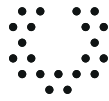


Aplicaciones y generalidades de un espectrofotómetro UV-VIS UV-1800 de Shimadzu

Isabel Cristina Castellanos Cuéllar
Javier Ricardo Velandia Cabra
Miguel Ángel González Curbelo
Diana Angélica Varela Martínez
Eduardo Ramírez Valencia



ean®

Ediciones

Catalogación en la fuente: Biblioteca Universidad EAN

Castellanos Cuéllar, Isabel Cristina
Aplicaciones y generalidades de un espectrofotómetro UV-VIS UV-1800
de Shimadzu / Isabel Cristina Castellanos Cuéllar, Javier Ricardo Velandia
Cabra, Miguel Ángel González Curbelo, Diana Angélica Varela Martínez,
Eduardo Ramírez Valencia.
Descripción: 1a edición / Bogotá: Universidad EAN, 2018
65 páginas

9789587565980 (Electrónico 2018)

1. Espectrofotometría 2. Espectroscopia de absorción atómica
3. Instrumentos científicos 4. Química analítica

I. Velandia Cabra, Javier Ricardo II. González Curbelo, Miguel Ángel
III. Varela Martínez, Diana Angélica IV. Ramírez Valencia, Eduardo

543.55 CDD23

Edición

Gerencia de Investigaciones

Gerente de Investigaciones

H. Mauricio Diez Silva

Coordinadora de Publicaciones

Laura Cediél Fresneda

Revisor de estilo

Juan Carlos Velásquez

Diagramación y finalización

María Eugenia Mila

Diseño de carátula

Cesar Augusto Rubiano Moreno

Publicado por Ediciones EAN, 2018.

Todos los derechos reservados.

ISBNe: 9789587565980

©Universidad EAN, El Nogal: Cl. 79 No. 11 - 45. Bogotá D.C., Colombia, Suramérica, 2018
Prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin autorización de la Universidad EAN®

©UNIVERSIDAD EAN: SNIES 2812 | Personería Jurídica Res. nº. 2898 del Minjusticia -
16/05/69| Vigilada Mineducación. CONACREDITACIÓN INSTITUCIONAL DE ALTA CALIDAD,
Res. N° 29499 del Mineducación 29/12/17, vigencia 28/12/21

Producido en Colombia.

CONTENIDO

Resumen.....	5
Palabras clave.....	5
Introducción.....	7
1. Operaciones básicas con el instrumento.....	11
1.1 Especificaciones generales del instrumento.....	11
1.2 Consideraciones antes de encender el instrumento.....	12
1.3 Operación básica de encendido.....	12
2. Operaciones stand alone en el UV-1800 (Shimatdzu.UV-1800, 2013).....	19
2.1 Lectura en modo fotométrico (photometric).....	19
2.2 Lectura en modo espectro (spectrum).....	20
3. Operación del UV-1800 con el software UV-probe (Shimatdzu. UV-Probe, 2013).....	23
3.1 Procedimiento para la operación del UV-1800 con el software UV-PROVE.....	23
3.2 Módulo Spectrum.....	24
3.3 Módulo photometric.....	30
3.4 Generación de reportes para impresión.....	49
4. Aplicación espectroscopia UV-VIS.....	55
4.1 Análisis cualitativo (espectro y estructura química).....	55
4.2 Análisis cuantitativo (curvas de calibración).....	60
Referencias.....	65

Resumen

El Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad EAN cuenta con un equipo de espectrofotometría UV-VIS UV-1800 de la casa comercial Shimadzu de doble haz, para el análisis de una gran variedad de analitos de origen tanto orgánico (compuestos orgánicos conjugados) como inorgánico (iones metálicos de transición), que tienen absorción de radiación en estas longitudes de onda, desde el UV lejano al infrarrojo en el rango de 120nm y 1100nm.

El espectrofotómetro UV-1800 permite realizar la caracterización de compuestos (acercamiento a la identificación de grupos funcionales) y un análisis cuantitativo de cromóforos con una sensibilidad de ppm para estar a la vanguardia de la tecnología y del conocimiento investigativo en lo que a técnicas de análisis instrumental se refiere.

Palabras clave

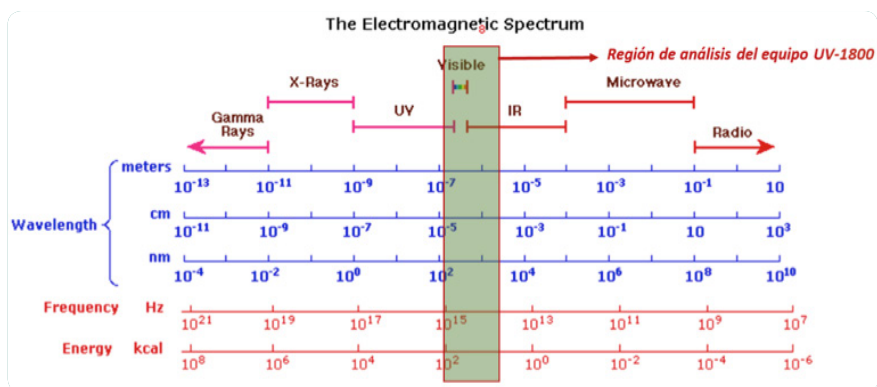
Espectrofotometría, análisis instrumental, UV-VIS, análisis cuantitativo.

Introducción

Es conocida la naturaleza dual que posee la luz tanto con propiedades corpusculares como ondulatorias. De esta forma algunos fenómenos es posible interpretarlos a la luz del modelo ondulatorio de la luz, así como otros pueden ser estudiados desde el modelo de la luz como un conjunto de partículas elementales llamadas fotones. Las propiedades básicas de la luz son su longitud de onda (distancia entre picos adyacentes (o valles), y se designa frecuentemente en nanómetros) y su frecuencia (es el número de ciclos de onda que pasan por un punto fijo por unidad de tiempo; y se mide en ciclos por segundo o Hertz - Hz).

La luz visible representa apenas una pequeña porción del espectro electromagnético, que abarca desde longitudes de onda muy cortas (rayos gamma y rayos X) hasta longitudes de onda muy largas (microondas y ondas de radio). La figura 1 muestra las regiones más representativas del espectro.

Figura 1. Espectro electromagnético. Resaltado en el recuadro, indica el rango de adquisición el equipo UV-1800.



Fuente. Adaptada de <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/uv-vis/spectrum.htm>.

Cuando un haz de luz blanca pasa a través de una sustancia coloreada, una porción de las longitudes de este rango es absorbida, mientras que el restante conjunto de longitudes de onda es reflejado; fenómeno que origina el color de los cuerpos, y en el que se basa la espectrofotometría de absorción UV-VIS.

La espectrofotometría de absorción UV-VIS se encarga de medir la atenuación de un haz de luz después de su paso a través de una muestra. Esta técnica es comúnmente usada para la detección de grupos funcionales, detección de impurezas, análisis cualitativo y cuantitativo de analitos, medicamentos con grupos cromóforos entre otras aplicaciones.

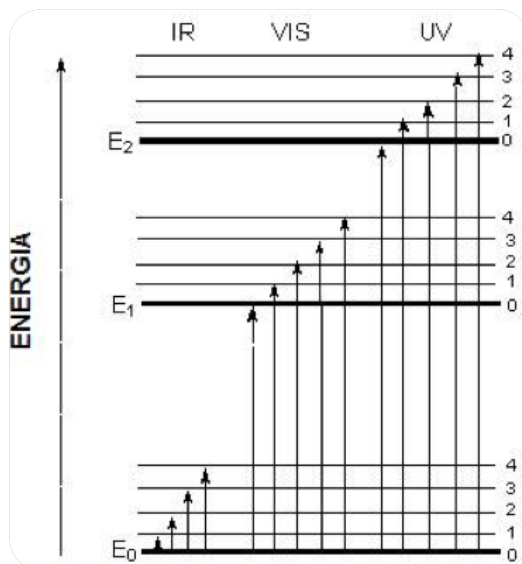
El principio básico de la técnica de UV-VIS es la absorción de radiación de una frecuencia determinada en el rango de longitudes de onda de UV-VIS, realizada por una molécula para producir una transición de un nivel de baja energía a un nivel de mayor energía.

En términos generales, la energía total de una molécula (ET) es la sumatoria de su energía electrónica (EE), su energía vibracional (EV) y su energía Rotacional (ER).

$$ET = EE + EV + ER$$

La energía de la radiación en el rango de longitud de onda del visible (38.1 a 71.5 Kcal/mol) es menor que en el rango del ultravioleta (UV) (143 a 71.5 kcal/mol) (Gilbert & Martín, 2011). En este rango de valores de energía se verá qué tipo de transiciones son posibles en la molécula, ya que la magnitud de la energía requerida por la molécula decrece en el siguiente orden: $EE > EV > ER$, de tal forma que las transiciones posibles en la molécula son de tipo vibracional, rotacional y hasta electrónica dependiendo de la región del espectro que incide sobre la misma, como se esquematiza en la figura 2:

Figura 2. Diagrama de los niveles de energía de un átomo o molécula.



Fuente. Adaptada de Jang, 2017.

En la anterior figura, se indican con flechas los cambios que se producen por absorción de radiación infrarroja (IR), visible (VIS) y ultravioleta (UV).

El equipo UV-1800 disponible en nuestros laboratorios puede realizar lecturas entre los 120nm y 1100nm. Este rango de radiación cubre el espectro UV cercano y lejano, el espectro VIS y parte del infrarrojo cercano (NIR), como se representó en la figura 2, por tanto, el tipo de transiciones moleculares que podemos esperar son electrónicas y vibracionales, que al combinarse generan bandas anchas características de los espectros UV-VIS, por la combinación de los diferentes tipos de transiciones específicas para cada compuesto o mezcla de compuestos, en el espectro que se registra como resultado de un barrido en el rango de análisis del equipo UV-1800.

En este orden de ideas, al adquirir un espectro en el rango de lectura del UV-1800, el usuario obtiene como resultado el conjunto de bandas de absorción de todas las posibles transiciones de su(s) compuesto(s), que serán acordes a las posibles transiciones de los grupos funcionales de su molécula; como metodología de caracterización química de un material (identificación de grupos funcionales).

La absorbancia (medida de la capacidad de una sustancia de absorber luz de una determinada longitud de onda. La absorbancia es igual al logaritmo del inverso de la transmitancia) de una muestra es proporcional al número de moléculas absorbentes en el haz de luz del espectrómetro (concentración molar de analito), acorde a la ley de Lambert-Beer; de modo que el equipo UV-1800 permite realizar medidas cuantitativas de un analito, partiendo de la construcción de una curva de calibración para interpolar la concentración de la muestra, desde la relación matemática de las concentraciones de los estándares conocidos con una sensibilidad en el UV-1800 hasta el rango de ppm.

Operaciones básicas con el instrumento

1.

1.1 Especificaciones generales del Instrumento

Las principales partes de un espectrofotómetro son tres, el sistema de iluminación, el sistema monocrómador y el sistema de detección y registro.

Tabla 1. Especificaciones generales del instrumento.

