



Manual del espectrofotómetro UV-visible-NIR Cary 5000

Selene Rubí Islas Sánchez

Tipo de proyecto interno

Financiamiento interno

Manual del espectrofotómetro UV-visible-NIR Cary 5000
Selene Rubí Islas Sánchez
Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica
ICAT, UNAM

Resumen

En el Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE), se cuenta con varias técnicas de caracterización molecular como son espectroscopia infrarroja (IR), dispersión Raman, fluorescencia y espectroscopia de absorción ultravioleta-visible. Para esta última el laboratorio cuenta con un espectrofotómetro Cary 5000 UV-visible-NIR, este equipo permite estudiar diferentes tipos de muestras, en el intervalo de longitudes de onda entre 170-3300 nanómetros. La espectroscopia ultravioleta-visible (UV-vis) es una técnica utilizada para identificar algunos grupos funcionales, determinar el contenido y pureza de sustancias, determinación cuantitativa de los componentes en disoluciones, iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados, etc. La radiación absorbida por las moléculas que componen la materia en esta región del espectro electromagnético provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas. Por lo tanto, es una herramienta versátil ampliamente utilizada en las diferentes ramas de investigación que se desarrollan en el ICAT. Esta técnica permite realizar la caracterización de reactivos, identificación de fases, estudio de procesos de síntesis, así como, el estudio de las propiedades ópticas de materiales en diversas formas como películas, polvos o disoluciones. Otras ventajas de esta técnica, es que permite la caracterización rápida de materiales sin la necesidad de una preparación complicada de las muestras, es una técnica no destructiva y económica una vez que se tiene el equipo. El presente manual de operación sirve como una guía rápida de consulta que les permitirá a los usuarios, de diversas disciplinas, aprender a operar el equipo de manera correcta, así como tener los cuidados necesarios para obtener resultados confiables y reproducibles. Es importante remarcar, que éste manual es una guía rápida para el uso del equipo y los aditamentos con los que cuenta el LUCE, para mayor información es necesario acudir al manual del equipo o al técnico especializado.

Índice

Glosario de Términos.....	3
1 Descripción general del sistema y especificaciones: Cary 5000.....	4
2 Requisitos de operación	5
3 Encendido del equipo.....	6
4 Software Cary WinUV: aplicación Scan.....	7
5 Scan: configuración.....	11
6 Aditamentos.....	15
7 Línea base.....	23
8 Adquisición de espectros	26
9 Fin de la sesión de trabajo.....	27
10. Referencias Bibliográficas... ..	28

Glosario de Términos

<i>Símbolo</i>	<i>Significado</i>
<i>A</i>	<i>Absorbancia</i>
<i>ADL</i>	<i>Lenguajes de Descripción de Arquitectura</i>
<i>D2</i>	<i>Deuterio</i>
<i>F(R)</i>	<i>Función Kubelka-Munk</i>
<i>NIR</i>	<i>Infrarrojo cercano</i>
<i>nm</i>	<i>nanómetros</i>
<i>PTFE</i>	<i>politetrafluoroetano</i>
<i>R</i>	<i>reflectancia</i>
<i>S:R</i>	<i>señal: ruido</i>
<i>%R</i>	<i>Porcentaje de Reflectancia</i>
<i>%T</i>	<i>Porcentaje de transmitancia</i>
<i>VA</i>	<i>Voltios-Amperios</i>
<i>UV</i>	<i>ultravioleta</i>
<i>vis</i>	<i>visible</i>

1 Descripción general del sistema y especificaciones: Cary 5000

El equipo Cary 5000 UV-visible-NIR de la marca Agilent Technologies®, es un espectrofotómetro de doble haz. Su sistema óptico se encuentra aislado al medio ambiente, lo que garantiza que las condiciones de humedad, temperatura y polvo del entorno de laboratorio no afectan las mediciones obtenidas en el equipo. El equipo pesa 91 Kg y mide 142 x 800 x 670 mm, consume 300 VA aproximadamente.

El espectrofotómetro Cary 5000 puede operar en un intervalo de longitudes de onda de 170 a 3300 nm (con excepción de la esfera de integración donde sólo se puede medir de 200-2500 nm), pero el intervalo más común de trabajo es de 200 a 800 nm que abarca el intervalo del ultravioleta y el visible.

Para realizar mediciones en el intervalo de 170 a 200 nm es necesario usar nitrógeno líquido de pureza ultra alta, en este sentido, en el laboratorio cuenta con la instalación adecuada para el suministro de nitrógeno con su regulador de presión y manómetro adecuados para garantizar que la presión de suministro de gas nitrógeno sea correcta en todo momento. El intervalo de presión operativa es de 83 a 172 kPa (de 12 a 25 psig).

Los tubos de plástico que se utilizan son de policloruro de vinilo (PVC) para asegurar su limpieza y evitar la presencia de contaminantes o el desprendimiento de partículas que podrían provocar daños al sistema óptico.

En general, los espectrofotómetros están integrados por cuatro partes fundamentales: la fuente de luz, un monocromador, el compartimento de la muestra y los detectores (Fig. 1). El Cary 5000 al ser un espectrofotómetro de doble haz, cuenta con en el compartimento donde uno de los haces pasa por la referencia o blanco y el otro pasa por la muestra.

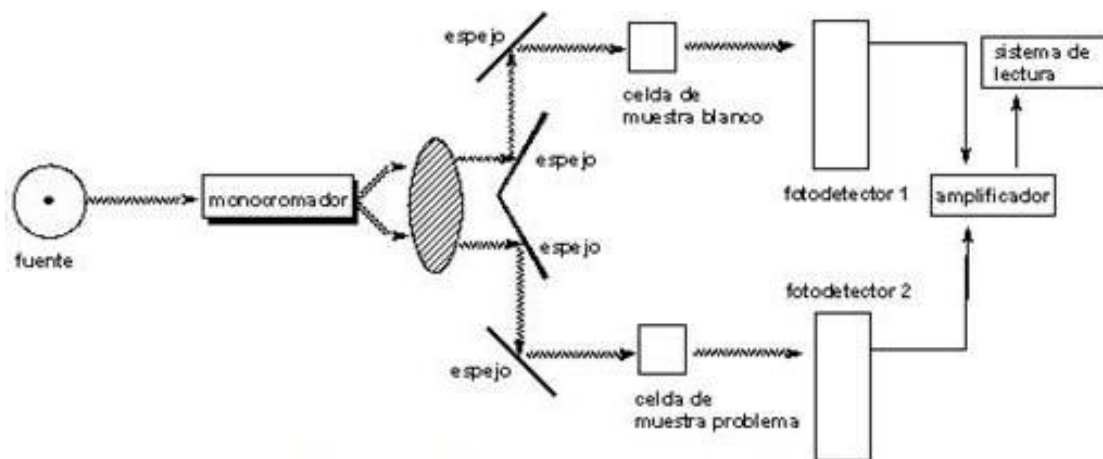


Figura 1. Diagrama de las partes que componen un espectrofotómetro de doble haz.

El espectrofotómetro Cary 5000 consta de tres lámparas: 1) una lámpara de tungsteno halógeno con ventana de cuarzo que es la fuente de la región del visible, 2) una lámpara de deuterio, D₂, para la región del ultravioleta y 3) una lámpara de mercurio, Hg, para la validación automática de precisión de longitud de onda, ver Fig. 2. El equipo cuenta con un sistema de administración de lámparas Plug-and-Go® que garantiza que estas se reemplacen fácilmente y pre-alineen.

El diseño de doble haz permite el registro de la relación señal/ruido (S:R), el cual es un modo de barrido que controla el nivel de precisión durante todo el barrido. Este modo es especialmente útil para muestras cuya absorbancia, o por ciento en reflectancia (%R), varían significativamente en todo el intervalo de longitudes de onda. Además, consta de un monocromador Littrow doble fuera del plano y rejillas doble cara controladas por la computadora.

Los detectores del Cary 5000 son de alto rendimiento en el intervalo de longitudes de onda entre 170 nm a 800 nm el cual consta de un tubo fotomultiplicador R928. El detector para el NIR es una fotocélula de sulfuro que incorpora tecnología PbSmart® para un óptimo bajo nivel de ruido y máximo rendimiento de linealidad.

El mecanismo Lock Down® permite colocar los accesorios o aditamentos de forma rápida y repetible, lo cual garantiza que la trayectoria del haz de luz del espectrofotómetro sea reproducible durante las mediciones.

