

EL EMPLEO DE LA DERIVADA EN LA ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Nadia R. Gamboa Fuentes*

Desde fines de 1930 hasta la actualidad, los espectrofotómetros han progresado desde simples colorímetros hasta equipos computarizados con brazos robots que colocan automáticamente las muestras en ausencia temporal de un operador. Grandes pasos se han dado desde la aparición del primer equipo comercial en 1939. Estos avances no son sólo tecnológicos sino de tratamiento de datos. Una de las herramientas matemáticas empleadas en espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis), fotometría de llama, espectroscopía infrarroja y de fluorescencia, es la derivación. El fundamento teórico de esta técnica fue expuesto en 1953, pero fue puesta en práctica dos décadas después. En los párrafos siguientes no se explicará el principio de la espectroscopía UV-Vis, ya que existen numerosos textos que lo hacen; en cambio, se comentará el empleo de la derivación en la misma.

Un espectro UV-Vis puede representarse por una función matemática. Cualquier función matemática puede ser derivada respecto a una de sus variables. Luego, una de estas funciones (que representa un espectro UV-Vis) puede ser derivada una, dos o más veces con respecto a la longitud de onda o frecuencia. Se obtiene así la derivada de primer, segundo, tercer, ... , de orden n . El instrumento hace el cálculo electrónicamente trabajando en intervalos no muy grandes de longitud de onda para analizar mejor la información que pro-

* PUCP, Departamento de Ciencias, Sección Química

porciona el espectro no derivado. El resultado: crecimiento de la señal, mayor información. La desventaja: aumenta considerablemente el ruido de fondo.

Esta técnica funciona como una especie de filtro. Resuelve las bandas traslapadas (hombros) y facilita la interpretación de las características del espectro. Reduce la interferencia del ruido de fondo (background) y resuelve las anchas bandas obtenidas en los espectros UV-Vis. Se emplea para solucionar problemas de interés bioquímico, clínico, ecológico y farmacéutico. Algunos usos son:

- a) Determinación cuantitativa en muestras turbias.
- b) Colorimetría de muestras de aguas de desagüe turbias.
- c) Mejoramiento de la resolución de un espectro de absorción.
- d) Mediciones en los extremos de una banda.
- e) Determinación de bandas traslapadas originadas por componentes secundarios reduciendo el efecto de fondo (background).
- f) Medición en sistemas de dos o más componentes.
- g) Determinación de trazas de compuestos aromáticos en hidrocarburos saturados.
- h) Espectros de gases.
- i) Determinación precisa de la longitud de onda máxima λ_{max} .

GENERALIDADES

Un espectro derivado es la representación gráfica de los cocientes diferenciales sobre un rango de longitudes de onda de interés:

$$\frac{d^n A}{d\lambda^n} \quad \text{para la n-ésima derivada}$$

donde A : absorbancia
 λ : longitud de onda

En la Figura 1 aparecen las curvas correspondientes a una banda Gaussiana que simula una absorción y sus derivadas hasta de cuarto orden. Esta sería la representación para una banda hipotética correspondiente a un compuesto puro. Asimismo, se puede construir las curvas hipotéticas que representarían a una mezcla de dos (Figura 2) o tres componentes (Figura 3). El efecto de dispersión (scattering) que se presenta en muestras turbias, puede entenderse analizando la Figura 4.

La primera derivada de cualquier curva toma el valor de cero para los máximos y mínimos. En la Figura 1 se aprecia claramente el valor de cero para el máximo en 30. En la Figura 4 se observa tres curvas denotadas por A, B y C. A es la banda de absorción de un compuesto hipotético cuyo λ_{max} se ubica en 400 nm. B es la curva de background debido al efecto scattering. Pero el instrumento graficaría la curva C que es una función compuesta resultado de la adición de las curvas A y B. La función C no tiene máximo ni mínimo y no toma el valor de cero en ningún punto de su primera derivada. Además, las formas de las curvas de la primera derivada de A y C son muy similares.

En la curva de la segunda derivada para sólo un compuesto, se obtiene un mínimo en un valor de longitud de onda que coincide con el valor de la absorción en el espectro (Figura 1). Para una curva compuesta, estos puntos casi coinciden con el máximo de las bandas de los componentes puros tal como se observa en las Figuras 2 y 3.

Las formas de las curvas para las derivadas de orden superior se van complicando (Figura 3). Un ejemplo experimental aparece en la Figura 5 donde aparecen las bandas de absorción traslapadas del espectro de un filtro de neodimio.