Dimensiones	450 (ancho) x 490 (profundidad) x 270 (altura) mm
Peso	15 kg
Fuente de luz	Lámpara de tungsteno y lámpara de deuterio. Vida útil: 2000 horas
Intervalo espectral	190,0 ~ 1100,0 nm
Temperatura de operación	15°C - 35°C
Ancho de banda espectral	1nm (190 to 1100nm)
Indicación de la longitud de onda	En incrementos de 0.1-nm
Fijación de la longitud de onda	En incrementos de 0.1-nm (incrementos de 1-nm al establecer un intervalo de barrido)
Exactitud espectral (para validación del equipo, en correcto funcionamiento del sistema óptico)	$\pm 0.1\text{nm}$ @ 656.1nm D2 $\pm 0.3\text{nm}$ (190 to 1100nm)
Repetitividad espectral	$\pm 0.1\text{nm}$
La luz espuria o errática: es toda luz que llega al detector sin haber atravesado la muestra cuya absorbancia queremos medir.	Menos de 0.02 % usando NaI a 220nm, NaNO ₂ a 340nm menos de 1.0 % usando KCl a 198nm
Sistema fotométrico	Doble haz

Tabla 1. Especificaciones generales del instrumento (Continuación)

Intervalo fotométrico de medida	Absorbancia: -4 a 4 Abs. Transmitancia: 0 % a 400 %
Exactitud fotométrica	± 0.002 Abs (0.5Abs) ± 0.004 Abs (1.0Abs) ± 0.006 Abs (2.0Abs)
Repetitividad fotométrica	Menos de ± 0.001 Abs (0.5 Abs), menos de ± 0.001 Abs (1 Abs), menos de ± 0.003 , Abs (2.0 Abs)
Estabilidad de la línea de base	Menos de 0.0003 Abs/hora a 700nm (después de una hora de encendida la fuente de luz)
Nivel de ruido	0.05 valor RMS a 700nm
Software	UV-PROBE

Fuente. Shimadzu, 2014.

1.2 Consideraciones antes de encender el instrumento

Verifique que el compartimiento de las celdas se encuentre desocupado cuando encienda el interruptor del instrumento. Si hay un objeto obstruyendo el paso de la luz en el chequeo inicial generará el error “NG” en energía de la lámpara por baja intensidad de la luz incidente en el detector (SHIMADZU.UV-1800, 2013).

1.3 Operación básica de encendido

A continuación se describe secuencialmente cómo encender el equipo y acondicionarlo para realizar un análisis, estos pueden ser realizados stand alone (sección 5) o a través del software UV-PROBE (sección 6).

- A. El encendido del instrumento se realiza directamente en el interruptor, ubicado en la parte inferior derecha del equipo.

Figura 3. Imagen Externa Espectrofotómetro UV-1800.



Fuente. LabCommerce, 2017.

B. Cuando el instrumento es encendido (ON), el UV-1800 comenzará de manera automática la ejecución de chequeos de rutina e inicialización. Una vez terminado el autochequeo el equipo solicita identificar el usuario y la contraseña; ingrese con el usuario Administrador, el password es nulo, ingrese con Enter desde el teclado del UV-1800. Una vez terminado el chequeo inicial se observa la siguiente pantalla del UV-1800.

Nota. Para garantizar estabilidad en las lecturas realizadas, se recomienda encender el instrumento como mínimo 30 minutos antes de realizar las lecturas.

- B. La ventana que observará se muestra en la imagen a la derecha. Seleccione 2 para establecer el rango de longitud de onda en el que desea analizar, ingrese 1100 con el teclado numérico y dé Enter, digite 190 y de nuevo Enter. Este corresponde al rango total de análisis del equipo.

Figura 5. Esquema pantalla operación modo Stand alone. Modulo spectrum.



Fuente. Shimadzu, 2014.

- C. Terminada la configuración verifique que no se encuentre ninguna celda en los compartimientos. Posteriormente realice la corrección de línea base presionando la tecla

1.3.2 Preparación de la muestra en la celda de lectura

En general todos los espectrofotómetros UV-VIS son instrumentos para la medición de muestras en solución (mezclas homogéneas), por tanto, es indispensable que si su muestra contiene partículas

de un tamaño mayor al de una solución (colides, dispersiones, espumas), es necesario realizar un tratamiento previo como filtración o centrifugación, ya que partículas de mayor tamaño resultan en absorbancias altas que no corresponden a la absorción por excitación de la muestra, sino por obstrucción del paso de luz (cuerpos opacos).

- A. Asegúrese que las celdas de cuarzo estén completamente limpias antes de adicionar su solución.
- B. En la primera celda adicione el solvente (blanco) dejando 1 cm abajo del borde, se recomienda realizar una adición de solvente a la celda para purga, descarte y adicione nuevamente disolvente evitando que queden burbujas al interior de la solución, ya que la presencia de aire afecta la medición.

Figura 6. Macro cuvette.

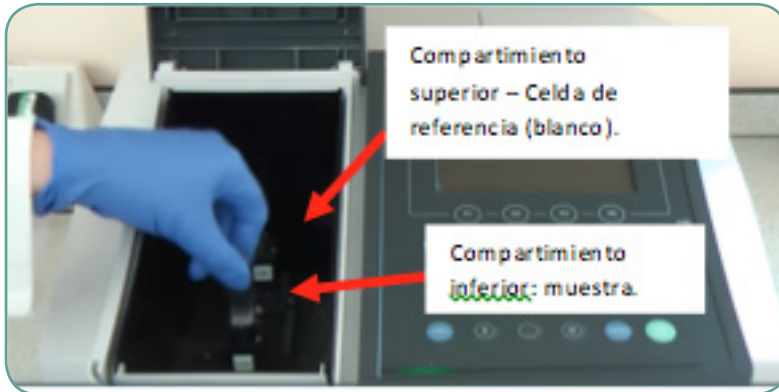


Fuente. <https://www.brand.deg>

- C. Ubique la tapa de la celda en la parte superior de la misma. Limpie con papel de arroz el exterior de la celda.
- D. Introduzca la celda con el solvente en el compartimiento superior de referencia. Para ubicar la celda en el equipo oriente la sección opaca de la celda hacia su frente, para permitir el correcto paso del haz de luz a través de la celda con la solución.

- E. Adicione la solución a medir en la otra celda de cuarzo, repita el mismo procedimiento que para la celda de referencia. Ubique la celda con la muestra en el compartimiento inferior del equipo, como lo muestra la imagen.

Figura 7. Compartimientos para muestra UV-1800. G.



Fuente. Adaptada de https://article.wn.com/view/2016/09/30/FY2015_Slavery_and_Human_Trafficking_Statement_Shimadzu_Corp/

- F. Una vez ubicadas las celdas, cierre el compartimiento del equipo para realizar la medición.
- G. Para operar el instrumento en modo stand alone continúe en la sección 3. Si se va a operar el equipo conectado al software UV-Probe continúe en la sección 5.

Figura 8. Esquema pantalla menú operación stand alone.



Fuente. Shimadzu, 2014.

Operaciones stand alone en el UV-1800 (Shimadzu.UV-1800,2013)

2.

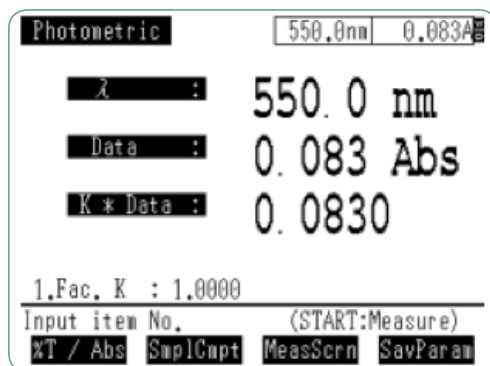
2.1 Lectura en modo fotométrico (photometric)

A. En la pantalla en la que se encuentra oprima Return para regresar al menú inicial, con el teclado digite 1 para seleccionar el módulo fotométrico (photometric) y dé Enter.

El UV-1800 en modo fotométrico permite realizar una medición a una única longitud de onda (item 1), o podemos tener la posibilidad de realizar una medición hasta en 8 diferentes longitudes de onda (item 2).

B. Seleccione item 1 y Enter Inmediatamente se encontrará con la ventana de la imagen.

Figura 9. Esquema pantalla menú operación stand alone método fotométrico.



Fuente. Shimadzu, 2014.

C. Cambie el valor de la longitud de onda con la tecla



D. Ubique la celda con la solución de referencia (blanco) en el compartimiento superior, y la celda con el analito en el compartimiento inferior como se describe en la sección 3.3.

E. El valor que muestra el monitor corresponde a la absorbancia de su muestra, para obtener el valor de transmitancia (F1) presione y seleccione con las flechas % T.

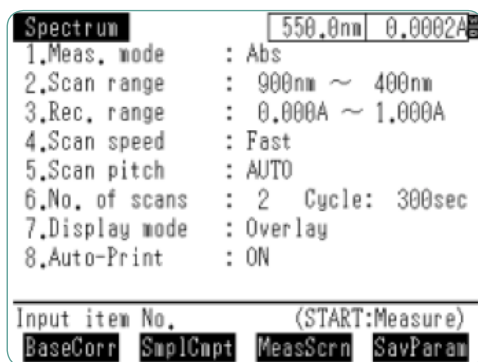


2.2 Lectura en modo espectro (spectrum)

A. En la pantalla inicial con el teclado seleccione 2 para seleccionar el módulo espectro (Spectrum) y Enter.

B. La ventana que observará contiene los mismos campos que el módulo Spectrum en el software UVProve (sección 5). Presione 1 en el teclado con las flechas seleccione las unidades en las que desea realizar su medición: absorbancia 0 %, transmitancia y Enter.

Figura 10. Esquema pantalla menú operación stand alone método espectro.



Fuente. Shimadzu, 2014.

- C. Seleccione 2 para establecer el rango de longitud de onda en el que desea analizar y Enter.
- D. Si desea realizar un ajuste de la escala del eje Y antes de iniciar la adquisición, puede ajustar el máximo y mínimo seleccionando la opción 3 y Enter, por ejemplo: valor mín 0.000A - 1.000A y Enter.
- E. Seleccione 4 y establezca el tiempo de acumulación (tiempo de espera entre una lectura y otra) la opción Fast toma datos cada 0.05s, Medium cada 0.2s, Slow cada 0.5s y Very slow cada 2.0s. El parámetro por defecto es Medium.
- F. Seleccione 5 para configurar el intervalo entre una medida y otra durante el escaneo del rango de longitud de onda. Auto: configura el intervalo dependiendo del rango de lectura de manera automática, 0.05 toma datos cada 0.05nm y los demás valores opcionales de igual manera. Una vez seleccionado el modo de configuración deseado presione Enter.
- G. Seleccione 6 para configurar el número de scan para cada punto (de 1 a 99 veces).
- H Seleccione 7 y configure la forma en la cual desea visualizar el espectro. Sequential: en la pantalla solo será visualizado el espectro en adquisición y por cada adquisición se actualiza. Overlay: la pantalla no se actualiza, comenzará a ver el espectro en adquisición desde la izquierda sobre los adquiridos anteriormente.

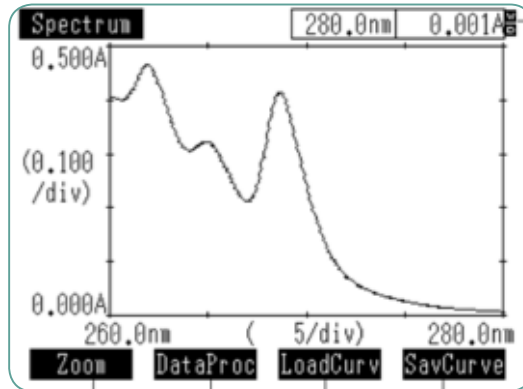
Actualmente la opción 8 siempre permanecerá en off, ya que no se encuentra conectado el accesorio de impresión.

- I. Ubique las celdas de referencia y la muestra con el analito en los compartimientos superior e inferior, como se describe en la sección 4.3, cierre la tapa del equipo para iniciar la adquisición de datos, presione la tecla



- j. Una vez termine la adquisición obtendrá una pantalla como se evidencia en la imagen. Si la escala no le permite ver la totalidad del espectro presione Return para ajustar el zoom y seleccione AutoScal con la tecla F3.

Figura 11. Esquema pantalla resultado adquisición espectro en modo stand alone.



Fuente. Shimadzu, 2014.

- k. Si desea ubicarse en una coordenada del espectro movílice la línea de lectura con las flechas hacia la derecha y hacia la izquierda. Las coordenadas Abs y longitud de onda le aparecerán resaltadas en la parte inferior del espectro. Almacene los datos de la adquisición en su memoria USB, que puede conectar presionando F3 (LoadCurv).