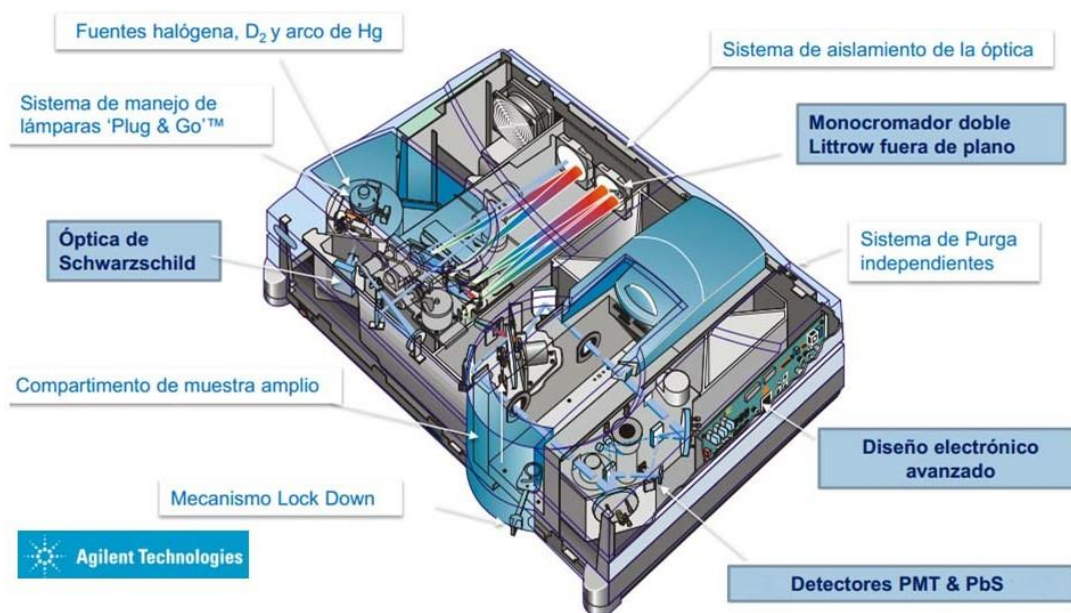


Figura 2. Diagrama de las partes del espectrofotómetro UV-Visible-NIR Cary 5000

2 Requisitos de operación

La computadora mediante la cual se opera el espectrofotómetro es de la marca Dell OPTIPLEX 960, con procesador Intel Core 2 Duo, memoria 2 GB RAM, disco duro 250 GB SATA 3.5 con software Windows 7 Pro 32-b.

Se recomienda trabajar a temperatura de 20-25 °C con una variación de ± 2 °C en un día de trabajo.

El Cary 5000 se opera por medio del software Cary WinUV, este software contiene varias aplicaciones las cuales se describen a continuación:

Tabla 1. Descripción de aplicaciones del software Cary WinUV

Aplicación	Descripción
ADL Shell	Una plantilla predefinida para escribir programas ADL
Advanced Reads	Para coleccionar la absorbancia leyendo múltiples muestras a una o varias longitudes de onda (hasta 6).
Align	Para varias alineaciones del instrumento, lámparas y accesorios.
Concentration	Para análisis cuantitativo
Kinetics	Para realizar determinaciones cinéticas a una longitud de onda o un intervalo de longitudes de onda.
Scan	Para ejecutar o ver colección de datos.
Scanning Kinetics	Para realizar determinaciones cinéticas a un intervalo de longitudes de onda.
Simple Reads	Para tomar lecturas de absorbancia a una o varias longitudes de onda (hasta 6 longitudes de onda).
System Information	Para registrar su empresa y detalles instrumentales para usar en informes, etc.
Validate	Para evaluar su instrumento y asegurarse que está trabajando correctamente.

3 Encendido del equipo



Figura 3. Espectrofotómetro UV-visible-NIR Cary 5000

Antes de encender el equipo Cary 5000, en primer lugar es necesario verificar que la fuente de energía esté encendida, el equipo está conectado a un *no break Eaton*® el cual tiene dos baterías, que una vez cargadas pueden soportar la carga eléctrica del equipo hasta por 30 minutos sin corriente eléctrica.

El interruptor de encendido se encuentra al frente en la parte izquierda baja del equipo, que una vez que se enciende, se ilumina el LED verde que se encuentra al lado del interruptor (Fig. 4).



Figura 4. Interruptor de encendido del espectrofotómetro Cary 5000

El equipo debe encenderse al menos 30 minutos antes de realizar mediciones, esto se debe a que las lámparas necesitan estabilizarse. La máxima eficiencia de las lámparas se alcanza después de una hora, de este modo se pueden realizar mediciones cuantitativas de calidad.

4 Software Cary WinUV: aplicación Scan

El equipo se manipula a través del software Cary WinUV y sus aplicaciones. Al encender la computadora, se debe acceder a la sesión de *usuarios Cary*.

Una vez que se ha dejado estabilizar la lámpara, en la pantalla de la computadora se encuentra el acceso directo *Cary WinUV* (Fig. 5) al darle doble clic se abre la carpeta donde están los iconos de las aplicaciones (sección 2) para controlar el espectrofotómetro (Fig. 6).



Figura 5. Icono del software Cary WinUV

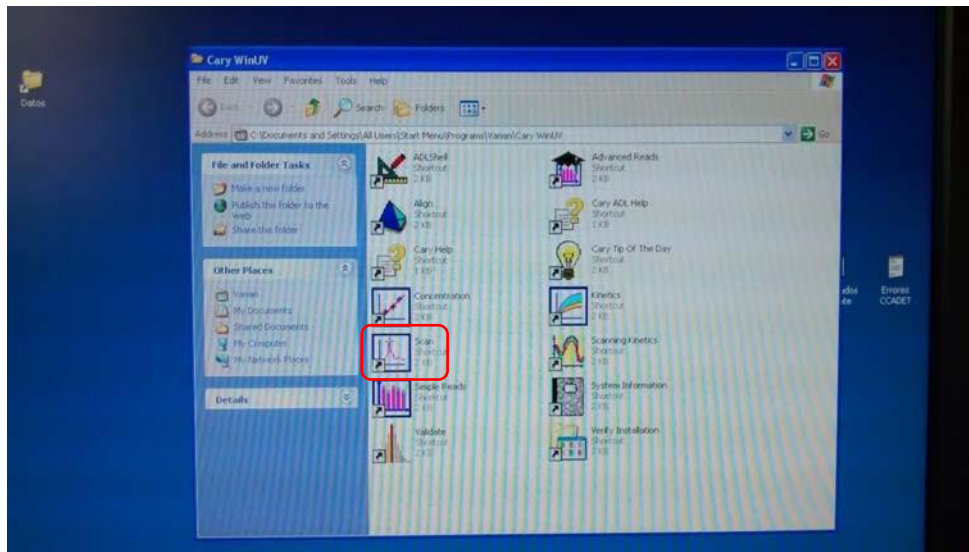


Figura 6. Pantalla donde se visualiza la carpeta del software Cary WinUV y los accesos directos para manipular el equipo. En el ovalo rojo se indica la aplicación Scan para realizar las mediciones.

Una vez abierta la carpeta Cary WinUV se debe elegir la aplicación de Scan dando doble clic, Fig. 7, con esta aplicación se pueden medir espectros con cualquiera de los aditamentos con los que cuenta el equipo Cary 5000.



Figura 7. Aplicación Scan.

Al dar doble clic a Scan para inicializar la aplicación, vamos a escuchar un sonido que indica el acomodo de la parte óptica del equipo que se ajusta para medir los espectros.