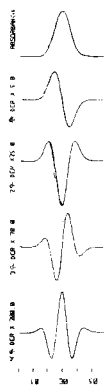


Fig. 1 Primera a cuarta derivada de una banda Gaussiana, altura 1.2 y FWHM (ancho de la banda a la mitad de la altura de la absorción)12*.

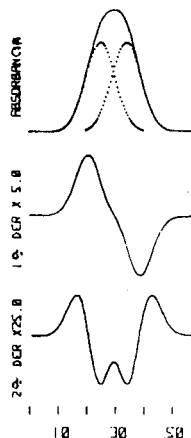


Fig. 2 Primera y segunda derivada de dos bandas Gaussianas traslapadas, altura 1.2 y FWHM 12, centrada en 25 y 34*.

* Figura tomada de la referencia 1

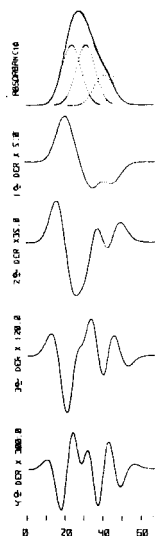


Fig. 3 Primera a cuarta derivada de una composición de tres bandas Gaussianas, cada una con FWHM de 12. Las bandas están centradas en 25, 32.5 y 42 con alturas de 1.2 y 0.6 respectivamente*.

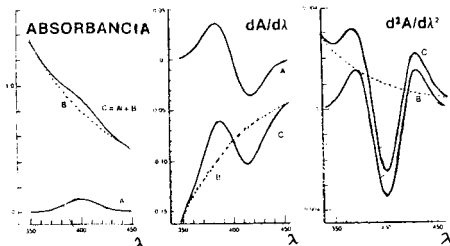


Fig. 4 Simulación de una banda de absorbancia con efecto de scattering y su primera y segunda derivada. A es la banda Gaussiana de altura 1.9 y FWHM 40 centrada en 400; B es el efecto scattering y $C = A + B^*$.

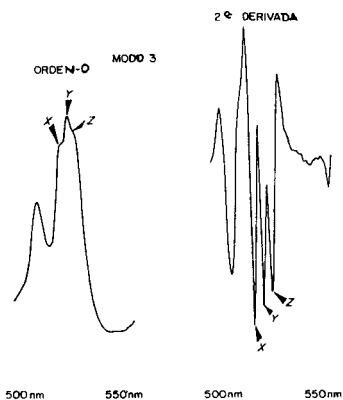


Fig. 5 Efecto y segunda derivada de un filtro de neodimio**.

** Figura tomada de referencia 5.

* Figura tomada de referencia 1

VENTAJAS DE LA DERIVADA

Las curvas de las derivadas de un espectro son afectadas por dos factores:

a) **Resolución:**

La Figura 2 muestra que las derivadas de una curva espectroscópica pueden ser útiles para resolver bandas que son muy cercanas. La resolución se incrementa conforme aumenta el orden de la derivada. La magnitud exacta de esta mejora depende del orden de la derivada, de la forma de la banda y de la relación entre el ancho de la banda y su altura. En la Figura 3 se muestra dos curvas Gaussianas que tienen las mismas alturas y anchos. Ambas son resueltas por la segunda y cuarta derivadas ya que su separación dividida entre su ancho a la mitad del máximo (FWHM) es 0.85, 0.63 y 0.52 respectivamente.

b) **Discriminación:**

Las formas agudas en los gráficos se incrementan conforme aumenta el orden de la derivada. En la Figura 4 se puede ver que el efecto del background (B) sobre el pico (A) en la curva C disminuye notablemente en la primera y segunda derivadas.

Cálculo de la derivada

Cuando se calcula derivadas de un espectro debe mantenerse un compromiso entre la fidelidad con la cual se obtiene la derivada y la relación S/N (señal/ruido). El ruido, aunque sea pequeño, tiene características muy agudas que afectan al espectro. La disminución en S/N puede ser evitada promediando los cálculos de las derivadas sobre una región de longitud de onda que sea grande comparada con la estructura del ruido. Sin embargo, conforme se incrementa el rango de longitudes de onda, la derivada se distorsiona más. Se puede apreciar mejor estos efectos haciendo algunos cálculos. Si se asume que el espectro de absorbancia es derivado sólo una vez en λ^1 :

$$\left(\frac{dA}{d\lambda}\right)_{\lambda=\lambda^1} \simeq D^1_{\lambda^1} = \frac{\Delta A}{\Delta \lambda} =$$
$$\frac{A(\lambda^1 + \Delta \lambda/2) - A(\lambda^1 - \Delta \lambda/2)}{\Delta \lambda}$$

