

MANUAL DE ANÁLISIS QUÍMICO E INSTRUMENTAL

Análisis Instrumental TOMO 3



ÍNDICE GENERAL

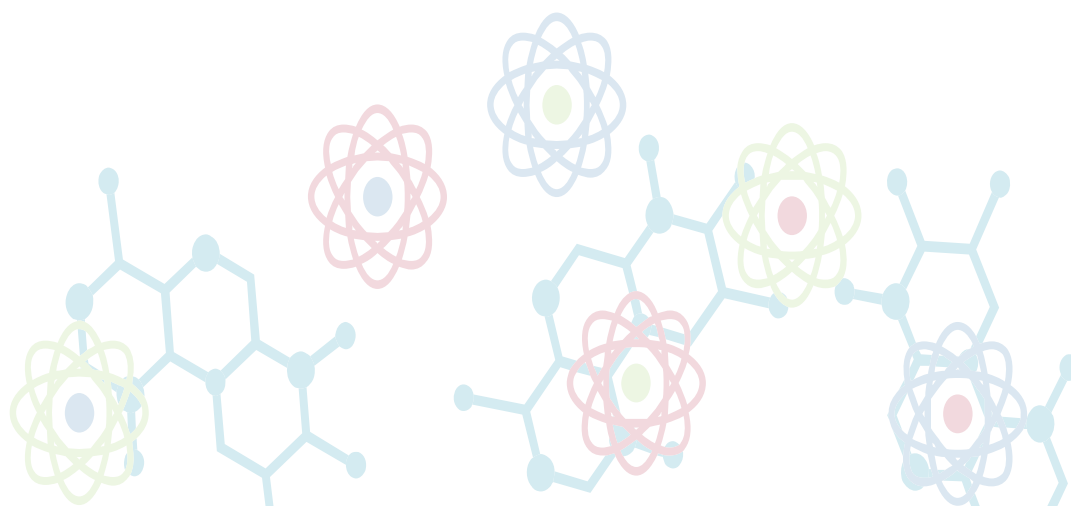
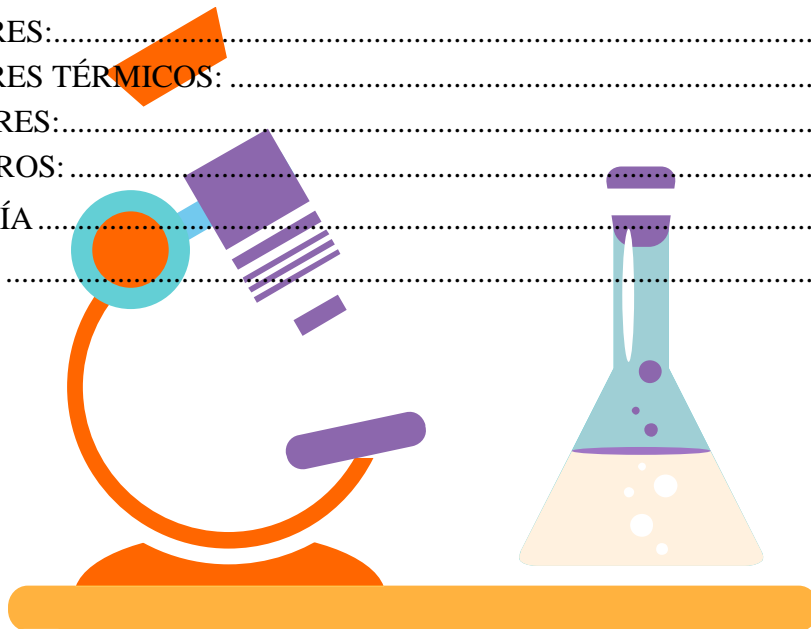
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN: TÉCNICAS ANALÍTICAS INSTRUMENTALES	10
TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.....	11
TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS.....	11
TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	12
TÉCNICAS DIVERSAS.....	12
TÉCNICAS CONJUNTADAS O ACOPLADAS.....	12
OBJETIVO GENERAL.....	13
NORMAS GENERALES DE LABORATORIO.....	14
CAPÍTULO I.....	16
CROMATOGRAFÍA.....	16
INTRODUCCIÓN.....	17
HISTORIA DE LA CROMATOGRAFÍA.....	18
¿QUÉ ES LA CROMATOGRAFÍA?.....	21
TIPOS DE CROMATOGRAFÍA.....	23
CROMATOGRAFÍA EN PAPEL.....	24
CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	24
CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.....	26
POR EXCLUSIÓN MOLECULAR.....	26
POR INTERCAMBIO IÓNICO.....	27
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.....	27
CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	28
CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.....	29
ETAPAS EN LA REALIZACIÓN DE UNA CROMATOGRAFÍA.....	30
CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.....	30
CROMATOGRAFÍA PLANA (PAPEL O CAPA FINA).....	30
RECOGIDA DEL EFLUENTE.....	30
DETECCIÓN.....	30
NORMAS ESTANDARIZADAS QUE SIGUE LA TECNICA (NORMA ASTM).....	31
NORMA WK33788.....	31
NORMA ASTM D7493.....	31
NORMA D1945 DE ASTM.....	31
NORMA D6581-08.....	31
NORMA ASTM D5580 – 15.....	31
NORMA D7065-06.....	32

APLICACIONES DE LA CROMOFOTOGRAFÍA.....	32
ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS EN LAS BEBIDAS:	32
FLAVONOIDES Y FENOLES:.....	32
LÍPIDOS:.....	32
CATEQUINAS DEL TÉ:.....	32
TRIGLICERIDOS:.....	32
INSTRUMENTACIÓN EN LA CROMATOGRAFÍA GAS-LÍQUIDO	33
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	34
DESAFÍOS TÍPICOS.....	35
TÉCNICAS PARA CONSEGUIR UNA PREPARACIÓN DE MUESTRAS SENCILLA, EFICAZ Y REPRODUCIBLE.....	35
PREPARACIÓN PRECISA DE MUESTRAS EN TODAS LAS OCASIONES.....	36
ANÁLISIS DE SALIDA DE RESULTADO.....	37
CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.....	37
ANÁLISIS DE SALIDA POR DESARROLLO.....	37
ANÁLISIS SALIDA POR ELUCIÓN (CROMATOGRAFÍA DE ELOCIÓN).....	37
COMPONENTES DEL CROMATÓFRAGO	39
PARTES	39
EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPCL)	39
EQUIPO DE CROMATOLOGÍA LÍQUIDA (LC)	40
EQUIPO DE CROMATOLOGIA DE GAS	41
TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS	42
CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN.....	42
CROMATOGRAFÍA DE REPARTO.....	42
CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN	42
CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO	43
TÉCNICAS ESPECIALES	44
CROMATOGRAFÍA CON FASE INVERTIDA	44
CROMATOGRAFÍA CON FASE NORMAL.....	44
ANÁLISIS ISOCRÁTICO	44
ELUCIÓN CON GRADIENTE	45
ELUCIÓN EN ETAPAS O ESCALONADA	45
CROMATOGRAFÍA BIDIMENSIONAL.....	45
TÉCNICAS CROMATOGRAFICAS NO INSTRUMENTALES	45
CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.....	45
CAPÍTULO II.....	47

ESPECTROFOTOMETRÍA	47
INTRODUCCIÓN	48
HISTORIA DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA	49
¿QUE ES ESPECTROFOTOMETRÍA?	50
LEYES APLICADAS A LA TÉCNICA	51
LEY DE LAMBERT	51
LEY DE BEER	52
NORMAS ESTANDARIZADAS	53
ESPECTROFOTÓMETRO NTC 3885	53
NORMA TÉCNICA NTC COLOMBIANA 4124-3	53
TIPOS DE ESPECTROFOTOMETROS	54
ESPECTROFOTÓMETRO DE HAZ SIMPLE:	54
ESPECTROFOTÓMETRO DE DOBLE HAZ EN EL ESPACIO:	54
ESPECTROFOTÓMETRO DE HAZ DOBLE EN EL TIEMPO:	55
ESPECTROFOTOMETRO DE ABSORCION ATOMICA :	55
ESPECTROFOTOMETRO DE ABSORCION MOLECULAR :	55
ESPECTROFOTOMETRO DE SMART MINI:	56
APLICACIONES DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA	56
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	58
COMPONENTES DEL ESPECTROFOTÓMETRO	58
PARTES DEL ESPECTROFOTÓMETRO	59
CONTROLES E INDICADORES	60
CONEXIÓN Y CALIBRACIÓN AUTOMÁTICA DEL EQUIPO	61
COMPONENTES INTERNOS DEL ESPECTROFOTÓMETRO	62
FUENTES:	62
LÁMPARA DE DEUTERIO E HIDRÓGENO:	63
LÁMPARA DE FILAMENTO DE TUNGSTENO:	63
LÁMPARA DE ARCO DE XENÓN:	63
SELECTORES DE LA LONGITUD DE ONDA:	63
FILTROS DE ABSORCIÓN:	64
FILTROS DE INTERFERENCIA:	64
EL MONOCROMADOR:	64
EL COLIMADOR:	65
DIRECTOR:	65
CAPÍTULO III	66
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR)	66
INTRODUCCIÓN	67

HISTORIA DE LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	68
¿QUÉ ES ESPECTROSCOPIA INFRARROJA?	71
CARACTERÍSTICAS INDESEABLES.....	72
FUNDAMENTOS	72
TRANSMISIÓN	72
REFLEXIÓN:.....	72
TIPOS DE ESPECTROSCOPIA	74
LA ESPECTROSCOPIA ATÓMICA	74
LA ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE	74
LA ESPECTROSCOPIA DE RAYOS X.....	74
LA ESPECTROSCOPIA DE PLASMA	74
LA ESPECTROSCOPIA RAMAN:.....	74
LA ESPECTROSCOPIA DE MASAS.....	74
LA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA:.....	75
LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	75
TIPOS DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.....	75
ESPECTROSCOPIA DEL INFRARROJO LEJANO	75
ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO MEDIO	75
ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO.....	76
NORMAS QUE RIGEN LA TÉCNICA	76
LA ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN LÁSER CON DIODOS SINTONIZABLES	76
NTC-IEC 60666. DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN DE ADITIVOS ESPECÍFICOS EN ACEITES MINERALES AISLANTES	77
NORMA ASTM E2719.....	77
APLICACIONES DE LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.....	78
INDUSTRIA FARMACÉUTICA	78
CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN:	78
INDUSTRIA ALIMENTARIA:.....	79
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	80
PREPARACIÓN DE MUESTRAS LÍQUIDAS.....	81
PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS.....	81
PASTILLAS:.....	81
SUSPENSIONES:.....	82
LÁMINAS DELGADAS DE POLÍMEROS:	82
PREPARACIÓN DE MUESTRAS GASEOSAS	82
ANÁLISIS DE SALIDA DE RESULTADOS.....	83
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	83
COMPONENTES DE LOS INSTRUMENTOS IR.....	84

FUENTES:.....	84
LA FUENTE GLOBALAR.-.....	85
EL EMISOR DE NERNST.-.....	85
MONOCROMADORES.-.....	85
DETECTORES:.....	85
DETECTORES TÉRMICOS:.....	86
TERMOPARES:.....	86
BOLÓMETROS:.....	86
BIBLIOGRAFÍA.....	87
WEBGRAFIA.....	87



MANUAL DE ANÁLISIS QUÍMICO E INSTRUMENTAL – FUNDAMENTOS DE ANÁLISIS QUÍMICO

Instituto Universitario de la Paz – UNIPAZ

Editorial: Instituto Universitario de la Paz – UNIPAZ

Representante legal: Oscar Orlando Porras Atencia

Página web: www.unipaz.edu.co

ISBN:

OSCAR ORLANDO PORRAS ATENCIA
Rector Instituto Universitario de la Paz

MÓNICA MARÍA PACHECO VALDERRAMA
Directora de Escuela de Ingeniería Agroindustrial

Ing. MSc. YULEISI TATIANA CABALLERO HERNÁNDEZ

Ing. MSc. SANDRA ROCÍO PATIÑO VILLAMIZAR

Ing. Esp. ALEXANDER DÍAZ CAMARGO

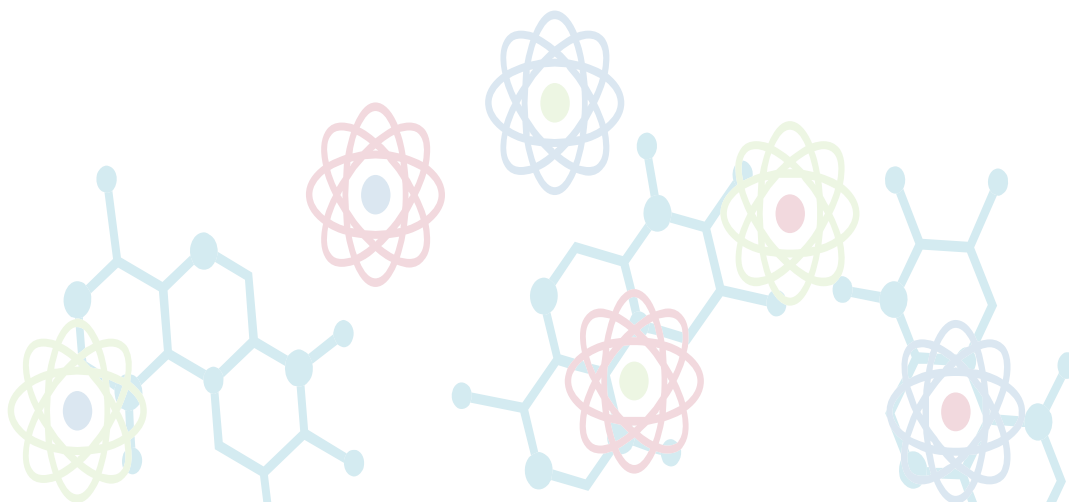
Ing. PhD. HÉCTOR LEANDRO OTÁLVARO MARÍN

Autores

Ing. Esp. ALEXANDER DÍAZ CAMARGO

Diseño e ilustración

Barrancabermeja, 2018.



PRÓLOGO

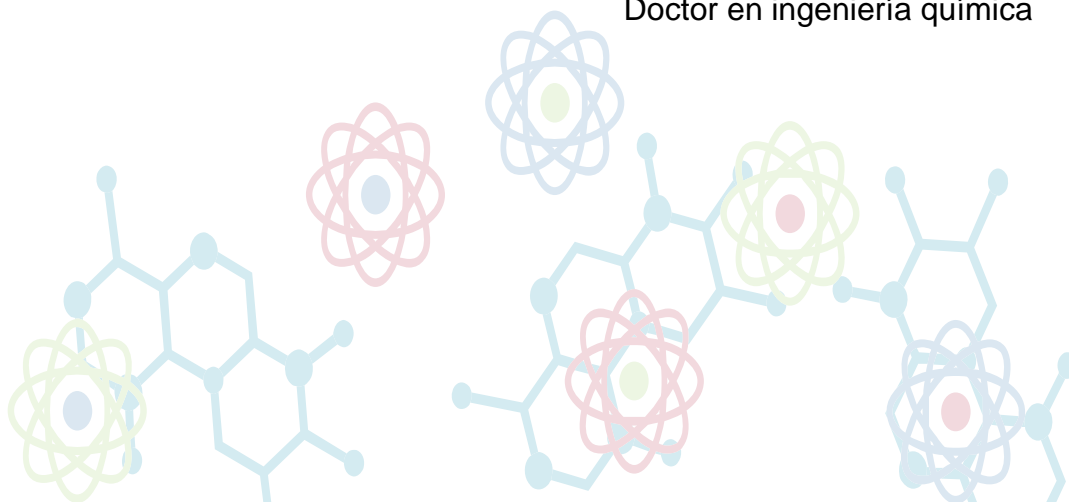
La Escuela de Ingeniería Agroindustrial y en especial el Grupo de Investigación en Innovación, Desarrollo Tecnológico y Competitividad en Sistemas de Producción Agroindustrial GIADAI del Instituto Universitario de la Paz – UNIPAZ han enfocado sus esfuerzos para que las personas que requieran trabajar en el laboratorio, estudiantes, docentes e investigadores y demás personal, tengan en sus manos una herramienta que les permita entender y comprender las normas de seguridad y comportamiento en el laboratorio.

Esta obra hace parte del MANUAL DE ANÁLISIS QUÍMICO E INSTRUMENTAL compuesta por tres tomos. Este primer tomo está dedicado de forma exclusiva a condiciones de trabajo seguro dentro del laboratorio. Cuenta con dos prácticas que conducirá a familiarizarse con conceptos y aspectos fundamentales dentro del laboratorio.

La metodología empleada y fundamentada en el presente manual no requiere que el lector tenga experiencia previa. De hecho, este tomo permite de manera sencilla, pero al mismo tiempo científica y validable, que el practicante en laboratorio adquiera conocimientos en normas de seguridad, riesgos del laboratorio, así como implementos de protección personal que más tarde podrá aplicar en prácticas relacionadas con investigación científica. De igual manera, servirá al lector como material de consulta permanente.

Después de leer esta obra el lector adquirirá conocimientos y habilidades para desarrollar su trabajo de forma más segura, y eficiente en el laboratorio.

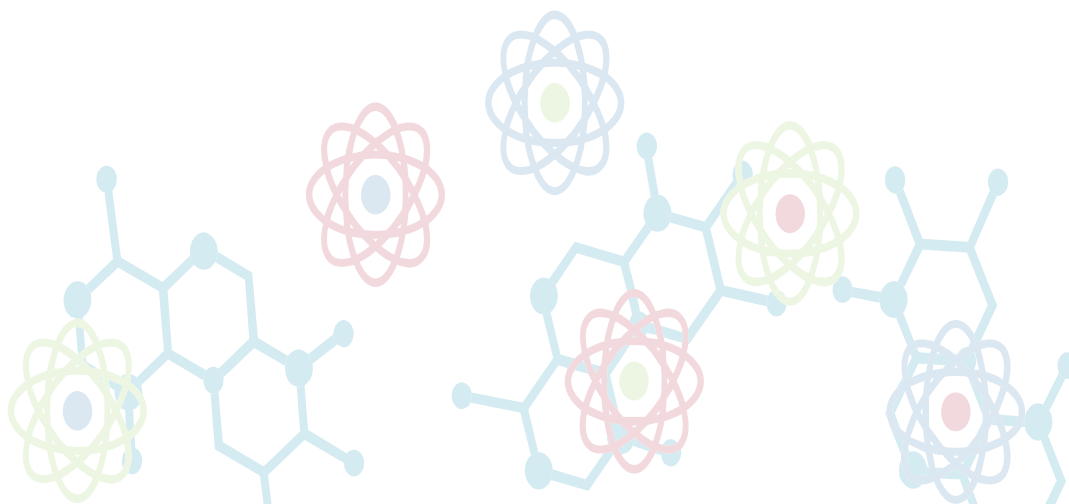
HÉCTOR LEANDRO OTÁLVARO MARÍN
Doctor en ingeniería química



RESUMEN

El uso de la instrumentación es una parte atractiva y fascinante del análisis químico que interacciona con todas las áreas de la química y con muchos otros campos de la ciencia pura y aplicada. Los análisis de suelos marcianos, de los líquidos biológicos de caballos de carreras y de atletas olímpicos, del aceite para los motores de aeronaves comerciales y militares, y aún del Sudario de Turín, son ejemplos de problemas que requieren técnicas instrumentales. A menudo es necesario usar varias técnicas de esa clase a fin de obtener la información requerida para resolver un problema de análisis. La instrumentación analítica juega un papel importante en la producción y en la evaluación de nuevos productos y en la protección de los consumidores y del medio ambiente. Esta instrumentación proporciona los límites de detección más bajos requeridos para asegurar que se disponga de alimentos, medicinas, agua y aire no contaminados. La fabricación de materiales cuya composición debe conocerse con precisión, como las sustancias empleadas en los chips o pastillas de los circuitos integrados, se controla con instrumentos analíticos. La amplia inspección de cantidades de muestra que se ha hecho posible por la instrumentación automatizada, frecuentemente libera al analista de las tediosas tareas relacionadas - en un principio - con el análisis químico. Entonces el analista puede estar libre para examinar los componentes del sistema analítico, como los métodos de muestreo, el procesamiento de datos y la evaluación de los resultados.

El objetivo de esta investigación consiste en la adquisición de un mayor conocimiento acerca de las técnicas analíticas instrumentales enfocada principalmente en Cromatografía, Espectrofotometría y Espectroscopia infrarroja llevándonos a la identificación de equipos, técnicas y características implementadas en cada uno de estos y así obteniendo mayor información para futuras aplicaciones ingenieriles.

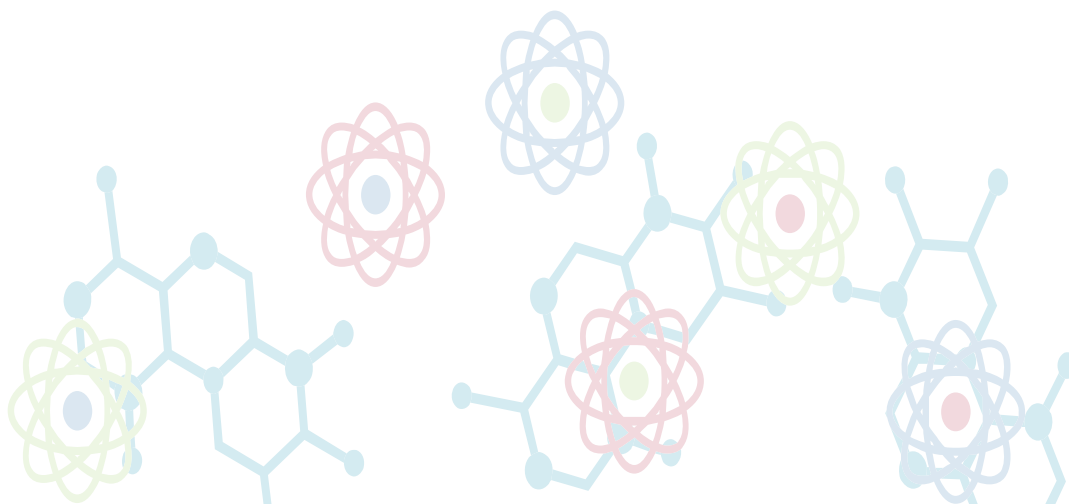


INTRODUCCIÓN: TÉCNICAS ANALÍTICAS INSTRUMENTALES

El uso de la instrumentación es una parte atractiva y fascinante del análisis químico que interacciona con todas las áreas de la química y con muchos otros campos de la ciencia pura y aplicada. Los análisis de suelos marcianos, de los líquidos biológicos de caballos de carreras y de atletas olímpicos, del aceite para los motores de aeronaves comerciales y militares, y aún del Sudario de Turín, son ejemplos de problemas que requieren técnicas instrumentales. A menudo es necesario usar varias técnicas de esa clase a fin de obtener la información requerida para resolver un problema de análisis.

La instrumentación analítica juega un papel importante en la producción y en la evaluación de nuevos productos y en la protección de los consumidores y del medio ambiente. Esta instrumentación proporciona los límites de detección más bajos requeridos para asegurar que se disponga de alimentos, medicinas, agua y aire no contaminados.

La fabricación de materiales cuya composición debe conocerse con precisión, como las sustancias empleadas en los chips o pastillas de los circuitos integrados, se controla con instrumentos analíticos. La amplia inspección de cantidades de muestra que se ha hecho posible por la instrumentación automatizada, frecuentemente libera al analista de las tediosas tareas relacionadas - en un principio - con el análisis químico. Entonces el analista puede estar libre para examinar los componentes del sistema analítico, como los métodos de muestreo, el procesamiento de datos y la evaluación de los resultados.



CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS INSTRUMENTALES

La mayoría de las técnicas instrumentales quedan en una de las tres áreas principales: espectroscopía, electroquímica y cromatografía. Aunque varias técnicas importantes (incluyendo la espectrometría de masas y el análisis térmico) no se ajustan convenientemente a estas clasificaciones, las tres áreas proporcionan la base de un estudio sistemático de la instrumentación química. Los avances en la química y en la tecnología están haciendo posibles nuevas técnicas y extendiendo el uso de las ya existentes. La espectroscopía fotoacústica es un ejemplo de técnica analítica en ciernes. Algunas de las técnicas existentes se han combinado para extender la utilidad de los métodos componentes. Ejemplos de métodos acoplados o conjuntados exitosamente (que se indican con siglas unidas con guión) son los de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y el de plasma con acoplamiento inductivo espectrometría de masas (ICP-MS). La aplicación de la capacidad de las computadoras a los instrumentos analíticos ha llevado al uso extenso de métodos como la transformada de Fourier para producir las nuevas técnicas: espectroscopías de infrarrojo según la transformada de Fourier (FTIR), y de resonancia magnética nuclear de pulsos (de carbono 13).

El analista debe estar al tanto de las funciones que realiza(n) la(s) computadora(s). En un método analítico dado. Estas funciones pueden ir desde la captura de los datos hasta el control para el manejo de los sistemas de datos de laboratorio. Aunque actualmente pocos químicos analíticos desarrollan programas y diseñan equipo de computación, deben comprender los conceptos fundamentales tanto del equipo (hardware) como de los programas computacionales (software).

Principales tipos de instrumentación química:

Técnicas espectroscópicas

- Espectrofotometría de visible y ultravioleta
- Espectrofotometría de fluorescencia y fosforescencia
- Espectrometría atómica (emisión y absorción)
- Espectrofotometría de infrarrojo Espectroscopía raman
- Espectroscopía de rayos X
- Técnicas radioquímicas, incluyendo el análisis por activación
- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear
- Espectroscopía de resonancia de espín electrónico (o de resonancia paramagnética electrónica)

Técnicas electroquímicas

- Potenciometría (electrodos de pH y selectivos de iones)
- Voltamperometría

- Técnicas voltamperométricas
- Técnicas de redisolución
- Técnicas amperométricas Coulombimetría Electrogravimetría
- Técnicas de conductancia

Técnicas cromatográficas

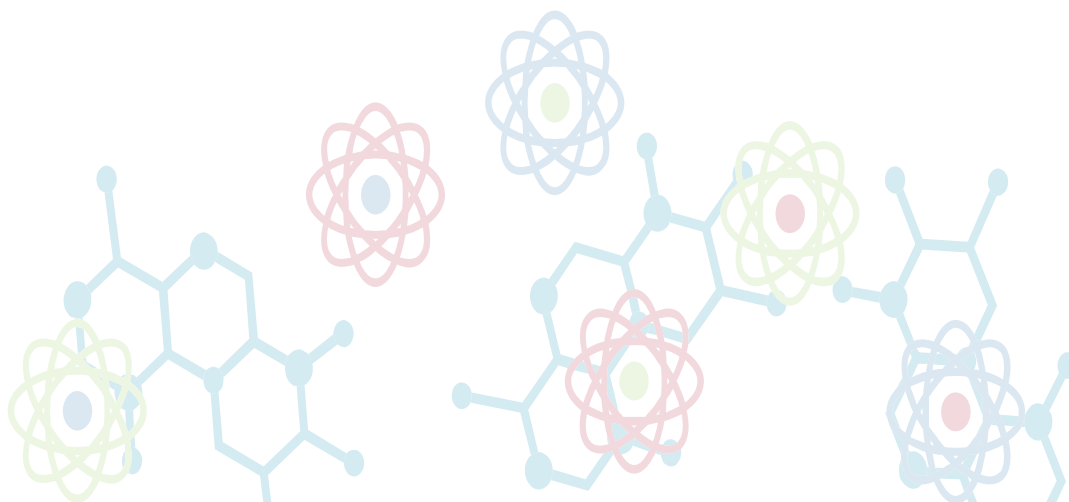
- Cromatografía de gases
- Técnicas de cromatografía líquida de alta resolución

Técnicas diversas

- Análisis térmico Espectrometría de masas
- Técnicas cinéticas

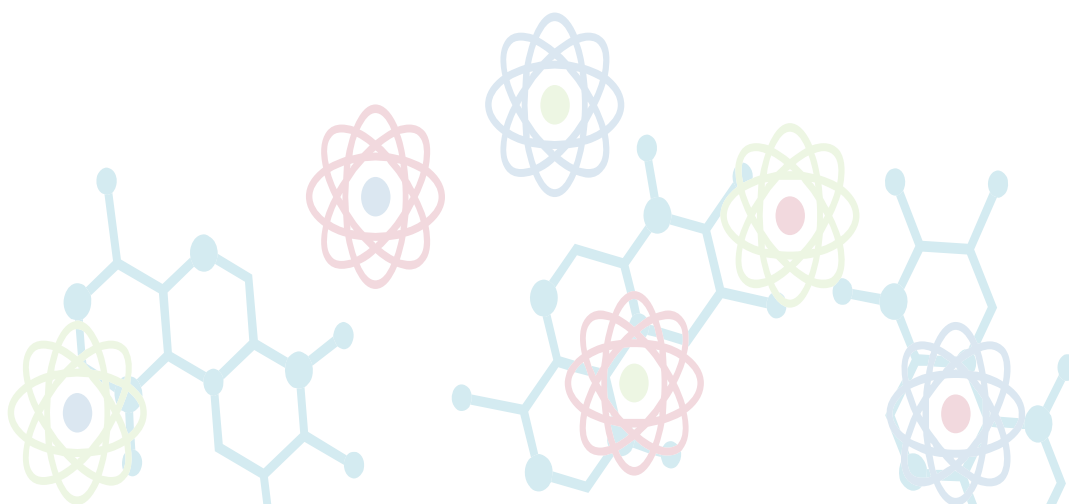
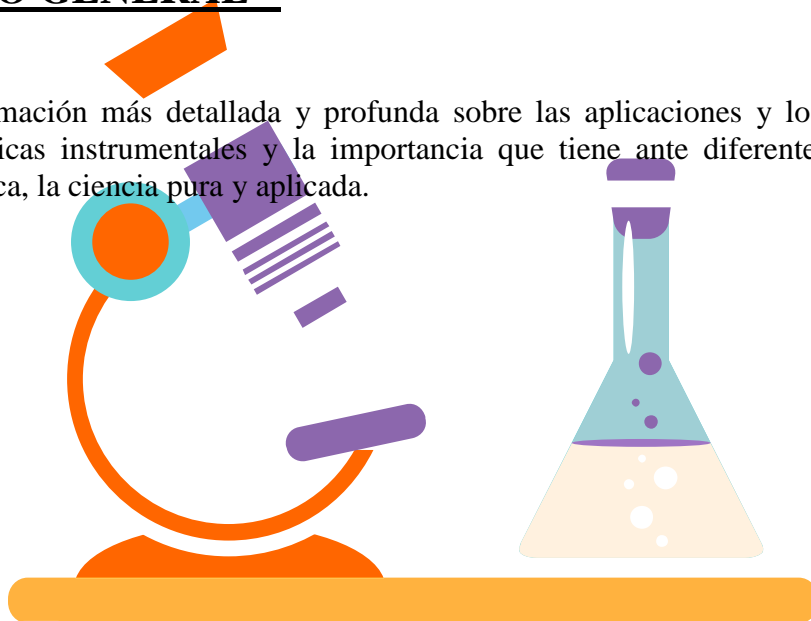
Técnicas conjuntadas o acopladas

- (GC-MS) (cromatografía de gases -espectrometría de masas)
- (ICP-NIS) (plasma con acoplamiento inductivo-espectrometría de masas)
- (GC-IR) (cromatografía de gases -espectrometría de infrarrojo)
- (MS-MS) (espectrometría de masas-espectrometría de masas)



OBJETIVO GENERAL

Adquirir información más detallada y profunda sobre las aplicaciones y los tipos de técnicas analíticas instrumentales y la importancia que tiene ante diferentes campos como la química, la ciencia pura y aplicada.



