



Manual

Actividades experimentales para analizar luz con un espectrómetro casero

**M. Esther Mata Zamora
Roberto Y. Sato Berrú
América Vázquez Olmos**

Proyecto Interno

ICAT

Financiamiento interno

Actividades experimentales para analizar luz con un espectrómetro casero

M. Esther Mata Zamora, Roberto Y. Sato Berrú, América Vázquez Olmos

Sistemas Híbridos y Nanospectroscopía

ICAT-UNAM

Resumen

El presente manual es una propuesta que busca acercar a los estudiantes de las materias de física, química e ingeniería electrónica al ámbito de la caracterización espectroscópica de materiales a través de experimentos accesibles que proporcionan un acercamiento a los fenómenos de absorción y emisión de luz. Con el fin de analizar estos fenómenos en el intervalo visible del espectro electromagnético se propone el uso de un espectrómetro casero y el análisis de imágenes obtenidas con una cámara digital empleando un software de acceso libre. El manual incluye una sección de ejemplos para la calibración del dispositivo, una sección de captura de espectros de fuentes de luz y otra sección del análisis de espectros de compuestos orgánicos preparados con materiales sencillos.

Índice

Nomenclatura

Introducción

1	Espectrómetros. Componentes básicos	5
2	Propuestas para la construcción de un espectrómetro casero	9
2.1	Protocolo para la captura de los espectrogramas	14
2.2	Tratamiento de las imágenes o espectrogramas	15
2.3	Calibración del eje-X	18
3	Aplicaciones del espectrómetro casero	22
3.1	Foco LED RGB	22
3.2	Lámparas de varios colores	23
3.3	Colorantes en gel	25
3.4	Extractos de compuestos luminiscentes	28
	Anexo A	33
	Anexo B	34
	Bibliografía	38

Nomenclatura

<i>Símbolo</i>	<i>Significado</i>
<i>CD</i>	<i>Compact Disk</i>
<i>DVD</i>	<i>Digital Versatil Disc</i>
<i>LED</i>	<i>Light Emitting Diode</i>
<i>RGB</i>	<i>Red Green Blue</i>

Introducción

La radiación electromagnética es un tipo de energía que se transmite en forma de onda, que viaja a una velocidad constante y que varía según el medio donde se propaga. Se la clasifica en intervalos de energía, dependiendo de la frecuencia y de su fuente en: rayos gamma, rayo-X, luz ultravioleta, luz visible, luz infrarroja, ondas de radio y microondas. El conjunto de todos estos tipos de radiación se llama espectro electromagnético. Las técnicas espectroscopías se basan en la naturaleza selectiva de las interacciones de la radiación electromagnética con la materia, así como en la cuantificación de estas interacciones (Millán, 2016).

Los experimentos propuestos en este manual permiten abordar fenómenos de absorción y emisión de luz en el intervalo visible del espectro electromagnético. El diseño y construcción del espectrómetro casero se retoma de los trabajos de Kovarik (2020) y Garrido-Gonzales (2016) y sus colaboradores, que considera cinco elementos básicos: la fuente luminosa, portamuestra, elemento dispersor, un dispositivo para la captura de imágenes y el uso de un software de libre acceso. El software permite hacer un tratamiento de imágenes para la adquisición de datos X-Y que se pueden graficar emulando en el eje de las abscisas las longitudes de onda y en el eje de las ordenadas la intensidad de luz transmitida, similar a los que se presenta como un espectro de transmitancia.

La estructura del manual consiste en presentar los elementos básicos a tomar en cuenta en el diseño de espectrómetros contruidos con materiales accesibles y relativamente económicos. El segundo tema presenta los pasos a seguir para la captura de los espectros (imágenes fotográficas) y su procesamiento con el *software ImageJ* (2018) que incluye la calibración del espectrómetro construido. El tercer tema tratado en este manual es la propuesta de realizar prácticas en las que se analizan fuentes luminosas y sustancias que absorben energía en la región visible del espectro electromagnético, es decir entre 400 nm y 700 nm. Los experimentos de emisión de sustancias orgánicas se acotan al fenómeno de fotoluminiscencia, para ello se usa una lámpara de luz negra (400 nm) como fuente de excitación. Los compuestos orgánicos

analizados se obtienen a partir de un proceso de extracción usando alcohol etílico a partir de vegetales y raíces.

El material complementario expuesto en los anexos incluye los espectros de absorbancia UV-vis de los compuestos orgánicos obtenidos en un espectrómetro Cary 5000. Además de los espectros de irradiancia de las fuentes luminosas obtenido con un espectrómetro Ocean Optics.

1. Espectrómetros. Componentes básicos

Desde el punto de vista instrumental, la luz blanca que proviene de una fuente luminosa pasa por un monocromador, este es un dispositivo óptico con el que se puede ir seleccionando una longitud de onda específica (Anexo A). La luz monocromática (es decir de un estrecho intervalo de longitudes de onda) pasa a continuación por la muestra (Figura 1). La muestra absorbe una fracción de luz para cada longitud de onda seleccionada y un detector mide la intensidad de luz que logra pasar o transmitir. Los espectrómetros comerciales están diseñados para proporcionar automáticamente valores de transmitancia o absorbancia en función de las longitudes de onda usando la electrónica adecuada. El intervalo de longitudes de onda que abarcan se encuentra entre 190 nm y 2500 nm (ultravioleta-visible-infrarrojo cercano).



Figura 1. Esquema general de un espectrómetro

La descripción detallada de cada bloque se puede consultar en libros especializados de espectroscopia como es el de Skoog *et al.* (2001). Si bien los equipos de laboratorio son de dimensiones relativamente grandes, también los hay de dimensiones reducidas en los que se diseñan aprovechando el desarrollo de las tecnologías en diversos campos de la óptica, electrónica, procesamiento de datos, entre otros. En la Figura 2 se muestra un modelo compacto de la marca Ocean Optics.



Figura 2. Espectrotómetro Ocean Optic. A la izquierda está el Módulo y a la derecha el portamuestras, ambos cubren una superficie de 30 cm².

En la Figura 3 se representan los diferentes arreglos de los cuatro bloques anteriormente mencionados, dispuestos dependiendo del tipo de espectroscopia.

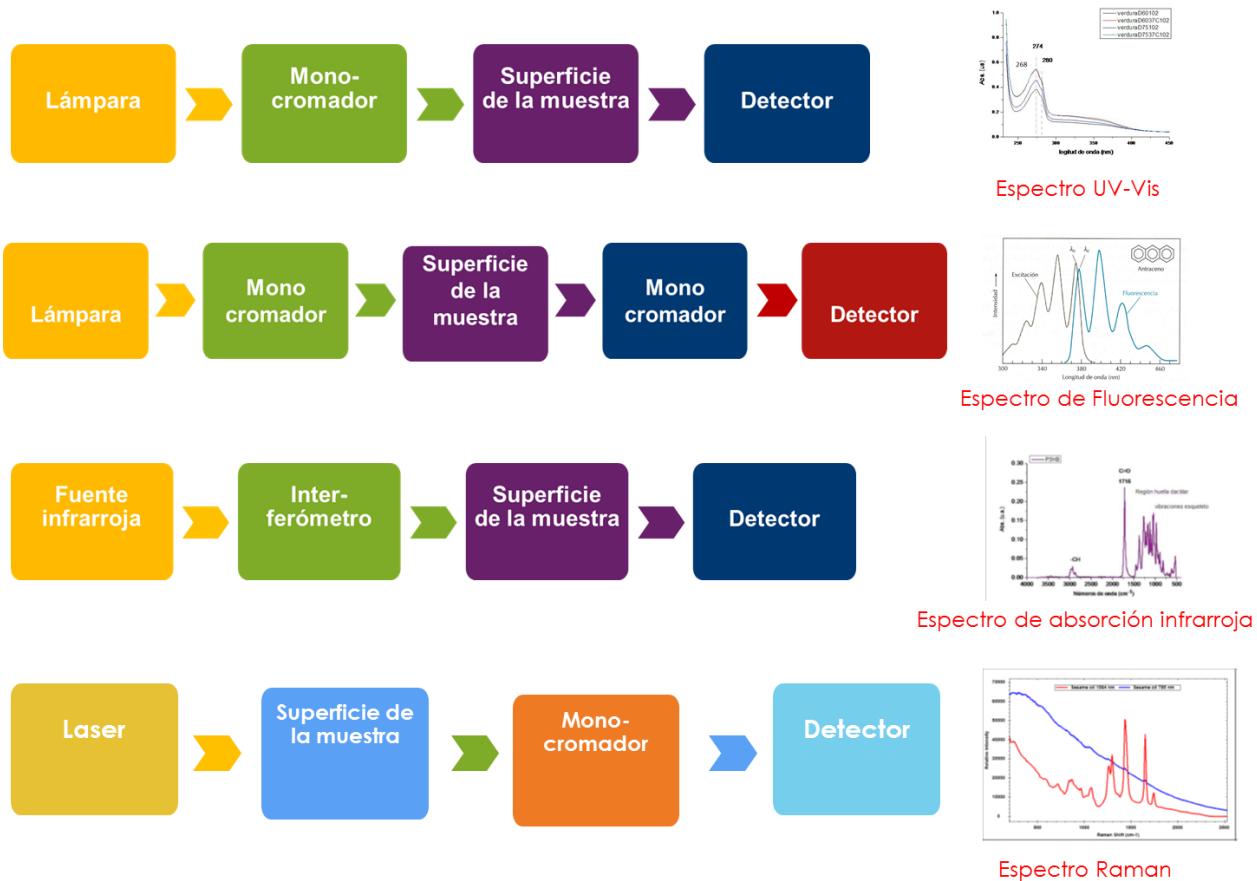


Figura 3. Diagrama de las diferentes configuraciones de los principales bloques para cada tipo de espectroscopía.

Los equipos de medición en los laboratorios de investigación se presentan como “cajas cerradas”, el usuario solo tiene acceso al compartimiento de muestras y al *software* para el procesamiento de datos. Generalmente en los laboratorios existe un manual de manejo del equipo con los puntos o parámetros más usados y por lo tanto estandarizados para obtener los espectros. En la Figura 4 se tiene el ejemplo de un espectrofotómetro junto a la computadora donde se encuentra cargado el software para procesar la señal (Figura 5).



Figura 4. Espectrofotómetro Cary 5000 UV-vis-NIR ubicado en el LUCE (Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica) del ICAT.

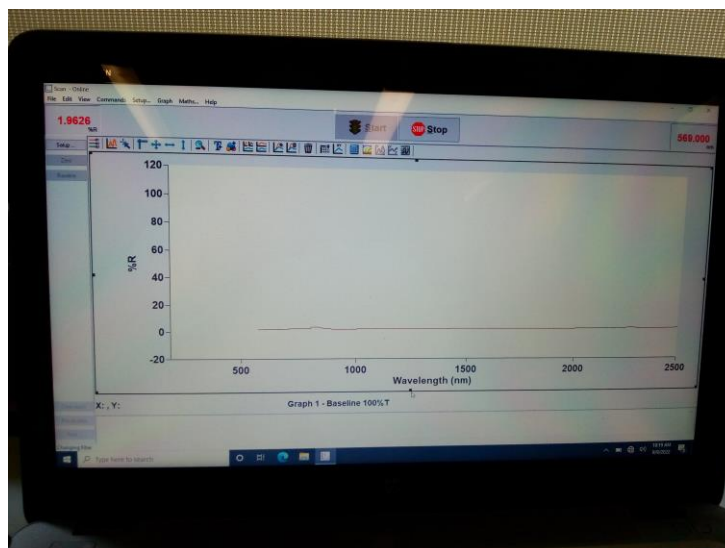


Figura 5. Vista de la pantalla con la apariencia general del software. El eje-x corresponde a los valores de longitud de onda en nanómetros y en el eje-y se puede elegir entre las opciones de absorbancia (A), transmitancia (T) o reflectancia (R).