y la segunda derivada es:

$$\left(\frac{d^2 A}{d\lambda^2}\right)_{\lambda=\lambda^1} \simeq D^2_{\lambda^1} = \frac{\Delta D^1_{\lambda^1}}{\Delta \lambda} = (\Delta/\Delta \lambda)^2 A =$$

$$\frac{A(\lambda^1 + \Delta \lambda) - 2A(\lambda^1) + A(\lambda^1 - \Delta \lambda)}{(\Delta \lambda)^2}$$

y así sucesivamente. El valor de la n-ésima derivada en cualquier punto involucra valores de absorbancia sobre un rango de longitudes de onda de $n\Delta\lambda$; su efecto en la forma de la derivada calculada y sobre S/N deben ser considerados.

RAZON SEÑAL-RUIDO

Para poder determinar la influencia de $\Delta \lambda$ sobre S/N de un espectro derivado, debe considerarse separadamente su influencia sobre la señal y sobre el ruido. La señal en D^1 en alguna longitud de onda λ^1 usando un particular $\Delta \lambda$ es

$$S_1(\lambda^1, \Delta \lambda) = A(\lambda^1 + \Delta \lambda/2) - A(\lambda^1 - \Delta \lambda/2) \simeq$$

$$\left(\frac{dA}{d\lambda}\right)_{\lambda=\lambda^1} \Delta \lambda$$

donde la aproximación involucra el uso de valores finitos de $\Delta \lambda$. La señal en D^2 es

$$S_2(\lambda^1, \Delta \lambda) = S_1(\lambda^1 + \Delta \lambda/2, \Delta \lambda) -$$

$$S_1(\lambda^1 - \Delta \lambda/2, \Delta \lambda) \simeq$$

$$\left(\frac{d^2 A}{d\lambda^2}\right)_{\lambda=\lambda^1} (\Delta \lambda)^2$$

En general,

$$S_n(\lambda^1, \Delta \lambda) \simeq \left(\frac{d^n A}{d\lambda^n}\right)_{\lambda=\lambda^1} (\Delta \lambda)^n$$

El ruido en la n-ésima derivada es calculado considerando el hecho de que cuando dos señales son sumadas o restadas, el ruido resultante está dado por la raíz de la suma de los cuadrados de sus niveles individuales de ruido. Si el espectro de absorbancia tiene un nivel de ruido de N_o a lo largo de una banda, el ruido en la primera derivada es:

$$N_1 = \sqrt{N_o^2 + N_o^2} = \sqrt{2} N_o.$$

El nivel de ruido en la segunda derivada está dado por:

$$N_2 = \sqrt{N_o^2 + (2N_o)^2} + N_o^2 = \sqrt{6} N_o.$$

ya que la señal en D^2 se obtiene por $A(\lambda^1 + \Delta \lambda) - 2A(\lambda^1) + A(\lambda^1 - \Delta \lambda)$.

Usando el mismo razonamiento, $N_3 = \sqrt{20} N_o$ y $N_4 = \sqrt{70} N_o$. Debe notarse que este tratamiento no asume correlación en el ruido entre dos puntos separados por $\Delta \lambda$.

Se observa que el ruido en la n-ésima derivada es independiente de $\Delta \lambda$, pero la relación S/N aumenta con $\Delta \lambda$ debido a un incremento en la señal. Este incremento en la señal varía con $(\Delta \lambda)^n$ si $n \Delta \lambda$ es pequeño comparado con el ancho de la señal (W), pero aumenta menos rápidamente a mayores $\Delta \lambda$ por el efecto de distorsión.

SELECCION DE $\Delta \lambda$

En general, los óptimos valores de n y $\Delta \lambda$ deben ser determinados experimentalmente para cada aplicación. Pero, algo debe quedar claro: la obtención de una derivada distorsionada no es útil. Es mejor aun promediar sobre un rango de longitud de onda en el orden del ancho de las bandas de interés ($\Delta \lambda = W/n$) para obtener mayor S/N u orden de derivada. Por ejemplo, un $\Delta \lambda$ de $W/8$ dará valores de D^1 para una banda Gaussiana dentro del 1% de la primera derivada exacta y un S/N relativo a la curva de absorbancia de 24%. Pero, un $\Delta \lambda$ de $W/4$ producirá una segunda derivada con un valor alto de S/N y mejores resolución (Figura 4) y discriminación.