NORMAS GENERALES DE LABORATORIO

Lo que debes saber antes de iniciar el trabajo en el laboratorio.

El laboratorio debe ser un lugar seguro para trabajar, los accidentes pueden originarse por negligencia en la prevención, descuidos, bromas o por circunstancias fuera de control. Para garantizar seguridad en el laboratorio se deberán tener siempre presentes los posibles peligros asociados al trabajo con reactivos químicos y conocer las medidas de seguridad que se aplican a estos lugares de trabajo.

¿Qué es la Seguridad?

Es un conjunto de medidas técnicas, educacionales, médicas y psicológicas empleadas para prevenir accidentes, tendientes a eliminar las condiciones inseguras del ambiente y a instruir o convencer a las personas acerca de la necesidad de implementar prácticas preventivas.

El alumno estará obligado a utilizar el llamado Equipo de Protección Personal (EPP) y seguir al pie de la letra las indicaciones dadas por el profesor acerca de cómo preparar reactivos y como llevar a cabo la práctica. El EPP se refiere a los objetos diseñados para proteger a los alumnos y al profesor durante su estancia en el laboratorio, éstos son de uso personal y podrán variar según lo requiera la práctica a realizar.

Descripción y Uso

Los accesorios de uso común en los laboratorios de química son bata, lentes de seguridad, guantes de diferentes materiales, mascarilla y zapatos apropiados (cerrados). Las características de estos accesorios personales de seguridad se indican a continuación:

Bata. Debe ser de algodón, de manga larga, 1 ó 2 tallas más grande de la talla habitual que usa el alumno y debe contar con todos los botones para mantenerla cerrada.



Guantes. Los hay de diferentes materiales, de látex o neopreno para el trabajo habitual de laboratorio, de asbesto para sujetar objetos calientes y de neopreno para manejo de ácidos.



Zapato. Se recomienda usar zapato cerrado, de suela antiderrapante. La zapatilla de tacón alto, las sandalias y en general los zapatos abiertos no se consideran adecuados para trabajo de laboratorio.

Otras recomendaciones. Traer el cabello recogido, evitar el uso de anillos, pulseras y gorras, y en el caso de las mujeres, las uñas largas no son apropiadas para el trabajo de laboratorio y no se recomienda el uso de medias.

Normas generales de trabajo:

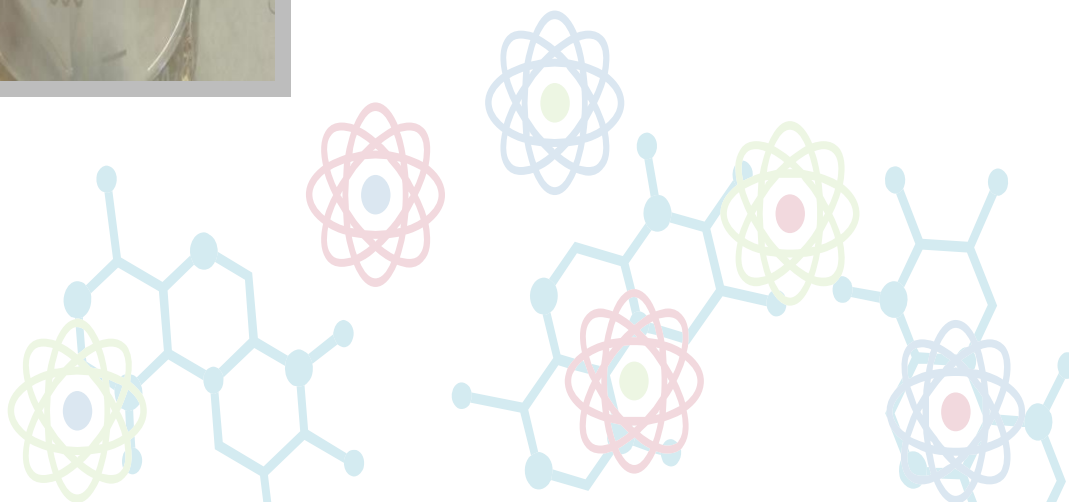
- ✓ El uso del Equipo de protección personal es obligatorio.
- ✓ Nunca trabaje solo, procure realizar su actividad cuando al menos otra persona esté trabajando en el laboratorio.
- ✓ Queda estrictamente prohibido comer, beber, almacenar alimentos, correr, fumar, maquillarse o manipular lentes de contacto en el laboratorio, aun cuando no se estén realizando prácticas.
- ✓ Mantenga su área de trabajo limpia y ordenada. No deben colocarse libros, abrigos y mochilas sobre las mesas de trabajo. Se deberá verificar que la mesa esté limpia al comenzar y al terminar el trabajo realizado.
- ✓ Los alumnos y docentes deben estar familiarizados con los elementos de seguridad disponible, salida de emergencia, extintores, regaderas y ubicación de botiquines.

- ✓ Toda herida o quemadura, aún los pequeños cortes, que se produzcan durante una práctica deben ser informados obligatoriamente al docente y deberán ser tratadas inmediatamente.
- ✓ En el caso de salpicaduras de ácidos sobre la piel lavar inmediatamente con agua abundante, teniendo en cuenta que en el caso de ácidos concentrados la reacción con el agua puede producir calor. Es conveniente retirar la ropa de la zona afectada para evitar que el corrosivo quede atrapado entre ésta y la piel.



CAPÍTULO I

CROMATOGRAFÍA

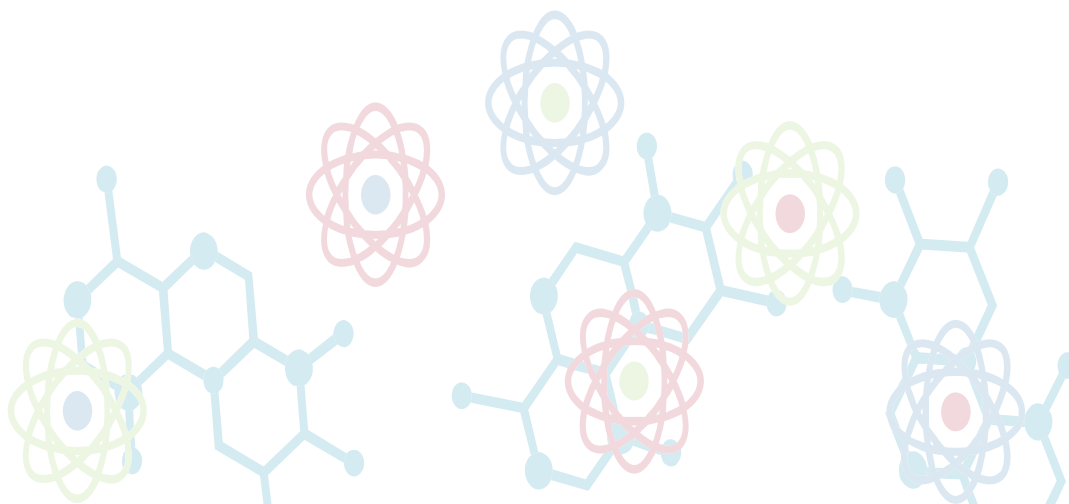


INTRODUCCIÓN

La cromatografía analítica se utiliza sistemáticamente en la industria y en el ámbito académico para separación, cuantificación e identificación de compuestos químicos o biológicos. Hay diferentes tipos en uso, incluyendo gas, líquido, papel y la cromatografía de gel permeable. Este proceso puede llegar a ser muy útiles especialmente con mezclas complejas .

La técnica cromatográfica es muy útil en una variedad de campos incluyendo ciencias puras, aplicadas, medicina forense y atletismo entre otros. El proceso se basa en el hecho de que diferentes moléculas se comportan de manera diferente cuando se disuelven con un solvente y se movan a través de un medio absorbente .

Un ejemplo muy simple es el caso del que se presenta con una marca de tinta en un pedazo de papel. El papel podría ser sumergido en agua, la acción capilar del agua hará que se disperse a través del papel. A medida que la tinta se mueve sus ingredientes se separarán, revelando un patrón distintivo que podría ser utilizado para determinar los componentes de la tinta .



HISTORIA DE LA CROMATOGRAFÍA

La cromatografía, como indica su nombre (proviene del griego χρῶμα chrōma y γράφω gráphō, que significan respectivamente "color" y "escribir, registrar", literalmente "escritura de color", o mejor "registro de color") , fue empleada originalmente con sustancias coloreadas.

Ya en 1850, Runge describió la formación de zonas coloreadas cuando se depositaban gotas de sustancias colorantes sobre papel secante, pero el desarrollo más importante vino con los experimentos de Mijaíl Tsvet[1] (1872-1919), que empleó por primera vez en 1906 el término "cromatografía". A comienzos del año 1903, Mijaíl Tsvet, botánico ruso, logró separar una mezcla de pigmentos de plantas (clorofilas) en una columna de carbonato de calcio. Más tarde, en 1910, cromatografió un extracto de yema de huevo en una columna de inulina. Sus investigaciones, sin embargo, no fueron utilizadas por otros investigadores hasta 1931. Esta demora quizá se debió al hecho de que los trabajos de Tsvet fueron publicados en ruso y en una revista que no tenía amplia circulación.

El rápido desarrollo de la cromatografía como herramienta analítica sensible no ocurrió hasta 1931, cuando Kuhn, con Lederer y con Winterstein, empleó la técnica para el análisis de pigmentos de plantas, confirmando los primeros trabajos de Tsvet y su predicción de que el caroteno no era una sola sustancia, sino una mezcla de varios homólogos estrechamente relacionados. Al mismo tiempo, el tamaño de las columnas empleadas fue aumentando para poder recuperar los componentes separados. La técnica, por lo tanto, no era solo analítica sino preparatoria.

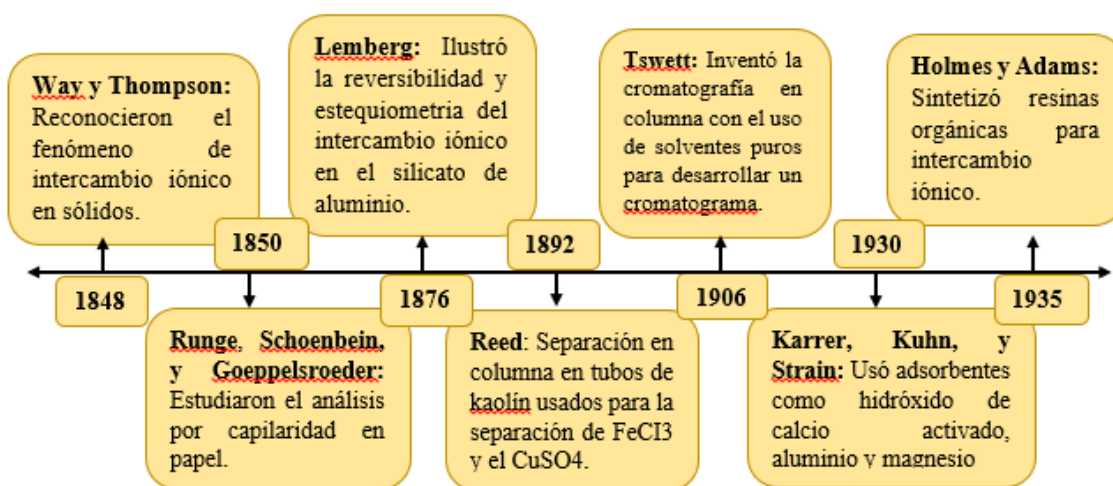
La cromatografía en columna por estos tiempo tenía aplicaciones limitadas, dado que los componentes que se podían separar eran invariablemente lípidos. Pasaron 10 años antes de que Martín y Synge desarrollaran una técnica mediante la cual se pudieran separar compuestos acuosos o hidrofílicos. Esto marcó un nuevo interés en la técnica y en 1944 Consden, Gordon y Martin lograron separar mezclas complejas de aminoácidos en papel y fueron premiados con el Premio Nobel por sus trabajos. Al poco tiempo, en 1947, en Estados Unidos de Norteamérica, la Comisión de Energía Atómica dio a

conocer información sobre el uso de la cromatografía de intercambio iónico para la separación de productos de fisión nuclear.

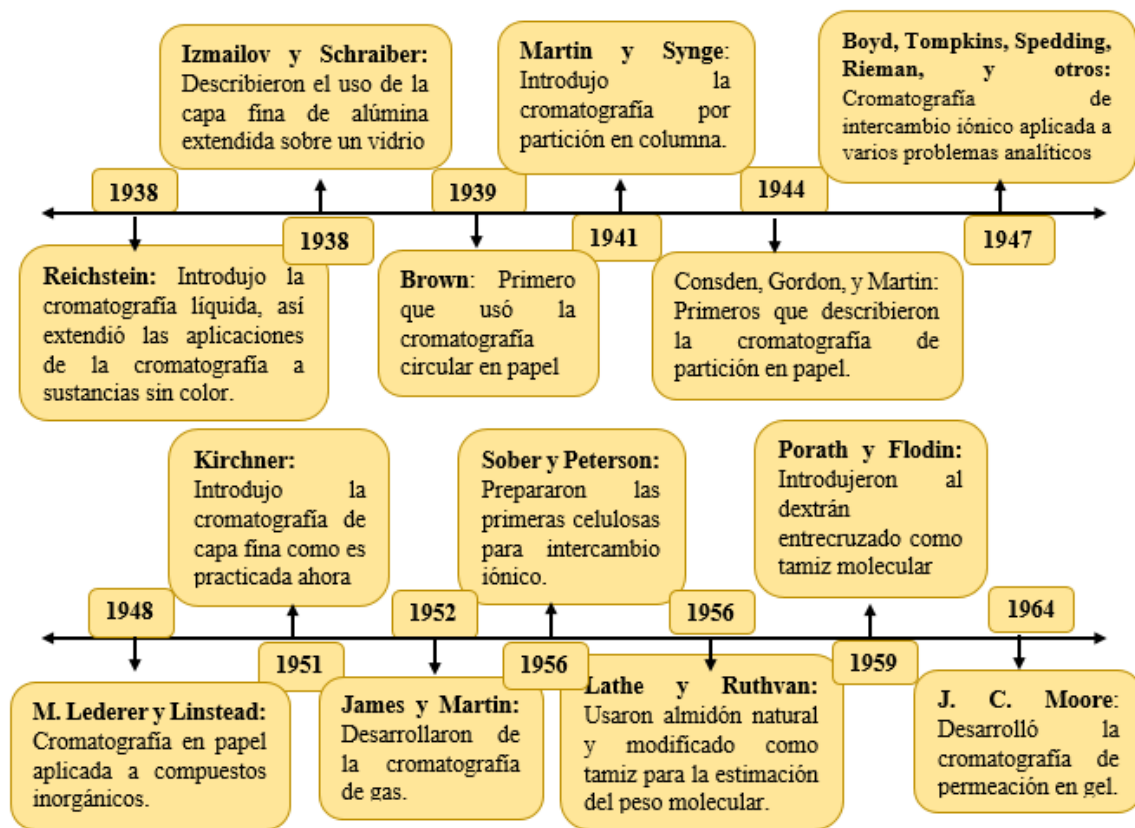
El desarrollo más reciente en el campo de la cromatografía se deriva de los trabajos de Stahl, quien en 1956 presentó una técnica práctica mediante la cual una capa delgada sílice gel, celulosa o alúmina era diseminada sobre una placa de vidrio. Esta técnica, llamada cromatografía de capa fina, resultó en un análisis más rápido y más sensible para el examen de mezclas complejas y, en muchos casos, ha sustituido a otros métodos similares más antiguos de cromatografía en papel toche.

En 1959, Porath y Flodin introdujeron una nueva técnica llamada cromatografía de filtración de gel. Esta se ha convertido en una poderosa y nueva herramienta para la separación de sustancias de alto peso molecular, particularmente las proteínas, y ha encontrado muchas aplicaciones en los campos de la bioquímica, la medicina, la fisiología y la biología. La mayoría de las técnicas de filtración en gel utilizan columnas y recientemente se han hecho trabajos con una combinación de filtración en gel y materiales de intercambio iónico, logrando que las separaciones complejas sean extremadamente rápidas y eficientes.

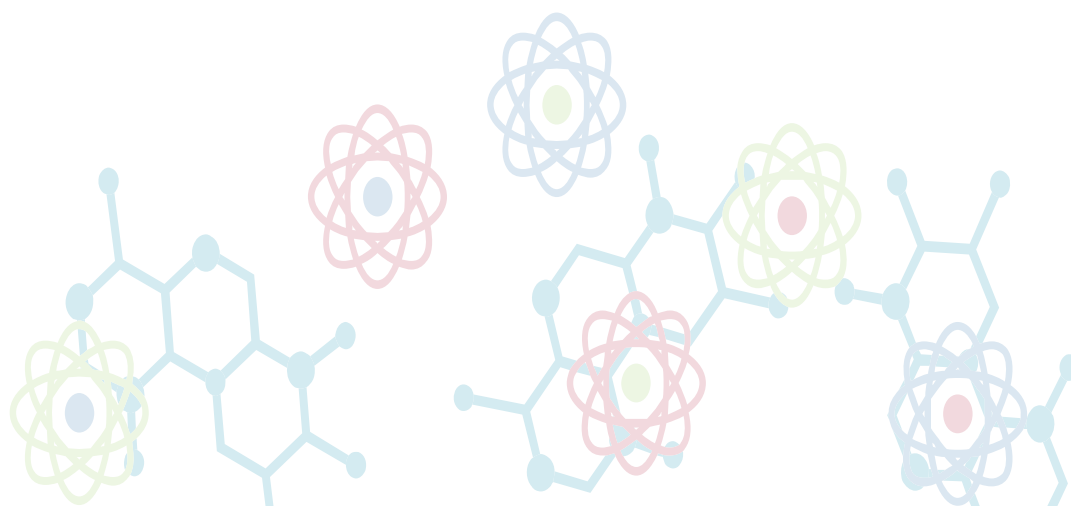
Los primeros equipos de cromatografía de gases aparecieron en el mercado a mediados del siglo XX. A su vez, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC High Performance Liquid Chromatography, en inglés) comenzó a desarrollarse en los años 1960, aumentando su importancia en las décadas siguientes, hasta convertirse en la técnica cromatográfica más empleada. Sin embargo esto se irá modificando con el paso de los años



FUENTE. ELABORACIÓN PROPIA



FUENTE. ELABORACIÓN PROPIA



¿QUÉ ES LA CROMATOGRÍA?

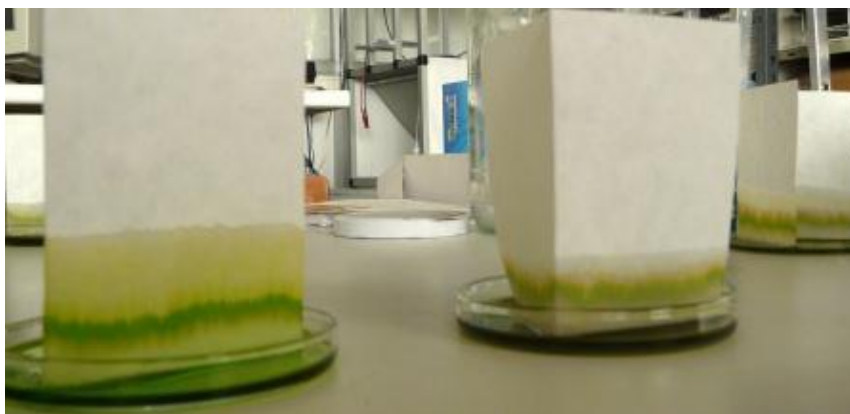
Como mencionamos anteriormente la cromatografía es una de las técnicas más usadas para separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. Esta forma de separar componentes de una mezcla se llama separación cromatográfica. La cromatografía se aprovecha del movimiento de una mezcla por un soporte, por ejemplo, papel o tela. Los elementos de la mezcla se mueven por el soporte a diferentes velocidades separándose. Unos componentes se mueven por el soporte más fácilmente y otros se detienen, esto hace que la mezcla se separe en bandas de diferentes componentes.

Nota: una mezcla se compone de por dos o más componentes con distintas propiedades



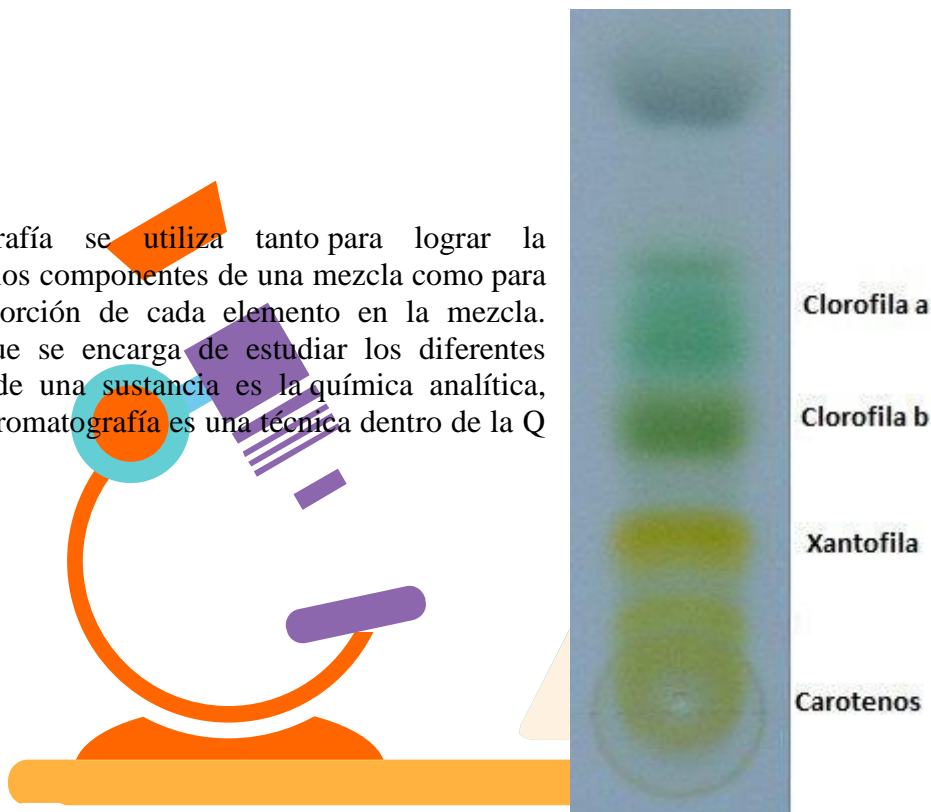
FUENTE. [HTTPS://WWW.EQUIPOSYLABORATORIO.COM/SITIO/CONTENIDOS_MO.PHP?IT=3064](https://www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=3064)

Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. Los componentes de la mezcla interactúan en distinta forma con la fase estacionaria. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando. Después de que los componentes hayan pasado por la fase estacionaria, separándose, pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo de compuesto.



FUENTE. [HTTP://ICMSECCIENCIAS3QUIM.BLOGSPOT.COM/2013/10/PRACTICA-SEPARACION-DE-PIGMENTOS.HTML](http://icmsecciencias3quim.blogspot.com/2013/10/practica-separacion-de-pigmentos.html)

La cromatografía se utiliza tanto para lograr la separación de los componentes de una mezcla como para medir la proporción de cada elemento en la mezcla. La ciencia que se encarga de estudiar los diferentes componentes de una sustancia es la química analítica, por lo que la cromatografía es una técnica dentro de la Q analítica.



Ejemplo 1

Si sobre un mantel blanco se derrama un poco de vino tinto, transcurrido un tiempo se observa que la mancha no es uniforme, sino que hay una zona con predominio de tonos azules y otra en que la tonalidad es roja. Eso es porque se ha producido una separación cromatografía de los pigmentos del vino.



Las tintas de los rotuladores son una mezcla compuesta por algún disolvente (parte líquida de la mezcla) y diferentes pigmentos. Algunos colores, como el negro, suelen ser mezcla de dos o tres pigmentos diferentes. Para separar estos pigmentos podemos realizar una cromatografía.

La cromatografía es usada muy comúnmente por la sociedad, y alguno de los usos diarios que se le dan son los siguientes:

- Se suele usar en análisis de sangre en escenas de crimen
- Verificación de incendios provocados con el rastro de color que se proponga (identificación de la sustancia química responsables de un fuego)
- Análisis de sangre después de la muerte

- Composición de alimentos es comúnmente usada en post cosecha en la parte de verificación de frutos maduros o verdes etc
- Para mirar los niveles de contaminación , en el agua y aire
- Es usada en petroquímica , perfumes y producción farmacéutica

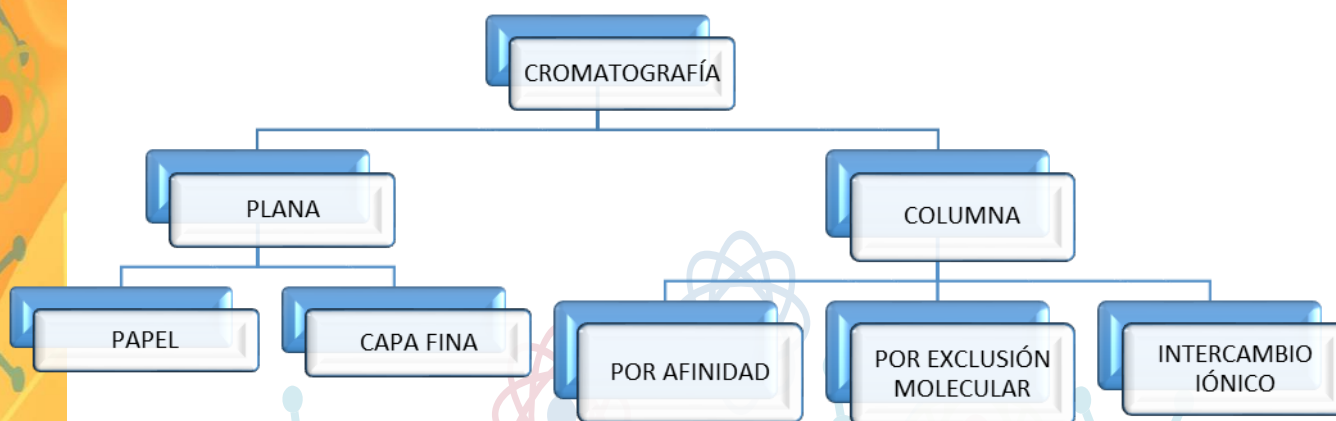
Ejemplo 2

El virus del ebola que se ha llevado a más de 5000 vidas desde su aparición a finales del año 2017 ha causado pánico e incertidumbre en países tercermundistas como sierra leona, guinea y Liberia, a medida de que los científicos tratan de combatir la enfermedad la cromatografía entra y apoya estos estudios, ya que se ha revelado que esta es muy útil para determinar que anticuerpos son más eficaces en la neutralización de la enfermedad



TIPOS DE CROMATOGRAFÍA

Las distintas técnicas cromatográficas se pueden dividir según cómo esté dispuesta la fase estacionaria



Fuente. Elaboración propia

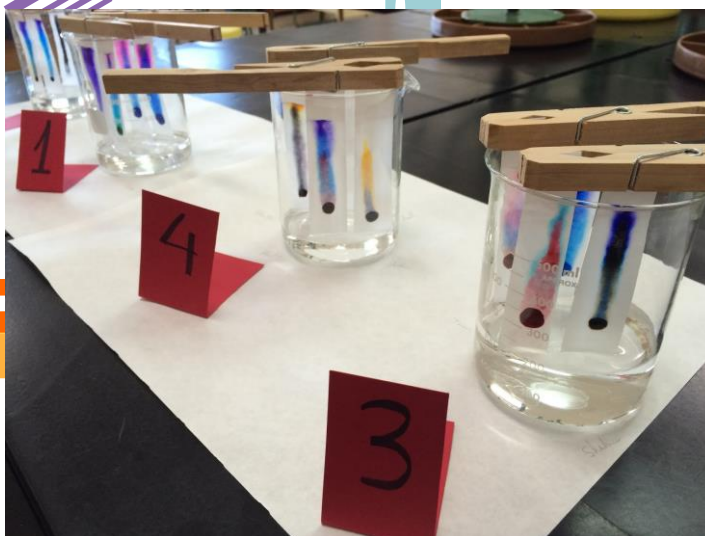
Según el fluido empleado como fase móvil se distinguen:

- Cromatografía de líquidos
- Cromatografía de gases
- Cromatografía de fluidos supercríticos

CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

La cromatografía en papel es un proceso muy utilizado en los laboratorios para realizar análisis cualitativos ya que pese a no ser una técnica muy potente no requiere de ningún tipo de equipamiento.