Figura 12. Imagen externa UV-1800.



Fuente. LabCommerce, 2017

Operación del UV-1800 con el software UV- Probe (Shimadzu. UV-Prrobe, 2013)

3.

El software disponible para el funcionamiento del equipo UV-1800 Shimadzu es el UVProbe, un software propietario de la casa fabricante Shimadzu. Permite coleccionar, analizar y generar reportes de manera simple e intuitiva.

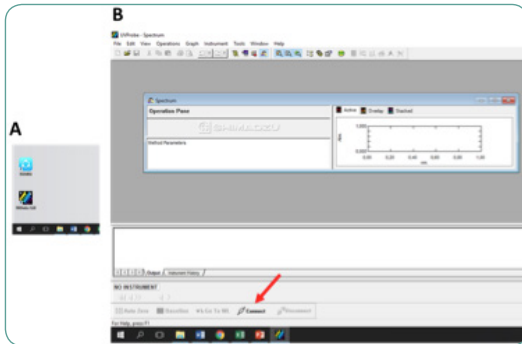
El software incluye cuatro componentes básicos:

- ◆ El módulo Spectrum, usado para escanear y analizar analitos en un rango determinado de longitudes de onda.
- ◆ El módulo Kinetics, usado para realizar mediciones en diferentes intervalos de tiempo; es un método útil en la determinación de cinéticas de reacción Michaelis-Menten, en las que se describe la velocidad de reacción por catálisis enzimática.
- ◆ El módulo photometric para análisis cuantitativo de analitos. Con este paquete es posible realizar la medición de un único valor de absorbancia (o % T) a una o más (hasta 8) longitudes de onda especificadas por el usuario, así como la construcción de curvas de calibración para el análisis cuantitativo de un analito basado en la ley de Lambert-bee.
- ◆ Generador de reportes.

3.1 Procedimiento para la operación del UV-1800 con el software UV-PROVE

A. Para iniciar la conexión del UV-Probe al PC verifique la conexión USB del UV-1800 al equipo de cómputo desde el cual operará el equipo, el cual deberá tener instalado y configurado el software UVProbe. Inicie el software, como se muestra a continuación:

Figura 13. Imagen ventana inicial software UVProbe.



A Ícono en el escritorio para iniciar UVProbe.

B Pantalla inicial de UVProbe, en la barra de herramientas de la parte inferior encontrará el ícono para solicitar la conexión al equipo desde el software una vez se halla encendido el UV-1800.

Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

B. Verifique que el espectrofotómetro se encuentre conectado a su PC en la barra de herramientas inferior. Si está conectado los botones los observará activos y el último ícono de la derecha será Disconnect (imagen arriba). En caso contrario, haga clic en Connect en la barra de herramientas inferior.

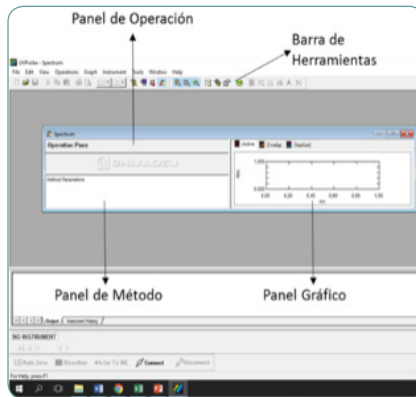
3.2 Módulo Spectrum

El objeto del módulo Spectrum es el control del espectrofotómetro para la adquisición de un barrido en un rango de longitudes de onda de la muestra de análisis.

El módulo incluye 3 paneles y una barra de herramientas (imagen a la derecha):

En el panel de operación visualiza la información colectada, las funciones de manipulación como Data Print, áreas de los picos y picos seleccionados. En el panel de método visualiza la información del método de colección de datos actual. En el panel de gráfico se visualizan los gráficos activos, superpuestos con anteriores scan o listados uno tras otro.

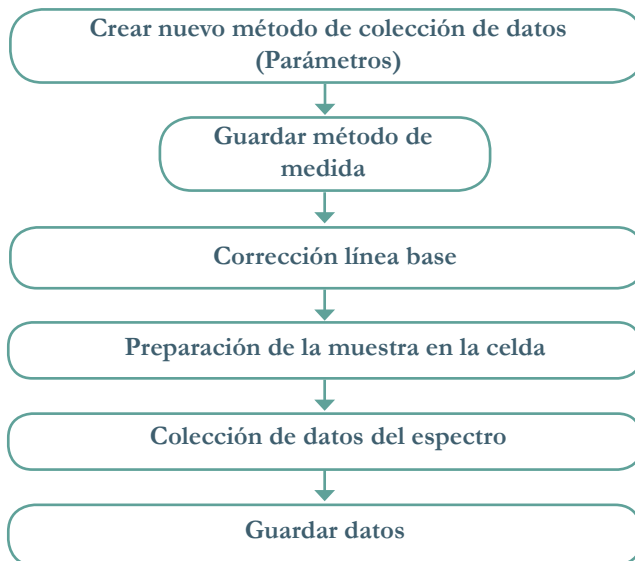
Figura 14. Imagen ventana inicial software UVProbe para operación en modo espectro.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

El procedimiento general para la construcción de un espectro en un rango de longitud determinada se muestra a continuación:

Figura 15. Diagrama procedimiento para adquisición en modo espectro usando UVprobe.



Fuente. Elaboración propia.

3.2.1 Creación nuevo método de colección de datos

A. Para iniciar el módulo Spectrum ubicado en la barra de herramientas superior, dé clic en el ícono



B. De la barra de herramientas superior, seleccione Edit > Method, o haga clic en el ícono Método para desplegar el siguiente cuadro de diálogo:

Figura 16. Barra de herramientas principal UVprobe en modo espectro.



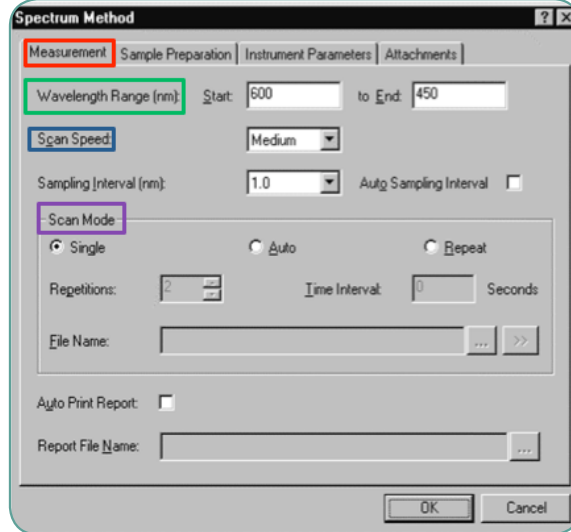
Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

C. En la pestaña Measurement, configure el rango de longitud de onda en el que desea analizar su muestra, en la opción Wavelength range (nm) por ejemplo si su rango de interés es: (600nm y 450nm) ingrese 600 en el campo Start y 450 en el campo End.

D. Seleccione en el campo velocidad de barrido (Scan Speed) medio para una adquisición cada 1nm; si desea mayor resolución disminuya la velocidad de scan hasta 0.1nm.

E. En el campo de Scan Mode seleccione single para realizar una única lectura por punto en el rango de longitud de onda seleccionado.

Figura 17. Menú configuración parámetros de medición modo espectro.

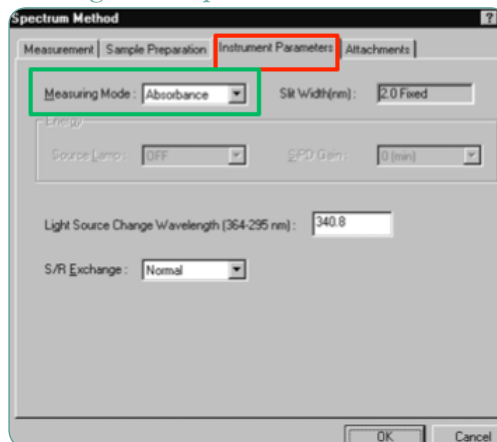


Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

F. En la pestaña Instrument Parameter de la misma ventana (imagen a la izquierda), seleccione Absorbancia en la lista de formas de medida (Measuring Mode).

G. Clic en OK para enviar los parámetros al espectrómetro. Cerciórese de la configuración en el espectrofotómetro.

Figura 18. Menú configuración parámetros del instrumento modo espectro.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

3.2.2 Guardar método de medida

Guarde el método como un archivo .smd para ello:

Figura 19. Barra de herramientas principal uv probe parámetros de medición modo.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

- A. Seleccione de la barra de herramientas superior File > Save as.
- B. En el campo File name, ingrese el nombre del archivo, por ejemplo: Metodo_Espectro_600-450.
- C. En la lista Save as type, dé clic en Method file (*.smd), acto seguido clic en Save.

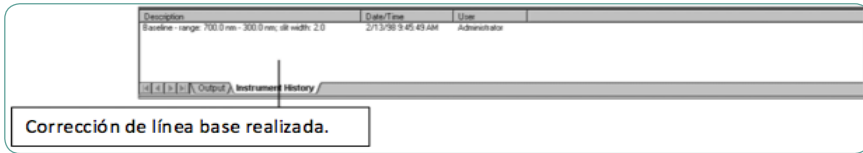
3.2.3 Corrección línea base

La corrección de la línea base se realiza sin celdas en el equipo, y en el rango de longitud de onda seleccionado afecta a todas las subsecuentes lecturas con el mismo rango. Si la corrección de línea base se realizó con el equipo operando en modo Stand Alone (Sección 4.2) no es necesario realizarla nuevamente usando el software. Si no ha realizado la corrección puede hacerla usando UV-Probe, como se indica a continuación:

- A. Seleccione Window>Spectrum para abrir el módulo Spectrum.
- B. Clic sobre Connect en la barra de herramientas inferior para conectar el software al UV-1800.
- C. Cuando los parámetros de la línea base aparezcan en el panel de método entre 700 como Start y 300 como End, modifíquelos de acuerdo al rango de longitud de onda de su interés. Dé clic en OK. Verifique la lectura en la ventana del espectrofotómetro.

- D. Cuando el scan ha finalizado, dé clic en la pestaña Instrument History y verifique que la corrección de línea base haya sido efectuada.

Figura 20. Ventana UVProbe de procesos.

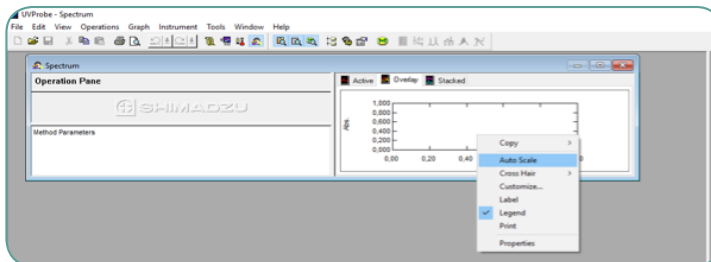


Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

3.2.4 Colección de datos para el espectro

- A. Para asegurar que toda la información colectada es visualizada en el gráfico, dé clic derecho con el mouse y seleccione Auto Scale.

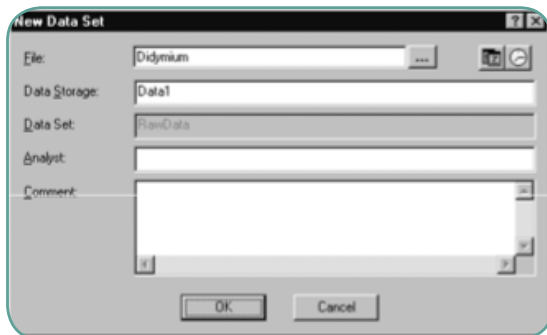
Figura 21. Menú configuración de escala UVProbe para modo espectro.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

- B. Dé clic en Start en la barra inferior. En el cuadro emergente New Data Set indique el nombre del espectro PE: Didymiun en el campo File y el nombre de la información de salida PE: Data 1, y dé clic en OK para iniciar la medición.

