



## Demostración práctica de la importancia de la longitud de onda en la espectroscopía Ultravioleta Visible

### *Practical demonstration of the importance of wavelength in Ultraviolet Visible spectroscopy*

Álvaro Andrés Amaya Vesga<sup>1</sup>, Astrid Carolina Carvajal Grimaldos<sup>2</sup>, Raúl Armando Gómez Tarazona<sup>2</sup> y Yeisson Ricardo Mendoza Castellanos<sup>2</sup>

Recepción: 04/09/2022.

Aceptación: 09/02/2023

#### Resumen

En el presente trabajo se llevó a cabo el diseño de una serie de experimentos que tienen como objetivo brindar a los docentes de cursos de química analítica, herramientas que les permitan demostrar de manera práctica la importancia de la selección de la longitud de onda de análisis en las mediciones de absorbancia en la disciplina de la espectroscopía de ultravioleta visible. Inicialmente, se plantearon una serie de experimentos basados en la absorción de radiación por parte de soluciones de azul de metileno y azul de bromotimol (con pH regulado a 3,7) a diferentes concentraciones. Para ello, se hizo pasar un haz de color rojo (665 nm) y violeta (405 nm) sobre una serie de soluciones de azul de metileno y azul de bromotimol a estudiar y se observó de forma cualitativa la atenuación de la intensidad (o potencia) del haz de radiación después de salir de la celda, teniendo en cuenta que, a mayor atenuación o disminución de la intensidad de la radiación, mayor sería la absorbancia por parte de la muestra. Seguidamente, se propuso un experimento en el laboratorio basado en la realización de curvas de calibración de azul de metileno y azul de bromotimol (regulado a pH de 3,7) a diferentes longitudes de onda (665 y 425 nm), con el fin de proveerle información cuantitativa al estudiante sobre la importancia de la selección de la longitud de onda en aplicaciones de la espectroscopía de absorción ultravioleta visible. Finalmente, los experimentos más representativos del presente trabajo fueron enmarcados en una serie de experimentos cortos de fácil realización, los cuales permiten facilitar la adquisición de conceptos mediante la interacción directa con los fenómenos a estudiar.

#### Palabras clave

Espectroscopía ultravioleta visible; Absorbancia; Longitud de onda.

#### Abstract

In the present work, the design of a series of experiments was carried out with the objective of providing teachers of analytical chemistry courses with tools that allow them to demonstrate in a practical way the importance of the analysis wavelength in the measurements of absorbance in the discipline of visible ultraviolet spectroscopy. Initially, a series of experiments based on the absorption of radiation by methylene blue and bromothymol blue (with pH regulated at 3.7) at different concentrations are proposed. To do this, the red (665 nm) and violet (405 nm) colored beam was passed over the solution to be studied and the attenuation of the intensity (or power) of the radiation beam was observed qualitatively after leaving the solution cell, considering that the greater the attenuation or decrease in the intensity of the radiation, the greater the absorbance of the sample. Finally, an experiment is proposed in the laboratory based on the realization of calibration curves of methylene blue and bromothymol blue (regulated at pH 3.7) at different wavelengths (665 and 425 nm), to provide quantitative information to the student about the importance of the selection of the wavelength in applications of visible ultraviolet absorption spectroscopy.

#### Keywords

Ultraviolet – Visible Spectroscopy; Absorbance; Wavelength.

<sup>1</sup> Universidad de Santander, Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agropecuarias, Ciencias Básicas y Aplicadas Para la Sostenibilidad - CIBAS, Bucaramanga, Colombia. Correo de contacto: [alv.amaya@mail.udes.edu.co](mailto:alv.amaya@mail.udes.edu.co)

<sup>2</sup> Universidad de Santander, Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agropecuarias, Bucaramanga, Colombia.