La fase estacionaria está constituida simplemente por una tira de papel de filtro. La muestra se deposita en un extremo colocando pequeñas gotas de la solución y evaporando el disolvente. Luego el disolvente empleado como fase móvil se hace ascender por capilaridad. Esto es, se coloca la tira de papel verticalmente y con la muestra del lado de abajo dentro de un recipiente que contiene fase móvil en el fondo. Después de unos minutos cuando el disolvente deja de ascender o ha llegado al extremo se retira el papel y seca. Si el disolvente elegido fue adecuado y las sustancias tienen color propio se verán las manchas de distinto color separadas. Cuando los componentes no tienen color propio el papel se somete a procesos de revelado. Hay varios factores de los cuales depende una cromatografía eficaz: la elección del disolvente y la del papel de filtro.

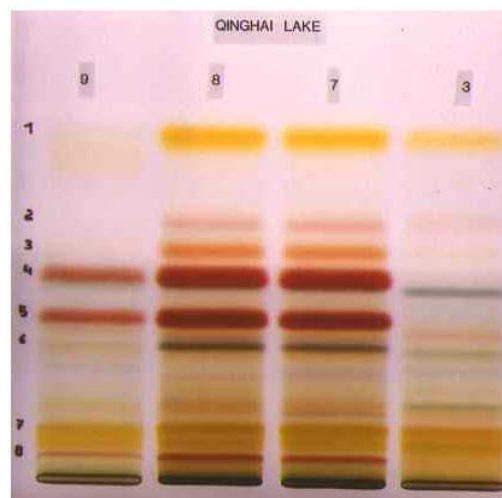
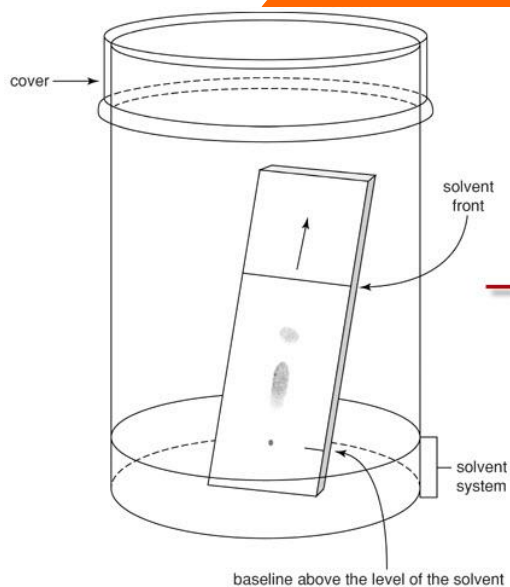


CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

La cromatografía en capa fina, TLC (Thin layer chromatography) es una técnica cromatográfica. La fase estacionaria es una capa, uniforme, de un absorbente mantenido sobre una placa, la cual puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte. Los requisitos son un absorbente (por ejemplo sílica gel), placas, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de absorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas.

La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.

Los productos a examinar se disolverán, cuando sea posible, en un disolvente orgánico que tenga un punto de ebullición lo suficientemente bajo para que se evapore después de la aplicación, lo más común es usar acetona. Frecuentemente se emplean disoluciones al 1%, de manera que al aplicar 2 μl resulta en la carga 20 μg de producto sólido. Muchos reactivos de revelado llegan a detectar 0.1 μg de material; por esto con esta carga puede llegarse a observar un 5% de impurezas. Existen una gran variedad de micropipetas y microjeringuillas para realizar el proceso de siembra de la muestra a analizar. También pueden usarse tubos capilares. El proceso de siembra se realiza tocando con la punta del capilar (micropipeta, etc) sobre la placa preparada. Dejando una distancia al borde inferior de un centímetro aproximadamente. El punto de aplicación de la muestra se denomina toque. Una vez colocado el toque se deja secar para evaporar el disolvente, de forma que en la placa solo quedará la muestra a analizar.

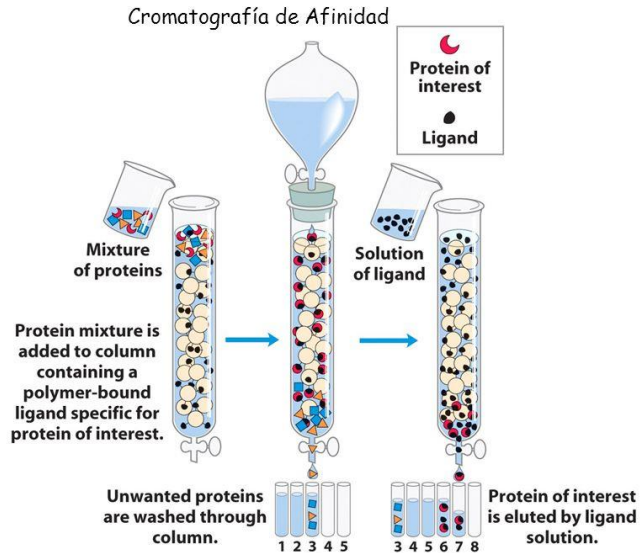


CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC). REFERENCIADO

DE: [HTTPS://WWW.UAM.ES/GRUPOSINV/LUMILA/PERSONAL/EBR/QOT/LECCION9/DEFAULT.HTML](https://www.uam.es/gruposinv/lumila/personal/EBR/QOT/LECCION9/DEFAULT.HTML)

CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

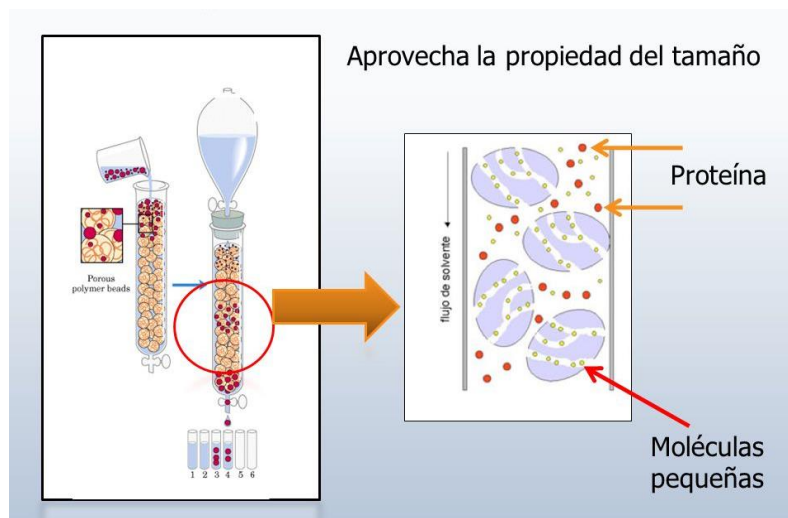
La Cromatografía de Afinidad permite la separación de mezclas proteicas por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando.



PROTEÍNAS, MÉTODOS PARA SU ESTUDIO. RECUEPRADO DE:
[HTTP://SLIDEPLAYER.ES/SLIDE/4070909/](http://SLIDEPLAYER.ES/SLIDE/4070909/)

POR EXCLUSIÓN MOLECULAR

La fase estacionaria es un material poroso, que retiene a las moléculas en función de su tamaño. En ocasiones se denomina también cromatografía sobre geles o de permeabilidad en geles (GPC).



PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS. RECUPERADO DE: [HTTP://SLIDEPLAYER.ES/SLIDE/148432/](http://SLIDEPLAYER.ES/SLIDE/148432/)

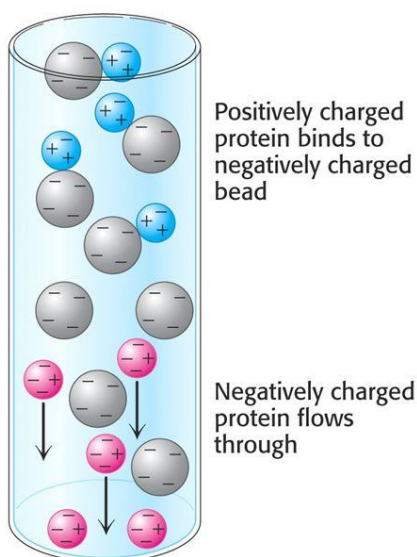
POR INTERCAMBIO IÓNICO

Se trata de una cromatografía en columna que utiliza una fase estacionaria con sustancias con componentes con carga eléctrica. Se utiliza para separar compuestos cargados, incluyendo aminoácidos, péptidos y proteínas. La fase estacionaria es normalmente una resina de intercambio iónico que contiene grupos funcionales cargados que interaccionan con grupos cargados de signo opuesto del compuesto que se quiere retener. Puede ser:

- Intercambiador de iones cargado positivamente (intercambiador de aniones), que interacciona con aniones
- Intercambiador de iones cargado negativamente (intercambiador de cationes), que interacciona con cationes.



INTERCAMBIO IÓNICO



CROMATOGRAFÍA. RECUPERADO DE: [//SLIDEPLAYER.ES/SLIDE/3495660/RELEASE/WOOTHEE](http://SLIDEPLAYER.ES/SLIDE/3495660/RELEASE/WOOTHEE)

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

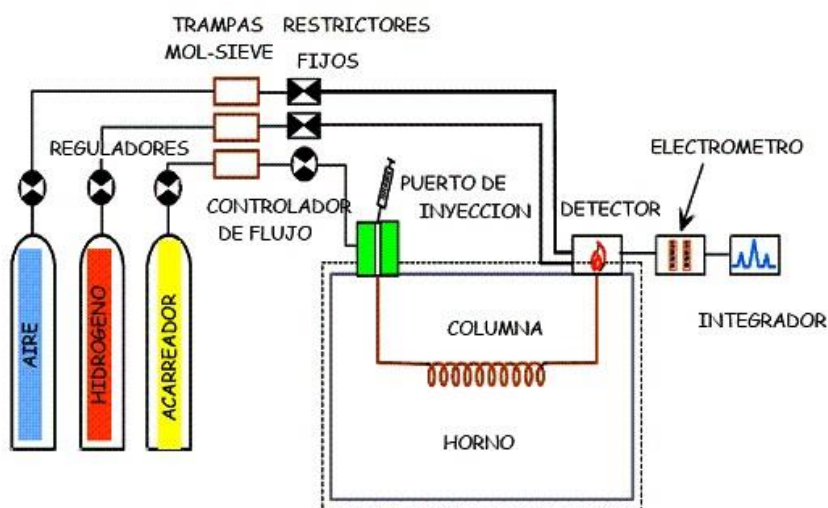
La Cromatografía líquida, también conocida como Cromatografía de líquidos, es una técnica de separación y no debe confundirse con una t

écnica cuantitativa o cualitativa de análisis. Es una de las técnicas analíticas ampliamente utilizadas, la cual permite separar físicamente los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla. En toda cromatografía existe un contacto entre dos fases, una fija que suele llamarse fase estacionaria, y una móvil (fase móvil) que fluye permanente durante el análisis, y que en este caso es un líquido o mezcla de varios líquidos. La fase estacionaria por su parte puede ser alúmina, sílice o resinas de intercambio iónico que se encuentran disponibles en el mercado. Los intercambiadores iónicos son matrices sólidas que contienen sitios activos (también llamados grupos ionogénicos) con carga electrostática (positiva o negativa). De esta forma, la muestra queda retenida sobre el soporte sólido por afinidad

electrostática. Dependiendo de la relación carga/tamaño unos constituyentes de la mezcla serán retenidos con mayor fuerza sobre el soporte sólido que otros, lo que provocará su separación. Las sustancias que permanecen más tiempo libre en la fase móvil, avanzan más rápidamente con el flujo de la misma y las que quedan más unidas a la fase estacionaria o retenidas avanzan menos y por tanto tardarán más en salir o fluir. Éste es el principio fundamental de la cromatografía. Un ejemplo notable es la cromatografía de intercambio iónico. Las columnas más utilizadas son las de sílice.

CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases (GC): la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC), siendo esta última la que se utiliza más ampliamente, y que se puede llamar simplemente cromatografía de gases (GC). En la GSC la fase estacionaria es sólida y la retención de los analitos en ella se produce mediante el proceso de adsorción. Precisamente este proceso de adsorción, que no es lineal, es el que ha provocado que este tipo de cromatografía tenga aplicación limitada, ya que la retención del analito sobre la superficie es semipermanente y se obtienen picos de elución con colas. Su única aplicación es la separación de especies gaseosas de bajo peso molecular. La GLC utiliza como fase estacionaria moléculas de líquido inmovilizadas sobre la superficie de un sólido inerte. La GC se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases. Éste consta de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de muestra, la columna (generalmente dentro de un horno), y el detector.



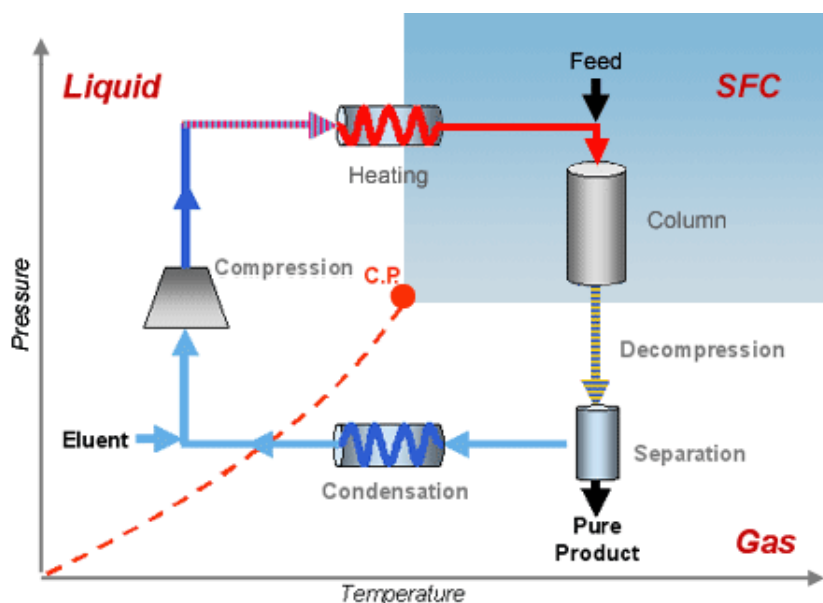
CROMATOGRAFIA DE GASES. RECUPERADO DE: [HTTPS://CCH-QUIMICA-129.WIKISPACES.COM/CROMATOGRAFIA+DE+GASES](https://CCH-QUIMICA-129.WIKISPACES.COM/CROMATOGRAFIA+DE+GASES)

CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

La cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) es una técnica híbrida entre la cromatografía de gases (GC) y la HPLC, que combina lo mejor de ambas técnicas. Esta técnica es importante porque permite la separación de mezclas en las que no es adecuada la aplicación de la GC ni de la HPLC. En concreto, se aplica a compuestos no volátiles o térmicamente inestables que no pueden ser separados mediante GC, o aquellos que contienen grupos funcionales que imposibilitan su detección en HPLC. Debido a las características de la fase móvil (alta presión y temperatura) se emplean equipos parecidos a los de HPLC, con varias diferencias:

- El empleo de un horno termostático para poder controlar con precisión la temperatura de la fase móvil.
- El uso de un restrictor, empleado para poder mantener por una parte la presión en el interior de la columna y por otra parte permitir la bajada de la presión a la salida para que el fluido supercrítico (SF en adelante) pase al estado gaseoso y pueda ser detectado adecuadamente el analito.

Básicamente, un restrictor es un tubo capilar de unos 2 a 10 cm de longitud y un diámetro interno menor al de la columna (típicamente 1/10 del diámetro), donde a la salida el SF expande y pasa al estado gaseoso y se puede mantener simultáneamente la presión en el interior de la columna. A diferencia de la cromatografía de gases, en la SFC no se aumenta la velocidad de elución modificando la temperatura, sino la presión del SF. El aumento de presión, al aumentar la densidad, permite una mayor interacción analito-fase móvil y disminuye los tiempos de elución. Se suele emplear en las eluciones una primera etapa isobárica para luego aumentar la presión lineal o asintóticamente hasta el final de la elución.



INSTRUMENTACIÓN EN LA CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS. REFERENCIADO DE:
[HTTPS://LIDIACONLAQUIMICA.WORDPRESS.COM/TAG/CROMATOGRAFIA-DE-FLUIDOS-SUPERCRITICOS/](https://LIDIACONLAQUIMICA.WORDPRESS.COM/TAG/CROMATOGRAFIA-DE-FLUIDOS-SUPERCRITICOS/)

ETAPAS EN LA REALIZACIÓN DE UNA CROMATOGRAFÍA

Cromatografía en columna

- 1.- Preparación del soporte y fase estacionaria.
 - 1.1.- Equilibrado de la columna.
- 2.- Aplicación de la muestra.
- 3.- Elución:
 - a) Lavado de componentes no retenidos.
 - b) Liberación, desplazamiento o elución propiamente dicha de los componentes retenidos.
- 4.- Recolección de fracciones o análisis del efluente en continuo.
- 5.- Análisis, cuantificación o revelado.
- 6.- Regeneración de la fase estacionaria.

Cromatografía plana (papel o capa fina)

- 1.- Preparación del soporte y fase estacionaria.
- 2.- Aplicación de la muestra.
Secado.
- 3.- Desarrollo de la cromatografía.
- 4.- Secado de la placa.
- 5.- Revelado y cuantificación en su caso.

RECOGIDA DEL EFLUENTE

El efluente de una columna se suele recoger en forma de pequeñas porciones o fracciones, comúnmente con la ayuda de un dispositivo mecánico llamado colector de **fracciones**.

Esquema de un **colector de fracciones**. En cada tubo cae un número determinado de gotas o un cierto volumen. A continuación, el soporte gira, de modo que el tubo siguiente queda colocado bajo la salida del efluente. Las gotas se detectan mediante una célula fotoeléctrica; cada gota interrumpe el haz de luz y así se cuenta.

DETECCIÓN

Los componentes de la muestra separados se detectan en el efluente:

- A. Mediante su análisis en continuo. Por ejemplo:
 - midiendo absorbancia a 280 nm para proteínas
 - midiendo absorbancia a 260 nm para ácidos nucleicos
 - midiendo radiactividad
- B. O bien mediante el análisis de las fracciones una vez recogidas. cualquier tipo de análisis (absorbancia, radiactividad, ensayo enzimático, ensayo biológico...)

NORMAS ESTANDARIZADAS QUE SIGUE LA TÉCNICA (NORMA ASTM)

- **NORMA WK33788**

Método de prueba para determinar la presencia de hidrocarburos y gases que no sean hidrocarburos en mezclas gaseosas mediante cromatografía de gases, está a cargo del Subcomité sobre análisis de la composición química de combustibles gaseosos, que forma parte del Comité D03 de ASTM International sobre combustibles gaseosos.

Según Shannon Canfield, química especialista en comercialización con Wasson-ECE Instrumentation y presidente del Subcomité D03.07, la norma WK33788 unifica y amplía con tecnología actualizada dos normas de ASTM, la D1945 de ASTM, Método de prueba para el análisis de gas natural mediante cromatografía de gas, y la D1946, Método para el análisis de gas reformado mediante cromatografía de gases.

- **NORMA ASTM D7493**

método de prueba para la medición de gas natural y combustibles gaseoso por medio de la cromatografía de gas y la detección electroquímica, estuvo a cargo del Subcomité D03.12 sobre análisis en línea y en la línea de los combustibles gaseosos, que forma parte del Comité D03 de la ASTM International sobre combustibles gaseosos. “Este método de medición en línea de azufre ofrece datos precisos ya que la devolución de la información para lograr la eliminación del azufre y un buen mantenimiento usando diferentes esquemas de elaboración de gas para alcanzar la calidad de gas combustible deseada”, dice Sherman Chao de Analytical Solution Inc. y miembro del Comité D03.

- **NORMA D1945 DE ASTM**

Método de prueba para el análisis de gas natural mediante cromatografía de gas, existen desde hace mucho tiempo”, dijo Werner.

Del mismo modo, la norma de laboratorio D5504 de ASTM, Método de prueba para determinar la presencia de compuestos de azufre en gas natural y combustibles gaseosos mediante cromatografía de gases y quimioluminiscencia, resultó ser el método primario para determinar el contenido de azufre en el gas. El gas natural con contenido de ácido sulfhídrico, también conocido como gas ácido, puede comprometer la calidad y dañar equipos y catalizadores para proceso y uso. Sin embargo, también se agregan deliberadamente gases de azufre olorosos para advertir a los usuarios y el público en caso de fugas en tuberías y artefactos.

- **NORMA D6581-08**

Métodos de prueba para la determinación de bromatos, bromuros, cloratos y cloritos en el agua potable por medio de cromatografía iónica de exclusión (Métodos A y B).

- **NORMA ASTM D5580 – 15**

Método de prueba estándar para determinación de benceno, tolueno, etilbenceno, p/m-xileno, o-xileno, C9 y componentes aromáticos más pesados, y el total de aromáticos en la gasolina terminada mediante una cromatografía de gases. Este

método de prueba abarca la determinación de benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos, C9 y componentes aromáticos más pesados, y el total de aromáticos en la gasolina de motor terminada mediante una cromatografía de gases.

• **NORMA D7065-06**

Método de prueba para la determinación de nonilfenol, bisfenol A, p-tert-octilfenol, monoetoxilato de nonilfenol y dietoxilato de nonilfenol en aguas ambientales mediante cromatografía de gases y espectrometría de masa.

APLICACIONES DE LA CROMOFOTOGRAFÍA

APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE ALIMENTOS:

Conservantes antioxidantes: Se usas el gradiente de HPLC con un detector para medir simultáneamente Iso nueve antioxidantes más comunes Hipoclorito, iodo etc

Carbohidratos simples: Usar HPCL con ELSD elimina la necesidad de usar bases feurtes o alto pH, convirtiéndose en un método no destructivo.

Análisis de carbohidratos en las bebidas:

La adición de mono y disacáridos a bebidas y zumos sirve como propósito de enriquecer el sabor. Para determinar si la cantidad añadida es correcta se de miden los azucares usando HPLC de intercambio iónico con detección de pulso amperométrico con detectores de refracción p ultravioletas.

Flavonoides y fenoles:

- En el vino la medición de estas sustancias permite la determinación del color, la edad y las variedades de uva usadas. El HPLC en combinación con colorímetros, permiten la determinación de hasta 22 compuestos diferentes simultáneamente.

Lípidos:

- La determinación de lípidos animales y vegetales como: colesterol, triglicéridos, glicéridos y esteroles, se basa en el uso del HPLC.

Catequinas del té:

- Las catequinas son flavonoles del té, posiblemente anticancerígenos. Se usa HPLC con hidrolisis enzimática para detectar estas sustancias tan beneficiosas.

Trigliceridos:

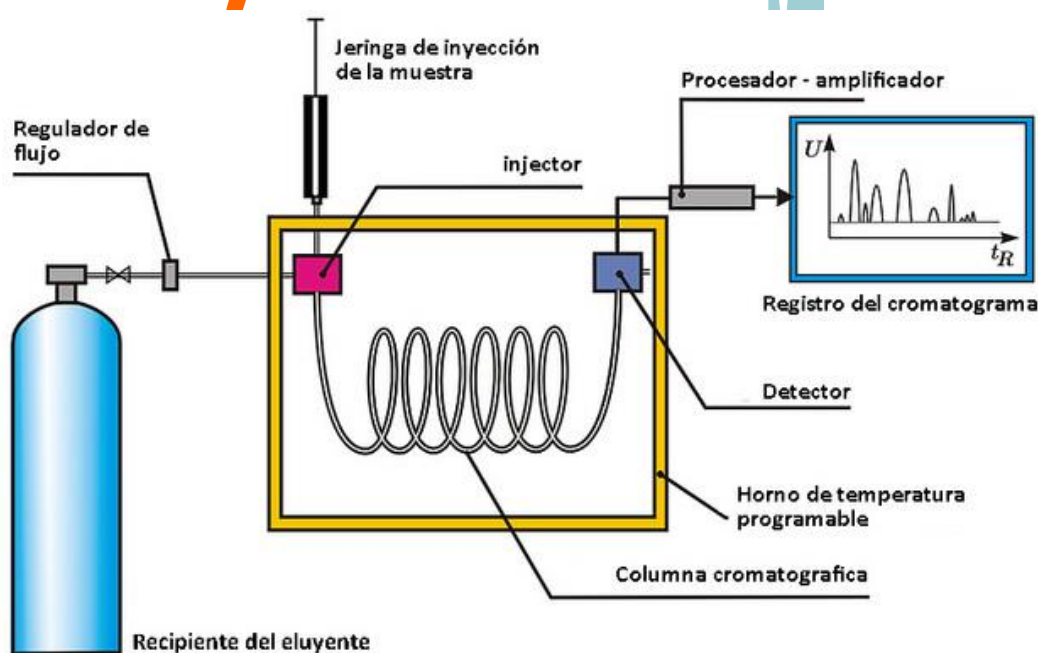
- HPLC con ELSD permite la separación y caracterización de todos los tipos de triglicéridos.

INSTRUMENTACIÓN EN LA CROMATOGRAFÍA GAS-LÍQUIDO

La cromatografía de gases (CG) es una técnica que permite trabajar con muestras sólidas, líquidas o gaseosas, siempre que sean volátiles y estables térmicamente.

En un cromatógrafo gas-líquido la mezcla de solutos a separar, una vez volatilizada, se hace pasar a través de una columna, que contiene la fase estacionaria, con ayuda de una fase móvil gaseosa (gas portador). Esquemáticamente:

Esquema- Cromatógrafo- Gases



INSTRUMENTACIÓN EN LA CROMATOGRAFÍA GAS-LÍQUIDO. REFERENCIADO DE:
[HTTPS://LIDIAONLAQUIMICA.WORDPRESS.COM/2015/08/05/INSTRUMENTACION-EN-LA-CROMATOGRAFIA-GAS-LIQUIDO/](https://LIDIAONLAQUIMICA.WORDPRESS.COM/2015/08/05/INSTRUMENTACION-EN-LA-CROMATOGRAFIA-GAS-LIQUIDO/)

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

ASPECTOS BÁSICOS DE LA PREPARACIÓN PRECISA DE MUESTRAS PARA CROMATOGRAFÍA



ASPECTOS BÁSICOS DE LA PREPARACIÓN PRECISA DE MUESTRAS PARA CROMATOGRAFÍA. REFERENCIADO DE:

[HTTPS://WWW.CHROMNEWS.COM/EU_ES/FUNDAMENTALS-ACCURATE-SAMPLE-PREPARATION-CHROMATOGRAPHY/](https://www.chromnews.com/eu_es/fundamentals-accurate-sample-preparation-chromatography/)

¿Sabía que el procesamiento de las muestras genera una tercera parte de los errores que se producen durante el análisis cromatográfico? Asimismo, el procesamiento de las muestras normalmente ocupa el 61 % del tiempo dedicado al análisis cromatográfico. Por lo tanto, una preparación precisa de muestras es un aspecto esencial para conseguir realizar la cromatografía correctamente, ya que garantiza la integridad de las muestras y elimina los contaminantes que pueden afectar negativamente a la detección de analitos y a la cromatografía.

Las interferencias indeseadas de las muestras pueden provocar obstrucciones y problemas mecánicos en los instrumentos, lo que conlleva costosos tiempos de inactividad y la necesidad de limpieza de los sistemas. Algunas interferencias de las muestras también pueden llegar a impedir la detección de analitos, aumentar el ruido de la línea base y reducir la sensibilidad. Los resultados pueden convertirse en poco fiables y difíciles de interpretar, con formas de pico deficientes, interferencias y coeluciones que pueden exigir repetir los análisis de las muestras. Además de eliminar los contaminantes, las técnicas como la extracción en fase sólida (SPE) pueden contribuir a enriquecer los analitos objetivo, aumentar la concentración de las muestras y mejorar la detección. Otro aspecto a tener en cuenta en relación con la preparación de muestras para cromatografía de líquidos es que estas pueden requerir una eliminación de aditivos adicionales o una desalinización, para acomodarlas en la solución

adecuada. Por lo tanto, el primer paso para obtener resultados precisos es una buena preparación de muestras que garantice la integridad de las mismas.

precisos es una buena preparación de muestras que garantice la integridad de las mismas.

DESAFÍOS TÍPICOS

Cada separación conlleva multitud de preguntas. ¿Los resultados obtenidos son fiables? ¿Y reproducibles? ¿Puedo ajustarme a mi presupuesto y cumplir los plazos? Muchos analistas se enfrentan a desafíos similares a la hora de gestionar sus técnicas de preparación de muestras, incluidos los siguientes:

- Integridad de las muestras.
- Falsos positivos y negativos en el análisis de trazas provocados por las impurezas y los efectos de la matriz.
- Desarrollo laborioso y extenso de nuevos métodos de preparación de muestras.
- Repetición de análisis debido a la obtención de resultados inconsistentes.

La falta de consistencia entre analistas, la variabilidad de las extracciones y el ajuste de los métodos de preparación de muestras para muestras grandes o sucias genera una gran ineficiencia. Para conseguir que la cromatografía sea fiable y productiva, la preparación de muestras debe ser sencilla, rentable y compatible con el método y los objetivos analíticos.