Figura 22. Ventana UVProbe almacenar método.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

3.2.5 Almacenamiento de la información

Para este punto del análisis la información ha sido colectada y nombrada, la información ha sido almacenada únicamente en la memoria; pero no ha sido almacenada en el disco. Si el software es cerrado en este momento la información se perderá. Para preservar la información es necesario guardar cada información en un archivo que incluirá: tabla de Peak Area, tabla de Point Pick, tabla de Peak Pick, información del método, resumen de la información e historial de la información.

- A. Seleccione File > Save as.
- B. Seleccione la ruta apropiada para el directorio en el campo superior de la ventana de diálogo.
- C. Ingrese el nombre del archivo, por ejemplo: Diymium.
- D. Seleccione .spc in la lista Save as type.
- E. Clic en Save.

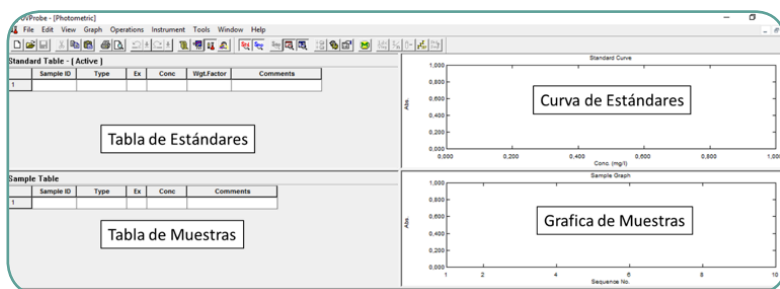
Para editar reportes y manipulación del espectro diríjase a la sección 5.3: generación de reportes.

3.3 Módulo photometric

El objetivo básico del módulo fotométrico es determinar la concentración de un analito en una muestra. Al realizar medidas de absorbancia (o transmitancia) de soluciones estándar de diferente concentración con el espectrofotómetro el software nos sirve de herramienta para la creación de una curva de calibración, la cual puede ser usada para calcular la concentración de muestras desconocidas, interpolando la relación matemática calculada.

El módulo incluye cuatro paneles importantes: tabla de estándares, curva de estándares, tabla de muestras, gráfica de muestras, cada panel tiene solamente una función a visualizar, con excepción de la tabla de muestras que incluye los estándares.

Figura 23. Esquema de ventanas UVProbe para método cuantitativo.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.


Para ingresar al módulo photometric  seleccione el ícono de la barra de herramientas superior:

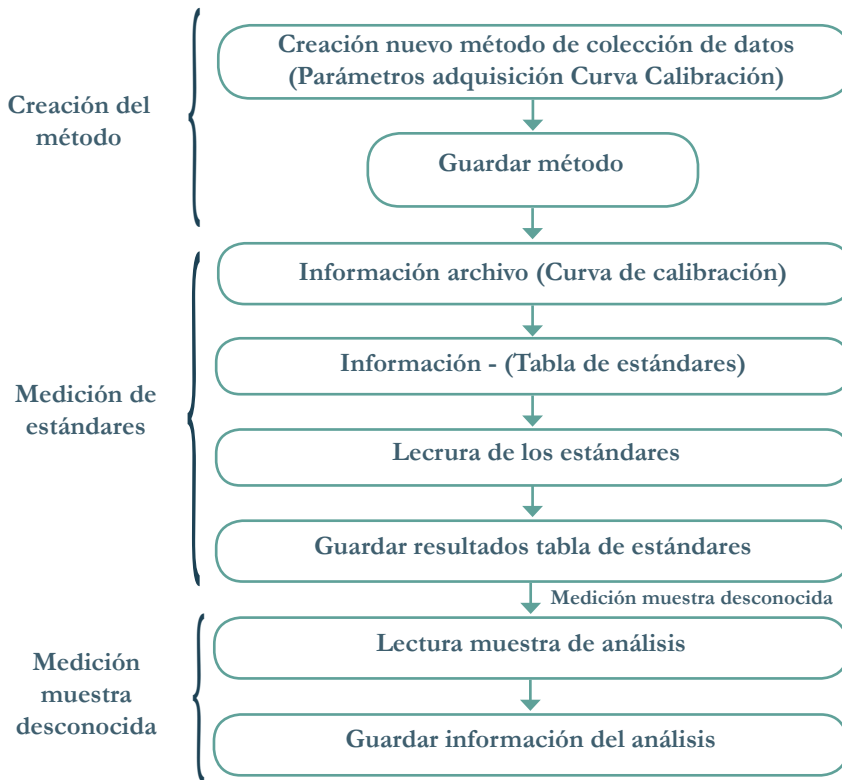
Figura 24. Barra de herramientas UBProbe principal para modo fotométrico.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

El procedimiento de creación de una curva de calibración y lectura de una o varias muestras desconocidas se esquematiza en el siguiente diagrama de flujo:

Figura 25. Diagrama procedimiento para adquisición en modo fotométrico en software UVProbe.



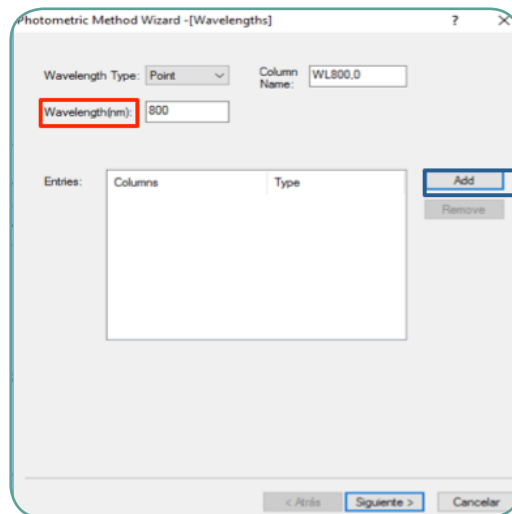
Fuente. Elaboración propia.

3.3.1 Creación nuevo método de colección de datos (parámetros adquisición curva calibración)

- A. En la barra de herramientas superior seleccione File > New.
- B. Seleccione Edit > Method. Se abrirá la ventana emergente Photometric Method Wizard.

- C. En el campo Wavelength (nm) ingrese la(s) longitud(es) de onda en las que desea realizar la(s) curvas de calibración; por ejemplo 530, para incluir esta longitud en las entradas (Entries) haga clic en el ícono Add. Comenzarán a aparecer las longitudes de onda en el recuadro Entries. Proceda con la segunda longitud de onda, por ejemplo 550 y dé clic en Add.

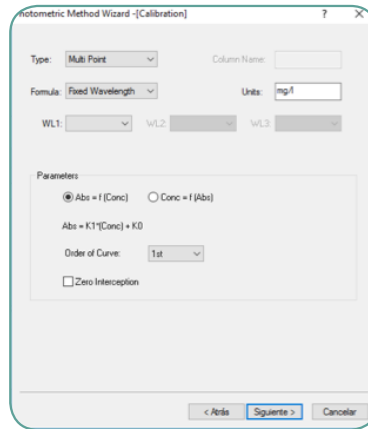
Figura 26. Ventana configuración parámetros del instrumento UVProbe en modo fotométrico.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

- D. Dé clic en Siguiente para configurar los parámetros que se describen a continuación:
- E. En el campo Type box, seleccione Multi Point para especificar que la curva de calibración será construida para dos puntos diferentes (530nm y 550nm según el ejemplo). Si se va a realizar la curva en una única longitud de onda seleccione Single Point.
- F. En el campo Formula seleccione Ratio.
- G. En el campo WL1 especifique la primera longitud de onda (por ejemplo 530) y en el campo WL2 la segunda (550). Si desea construir la curva en una única longitud de onda seleccione Single point. Y en Formula Fixed Wavelength.

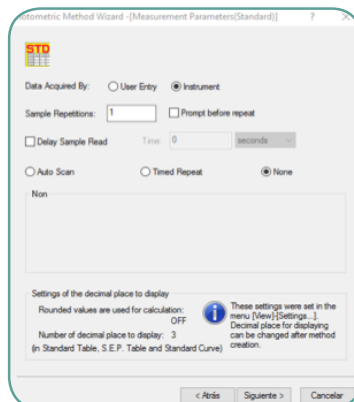
Figura 27. Ventana configuración parámetros para cuantificación UVProbe en modo fotométrico.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

- H. Verifique que en el campo Column Name sea Result. Para cada muestra que sea leída por el equipo, el resultado indicará la absorbancia leída a 530nm, dividido por la absorbancia leída a 550nm.
- I. En el campo Order Curve seleccione 1 para una relación matemática lineal de la curva de calibración. Dé clic en Siguiente. Encontrará esta ventana:

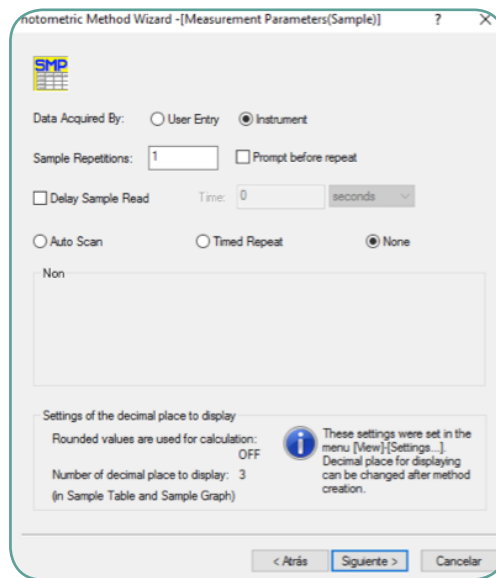
Figura 28. Ventana configuración parámetros de medición del estandar para cuantificación UVProbe en modo fotométrico.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

- J. Seleccione el método de adquisición en el campo Data Acquired by desde el equipo, escogiendo la opción Instrument. Dé clic en Siguiente.
- K. Aparecerá la ventana de parámetros de medición para muestras desconocidas, la cual se puede configurar. Elija el método de adquisición en el campo Data Acquired By desde el equipo, seleccione la opción Instrument. Dé clic en Siguiente.

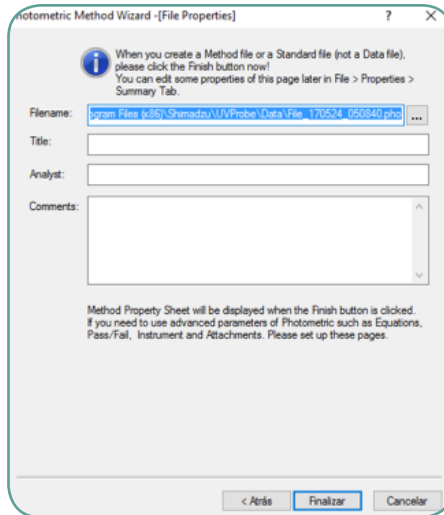
Figura 29. Ventana configuración parámetros de medición para la muestra en método de cuantificación UVProbe en modo fotométrico.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

- L. Una vez configurados los parámetros de medición, encontrará la ventana para configurar las propiedades del archivo para almacenamiento. En el campo Filename indique la ruta en la que el archivo del método y los resultados serán almacenados, por defecto es almacenado en la carpeta Data del archivo del software, el nombre del archivo corresponderá a la fecha_hora de adquisición. La extensión es .pho.
- M. Para terminar dé clic en Finalizar.

Figura 30. Ventana para almacenamiento de método cuantitativo en UVProbe.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

- N. Aparecerá una ventana emergente para especificar los parámetros de la medición fotométrica.
- O. Seleccione la pestaña Parameter tab.
- P. Seleccione la pestaña de Instrument Parameters.
- Q. Seleccione en el campo Measuring mode Absorbance.
- R. En el campo de Slit Width(nm) seleccione 2.0.
- S. Se recomienda dejar los demás parámetros por defecto.
- T. En la pestaña Wavelengths las longitudes de onda fueron las ingresadas, para el ejemplo WL530, WL550 y Result.
- U. Dé clic en Close.