La pantalla de la aplicación Scan:

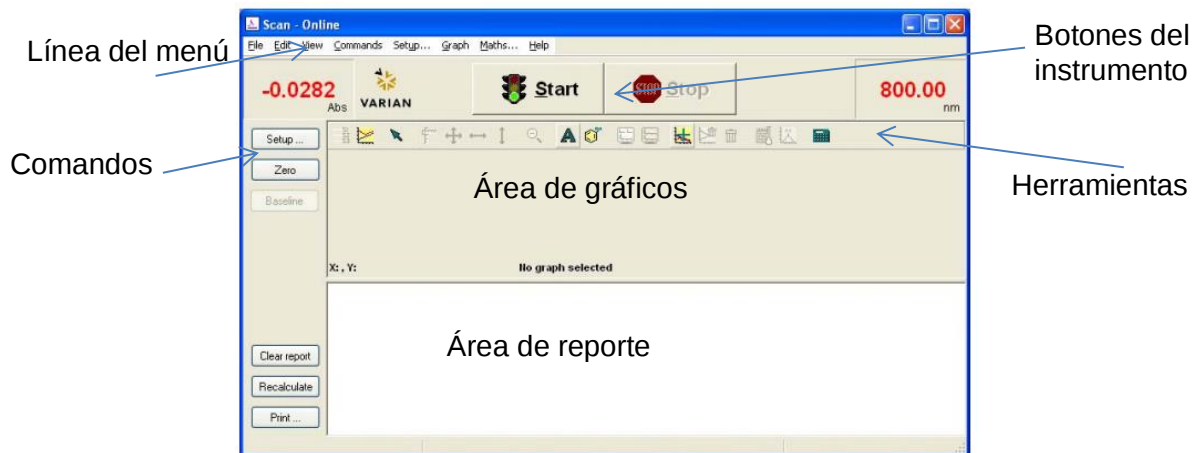


Figura 8. Pantalla de la aplicación Scan.

Línea menú

Cada aplicación contiene una línea de menú directamente debajo de la barra de título de la ventana. Esta barra muestra una lista de comandos: File (Archivo), Edit (Editar), View (Ver),... y Help (Ayuda).

Se puede acceder a los comandos haciendo clic en el elemento deseado con el mouse o presionando Alt y la letra activa (subrayada) en nombre del menú (por ejemplo, Alt + E para acceder al menú Editar). Al dar clic se mostrará una lista del menú. Se puede acceder a las opciones en la lista de menú de la misma forma. Para una descripción de los diversos elementos del menú y las opciones, se puede referir a Help (Ayuda).

Es importante notar que cuando los elementos u opciones del menú aparecen en gris, no están disponibles para su selección.

Barra de Herramientas

La barra de herramientas (Fig. 8) de la aplicación Scan tiene una serie de iconos que nos permiten hacer modificaciones en el área del gráfico, los iconos se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Descripción de iconos en la barra de herramientas

ICONO	DESCRIPCIÓN
	Preferencias de seguimiento (<i>tracking preferences</i>): permite elegir el color de la gráfica (haciendo clic con el botón derecho del mouse sobre la curva seleccionada), cambia el nombre de la gráfica, ocultar.
	Preferencias de gráfico (<i>Graph Preferences</i>): permite cambiar entre diferentes estilos de cuadrícula, estilos de las gráficas y el intervalo de segmentos en cada eje.
	Modo de cursor (<i>Cursor Mode</i>): permite cambiar entre el cursor que sigue el gráfico y aparece donde lo tiene.
	Ejes Escala (<i>Axes Scale</i>): permite especificar los intervalos para los ejes, el formato es de menor valor al mayor para ambos ejes. También, permite seleccionar algunos intervalos previamente utilizados.

	Auto-escala (XY): Al hacer clic sobre éste icono, se establecerá el intervalo de ambos ejes para encajar en el dominio X y Y de la gráfica seleccionada.
	Auto-escala (Y), Al hacer clic en (<i>Autoscale Y</i>) cambiará el rango Y a tener un máximo ligeramente mayor que el máximo actual y un mínimo ligeramente menor que el mínimo actual.
	Auto-escala (X), Al hacer clic en (<i>Autoscale X</i>) se cambiará el dominio X en el gráfico para que encaje exactamente los valores x de la gráfica en este momento.
	Alejar (<i>Zoom Out</i>): Al hacer clic en éste icono se cambiarán los rangos a los especificados en la ventana del <i>Setup</i> (Configuración).
	Agregar etiqueta (<i>Add Label</i>)
	Agregar imagen (<i>Add Picture</i>)
	Gráfico individual/múltiple (<i>Single/Multi Graph</i>)
	Arreglos automáticos de los Gráficos (<i>Auto Arrange Graphs</i>)
	Eliminar gráfico (<i>Remove Graph</i>): eliminará el gráfico seleccionado.
	Borrar (<i>Clear All Traces</i>): ocultará todos los espectros en el gráfico seleccionado y hará que el gráfico quede en blanco. Los espectros seguirán estando disponibles en la ventana/menú "preferencias de seguimiento".
	Formulario de datos del usuario (<i>User Data Form</i>): agrega información en un formulario.
	Etiquetas de los máximos (<i>Peak Labels</i>): permite etiquetar los máximos de las bandas en el gráfico.
	Matemáticas (<i>Maths</i>): permite realizar varias operaciones matemáticas para la gráfica seleccionada.

Una vez abierto el programa *Scan*, en un inicio los números que aparecen en las esquinas superiores de la pantalla están de color azul, cuando el programa se encuentra en comunicación con el espectrofotómetro los números cambian de azul a rojo (Fig. 9) y el equipo está listo para usarse.

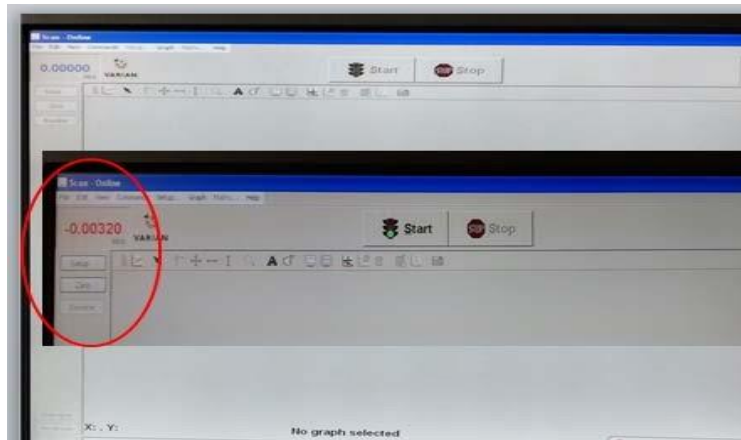


Figura 9. Ventana de la aplicación Scan

5 Scan: configuración

Una vez activa la aplicación *Scan*, se configuran los parámetros con los cuales se van a realizar las mediciones. Para ello se debe entrar al menú *Setup* (configuración); para entrar a esta opción existen dos rutas: 1) con el comando *Setup* que se encuentra debajo de los números de la pantalla al lado izquierdo y 2) por medio del menú *Setup* en la línea del menú de la aplicación.

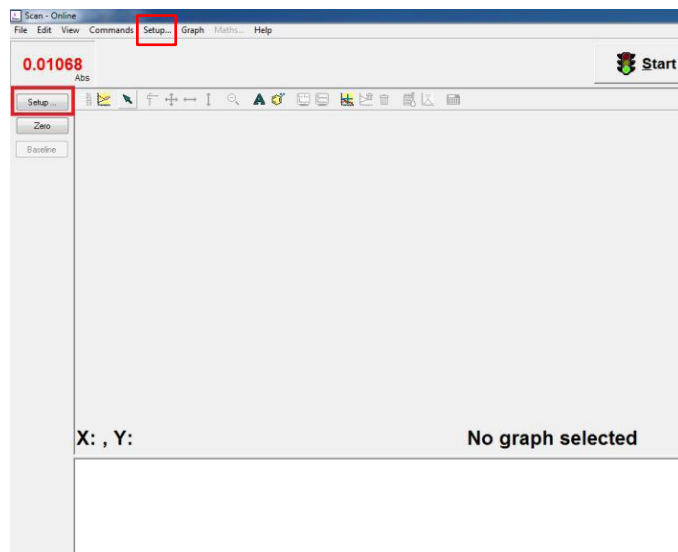


Figura 10. Ventana de la aplicación Scan recuadro rojo comandado Setup.

Una vez que se abre la ventana del *Setup*, se eligen las condiciones experimentales para llevar a cabo la medición de los espectros con las pestañas *cary* y *Baseline* (Fig. 10).

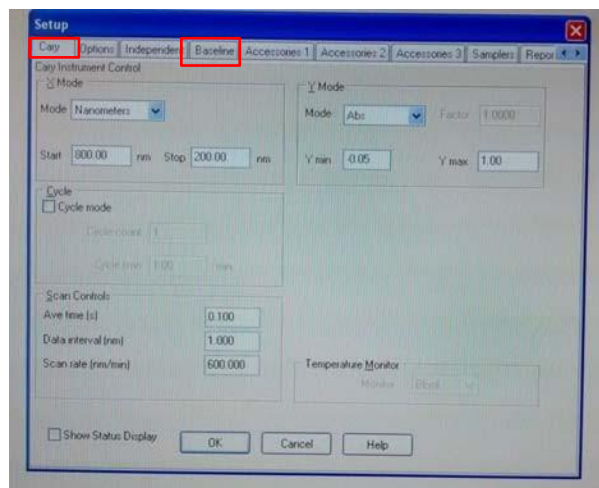


Figura 11. Ventana de menú Setup.