## Introducción

Los cursos de química analítica son esenciales para la formación de profesionales en el campo de la química, bacteriología, microbiología, ingenierías, entre otras disciplinas (D. Olsen, 2016; Harris, 2007; Shi et al., 2022). Uno de los tópicos más ampliamente impartidos en los cursos de química analítica instrumental es la espectroscopía ultravioleta visible (UV-VIS), la cual se basa en la absorción de radiación electromagnética en el rango ultravioleta visible (UV-VIS) por parte de una sustancia a analizar (D. Olsen, 2016; Skoog et al., 2014; Sogorb Sánchez y Vilanova Gisbert, 2015).

Si bien gran cantidad de sustancias pueden absorber radiación electromagnética en la región del ultravioleta visible, es ampliamente conocido que no se absorbe con la misma eficiencia en todas las longitudes de onda. Por lo general, la radiación se absorbe más en unas regiones que en otras, dando como resultado, un espectro de absorción, el cual establece de forma indirecta para una sustancia, la cantidad de radiación absorbida para las diferentes longitudes de onda del espectro ultravioleta y visible, comúnmente en la región de los 200 a los 800 nm (Harris, 2007; Skoog et al., 2014).

A la hora de emplear un método analítico basado en la absorción UV-VIS con fines cuantitativos, uno de los parámetros más importantes para configurar en el espectrofotómetro es la longitud de onda de análisis. Para la mayoría de los casos, se escoge como longitud de onda de análisis, a aquella longitud de onda en la cual se presenta la máxima absorción de radiación; esta longitud de onda se conoce como la longitud de onda de máxima de absorción.

Escoger la longitud de onda de máxima absorción para estudiar la absorción de radiación de una serie de muestras de concentración conocida, con el fin de realizar una curva de calibración, permite obtener la mayor sensibilidad debido a que la pendiente sería la más alta posible para una determinada sustancia (Skoog et al., 2014). Por otro lado, cuando se selecciona una longitud de onda diferente a la del máximo de absorción, se esperarían obtener valores de absorbancia más bajos, y esto trae consigo una reducción en la sensibilidad y mayor dificultad para llevar a cabo la ejecución del método analítico (Hernandez Hernandez y González Pérez, 2022).

En caso de que se seleccione una longitud de onda en la cual la absorción de radiación sea mínima, no se podría efectuar una curva de calibración debido a que los valores de absorbancia obtenidos serían muy bajos o cercanos a cero, sin un aumento significativo de la absorbancia a medida que aumenta la concentración del analito en la solución. Esto refleja la importancia de seleccionar adecuadamente la longitud de onda a la hora de realizar una curva de calibración.

En este trabajo se propone una serie de experimentos, los cuales tienen como objetivo permitirle al estudiante interactuar con el fenómeno de absorción UV-VIS y de comprender la importancia de seleccionar la longitud de onda adecuada a la hora de realizar una curva de calibración.

## Materiales y equipos

### Reactivos

- **Solución buffer de pH 3,7:** se mezclaron 15 mL de ácido acético glacial (Merck Millipore) junto con 60 mL de etanol al 96% (Merck Millipore) y 20 mL de agua destilada en un vaso de precipitados. Seguidamente el pH fue ajustado a 3,7 empleando solución de amoníaco al 25% m/m. Finalmente, la mezcla obtenida se transfirió a un balón aforado de 100 mL para aforar hasta la marca.
- **Solución de azul de metileno de 125 mg/L:** se disolvieron 500 mg de azul de metileno (en base seca o 570 mg en base húmeda, asumiendo  $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot xH_2O$  donde x es igual a 2,5) en agua destilada hasta formar 100 mL de solución, para generar una solución de azul de metileno de 5000 mg/L. Seguidamente, a partir de esta solución se preparó una solución de azul de metileno de concentración 125 mg/L, la cual fue empleada para generar las soluciones de azul de metileno usadas en el presente estudio.
- **Solución de azul de bromotimol de 1000 mg/L a pH 3,7:** se tomaron 100 mg de azul de bromotimol (Merck Millipore) y se diluyeron con solución buffer de pH 3,7 preparadas anteriormente, hasta un volumen de 100 mL.