Figura 31. Configuración de parámetros instrumentales método fotométrico para cuantificación.

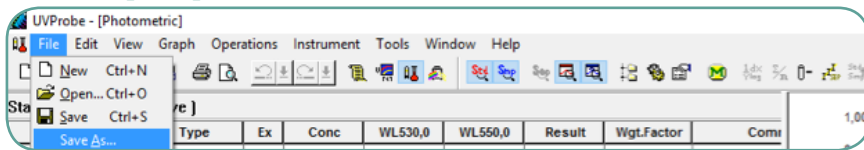


Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

3.3.2 Guardar método

Este paso es importante si a futuro se desea realizar una colección de datos usando el mismo método que acaba de configurar. Este archivo será almacenado con extensión *.pmd.

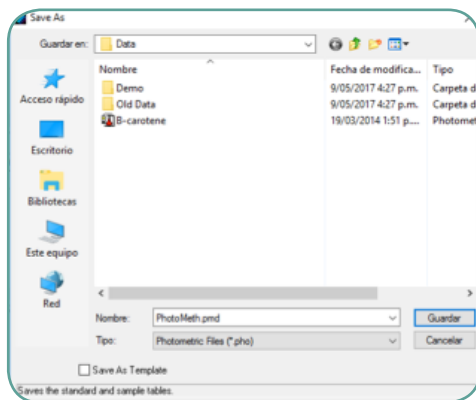
Figura 32. Menú emergente en File sobre la barra de herramientas principal UVProbe.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

- A. Seleccione File > Save As. Verifique la ruta de almacenamiento del archivo en el campo Data (directory) en la ventana de Save.
- B. En el campo File Name, ingrese el nombre el archivo, por ejemplo PhotoMeth.
- C. En el campo Save As Type, seleccione del listado desplegable Methods (*.pmd) y dé clic en Save.

Figura 33. Ventana para almacenamiento de archivo de configuración para el método cuantitativo creado en UVProbe.

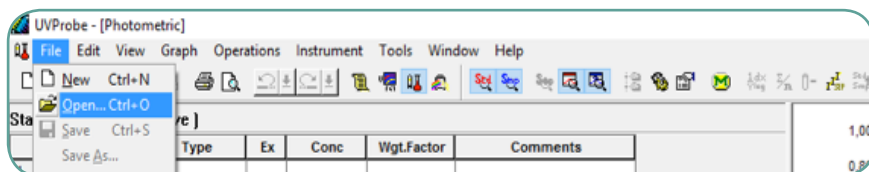


Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

3.3.3 Medición de estándares

La configuración de información como nombre de archivo para la realización de la adquisición. Si existe un método creado (*.pmf) puede llamarlo para la medición.

Figura 34. Menú emergente para abrir archivos creados sobre la barra de herramientas principal UVProbe.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

- A. Seleccione File > New para salir del método actual.
- B. Seleccione File > Open.
- C. Seleccione en el campo File Type > Measurement File (*.pmf= de doble click en el método que creó en el paso anterior PhotoMetric (o el que dese usar para su medición que haya sido creado con anticipación).
- D. Dé clic en Abrir.

Figura 35. Ventana para apertura de archivos UVProbe.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

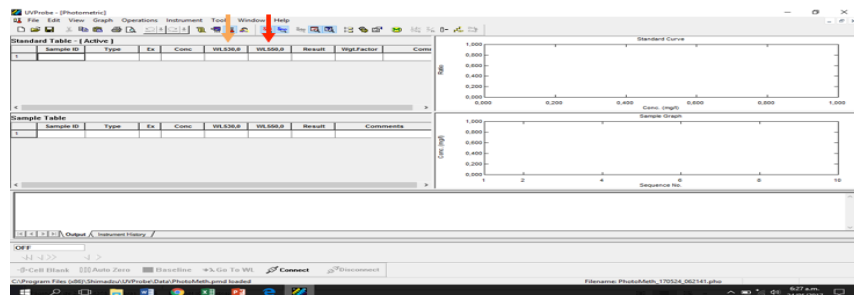
E. Aparecerá la ventana File Property. Ingrese en el campo File Name el nombre del archivo de adquisición de salida por ejemplo Photo 1.pho. puede ingresar Título del análisis comentarios en los campos indicados de esta ventana o puede saltar este paso. Y finalizar dando click en OK.

3.3.4 Información, tabla de estándares

Una tabla de estándares (Standard table) es una tabla de resultados (absorbancia, transmitancia, energía o reflectancia) adquiridos para concentraciones conocidas de un analito a una o varias longitudes de onda. Para el ejemplo de este manual serán los resultados a dos longitudes de onda: WL530 y WL550, la columna de resultados será adicionada a esta tabla una vez adquiridos los datos por el espectrofotómetro. Los ID (números de identificación de cada estándar) y valores de concentración pueden ser adicionados creando la Standard table.

A. De clic en cualquier lugar del panel de Standard Table de la pantalla.

Figura 36. Esquema de ventanas para inicio de adquisición en modo cuantitativo UV-Probe.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

B. Ingrese la siguiente información en las columnas Sample ID y Conc haciendo clic en cada casilla de la tabla con los valores de concentración de la siguiente tabla de ejemplo:

Tabla 2. Tabla ejemplo de concentraciones patrón para construcción curva de calibración y ventana de estándares en UVProbe.

Sample ID	Concentration
DyeA	0.0
DyeB	25.0
DyeC	50.0
DyeD	75.0
DyeE	100.0

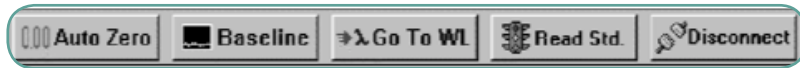
Standard Table-(Active)									
	Sam- ple ID	Type	Ex	Conc	WL 530,0	WL 550,0	Result	Wgt. Factor	Comm
1*	DyeA			0.000				1.000	
2	DyeB			25.000				1.000	
3	DyeC			50.000				1.000	
4	DyeD			75.000				1.000	
5	DyeE			100.000				1.000	
6									

Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

3.3.5 Lectura de los estándares

El espectrofotómetro puede ser usado para medir cada estándar. Sin embargo, UVProbe también puede ser usado para realizar la adquisición de datos para crear la curva.

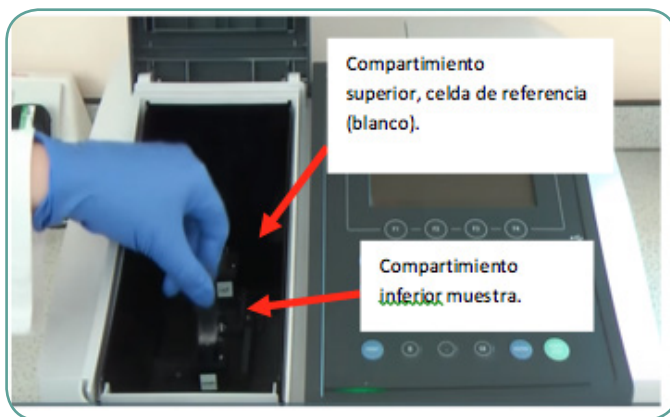
Figura 37. Barra inferior de acciones en UVProbe..



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

- A. Verifique que el espectrofotómetro está conectado a su PC, en la barra de herramientas inferior. Si está conectado los botones los observará activos y el último ícono de la derecha será Disconnect (imagen arriba). Si no, haga clic en Connect en la barra de herramientas inferior.
- B. Diligencia la celda de cuarzo con el primer estándar y ubíquela en el compartimiento inferior (muestra). Cierre la tapa superior para iniciar la lectura.

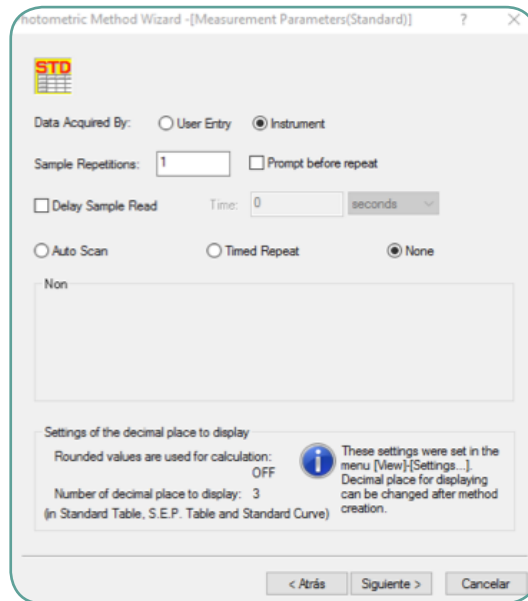
Figura 38. Compartimiento para ubicación de muestras en UV 1800.



Fuente. Adaptada de https://article.wn.com/view/2016/09/30/FY2015_Slavery_and_Human_Trafficking_Statement_Shimadzu_Corp/

- C. Dé clic en el ícono Read Std o presione la tecla F9.
- D. El resultado aparecerá en el panel de Standard table, en las columnas de WL530 y WL550 o en las columnas de las longitudes de onda que haya seleccionado para el análisis.
- E. Continúe la lectura en el espectrofotómetro de la misma forma, en orden para cada estándar, no olvide purgar la celda con la siguiente solución más concentrada antes de dejar la solución para lectura.
- F. Los datos de absorbancia pueden ser ingresados manualmente si en la ventana de creación del método cambia a entrada manual.

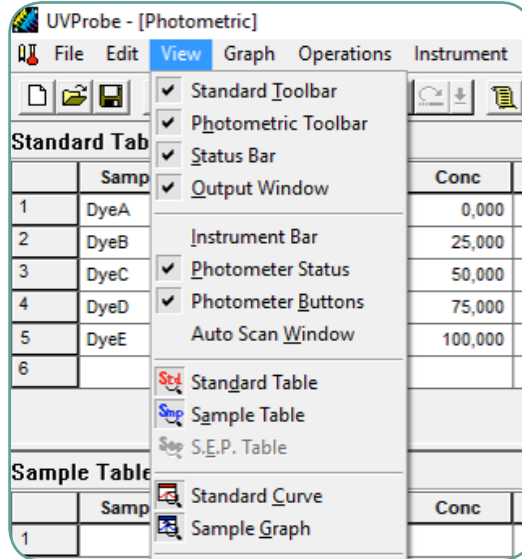
Figura 39. Ventana configuración de adquisiciones para estándar en modo cuantitativo UVProbe.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

- G. En la barra de herramientas superior seleccione View < Standard Curve para observar los datos adquiridos en la gráfica.

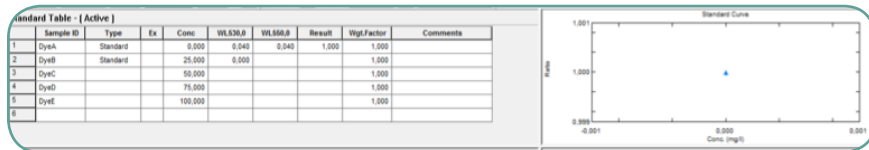
Figura 40. Menú emergente para visualizar de la barra de herramientas principal de UVProbe.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

H. A medida que se realizan las lecturas de cada estándar comenzará a visualizar el resultado en la tabla y en la gráfica, como se observa en la imagen abajo.