En la primera pestaña que corresponde al menú Cary, hay varios recuadros. En el primer recuadro “X Mode” se selecciona el intervalo de longitud de onda que se va a medir y las unidades en las que se va a registrar la longitud de onda, habitualmente son nanómetros (nm), pero también se pueden medir en número de onda (cm^{-1}) o Angstroms ($\text{\AA}$).

El espectrofotómetro Cary 5000 puede operar en un intervalo de longitudes de onda de 170 a 3300 nm (con excepción de la esfera de integración donde sólo se puede medir de 200-2500 nm), pero el intervalo más común de trabajo es de 200 a 800 nm que abarca el intervalo del UV y el visible.

En el recuadro “Y Mode”, se elige las opciones para medir la absorbancia del analito (A) u otra magnitud equivalente como puede ser porcentaje de transmitancia (%T), porcentaje de reflectancia (%R), función Kubelka-Munk (F(R)), entre otras. La elección de la magnitud a medir depende del tipo de estudio o análisis que se desee hacer a la muestra, esto a su vez define el aditamento que se va a emplear.

Cuando las muestras son líquidas generalmente se elige Absorbancia, en el caso de polvos se elige reflectancia o la función F(R), para películas se emplea %T si la película es transparente, o %R si la película es tipo espejo.

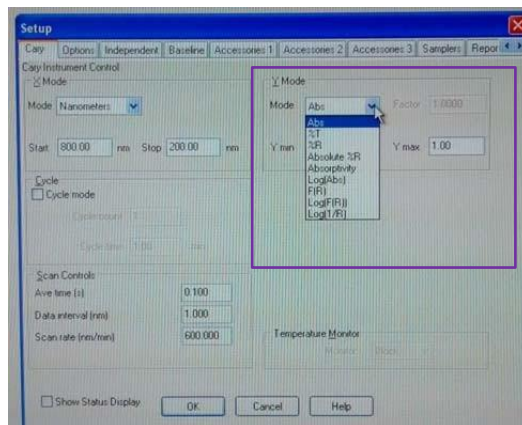


Figura 12. Ventana de menú Setup opciones para “Y Mode”.

Para cada aditamento hay un intervalo de valores mínimo y máximo que se puede emplear para la escala “Y”, por ejemplo, para absorbancia en automático el intervalo que da el software es -0.05 a 1.00, para %T va de 0 a 105. Este intervalo se puede modificar cuando el usuario conoce *a priori* el tipo de respuesta de su muestra.

En el recuadro *Cycle* podemos programar el equipo para que se adquieran varios espectros en un cierto tiempo. Al seleccionar la opción de *Cycle mode*, se activa *Cycle count* en esta opción colocamos cuantos espectros queremos tomar, mientras que en *Cycle time* se coloca el intervalo en minutos en que se van a medir los espectros, Fig. 13.

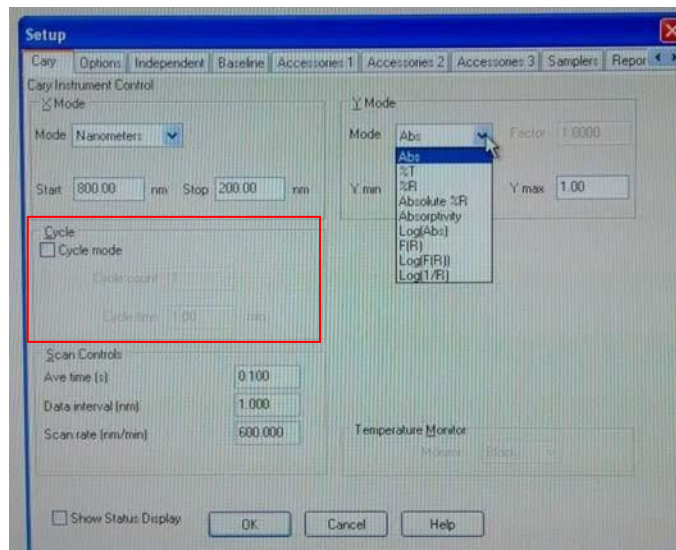


Figura 13. Ventana de menú Setup recuadro “Cycle”.

En el recuadro de *Scan Controls* se observa las opciones de velocidad con la cual se adquiere el espectro. Es posible variar el tiempo de adquisición de un espectro y la resolución, por tanto, la velocidad de adquisición de un espectro.

No es recomendable mover los parámetros que se encuentran ya programados (600 nm por minuto), a menos que sea estrictamente necesario para reducir el tiempo de medición o mejorar la relación señal/ruido. No es recomendable mover este parámetro debido a que podemos variar la relación señal/ruido y obtener resultados no deseados, Fig.14.

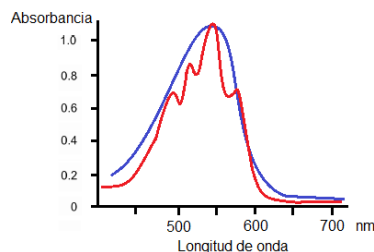


Figura 14. El espectro azul adquirido a una velocidad de 600 nm/min y el espectro rojo fue tomado a 50 nm/min.

En la pestaña de “Options”, Fig. 15, podemos cambiar la opción de haz doble o un solo haz, esto depende del tipo de experimento o aditamento, pero en general, no para los aditamentos con los que cuenta el LUCE. Otro punto importante de esta pestaña, es que describe donde pueden observarse pequeñas

discontinuidades o “saltos” en el espectro. En los espectros obtenidos en el Cary 5000 se observan dos y se deben a: 1) el cambio de lámpara el cual ocurre a 350 nm, cuando la lámpara de deuterio se cambia por la lámpara de halógeno (Visible-NIR) y 2) un segundo “salto” ocurre en 800 nm por el cambio de detector. En el intervalo de 200-800 nm se utiliza un fotomultiplicador y para el intervalo del NIR (800-3300 nm) se utiliza un detector de PbS.

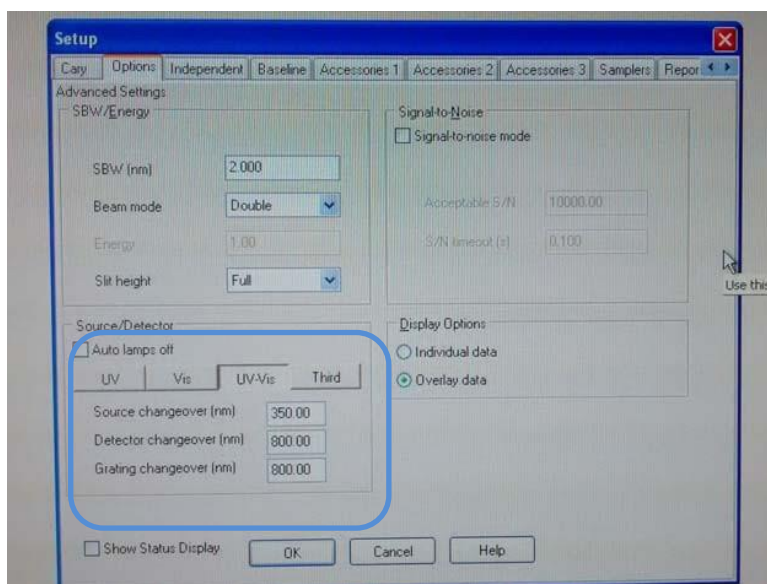


Figura 15. Ventana de menu “Setup” pestaña “Options”.

En la pestaña “Baseline” se selecciona la opción para medir la línea base, la cual es recomendable siempre medir debido a que así se elimina la señal que corresponde a la interacción de la lámpara con el detector.

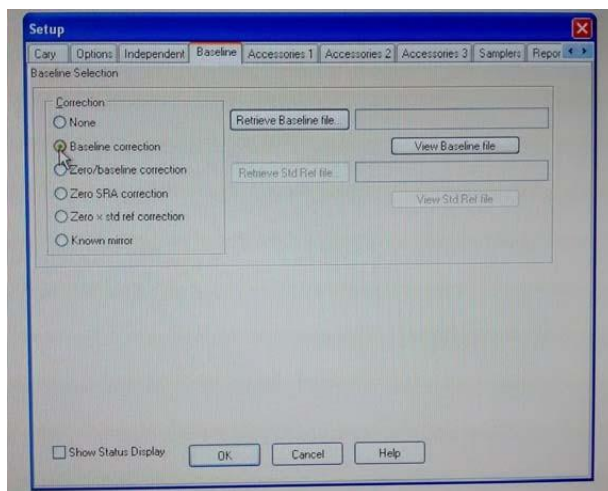


Figura 16. Ventana de menu “Setup” pestaña “Options”.