### Equipos

- Láser rojo comercial de longitud de onda de  $650 \pm 10$  nm y potencia de emisión de 5 mW.
- Láser violeta de longitud de onda de  $405 \pm 10$  nm y potencia de emisión de 5 mW.
- Espectrofotómetro Spectroquant Prove 300 de la empresa MERCK con rango de análisis de 200 – 800 nm.

## Parte experimental

### *Obtención de espectros ultravioleta visible para soluciones de azul de metileno y azul de bromotimol*

El espectro de absorción correspondiente al azul de metileno y al azul de bromotimol se analizó utilizando soluciones de azul de metileno y de azul de bromotimol de concentración 4,0 y 16 mg/L respectivamente. Cada solución fue analizada en un espectrofotómetro Merck Prove 300 en el rango de 380 – 800 nm empleando celda de plástico de paso óptico de 1 cm.

## ***Demostración en el aula de la importancia de la longitud de onda de análisis en la espectroscopía ultravioleta visible***

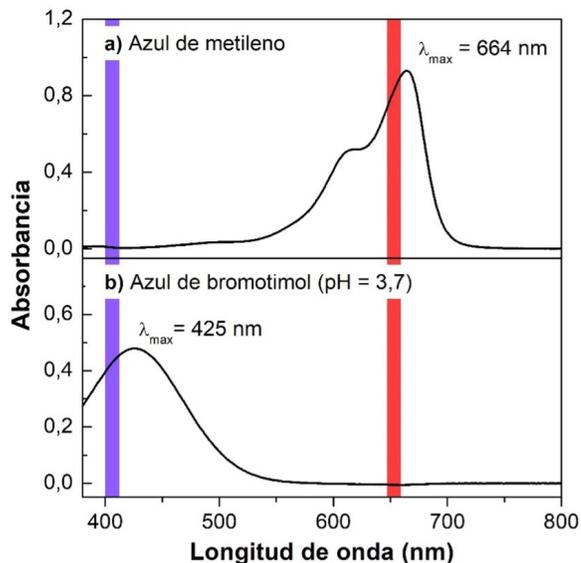
Se tomaron varias celdas plásticas para espectrofotómetro con paso óptico de 1 cm. A cada celda se le adicionó por separado distintas soluciones de azul de metileno y azul de bromotimol de diferente concentración. Para el caso de las soluciones de azul de metileno se emplearon concentraciones de 5,0, 10, 15 y 20 mg/L. Para el caso de las soluciones de azul de bromotimol se emplearon concentraciones de 20, 30, 40, 50 y 80 mg/L. Estas celdas pueden ser selladas con sus respectivas tapas para su posterior uso en el aula.

Cada celda fue irradiada con el láser violeta (405 nm) y rojo (650 nm) con el fin de verificar empíricamente la absorción de radiación por parte de las soluciones analizadas, mediante la atenuación de la intensidad del láser al salir de la celda. La luz del láser se hizo incidir sobre una superficie blanca en un ambiente de baja iluminación.

### ***Experimentos en el laboratorio para la demostración de la importancia de la selección de la longitud de onda en análisis cuantitativos mediante ultravioleta visible***

Para demostrar la importancia de la selección de la longitud de onda en el análisis cuantitativo mediante ultravioleta visible, se llevaron a cabo una serie de curvas de calibración usando la longitud de onda de máxima absorción y una longitud de onda de mínima absorción. Las curvas de calibración se realizaron empleando soluciones de azul de metileno y azul de bromotimol a pH 3,7 de diferentes concentraciones. Para el azul de metileno, se emplearon soluciones de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 y 5,0 mg/L. Para el azul de bromotimol se emplearon soluciones de 2,0, 4,0, 8,0, 12, 16, 20, 24, 28 y 40 mg/L. La absorbancia se analizó empleando los valores máximos de absorción para cada analito, siendo 665 nm para el azul de metileno y 425 nm para el azul de bromotimol. Los análisis fueron llevados a cabo empleando un espectrofotómetro Merck Prove 300 y una celda de plástico de 1 cm de paso óptico.