TÉCNICAS PARA CONSEGUIR UNA PREPARACIÓN DE MUESTRAS SENCILLA, EFICAZ Y REPRODUCIBLE

A medida que los instrumentos van siendo más selectivos y sensibles, las técnicas de preparación de muestras también han tenido que evolucionar. Tal como se muestra en el folleto Solutions for Worry Free Sample Preparation (Soluciones para conseguir una preparación de muestras sin problemas), al determinar la técnica de preparación de muestras idónea en función de sus necesidades podrá obtener los resultados deseados de forma rápida y robusta. Debido a la amplia variedad de técnicas disponibles, puede ser necesario dedicar tiempo a adaptar la estrategia de preparación de muestras a los desafíos existentes. Entre los métodos de preparación de muestras más comunes se incluyen los siguientes:

- Filtración: esta técnica resulta idónea para numerosas muestras orgánicas o acuosas que contengan partículas que pueden obstruir el instrumento o provocar tiempos de inactividad.

- Técnicas avanzadas de precipitación y filtración: las técnicas de filtración basadas en la precipitación de proteínas son métodos rápidos y genéricos de eliminación de proteínas aplicables a diversos tipos de muestras. Algunas versiones de estas técnicas también permiten reducir la cantidad de lípidos, lo que contribuye a eliminar los lípidos comunes.
- Extracción de líquidos con soporte sólido (SLE): esta técnica, idónea para muestras acuosas que contengan interferencias inorgánicas, ofrece ventajas frente a los métodos convencionales de extracción líquido-líquido, entre las que se incluyen el soporte para tareas de automatización, la reducción del consumo de disolventes y la mejora de la recuperación y la precisión, gracias a la eliminación de los problemas con emulsiones que a menudo se producen al realizar extracciones líquido-líquido.
- Extracción en fase sólida (SPE): cuando se requieren una selectividad y una sensibilidad elevadas, esta técnica de preparación de muestras ultralimpia garantiza que el análisis resulte preciso y eficaz. La SPE ofrece una combinación óptima de eliminación de interferencias y concentración de analitos.

PREPARACIÓN PRECISA DE MUESTRAS EN TODAS LAS OCASIONES

Para que la cromatografía sea precisa y productiva, es necesario que la preparación de muestras resulte sencilla, rentable y compatible con los objetivos analíticos. Precisamente por eso, la gama de productos de preparación de muestras de Agilent está diseñada para garantizar una preparación precisa de muestras que le permita obtener resultados fiables en todo su flujo de trabajo. Además de garantizar la integridad de las muestras, la eliminación de interferencias de la matriz contribuye a mejorar las prestaciones de la columna y a prolongar su vida útil.

Los productos de filtración se pueden utilizar para mejorar tanto las prestaciones de los sistemas como la calidad analítica mediante la eliminación de partículas que pueden afectar a la integridad de las muestras. Los productos de filtración ofrecen una amplia variedad de tipos de membranas y tamaños de poro, con el fin de dar respuesta a las necesidades de sus aplicaciones cromatográficas. Por ejemplo, los filtros de jeringa Captiva permiten filtrar de forma fiable volúmenes de muestra desde 1 ml hasta 150 ml, lo que posibilita una excelente preparación de muestras para HPLC y UHPLC.

Si desea conseguir un nivel de limpieza mayor, los productos Bond Elut para SPE eliminan de forma selectiva las interferencias y, al mismo tiempo, incrementan la concentración relativa de los analitos de interés. La gama Bond Elut para SPE ofrece dos tipos de absorbentes funcionales:

- Fases poliméricas: estas fases, diseñadas para metodologías genéricas y para facilitar el desarrollo de métodos, ofrecen de entrada unos resultados excelentes para los usuarios menos experimentados. Además,

pueden utilizarse en extracciones en las que es necesario extraer una amplia variedad de analitos en una única operación (los denominados métodos múltiples).

- Fases de sílice: esta gama de absorbentes ligados trifuncionales ofrece más de 25 selectividades funcionales diferentes que posibilitan extracciones enormemente específicas y selectivas. Estas fases para aplicaciones específicas son la referencia en cuanto a purificación eficaz de muestras.

La guía de Agilent denominada Sample Preparation Fundamentals for Chromatography (Aspectos básicos de la preparación de muestras para cromatografía) describe algunas de las metodologías de preparación de muestras que se utilizan en la actualidad. No olvide que una calidad consistente permite obtener resultados consistentes, con la que puede conseguir una preparación precisa de muestras para sus aplicaciones, incluidas las alimentarias, farmacéuticas, de química forense y medioambientales.

ANÁLISIS DE SALIDA DE RESULTADO

CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

ANÁLISIS DE SALIDA POR DESARROLLO

Es el método utilizado en los experimentos iniciales de cromatografía. El cromatograma se desarrolla hasta que el frente del disolvente alcanza el final del lecho estacionario, de forma que los constituyentes de la mezcla una vez separados permanecen sobre el lecho al finalizar la separación. La técnica de análisis por desarrollo presenta la ventaja de que es analizable la totalidad de la muestra, incluyendo los compuestos de muy baja o muy alta retención. Se utiliza fundamentalmente en cromatografía de papel y capa fina (Figura 2.3)

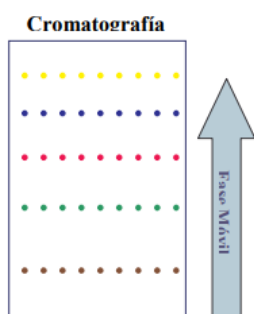


Figura 2.3.- Análisis por desarrollo. Esquema de sistema para hacer cromatografía en capa fina.

ANÁLISIS SALIDA POR ELUCIÓN (CROMATOGRAFÍA DE ELUCIÓN)

Procedimiento en el que la fase móvil pasa de forma continua a través o a lo largo del lecho cromatográfico y la muestra se suministra al sistema de forma discreta, como una

pequeña cantidad en un tiempo breve. Esta técnica presenta la desventaja de que los componentes con retenciones muy altas pueden no ser observados.

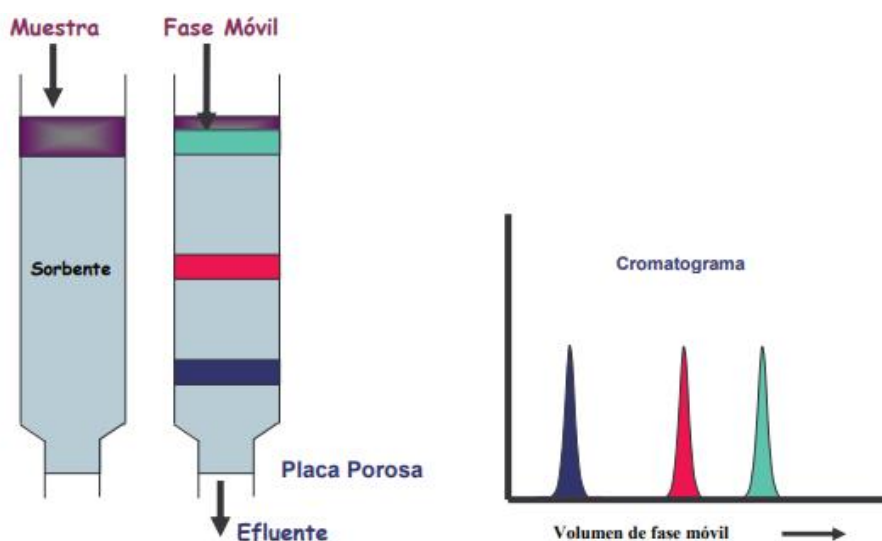


Figura 2.4.- Esquema de dispositivo para realizar cromatografía con análisis por elución.

Es la técnica más utilizada en casi todas las separaciones cromatográficas analíticas y en muchas preparativas.

• **ANÁLISIS FRONTAL DE SALIDA**

Procedimiento en el que la muestra (líquida o gaseosa) se alimenta de forma continua al lecho cromatográfico. No se utiliza ninguna fase móvil adicional. Se utiliza la diferencia de afinidad del adsorbente por cada una de las sustancias a separar. Se utiliza una pequeña columna, que se satura sucesivamente por cada una de las sustancias a separar, emergiendo de ella el primer componente puro hasta que la columna se satura del segundo componente, momento en el que empezará a emerger éste mezclado con el primero. El análisis frontal tiene su principal aplicación como técnica preparativa en la purificación de sustancias.

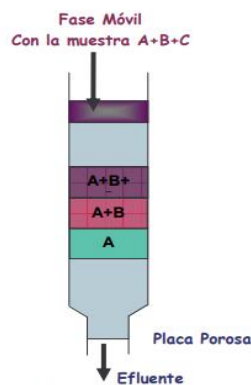


Figura 2.5.-

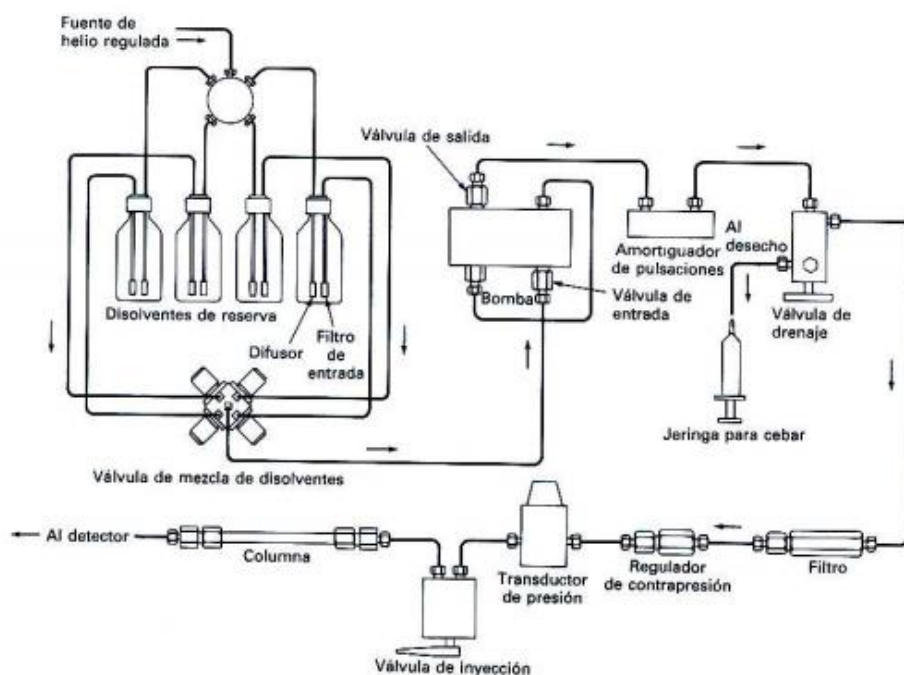
COMPONENTES DEL CROMATÓFRAGO

PARTES

EQUIPO DE CROMATOGRFÍA LIQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPCL)



La cromatografía de líquidos, hoy en día, es la técnica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de su popularidad las encontramos en su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estas sustancias incluyen los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, drogas terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y cierta variedad de especies inorgánicas.



EQUIPO DE CROMATOLOGÍA LÍQUIDA (LC)

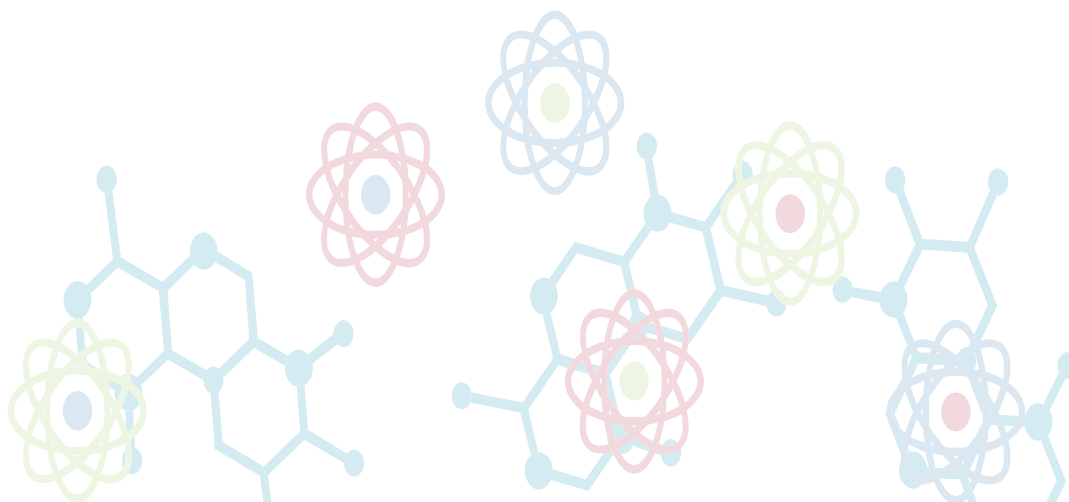
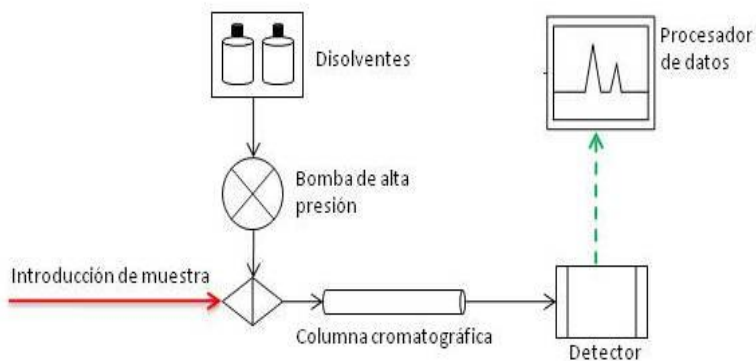


En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que circula a través de una columna en la que está contenida la fase estacionaria. La fase móvil no sólo arrastra al analito, sino que existen interacciones intensas entre el analito y la fase móvil.

La retención cromatográfica es función de:

- La fase móvil.
- La fase estacionaria.
- El analito.

Todas las especies que pueden disolverse pueden separarse eligiendo la combinación adecuada de fase móvil y fase estacionaria.

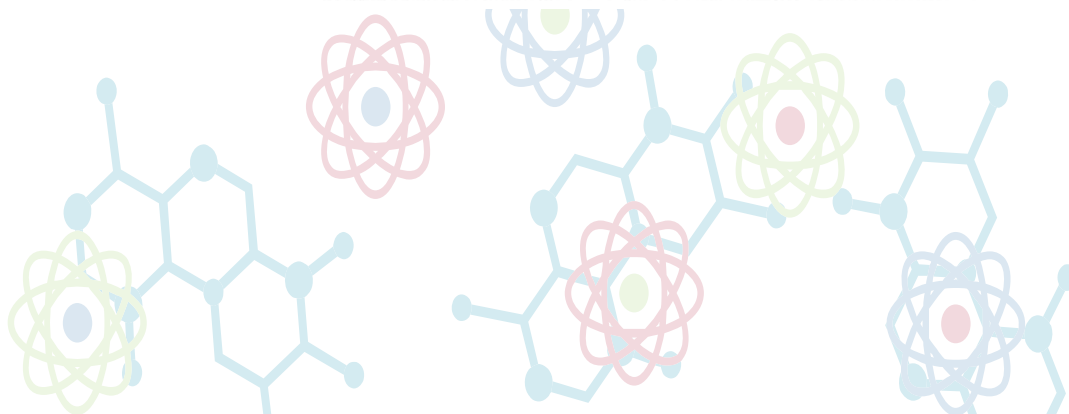
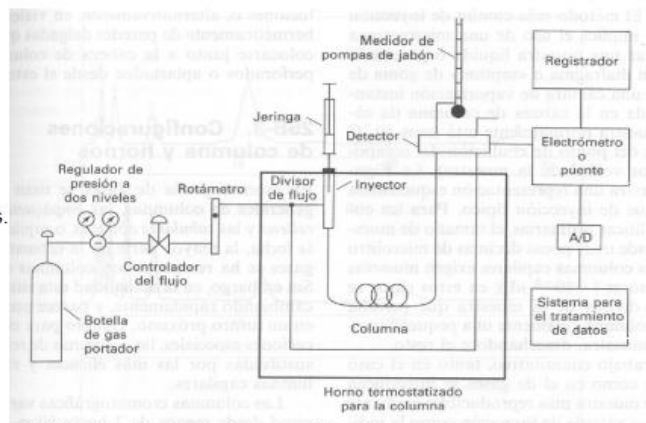


EQUIPO DE CROMATOLOGIA DE GAS



En la cromatografía de gases (GC), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte y, a diferencia de la mayoría de los equipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, su única función es la de transportar al componente a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases: - Cromatografía gas-sólido (GSC) - Cromatografía gas-líquido (GLC). Tiene gran aplicación en todos los campos de la ciencia y su denominación se abrevia normalmente como cromatografía de gases (GC).

Fig 2: Esquema Cromatógrafo de gases.



TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS

Cromatografía de Adsorción

La separación se basa principalmente en la diferente afinidad en términos de adsorción de los componentes de la muestra sobre la superficie de un sólido activo. La fuerza con que es adsorbido un componente depende de las interacciones (tipo y magnitud) existentes entre, o bien, el componente y la fase estacionaria, o el componente y la fase móvil, es decir de la polaridad de los componentes, de la actividad del adsorbente (fase estacionaria) y de la polaridad de la fase móvil. La cromatografía de adsorción, es una técnica particularmente útil para separar compuestos de polaridad baja o media. La separación de compuestos muy polares mediante cromatografía de adsorción requiere, debido a la gran retención que ofrecen, la utilización de adsorbentes muy poco activos, o bien, tratamientos químicos previos a fin de reducir su polaridad.

Cromatografía de Reparto

La separación se basa principalmente en la diferente solubilidad de los componentes de la muestra en la fase estacionaria (caso de la cromatografía de gases), o en las diferentes solubilidades de los componentes en las fases móvil y estacionaria (caso de la cromatografía líquida). La mayor o menor migración de un componente en este tipo de cromatografía será función del coeficiente de reparto de éste entre la fase estacionaria y la fase móvil: $K_d = \frac{\text{Concentración de A en fase estacionaria}}{\text{Concentración de A en fase móvil}}$. La cromatografía de reparto se utiliza para la separación de mezclas de compuestos de polaridad media y alta. Algunos ejemplos de este tipo de cromatografía son las cromatografías sobre papel, sílice hidratada y fase inversa en la cromatografía líquida de alta eficacia.

Cromatografía de Exclusión

La separación se basa principalmente en efectos de exclusión, tales como las diferencias de tamaño molecular o de forma, o las diferencias de carga (Figura 2.1). Se puede usar también el término cromatografía de exclusión por tamaños, SEC, cuando la separación se basa en el tamaño molecular. Anteriormente se usaban para esto los términos filtración en gel y cromatografía de permeación en gel (GPC), cuando la fase estacionaria es un gel hinchado. El término cromatografía de exclusión de iones se usa específicamente para la separación de iones en una fase acuosa. La cromatografía de filtración en gel se realiza empleando unas matrices formadas por unas esferas porosas. El volumen de los poros es muy elevado y su diámetro se conoce. Cuando penetran en el lecho de la columna dos macromoléculas de tamaños tales que una penetra en los poros de las bolas de gel y la otra no, la primera se reparte entre el espacio entre las bolas y el interior de los poros, reduciéndose la concentración en la fase libre entre las bolas. La segunda macromolécula, por tamaño, sólo puede encontrarse entre las bolas. El flujo de disolvente es más elevado entre las bolas que en el interior de los poros de éstas, por lo que el efecto neto es el de acelerar el desplazamiento de las macromoléculas de mayor peso molecular respecto al de las de menor peso molecular. En esta cromatografía se eluyen primero las macromoléculas mayores, y en segundo lugar las menores, y tiene una gran influencia en el resultado la longitud de la columna y el volumen de la misma. Columnas largas aseguran separaciones de mayor calidad.

Empleando patrones de macromoléculas de masa molecular conocida se pueden construir curvas de calibrado que posteriormente permitan la determinación de la masa molecular de macromoléculas de tamaño desconocido. El rango de trabajo de las fases estacionarias se define como el intervalo de masas moleculares que pueden ser separadas. Otro parámetro que caracteriza a este tipo de 7 fases es su límite de exclusión que se define como la masa molecular a partir de la cual los compuestos pasarán a través del lecho estacionario sin experimentar retención.

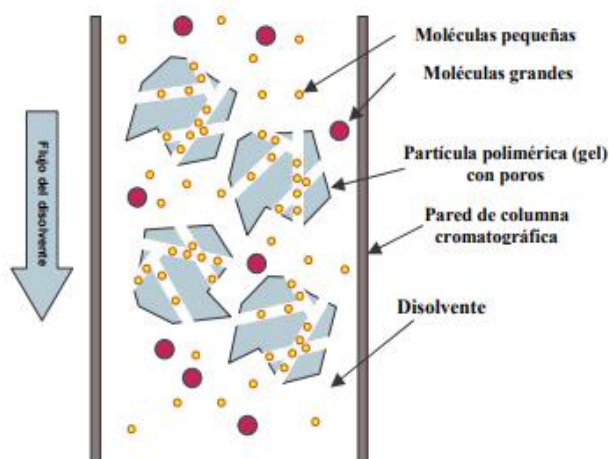
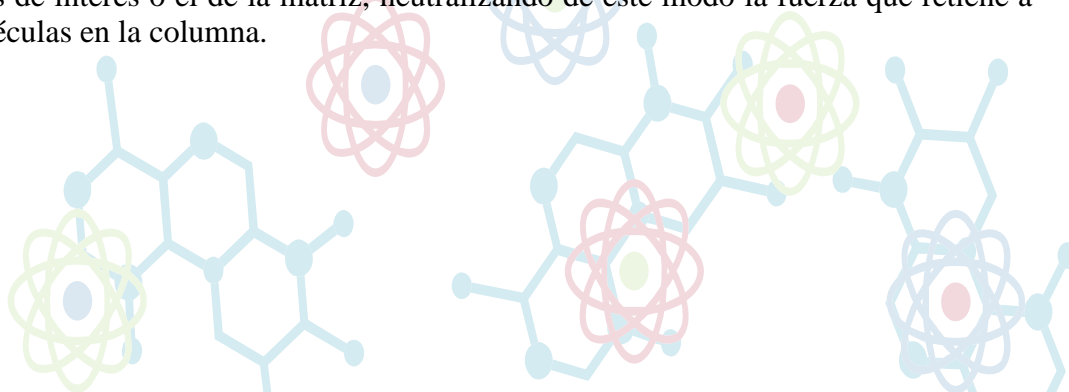


Figura 2.1.- Esquema del proceso de separación por cromatografía de exclusión por tamaños.

Cromatografía de Intercambio Iónico

La separación se basa principalmente en la diferente afinidad para el intercambio de iones de los componentes de la muestra (Figura 2.2). Actualmente, cuando se lleva a cabo sobre columnas de partículas pequeñas y elevada eficiencia, y empleando habitualmente detectores conductimétricos o espectroscópicos, se denomina cromatografía de iones (IC). La cromatografía de intercambio iónico se realiza sobre matrices que tienen una carga neta (positiva en el esquema de la Figura 2.2). La carga de la matriz de la columna así como la carga de las moléculas dependerá del pH del disolvente y de su fuerza iónica (proporcional a la concentración de iones). En unas condiciones determinadas serán retenidas en la columna las moléculas o especies que tengan una carga complementaria a la de la matriz del gel (las moléculas cargadas negativamente serán retenidas por una matriz cargada positivamente), siendo eluidas las restantes. Para eluir las moléculas retenidas se puede variar la carga iónica del disolvente o su pH de forma que se alcance el punto isoeléctrico de la moléculas o especies de interés o el de la matriz, neutralizando de este modo la fuerza que retiene a las moléculas en la columna.



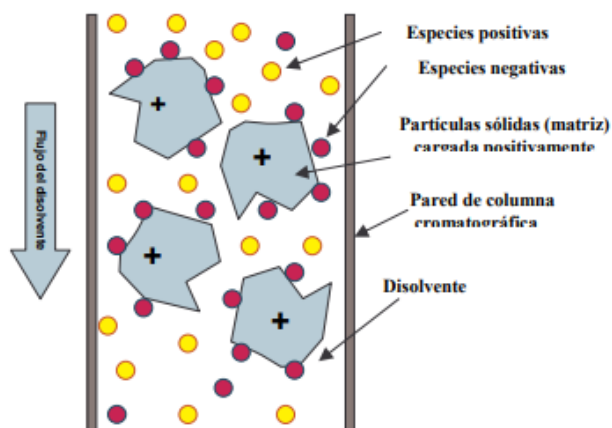


Figura 2.2. Esquema del proceso de separación por cromatografía de intercambio iónico.

Cromatografía de Afinidad

Esta expresión caracteriza una variedad particular de cromatografía en la que se utiliza para la separación la especificidad biológica singular respecto a la interacción entre analito y ligando.

TÉCNICAS ESPECIALES

Cromatografía con fase invertida

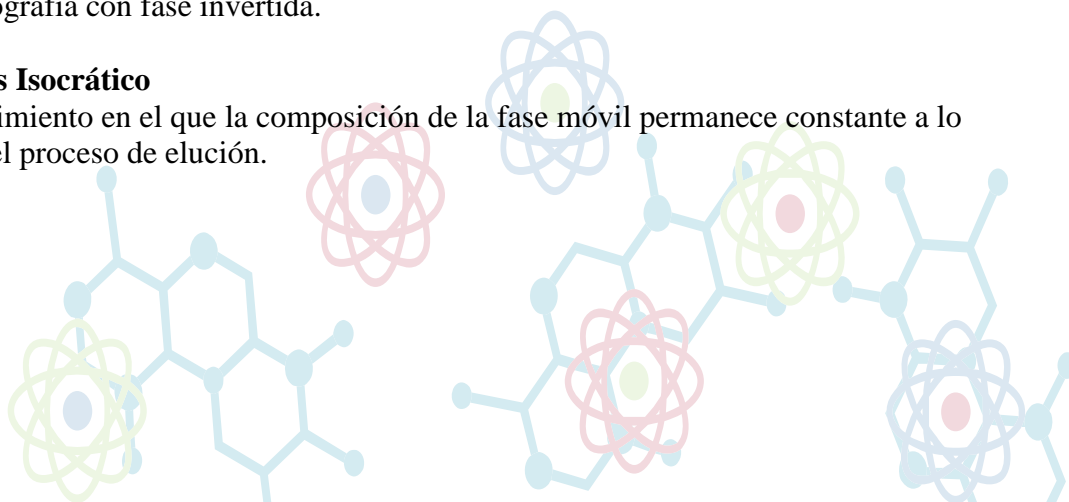
Procedimiento de elución empleado en cromatografía líquida en el cual la fase móvil es significativamente más polar que la estacionaria; por ejemplo, un material microporoso de base silíceo con cadenas alquilo unidas químicamente. Nota: el término "fase reversa" es una expresión incorrecta que debe evitarse (en inglés, debe decirse Reversed Phase y no Reverse Phase).

Cromatografía con Fase Normal

Procedimiento de elución en el que la fase estacionaria es más polar que la fase móvil. Este término se usa en cromatografía líquida para resaltar el contraste con la cromatografía con fase invertida.

Análisis Isocrático

Procedimiento en el que la composición de la fase móvil permanece constante a lo largo del proceso de elución.



Elución con Gradiente

Procedimiento en el que la composición de la fase móvil cambia, de forma continua o en etapas, a lo largo del proceso de elución.

Elución en Etapas o Escalonada

Proceso de elución en el que se cambia la composición de la fase móvil en etapas o escalones durante un sólo desarrollo de la cromatografía.

Cromatografía Bidimensional

Procedimiento en el que parte o todos los componentes de la muestra se someten, una vez separados, a etapas adicionales de separación. Esto se puede hacer, por ejemplo, conduciendo a una fracción en particular que eluye de la columna hacia otra columna (o sistema) que tenga diferentes características de separación. Cuando se combina con etapas de separación adicionales, se puede hablar de cromatografía multidimensional. En la cromatografía plana, cromatografía bidimensional se refiere al proceso cromatográfico que hace que los componentes migren primero en una dirección y luego en otra perpendicular a ella; las dos eluciones se llevan a cabo con eluyentes diferentes.

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS NO INSTRUMENTALES

De las técnicas clásicas de cromatografía no instrumentales, solamente continúan teniendo utilización amplia las de columna y capa fina, dado que la cromatografía sobre papel ha sido prácticamente relegada por esta última. Estos dos métodos son particularmente útiles a escala preparativa, aunque en el caso de la cromatografía de capa fina sigue utilizándose ampliamente como método analítico.

Cromatografía en columna

La característica fundamental de la cromatografía clásica en columna es que el gradiente de presión necesario para el desplazamiento de la fase móvil a través de la fase estacionaria, está originado por gravedad. La cromatografía en columna se puede basar en cualquier mecanismo de separación y, en consecuencia, se puede utilizar con cualquier fase estacionaria y fase móvil a condición de que esta última sea líquida. Los lechos cromatográficos utilizados para columnas, son generalmente de un solo uso y se preparan en el propio laboratorio. La Figura 2.9 muestra un esquema de una columna de gravedad. El recipiente es normalmente un tubo de vidrio provisto de algún tipo de llave para regular el flujo de la fase móvil. Es muy importante que la fase estacionaria esté distribuida de forma homogénea, sin fracturas ni burbujas de aire, siendo también fundamental que los extremos de la columna sean planos para evitar eluciones simultáneas de más de una fracción, especialmente si la capacidad de separación de la columna no es muy grande. El método más recomendable de llenado consiste en añadir al tubo, una vez colocado en posición vertical, una pasta formada con la fase estacionaria y un disolvente de menor actividad que la fase móvil a utilizar, dejando salir el disolvente sobrante a medida que la fase estacionaria va sedimentando.