Hay dos opciones para medir la línea base, una puede ser *Baseline correction* y la otra *Zero/baseline correction*. La principal diferencia entre ambas opciones es que en el caso de *Baseline correction* sólo se mide el 100% de T, esto si se piensa obtener espectros en Absorbancia (A) o transmitancia (T) y en el caso de reflectancia o F(R) se mide el 100% R.

Con la opción *Zero/baseline correction* se mide el 100% (sin muestra o con la referencia adecuada para el aditamento) y 0% en transmitancia (obstruyendo el paso de luz en el haz de la muestra).

Una vez elegidas las condiciones experimentales se elige la opción OK y se cierra la ventana en automático.

Se regresa a la pantalla inicial, donde los comandos a la izquierda de la pantalla se han activado (Fig. 17).

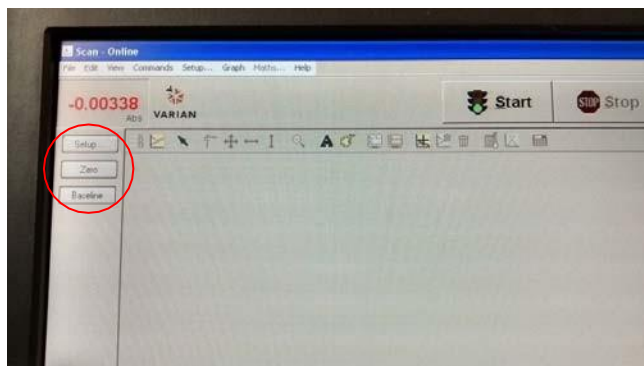


Figura 17. Pantalla principal de la aplicación Scan comandos Sepup Zero y Baseline.

6 Aditamentos

Cómo colocar los aditamentos

Antes de iniciar las mediciones se debe colocar el aditamento adecuado para el tipo de muestra, todos los aditamentos tienen la misma base, la cual es una placa metálica con 3 pines metálicos en la base (Fig. 18).

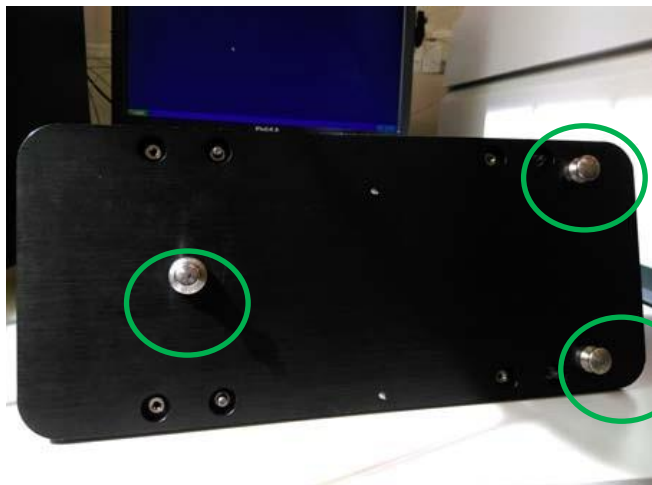


Figura 18. Base del aditamento.

Para colocar el aditamento, éste debe sujetarse únicamente de la base y de la agarradera que tiene al centro. Para introducir el aditamento dentro del compartimento de la muestra hay que colocar los dos pines al fondo y al frente el tercero, que está al centro, como se muestra en la figura 19.



Figura 19. Forma en la que debe sujetarse y colocarse el aditamento.

Los pines de la base se anclan al compartimento de la muestra con la palanca que se encuentra en la parte inferior del compartimiento para las muestras con el mecanismo “Lock down”.



Figura 20. Mecanismo “Lock down” para sujetar el aditamento.

Para sujetar el aditamento es necesario desplazar la palanca hacia la izquierda, es importante verificar que la palanca se mantenga en la posición final y no se regrese. Además, se debe verificar que el aditamento este de forma paralela y bien asentado en la base del compartimiento de la muestra, ya que en el caso de que este no este colocado de forma correcta puede provocar cambios en el trayecto del haz de luz. Debido al diseño del espectrofotómetro de doble haz, tenemos un haz de luz para el blanco y otro para la referencia, para ambos se debe verificar que el paso de la luz no se obstruya.

El equipo debe cerrarse adecuadamente ya que el experimento debe realizarse en oscuridad. Para los diferentes aditamentos y debido a sus dimensiones se utilizan diferentes tapas (Fig. 21), todas tienen la misma forma al frente, dos cejas que se colocan en los canales al frente del compartimiento de la muestra y se cierran con la puerta corrediza, la cual está asociada a los obturadores de los detectores.



Figura 21. Tapas para los diferentes aditamentos del Cary 5000

Descripción de los aditamentos

Los aditamentos con los que cuenta el LUCE son: líquidos, polvos, películas y esfera de integración. La elección del aditamento que se va a emplear para medir una muestra en el espectrofotómetro Cary 5000 depende principalmente de sus propiedades físicas, es decir, si la muestra es sólida, líquida, es un polvo o una película, así como color, turbidez o transparencia. Para colocar los aditamentos dentro del compartimiento de la muestra es necesario tomar el aditamento de las manijas y con cuidado hacer embonar la base del aditamento seleccionado con la base del compartimiento (Fig.22).



Figura 22. A) Aditamento de líquidos tomado por su manija para ser colocado en el compartimiento de la muestra del equipo y B) los orificios en la base del comportamiento de muestra.

En general cada aditamento tiene dos portamuestras para colocar la muestra y la referencia. Cada aditamento es específico para un cierto tipo de medición, es decir, si la muestra es líquida se usará el aditamento de la Fig. 23 y un par de celdas de cuarzo. Si se trata de películas, en la Fig. 26 se muestran varias opciones para colocar y definir el área de exposición de la muestra. En el caso de polvos, se cuenta con el aditamento Praying Mantis®, para mediciones de reflectancia difusa, Fig. 29. Por último, está la esfera de integración, que se recomienda para películas, pinturas, así como, para medir la transmisión de materiales refractarios, turbios, translúcidos u opacos donde las técnicas estándar demostraron ser inadecuadas debido a la pérdida de luz resultante de los efectos de dispersión de la luz en la muestra (Fig. 33).

1) Líquidos



Figura 23. Aditamento para líquidos.

Cuando se miden disoluciones y muestras líquidas es importante tomar en cuenta sus propiedades físicas como volatilidad, densidad, otro dato importante es la ventana óptica útil del disolvente o intervalo de transparencia UV (Fig. 23).

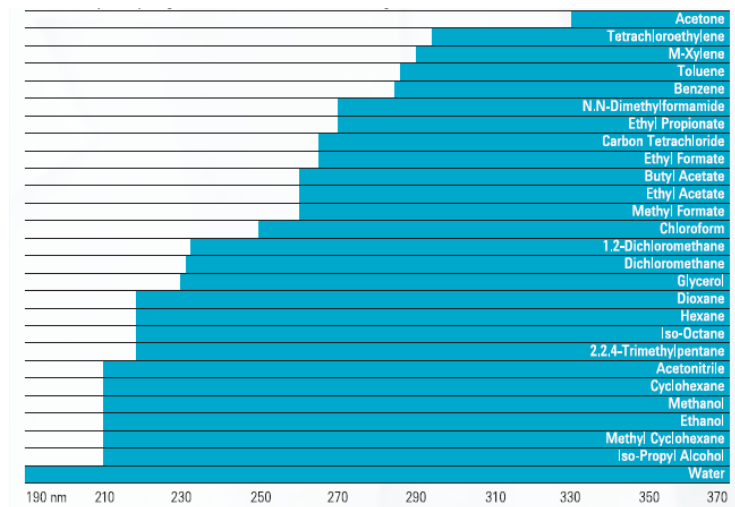


Figura 24. Intervalo de transparencia UV para diferentes disolventes: intervalo azul.