APLICACIONES

a) **Determinación cuantitativa en muestras turbias**

Es importante la determinación cuantitativa de sustancias absorbentes disueltas en presencia de turbidez. En un espectro normal la turbidez produce generalmente una absorbancia que aumenta continuamente hacia valores de longitud de onda más cortos. Esto no causará ningún cambio espectral pronunciado en la primera o segunda derivada. Así, cuando sustancias absorbentes son analizadas en presencia de turbidez, la absorbancia de fondo (background) causada por esta turbidez puede ser eliminada. La Figura 6 muestra el espectro de fenol en agua (curva a) así como su primera (1a) y segunda derivadas (2a). En la segunda derivada la posición de los hombros en el espectro de absorción se distinguen por los dos pronunciados mínimos.

Para evaluar cuantitativamente el espectro derivado se emplea la diferencia entre un máximo y un mínimo. Si existen muchas diferencias, se seleccionan los extremos que muestren la mayor diferencia, por ejemplo, la diferencia A-B (curva a) o C-D (curva b) en la Figura 7. Precisamente, la determinación de fenol en agua de desagüe fue uno de los primeros ejemplos del empleo de la derivada en la determinación cuantitativa de un parámetro en presencia de turbidez. La Figura 7 demuestra que la evaluación de la primera y segunda derivada cumple la ley de Beer-Lambert, y que la turbidez no influye en la linealidad (curva c).

Las bebidas que contienen quinina también contienen extractos de frutas como el amargo de limón. Esto las hace ligeramente turbias y también contienen sustancias que absorben luz UV. La Figura 8 muestra los espectros de absorción y las segundas derivadas de una solución estándar de quinina (curvas a), de una muestra de bebida que contiene quinina (curvas b), y de una muestra que contiene quinina en la misma concentración que el estándar (curvas c). El mínimo en la segunda derivada puede atribuirse a la quinina localizada a la misma longitud de onda (250 nm) para las tres muestras. La quinina añadida a la muestra de bebida tiene un efecto aditivo.

Las bebidas de cola contienen cafeína. Aunque no son turbias, la determinación espectroscópica directa de la concentración de cafeína en el rango UV no es posible debido a la coloración oscura y a la posible presencia de otras sustancias que absorban en esta zona del espectro. La Figura 9 muestra la eliminación de la absorbancia de background no específica por espectros-