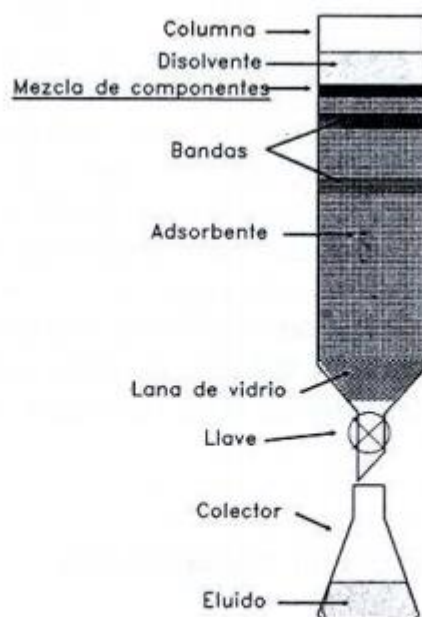
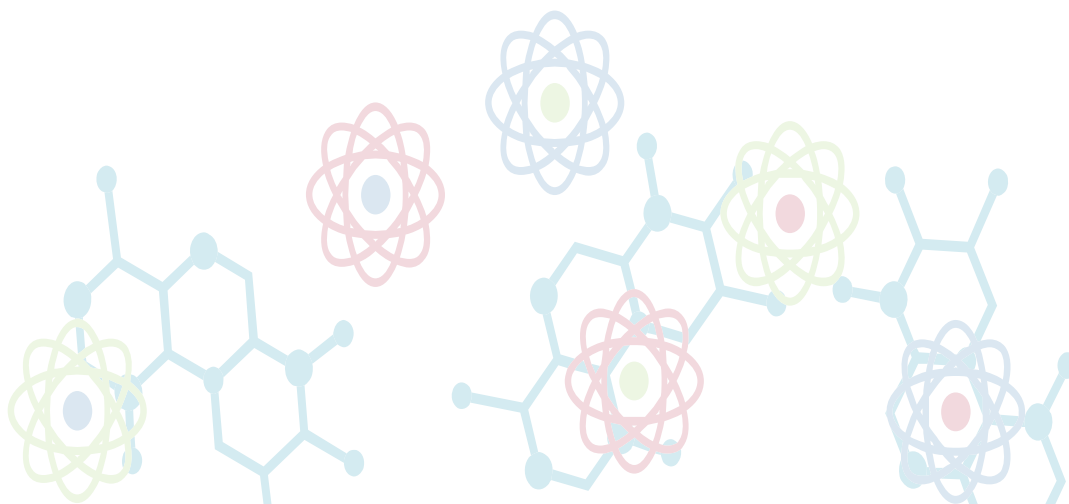
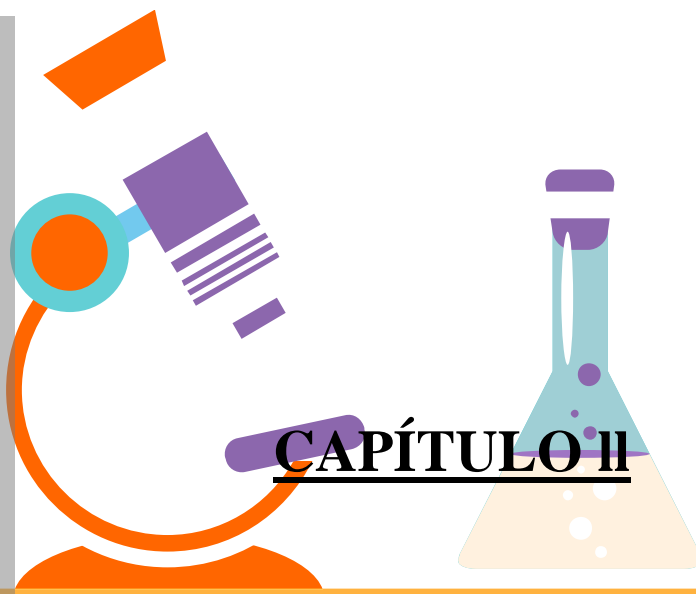
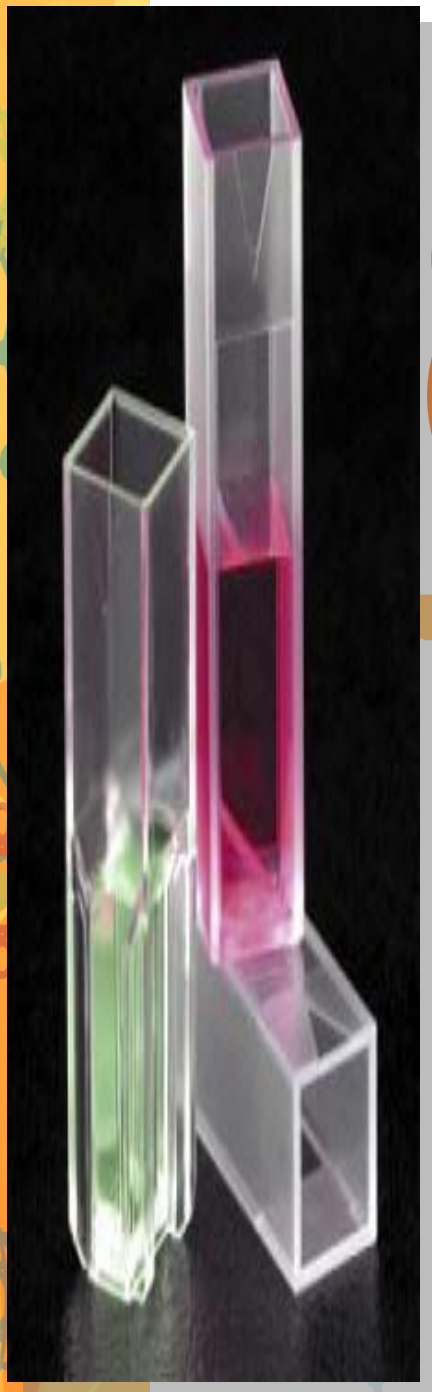


Figura 2.9.- Esquema de una columna de gravedad (Figura tomada de: ALBELLA, J.M.; CINTAS, A.M.; MIRANDA, T. y SERRATOSA, J.M.: "Introducción a la ciencia de materiales". C.S.I.C., 1993).

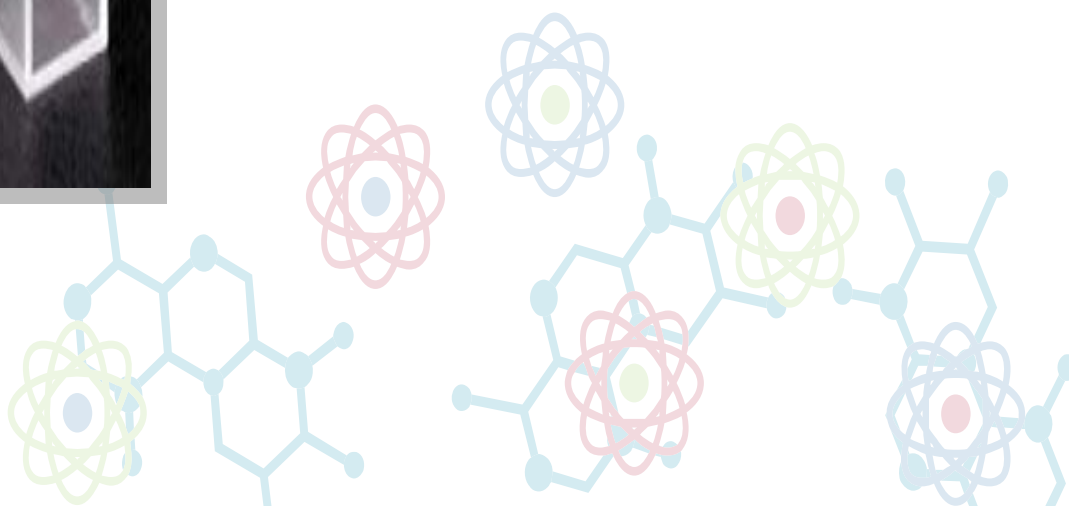
La capacidad de separación de las columnas de gravedad no es muy grande ya que su eficacia se encuentra limitada por el tamaño de las partículas de la fase estacionaria que debe ser bastante alto (70-230 mallas ASTM) para permitir un caudal razonable de la fase móvil. La cantidad de fase estacionaria y el tamaño de la columna también limitan su capacidad de separación. Como norma general, se utilizan de 20 a 30g de fase estacionaria por gramo de mezcla a separar, pudiéndose llegar hasta relaciones de 100:1 para separaciones especialmente difíciles. La relación entre el diámetro y la longitud de la columna es también importante, ya que columnas demasiado cortas no proporcionarán espacio suficiente para lograr la separación. En general, las relaciones longitud/diámetro para este tipo de columnas deben oscilar entre 8:1 y 10:1. Las columnas de gravedad operan normalmente por elución, y el control del contenido de la fase eluida se realiza en la práctica recogiendo un gran número de pequeñas fracciones que se analizan por medio de alguna otra técnica, normalmente cromatografía de capa fina.





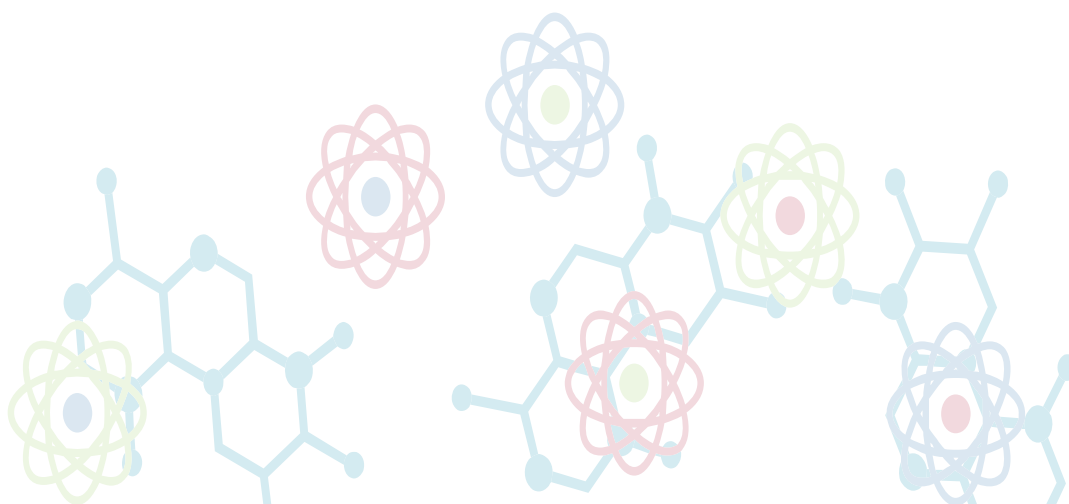
CAPÍTULO II

ESPECTROFOTOMETRÍA



INTRODUCCIÓN

La espectrofotometría es uno de los métodos de análisis más usados, y se basa en la relación que existe entre la absorción de luz por parte de un compuesto y su concentración. Cuando se hace incidir luz monocromática (de una sola longitud de onda) sobre un medio homogéneo, una parte de la luz incidente es absorbida por el medio y otra transmitida, como consecuencia de la intensidad del rayo de luz sea atenuada desde P_0 a P , siendo P_0 la intensidad de la luz incidente y P la intensidad del rayo de luz transmitido. Dependiendo del compuesto y el tipo de absorción a medir, la muestra puede estar en fase líquida, sólida o gaseosa. En las regiones visibles y ultravioleta del espectro electromagnético, la muestra es generalmente disuelta para formar una solución. Cada sustancia tiene su propio espectro de absorción, el cual es una curva que muestra la cantidad de energía radiante absorbida, Absorbancia, por la sustancia en cada longitud de onda del espectro electromagnético, es decir, a una determinada longitud de onda de la energía radiante, cada sustancia absorbe una cantidad de radiación que es distinta a la que absorbe otro compuesto.



HISTORIA DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA

El espectrofotómetro se inventó en 1940, por Arnold J. Beckman y sus colegas en los



Laboratorios National Technologies, la empresa que Beckman había comenzado en 1935. Fueron conducidos por el líder de proyecto Howard H. Cary. El espectrofotómetro fue el mayor descubrimiento de la compañía. En la década de 1950 se comienza a utilizar el espectrofotómetro en E.U. éste eliminó el comparador de color logrando así que los análisis fuesen más cuantitativos, confiables, e incrementando la y la exactitud.

- **Diseño:** Al principio, hubo problemas de rendimiento con el espectrofotómetro. Estos problemas llevaron a cambios en el diseño. El espectrofotómetro modelo B utilizó un prisma de cuarzo en lugar de un prisma de cristal, lo que mejoró las capacidades ultravioletas del dispositivo. El modelo C continuó con los cambios que elevaron la resolución de la longitud de onda en el ultravioleta y se realizaron tres espectrofotómetros posteriores al modelo C. En 1941, el Modelo D, también conocido como el Modelo DU, fue producido con una lámpara de hidrógeno y otras mejoras. Este diseño se mantuvo esencialmente sin cambios desde 1941 hasta 1976, cuando fue discontinuado.

Para cuando la producción del Modelo DU se interrumpió en 1976, se habían vendido más de 30.000 modelos DU y DU-2. Este instrumento fue utilizado en clínicas, laboratorios industriales y en la química y bioquímica. Bruce Merrifield, premio Nobel y autor fue citado diciendo que el espectrofotómetro era "probablemente el instrumento más importante que se haya desarrollado hacia el avance de la ciencia biológica".

- **Avances:** En 1981, Cecil Instrumentos produjo un espectrofotómetro que era controlado por microprocesador. Este automatizó el dispositivo y mejoró la velocidad, además de ser más confiable que otras versiones realizadas en esa época. De 1984 a 1985, se desarrollaron versiones con doble haz que se convertirían en el modelo de la serie 4000. Con la década de 1990 llegó la adición de un software externo que proporcionaba control mediante PC y pantallas de información con los espectros. Hoy en día, el desarrollo del espectrofotómetro continúa y sus aplicaciones van desde la ciencia y la medicina, hasta la investigación de la escena del crimen y otros usos policiales.

¿QUE ES ESPECTROFOTOMETRÍA?

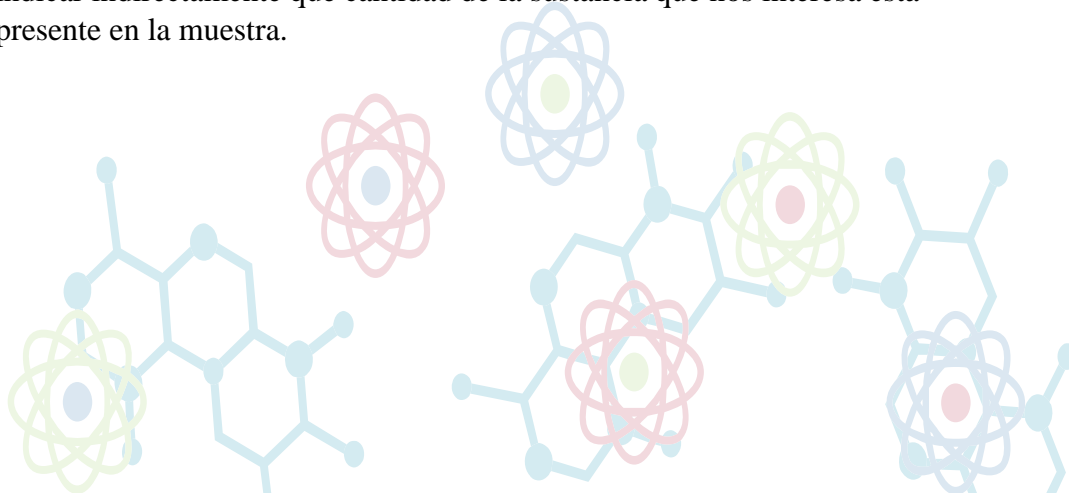
El espectrofotómetro es un instrumento usado en la física óptica que sirve para medir, en función de la longitud de onda, la relación entre valores de una misma magnitud fotométrica relativos a dos haces de radiaciones. También es utilizado en los laboratorios de química para la cuantificación de sustancias y microorganismos. Hay varios tipos de espectrofotómetros, puede ser de absorción atómica o espectrofotómetro de masa.

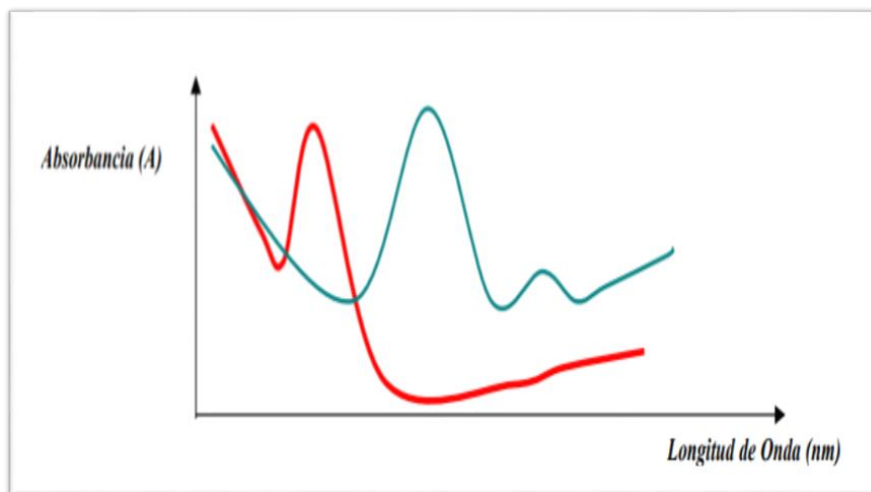


FUENTE: (EL ESPECTROFOTOMETRO, 2018).

Este instrumento. Es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma. Esto le permite al operador realizar dos funciones:

- Dar información sobre la naturaleza de la sustancia en la muestra.
- Indicar indirectamente qué cantidad de la sustancia que nos interesa está presente en la muestra.





FUENTE: (LUIS ENRIQUE SALINAS MÉNDEZ., 2014).

Absorbancia (A): se define como el logaritmo negativo de la transmitancia, y se observa que la absorbancia y la transmitancia tienen una relación inversa, como se muestra a continuación:

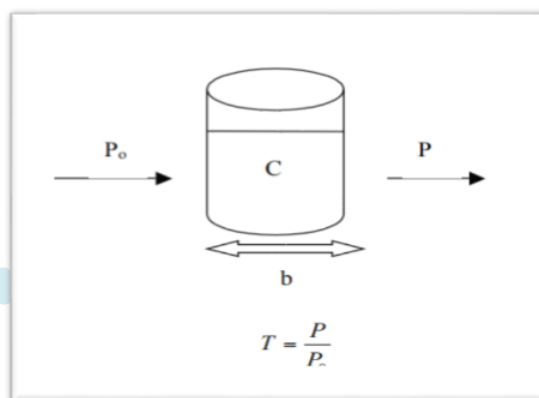
$$\text{Absorbancia} = -\log(T) = -\log(P/P_0).$$

Esto permite que diferentes espectrofotómetros con diferentes fuentes de luz produzcan lecturas de absorción independientes de la potencia de la fuente de luz.

LEYES APLICADAS A LA TÉCNICA

LEY DE LAMBERT

La cantidad de radiación electromagnética absorbida por un analito se puede relacionar cuantitativamente con la concentración de dichas sustancias en solución. La transmitancia (T) se define como la fracción de radiación incidente transmitida por la disolución. Si la potencia radiante que incide sobre la disolución es P_0 y P la potencia radiante que sale, entonces:

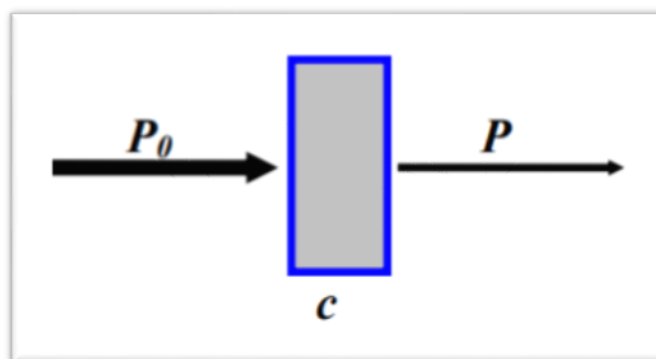
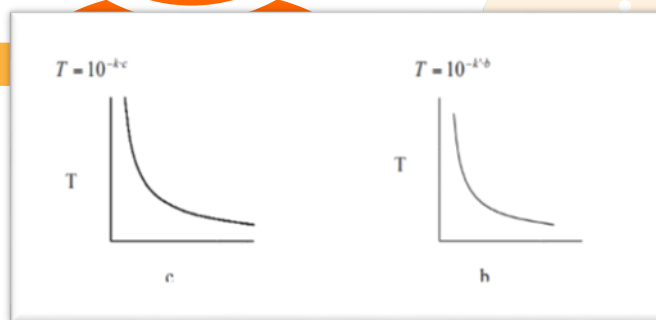


- **P₀**: Intensidad de la luz incidente.
- **P**: Intensidad de la luz transmitida.
- **B**: Espesor del medio absorbente.
- **K**: Constante, cuyo valor depende de la naturaleza del soluto, de la longitud de onda de la luz incidente, del espesor del medio absorbente y de la naturaleza del medio.

Se puede analizar la potencia de la energía transmitida disminuye geoméricamente (exponencialmente) con la concentración C y con la distancia b recorrida a través de la disolución.

LEY DE BEER

La intensidad de un haz de luz monocromática disminuye exponencialmente al aumentar aritméticamente la concentración de la sustancia absorbente, cuando este haz pasa a través de un medio homogéneo.



$$P / P_0 = e^{-k'c}$$

- P₀**: Intensidad de la luz incidente.
- P**: Intensidad de la luz transmitida.
- C**: Concentración de la solución.
- K**: Constante, cuyo valor depende de la naturaleza del soluto, de la longitud de onda de la luz incidente, de la concentración de la solución, y frecuentemente, de la naturaleza del medio.

NORMAS ESTANDARIZADAS

ESPECTROFOTÓMETRO NTC 3885.

HIGIENE INDUSTRIAL. EVALUACIÓN DE LOS CONTAMINANTES QUÍMICOS. DETERMINACIÓN DE PLOMO EN MUESTRAS AMBIENTALES. MÉTODO DE ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON SISTEMA DE LLAMA. MÉTODO NIOSH 7082/84.

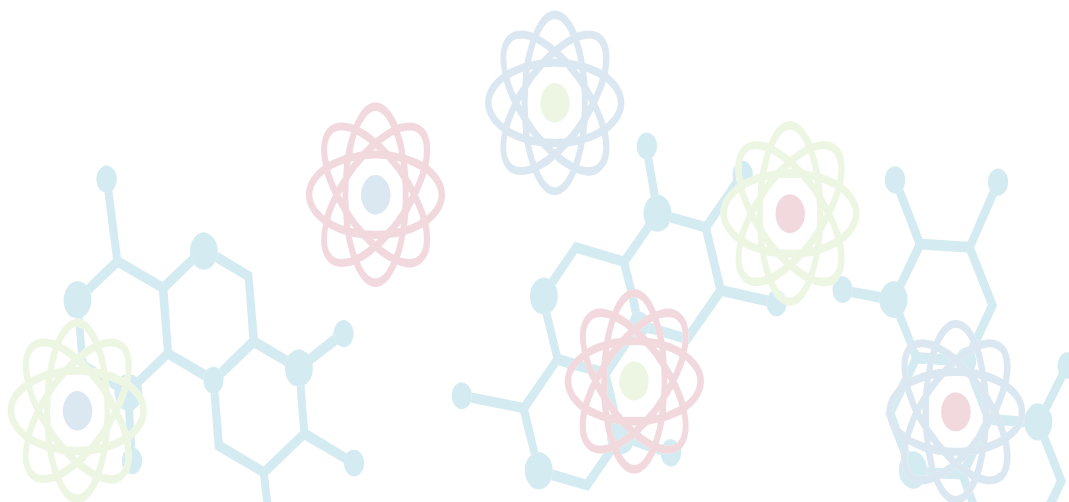
Esta norma tiene por objeto establecer los métodos de ensayo para la evaluación de plomo en el ambiente de trabajo por Espectrofotometría de Absorción Atómica con sistema de llama, con el fin de realizar una evaluación higiénica industrial.

NORMA TÉCNICA NTC COLOMBIANA 4124-3.

GESTIÓN AMBIENTAL. CALIDAD DEL AGUA. DETERMINACIÓN DEL SODIO Y POTASIO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE EMISIÓN DE LLAMA.

CAMPO DE APLICACIÓN Esta norma especifica un método para determinar el sodio y potasio disueltos mediante la espectrometría de la emisión de llama (FES por sus siglas en inglés). Está destinado para el análisis de aguas residuales y potables.

Este método es aplicable para muestras de agua que contengan una concentración másica de sodio y potasio de hasta 10 mg/l. Para muestras que contengan concentraciones más altas de estos elementos, se debe tomar una porción de muestra más pequeña para el análisis. Los límites más bajos de determinación son inferiores a 0,1 mg/l tanto para sodio como para potasio.



TIPOS DE ESPECTROFOTOMETROS**ESPECTROFOTÓMETRO DE HAZ SIMPLE:**

Los instrumentos de simple haz son aquellos en los cuales el haz de luz sigue una única trayectoria entre la fuente y el detector. La banda de luz atraviesa la muestra que se



halla contenida en una celda, la luz transmitida por la muestra pasa al detector originándose una corriente eléctrica que por medio de diferentes circuitos permite observar una señal, ya sea el movimiento de una aguja o señal digital o un registro gráfico.

ESPECTROFOTÓMETRO DE DOBLE HAZ EN EL ESPACIO:

En los instrumentos de doble haz la luz proveniente de la fuente es dividida en dos haces después de salir del monocromador mediante un sistema de espejos divisores. Esta división produce dos haces de luz, uno de ellos se dirige a la celda de referencia, que contiene el blanco, y el otro haz se dirige hacia la celda de muestra. Los dos haces de luz después de atravesar la celda de referencia y la de muestra llegan a detectores separados para obtener la señal correspondiente.



Los sistemas de doble haz tienen la ventaja de que cualquier variación en la intensidad de la fuente, la eficiencia de la red, la reflectividad de los espejos, la fotosensibilidad del detector, etc. afecta simultáneamente a los dos haces. En consecuencia, la relación de energía de los dos haces permanece siempre constante.

ESPECTROFOTÓMETRO DE HAZ DOBLE EN EL TIEMPO:

Utilizan los mismos componentes que el espectrofotómetro de haz simple. Dos haces de luz pasan por los mismos componentes pero no al mismo tiempo. Emplean un “Chopper” consistente en un interruptor rotativo del haz luminoso colocado a continuación de la rendija de salida. Un sistema de espejos dirige la porción de luz reflejada por el “chopper” a través de una cubeta de referencia y de ahí al detector común. El detector lee alternativamente el haz procedente de la muestra y el de la cubeta de referencia. Esto compensa la variación de energía radiante.



ESPECTROFOTOMETRO DE ABSORCION ATOMICA :

Para evaluar la concentración de un analito en una muestra. Se basa en gran medida en la ley de Beer-Lambert. En resumen, los electrones de los átomos en el atomizador pueden ser promovidos a orbitales más altos por un instante mediante la absorción de una cantidad de energía (es decir, luz de una determinada longitud de onda). Esta cantidad de energía (o longitud de onda) se refiere específicamente a una transición de electrones en un elemento particular, y en general, cada longitud de onda corresponde a un solo elemento.



ESPECTROFOTOMETRO DE ABSORCION MOLECULAR :

Las técnicas espectroscópicas de análisis se basan en la observación de las interacciones entre la materia y la radiación electromagnética. La especialidad de la detección del analito se basará en la selección de longitud de onda de la radiación absorbida en la región visible y ultravioleta.



ESPECTROFOTOMETRO DE SMART MINI:

De simple haz, portátil Rango de longitudes de onda: 350 - 1000nm Exactitud de longitud de onda: +/- 2nm Resolución de longitud de onda: 1nm Ancho de banda: 5nm (máximo) Luz espúrea: menor a 0,5%T Sistema óptico: Monocromador de montaje Ebert modificado con red de difracción de 1200 líneas por mm Modos de medición: %T, Abs. Y Conc Calibración fotométrica: automática.



APLICACIONES DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA

Este instrumento tiene distintos usos, entre ellos se tiene para el análisis cuantitativo en diversas áreas como es el caso de la química, física, biología, bioquímica, materiales e ingeniería química, aplicaciones clínicas, industriales, etc.

Cualquier aplicación que trata con sustancias químicas o materiales puede utilizar esta técnica. En bioquímica, por ejemplo, sus usos son para determinar las reacciones enzima-catalizadores. En la aplicación clínica, se utiliza para examinar la sangre o los tejidos para el diagnóstico clínico.

Son ampliamente utilizados en muchas industrias incluyendo semiconductores, láser y fabricación óptica, impresión y examinación forense, así como en laboratorios para el estudio de las sustancias químicas, también se utiliza para la medición de la transmitancia o reflectancia de sólidos transparentes u opacos, como el vidrio pulido, o gases. Sin embargo, también puede ser utilizado para medir la difusividad en cualquiera de los intervalos de luz que generalmente cubren alrededor de los 200 nm – 2,500 nm utilizando calibraciones y controles diferentes. Dentro de estas gamas de luz, se necesitan calibraciones de la máquina utilizando los estándares que varían en tipo según la longitud de onda de la determinación fotométrica. En definitiva, un espectrofotómetro es capaz de determinar, según el control o calibración, qué sustancias están presentes en un objetivo y exactamente cuánto, mediante cálculos de longitudes de onda observadas.



FUENTE: (EL ESPECTROFOTOMETRO, 2018)

Hay dos clases principales de dispositivos:

- De haz simple.
- De doble haz.

Un espectrofotómetro de doble haz compara la intensidad de luz entre dos caminos de luz, un camino que contiene una muestra de referencia y la otra la muestra de prueba. **Un espectrofotómetro de haz simple** mide la intensidad relativa de la luz del haz antes y después de atravesar una muestra de prueba.

Aunque las medidas de comparación de instrumentos de doble haz son relativamente más fácil y más estables, los instrumentos de haz simple pueden tener un rango dinámico mayor y son ópticamente más compactos. Además, algunos instrumentos especializados, tales como espectrofotómetro en microscopios o telescopios, son instrumentos de haz simple debido a la practicidad.