De acuerdo con la ley de Lambert-Beer, la cual describe la proporcionalidad entre la intensidad de luz absorbida y la concentración de analito, dada por:

$$A = C \epsilon l$$

De acuerdo con esta relación a una longitud de onda dada y con una celda de un espesor l , la absorbancia A es proporcional a la concentración de la muestra C , lo que constituye el fundamento del análisis espectrofotométrico cuantitativo. Donde ϵ es la “absortividad molar” (una medida de la radiación absorbida), que es un valor constante para cada sustancia a cada longitud de onda λ y en condiciones experimentales determinadas; también se denomina “coeficiente de extinción molar” si la concentración se expresa en moles por litro.

Existen factores que afectan el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer, especialmente a concentraciones elevadas. Por ello antes de proceder al análisis de una muestra es preciso comprobar experimentalmente el rango de concentraciones en que dicha ley se cumple, obteniendo la curva de calibrado que relaciona las absorbancias con las concentraciones (fig. 25).

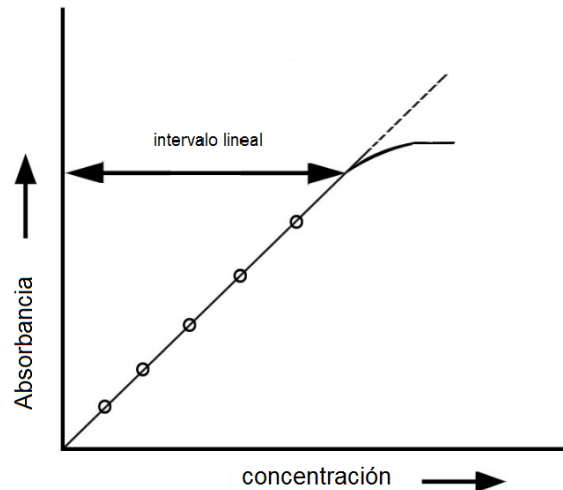


Figura 25. Desviación de la ley de Lambert-Beer para altas concentraciones.

2) Películas



Figura 26. Aditamento para películas.

Al hacer uso de este aditamento se deben emplear dos portamuestras con el mismo tamaño: 1, 5 y 10 mm. En el caso de los portamuestras de 1 y 5 mm, es importante notar que no son simétricos en el eje horizontal, es decir, tienen 2 pares de orificios y tres pares de orificios, deben colocarse de la misma forma para el haz de referencia y el haz de la muestra.

Una vez que se colocan los portamuestras en el aditamento estos deben sujetarse con el tornillo A, previamente con el tornillo B se deben colocar en la placa (C) en los carriles (D). El portamuestras en el riel del aditamento debe colocarse al centro, pues en este punto es donde pasa el haz de luz (Fig. 26).

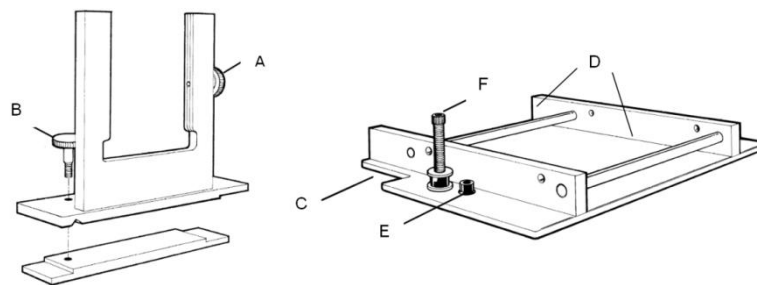


Figura 27. Aditamento para películas: A) tornillo para sujetar los portamuestras, B) tornillo para sujetar la placa a la base del aditamento, D) riel donde se coloca la placa y los tornillos ajustadores F y E son para calibrar la base.

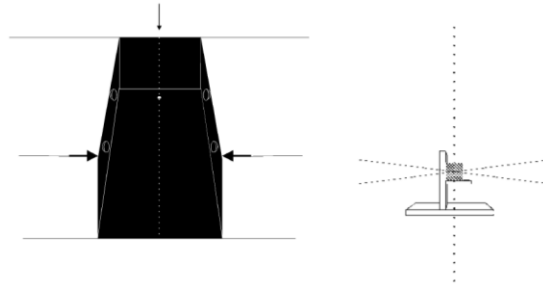


Figura 28. Alineación de la muestra en el compartimento de muestra. La línea punteada indica el centro del compartimiento.

3) Polvos por reflectancia difusa (Praying Mantis®)

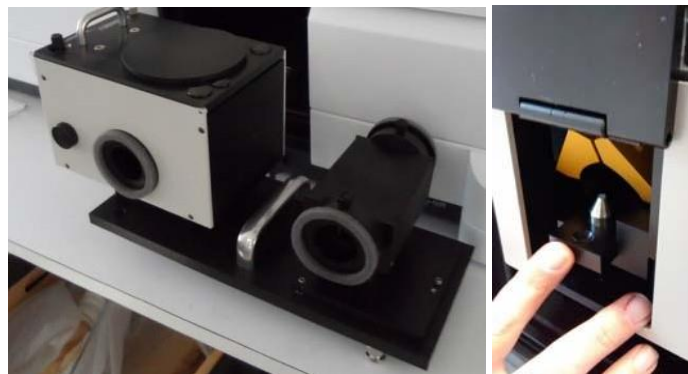


Figura 29. Aditamento para polvos o Praying Mantis®.

El praying mantis® es un aditamento que se basa en el principio de reflectancia difusa. Este aditamento es ideal para estudios confiables de reflectancia difusa de polvos y otras muestras sólidas de superficie rugosa.

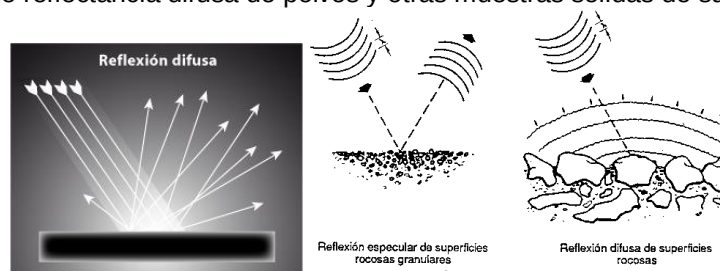


Figura 30. Reflexión especular en diferentes tipos de muestras lisa, rocosa granular y rocosa.

El aditamento consta de un arreglo de espejos fig 31, el haz de luz que proviene de la fuente llega al espejo M1 el cual se refleja al M2 y el espejo M3 que es un espejo cóncavo direcciona el haz de luz a la muestra S, el espejo cóncavo M4 colecta la respuesta en todas direcciones y la centra en el espejo M5. Por último, de M5 pasa a M6 y este último dirige el haz al detector.

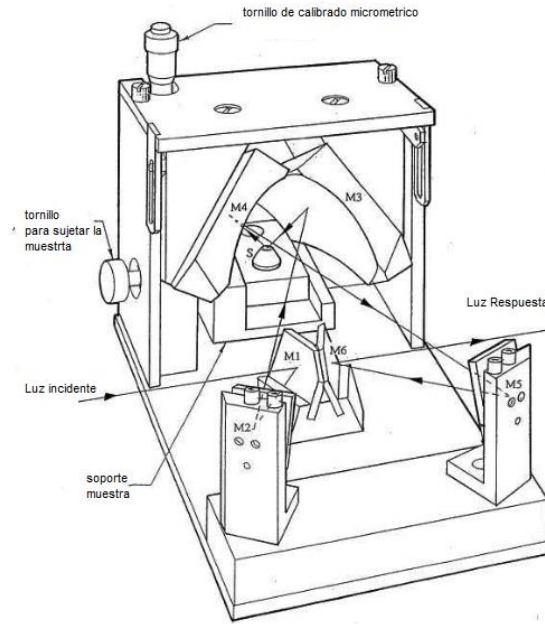


Figura 31. Interior del aditamento praying mantis®.

Debido al recorrido que hace a través del arreglo de espejos el haz de luz, es importante, preparar la muestra correctamente. Para ello, se debe moler la muestra para asegurar la homogeneidad del tamaño de grano de la muestra, con lo cual se evita perder parte de la respuesta de la luz que se refleja de la muestra o que se pierde al penetrar la superficie de la muestra (Fig. 10).