**FIGURA 1.** Espectro de absorción de a) azul de metileno (4,0 mg/L) y b) azul de bromotimol (16 mg/L) a pH 3,7.



## **Resultados**

### ***Espectros de absorción UV-VIS del azul de metileno y azul de bromotimol***

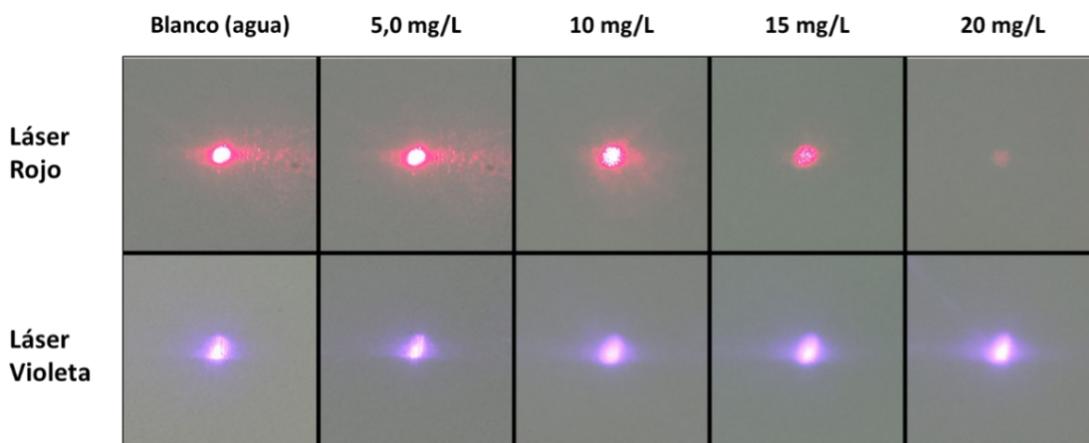
El azul de metileno es un colorante ampliamente utilizado en diferentes aplicaciones en biología y química analítica, el cual se caracteriza por presentar un color azul intenso (Karthi et al., 2022; Lv et al., 2022; Tong et al., 2022). La Figura 1.a representa el espectro de absorción UV-VIS de una solución de azul de metileno de concentración 4,0 mg/L.

Como se puede observar, el máximo de absorción del azul de metileno se ubica cerca de los 664 nm, mientras que, en la región cercana a los 405 nm, se observa una región de mínima absorción. De igual forma, la Figura 1.b muestra el espectro de absorción del azul de bromotimol a pH igual a 3,7 a una

concentración de 16 mg/L. Para esta sustancia, el máximo de absorción se ubica a 425 nm, mientras que a 650 nm se tiene una región de absorción prácticamente nula (Ali et al., 2017; Pudipeddi et al., 2008). Los espectros UV-VIS expresados en la Figura 1, permiten evidenciar que, para las condiciones analizadas, el azul de metileno podría absorber satisfactoriamente un láser de color rojo (650 nm) pero no un láser de color violeta (405 nm). Por otro lado, el azul de bromotimol podría absorber satisfactoriamente un láser de color violeta, pero no un láser de color rojo. Esto permitiría poder demostrar, de forma experimental, la importancia que tiene la selección de la longitud de onda, a la hora de realizar experimentos donde se analice la absorbancia de una sustancia.

### ***Demostración de la importancia de la selección de la longitud de onda en medidas de absorción de radiación UV-VIS***

Para este propósito se prepararon una serie de soluciones de azul de metileno y azul de bromotimol (pH = 3,7) a diferentes concentraciones, y se hizo pasar, a través de ellas, el haz de un láser de color rojo (650 nm) y violeta (405 nm), y se analizó la proyección producida por el haz al incidir sobre una superficie blanca. La intensidad del haz después de pasar a través de la celda se analizó cualitativamente de acuerdo a la intensidad del haz de luz proyectado sobre la superficie blanca. La Figura 2 muestra los resultados obtenidos cuando se hizo pasar un láser de color rojo (650 nm) o violeta (405 nm) sobre una serie de soluciones de azul de metileno de diferente concentración.