Los más modernos espectrofotómetros de infrarrojos utilizan una técnica de transformada de Fourier para obtener la información espectral. La técnica se llama espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier.

Al hacer las mediciones de transmisión, el espectrofotómetro compara cuantitativamente la fracción de luz que pasa a través de una solución de referencia y una solución de prueba. Para medidas de reflectancia, el espectrofotómetro compara cuantitativamente la fracción de luz que se refleja de la muestra de referencia y muestra de prueba. Luz de la lámpara fuente se pasa a través de un monocromador, que difracta la luz en un “arco iris” de longitudes de onda y salidas de anchos de banda estrechas de este espectro de difracción. Las frecuencias discretas son transmitidas a través de la muestra.

El valor de transmitancia o reflectancia para cada longitud de onda de la muestra se compara con los valores de transmisión (o reflexión) de la muestra de referencia. Muchos espectrofotómetros más viejos deben ser calibrados con un procedimiento conocido como “reducción a cero.” La absorbancia de una sustancia de referencia se establece como un valor de referencia, por lo que las absorbancias de todas las demás sustancias se registran en relación con la sustancia inicial “cero”.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras líquidas pueden ser prensadas entre dos planchas de una sal de alta pureza (como el cloruro de sodio). Estas placas deben ser transparentes a la luz infrarroja para no introducir ninguna línea en el espectro de la muestra. Las placas obviamente son solubles en agua, por lo que la muestra, los reactivos de lavado y el medio deben ser anhidros (es decir, sin agua).

Las muestras sólidas se preparan mezclando una cierta cantidad de muestra con una sal altamente purificada (por lo general bromuro de potasio). Esta mezcla se tritura y se prensa con el fin de formar una pastilla por la que pueda pasar la luz. La pastilla necesita ser prensada a altas presiones para asegurar que sea translúcida, pero esto no puede lograrse sin un equipo adecuado (por ejemplo, una prensa hidráulica). Al igual que el cloruro de sodio, el bromuro de potasio no absorbe la radiación infrarroja, por lo que las únicas líneas espectrales provendrán del analito

COMPONENTES DEL ESPECTROFOTÓMETRO

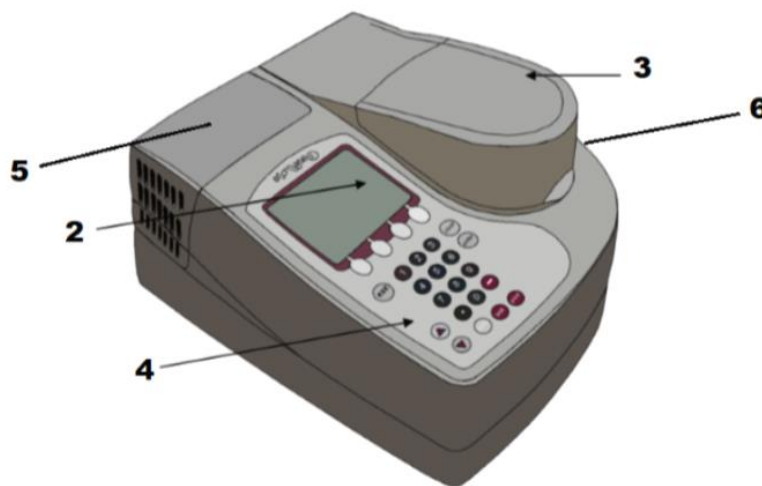
Las fuentes de radiación son generalmente lámparas de tungsteno o tungsteno-halógeno para proveer de una radiación continua adecuada del espectro visible al infrarrojo cercano. Para la capacidad de radiar con los UV se necesita una lámpara de H₂ o D₂. Una lámpara de D₂ es generalmente preferida que una lámpara de H₂ por que emite una radiación tres veces mayor. Por simplicidad, una lámpara de D₂ y H₂ puede servir como una sola fuente para emitir en la región UV-visible aunque la radiación en el espectro visible es más pequeña que la emitida por una lámpara de tungsteno y al mismo tiempo poco estable. En algunos instrumentos la fuente de radiación es modulada con un dispositivo mecánico.

Absorción máxima y coeficientes de extinción de cromóforos en sistemas biológicos

Compuesto	Absorción máxima $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Coefficiente de extinción molar $\epsilon \times 10^{-3}$ ($M^{-1} \text{cm}^{-1}$)
NADH	260	~15
	340	6.2
FAD	260	~15
	375	~9
	445	11
-caroteno	~450	~12
Ácido linoleico (<i>trans-trans</i>)	231	35
Ácido linoleico (<i>cis-trans</i>)	234	24.5
Tryptofano	280	5.6
	219	47
Tirosina	274	1.4
	222	8
	193	48
Fenilalanina	257	0.2
	206	9.3
	188	60
DNA	258	6.6
RNA	258	7.4
Colesterol	~235	20

FUENTE. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PARTES DEL ESPECTROFOTÓMETRO



- 2. Pantalla digital:** Consiste en un ordenador conectado a un vídeo proyector que muestra la señal de dicho ordenador sobre una superficie lisa y rígida, sensible o no, al tacto, desde la que se puede controlar el ordenador hacer anotaciones manuscritas sobre cualquier imagen proyectada, así como, también, guardarlas, imprimir las, enviarlas por correo electrónico y exportarlas en diversos formatos.

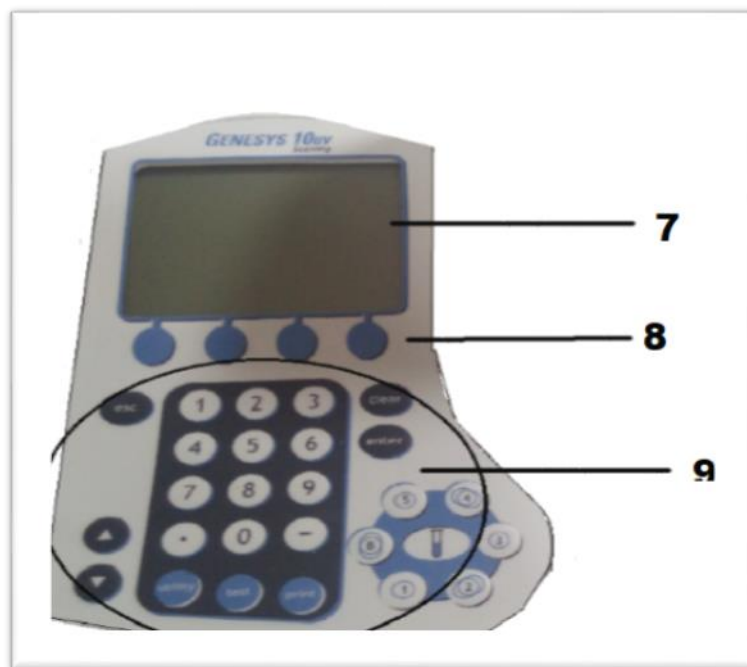
3. Tapa del compartimiento de muestras: Es donde se deposita las muestras, en la porta cubetas en la cual queda segura ya que tiene unos orificios para anexas las cubetas y que no se vayan a partir.

4. Teclado: es un dispositivo que permiten introducir datos o información en el espectrofotómetro para que esta los procese u ordene.

5. Impresora interna opcional: Que permite producir una gama permanente de textos o gráficos de documentos almacenados en un formato electrónico, imprimiéndolos en medios físicos, normalmente en papel, utilizando cartuchos de tinta o tecnología láser.

6. Puerta de compartimiento de la lámpara: Es un dispositivo que transforman una energía eléctrica o química en energía lumínica. es responsable del control y la distribución de la luz emitida por la lámpara. Es importante, que en el diseño de su sistema óptico se cuide la forma y distribución de la luz.

CONTROLES E INDICADORES



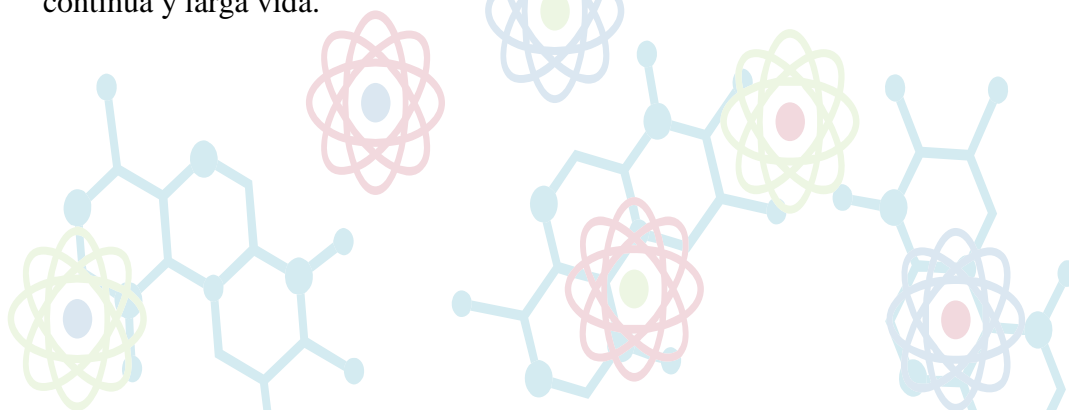
7. Panel de lectura: Muestra las lecturas de absorbancia, transmitancia y la concentración de los compuestos en las soluciones contenidas en la celda. Asimismo, indica la programación que se está haciendo del equipo.

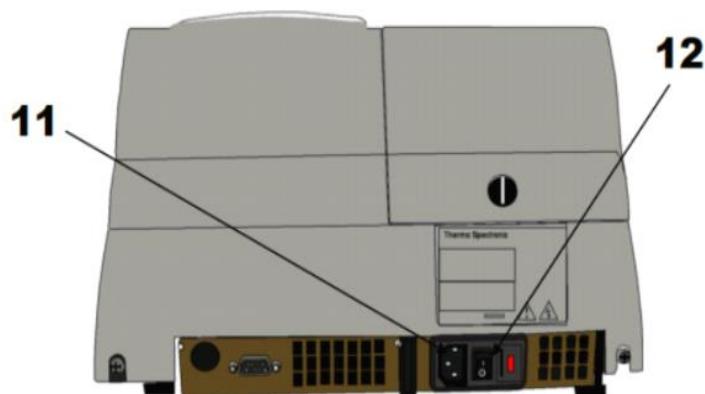
8. **Tecla de función:** Ajusta y establece cambios en los parámetros de medición, a través de los teclados numéricos, de programación y de funciones.
9. **Tecla numeración y programación :** El teclado numérico ajusta los cambios en la longitud de onda y tiempo de la determinación, y los de programación y funciones incluyen las teclas “esc”, “clear”, “enter” ▲, ▼ y, “test”, “utility”, “print” que permiten que el espectrofotómetro funcione como una microcomputadora.

CONEXIÓN Y CALIBRACIÓN AUTOMÁTICA DEL EQUIPO



9. **Portacelda:** Donde se anexa los tubos de muestras.
10. **Lente receptor (interior):** La fuente de luz ilumina la muestra química o biológica, pero para que realice su función debe cumplir con las siguientes condiciones: estabilidad, direccionalidad, distribución de energía espectral continua y larga vida.



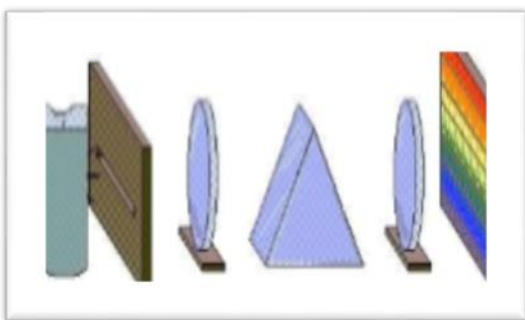


11. Entrada hembra para el cable de corriente: Este dispositivo permite que se conecte uno al otro para establecer una conexión que permita el paso de la corriente eléctrica.

12. Interruptor de encendido / apagado: Es un dispositivo que permite desviar o interrumpir el curso de una corriente eléctrica. En el mundo moderno sus tipos y aplicaciones son innumerables, desde un simple interruptor que apaga o enciende el espectrofotómetro.

COMPONENTES INTERNOS DEL ESPECTROFOTÓMETRO

FUENTES:



La fuente de luz ilumina la muestra química o biológica, pero para que realice su función debe cumplir con las siguientes condiciones: estabilidad, direccionalidad, distribución de energía espectral continua y larga vida.

LÁMPARA DE DEUTERIO E HIDRÓGENO:



Produce un espectro continuo en la región UV. Absorbe fuertemente a longitudes de onda menores que 350 nm, las lámparas de deuterio requieren la utilización de cubetas de cuarzo.

LÁMPARA DE FILAMENTO DE TUNGSTENO:



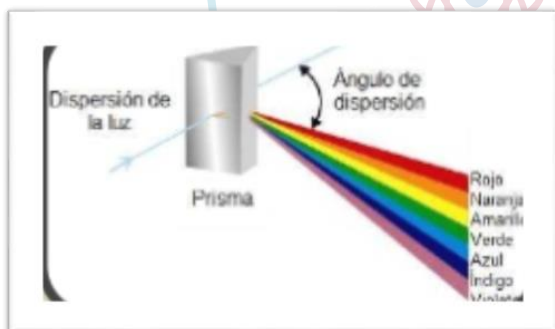
Es la fuente más común de radiación visible e infrarrojo cercano, se utiliza en la región de longitud de onda de 350 a 2500 nm.

LÁMPARA DE ARCO DE XENÓN:



Emite luz producida por un arco eléctrico (también llamado arco voltaico). Este tipo de fuente se usa en EU como repuestos para los exámenes de ingeniería. El tipo de lámpara se nombra según el gas en este caso xenón. Pero también puede ser: neón, argón, kriptón, sodio, haluro metálico y mercurio.

SELECTORES DE LA LONGITUD DE ONDA:



Es la parte más importante del equipo, determinando en gran parte su calidad. Son dispositivos que filtran el espectro producido por la fuente, dejando "pasar"

sólo radiaciones en un rango de longitud de onda determinada.

FILTROS DE ABSORCIÓN:



Produce un espectro continuo en la región UV. Absorbe fuertemente a longitudes de onda menores que 350 nm, las lámparas de deuterio requieren la utilización de cubetas de cuarzo.

FILTROS DE INTERFERENCIA:



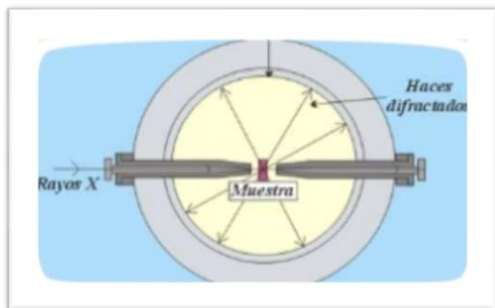
Proporciona bandas de radiación bastante más estrechas que el filtro de absorción. Su funcionamiento se basa en la interferencia óptica, esto es, la interferencia destructiva entre la radiación que se quiere eliminar.

EL MONOCROMADOR:



Aísla las radiaciones de longitud de onda deseada, logrando obtener luz monocromática. Un monocromador está constituido por las rendijas de entrada y salida, colimadores y el elemento de dispersión. Existen dos tipos, los de red y los de prisma. Los principios de su funcionamiento están fuera de los alcances de esta guía.

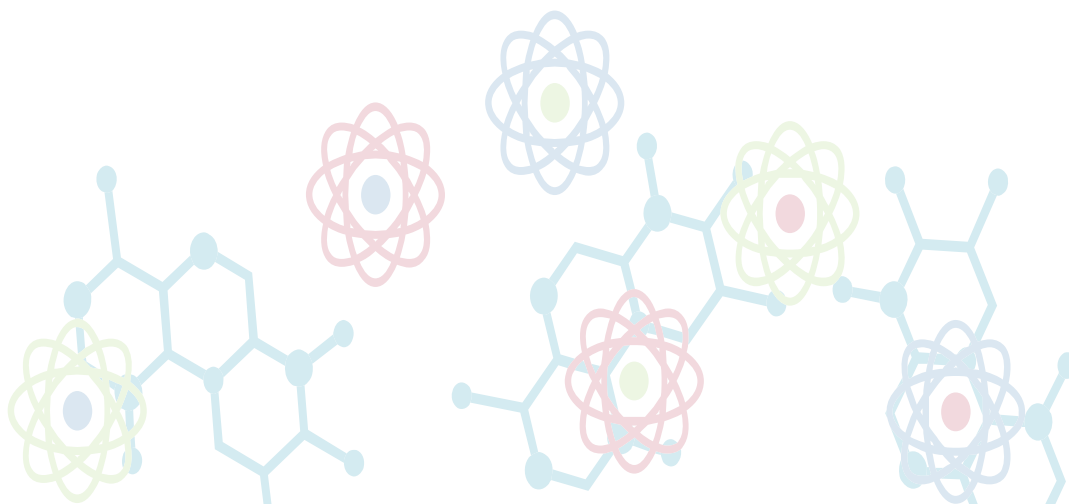
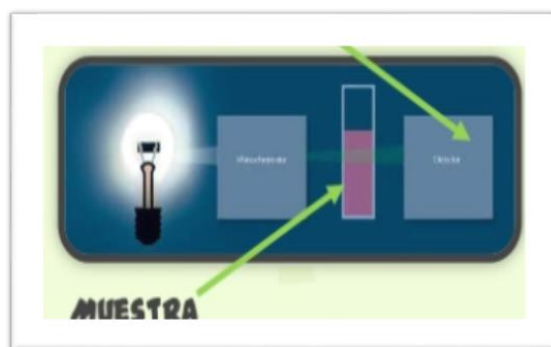
EL COLIMADOR:



Es un lente que lleva el haz de luz entrante con una determinada longitud de onda hacia un prisma, el cual separa todas las longitudes de onda de ese haz logrando que se redireccionen hacia la rendija de salida.

DIRECTOR:

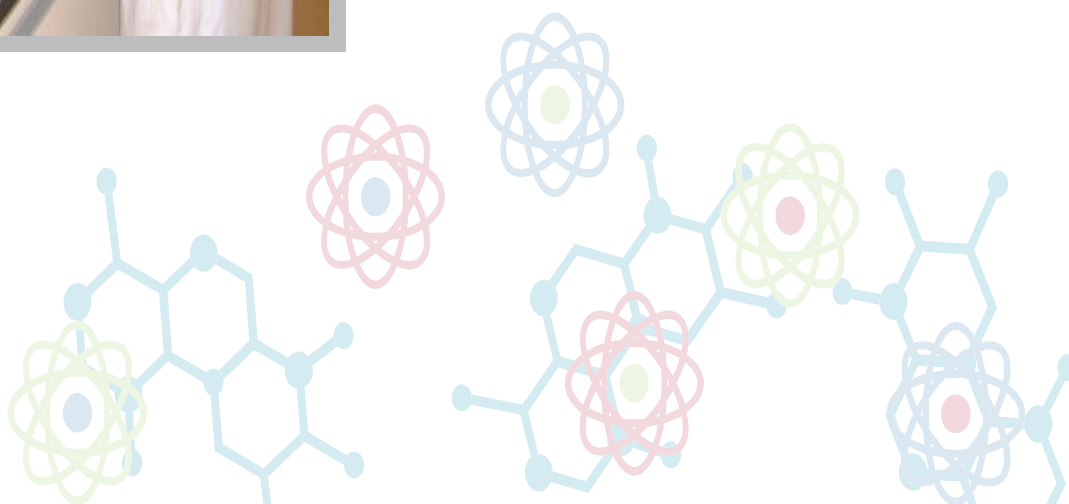
Convierte la energía radiante en una señal eléctrica. Detector se encarga de evidenciar una radiación para que posteriormente sea estudiada y saber a qué tipo de respuesta se enfrentarán (fotones o calor).





CAPÍTULO III

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR)



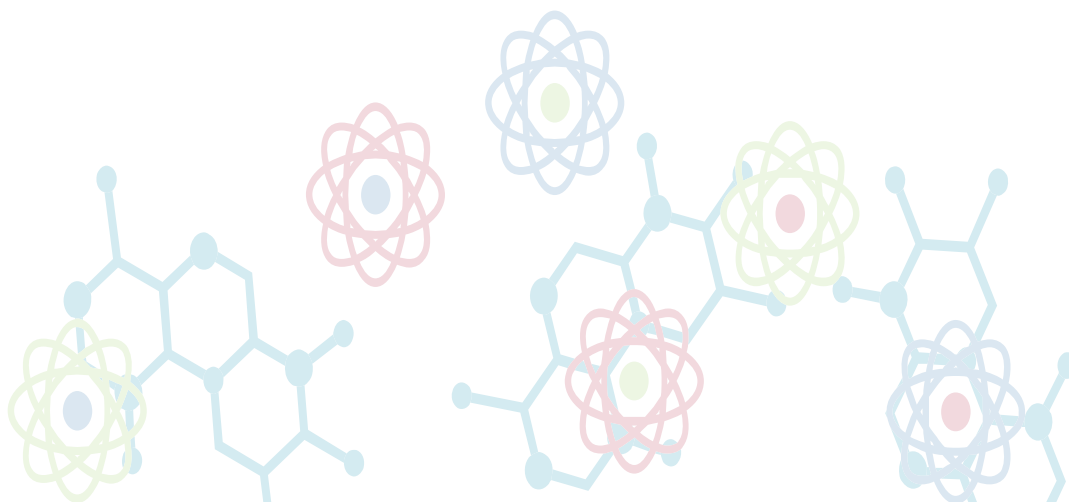
INTRODUCCIÓN

La espectroscopia es la herramienta más utilizada en investigación, análisis, control y diagnóstico en muchos ámbitos relacionados con la física, la química, las ciencias biológicas y las ciencias médicas. Nuevas tecnologías surgen constantemente gracias a los avances en el diseño de fuentes de radiación y detectores, así como dispositivos y sistemas electrónicos cada vez más compactos, rápidos y eficientes.

Una de las grandes ventajas de la espectroscopia IR es su versatilidad, ya que permite estudiar prácticamente cualquier muestra con independencia del estado en que se encuentre: líquidos, disoluciones, pastas, polvos, fibras, films, gases o superficies son algunos ejemplos.

Como en otros procesos de absorción de radiación electromagnética, la interacción de la radiación infrarroja con la materia provoca en ésta alguna alteración. En el caso que nos ocupa, esta alteración guarda relación con cambios en el estado vibracional de las moléculas. El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de ésta molécula. Así, entre otras aplicaciones, el espectro IR se puede usar como “huella dactilar” en la identificación de muestras desconocidas mediante la comparación con espectros de referencia.

A continuación presentaremos información mucho mas detallada a cerca de la técnica de espectroscopia infrarroja.



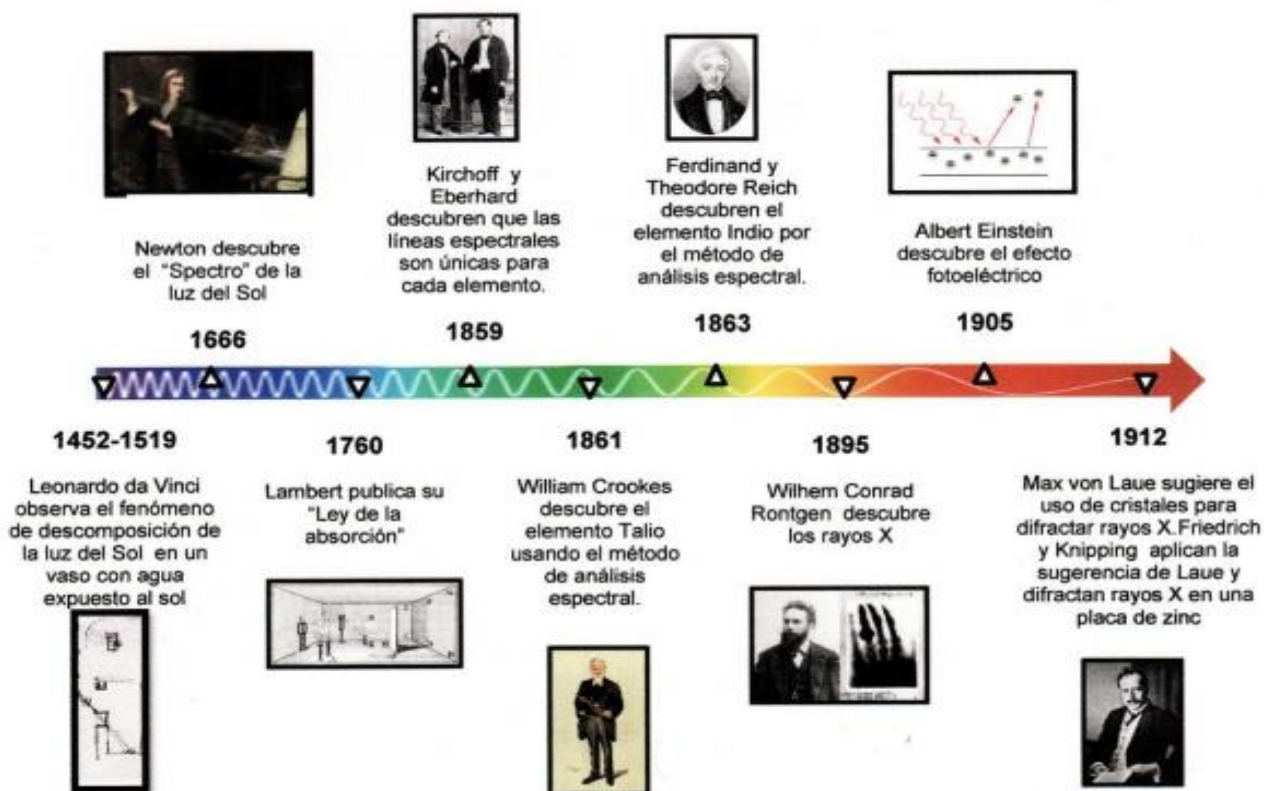
HISTORIA DE LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Surgimiento de los espectrofotómetros IR

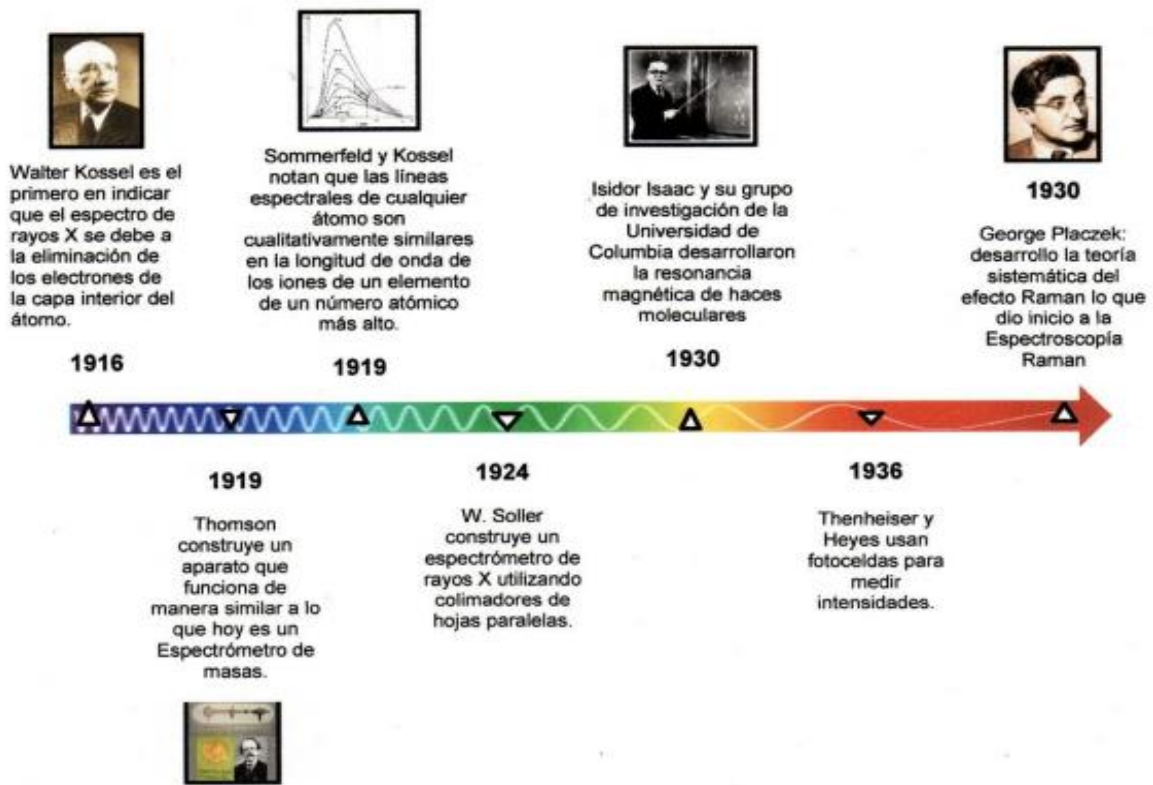
Los primeros equipos comerciales aparecieron a mediados del siglo XX, habiéndose impulsado su desarrollo durante la Segunda Guerra Mundial, cuando se utilizó para la síntesis de caucho sintético (empleado en el control de la concentración y pureza del butadieno empleado en la síntesis del polímero). En la última década del siglo XX aparecieron en el mercado los espectrómetros de transformada de Fourier, ampliando las posibilidades de esta técnica. (Espectrofotómetro de transformada de Fourier).