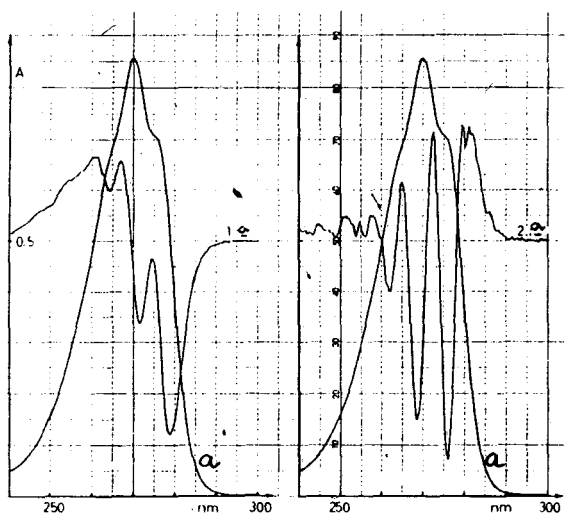


Fig. 6 Espectro normal y derivado del fenol (50ppm) en agua***

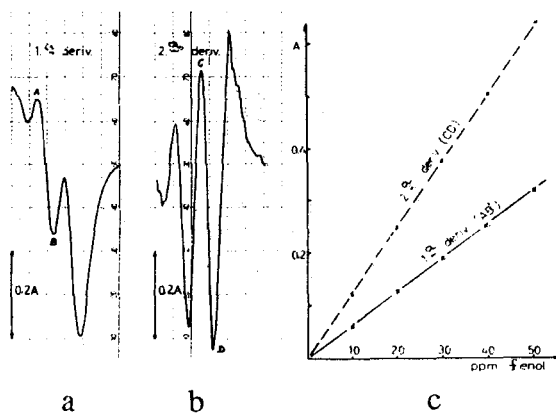


Fig. 7 Fenol en agua de desagüe: Espectro derivado y linealidad***

*** Figuras tomadas de referencia 3.

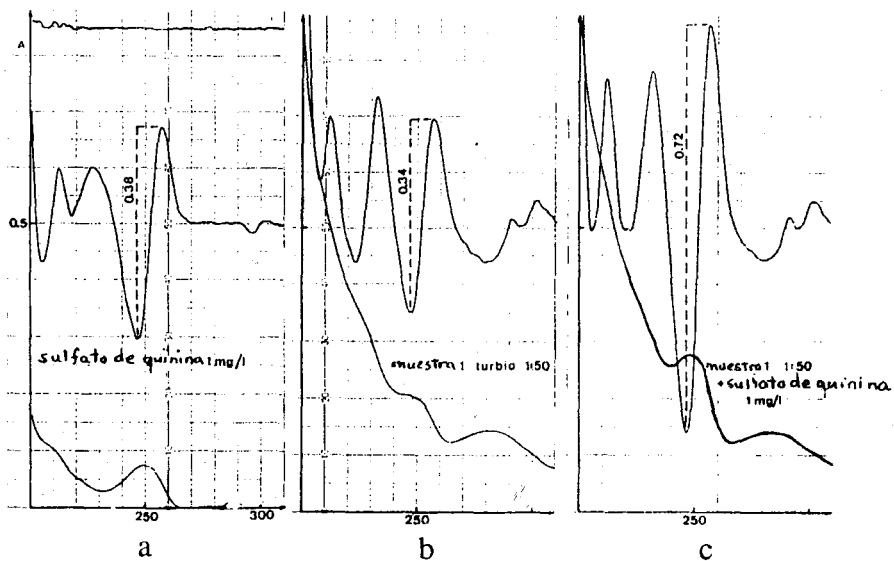


Fig. 8 Determinación de quinina por espectroscopía derivada en ácido sulfúrico 0.05 N***

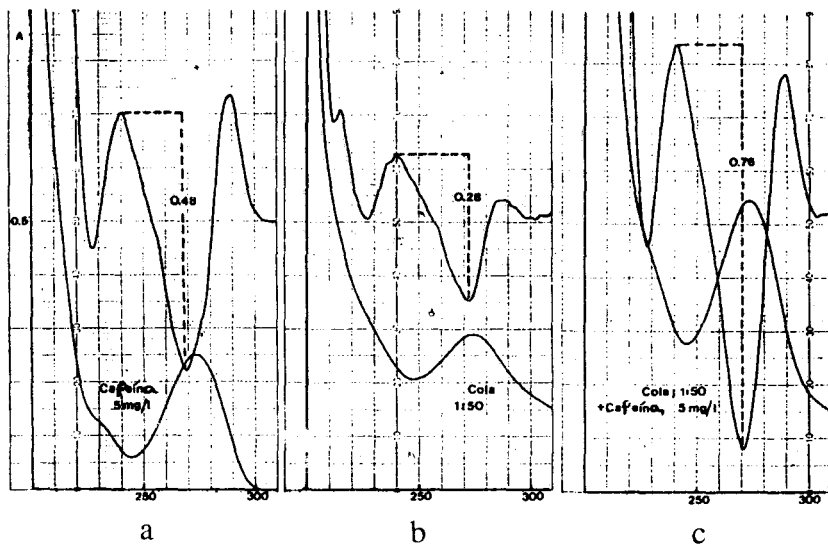


Fig. 9 Determinación de cafeína por espectroscopía derivada***

copía derivada. La adición de una conocida cantidad de cafeína a una bebida de cola muestra el resultado que podría haberse predicho teóricamente (curva c, 270 nm).

Otro ejemplo es la leche cuya turbidez es causada por una emulsión de grasas. Además de la determinación de grasas y otros ingredientes de la leche, la determinación de proteínas es importante. Los métodos convencionales para la determinación de las proteínas son tediosos y largos. La espectroscopía derivada ofrece una alternativa menos complicada. En la Figura 10 se ve el espectro de absorción y la segunda derivada de leche fresca altamente diluida (curva b). El pico en 280 nm se puede atribuir al contenido de aminoácidos de las proteínas de la leche (curva a). En la misma figura aparece una proteína modelo. En la Figura 11 se muestran los espectros de absorción y sus correspondientes segundas derivadas para cinco diluciones de leche. Cuando las diluciones son mayores de 1:100, las diferencias pico-pico AB son lineales con la dilución.

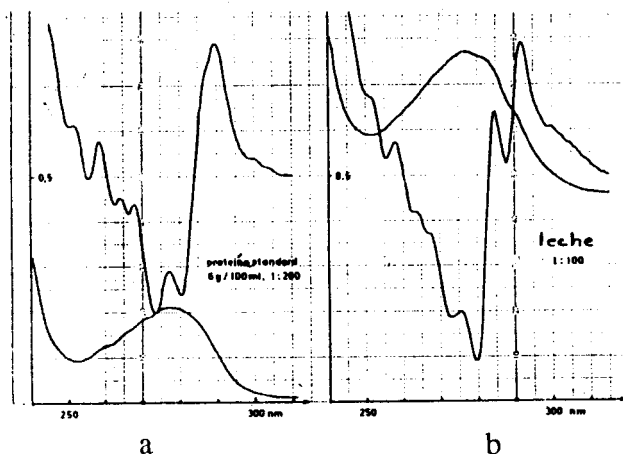


Fig. 10 Espectros de absorción y segundas derivadas de un estándar de proteína y de leche fresca diluida***