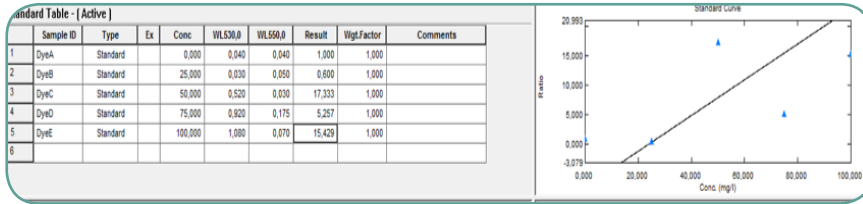
Figura 41. Esquema de ventanas durante adquisición del primer estándar en modo cuantitativo UVProbe.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014

I. Una vez termina la adquisición de los estándares obtendrá la tabla completa y la gráfica.

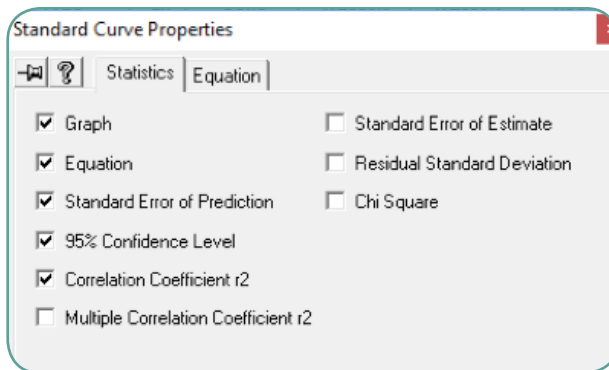
Figura 42. Esquema de ventanas durante adquisición de los tres primeros estándares en modo cuantitativo UVProbe.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014

- J. Para visualizar los parámetros estadísticos de la curva dé clic derecho con el mouse y seleccione Propiedades para obtener la ventana emergente Standard Curve Properties.

Figura 43. Ventana para configuración de estadísticas de las adquisiciones en modo cuantitativo UBProbe.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

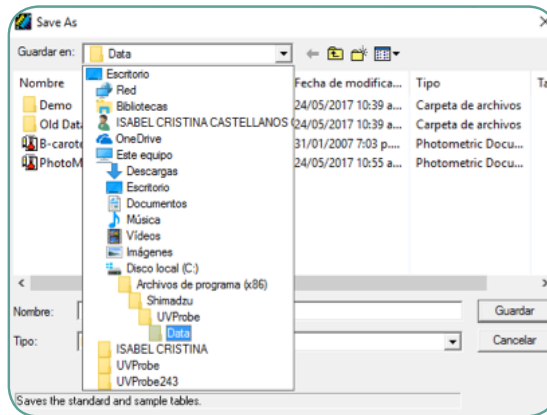
- K. Seleccione los parámetros estadísticos que desea visualizar dando clic en los recuadros.
- L. Dé clic en X para cerrar.
- M. Para cambiar el orden de la curva seleccione Edit > Method. Seleccione la pestaña Calibration en la ventana emergente y en el campo de Order for Curve seleccione 2.º o 3.º orden en busca del mejor ajuste matemático a los datos adquiridos.

3.3.6 Guardar resultados tabla de estándares

La tabla de estándares que acaba de crear puede ser almacenada para consultarla posteriormente.

- A. De la barra superior seleccione File > Save As. Verifique que la carpeta de destino sea el directorio Data (imagen) en el campo Guardar en.
- B. Ingrese el nombre del archivo, por ejemplo: Standardd1 en el campo Nombre.
- C. En el campo Tipo seleccione *.std.
- D. Dé clic en Guardar.

Figura 44. Ventana para almacenamiento en disco de los resultados adquiridos en modo cuantitativo UVProbe.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

3.3.7 Medición muestra desconocida

Para este momento se puede estimar la concentración de muestras desconocidas empleando la curva de calibración que se obtuvo. De la misma forma en que fue creada la tabla de estándares en el panel superior izquierdo de la pantalla, se realiza la creación de la tabla de muestras en el panel inferior izquierdo (Sample table).

A. Dé clic en cualquier lugar del panel Sample table, en la parte superior aparecerá el mensaje Active, como se observa en la imagen.

Tabla 3. Tabla de muestras en modo cuantitativo UVProbe.

sample Table - [Active]								
	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL530,0	WL550,0	Result	Comments
1								

Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

B. Digite los ID de las muestras a analizar (desconocidas), para incluir una nueva casilla dé Enter. Para el ejemplo de este manual digitaremos DyeF, DyeG, DyeH, DyeI, DyeJ. Se obtendrá el panel, como se muestra en la imagen.

Tabla 4. Tabla de muestras diligenciada en modo cuantitativo UVProbe.

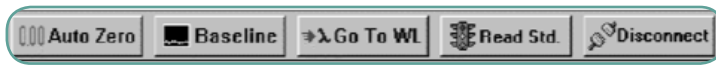
Standard Table-(Active)								
	Sam- ple ID	Type	Ex	Conc	WL 530,0	WL 550,0	Result	Comments
1*	DyeF							
2	DyeG							
3	DyeH							
4	DyeI							
5	DyeJ							

Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

C. Si no observa en la pantalla el panel de grafica de la muestra (Sample Curve), seleccione View de la barra de herramientas superior y simple Curve del menú desplegable (imagen a la derecha). En este panel podrá observar la concentración calculada desde la curva de calibración de sus muestras gráficamente.

D. Ahora puede iniciar la lectura de las soluciones desconocidas desde el espectrofotómetro o de igual forma que en la curva de calibración puede ingresar los datos manualmente en la tabla.

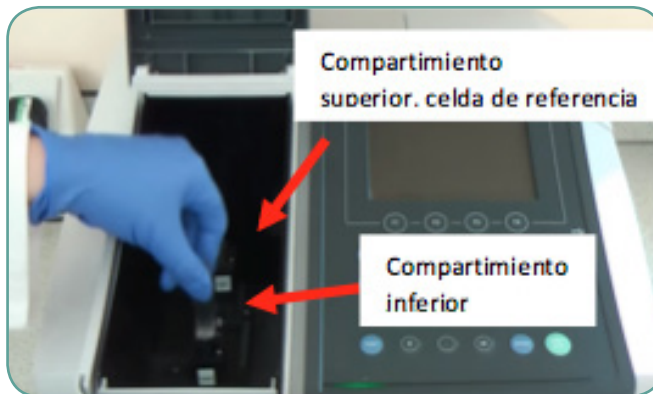
Figura 45. Barra inferior de acceso rápido a procesos UVProbe.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

- E. Verifique que el espectrofotómetro está conectado a su PC en la barra de herramientas inferior. Si está conectado los botones los observará activos y el último ícono de la derecha será Disconnect (imagen arriba). Si no, haga clic en Connect, en la barra de herramientas inferior.
- F. Diligencie la celda de cuarzo con el primer estándar, ubíquela en el compartimiento inferior (muestra). Cierre la tapa superior para iniciar la lectura.
- G. Dé clic en el ícono Read Std o presione la tecla F9.

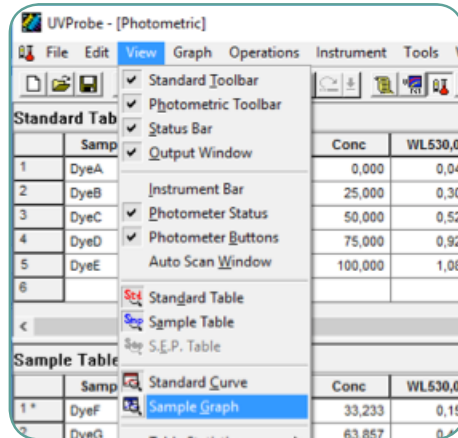
Figura 46. Imagen de compartimientos para muestras UV-1800.



Fuente. Adaptada de https://article.wn.com/view/2016/09/30/FY2015_Slavery_and_Human_Trafficking_Statement_Shimadzu_Corp/

- H. El resultado aparecerá en el panel de Standard table en las columnas de WL530 y WL550, o en las columnas de las longitudes de onda que haya seleccionado para el análisis.

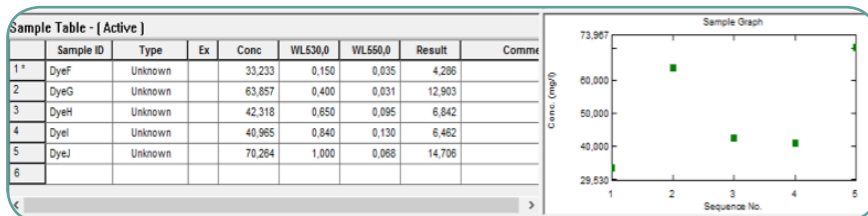
Figura 47. Menú emergente para ver de la barra de herramientas principal UV Probe. Graficar muestra en modo fotométrico.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014

- I. Continúe la lectura en el espectrofotómetro, de la misma forma en orden para cada estándar, no olvide purgar la celda con la siguiente solución más concentrada antes de dejar la solución para lectura.

Figura 48. Muestras en modo cuantitativo UVProbe terminada la adquisición.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

3.3.8 Guardar información del análisis

La información de las tablas de los estándares y de las muestras puede ser almacenada en el disco en este momento. Los archivos Photometric contienen las dos informaciones, tanto la información de los estándares como de las muestras.

- A. Seleccione File > Save.

3.4 Generación de reportes para impresión

3.4.1 Creación de formatos personalizados

El generador de reportes es una herramienta para dar formato a los resultados adquiridos, el usuario puede crear, dar formato, guardar e imprimir sus reportes, los cuales incluyen gráficas, texto, objetos insertados. Cuenta con un enlace a los diferentes módulos de UVProbe.


- A. Para iniciar el módulo de reportes es importante tener en UVProbe abierto el archivo de resultados o método que desea formatear en un reporte.
- B. En la barra superior seleccione el ícono 

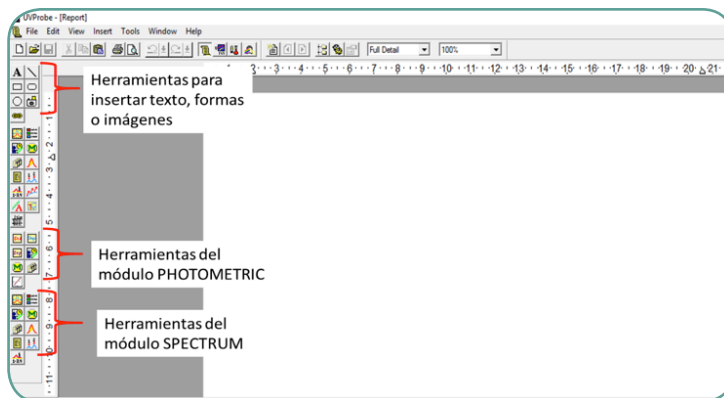
Figura 49. Barra de herramientas principal en modo fotométrico.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014

Obtendrá la ventana del generador de reportes (imagen abajo).

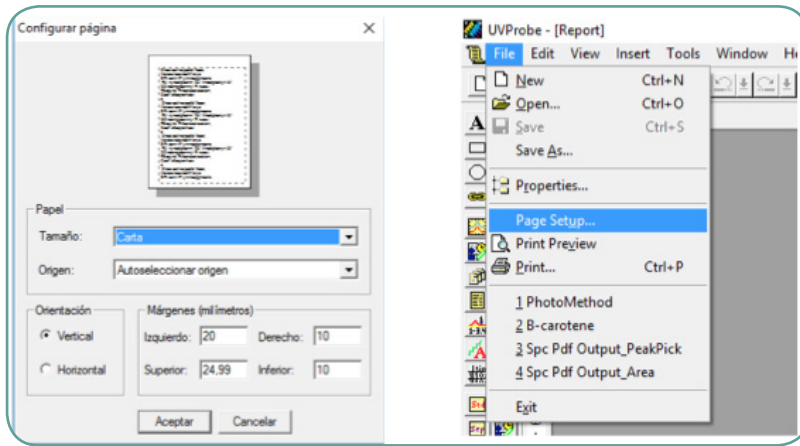
Figura 50. Ventana para edición y preparación de reportes de adquisición en UVProbe.



Fuente. Adaptado de Shimadzu U.-P. , 2014.

- C. Configure la página de su reporte, inicie configurando las márgenes, en la barra de herramientas superior File < Page Setup.
- D. Inmediatamente obtendrá la ventana emergente para configurar la página.