Al interior del gabinete se encuentran los componentes principales: lámparas de halógeno (región visible y del infrarrojo cercano), lámpara de arco de mercurio (región ultravioleta), compartimento de muestras, monocromador y detectores.

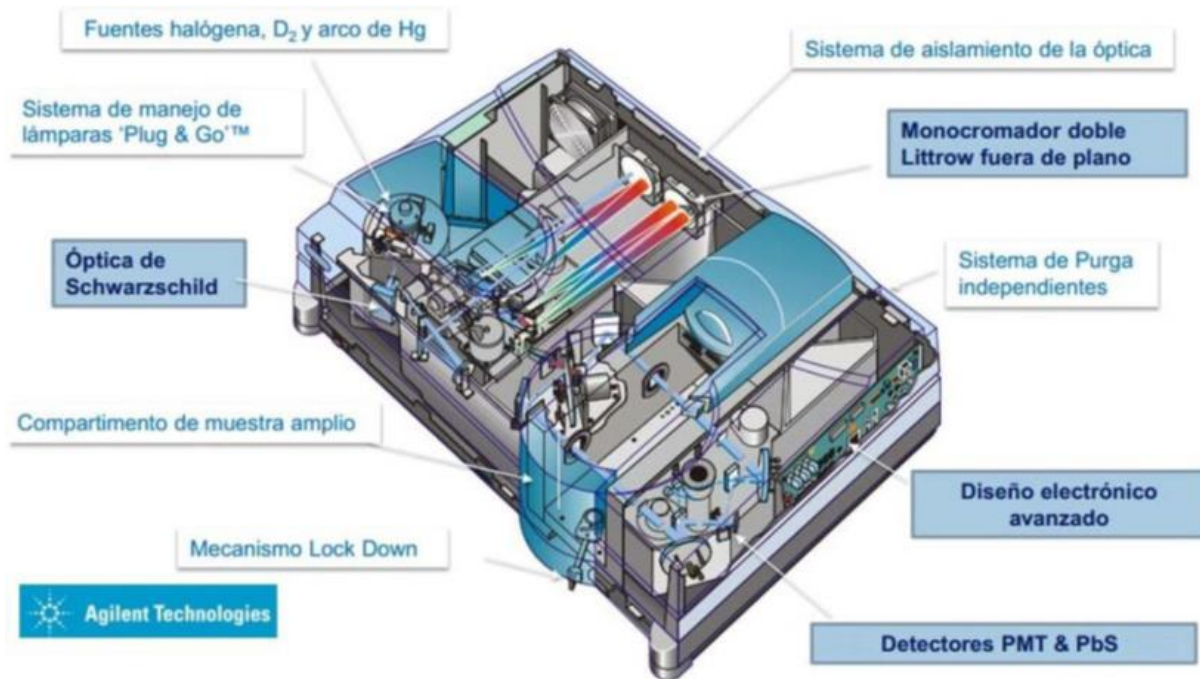


Figura 6. Vista interior del espectrómetro Cary 5000. Se indican algunos de los componentes principales, entre ellos la fuente, el monocromador y detectores (Islas, 2018).

En el siguiente apartado se presenta la propuesta de un dispositivo que intenta representar las funciones de un espectrómetro. Cada uno de los elementos o bloques antes mencionados son remplazados por materiales sencillos y equipo como cámaras digitales.

2. Propuestas para la construcción de un espectrómetro casero

En este apartado se presentan algunas ideas y propuestas para construir primero un espectroscopio (dispositivo para visualizar el espectro de diversas fuentes de luz) y posteriormente un espectrómetro (dispositivo para medir la intensidad de luz a través de un intervalo de longitudes de onda). El elemento principal de ambos dispositivos es una rejilla (o red) de difracción que es un componente óptico con un conjunto repetitivo de elementos difractores igualmente espaciados (aberturas u obstáculos) cuyas dimensiones son del orden de centenas de nanómetros, los cuales producen alteraciones periódicas en la fase, y/o amplitud de la onda electromagnética produciendo dispersión de la luz en sus componentes (Hetch, 2000), ver Figura 7.

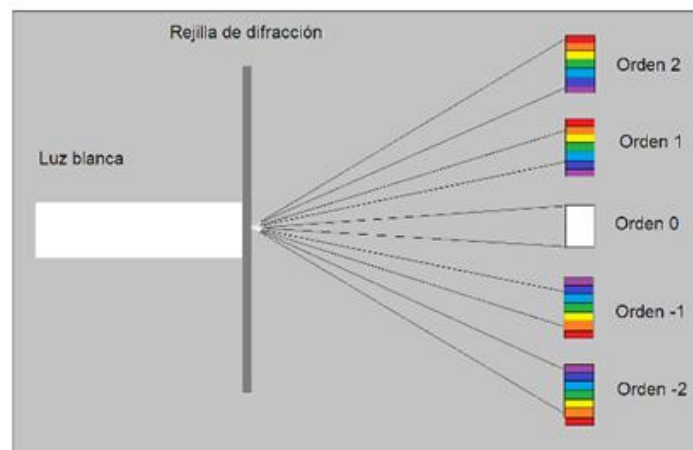


Figura 7. Esquema del efecto producido por una rejilla de difracción por transmisión al hacer pasar un haz de luz blanca (policromática) a través de los elementos difractores.

Los espectroscopios caseros son dispositivos que se pueden construir usando materiales comunes como cartón y discos compactos (CD) o de video digital (DVD), Anexo A. Wakabayashis y colaboradores (2006) proponen el diseño de un espectroscopio en el que se usa un CD o un DVD como rejillas de difracción por reflexión. En la Figura 8 se muestra la plantilla con las dimensiones adecuadas y optimizadas, así como la recomendación de usar una mascarilla que sirve para delimitar la superficie de reflexión que permite reducir la dispersión, los múltiples reflejos lo cual mejora considerablemente los espectros observados. Por otra parte, cuenta con dos ranuras en las que se pueden insertar un CD o un DVD.

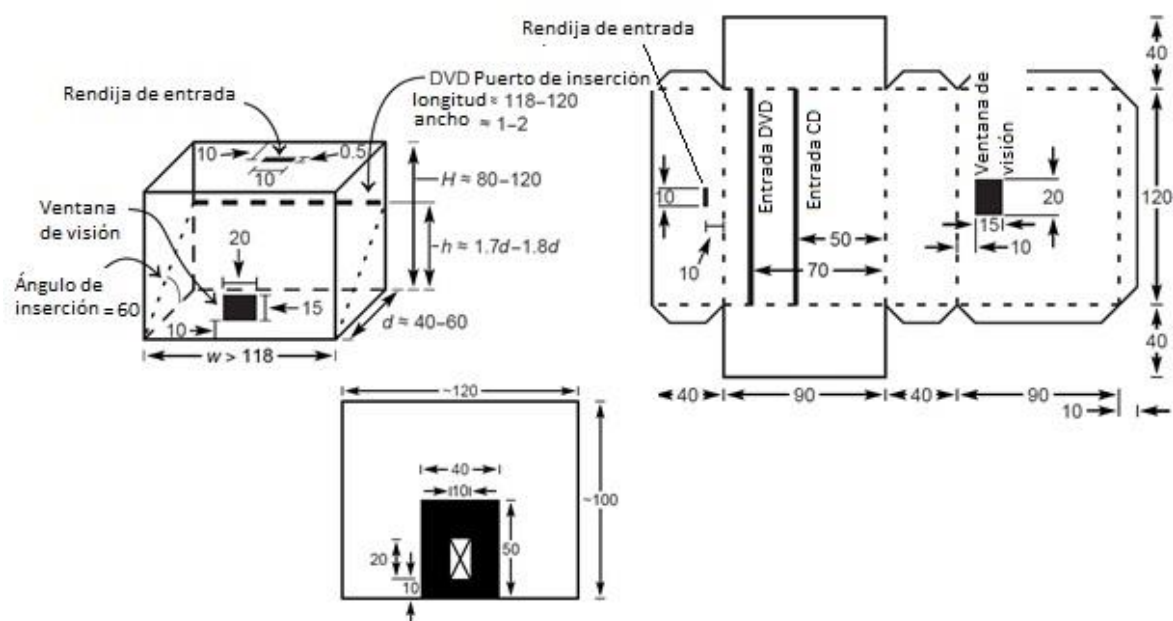


Figura 8. A) Vista de la caja armada con la opción del DVD. B) Plantilla para el armado de la caja con la opción de ranuras para el CD o el DVD. C) Ejemplo de la posición y dimensiones de la mascarilla que se coloca en el CD o DVD. Adaptación de F. Wakabayashi y K. Hamada, J. Chemical Education 83 (1) 2006, 56-58. Todas las dimensiones están en mm.

Una recomendación adicional para evitar los bordes irregulares en la rendija de entrada es usar un par de navajas con sus filos encontrados como se ve en la Figura 9. Esto también permite ajustar con facilidad la anchura de la rendija a 1 mm.



Figura 9. Detalle de la fabricación de la rendija de entrada.

Actividad 1. Coloca el espectroscopio de manera que se pueda observar desde la ventanilla de visualización, has incidir la luz en la rendija de entrada (el ancho debe ser de 1 mm y de bordes bien definidos). Prueba con diferentes fuentes de luz: lámpara fluorescente, lámpara ahorradora de luz blanca o luz de colores, un LED, etc.

Advertencia. No uses un apuntador láser ni veas directamente el reflejo del sol.

Actividad 2. Compara dos espectros de la misma fuente luminosa usando el CD y luego el DVD.

Actividad 3. Coloca plásticos de color entre la fuente luminosa y la rendija de entrada y observa la posición de la banda de color.

La construcción del dispositivo anterior es una primera aproximación al siguiente dispositivo en el que se incluye el monocromador, el sensor y software que permite la captura y análisis de datos. El diseño y construcción de los espectrómetros con estos elementos pueden ser tan complejos como los recursos tecnológicos que se tengan a disposición, algunos ejemplos se pueden consultar en el trabajo de Kovarik *et al.* (2020).

Los elementos básicos en la instrumentación de los proyectos propuestos son:

- Fuente luminosa. Lámpara incandescente, LED, lámpara ahorradora, apuntador láser, etc.
- El portamuestras dependerá del tipo de muestra, si es para líquidos tendrá que ser un recipiente que permita un paso óptico de 1 cm, para muestras sólidas se requerirá un soporte donde se pueda sujetar películas o placas.
- Elemento dispersor de luz, generalmente se usa una rejilla de difracción para descomponer la luz blanca en sus diferentes colores. Un trozo de CD o DVD con película metálica o sin película metálica.
- Elemento detector que podrá ser una cámara web, la cámara de un teléfono inteligente o una cámara digital.

- Un *software* que permita analizar el número o porcentaje de píxeles con un valor determinado por los valores RGB (Red, Green, Blue) en términos de las coordenadas XY del plano de la imagen capturada digitalmente.

El fundamento de operación del espectrómetro casero es el de la captura de los espectrogramas de colores, resultado del espectro formado después de que el haz de luz pasa por la rejilla o red de difracción. El espectrograma obtenido se analiza mediante el software *ImageJ* con el que se puede presentar una gráfica del perfil de intensidad contra la distancia (en píxeles) a partir de un origen sobre el plano de la imagen. Estos dos parámetros se pueden transformar en los parámetros estándar de transmitancia o absorbancia contra longitud de onda, con un procedimiento de calibración.

En la Figura 10 se aprecian las imágenes de algunos de los espectrómetros contruidos con materiales de reciclaje de equipos electrónicos. También se puede emplear cajas de cartón rígido con las caras interiores pintadas en negro mate para evitar reflejos. El diseño y construcción dependerá de los materiales que se tengan a disposición, es por eso por lo que no se da un diagrama detallado de las dimensiones ni lista de materiales. Estas propuestas y otras se pueden consultar en los trabajos de Kovarik *et al.* (2020).