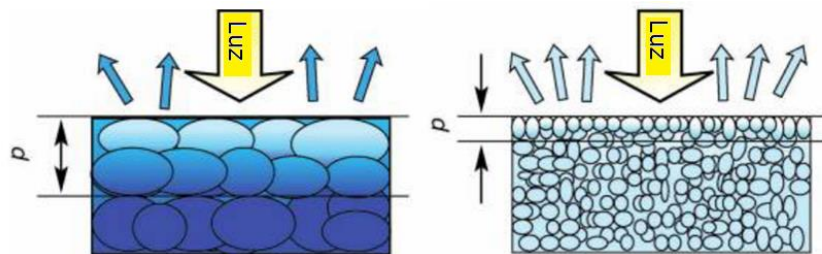


Figura 32. Penetración del haz luz en la muestra dependiendo del tamaño de grano.

4) La esfera de integración



Figura 33. Esfera de integración

La esfera de integración o integradora mide la reflectancia y transmitancia. La reflectancia espectral relativa (transmitancia) se define como la relación entre el flujo reflejado (transmitido) por la muestra y el de una superficie estándar bajo condiciones geométricas y espectrales idénticas. Para la transmitancia, la superficie estándar es aire, y para la reflectancia la superficie estándar es un blanco secundario calibrado en relación con el difusor perfectamente reflejante, en el caso de este aditamento se usa politetrafluoroetileno (teflón).

Debido a la geometría de la esfera integradora, ésta tiene la capacidad de captar la mayor parte de la radiación reflejada o transmitida, eliminar cualquier preferencia direccional y presentar una señal integrada al detector. El intervalo de trabajo de la esfera es de 200 a 2500 nm.

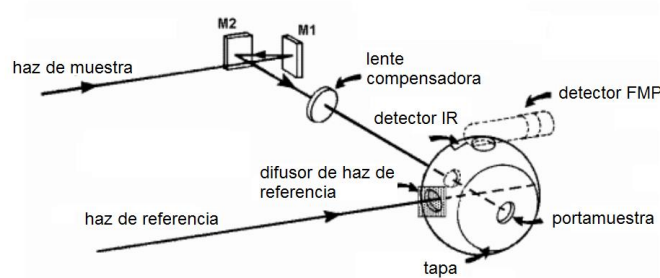


Figura 34. Diagrama del interior de la esfera de integración.

Para la esfera de integración la muestra debe ser homogénea, preferentemente plana y de preferencia lo suficientemente grande para cubrir completamente el orificio frente a la esfera. Las muestras finamente pulverizadas se pueden estudiar usando una celda de polvo. También hay una opción de montaje disponible para muestras pequeñas.

Para medir únicamente la reflectancia difusa, coloque la tapa de la esfera con la marca 'D' hacia arriba. Coloque la marca 'S' hacia arriba para medir la reflectancia especular + difusa (reflectancia total). En la posición 'D', el ángulo del haz desde el plano normal al plano de muestra es de aproximadamente 0 grados. Cualquier componente especular de la reflexión se refleja hacia atrás a través del puerto de transmisión y es desviado por la lente en ángulo, lo que impide el reingreso a la esfera.

Con la tapa en la posición 'S', el ángulo de incidencia es de $3^{\circ}20''$. El componente especular golpeará la pared de la esfera y se difundirá dentro de la esfera. La reflectancia total se medirá entonces.

Al realizar mediciones en materiales brillantes (con una alta componente especular), se utiliza la placa de referencia sobresaliente. La superficie de referencia sobresale en la esfera y se comporta más como un difusor perfecto.

7. Línea base

Antes de realizar las mediciones siempre es necesario correr o adquirir la línea base, *baseline*, la cual resta la contribución que se debe a la interacción de las lámparas con los detectores de los espectros que dan información de la muestra, por esta razón el intervalo de longitud de onda en el cual debe medirse la línea base debe ser mayor o igual al intervalo de trabajo, nunca menor.

El blanco o referencia depende del aditamento que se van a usar para el tipo de muestra:

1. En el aditamento para películas (fig. 35) para medir la línea base se coloca los portamuestras con los que se va a sujetar la muestra. Se deben colocar en pares, es decir, el portamuestras donde se coloca la muestra debe ser igual al portamuestras donde se coloca el blanco o referencia.



Figura 35. Ejemplos de portamuestras para películas con diferentes áreas de exposición.

2. En el aditamento para líquidos, para medir la línea base, se no se coloca nada en los portamuestras de las celdas tanto en la referencia como en la muestra. Si se requiere usar las celdas, se debe colocar el disolvente que se va a usar como blanco, por ejemplo agua. Pero es importante recordar que se debe colocar las celdas en par y ambas con el disolvente de elección. No es recomendable usar las celdas vacías, porque se hacen tres cambios del medio por las dos caras de las celdas y después el aire dentro y fuera de la celda.

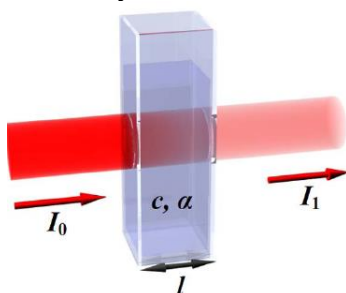


Figura 36. Paso de un haz de luz de intensidad I_0 a través de una celda de cuarzo con disolvente.

3. En el aditamento de sólidos en polvo o praying mantis® o la esfera de integración, se emplea el blanco discos o pastillas hechas de PTFE (politetrafluoroetileno).



Figura 37. Discos de PTFE para usar como referencias

En la pantalla del programa, en la parte superior izquierda debajo del número en rojo, ver Fig. 38, hay tres iconos *Setup*, *Zero* y una vez elegidos los parámetros para realizar las mediciones, se activa la opción de *Baseline*, damos un clic a este último y se abre una ventana, en la cual podemos leer el mensaje donde el software nos solicita insertar el blanco en el comportamiento muestra para coleccionar el espectro de línea base en 100 % T (Fig. 39).

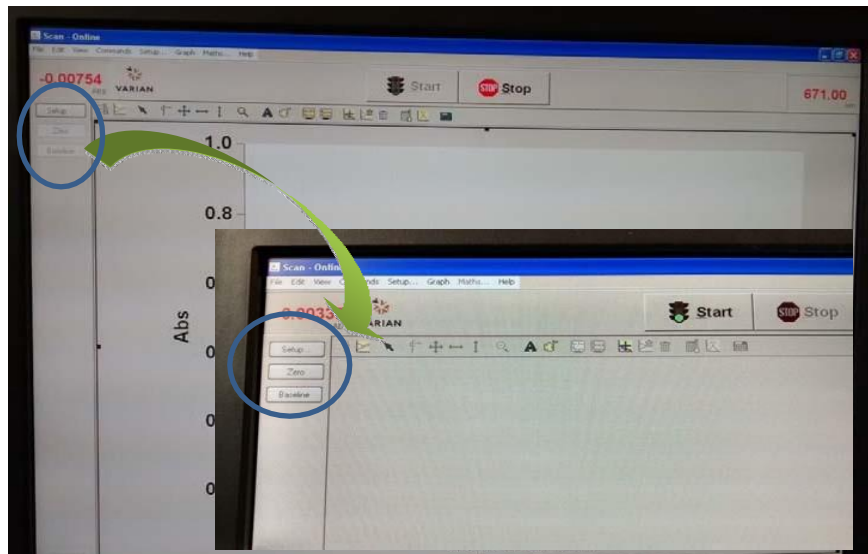


Figura 38. Iconos a la izquierda de la pantalla de la aplicación de Scan: Setup, Zero and Baseline.

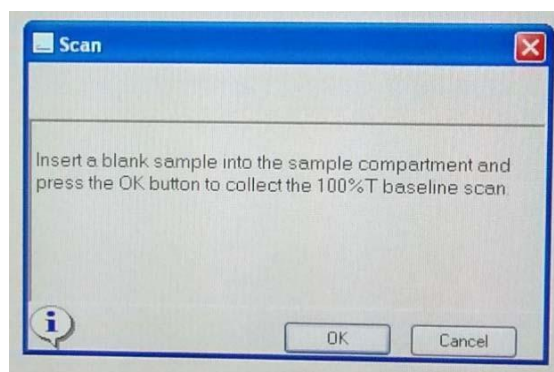


Figura 39. Ventana que aparece antes de medir la línea base

Una vez que se coloca el blanco que corresponde al aditamento, se da clic en la opción OK y se comienza a medir el espectro.