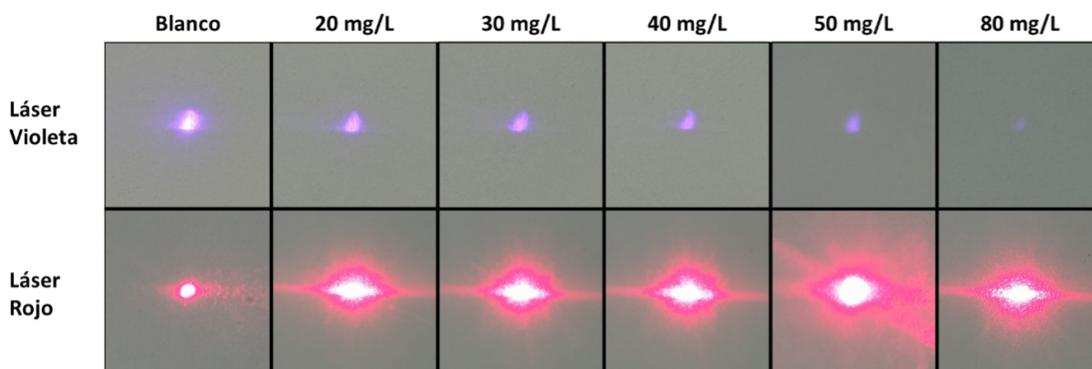


**FIGURA 2.** Proyección del haz de luz de color violeta o rojo después de pasar sobre una serie de soluciones de azul de metileno de diferente concentración.

Como se puede apreciar en la Figura 2, a medida que aumenta la concentración de azul de metileno, la intensidad del haz de luz de color rojo después de pasar por la celda se ve disminuida, siendo significativamente atenuada cuando la concentración de azul de metileno es 20 mg/L. Por otro lado, para el caso del láser violeta no se observó una reducción aparente en la intensidad del haz después de pasar por la celda. Estos resultados están en concordancia con el hecho de que el azul de metileno presenta un máximo de absorción de 664 nm (cercano a 650 nm), mientras que su absorción a 405 nm no es significativa.

Por otro lado, para el caso del azul de bromotimol, se observó que la intensidad del haz del láser de color violeta se vio seriamente reducida a medida que aumentaba la concentración de azul de bromotimol, siendo prácticamente imperceptible cuando la concentración de azul de bromotimol fue de 80 mg/L (ver Figura 3). Por otro lado, cuando

se hizo incidir el láser de color rojo sobre esta serie de soluciones de azul de bromotimol, no se observó una disminución aparente en la intensidad del láser, sino que se observó una dispersión del haz de luz proyectado sobre la superficie blanca; este último fenómeno no se discute en este trabajo. Los resultados obtenidos en el anterior experimento están en concordancia con el hecho de que el azul de bromotimol a pH 3,7 presenta un máximo de absorción de 425 nm (cercano a 405 nm) (Shimada y Hasegawa, 2017) mientras que a 650 nm presenta una absorbancia prácticamente nula.



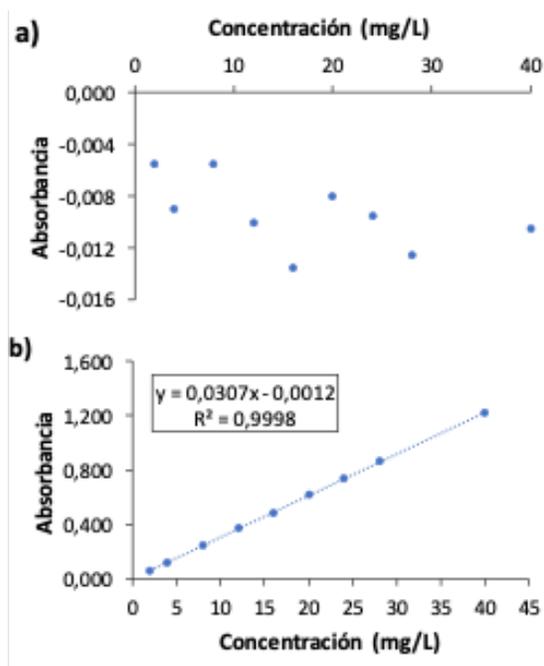
**FIGURA 3.** Proyección del haz de luz de color violeta o rojo después de pasar sobre una serie de soluciones de azul de bromotimol de diferente concentración.