Figura 10. Espectrómetros caseros fabricados con material de reciclaje. Como detector se puede usar la cámara de un celular o una cámara web.

Los aspectos importantes que tendrán que ser considerados en cualquiera de los diseños son:

Los elementos como la rendija de entrada y la rendija de salida hacia la lente de la cámara fotográfica deben estar centrados sobre el eje óptico del arreglo. La rejilla de difracción por transmisión se coloca justo frente a la lente de la cámara. El ángulo formado entre el haz de luz de entrada y la normal del plano de la rejilla de difracción debe ser aproximadamente de 45° , ver Figura 11.

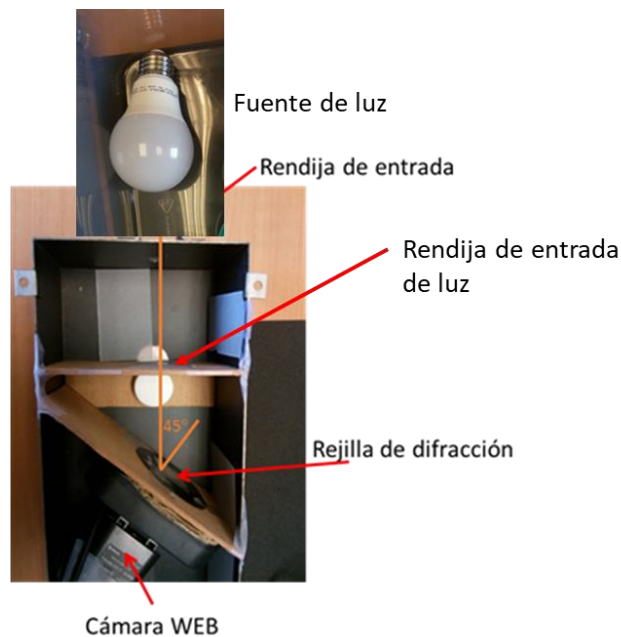


Figura 11. Vista superior con la disposición espacial de los componentes principales del espectrómetro casero.

La luz de entrada debe estar colimada para ello a veces es necesario colocar una lente biconcava (lupa) y si es muy intensa se puede colocar un material translucido (por ejemplo, papel cebolla, vidrio esmerilado, placa de plástico blanco), sobre la rendija de entrada, de otro modo la imagen tiende a salir con reflejos superpuestos al espectro de colores.

La distancia entre la segunda rendija de entrada tiene un ancho de apertura de 2 mm, y se debe situar a una distancia igual a la distancia focal de la cámara. Esto se verifica al observar con nitidez la imagen de la rendija en el monitor de la computadora.

A fin de registrar la misma intensidad para cada espectrograma se deben ajustar algunos parámetros de la cámara digital o cámara web, por ejemplo, el enfoque de la cámara, apertura de diafragma y tiempo de exposición.

2.1 Protocolo para la captura de los espectrogramas

Una vez construido el espectrómetro, la fuente luminosa se coloca frente a la rendija de entrada y se verifica que la imagen del espectro se pueda observar adecuadamente en la pantalla de la computadora. En la Figura 12 se puede apreciar el espectro de una lámpara ahorradora de luz blanca y otro de una lámpara fluorescente.

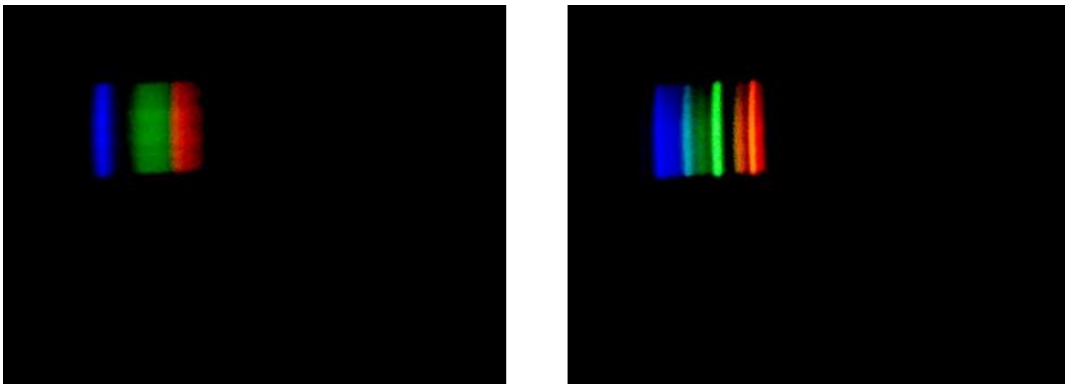


Figura 12. Espectrogramas de una lámpara ahorradora LED (izquierda) y de una lámpara fluorescente (derecha).

Como se verá más adelante en la sección de calibración, la imagen del espectro característico de la lámpara fluorescente (líneas de emisión del compuesto que recubre las paredes interiores de la lámpara) se puede usar como referencia para convertir las unidades del eje-X que se encuentran en unidades de distancia en píxeles a longitudes de onda en nanómetros.

Para obtener el espectro de una muestra, esta se coloca entre la entrada de luz (después de la rendija de entrada) y la rejilla de difracción, tal y como se muestra en la Figura 13.

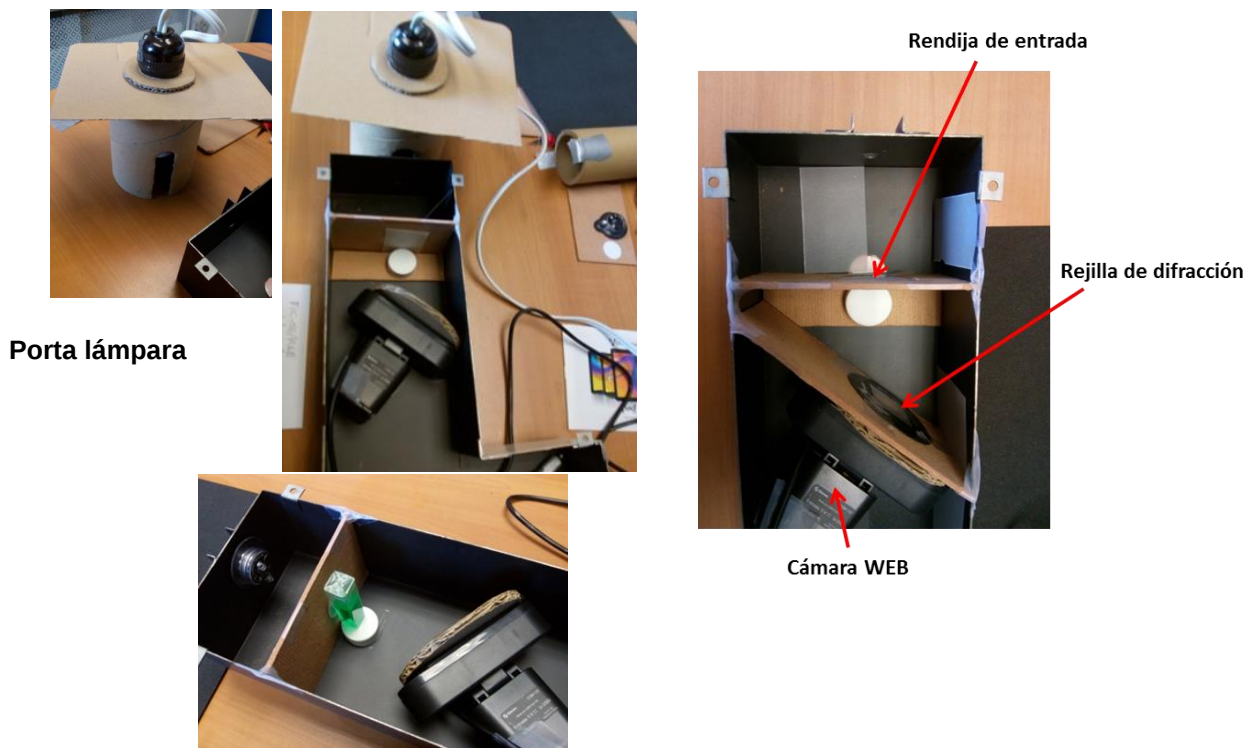


Figura 13. Espectrómetro casero. Se utiliza como fuente luminosa un LED de luz blanca, frente a la rendija de entrada de 2 mm de ancho de apertura se coloca la muestra, en este caso se usa una disolución de colorante vegetal y como detector una cámara web.

Todas las imágenes se deben tomar bajo las mismas condiciones para poder hacer la comparación entre las curvas que se obtienen después del procesamiento de imágenes con el software *ImageJ*. También es importante que la imagen del espectro sea capturada con los colores en el orden de mayor frecuencia (azul) a menor frecuencia (rojo) y que estén en posición horizontal, como se observan en la Figura 12. Si el arreglo experimental del espectrómetro no lo permite, las imágenes se pueden rotar usando el programa de procesamiento de imágenes.

2.2 Tratamiento de las imágenes o espectrogramas

El espectrograma registrado por el espectrómetro casero contiene información de la intensidad luz y su posición en unidades de píxeles, es decir, de la intensidad de luz y la longitud de onda de cada color. Con el fin de analizar los datos cuantitativamente se describe el siguiente protocolo:

La primera actividad es transferir desde el dispositivo en el que se capturan las fotos a una computadora. La segunda actividad es cargar el software *ImageJ*, disponible en <http://imagej.nih.gov/ij/>, el cual es un software libre desarrollado por el National Institutes of Health. Una vez hecho esto la secuencia de pasos es como sigue.

1. Se abre el programa *ImageJ* y se importa la imagen: *File>Open>Find the desired image*.



Figura 14. Ventana principal desde ImageJ.

2. Se selecciona el área que se analizará (Figura 15), presionando el botón izquierdo del *ratón* y dibujando un recuadro desplazando el *ratón* sobre la imagen.

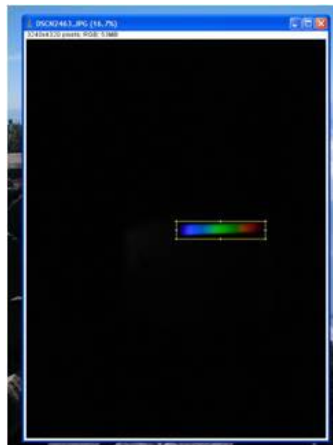


Figura 15. Área seleccionada para el análisis.

Es importante seleccionar un punto de referencia que tendrá que ser el mismo para toda la secuencia de imágenes que se analicen. Este punto de referencia se puede tomar usando las coordenadas que se pueden visualizar en la parte superior en la ventana del menú del programa. También es importante que la altura y el ancho del

recuadro dibujado sea el mismo. El recuadro alrededor del espectro debe abarcar, tanto como sea posible, un espacio oscuro mínimo en los bordes de este.

3. Se analiza el área seleccionada usando el comando *Analyze>Plot profile*. Se despliega una gráfica de escala de grises contra pixeles como se muestra en la Figura 16.