A continuación presentamos una línea del tiempo de la historia de la espectroscopía:

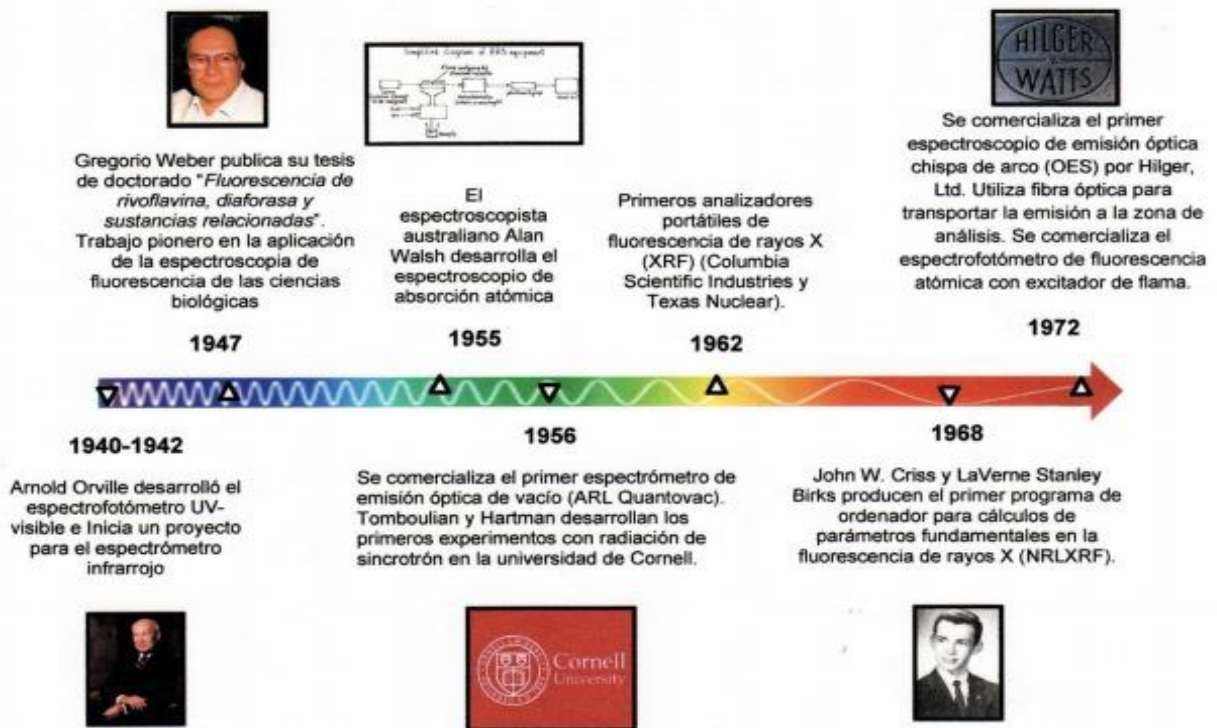
LINEA DEL TIEMPO



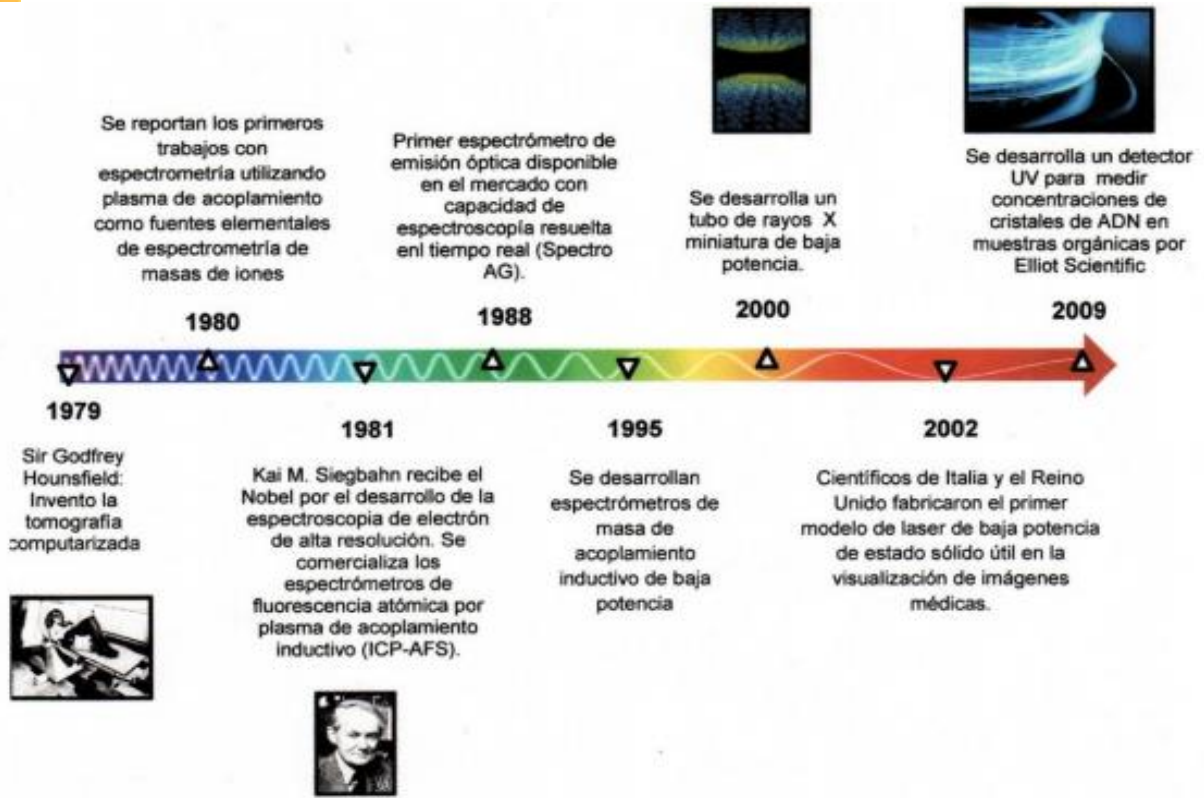
Evolución de la espectroscopía a través del tiempo (1460-1912).



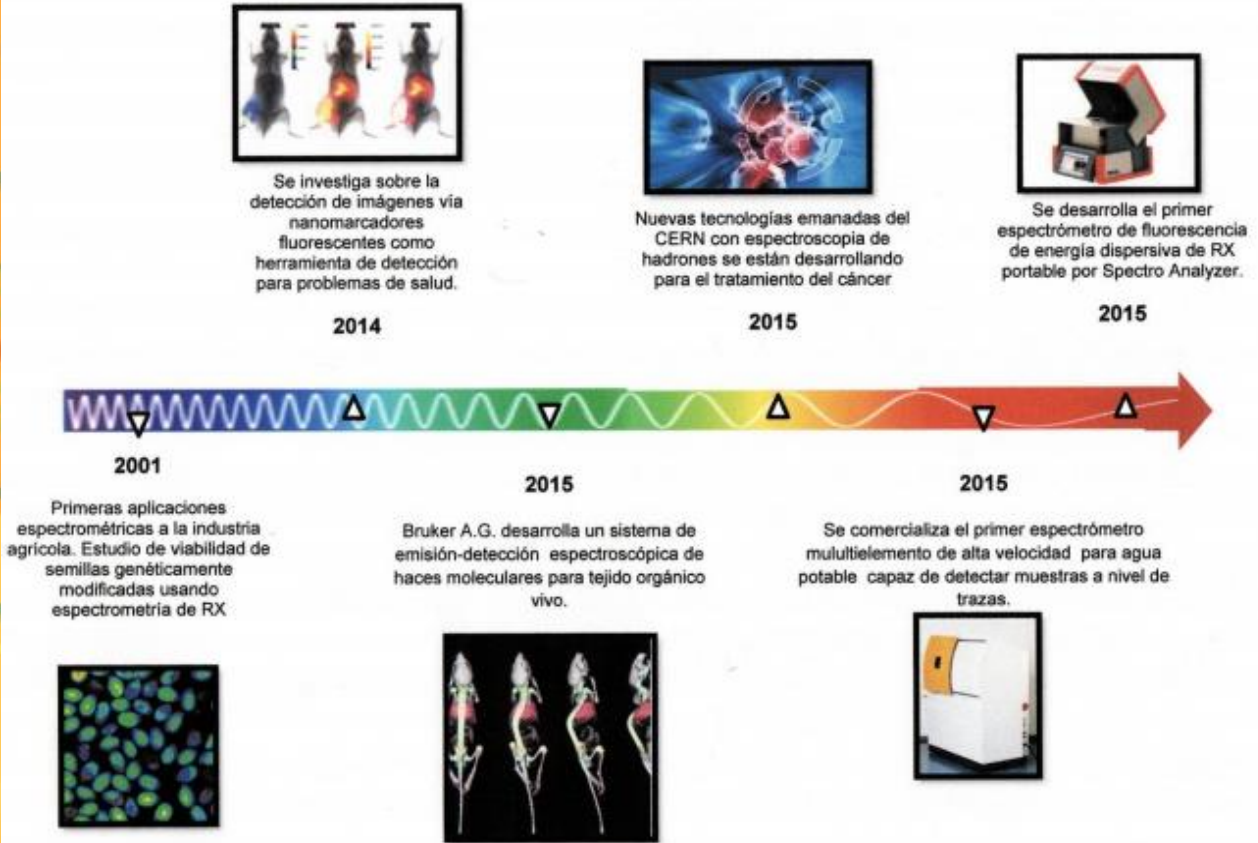
Evolución de la espectroscopia (1916-1936).



Evolución de la espectroscopia (1940-1972).



Evolución de la espectroscopia (1979-2009)



Evolución de la espectroscopia (2001-2015). Recuperado de :

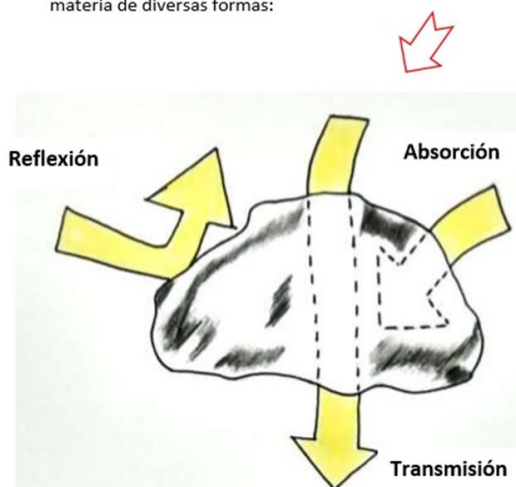
¿QUÉ ES ESPECTROSCOPIA INFRARROJA?

La espectroscopia infrarroja, también conocida como FTIR (del inglés, Fourier Transform Infra-Red) o simplemente IR

Estudia los fenómenos de interacción entre la radiación de origen infrarrojo y la materia. Esencialmente la energía de la radiación, localizada en determinada longitud de onda del infrarrojo, es absorbida por una molécula (o parte de ella) que se encuentra vibrando en su estado basal a la misma longitud de onda que la radiación infrarroja incidente, provocando con ello un cambio en la intensidad de la vibración.

La espectroscopia infrarroja es una herramienta poderosa para identificar compuestos orgánicos e inorgánicos puros porque, a excepción de las moléculas homonucleares como O₂, N₂ y Cl₂, todas las especies químicas moleculares absorben radiación infrarroja. Además, a excepción de las moléculas quirales en estado cristalino, cada compuesto molecular tiene un espectro de absorción infrarroja único. Por lo tanto, una coincidencia exacta entre el espectro de un compuesto de estructura conocida y el espectro del analito identifica inequívocamente al analito. La espectroscopia infrarroja es una herramienta menos satisfactoria para el análisis cuantitativo que sus análogas ultravioleta y visible, debido a la baja sensibilidad y a las frecuentes desviaciones a la ley de Beer. Además, las mediciones de absorbancia en la región infrarroja son considerablemente menos precisas. Sin embargo, en los casos en los que una precisión moderada es adecuada, la naturaleza única de los espectros infrarrojos proporciona un grado de selectividad en una medición cuantitativa que puede compensar esas

En forma general la radiación electromagnética puede interactuar con la materia de diversas formas:



La luz puede reflejarse, absorberse, transmitirse, o una combinación de ellas, en la materia.

Una interacción electromagnética puede llevarse a cabo en la materia en cualquiera de sus estados físicos: gaseoso, sólido o líquido.

CARACTERÍSTICAS INDESEABLES.

Fundamentos

Cuando la radiación infrarroja incide sobre una muestra, es capaz de provocar cambios en los estados vibracionales de las moléculas constituyentes de la misma. La absorción de radiación por parte de una muestra es indicativa del tipo de enlaces y grupos funcionales presentes.

Tanto desde el punto de vista instrumental como de sus aplicaciones es conveniente dividir la región infrarroja en tres regiones denominadas infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio (MIR) e infrarrojo lejano (FIR). La gran mayoría de las aplicaciones analíticas clásicas de la espectroscopia infrarroja se basan en el empleo del infrarrojo medio (4000-600 cm^{-1}) y el infrarrojo cercano, que proporciona la posibilidad de convertir esta técnica en una técnica cuantitativa. La técnica de transformada de Fourier, que permite mediante una operación matemática, convertir un espectro en dominio del tiempo a un espectro en dominio de frecuencia, permite la obtención de espectros de forma rápida, precisa y con relaciones Señal/Ruido (S/N) elevadas.

La obtención de espectros IR se puede llevar a cabo a través de las siguientes técnicas de medida:

Transmisión

En este método de medida la radiación IR atraviesa la muestra registrándose la cantidad de energía absorbida por la muestra. A partir de la comparación de la radiación registrada tras atravesar la muestra, con un experimento de referencia se obtiene el espectro IR. Esta técnica permite analizar con los accesorios adecuados, muestras gaseosas, líquidas y sólidas. En caso de muestras sólidas, éstas se muelen junto con KBr en polvo (ópticamente transparente) y se prensa para obtener una pastilla delgada que se expone a la radiación infrarroja.

Reflexión:

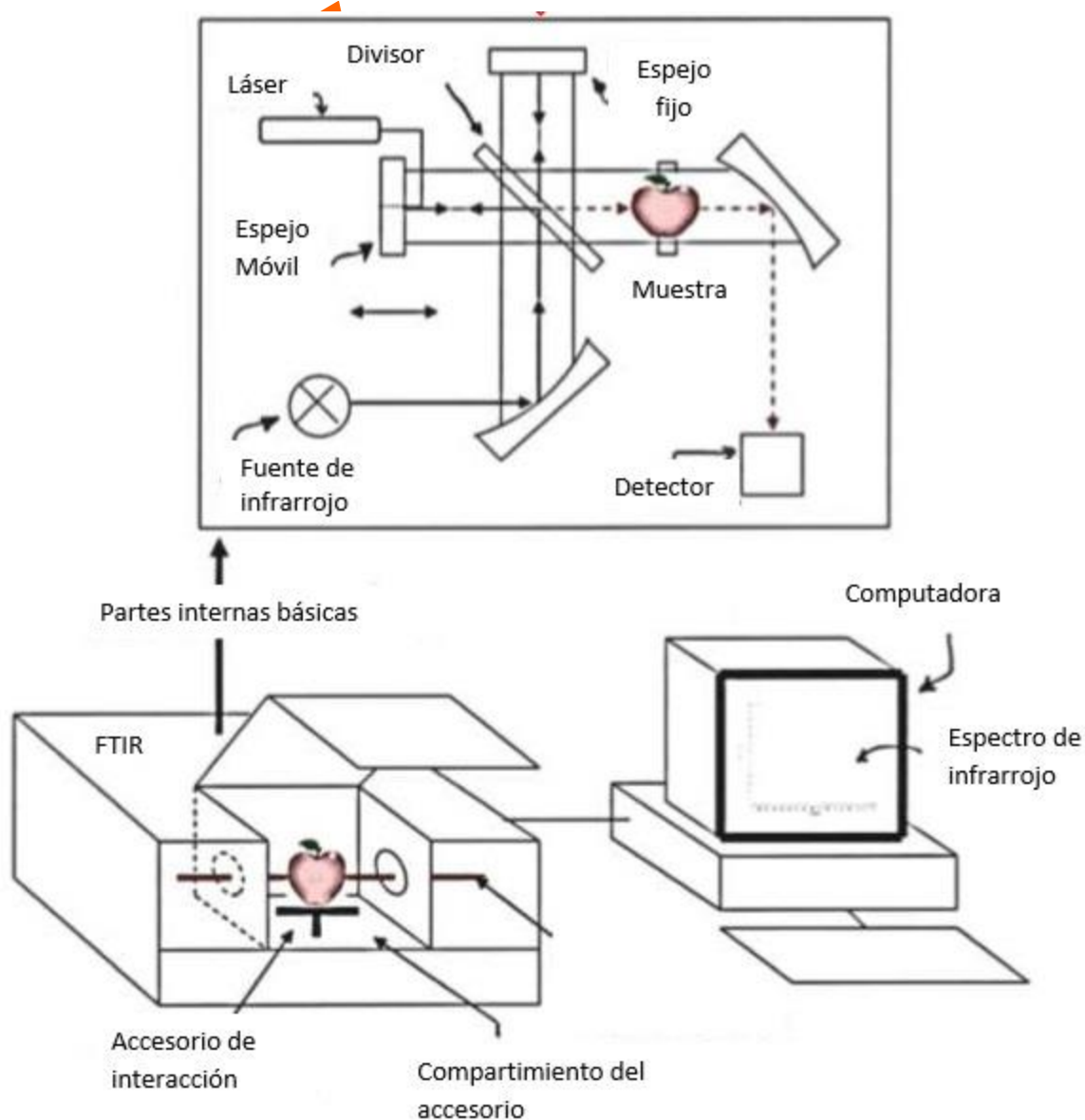
La radiación infrarroja es reflejada sobre la muestra. Analizando la radiación reflejada y comparándola con la radiación incidente se obtiene información molecular de la muestra. Para utilizar esta técnica de medida la muestra debe ser reflectante o estar colocada sobre una superficie reflectante.

Modo ATR:

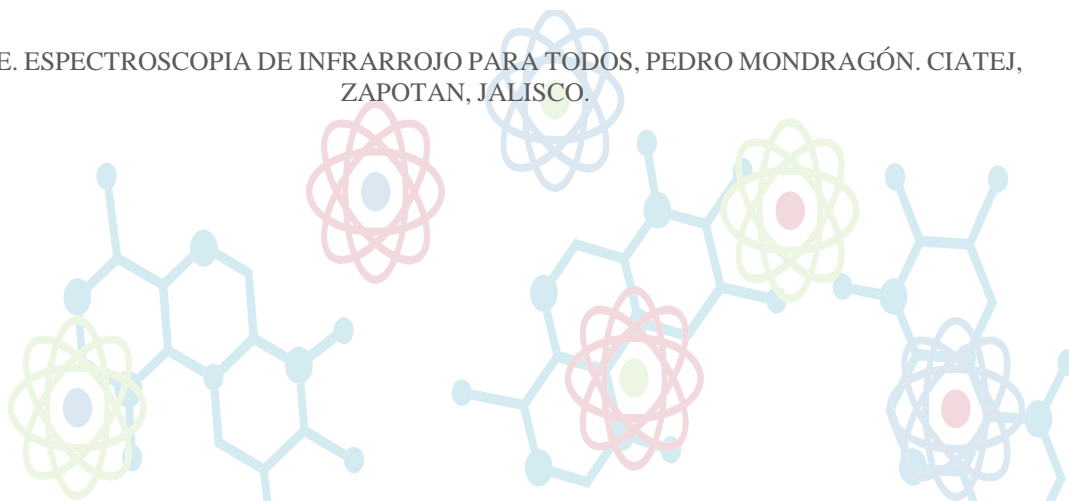
Es un modo de muestreo en el que el haz IR se proyecta en un cristal de alto índice de refracción. El haz se refleja en la cara interna del cristal y crea una onda evanescente que penetra en la muestra. Ésta debe estar en íntimo contacto con el cristal. Parte de la energía de la onda evanescente es absorbida y la radiación reflejada (con la información química de la muestra) es conducida al detector. Se trata de un método muy versátil que permite la medida de muestras líquidas y sólidas sin prácticamente preparación de las mismas.

El equipo donde se lleva a cabo la interacción entre la materia (muestra) y la radiación infrarroja es un espectrómetro de infrarrojo. Actualmente a estos equipos también se les

conoce como espectrómetros de infrarrojo con transformada de Fourier, o como espectrómetros FTIR (del inglés Fourier Transform Infrared). El resultado de la interacción entre la muestra y la energía en infrarrojo se lee en un espectro de infrarrojo



FUENTE. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO PARA TODOS, PEDRO MONDRAGÓN. CIATEJ, ZAPOTAN, JALISCO.



TIPOS DE ESPECTROSCOPIA

En la actualidad, existen diversos tipos de tecnologías espectroscópicas clasificadas según su uso o forma en la que se emite o se detecta la radiación incidente.

La espectroscopia atómica

permite medir las concentraciones de un material en una mezcla, y determinar –hasta el momento–, más de 70 elementos diferentes en solución, o directamente en muestras sólidas, utilizadas en farmacología, biofísica o toxicológica. Se utiliza comúnmente en análisis de aguas, muestras geológicas, muestras orgánicas, metales, aleaciones, petróleo y sus subproductos.

La espectroscopia ultravioleta-visible

(UV/VIS) está basada en la cantidad de energía que puede absorber o transmitir una muestra en función de la cantidad de sustancia presente. Las técnicas de absorción suponen que cuando una radiación incide sobre una muestra, se produce una absorción parcial de esta radiación, lo que produce una transformación entre los niveles energéticos de la sustancia, pasando ésta a un estado de excitación, y al regresar a su estado basal, emite una radiación de menor longitud de onda.

La espectroscopia de rayos X

se utiliza para determinar las estructuras electrónicas y cristalinas de los materiales bajo estudio mediante excitación por rayos X. Utiliza energías superiores a la radiación ultravioleta, que permiten una rápida interacción con los electrones, y son capaces de penetrar estructuras cristalinas.

La espectroscopia de plasma

utiliza una mezcla gaseosa conductora de la electricidad, que contiene una concentración significativa de cationes y aniones. Generalmente se utiliza gas argón, el cual es excitado por una fuente de radio frecuencia, lo que la convierte en plasma de altas temperaturas. La muestra es transportada al seno del plasma, donde es totalmente dissociada. La recombinación de los electrones de la muestra a sus estados basales, son fuente de emisión espectrométrica, la cual es recogida por una óptica que, con ayuda de un software, la interpreta y define los componentes presentes en la muestra.

La espectroscopia Raman:

se basa en el examen de la energía dispersada por un material, al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de esa radiación es dispersada de forma inelástica, experimentando ligeros cambios de frecuencia, que son característicos del material analizado e independiente de la frecuencia de la luz incidente.

La espectroscopia de masas

sirve para dilucidar estructuras químicas, en base a la medición de la relación masa/carga de especies moleculares. Las determinaciones requieren de la generación de especies cargadas eléctricamente, lo cual se logra por diferentes metodologías como: el impacto electrónico, el bombardeo de átomos rápidos (FAB), y la generación de iones enlazados. La medición de la relación masa/carga nos permite conocer el peso

molecular exacto de las muestras, y es utilizada generalmente en la industria farmacéutica y de alimentos.

La espectroscopia de fluorescencia:

analiza la fluorescencia de una muestra que, fue previamente excitada por un haz de luz (generalmente luz ultravioleta). Las moléculas son excitadas mediante la absorción de una onda electromagnética, desde su estado electrónico fundamental a La espectroscopia y su tecnología. Un repaso histórico... Lat. Am. J. Phys. Educ. Vol. 9, No. 4, Dec. 2015 4602-3 <http://www.lajpe.org> uno de los diversos estados electrónicos excitados, lo que provoca la emisión del fotón.

La resonancia magnética nuclear

comúnmente conocida como espectrometría RMN, es una técnica que utiliza las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos los cuales, una vez excitados por radiofrecuencias, interactúan en el seno de un campo magnético y cambian su orientación. La interpretación de las variaciones de los diminutos campos magnéticos permite determinar diferentes compuestos presentes en una muestra.

TIPOS DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

ESPECTROSCOPIA DEL INFRARROJO LEJANO

Las primeras aplicaciones químicas de esta técnica consistieron en estudios de absorción en el intervalo entre 400 y 10 cm^{-1} (25 y 1000 μm). La ventaja energética del sistema interferométrico sobre el dispersivo da lugar por lo general a una significativa mejora en la calidad de los espectros.

La región del infrarrojo lejano es especialmente útil en los estudios inorgánicos ya que la absorción causada por las vibraciones de extensión y flexión de los enlaces entre átomos metálicos y ligandos inorgánicos u orgánicos, se produce por lo general a frecuencias menores de 600 cm^{-1} ($>17\mu\text{m}$). Los estudios en el infrarrojo lejano de sólidos inorgánicos han proporcionado también información útil acerca de las energías de los retículos cristalinos y la energía de transición de los materiales semiconductores.

ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO MEDIO

La aplicación de la espectroscopía basada en la transformada de Fourier al intervalo entre 650 y 4000 cm^{-1} se ha limitado principalmente a problemas particulares en los que existe algún tipo de limitación energética. Por ejemplo, ha resultado útil para el estudio de micromuestras cuando la absorción se reduce a una región muy limitada; de esta forma se puede obtener el espectro para partículas tan pequeñas como de 100 μm .

Este método también se ha empleado para el estudio de especies transitorias que de otra forma requerirán un barrido de longitud de onda muy rápido. En este caso, la ventaja proviene del hecho de que se puede observar todo el espectro en forma simultánea.

ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO

Se caracteriza por presentar bandas o absorciones en la región de 400 nm a 2500 nm (2500 cm^{-1} a 400 cm^{-1}), las cuales son el resultado de armónicos o combinación de bandas originadas en la región del infrarrojo medio. Los espectros infrarrojos están constituidos por la representación gráfica de la energía absorbida en función de la longitud de onda.

La espectroscopía NIR está prácticamente orientada a la determinación y cuantificación de compuestos orgánicos, los cuales se caracterizan por la presencia de grupos funcionales como -OH, -NH, -CO y -CH en las muestras que se analizan.

En la espectroscopía de reflectancia cercana (NIR) la línea de base del espectro asciende con el incremento de la longitud de onda. Por tanto, a medida que el tamaño del particulado de muestras sólidas aumenta, la penetración del rayo infrarrojo es mayor que en materiales finos, lo cual causa problemas en la línea de base; por lo general el efecto podría ser cancelado mediante el empleo de derivadas (primera y segunda) del espectro básico.

NORMAS QUE RIGEN LA TÉCNICA

Entre las nuevas normas propuestas que están desarrollando los subcomités del Comité D03, están la WK24874, método de prueba para la determinación de la concentración de vapores húmedos en el gas natural y por espectroscopía de absorción láser con diodos sintonizables (TDLAS, Tunable Diode Laser Absorption Spectroscopy), y la WK24875, método para la determinación en línea del contenido de siloxanos en el biogás y otros combustibles gaseosos por FTIR (espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier).

La espectroscopía de absorción láser con diodos sintonizables

La nueva norma propuesta, la WK24874, se está desarrollando a pedido de varias empresas de gas que usan analizadores de TDLAS para la medición del contenido de humedad del gas natural. Si bien la TDLAS pasó a ser un tipo de análisis de gas generalizado, no hay ninguna norma específica para su uso.

La norma WK24874 se encuentra bajo la jurisdicción del Subcomité D03.12 sobre análisis en línea y en la línea de los combustibles gaseosos.

Según Samuel Miller, miembro del Comité D03 y director de control de líneas de productos, industria del gas natural de SpectraSensors Inc., la nueva norma propuesta

se usará principalmente para la medición del contenido de humedad en el gas metano o natural y tendrá en cuenta los siguientes usos específicos:

- el gas crudo natural que se encuentra en los centros de producción y recolección;
- la entrada y la salida de las plantas de deshidratación
- los gasoductos de transporte;
- las instalaciones subterráneas para almacenar gas;
- la distribución de gas natural (empresas de servicio);
- las entradas de gas natural de las centrales de energía; y,
- el procesamiento del gas natural, como las plantas de separación del gas natural líquido, extracción de gas sulfídrico de los hidrocarburos y licuación del gas.

NTC-IEC 60666. DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN DE ADITIVOS ESPECÍFICOS EN ACEITES MINERALES AISLANTES

El método de ensayo previo en la primera edición de la Norma IEC 60666 describe un procedimiento para la determinación de antioxidantes específicos usando técnicas IR. Éste método de ensayo era satisfactorio con aceites nuevos, cuando no existían productos de oxidación que interfiriesen con el antioxidante.

NORMA ASTM E2719

El resultado de este trabajo es una nueva norma, la E2719, Guía para la calibración y calificación de instrumentos para fluorescencia. La nueva norma fue desarrollada por el Subcomité E13.01 sobre espectroscopía ultravioleta, visible y por luminiscencia, parte del Comité E13 de ASTM International sobre Espectroscopía molecular y ciencia de la separación.

APLICACIONES DE LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Los principios básicos y las principales aplicaciones de la espectroscopia infrarroja en el análisis de procesos han sido analizados por Workman y col. En este trabajo se detallan las principales aplicaciones de la espectroscopia infrarroja en la última década del siglo XX.

En esta revisión podemos ver que la técnica de la espectroscopia infrarroja está ampliamente extendida en el mundo de la industria. En una primera aproximación observamos que está relacionada con diferentes áreas de aplicación: agricultura, biotecnología, cosméticos, ciencias de la tierra, de la atmósfera y mineralogía, control medioambiental, alimentos y bebidas, ciencia forense, medicina y química clínica, investigación militar, industria del petróleo, industria farmacéutica, ciencia de los polímeros, ciencia de los materiales, industria textil, etc.

Industria farmacéutica

La espectroscopia IR es un complemento ideal a la Resonancia magnética Nuclear y la Espectrometría de masas, y se ha utilizado ampliamente tanto en la evaluación de materiales crudos como en la producción de los compuestos activos y excipientes. La caracterización de los diferentes polimorfos de una droga se puede llevar a cabo por IR y cobra especial relevancia porque la actividad de una de las formas puede ser muy superior a las demás. Aunque los espectros son complejos por debajo de 1500 cm^{-1} , es fácil observar las diferencias en la región $1800\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$, así como en la banda del OH-stretching entre $3600\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$.