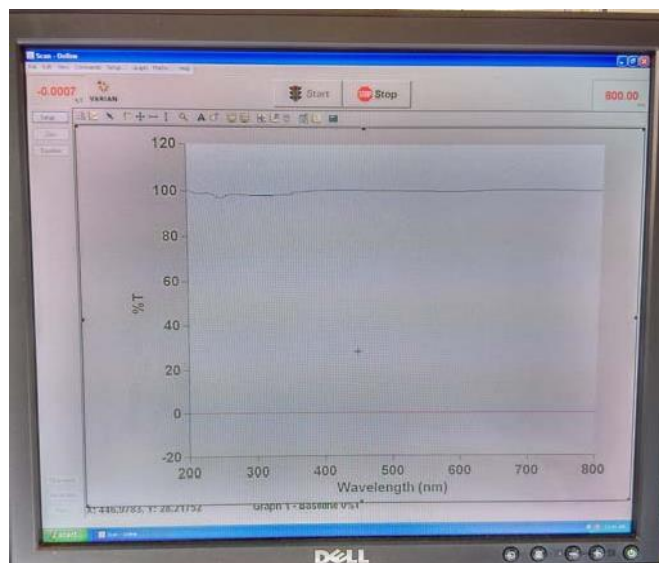


Figura 40. Línea base en 100% T y 0% T.

Para coleccionar el 0% T hay que bloquear el paso del haz de luz, únicamente en la parte donde se coloca la muestra. La parte que corresponde a la referencia hay que mantenerla libre al paso de la luz.

Líquidos y películas: se coloca una cartulina o laminilla negra para obstruir el paso de la luz en el lado donde se coloca la muestra.

Prying Mantis o aditamento para polvos: se quita el portamuestras (Fig. 37), por tanto, el camino de la luz se interrumpe.

Esfera de integración: no se coloca nada en la parte de la muestra, de esta forma el camino de la luz se interrumpe.

El espectro de la línea base se colecta, activando el icono "Baseline", es importante notar que cuando el equipo está haciendo la adquisición de los espectros, el icono en la parte central superior de la pantalla en forma de semáforo (*Start*), se apaga y se vuelve a poner activo cuando el espectro termina de ser colectado.

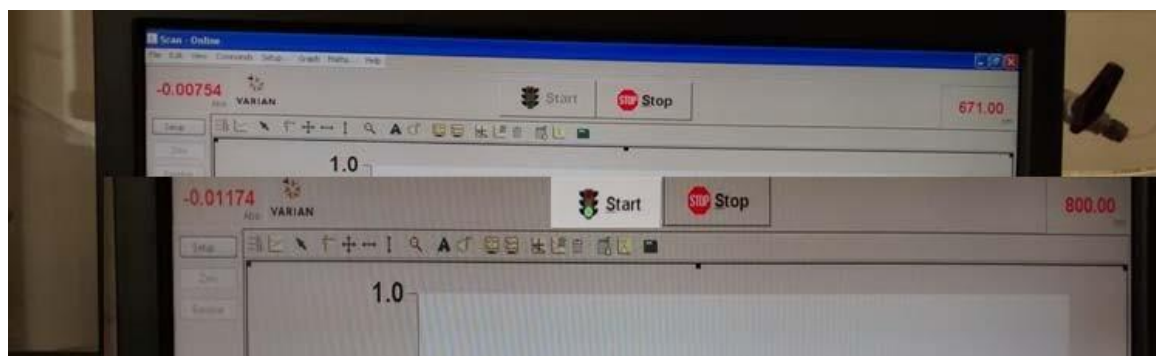


Figura 41. Icono de Start

8. Adquisición de espectros

Para coleccionar los espectros, ahora se debe colocar la primera muestra en el espectrofotómetro y después dar clic en el icono de Start (semáforo).

Aparece otra ventana, en la cual se da el nombre de la sesión de trabajo (no de la muestra), previamente o en este mismo momento se puede hacer una carpeta con el nombre del usuario para guardar los resultados.

Todas las carpetas de los usuarios se guardan en carpeta de *Datos* dentro de la cual hay otra carpeta que dice *USUARIOS* en la que se debe abrir una carpeta con el nombre y apellido del usuario, donde se colocan las carpetas por día de trabajo y en estas se deben guardar los resultados.

Este procedimiento es para guardar el nombre de la sesión en general no de la muestra que se va a medir.

Una vez que ya hemos nombrado nuestra sesión de trabajo damos clic en *save*, la ventana se cierra y en su lugar aparecerá una venta para colocar el nombre de nuestra primera muestra *Sample Name* donde colocará el nombre de la muestra que se va a medir, Fig. 42.

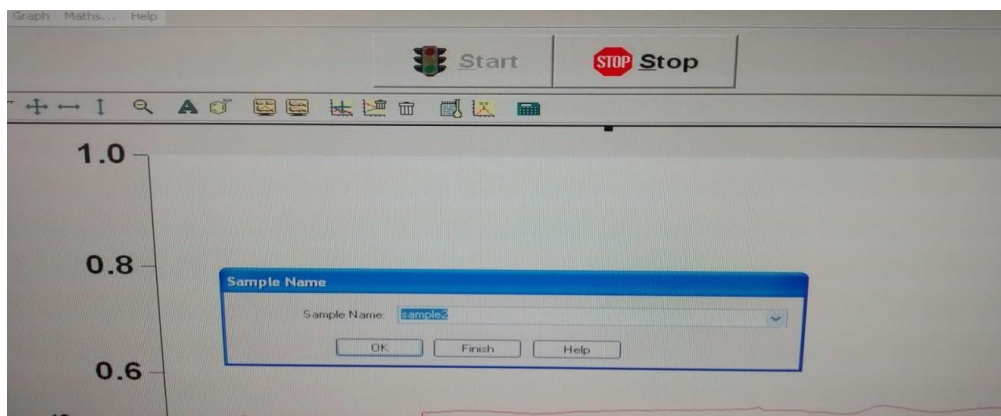


Figura 42. Ventana que aparece antes de medir la línea base

Una vez que esté colocada la muestra en el compartimiento de muestra y tras haber colocado el nombre de la muestra seleccionamos la opción OK.

Se coleccionará el espectro y una vez que termine de ser coleccionado volverá aparecer la ventana de Sample Name y nos solicitará el nombre de la segunda muestra, y así sucesivamente.

No es posible manipular el espectro mientras esta activada la ventana Sample Name, así como tampoco es posible utilizar ningún icono o función de la aplicación. Para poder manipular el espectro o utilizar alguna función del programa es necesario dar clic en *finish* lo cual significa que ya no vamos a medir otro espectro. Sin embargo, no se ha terminado la sesión, es decir, posteriormente se podrá volver a tomar otro espectro dando clic en Start (semáforo). En este caso nuevamente nos va a pedir un nombre para la siguiente serie de espectros, lo que procede es darle el mismo nombre y reescribir el archivo, o darle un nuevo nombre a la sesión.

Los espectros que estén en pantalla son los que se van a guardar al final de la sesión.

Los íconos en la parte superior del espectro se pueden emplear para modificar, el tamaño del espectro o para obtener los máximos, ampliar los ejes, etc.

Para hacer zoom en el espectro es necesario hacer únicamente un recuadro con el *mouse* sobre el espectro y dar clic con el botón derecho del *mouse*.

9. Fin de la sesión de trabajo.

Una vez que se termina de tomar los espectros de las muestras. Se procede a guardar los datos.

El software los guarda con una terminación *.BSW que es el formato de archivo que maneja el programa, lo que se debe hacer para guardar los espectros en un formato que se pueda manipular, hay que ir a la pestaña de File y elegir la opción Save As. En la siguiente ventana que se abra se debe dar nombre al archivo y guardarlo con extensión *.CSV, así se podrán manipular los datos en cualquier otro programa como Excel o Origin.

Una vez guardados los datos se puede cerrar el programa.

Si alguna vez por error se elige cerrar el programa sin guardar los datos, el programa abre un mensaje preguntando si se está seguro de querer cerrar el programa sin haber guardado los resultados.

Para apagar el equipo sólo se tiene que pagar el interruptor.

10. Referencias bibliográficas

Agilent Technologies, 2017, **Cary 5000 UV-Vis-NIR** [internet], Santa Clara, CA EUA
<https://www.agilent.com/en/products/uv-vis-uv-vis-nir/uv-vis-uv-vis-nir-systems/cary-5000-uv-vis-nir>
[Revisado 27 noviembre 2017]

Agilent Technologies, 2017, **Diffuse Reflectance Accessory (Internal)** [internet], Santa Clara, CA EUA
http://mmrc.caltech.edu/Cary%20UV-Vis%20Int.Sphere/manuals/Cary%20manuals/4000_5000_6000i_external_dra.pdf [Revisado 27 noviembre 2017]