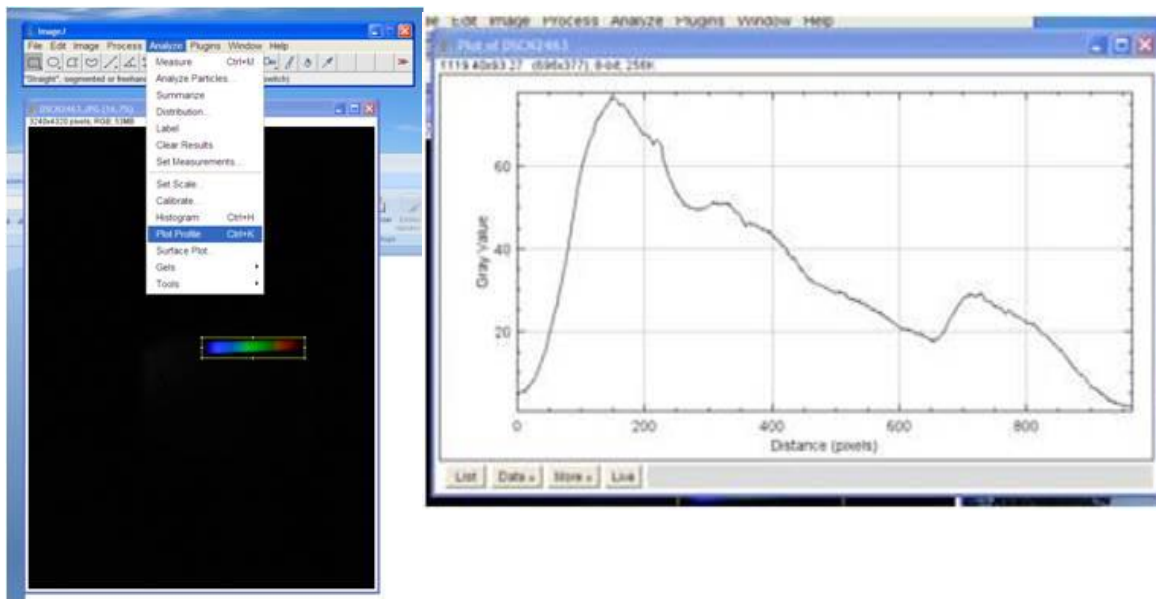


Figura 16. Imagen de la ventana que muestra el espectro (distancia en pixeles contra escala de grises) obtenido después del análisis del espectrograma.

4. Al dar un *click* en *List box* se obtiene la tabla de datos (pixel, escala de grises).

Distance (pixels)	Gray Value
0	5.0503
1	4.9670
2	4.9184
3	5.0382
4	5.1684
5	5.0694
6	5.3542
7	5.4219
8	5.5536
9	5.4965
10	5.5573
11	5.5156
12	5.4010
13	5.4201

Figura 17. Tabla de valores XY (píxel, escala de grises) del área seleccionada.

5. Se salva el archivo usando el comando *File>Save as*, el archivo se puede abrir en algún software como Excel, Origin o SigmaPlot para su análisis y presentación.
6. Los valores en la *escala de grises* para cada posición de píxeles representan la luz transmitida.
7. Si se requiere presentar los datos en absorbancia ($A = -\log(I_s/I_0)$) o transmitancia ($T = I_s/I_0$). Se puede elegir la función RGB y se usan los valores entre 0 y 255 como el valor de las intensidades medidas sin la muestra (I_0) y con la muestra (I_s) a una longitud de onda determinada.

2.3 Calibración del eje-X

Esta actividad consiste en convertir los espectrogramas de colores y mostrarlos como graficas de intensidad contra longitud de onda. Con esto se tiene la oportunidad de hacer el análisis de los datos de manera cualitativa.

Para convertir la posición de los píxeles a longitudes de onda se tienen que capturar los espectrogramas de una fuente de luz de referencia como pueden ser una lámpara fluorescente (espectro medido en un equipo comercial, ver Anexo B) o la luz de apuntadores laser (azul, verde, rojo). Con los datos de la posición de los máximos en el eje de las distancias en píxeles se hace una gráfica de longitudes de onda contra la posición de los máximos correspondientes en píxeles. Posteriormente, los datos se ajustan por mínimos cuadrados a una función lineal. Esta función lineal es usada para convertir cada posición de píxel a un valor de longitud de onda.

Opción 1. Lámpara fluorescente

Se obtiene el espectrograma de una lámpara fluorescente y se lleva a cabo el protocolo anteriormente descrito, la calibración se realiza con los valores que se reportan para las líneas espectrales: azul= 436 nm, verde=546 nm y rojo=611nm. En la Figura 16a se muestra la imagen que se observa a través de la cámara web, en la Figura 16b se muestra la gráfica de escala de grises contra distancia en píxeles. Los máximos de intensidad ubicados a distancias de 2, 72 y 116 píxeles corresponden a las líneas

espectrales intensas del azul, verde y rojo en la imagen de la izquierda. En la Figura 18a se observa el ajuste de la recta formada por los tres puntos experimentales para obtener la curva de calibración. Finalmente, en la Figura 18b se presenta el espectro de intensidad (escala de grises) contra longitudes de onda.

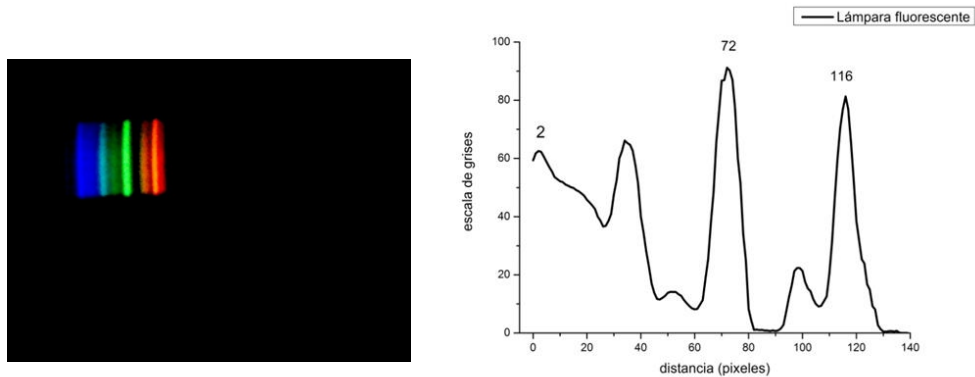


Figura 18. a) Espectrograma de una lámpara fluorescente b) Grafica del Perfil correspondiente a la intensidad versus la posición de los pixeles.

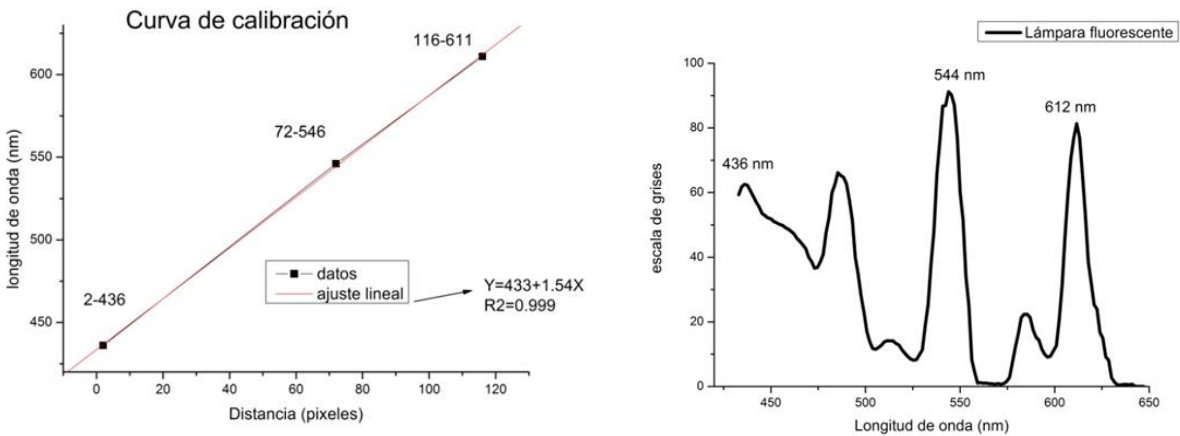


Figura 19. Curva de calibración (izquierda) y Grafica del perfil contra longitudes de onda (derecha).

Opción 2. Lámparas LED de longitud de onda conocida.

Se obtiene el espectrograma de cuatro lámparas LED y se lleva a cabo el protocolo anteriormente descrito, la calibración se realiza con los valores que reporta el fabricante (Anexo B): azul= 470 nm, verde=525 nm, naranja=590 nm y rojo=630nm. En la Figura 20a se muestran las imágenes que se observan a través de la cámara web, en la parte superior se muestra el espectrograma del LED de luz blanca, en forma descendente el que corresponde al LED de color azul, verde, naranja y rojo. En la Figura 20b se muestra la gráfica de escala de grises contra distancia en pixeles. Los máximos de intensidad ubicados a distancias de 26, 63, 112 y 138 pixeles corresponden a los valores 470 nm, 525 nm, 590 nm y 630 nm; y la línea en negro corresponde a la gráfica de luz blanca.

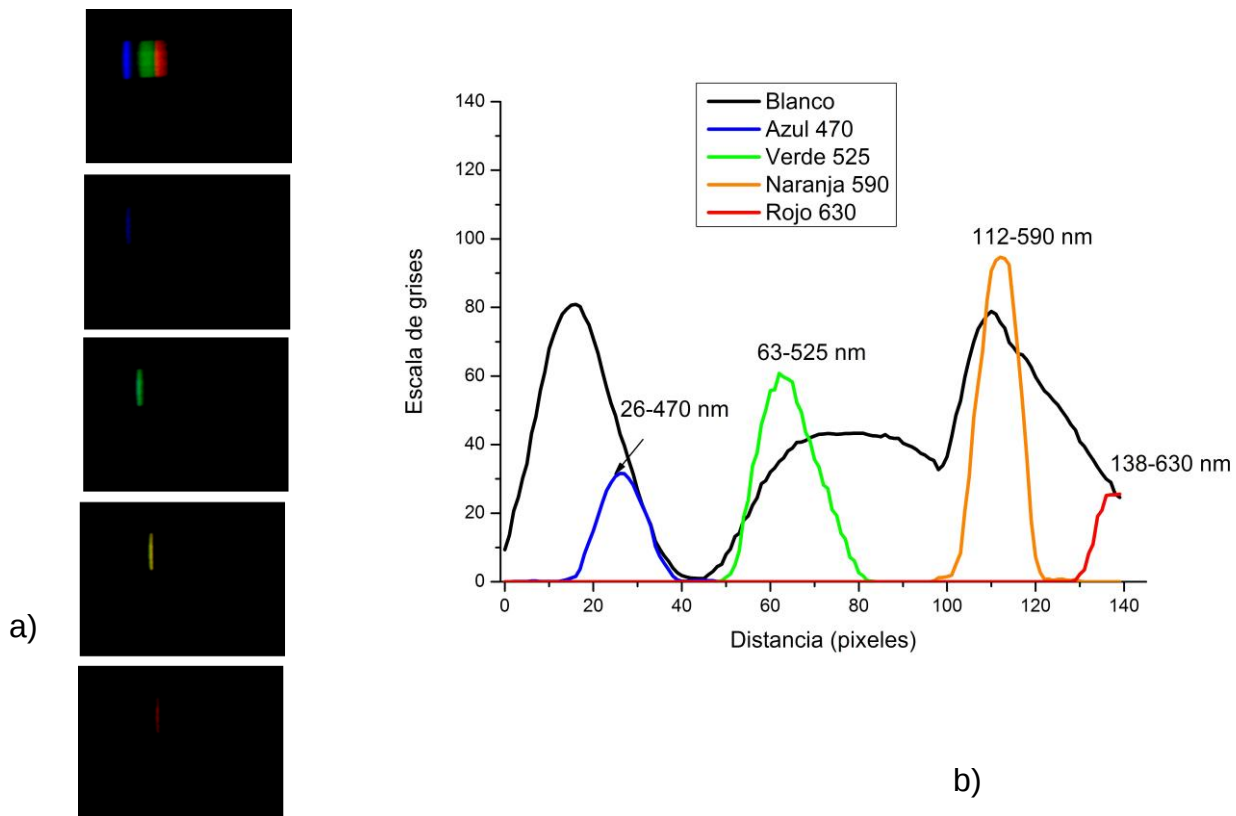


Figura 20. a) Espectrogramas de 4 lámparas LED de color (azul, verde, naranja y rojo) y un LED de luz blanca. b) Grafica del perfil correspondiente a la intensidad contra la posición de los pixeles y su correspondiente valor en longitud de onda.