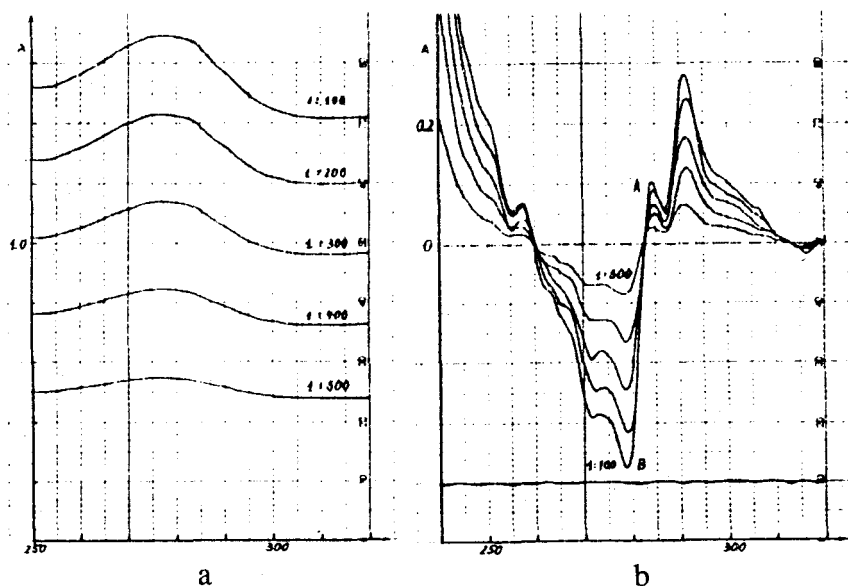


Fig. 11 Espectro de absorción y segunda derivada de varias diluciones de leche fresca***

b) Mejoramiento de la resolución de un espectro de absorción

Se puede mejorar la resolución en estructuras muy finas de espectros. En este caso es útil la segunda derivada ya que el máximo y mínimo del espectro normal y de la segunda derivada tienen más o menos la misma longitud de onda. La estructura fina del espectro normal es aparentemente distinta que en la primera derivada. El reconocimiento de la estructura fina es muy importante para la identificación, para pruebas de pureza o para control de calidad. La segunda derivada es, en muchos casos, superior al cociente de la absorción en dos longitudes de onda; esto es usado generalmente en bioquímica como una prueba de pureza.

c) Medición en sistemas de dos o más componentes

Los componentes de una mezcla pueden no ser determinados exactamente por bandas de absorción definidos, sino que se presentan hombros o

pequeños picos en el espectro UV-Vis. Con los métodos convencionales dichos picos son evaluados con error. Con la primera o segunda derivada bajo determinadas condiciones se pueden distinguir los componentes individuales con un pequeño error. La exactitud de una determinación en un sistema de varios componentes depende de:

- i La relación de la altura de la banda de interferencia y la de la banda que se desea determinar.
- ii La relación del ancho a la mitad de la banda de interferencia y de la de la banda que se desea determinar.
- iii La distancia entre los máximos de absorción de ambos componentes individuales.

En la Figura 6 se analizó la mezcla fenol-agua que presenta dos hombros. Pero hay otros ejemplos interesantes. Muchas vitaminas muestran un comportamiento típico de absorción en la zona UV. La primera y segunda derivadas pueden usarse para la determinación cuantitativa de vitaminas en presencia de otras sustancias absorbentes. La Figura 12 muestra los espectros de absorción y sus segundas derivadas de la vitamina B12 (curvas a) y del acetato de vitamina E (curvas b). La Figura 13 muestra la determinación cuantitativa del acetato de vitamina E en presencia de vitamina A. La adición del estándar puro al extracto de una gragea (curva c) dio un rendimiento de 97%. En cambio, con los métodos convencionales debe realizarse la hidrólisis para obtener la vitamina E la cual, debido a la autooxidación de la sustancia, siempre ocasiona pérdidas. Estableciendo las diferencias entre máximos y mínimos se puede confirmar el rendimiento obtenido (curva c) con el que se obtiene por los métodos clásicos.