Estos experimentos anteriormente mencionados permitirían al docente poder exponer, experimentalmente en el aula, la importancia que tiene la selección de la longitud de onda, a la hora de analizar la absorbancia de un analito determinado.

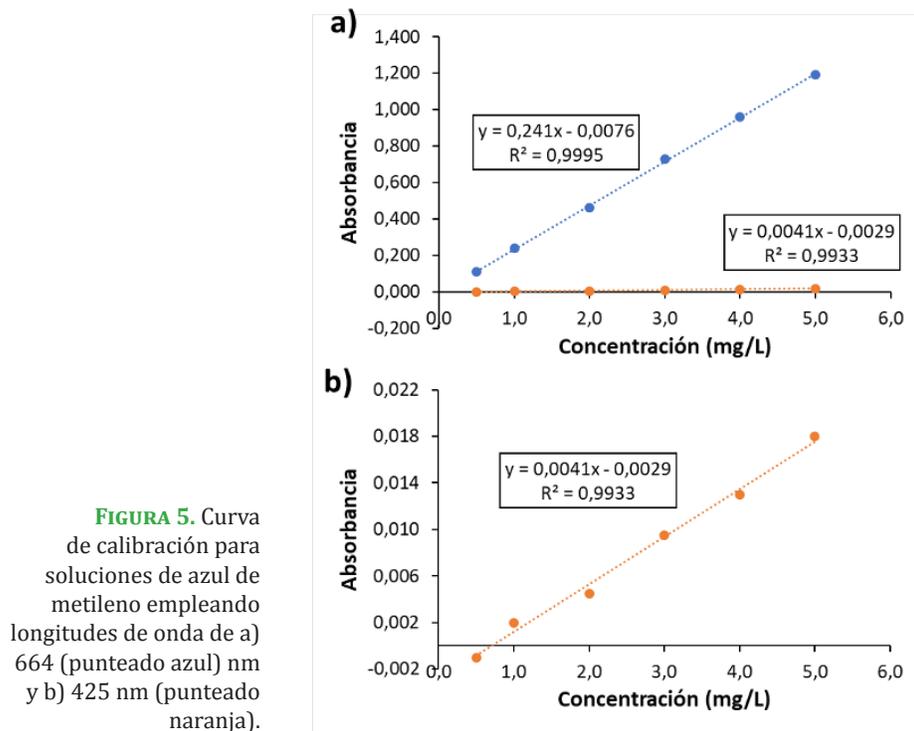
### ***Experimentos de profundización en el laboratorio mediante la realización de curvas de calibración***

Con el fin de determinar el efecto que tiene la selección de la longitud de onda sobre la calidad de los datos obtenidos en una curva de calibración, se analizó la absorbancia de una serie de soluciones de azul de metileno y azul de bromotimol de diferentes concentraciones, empleando un espectrofotómetro. Como se muestra en la Figura 4.b, cuando se lleva a cabo una curva de calibración de azul de bromotimol a pH 3,7, utilizando la longitud de onda de máxima absorción (425 nm) se obtiene una tendencia clara del comportamiento lineal entre la absorbancia y la concentración, indicando un óptimo cumplimiento de la ley de Lambert – Beer en esta región analizada (Skoog et al., 2014). No obstante, cuando se realiza la curva de calibración a una longitud de onda en donde la absorción es no significativa (en este caso a 664 nm), no se obtiene una tendencia coherente entre la concentración y la absorbancia, sino que se obtiene una serie de resultados dispersos en torno a un valor determinado (ver Figura 4.a). Esto demuestra que cuando se lleva a cabo una curva de calibración empleando una longitud de onda donde la absorción de radiación no es significativa, no se logra obtener una relación directa entre la absorbancia y la concentración para el analito analizado. La obtención de valores negativos puede ser debida al efecto de dispersión del haz de luz por parte de un láser de color rojo (aproximadamente 650 nm) tal como se vio en la Figura 3, sin embargo, este fenómeno no es objeto de estudio en el presente trabajo.