En la Figura 21a se observa el ajuste de la recta formada por los cuatro puntos experimentales y el ajuste lineal para obtener la curva de calibración. Finalmente, en la Figura 21b se presenta el espectro de intensidad (escala de grises) contra longitudes de onda de las cuatro lámparas LED de color y el LED de luz blanca (Figura 21c).

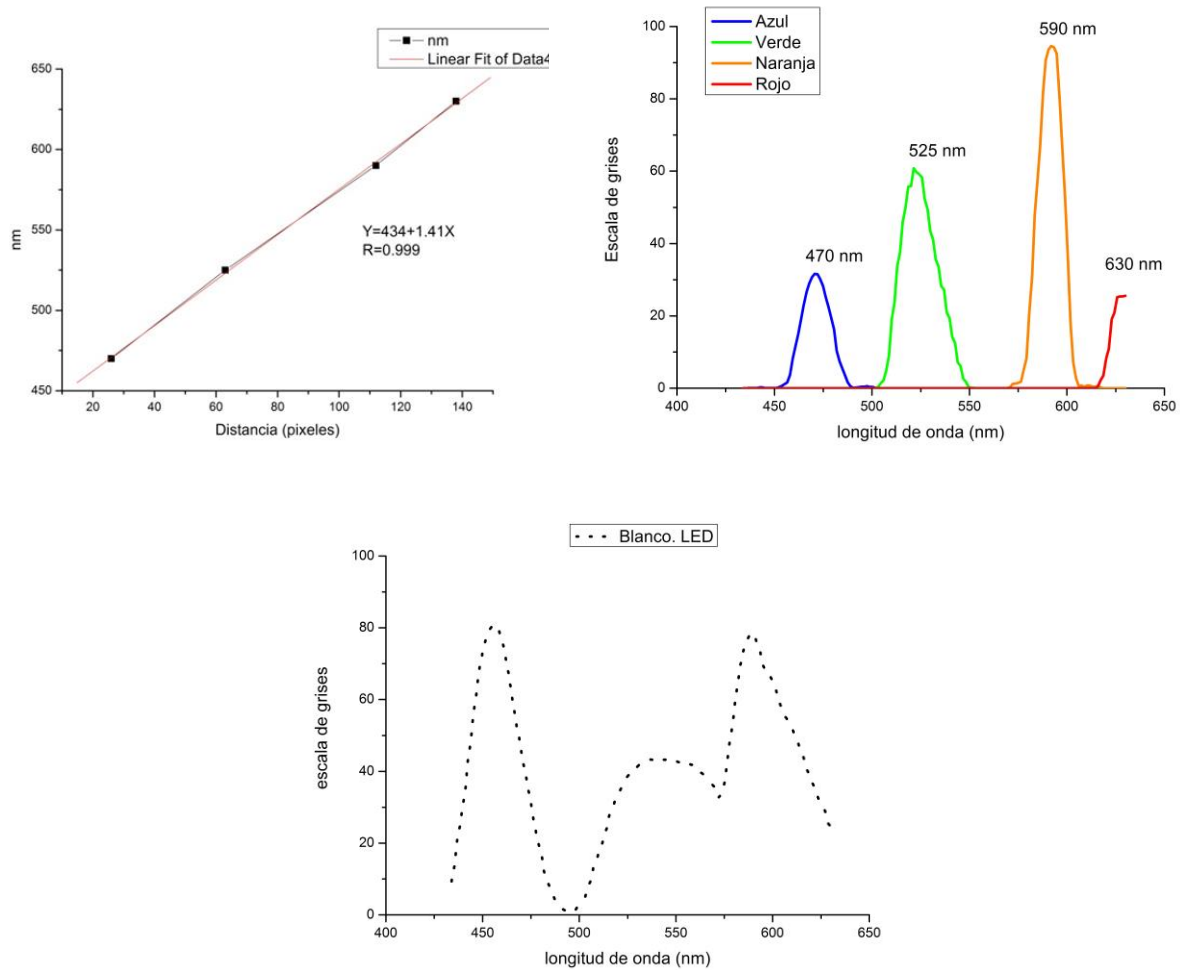


Figura 21. a) Curva de calibración. b) Grafica del perfil o escala de grises contra longitudes de onda de cada LED y su respectivo máximo de intensidad. c) Grafica del perfil o escala de grises contra longitudes de onda del LED de luz blanca.

3. Aplicaciones del espectrómetro casero

3.1 Foco LED RGB

Se obtiene el espectrograma de los tres colores primarios que emite un foco RGB (Anexo B) y se lleva a cabo el protocolo de calibración anteriormente descrito. En la Figura 22 se observa los espectrogramas de luz blanca, azul, verde y roja con sus respectivos perfiles en escala de grises. El eje vertical está calibrado en longitudes de onda.

Foco RGB y su control a distancia para la elección de colores.

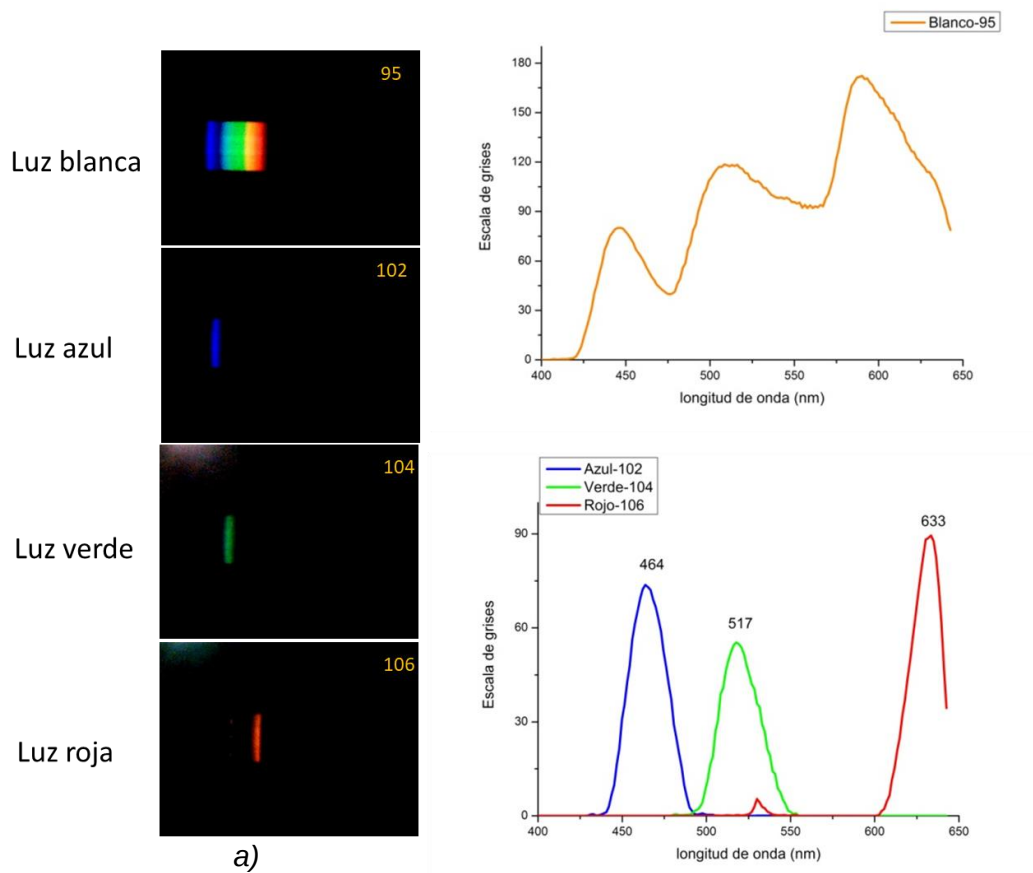


Figura 22. a) Espectrogramas de las opciones de color del foco RGB marca OSRAM. b) Gráfica del perfil o escala de grises contra longitudes de onda de la opción luz blanca, c) Gráfica del perfil o escala de grises contra longitudes de onda de cada color y su respectivo máximo de intensidad.

Actividad 1. Probar que el color amarillo se forma por la superposición de los colores verde y rojo.

3.2 Lámparas de varios colores

Se obtiene el espectrograma de seis lámparas de diferentes colores y se lleva a cabo el protocolo de calibración usando una lámpara fluorescente. En la Figura 23 se muestran las imágenes de los espectrogramas de cada lámpara observados a través de la cámara web. En la Figura 24 se muestra las gráficas, una antes y la otra después de hacer la calibración del eje-X.

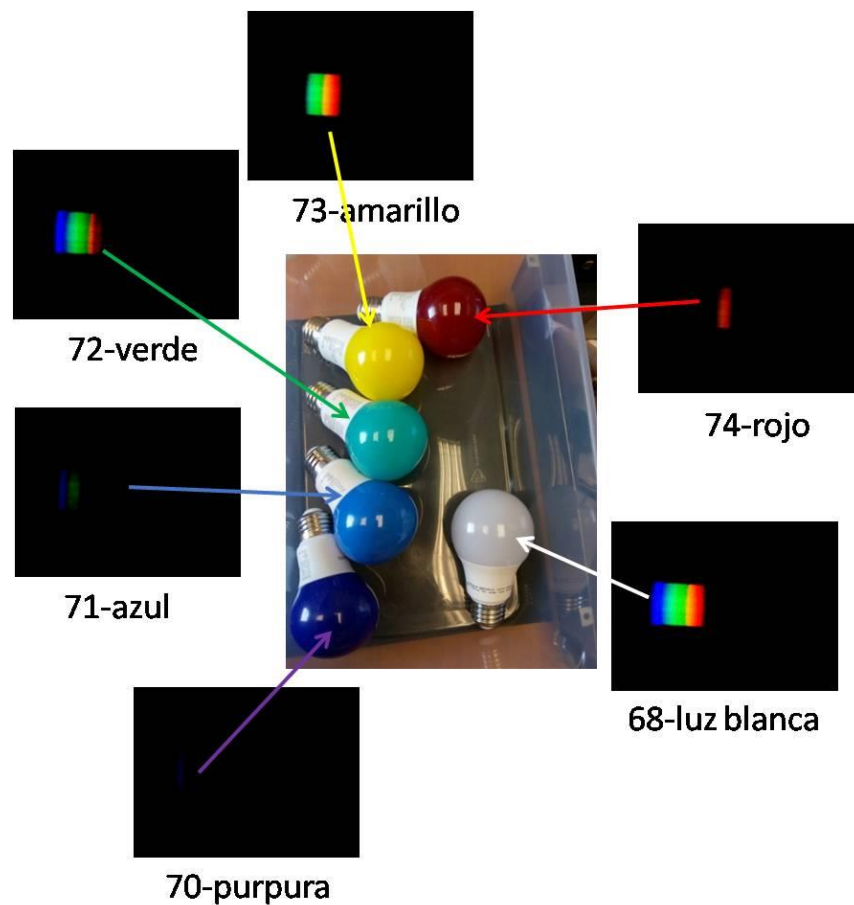


Figura 23. Lámparas de colores SLP, Modelo LEDBULB-9W E26LD. Espectrograma capturado con cámara Web.