d) Determinación de trazas de compuestos aromáticos en hidrocarburos saturados

Los picos de hidrocarburos poliinsaturados tienen un ancho a la mitad de su altura muy pequeño en el rango UV. La segunda derivada los mejora. Esto se emplea para la determinación cuantitativa de los contaminantes aromáticos en hidrocarburos saturados. La Figura 14 muestra la detección de trazas de benceno en ciclohexano.

e) Espectros de gases

Los gases presentan espectros de absorción de estructura fina y muy detallada. Ocurre una reducción de las influencias intermoleculares (ausencia

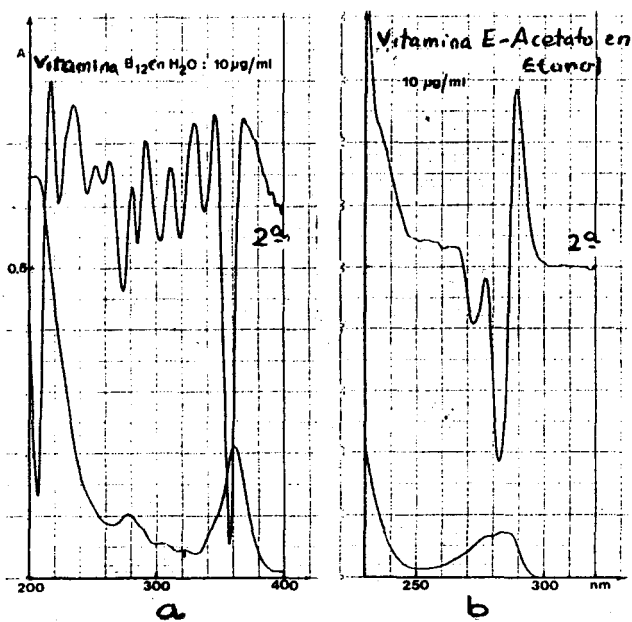


Fig. 12 Espectros de absorción y segundas derivadas de vitaminas***

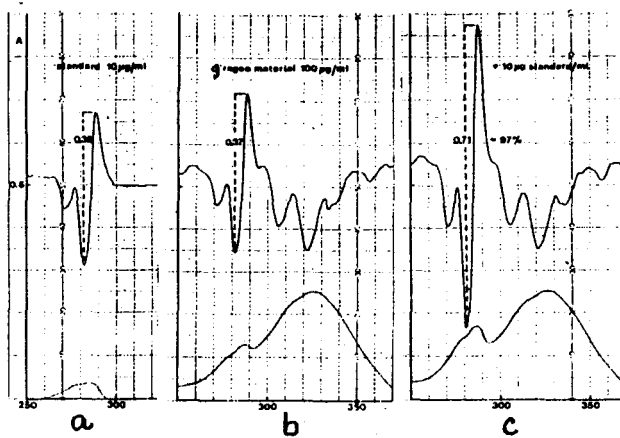


Fig. 13 Determinación del acetato de vitamina E en presencia de vitamina A en isopropanol***

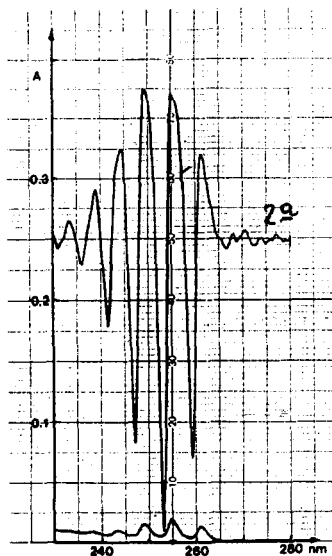


Fig. 14 Espectros y segunda derivada de benceno (10 ppm) en ciclohexano***

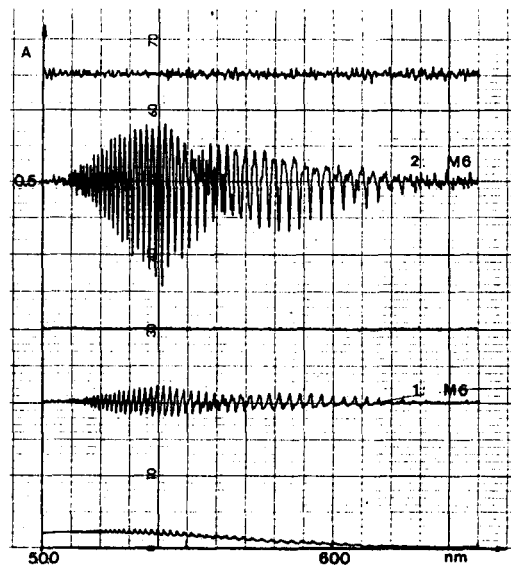


Fig. 15 Espectros normal, primera y segunda derivadas de yodo gaseoso***

de solvente) y el incremento de los efectos rotacionales y vibracionales. Se puede resolver esta estructura fina con la derivada. Se muestra ejemplos en las Figuras 15 - 17

f) **Determinación precisa de la longitud de onda máxima $\lambda_{\max}$**

Mientras que en un espectro de absorción, en especial con bandas anchas, la posición de $\lambda_{\max}$ puede ser determinada sólo aproximadamente, con la primera derivada la posición del máximo es determinada exactamente por la intersección de la curva con cero.