La técnica acoplada GC-IR es un método apropiado para detectar drogas y complementa a la perfección el método generalmente aceptado como definitivo (GC-MS). Por ejemplo las anfetaminas se han diferenciado de forma satisfactoria por GC-IR. Estas son moléculas estructuralmente parecidas que se pueden confundir con facilidad, especialmente las drogas de diseño derivadas de la propia anfetamina. Aunque no se pueden diferenciar mediante su espectro de masas, existen diferencias acusadas en su infrarrojo.

Control de la contaminación:

El control rutinario de los niveles de sustancias tóxicas en el medioambiente (aire, agua y suelo), ha impulsado el desarrollo de técnicas para análisis cuantitativo automático. En el caso de los vapores nocivos se necesitan celdas





grandes (1-20 m.) y una bomba para que la muestra de aire circule por el aparato. Los instrumentos se suelen dedicar a un solo contaminante empleando un sistema de filtros para seleccionar la longitud de onda, aunque también los hay para análisis multicomponente. Son de uso común las medidas de SO_2 , HCN , ClCO , NH_3 , H_2S y HCl .

Aplicaciones típicas son el control de formaldehído en fábricas de plásticos y resinas, de anestésicos en quirófanos o de monóxido de carbono en aparcamientos. En el caso de contaminantes sólidos como los pesticidas también se ha utilizado con éxito la espectroscopia IR.

Industria alimentaria:

La espectroscopia de infrarrojo es una técnica de análisis utilizada ampliamente para estudiar la calidad de los alimentos. Como ya se mencionó, esta técnica se basa en la interacción de un haz, en el rango de la energía en infrarrojo, con la sustancia alimenticia a medir. El equipo donde se lleva a cabo esta interacción haz de infrarrojo-alimento se llama espectrómetro de infrarrojo. Para llevar a cabo una interacción confiable se utiliza un dispositivo que se coloca en el espectrómetro. Hay accesorios de varios tipos, pero existe uno muy usado para el estudio de alimentos denominado accesorio de reflexión total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés), en el cual se puede colocar la muestra muy rápidamente, ya sea en estado líquido o sólido.

Tanto el IR-medio como el cercano (NIR) se han utilizado para obtener información cualitativa y cuantitativa de muestras de alimentos. Estos son mezclas complejas que contienen agua, proteínas, grasas y carbohidratos como componentes mayoritarios.

Un método importante es el empleado para determinar isómeros trans- en grasas y aceites (principalmente triglicéridos). Aunque la configuración cis- aparece de forma predominante en la naturaleza, durante el procesado industrial puede ocurrir la isomerización en un grado importante que es necesario conocer. Ambos isómeros tienen en común una banda intensa a 1163 cm^{-1} del grupo éster (C-O, que puede servir de banda de referencia en estudios cuantitativos) y se diferencian por el bending fuera del plano del grupo C=C-H que aparece en la región $840\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ para el cis-, y como un pico





muy característico a 966 cm^{-1} para el trans-. La determinación del contenido en trans- se puede obtener relacionando la concentración de éste con el cociente de absorbancias entre las bandas a 1163 y 966 cm^{-1} .

Por su parte el NIR se ha empleado en el control de la leche, con un importante desplazamiento de las bandas a menores longitudes de onda conforme disminuye

la concentración de grasa y proteínas. La concentración de alcohol en vinos y bebidas de mayor graduación también se ha realizado con éxito mediante el NIR., así como el estudio de muestras adulteradas con metanol o etilglicol.

Otros usos: Esta técnica se ha empleado con éxito en el estudio de combustibles fósiles, por ejemplo determinando su contenido de agua. El análisis multicomponente se ha aplicado al estudio de minerales, aunque hay una dependencia marcada con el tamaño de partícula. Por último, el IR se ha utilizado en catálisis para identificar las especies adsorbidas en la superficie y el modo en que tiene lugar esta unión. Uno de los sistemas mejor estudiados es el monóxido de carbono sobre metales.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Por lo que respecta a las muestras, la Espectroscopia IR es una técnica versátil que permite obtener espectros de sólidos, líquidos y gases utilizando en cada caso las celdas o soportes adecuados. Como se ha comentado, el material en cuestión debe ser transparente a la radiación incidente y los haluros alcalinos son los que más se emplean en los métodos de transmisión (NaCl, KBr, KCl etc.). En comparación con otras técnicas instrumentales, las muestras a analizar requieren poca o ninguna preparación. Basta con moler el sólido en una matriz de KBr o disolver la muestra en un disolvente apropiado (se prefiere CCl_4 o CS_2). El agua debe ser retirada de la muestra siempre que sea posible, ya que tiene una fuerte absorción en la región infrarroja. El tiempo de análisis para obtener un espectro en una muestra rutinaria es de 1 a 10 minutos, dependiendo de la resolución y el número de barridos requerido. De acuerdo con la ley de Beer $I = I_0 e^{-abc}$ la transmitancia $T = I/I_0$ es función de la absorptividad, el camino óptico y la concentración, de modo que para obtener un espectro de intensidad moderada de una muestra sólida o líquida no diluida son suficientes caminos de 0.01-0.05 mm. Es necesario variar este parámetro en función de la concentración de la muestra. Aunque las cantidades en análisis de rutina pueden variar en función de la muestra disponible, el límite inferior cuando el sólido se analiza en un disolvente adecuado, estaría en torno a 1-10 μg ; 1 mg para pastillas de KBr; para analizar un líquido, basta con 0,5 μl . y para analizar un gas, es suficiente una concentración de 50 ppb (en este caso con el comentado aumento del camino óptico).

PREPARACIÓN DE MUESTRAS LÍQUIDAS

Las celdas mencionadas en el apartado anterior se usan para medir disoluciones diluidas de muestras sólidas y líquidas disueltas en disolventes transparentes al IR. Desafortunadamente ningún disolvente es transparente a lo largo de todo el IR medio. Los más utilizados son: el CCl_4 para la región $4000\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$ y el CS_2 para la región $1330\text{-}625\text{ cm}^{-1}$. Ambos disolventes son bastante tóxicos y deben ser manipulados con precaución. Se puede reemplazar el CCl_4 con el $\text{CCl}_2\text{-CCl}_2$ o con el CH_2Cl_2 , menos tóxicos, y sustituir el CS_2 con n-hexano o n-heptano. Los disolventes polares, como el agua o los alcoholes son raramente usados, ya que absorben fuertemente en el IR medio y reaccionan con los haluros de los metales alcalinos, como el NaCl , comúnmente usados como ventanas transparentes al IR. Para ensayos cualitativos es suficiente una gota colocada entre las ventanas de una celda desmontable, mientras que con muestras de débil absorción se usan espaciadores de 25 a $50\ \mu\text{m}$. Hay que cerrar con cuidado la celda, evitando atrapar burbujas de aire y apretando los tornillos suficientemente pero sin romper las ventanas. La preparación de disoluciones es un paso importante en los estudios por IR. Disolver muestras sólidas, reducir la viscosidad de líquidos y sobre todo, diluir la muestra para así poder usar caminos ópticos más largos y reproducibles en el análisis cuantitativo. Típicamente se analizan disoluciones de una concentración de $0,05\%$ a 10% en células de $0,1$ a 1 mm de espesor. Una combinación práctica puede ser un 10% de concentración y un camino óptico de $0,1\text{ mm}$. Puesto que se necesitan volúmenes pequeños de muestra, se suele utilizar el método gravimétrico en su preparación.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS

La mayoría de los compuestos orgánicos presentan numerosos picos de absorción en el infrarrojo medio, y encontrar un disolvente que no dé lugar a solapamiento de picos es con frecuencia imposible. Como consecuencia, a menudo se obtienen los espectros de dispersiones del sólido en una matriz líquida o sólida. Generalmente, en estas técnicas la muestra sólida se debe pulverizar hasta que el tamaño de sus partículas sea menor que la longitud de onda de la radiación ($<2\ \mu\text{m}$) para evitar los efectos de la dispersión de la misma.

Pastillas:

Una de las técnicas más populares es la formación de pastillas de KBr (también se han usado otros haluros de metales alcalinos). Las sales de haluros tienen la propiedad de flujo en frío (cold flow), por lo que, cuando se somete a la presión adecuada este material finamente pulverizado, sinteriza y forma una tableta transparente que se asemeja a un cristal. Al usar esta técnica, se mezcla a fondo un miligramo o menos de la muestra finamente pulverizada, con aproximadamente $100\text{-}300\text{ mg}$ de polvo de KBr . La mezcla se puede realizar con un mortero y su mano o en un pequeño molino de bolas. Posteriormente se presiona la mezcla en un troquel especial entre 700 y 1000 kg/cm^2 hasta obtener un disco transparente. Se obtienen mejores resultados si el disco se prepara a vacío para eliminar el aire ocluido. A continuación, el disco se coloca en la trayectoria del haz del instrumento para su examen espectroscópico. Los espectros

obtenidos presentan a menudo bandas a 3450 y 1640 cm^{-1} debidas a la humedad absorbida.

Para muchos compuestos las pastillas de KBr producen espectros excelentes para medidas cualitativas que aparecen en las colecciones de espectros (No es una técnica muy utilizada en el análisis cuantitativo). Al ser un compuesto iónico, el KBr transmite a lo largo de la mayor parte de la región del infrarrojo hasta una frecuencia de aproximadamente 400 cm^{-1} . El ioduro de cesio absorbe por debajo de 200 cm^{-1} y se utiliza para mayor transparencia a bajas frecuencias. Después del prensado es importante realizar una limpieza cuidadosa de todos los accesorios, puesto que los residuos de KBr pulverizado son higroscópicos y muy corrosivos una vez húmedos. En relación con esto conviene resaltar la elevada polaridad de los haluros alcalinos que pueden incluso interactuar física o químicamente con la muestra, de tal modo que el espectro registrado por este método puede diferir si lo medimos empelando alguno de los métodos que se comentan a continuación. Algunos cambios son la hidratación de la muestra, saponificación de esteres, sustitución de grupos funcionales por haluro o descomposición del producto. Si se observan anomalías en la identificación de la muestra es recomendable probar otra técnica de preparación.

Suspensiones:

Cuando los sólidos no son solubles en un disolvente transparente en la región del infrarrojo ni es conveniente prepararlos en forma de pastillas de KBr, sus espectros de infrarrojo se suelen obtener por dispersión del analito en una suspensión de un aceite mineral o un hidrocarburo fluorado. Las suspensiones se preparan moliendo de 2 a 5 mg de la muestra finamente pulverizada (tamaño de partícula $<2 \mu\text{m}$) en presencia de una o dos gotas de un aceite hidrocarbonado pesado (Nujol, Figura 12). Si es probable que interfieran las bandas del hidrocarburo se pueden sustituir por 1,3 hexaclorobutadieno. En cualquiera de los casos, la suspensión resultante se examina luego como una delgada película entre dos placas de sal o dos láminas de polietileno

Láminas delgadas de polímeros:

Se pueden obtener, con ayuda de un par de placas calientes y una prensa, láminas delgadas de polímeros con un espesor altamente reproducible, desde 15 hasta 500 μm . Respecto a la cantidad de muestra necesaria, para hacer un disco de 20 mm de diámetro basta con 10 mg de polímero si se quiere hacer una lámina de 15 μm de espesor. Esta lámina se analizará por transmisión. Debido a que ciertos polímeros, como el nailon, se oxidan y descomponen un poco por encima de su temperatura de reblandecimiento, es preciso elevar la temperatura en su justa medida y prensar el polímero con cuidado.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS GASEOSAS

En el caso de los gases se requiere un método de trabajo diferente a los mencionados. Es también posible realizar estudios cuantitativos y, con la suficiente resolución, el espectro permite obtener conclusiones adicionales sobre el diseño molecular basadas en la estructura fina rotacional. Las muestras gaseosas suelen distribuirse y almacenarse en cilindros metálicos o de vidrio, desde lo que hay que transferirlas a la celda,

normalmente utilizando un aparato de vacío que tras la evacuación del sistema permite una medida exacta de la presión parcial. Después de forma similar se añade nitrógeno para conseguir la presión total deseada, puesto que hay una importante dependencia de la absorptividad con esta magnitud que hay que considerar en los ensayos cuantitativos. Así, es muy importante utilizar la misma presión total en las medidas de la muestra y en la correspondiente calibración.

Si la muestra de polímero es soluble en un disolvente muy volátil es posible preparar un film a partir de una disolución muy concentrada que se deja evaporar sobre un soporte metálico. Al igual que ocurre con las pastillas de KBr, films delgados de polietileno se pueden utilizar como soporte de muestras líquidas o de suspensiones de sólidos en Nujol. Estos films se montan a su vez sobre piezas de cartón compatibles con los mecanismos de sujeción estándar de los aparatos.

ANÁLISIS DE SALIDA DE RESULTADOS

El análisis de la muestra se completa cuando la señal es captada por un detector. Los microscopios de infrarrojo generalmente se encuentran equipados con detectores de telurio de mercurio-cadmio enfriados con nitrógeno líquido (MCT por sus siglas en inglés) (Bellisola & Sorio, 2012; Matthäus et al., 2008; Miller & Dumas, 2010). Sin embargo los desarrollos más recientes en detectores de infrarrojo, han generado los detectores de arreglo de plano focal (FPA por sus siglas en inglés) que consisten de cientos de elementos detectores de infrarrojo, permitiendo obtener imágenes de grandes áreas con una alta resolución espacial significando un gran ahorro de tiempo en comparación de los detectores MCT, sin embargo en la actualidad los detectores FPA aún tienen una relación señal/ruido inferior a la de los detectores MCT (Kazarian & Chan, 2013). Avances en el área prometen una mejora en los detectores FPA lo que permitirá tener mejores resoluciones espaciales y mayores avances técnicos en los estudios con células vivas, mejorando tanto la resolución, como los tiempos de observación (Miller & Dumas, 2010)

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

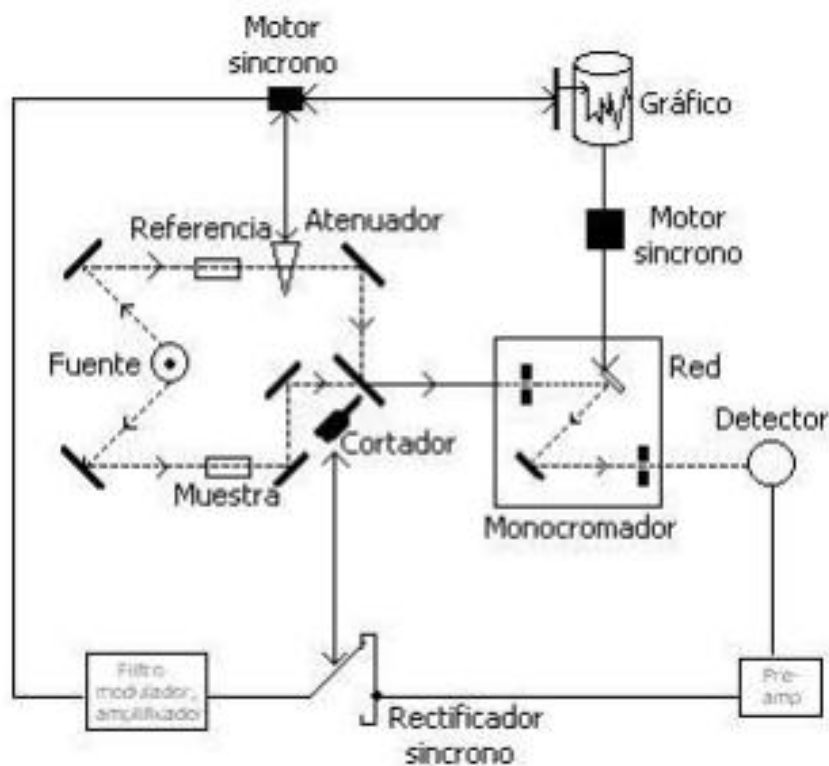
Varía dependiendo del tipo de muestra utilizada, en el caso de trabajar con un tejido se llevan a cabo cortes de las muestras seleccionadas en micrótopo, estos cortes varían entre de 5 a 30 μm de grosor (Leskovjan et al., 2009; Pijanka et al., 2009), las muestras pueden ser usadas directamente o ser embebidas en una matriz para mantener su integridad. Sin embargo lo más recomendable es no utilizar muestras embebidas, ya que las matrices utilizadas absorben energía en la región del infrarrojo medio (2.5 a 15 μm) interfiriendo con las biomoléculas presentes en la muestra.

Desafortunadamente, el uso de esta técnica de montaje es casi obligado, debido a que son pocas las muestras de tejido que pueden analizarse directamente tras el corte realizado por el micrótopo, por ello siempre es importante balancear la cantidad de ruido que generará el método de conservación de muestras en los resultados (Magne et

al., 2001; Miller & Dumas, 2006). Una vez obtenido el corte, la muestra será montada en un portamuestras para ser observada.

En función de su capacidad de permitir el paso de la energía, los portamuestras pueden ser de transmisión, reflexión de infrarrojo o con un cristal de reflexión total atenuada (ATR) , dependiendo si permiten o no el paso de energía infrarroja. En el caso de utilizarse un método de transmisión de infrarrojo se requiere de un portamuestras el cual está fabricado con un material transparente a la radiación de infrarrojo.

COMPONENTES DE LOS INSTRUMENTOS IR



FUENTE. ESPECTROMETRIA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA.

FUENTES:

La fuente infrarroja común es un sólido calentado eléctricamente a temperatura entre 1500° y 2000° K. Se produce radiación continua que se aproxima a la de un cuerpo negro. La intensidad radiante máxima a estas temperaturas se produce en 1.7 a 2.0 (de 5000 a 6000 cm⁻¹), o sea la máxima emisión cae en el infrarrojo próximo o cercano. Un aumento en la temperatura solo sirve para incrementar mucho más la radiación de longitud de onda corta que la radiación de longitud de onda larga que es la que generalmente se usa.

En los instrumentos de IR comerciales se usan tres tipos de fuentes: la fuente Global, el emisor de Nernst y la fuente de filamento incandescente.

LA FUENTE GLOBAL.-

Un global es una varilla de carburo de silicio, que por lo general tiene unos 50 mm de longitud y 5 mm de diámetro. Se calienta eléctricamente (1300 a 1500° K) y tiene la ventaja de poseer un coeficiente de resistencia positivo. Por otra parte, es necesario enfriar los contactos eléctricos. Las energías espectrales del Global y del emisor de Nernst son semejantes, excepto con la región inferior a 5 μm donde el Global se distingue por tener mayor energía.

EL EMISOR DE NERNST.-

Está constituida por óxidos de tierras raras, y tiene forma cilíndrica con un diámetro de 1 a 2 mm y una longitud de unos 20 mm. Los extremos del cilindro están unidos a unos conductores de platino que permiten el paso de la electricidad lo que permite alcanzar temperaturas comprendidas entre 1200 y 2200 ° K. Debe calentarse externamente hasta el rojo oscuro para que la corriente sea suficiente como para mantener la temperatura deseada. Debido a que la resistencia disminuye con el aumento de temperatura, el circuito de la fuente se ha diseñado para limitar la corriente, si no fuera así, la lámpara se calentaría tanto que se destruiría.

MONOCROMADORES.

Un monocromador infrarrojo consiste en un sistema variable de ranuras de entrada y salida, uno o más elementos dispersantes y varios espejos para reflejar y enfocar el haz de radiación. No se emplea lentes a causa de los problemas con aberraciones cromáticas.

El sistema de ranuras de un espectrofotómetro de IR realiza la misma función que en sus análogos UV-Visible, y debe hacerse el mismo compromiso al recoger el ancho de ranura que se emplea. Ranuras estrechas proporcionan menores anchos de banda y mayor ausencia de radiación dispersa; ranuras más anchas producen mayor energía radiante que llega al detector, y menor definición del espectro de absorción.

Se emplean prismas y rejillas para dispersar la radiación infrarroja; el uso general de éstas últimas es relativamente nuevo se han usado varios materiales para la construcción de prismas. Se emplea cuarzo para la región próxima al IR, lo único es que no posee características ideales de dispersión en esta región, absorbe fuertemente más allá de 4 μm .

DETECTORES:

La medición de radiación infrarroja es difícil debido a la baja intensidad de las fuentes disponibles y a la poca energía del fotón infrarrojo. Como consecuencia de estas propiedades, la señal eléctrica de un detector infrarrojo es pequeña y su medición requiere grandes factores de amplificación. Generalmente, el sistema detector en un espectrofotómetro IR es el que limita la sensibilidad y la precisión. Los detectores utilizados en infrarrojo son: detectores térmicos y detección basada en fotoconducción.

DETECTORES TÉRMICOS:

Tienen respuestas uniformes para todas las frecuencias medidas en términos de señal de detector por Watt de poder incidente y como ya mencionamos las señales débiles por la baja intensidad de las fuentes se coloca un preamplificador tan próximo como sea posible al detector. Con estos dispositivos se mide el incremento de temperatura que resulta cuando un pequeño cuerpo negro absorbe la radiación. Entre los detectores térmicos se encuentran los termopares, bolómetros y celda de Golay.

TERMOPARES:

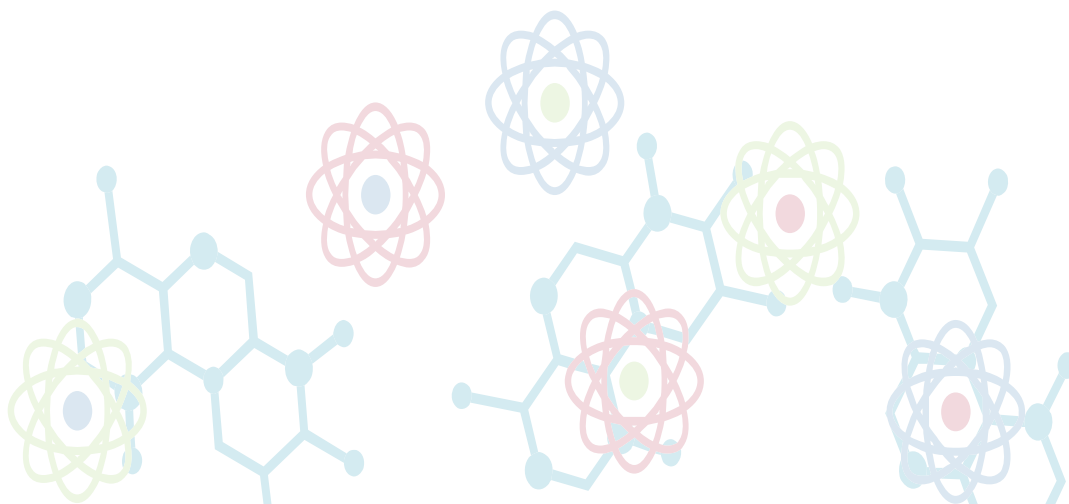
Consiste en un par de uniones que se forman soldando los extremos de dos piezas de un metal como el bismuto, a otro metal distinto como el antimonio. Entre las dos uniones se genera un potencial que varía en función de su diferencia de temperatura. Contiene una cámara de vacío con una ventana transparente a la radiación infrarroja. Para aumentar la sensibilidad se pueden unir varios termopares en serie para originar lo que se llama una Termopila.

Un detector de termopar bien diseñado, es capaz de responder a diferencias de temperatura de 10-6 K, considerando que la potencia radiante del haz de un espectrofotómetro de infrarrojo es muy baja, por lo que la capacidad calorífica del elemento absorbente debe ser lo más pequeña posible para producir un cambio de temperatura detectable.

Un amplificador operacional seguidor de voltaje, también se puede emplear como preamplificador en los circuitos del detector de termopar.

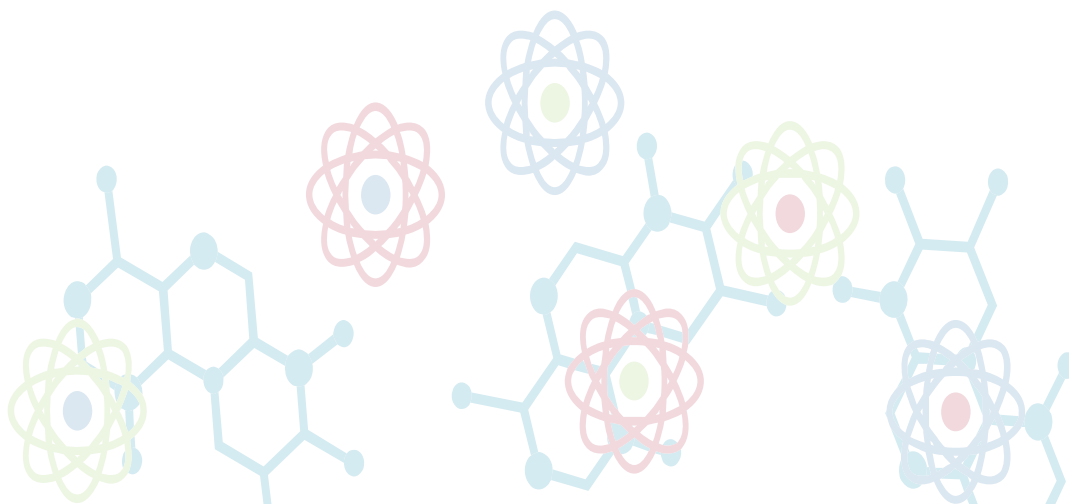
BOLÓMETROS:

Un bolómetro es un tipo de termómetro de resistencia construido con bandas de metal como platino o níquel o de un semiconductor, en este último caso se denomina termistor. Estos materiales presentan un cambio de resistencia relativamente grande con la temperatura. El elemento sensible suele ser pequeño y está pintado de color negro para absorber el color radiante.



BIBLIOGRAFÍA

- La espectroscopia y su tecnología: Un repaso histórico y su importancia para el siglo XX. González C. Marco Antonio , Montaña Z. Luis Manuel, Instituto Politécnico Nacional 2508. San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, México D. F.
- Espectrofotometría de absorción. Arenas S. Iván, López S. José Luis. Universidad Nacional Autónoma de México, maestría en ciencias bioquímicas, Cuernavaca, Mor. Junio de 2004.
- Espectroscopía Infrarroja Fundamentos, Serrano M. José Luis. Posgrado en Ingeniería del Agua y del Terreno, Universidad Politécnica de Cartagena.
- Espectroscopia de Infrarrojo para todos ...y 51 espectros de alimentos consumidos en México. Pedro Mondragón Cortez Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C Primera Edición, julio de 2017.
- Manual de Prácticas para la Asignatura de: Técnica Instrumental. M.C Martín Jesús Robles de Anda, IQM Abel Ignacio Garnica Marmolejo Universidad de Colima. Agosto 2016.



WEBGRAFÍA

- La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos, Guillermo Barraza-Garza, Laura A. de la Rosa, Alejandro Martínez-Martínez, Hiram Castillo-Michel, Marine Cotte, Emilio Alvarez-Parrilla. Revista Latinoamericana de Química. Septiembre 2013. Recuperado de:

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-59432013000300001

- Calibración y Calificación de Instrumentos, Paul DeRose, Standardization news, Marzo/Abril 2010. Recuperado de:

https://www.astm.org/SNEWS/SPANISH/SPMA10/e1301_spma10.html

- Introducción a las Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial. Recuperado de:

<https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8245/8/T1metodos%20instrumen.pdf>

- Espectrometría infrarroja, Guillermo Perez. Recuperado de:

https://www.espectrometria.com/espectrometra_infrarroja

- Espectroscopía Fotoacústica, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México. Recuperado de:

http://www.cicata.ipn.mx/OfertaEducativa/MTA/RecInfraestructura/Paginas/Equipos_Fototermicas/Espeac_Fotoacustica.aspx

- Aplicación de la Espectroscopía del Infrarrojo Medio en Química Analítica de Procesos, Marcelino de Fuentes Navarta, Catalina Bosch Ojeda, Fuensanta Sánchez Roja. Enero, 2008. Universidad de Málaga, España. Recuperado de:

https://www.researchgate.net/publication/260386447_Aplicacion_de_la_Espectroscopia_del_Infrarrojo_Medio_en_Quimica_Analitica_de_Procesos

- Espectrómetro infrarrojo. Recuperado de:

<https://elespectrofotometro.com/espectrometro-infrarrojo/>

- Espectro infrarrojo. Recuperado de:

https://www.ecured.cu/Espectro_infrarrojo

- Espectrofotometría. Recuperado de:
https://www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=2370
- Espectrofotómetro, Marcos Gerenstein, 4Junio 2018, Recuperado de:
<http://www.instrulab.com.ar/espectrofotometro.htm>
- La Espectrofotometría de Gases en la Industria, QuimiNet ,26 octubre 2012, Recuperado de:
<https://www.quiminet.com/articulos/la-cromatografia-de-gases-en-la-industria-2876007.htm>
- Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y repliegamiento de proteínas. K. Mayolo-Deloisa, L.M. Martínez y M. Rito-Palomares Rev. Mex. Ing. Quím vol.11 no.3 México dic. 2012. Recuperado de:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382012000300006
- Aspectos básicos de la preparación precisa de muestras para cromatografía. Recuperado de:
https://www.chromnews.com/eu_es/fundamentals-accurate-sample-preparation-chromatography/
- Técnicas de Separación Cromatográfica. Recuperado de:
http://ocw.uc3m.es/ciencia-e-oin/caracterizacion-de-materiales/material-de-clase-1/Apuntes_Tecnicas_de_separacion_cromatografica.pdf
- Equipos para Cromatografía de Gases (CG), Perkin Elmer. Recuperado de:
<http://cromatografosdegases.com/default.html>
- Cromatografía, Romero G. Aida Susana, 2002. Instituto de Biotecnología, UNAM. Recuperado de:
<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf>
- Análisis de la composición química, Standardization News, Noviembre/Diciembre 2011. Recuperado de:
https://www.astm.org/SNEWS/SPANISH/SPND11/d0307_spnd11.html