**FIGURA 4.** Curva de calibración para soluciones de azul de bromotimol a pH 3,7 utilizando longitudes de onda de a) 664 nm y b) 425 nm.



Para el caso de la curva de calibración empleando azul de metileno como analito, en ambos casos (usando la longitud de onda de máxima absorción y de baja absorción) se pudo establecer una relación lineal entre la absorbancia y la concentración del analito (ver Figura 5). No obstante, como se puede ver en esta gráfica, las pendientes de la recta en



**FIGURA 5.** Curva de calibración para soluciones de azul de metileno empleando longitudes de onda de a) 664 (punteado azul) nm y b) 425 nm (punteado naranja).

ambas curvas de calibración son significativamente diferentes, siendo mayor para el caso en donde se utilizó la longitud de onda de máxima absorción (ver Figura 5.a). Esta diferencia observada en el valor de las pendientes obtenidas evidencia que la sensibilidad del método analítico se ve significativamente influenciada por la selección de la longitud de onda; cuando se escoge la longitud de onda de máxima absorción, se obtiene la mayor pendiente (lo cual favorece la sensibilidad del método analítico) mientras que cuando se escoge la longitud de onda de menor absorción, se obtiene una baja pendiente, lo cual desfavorece la sensibilidad del método analítico.

## Dinámica de evaluación de los conceptos relacionados en el presente trabajo

Con el fin de llevar a cabo un proceso de evaluación de la asimilación de conceptos por parte del estudiante, se propone la siguiente dinámica expresada en la Tabla 1. Se recomienda llevar a cabo esta actividad en un laboratorio, con todas las normas de bioseguridad requeridas.

Concepto a evaluar	Dinámica de la evaluación	Resultado esperado
Efecto de la variación de la longitud de onda sobre la absorción de radiación por parte de una solución de azul de metileno.	Tomar una solución de azul de metileno de concentración cercana a los 15 mg/L depositada en una celda de plástico. Hacer pasar a través de ella, la luz emitida por un diodo láser rojo y posteriormente de un láser violeta. Observar la disminución de la intensidad del haz después de pasar por la celda. Comparar los resultados con una celda con agua destilada.	A partir de este experimento, el estudiante observará la diferencia en la atenuación entre la intensidad del láser rojo y violeta cuando estos se hacen incidir sobre una solución de azul de metileno, encontrando que la solución de azul de metileno presenta mayor eficiencia para la absorción del color rojo que el color violeta.  <b>Resultado de aprendizaje:</b> el estudiante podrá inferir acerca de la importancia que tiene la correcta selección de la longitud de onda, sobre la absorbancia obtenida durante el análisis de un analito determinado.
Efecto de la variación del analito, sobre la eficiencia de absorción de radiación para un láser de longitud de onda determinada.	Tomar una solución de azul de metileno y de azul de bromotimol a pH 3,7 y verter cada una en una celda plástica. Así mismo, verter agua destilada en una celda adicional para generar el blanco. Seguidamente, hacer incidir el láser de luz roja sobre las tres celdas mencionadas anteriormente por separado y observar la atenuación de la intensidad del haz.	Como resultado de este experimento, el estudiante observará un cambio significativo en la atenuación del haz de color rojo cuando este es pasado a través de una solución de azul de metileno con respecto a cuando es incidido sobre una solución de azul de bromotimol a pH 3,7.  <b>Resultado de aprendizaje:</b> el estudiante podrá inferir acerca de la eficiencia de absorción de radiación a una longitud de onda determinada cuando se evalúan dos analitos cuyo máximo de absorción son similares o diferentes a la longitud de onda de la radiación empleada.