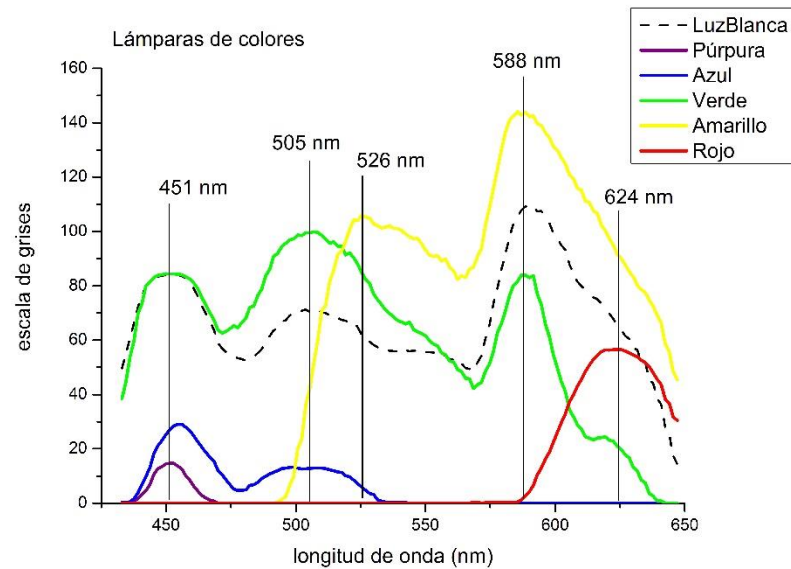
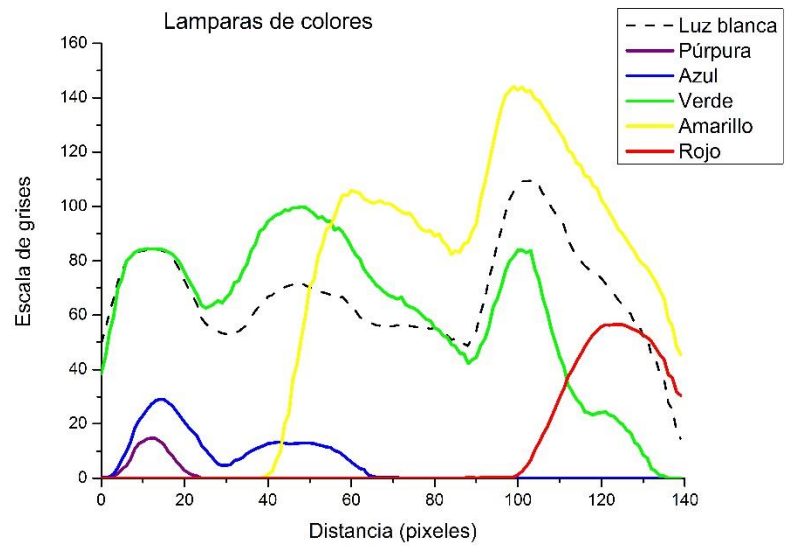


Figura 24. Se presentan las dos graficas del espectro de intensidad (escala de grises) de las cuatro lámparas LED de color y el LED de luz blanca (línea punteada). En a) distancia en píxeles y en b) en longitudes de onda.

3.3 Colorantes en gel

Uno de los usos analíticos de la espectroscopía en la región visible es determinar la concentración de un compuesto (o analito) particular. Con la espectroscopía ultravioleta visible se pueden medir tres propiedades que derivan de la interacción de la materia con esta región del espectro electromagnético (190-800 nm). Estas propiedades son la absorbancia, la emisión de luz y la fluorescencia, las cuales presentan una relación lineal con la variación de la concentración, bajo condiciones experimentales adecuadas (Millán, 2016).

La ley que rige los aspectos cuantitativos de la absorción de luz es la ley de Lambert y Beer, la cual establece que, bajo ciertas condiciones experimentales fijas como la longitud de onda de la radiación, camino óptico, temperatura, pH entre otras, la absorbancia del analito varía directamente con la concentración. Esto es (Skoog y West, 2001):

$$A=\epsilon bC \quad (\text{Ec.1})$$

donde ϵ es la absortividad molar, b es el camino óptico y C la concentración.

En el arreglo experimental del espectrómetro utilizado (Figura 13, sección 2.1) los valores de absorbancia se obtienen a partir de las imágenes digitales al medir los valores RGB (Red, Green, Blue) sobre una escala de intensidades entre 0 y 255. Con el software *ImageJ* se delimita una región en la imagen y con la opción *RGB Measure* se determina los valores promedio R, G o B de los múltiples píxeles contenidos dentro del área seleccionada.

La absorbancia se calcula usando la siguiente ecuación:

$$A=-\log(I_n/I_0) \quad (\text{Ec.2})$$

donde I_n denota el valor R, G o B para la imagen tomada con la muestra y el valor I_0 al valor R, G o B de la imagen tomada sin la muestra.

Preparación de los colorantes en gel.

Se prepara diferentes disoluciones del colorante vegetal disolviendo una pequeña cantidad en 2 ml de agua, se toma una gota de esta disolución y se añade a 2 ml de agua, así sucesivamente para obtener de cuatro a cinco disoluciones, las que se etiquetan como C1, C2, C3, etc.

Se prepara la grenetina siguiendo las instrucciones del empaque. Cuando aún se encuentra líquida la grenetina se vierte en recipientes separados en los que se coloca en cada uno de ellos una gota de las disoluciones C1, C2, C3 etc. El recipiente debe ser de un material transparente y de preferencia de un espesor de 1 cm. Se agita la mezcla hasta obtener una coloración uniforme y se deja gelificar.

En la Figura 25 se muestra la imagen del colorante verde en gel a diferentes concentraciones y en la Figura 26 se muestran los espectrogramas correspondientes, incluyendo el de un recipiente solo con agua.

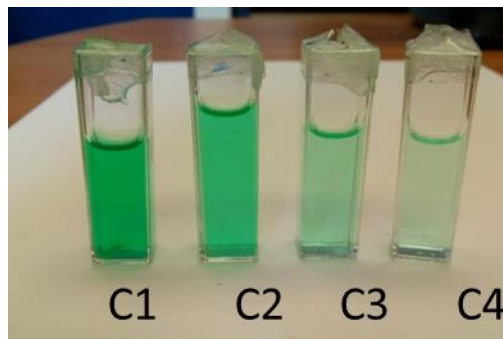


Figura 25. Colorante verde en gel a cuatro diferentes concentraciones

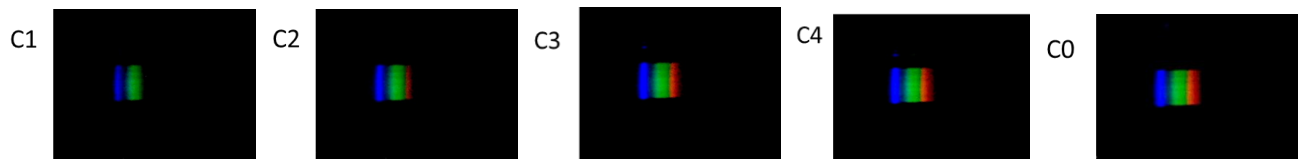


Figura 26. Espectrogramas de cada uno de los recipientes con el colorante en gel incluyendo el de concentración cero.

Puesto que el colorante es verde la región a ser evaluada con la opción *RGB Measure* es la que corresponde al color complementario, es decir al rojo. En la Tabla 1 se muestran los valores de absorbancia para cada concentración. En la Figura 27 se muestra los datos de concentración contra absorbancia y el ajuste de la curva de calibración.

Colorante verde en gel		
Celada	Valor promedio RED (I_n)	$A = -\log(I_n/I_0)$
C0	227	0.0505
C4	186	0.1370
C3	145	0.2452
C2	109	0.3692
C1	43	0.4773

Tabla 1. Datos del valor promedio Green en la escala de intensidades de 0 a 255 y el valor de la absorbancia $A = -\log(I_n/I_0)$.

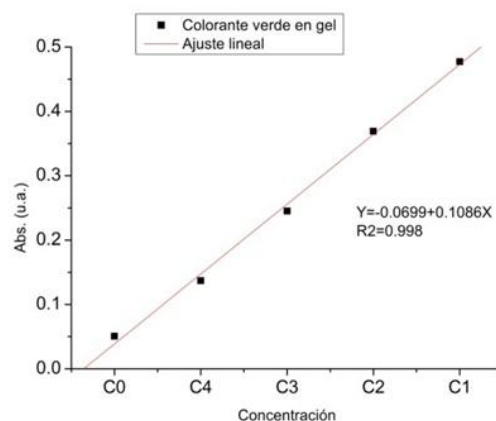


Figura 27. Curva de Concentración contra Absorbancia del colorante verde en gel.

3.4 Extractos de compuestos luminiscentes

Uno de los fenómenos que son muy vistosos es la luminiscencia. La luminiscencia tiene lugar cuando una sustancia emite luz al absorber radiación de una longitud de onda menor, como por ejemplo luz ultravioleta. Se puede dividir en dos fenómenos: se dice que la sustancia posee *fluorescencia* cuando para visualizar el fenómeno se requiere de luz externa para ser observado; mientras que para la *fosforescencia* una vez se deja de irradiar la muestra esta sigue emitiendo luz unos segundos (o minutos) después.

Desde el enfoque atómico o molecular, la luminiscencia es un proceso de emisión en el cual un electrón desciende de un estado excitado a un estado basal mediante la emisión de un fotón. El fotón emitido en forma de radiación es diferente al inicialmente absorbido por el electrón ya que una parte de la energía se pierde en el proceso. Al restarse esta pérdida de energía, el fotón emitido presenta una longitud de onda mayor al fotón absorbido. Normalmente, el tiempo de vida media de una especie excitada depende de la forma en el átomo o molécula excitada libera su exceso de energía y se relajan a su estado fundamental (Hamer et al., 2021).

El arreglo experimental para obtener espectros de fluorescencia cambia ligeramente, típicamente se coloca el detector (cámara digital) a un ángulo de 90° con respecto a la fuente de luz con el fin de eliminar señales parasitas desde la señal dispersada y transmitida (Figura 28). Las distancias entre la fuente de excitación, la muestra y el detector se deben optimizar para obtener las mediciones reproducibles. La cámara debe estar enfocada en el centro del portamuestra.

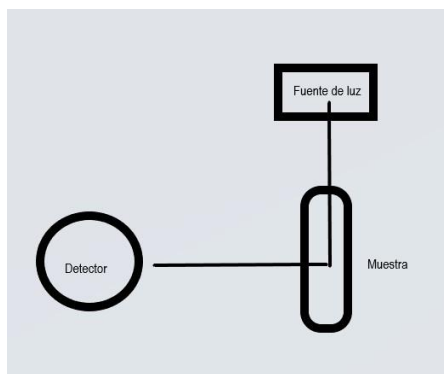


Figura 28. Diagrama del dispositivo en la configuración para obtener espectros de fluorescencia.

Extracción de compuestos fluorescentes a partir de materiales orgánicos.

En la extracción del componente fluorescente a partir de la raíz cúrcuma, hojas de espinacas y cáscara de huevo rojo se siguió el procedimiento de Petillo y Fernández (2004). Adicionalmente se usó agua tónica para los espectros de la quinina, su principal componente. La fuente utilizada para irradiar las muestras fue una lámpara de luz negra (400 nm), Anexo B.

Proceso de extracción.

1. Se lavan los materiales orgánicos, para evitar la contaminación por impurezas en la extracción de los compuestos fluorescentes.
2. Se cortan en trozos pequeños para tener mayor contacto con el disolvente (alcohol etílico).
3. Posteriormente se vierte poco a poco el disolvente, mientras se tritura el material con la ayuda de un mortero. Este proceso se continúa hasta tener una masa suave y bien integrada con el disolvente.
4. Se deja reposar la mezcla en el disolvente alrededor de 30 minutos, para una extracción más concentrada de los compuestos se requiere de 24 horas.
5. Se filtra la mezcla usando un embudo y papel filtro (los filtros para café pueden funcionar) para retirar los sólidos grandes se deja reposar para después decantar los sólidos restantes y así obtener sólo la parte líquida y clara del componente deseado.