Figura 51. Ventanas de configuración para reportes en UVProbe.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

- E. En los campos izquierdo, derecho, superior e inferior digite las márgenes de su preferencia, por ejemplo 10.
- F. Con la barra de herramientas izquierda, de acuerdo al método usando para el análisis (Photometric o Spectrum), puede insertar la información por grupos para ajustar el formato. A continuación un ejemplo.
- G. Para la curva de calibración creada con el método Photometric iniciaremos con el gráfico de la curva.


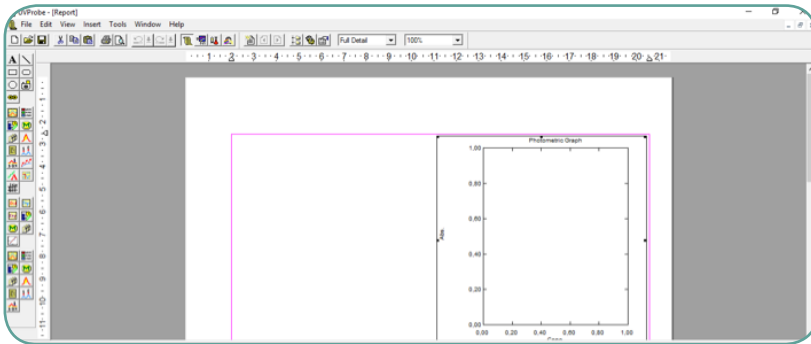
- H. Seleccione el ícono  que mostrará como recuadro blanco el espacio que ocupa el gráfico dentro del formato de reporte, el usuario debe, con la ayuda del mouse, ubicar la localización de este ítem.

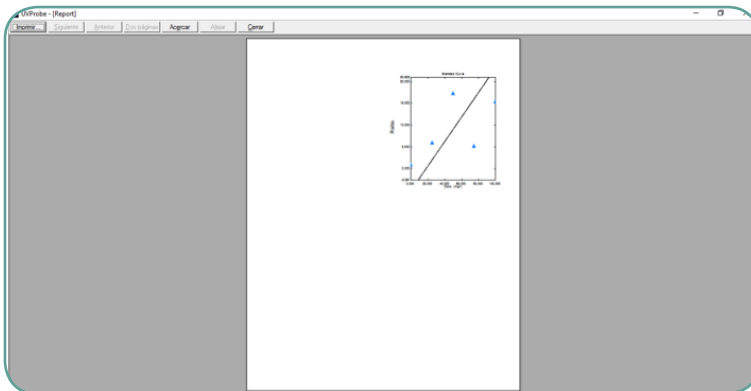
Figura 52. Configuración de reporte UVProbe.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

- I. Para visualizar el reporte dé clic en el ícono de la barra de herramientas superior. Inmediatamente tendrá una vista preliminar de su reporte, como lo muestra la imagen.

Figura 53. Vista previa reporte en UBProbe.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

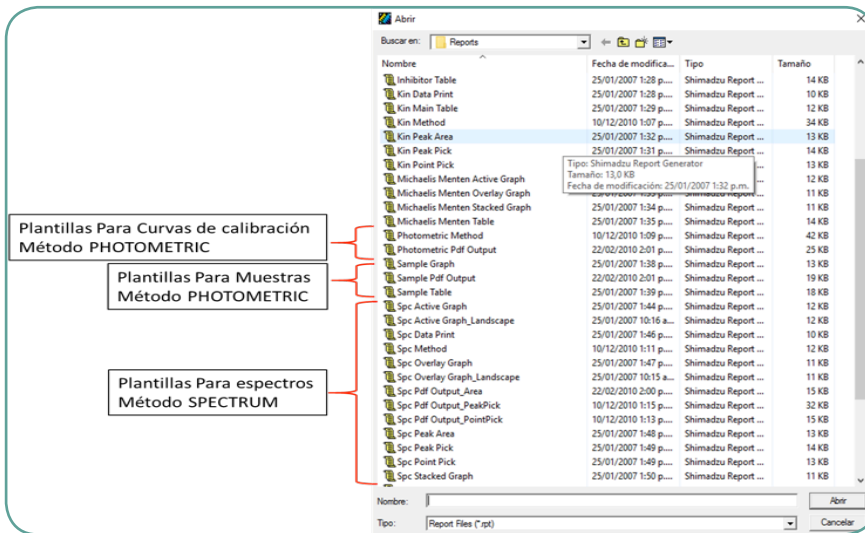
De esta forma el usuario continúa insertando los reportes del análisis que considere necesarios.

3.4.2 Generación de reportes usando plantillas predeterminadas

El software UVProbe cuenta con plantillas estándar para la presentación de reportes para ello siga el procedimiento básico que se describe a continuación:

- a. Desde la barra de herramientas seleccione File < Open. Inmediatamente visualizará en la ventana emergente (Abrir) el listado de plantillas disponibles. Seleccione la que desea usar teniendo en cuenta el método de análisis y la información que desea presentar en el reporte.

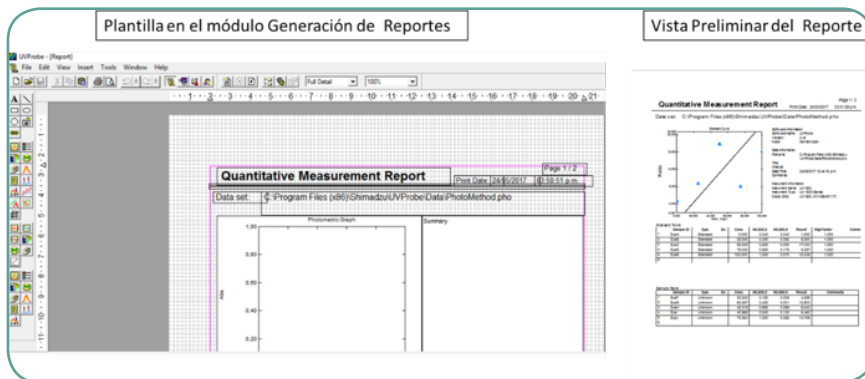
Figura 54. Ventana para abrir plantillas de reportes en UVProbe.



Fuente. Shimadzu U.-P. , 2014.

- b. Dé clic en el ícono Abrir. Observará en pantalla los recuadros que muestran el espacio de ocupación de cada campo. Para visualizar una vista preliminar de su reporte dé clic en el ícono de la barra de herramientas superior.

Figura 55. Esquema de ventanas de plantillas y vistas previas UBProbe.



Fuente. Shimadzu U.-P., 2014.

Aplicación espectroscopia UV-VIS

4.

La espectroscopia UV-VIS como técnica analítica ha estado en uso durante los últimos 35 años, durante este periodo se ha convertido en uno de los instrumentos analíticos en el día a día. En muchas aplicaciones se podrían emplear otras técnicas, pero ninguna compete con el UV-VIS por su simplicidad, versatilidad, velocidad, precisión y rentabilidad. Cuando consultamos el banco de información del Analytical Abstracts, encontramos alrededor de 40.000 coincidencias relacionadas con espectrofotometría UV-VIS. Los procedimientos involucran medidas directas de las especies que absorben la radiación, medidas derivadas por acoplamiento con diversas técnicas o procesos, como cromatografía, electroforesis u otros análisis de flujo.

Identificar la identidad de una sustancia, así como las sustancias están presentes en una mezcla es llamado análisis cualitativo, mientras que analizar la cantidad de estas sustancias en la mezcla es llamado análisis cuantitativo, ambos tipos de análisis son posibles en el equipo UV-1800.

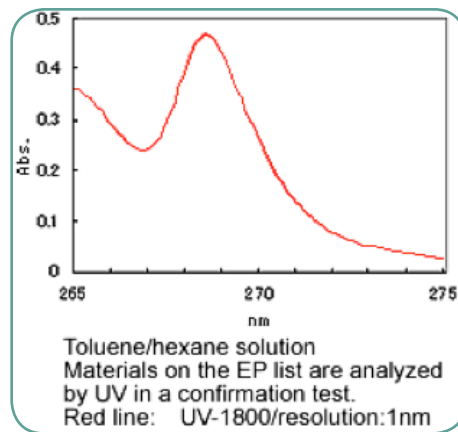
4.1 Análisis cualitativo (espectro y estructura química)

La absorbancia de luz en la zona del UV-VIS es determinada por un cromóforo (grupo funcional que absorbe luz como C=O, C=C, N=N, y N=O, que tienen múltiples enlaces) y un auxocromo (como -OH,

-NH₂, y -SH, con pares de electrones no enlazantes) de manera que depende de la estructura química de cada analito que mostrará un patrón específico en el espectro de absorción (es decir, la gráfica de la intensidad de absorción frente a la longitud de onda de la radiación incidente).

Para las longitudes de onda en el rango UV-VIS, podríamos esperar que el espectro de absorción de una molécula mostrara líneas agudas, ya que a una longitud de onda con la energía que coincide exactamente a la requerida para excitar un electrón hacia una transición electrónica es la única capaz de registrar absorción. No obstante, en la práctica se encuentra que el espectro UV-VIS de la mayoría de las moléculas consiste en unas cuantas curvas ensanchadas en vez de líneas agudas.

Figura 56. Espectro UV para el tolueno adquirido en UV-1800.



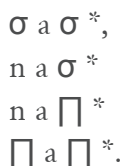
Fuente. <http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/spectro/uv/uv-1800.shtml>

Estas curvas nos muestran que la molécula está absorbiendo radiación sobre un rango de longitudes de onda, en razón a que la transición electrónica suele ir acompañada de un cambio simultáneo entre numerosos niveles vibratorios asociados, así como con un gran número de rotaciones. De esta manera, una transición consiste de un

componente electrónico, un elemento vibratorio más pequeño y un componente de rotación aún más pequeño. Esta última transición, la contribución rotacional, muestra su resultado en la banda ensanchada por su efecto de rellenar los vacíos (absorción en amplios rangos de longitud de onda).

En la transición de electrones de orbitales de estado fundamental tenemos tres tipos de orbitales que pueden estar relacionados: orbitales híbridos σ (enlaces sencillos), orbitales híbridos π (enlaces dobles) n (no enlazantes) y los orbitales del estado excitado σ^* y π^* .

Una transición en la que un electrón de unión se excita a un orbital σ antienlazado se denomina transición de σ a σ^* . En el mismo orden π a π^* representa la transición de un electrón. Así, las siguientes transiciones electrónicas pueden ocurrir por la absorción de la luz ultravioleta y visible:



La figura 56 ilustra el patrón general de los niveles de energía, y el hecho de que las transiciones son provocadas por la absorción de diferentes cantidades de energía.

4.1.1 Compuestos saturados

Las transiciones σ a σ^* y n a σ^* requieren una gran cantidad de energía, por lo tanto ocurren en la región ultravioleta lejano o débilmente en la región 180-240nm. En consecuencia, los grupos saturados no exhiben una fuerte absorción en la región ultravioleta.

Las transiciones a orbitales π^* que ocurren en la región ultravioleta para una molécula saturada particular, tienen lugar en la región visible si se modifica la estructura molecular. Muchos compuestos inorgánicos en solución también muestran absorción en la región visible. Estas incluyen sales de elementos con capas internas incompletas de electrones (principalmente metales de transición), cuyos iones están complejados por hidratación, por ejemplo, $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O}_4)]^{2+}$. Tales absorciones surgen de un proceso de transferencia de carga, donde los electrones se mueven de una parte del sistema a otro por la energía proporcionada por la luz visible.

4.1.2 Compuestos poliinsaturados, o dobles enlaces conjugados (cromóforos)

Las transiciones de π a π^* , cuando ocurren en grupos aislados en una molécula, dan lugar a una absorción de luz bastante baja. Sin embargo, la conjugación de grupos insaturados en una molécula produce un efecto notable sobre el espectro de absorción. La longitud de onda de la absorción máxima se mueve a una longitud de onda más larga y la intensidad de absorción a menudo puede aumentar. Los sistemas aromáticos, que contienen electrones en orbitales p, absorben fuertemente en el ultravioleta.

