectrofluorómetro, y la técnica más común se denomina Fluorescencia de Rayos X, ya que son estos los utilizados como fuente de energía.

Tiene una gran aplicabilidad en la cuantificación de moléculas orgánicas en productos alimenticios, farmacéuticos, clínicos y naturales.

### **Otros métodos.**

#### Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Se produce una absorción de radiación electromagnética por los núcleos atómicos. Estos tienen un movimiento de giro, que es cambiado en el proceso de absorción.

El tipo de radiaciones que se utilizan son de gran  $\lambda$  (microondas de baja energía), y la absorción depende de la configuración electrónica que rodea al núcleo y de las interacciones intramoleculares. Por lo tanto da información sobre los enlaces que tiene un átomo, y el tipo de molécula que se estudia. Las radiaciones involucradas en esta técnica no alteran los materiales estudiados (dada su baja energía), por lo que tiene una gran aplicación en seres vivos, productos fácilmente alterables, etc.

Los elementos químicos que se detectan por esta técnica son H, F, P, B, Cl, N. Mientras que el C y el O no tienen un momento cinético de giro nuclear.

Esto hace que la técnica sea muy interesante para identificar moléculas orgánicas, obteniendo espectros de los átomos de H, de los que se deduce todos los enlaces del H en la molécula.

Esta técnica tiene una gran aplicación en medicina (estudios no destructivos de tejidos de órganos del cuerpo humano), determinación de humedad, estudios de aceites y grasas, estudios de F en plásticos, etc.

#### Espectroscopia de masas (MS).

No es una técnica espectrofotométrica propiamente dicha, pero se utiliza mucho en conjunto con algunos de los instrumentos citados.

Se basa en obtener una nube de moléculas gaseosas ionizadas, de manera que quedan los elementos químicos en forma iónica (cationes) en estado gaseoso. Esta nube se acelera mediante un campo eléctrico y pasa por un potente imán que separa los iones según su masa, y finalmente choca sobre un detector sensible a todos los iones. El detector es como una pantalla alargada y los átomos de un mismo elemento chocan en una misma zona, distinguiéndose varias regiones o rayas en el detector relacionadas con la masa de los átomos presentes en la muestra.

Al final se obtiene una gráfica llamada espectrograma o espectro de masas, con los pesos atómicos en abscisas y la frecuencia o cantidad en ordenadas. En este aparecen rayas indicando los elementos químicos presentes y son más o menos largas según la cantidad de átomos que hay.

La instrumentación de esta técnica es muy sofisticada y solo disponible en muy buenos laboratorios. Da un grado de exactitud muy bueno, siendo la técnica más sensible para determinar algunos elementos químicos. Permite determinar ppb de algunos metales en combinación con la técnica ICP.