Los componentes orgánicos fluorescentes correspondientes son la curcumina, la clorofila y la protoporfirina. En la figura 29 se muestran el agua tónica y los tres extractos iluminados con luz blanca.



Quinina



Curcumina



Clorofila



Protoporfirina

Figura 29. Imágenes de los tres extractos y el agua tónica iluminados con una lámpara de luz blanca.

El color que se observa en cada uno de los extractos corresponde al color complementario de las longitudes de onda que son absorbidas. En la Figura 30 se muestran los espectros de absorción UV-visible de los extractos y del agua tónica obtenidos con el espectrómetro Cary 5000 (Figura 30). Los cuatro compuestos absorben fuertemente en la región del ultravioleta (200 nm–380 nm). Como se puede observar la curcumina tiene una banda intensa adicional alrededor 427 nm correspondiente al color azul (420 nm-490 nm) y los demás compuestos presentan bandas de absorción de poca intensidad entre los 300 nm y 500 nm.

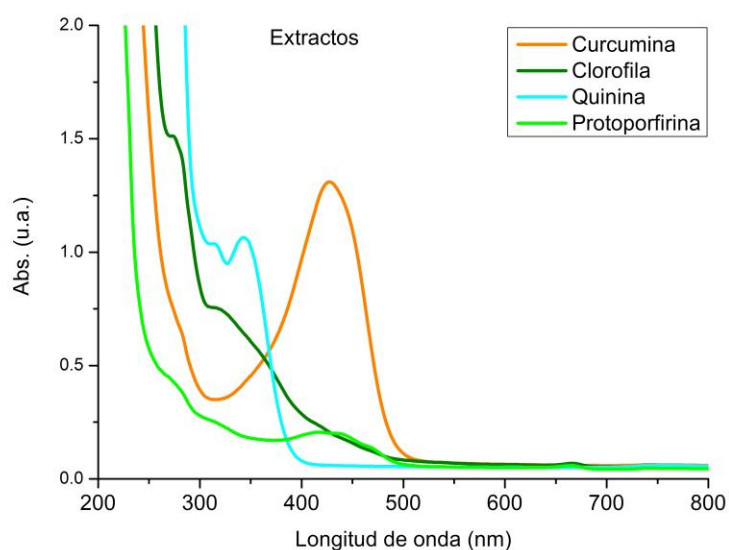
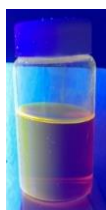


Figura 30. Espectros de absorción de los extractos de materiales orgánicos.

En la Figura 31 se muestran el agua tónica y los tres extractos iluminados con una lámpara de luz negra (~400 nm) en la que se observar el cambio de color.



Quinina



Curcumina



Clorofila



Protoporfirina

Figura 31. Imágenes de los extractos bajo la luz de una lámpara de luz negra (400 nm) usada en la identificación de billetes falsos.

Actividad 1. Se hacen dos diluciones del agua tónica y se obtienen los espectrogramas de fluorescencia. En la Figura 32 las muestras son iluminadas desde la parte superior y la imagen se captura de manera frontal, de tal modo que se mantiene una configuración de 90° entre la dirección del haz de luz y el detector.

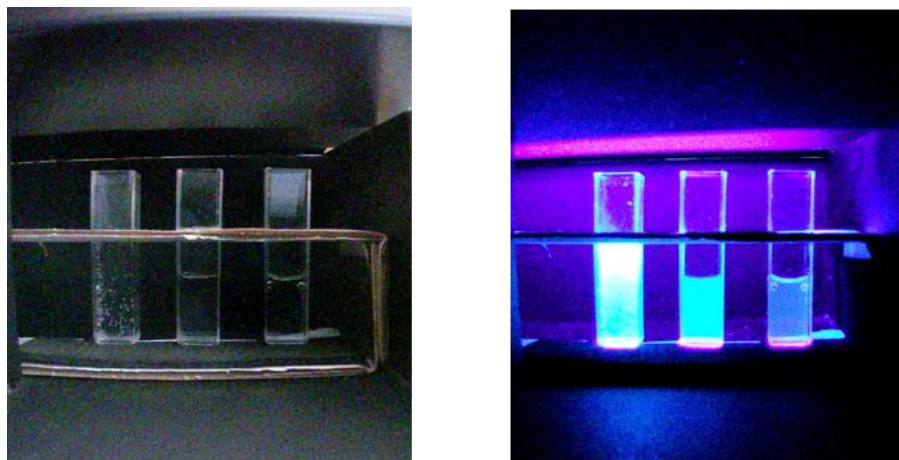


Figura 32. Imágenes de tres recipientes que contienen agua tónica a tres diferentes concentraciones. A la izquierda iluminados con luz natural y a la derecha con luz negra.

Al usar el software en la opción *Plugins>Analyze>RGB Measure*, se puede hacer un análisis cuantitativo de la intensidad de luz emitida por la fluorescencia a diferentes concentraciones del analito. En la Tabla 2 se muestra un ejemplo de los valores RGB de la concentración intermedia del agua tónica de la Figura 32.

Etiqueta	Área	Promedio	Mínimo	Máximo
RED	4042	12.140	0	209
GREEN	4042	252.537	26	255
BLUE	4042	553.765	136	255

Tabla 2. Resultado del valor RGB Measure del área seleccionada en la imagen 2 de la Figura 32.

En la Figura 33 se muestran alguna de las ventanas que se despliegan en la opción “Plugins” del programa *ImageJ*.

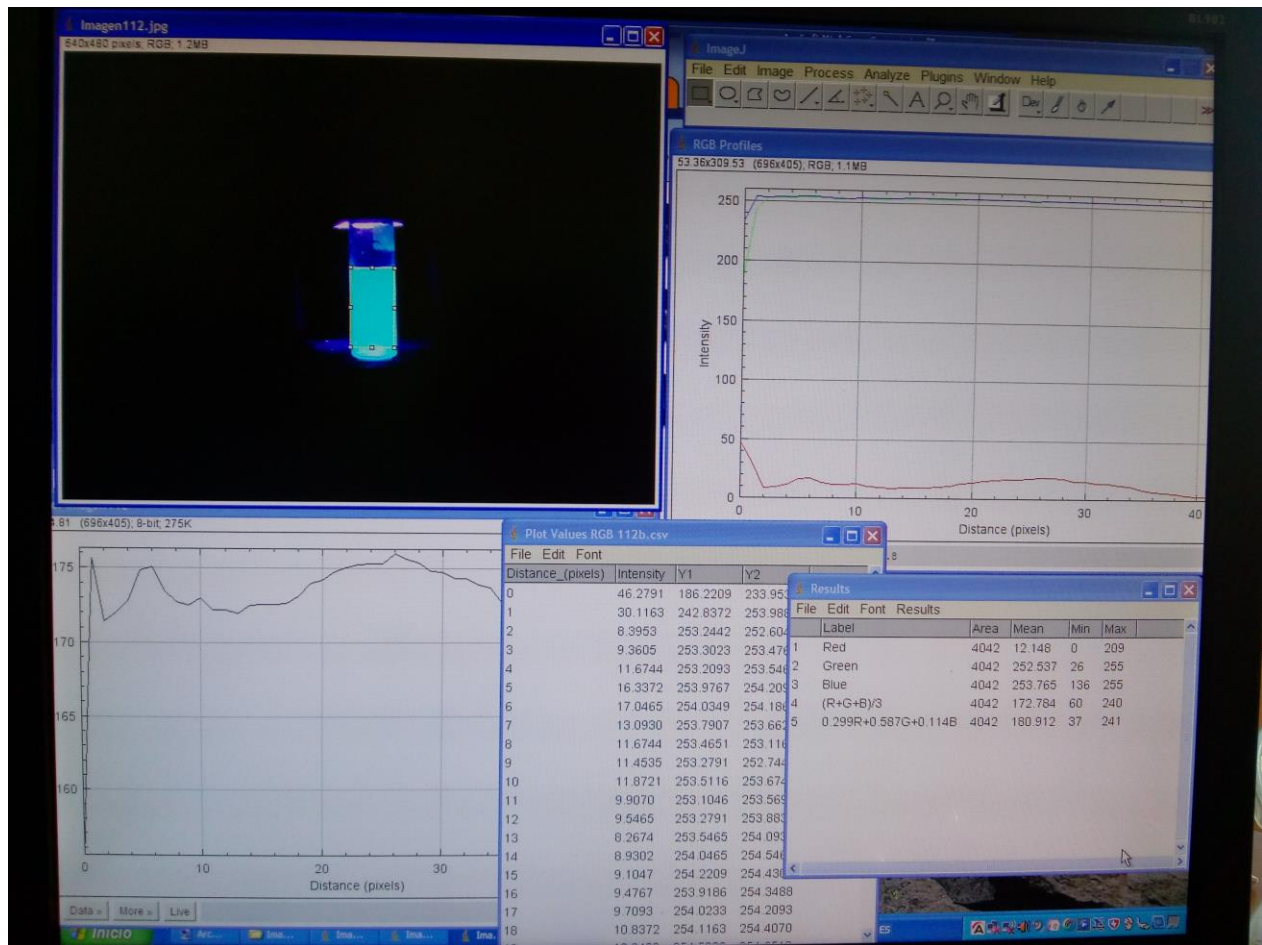


Figura 33. Imagen de las ventanas disponibles del software ImageJ. Área seleccionada, perfil de escala de grises, perfil RGB, tabla de valores del espectrograma, tabla de resultados de los parámetros RGB.

Anexo A. Rejillas de difracción caseras

Un CD (del inglés, *Compact Disk*) o DVD (del inglés, *Digital Versatil Disc*) es una superficie reflectante que posee una serie de huecos y salientes mediante los cuales se codifica la información. Los huecos y salientes están distribuidos a lo largo de un surco que describe una espiral desde el radio exterior hacia el radio interior del disco. La separación entre dos surcos consecutivos es una cantidad fija, del orden de la longitud de onda de la luz visible ($1.6\text{ }\mu\text{m}$ para los CD y $0.74\text{ }\mu\text{m}$ para los DVD). Usualmente se reporta el número de líneas por milímetro, es decir un CD tiene aproximadamente 650 líneas/mm y el DVD 1200 líneas/mm. La densidad de líneas de este último permite la obtención de espectros mejor definidos. Aunque frecuentemente el CD o DVD se usan como redes de difracción por reflexión, también se puede usar como redes de difracción por transmisión al retirar la película reflectante (cubierta metálica), ver Figura 1A.