En general, cuanto mayor es la longitud de un sistema conjugado en una molécula, más cerca está el λ_{max} de la región visible. Así, la energía característica de una transición y, por lo tanto, la longitud de onda de absorción, es una propiedad de un grupo de átomos más bien que los electrones mismos. De esta forma es posible identificar

el grupo cromóforo presente en un analito basado en el análisis del espectro de absorción (tabla ϵ máx).

Tabla 5. Absorciones de los principales grupos cromóforos UV-VIS.

Cromóforo	Solvente	λ_{max} (nm)	ϵ máx	Tipo de transición
Alqueno	n-Heptano	177	13000	$\pi-\pi^*$
Alquino	n-Heptano	178	10000	$\pi-\pi^*$
		196	2000	
		225	160	
Carbonilo (Cetona)	n-Heptano	186	1000	$n-\sigma^*$
		280	16	$n-\pi^*$
Carbonilo (Aldehído)	n-Heptano	180	Elevada	$n-\sigma^*$
		293	12	$n-\pi^*$
Carboxilo	n-Heptano	204	41	$n-\pi^*$
C-X	Hexano	205	200	$n-\sigma^*$
		255	360	
-OH	Agua	180	316	$n-\sigma^*$
Amida	Agua	214	60	$n-\pi^*$
Azo	Etanol	339	5	$n-\pi^*$
Nitro	Isooctanol	280	22	$n-\pi^*$
Nitroso	Etileter	300	100	$n-\pi^*$
		665	20	
Nitrato	Dioxano	270	12	$n-\pi^*$

Fuente. Elaborada a partir de Kumar (2006) y Jang (2017).

Es importante anotar la importancia del solvente sobre el espectro resultante, ya que la absorbancia en intensidad y longitud de onda puede cambiar con la introducción de solventes o diferentes compuestos en una mezcla. Estos cambios pueden generar cuatro efectos diferentes: el cambio del pico de absorbancia hacia longitudes de onda más grandes es llamado movimiento batocrómico; el cambio

hacia a longitudes de onda más pequeños es llamado “movimiento hipsocrómico”; la disminución en la intensidad de la absorbancia se conoce como “movimiento hipocrómico”; el aumento se conoce como “movimiento hipocrómico”.

Tabla 6. Disolventes comúnmente utilizados y sus longitudes de onda de máxima absorción.

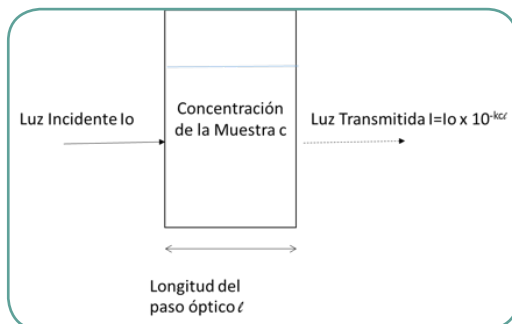
Solvente	Cut-off (nm)
Iso-octano	202
Alcohol etílico	205
Ciclohexano	200
Acetona	325
Tetracloroetileno	290
Benceno	280
Tetracloruro de carbono	265
Cloroformo	245
Éter etílico	220
Alcohol isopropílico	210
Alcohol metílico	210

Fuente. Elaborada a partir de Kumar (2006) y Jang (2017).

4.2 Análisis cuantitativo (curvas de calibración)

El equipo UV-1800 tiene su mayor aplicación en el análisis cuantitativo de analitos o también conocido como análisis colorimétricos. La ley que es principio de este análisis cuantitativo es la ley de Lambert-Beer, que tiene su base matemática en la medida de absorción de radiación de muestras en solución.

Figura 57. Esquema paso de luz a través de la muestra en la celda.



Fuente. Elaboración propia.

En términos de absorbancia, la expresión matemática es $A = \log(I_0/I) = k \times c \times l$. Donde A es absorbancia, I_0 es la intensidad de la radiación monocromática que incide en la muestra e I la intensidad de la radiación que emerge de la muestra.

La absorbancia (A) es una característica específica que depende de la intensidad incidente, la longitud del paso óptico y la concentración del analito. Cuando tomamos la longitud del paso óptico como 1cm y la concentración como 1mol/L, obtenemos la constante ϵ , que se conoce como coeficiente de absortividad molar un valor único y específico de cada compuesto bajo condiciones específicas (I_0 , c y l).

El método cuantitativo para medir la concentración de una muestra de concentración desconocida desde la absorción de una muestra de concentración conocida puede ser realizada usando los siguientes dos métodos:

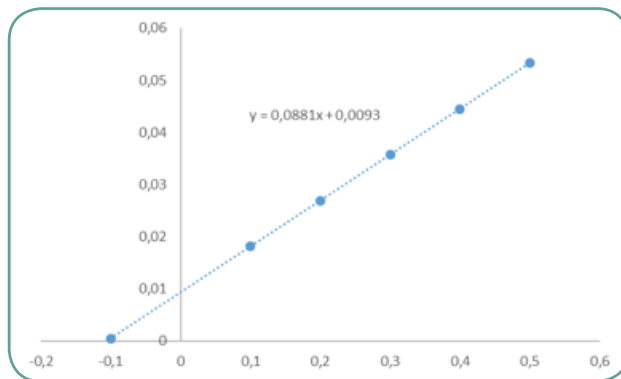
- ♦ Curva de calibración
- ♦ Adición de estándar

En el método de la curva de calibración se preparan estándares de concentración conocida, a los cuales se les realiza la medición de absorbancia. Una curva de calibración es construida usando la

absorbancia obtenida en el eje vertical y la concentración de los estándares en el eje horizontal, cuando el resultado no muestra una relación lineal comúnmente es por la presencia de partículas en suspensión que actúan como cuerpos oscuros y desvían el comportamiento descrito por la ley de Lambert Beer. Cuando se usa una solución blanca la curva de calibración debe pasar por el origen, no obstante, si un blanco no es medido, es posible que la curva no pase por el origen, para la determinación de la concentración de las muestras desconocidas los resultados se obtienen por interpolación desde la curva de calibración.

En el método de adición de estándar, a una muestra estándar es adicionada por etapas a cuatro o más muestras de la muestra a medir. De manera similar al método de la curva de calibración una relación matemática entre la absorbancia y la concentración es construida. La concentración del componente objetivo en la muestra desconocida es extraída de la gráfica tomando el punto de corte de la curva con el eje vertical (Y). Este método es aplicado solamente cuando se tienen rangos bajos de concentración.

Figura 58. Curva de calibración ejemplo en el método de adición de estándar.



Fuente. Elaboración propia.

Una curva de calibración es generalmente recta, sin embargo, puede curvarse debido a varias razones:

- ♦ Un daño en el circuito de medida.
- ♦ Fluorescencia en la muestra.
- ♦ Linealidad de la luz incidente.
- ♦ Amplitud de la banda.
- ♦ Determinación de la cuantificación, no en un pico de absorción sino en un hombro de la banda.

Primero, de manera inherente a cada equipo existe la deriva inmediatamente y es encendido el equipo, por ello es aconsejable iniciar las mediciones 30 minutos después de encender el equipo para evitar este tipo de desviaciones.

Segundo, cuando una muestra emite luz fluorescente y esta llega al detector, la absorbancia puede parecer menor y la cantidad de fluorescencia incrementa con la concentración de la muestra. Como resultado, la curva de calibración puede curvarse hacia el extremo inferior. Si esto ocurre, es necesario reducir la influencia de la luz fluorescente tanto como sea posible, incrementando la distancia entre la muestra y el detector o insertando un enmascarante entre la muestra y el detector.

Tercero, la luz lineal es el total de la luz de una longitud de onda desviada desde un cierto espectro, con una configuración específica del monocromador, y la emitida desde este, pero la luz que no es transmitida desde la fuente hacia la muestra pasa por un lado de la muestra y genera un error en la medición, para la corrección de este error que toma importancia en muestras con altos valores de absorbancia $> 0,8$, puede usar la siguiente tabla. Tabla tomada del manual UV-1800. Para minimizar este error se sugiere la instalación de un doble monocromador.

Tabla 7. % pérdida de luz incidente.


% Pérdida de luz	Absorbancia								
	0.8	1.0	1.2	1.5	1.8	2.0	2b.5	3.0	4.0
1	0.0222	0.0370	0.0595	0.1150	0.2081	0.2967	0.6150	1.0370	2.0000
0.5	0.0133	0.0190	0.0309	0.0615	0.1169	0.1739	0.4096	0.7759	1.7059
0.2	0.0045	0.0077	0.0126	0.0257	0.0507	0.0783	0.2119	0.4762	1.3213
0.1	0.0022	0.0038	0.0063	0.0130	0.0261	0.0409	0.1188	0.3005	1.0409
0.05	0.0011	0.0019	0.0032	0.0065	0.0132	0.0209	0.0635	0.1758	0.7799
0.02	0.0004	0.0007	0.0012	0.0026	0.0053	0.0085	0.0365	0.0790	0.4770
0.01	0.0002	0.0003	0.0006	0.0013	0.0026	0.0042	0.0134	0.0413	0.3009
0.005	0.0001	0.0001	0.0003	0.0006	0.0013	0.0021	0.0067	0.0211	0.1791
0.002	0.0000	0.0000	0.0001	0.0003	0.0005	0.0008	0.0027	0.0085	0.0791
0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0002	0.0004	0.0013	0.0043	0.0413
0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0004	0.0043

Fuente. Tomado de SHIMATDZU.UV-Prove, 2013.

Cuarto, una lámpara de halógeno o una lámpara de deuterio es usada como fuente de luz del espectrómetro, en razón a que estas lámparas emiten un espectro continuo, es un aspecto que toma importancia en razón que el coeficiente de absortividad difiere con pequeños cambios en la longitud de onda, de esta forma el ancho de banda de medición influye en el valor del coeficiente de absortividad entre mayor es el ancho mayor variación se introduce en la medición, para minimizar el efecto es suficiente con configurar un ancho de banda de 1/8 a 1/10 de la mitad de la banda de absorbancia.

Referencias

- Gilbert, J.C., & Martín, S.F. (2011). *Experimental organic chemistry: A miniscale and microscale approach*. Boston, Mass.: Brooks/Cole Cengage Learning.
- Jang, Y. H. (5 de 12 de 2017). mirrored from UCLA. Obtenido de mirrored from UCLA: <http://www.wag.caltech.edu/home/jang/genchem/infrared.htm>
- Kumar, S. (2006). *Spectroscopy of Organic Compounds* . En S. Kumar, *Spectroscopy of Organic Compounds* (págs. 8-12). Amritsar, India: http://www.uobabylon.edu.iq/eprints/publication_11_8282_250.pdf.
- Shimadzu. (2014). *Shimadzu Spectrophotometer UV-1800*. Columbia, Maryland, USA: Shimadzu.
- Shimadzu, U.-P. (2014). *UV-Probe Shimadzu*. Columbia, Maryland, USA: Shimadzu.
- LabCommerce, I. (5 de 12 de 2017). *LabCommerce, Inc.* Obtenido de LabCommerce, Inc.: <https://www.labcommerce.co>



Aplicaciones y generalidades de un espectrofotómetro de UV-VIS UV-1800 de Shimadzu

El Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad EAN cuenta con un equipo de espectrofotometría UV-VIS UV-1800 de la casa comercial Shimadzu de doble haz, para el análisis de una gran variedad de analitos de origen tanto orgánico (compuestos orgánicos conjugados) como inorgánico (iones metálicos de transición), que tienen absorción de radiación en estas longitudes de onda, desde el UV lejano al infrarrojo en el rango de 120nm y 1100nm.

El espectrofotómetro UV-1800 permite realizar la caracterización de compuestos (acercamiento a la identificación de grupos funcionales) y un análisis cuantitativo de cromóforos con una sensibilidad de ppm para estar a la vanguardia de la tecnología y del conocimiento investigativo en lo que a técnicas de análisis instrumental se refiere.