La lista de empleos y de ejemplos importantes es realmente larga. Lo que es común en todos los casos es que puede disiparse cualquier duda que existiese sobre un valor de longitud de onda máxima para un compuesto o para el diseño de una técnica de análisis en el caso de soluciones de composición compleja. En el futuro se detallará y profundizará más en el empleo de la derivada en espectroscopía UV-Vis.

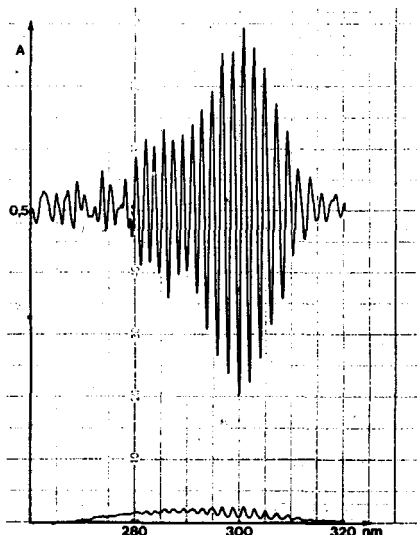


Fig. 16 Espectro normal y segunda derivada de dióxido de azufre***

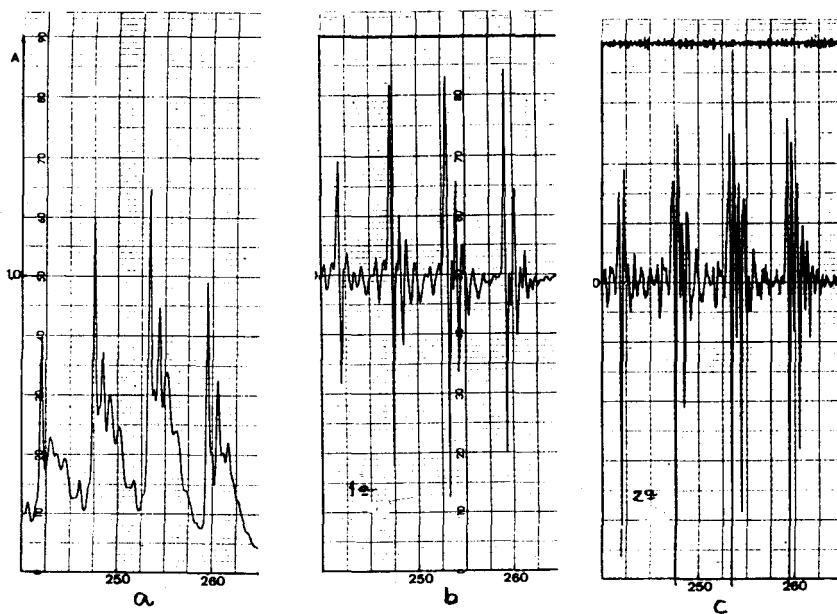


Fig. 17 Espectro normal, primera y segunda derivadas de benceno gaseoso***

REFERENCIAS

1. Cook, T.E., Santini, R.E., Pardue, H.L.; *Anal. Chem.* **49**, 871 (1977); Savitzky, A., Golay, M.J.E. *Ibid* **36**, 1627 (1964)
2. Operator's Manual UV-Vis Spectrophotometer Perkin-Elmer Modelo 552 242-A1-M202/11.78 West Germany 103 709.
3. Schmitt, A.; **Derivative Spectroscopy An Introduction with Practical Examples**, Bodenseewerd Perkin-Elmer 1651/1.77
4. Cahill, J., Padera, F.G.; **Applications Data Bulletin Derivative Spectroscopy Application and Theory**, Reprint Perkin-Elmer Nov. 1979 - April 1980.
5. Botten, D., Honkawa, T., Tohyama, S.; **Applications Data Bulletin Second Derivative Spectroscopy**, Reprint Perkin-Elmer.
6. Honkawa, T.; **Applications Data Bulletin Higher Order Derivative Spectrophotometry**, Reprint Perkin-Elmer.