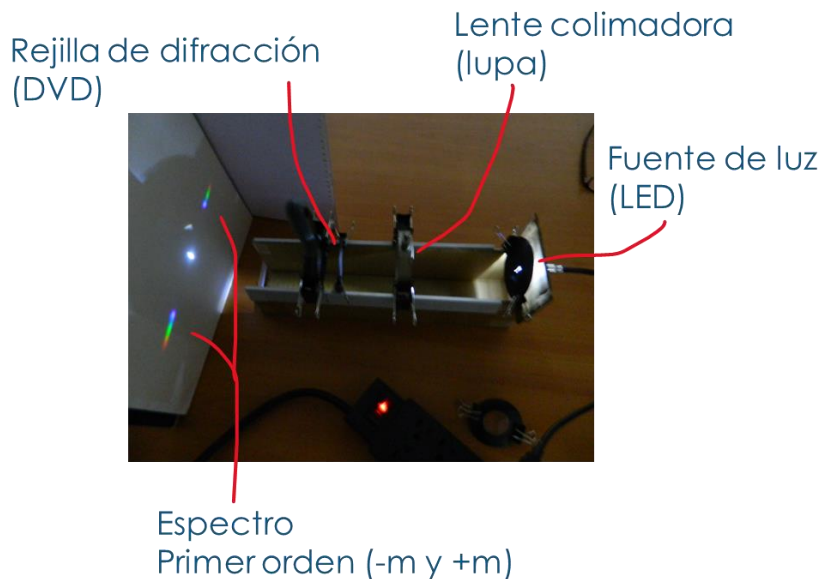
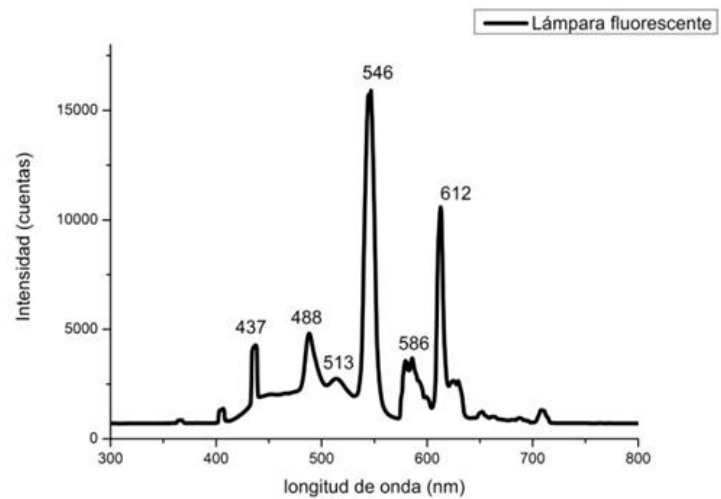


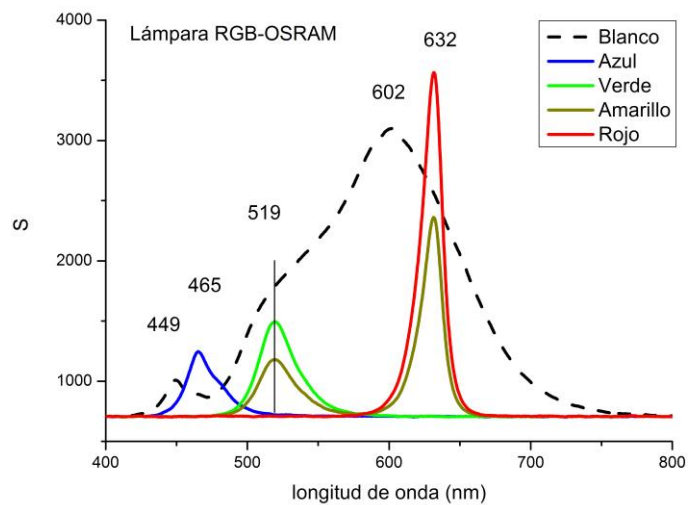
Figura 1A. Arreglo experimental en el que se observa el espectro de luz de un LED de luz blanca al pasar a través de un trozo de DVD al que se le ha retirado la cubierta metálica (rejilla o red de difracción por trasmisión).

Anexo B. Ejemplos de lámparas comerciales usadas en este reporte con sus espectros de emisión. Espectrómetro utilizado Ocean Optics HR 4000CG-UV-NIR.

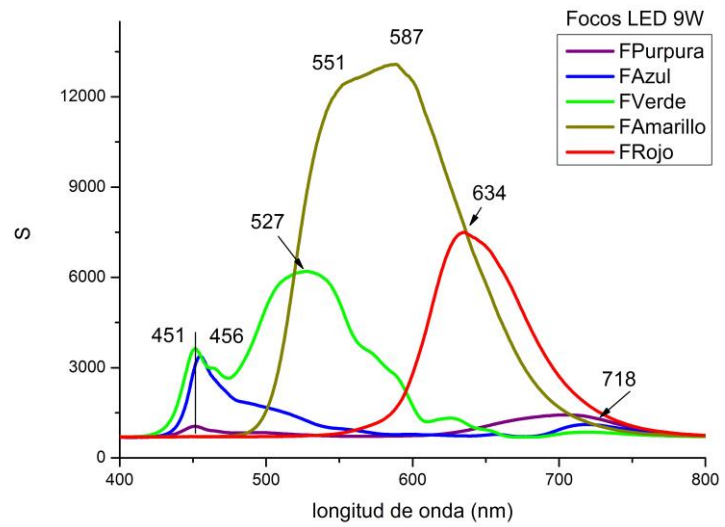
Lámpara fluorescente. 127 V, 60 Hz, 10 W, 600 lm (6500K)



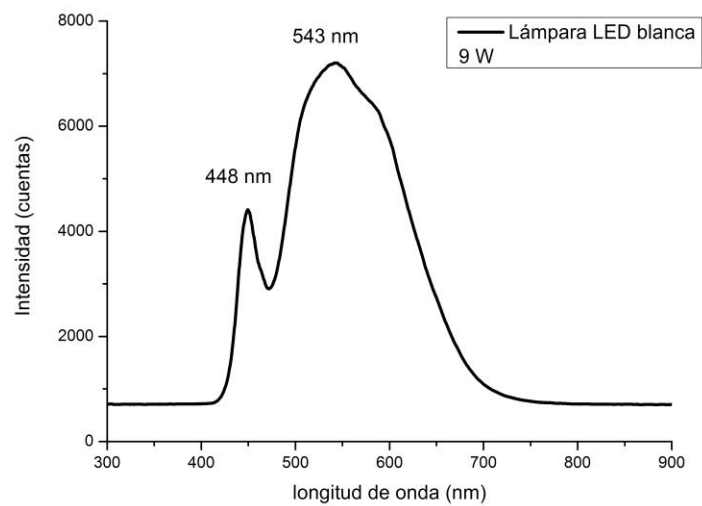
Lámpara LED RGB



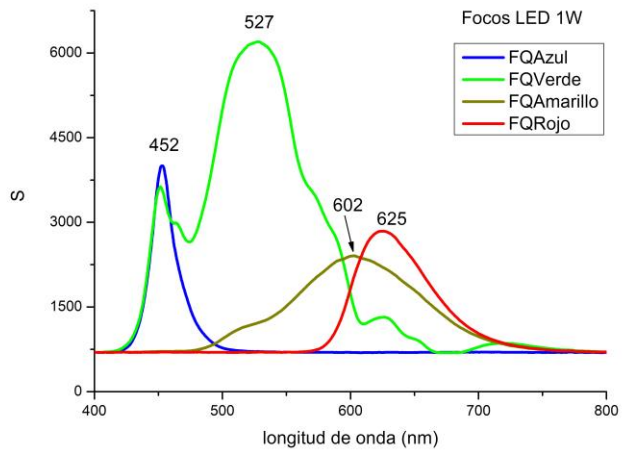
Lámpara LED PHILIPS 9W, 125 mA, 120 V 60 Hz



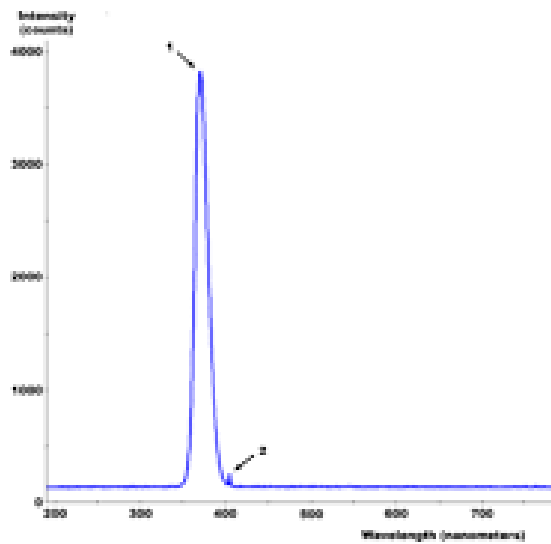
Luz Blanca BrillaMax, 9WE26LD, 127 V, 60 Hz



Lámpara LED Mini globo Tipo G45, 127 V, 60 Hz, 1 W. Volteck (Truper).

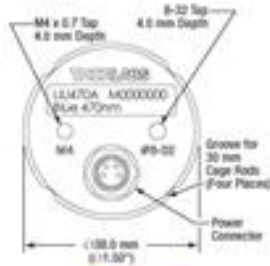


Lámpara de luz negra.

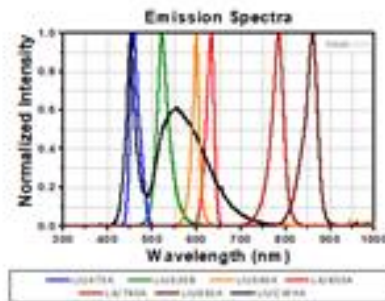


https://es.wikipedia.org/wiki/Luz_negra

Lámparas LED de colores marca THORLABS



The drawing above shows a back view of the L470A LED array.



The plot above shows the spectra for all of the LEDs on this page, measured using our [CC3200](#) compact spectrometer.



The photo above shows an LED array in a 30 mm cage system. When pushed together, the two cage plates clamp the LED array in place.

LED Array Light Sources (Power Supply Not Included)

Item #	L470A	L525B	L590A	L630A	L730A	L850A	L9000A
Image (Click to Enlarge)							
Color	Blue	Green	Orange	Red	Infrared (IR)	Infrared (IR)	Cold White
Central Wavelength	470 nm	525 nm	590 nm	630 nm	730 nm	850 nm	Color Temperature: 4000 K - 9000 K
Intensity ^a	4.0 mW/cm ²	1.9 mW/cm ²	1.4 mW/cm ²	2.4 mW/cm ²	3.7 mW/cm ²	3.5 mW/cm ²	3.0 mW/cm ²
Total Output Power	253 mW	111 mW	105 mW	208 mW	315 mW	322 mW	250 mW
Typical Max Current	30 mA						
Supply Voltage	24 V						
Operating (Ambient) Temperature	0 to 40 °C (Non-Condensing)						
Storage Temperature	-40 to 70 °C						
Emission Spectrum ^b							
Intensity Distribution ^{a,b}							

a. When measured at a distance of 100 mm from the LED along the emission axis.
b. Click the graph icon to view the emission spectrum of each LED unit. Click [here](#) to download raw data.

Bibliografía

Garrido-Gonzales J. J., Trillo-Alcalá M., Sánchez-Arroyo A. J., J. Chemical Education 95, 2018, 903-907.

Hamer M., Beraldi A. M., Gómez S. G. J., Ortega F. Onna, M. Hamer. J. Chem. Educ. 98, 2021, 2625-2631.

Hetch E., (2000). Óptica, tercera edición, Addison Wesley. Madrid.

ImageJ, disponible en <http://imagej.nih.gov/ij/>, (consultado en 2018).

Islas S. R., Manual del espectrómetro UV-vis-NIR Cary 5000, MA-TECC-2017-481. ICAT-UNAM. Figura adaptada de https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5990-7786EN_Cary-4000-5000-6000i-UV-Vis-NIR_Brochure.pdf. (Consulta enero 2023).

Kovarik M. L., Clapis J. R., Romano-Pringle K. A. J. Chem. Educ. 97, 2020, 2185-2195. ImageJ. <https://imagej.nih.gov/ij/> (acceso de febrero 2018).

Millán F. Métodos espectroscópicos UV visible para análisis molecular y elemental. Instituto Universitario Politécnico “Santiago Mariño”, IUPSM, Extensión Mérida. Coordinación de Ingeniería Química y Agronomía. DOI: 10.13140/RG.2.2.16927.15528. Consultado en: <https://www.researchgate.net/publication/306350453>.

Petillo A. L. y Fernández C. Fluorescência e Estrutura Atômica: Experimentos simples para abordar o tema. Química Nova na Escola, No.19 maio 2004.

Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A. Principios de análisis instrumental, Quinta edición, Mc Graw-Hill, 2001.

Skoog, D. A. y West, D. M. 2001., *Química Analítica*. 7^{ma} edición, McGraw Hill Interamericana

Wakabayashi F., Hamada K., J. Chemical Education 83 (1), 2006, 56-58.