**TABLA 1.** Dinámica de evaluación de conceptos básicos relacionados con el efecto de la longitud de onda sobre la eficiencia de absorción por parte de soluciones de analitos absorbentes en el rango UV-VIS.

Para el procedimiento de evaluación para la verificación de saberes adquiridos, el docente podrá generar un formulario escrito donde se evalúen los conceptos mencionados en la Tabla 1, haciendo uso de preguntas abiertas, selección múltiple, u otro tipo de preguntas que considere pertinente.

## Conclusión

La selección de la longitud de onda es un parámetro crucial en el análisis químico de una solución de un analito absorbente. La demostración práctica de este fenómeno puede ser una herramienta valiosa para enseñar a los estudiantes la importancia de la selección de la longitud de onda durante la ejecución de un método analítico. Mediante experimentos sencillos y económicos, se puede demostrar cómo una sustancia puede absorber significativamente en algunas regiones de longitudes de onda y no en otras, lo que puede afectar los resultados del análisis químico. En conclusión, la selección cuidadosa de la longitud de onda es fundamental para garantizar la precisión y exactitud de los resultados analíticos.

## Bibliografía

- Ali, R., Saleh, S. M., y Aly, S. M. (2017). Fluorescent gold nanoclusters as pH sensors for the pH 5 to 9 range and for imaging of blood cell pH values. *Microchimica Acta*, 184(9), 3309–3315. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2352-7>
- D. Olsen, E. (2016). *Métodos ópticos de análisis* (1st ed.). España, Barcelona: Reverté.
- Harris, D. C. (2007). *Análisis Químico Cuantitativo* (3rd ed.). España, Barcelona: Reverté.
- Hernandez Hernandez, L., y González Pérez, C. (2022). *Introducción al análisis Instrumental* (1st ed.). España, Barcelona: Ariel S.A.
- Karthi, S., Sangeetha, R. K., Arumugam, K., Karthika, T., y Vimala, S. (2022). Removal of methylene blue dye using shrimp shell chitin from industrial effluents. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.05.428>
- Lv, B., Dong, B., Zhang, C., Chen, Z., Zhao, Z., Deng, X., y Fang, C. (2022). Effective adsorption of methylene blue from aqueous solution by coal gangue-based zeolite granules in a fluidized bed: Fluidization characteristics and continuous adsorption. *Powder Technology*, 408, 117764. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2022.117764>
- Pudipeddi, M., Zannou, E. A., Vasanthavada, M., Dontabhaktuni, A., Royce, A. E., Joshi, Y. M., y Serajuddin, A. T. M. (2008). Measurement of Surface pH of Pharmaceutical Solids: A Critical Evaluation of Indicator Dye-Sorption Method and its Comparison With Slurry pH Method. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(5), 1831–1842. <https://doi.org/10.1002/jps.21052>
- Shimada, T., y Hasegawa, T. (2017). Determination of equilibrium structures of bromothymol blue revealed by using quantum chemistry with an aid of multivariate analysis of electronic absorption spectra. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 185, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.040>
- Shi, Z., Chow, C. W. K., Fabris, R., Liu, J., y Jin, B. (2022). Applications of Online UV-Vis Spectrophotometer for Drinking Water Quality Monitoring and Process Control: A Review. *Sensors*, 22(8), 2987. <https://doi.org/10.3390/s22082987>

- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., y Crouch, S. R. (2014). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (9th ed.). Estados Unidos, New York: Saunders College Pub.
- Sogorb Sánchez, M. A., y Vilanova Gisbert, E. (2015). *Técnicas analíticas de contaminantes químicos: aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias* (1st ed.). Diaz de Santos.
- Tong, Y., Jiang, B., Chen, X., Ren, X., Lu, J., y Ding, L. (2022). Synergistic degradation of methylene blue by laser cavitation and activated carbon fiber. *Optics y Laser Technology*, 155, 108417. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2022.108417>