



ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ

Departamento de Zootecnia

LZT5862 –Análise e Composição de Alimentos

Fundamentos de espectrofotometria para ensaios colorimétricos

Discentes: Ana Paula da Silva

Claudia Helena de Magalhães

Docente: Carla Maris Machado Bittar

Piracicaba - SP

2019

ESPECTROFOTOMETRIA

- São métodos que utilizam a radiação eletromagnética para medir as concentrações de substâncias químicas em solução.
- Uma vez que as substâncias absorvem ou emitem radiação eletromagnética (LUZ), podemos fazer uso desta propriedade (ABS ou emissão) para fazer análises (qualitativas ou quantitativas).

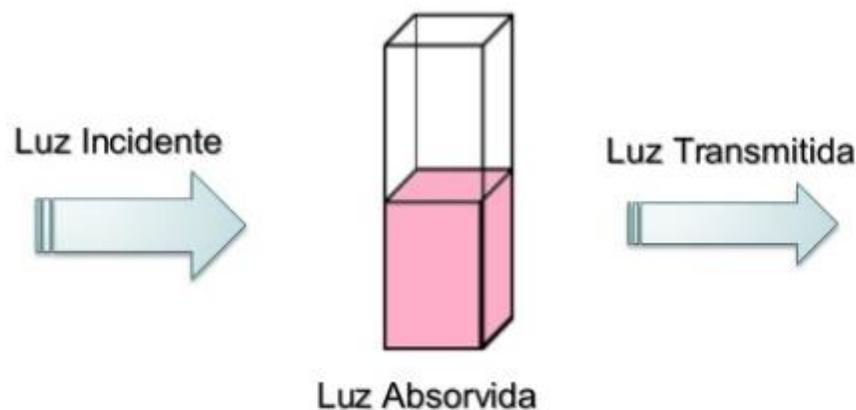


Figura 1 – Feixe de luz incidente e transmitido.

Reflexões
Absorção
Dispersão
Transmissão

Propriedades da Radiação Eletromagnética

**Características
Ondulatórias**

**Os fenômenos óticos:
refração, reflexão,
difração**

**Características
Corpusculares**

**Luz trafega na forma de
partículas (fótons)
 $E_{\text{fóton}} = 5,0 \times 10^{-19} \text{J}$**

Dualidade Partícula onda

Parâmetros de uma onda

- É a oscilação de um campo elétrico (E) e um campo magnético (B) se propagando perpendicularmente no espaço, que atravessam o espaço vazio a uma velocidade $3,00 \times 10^8$ m/s.

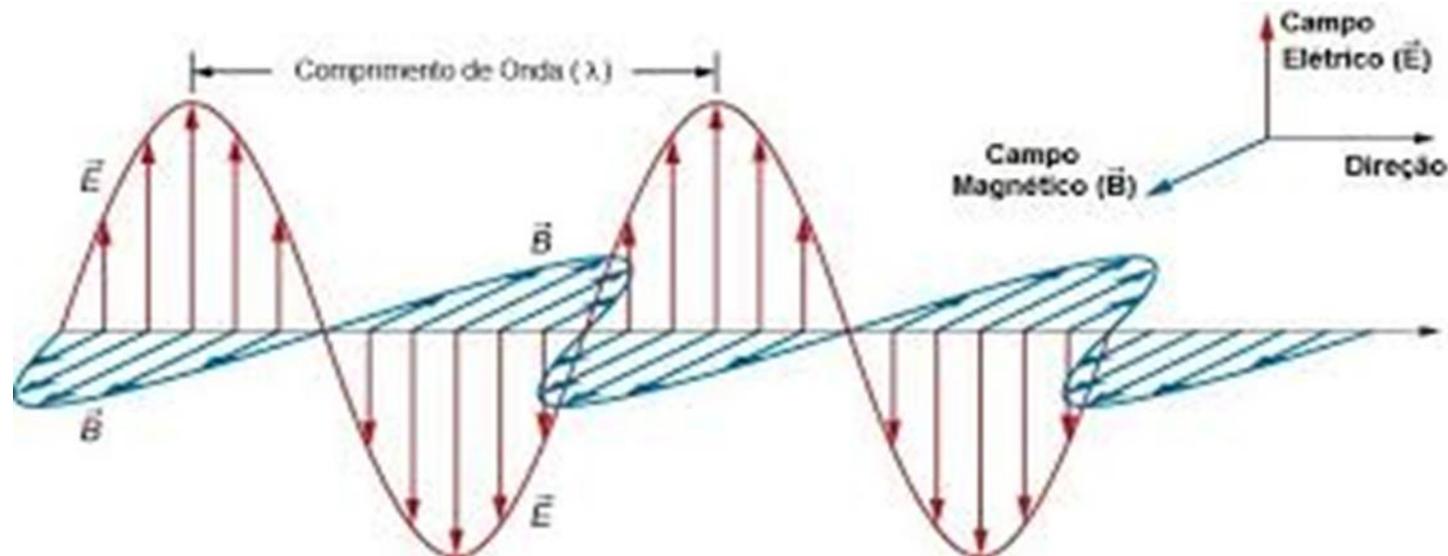
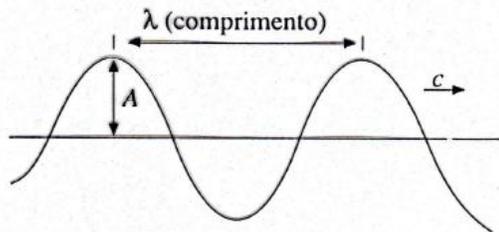


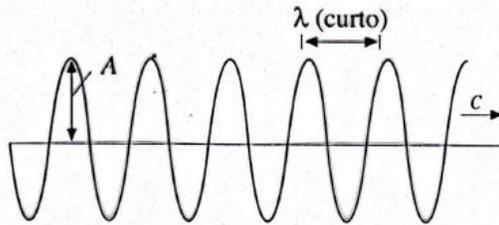
Figura 1 . Ilustração de uma onda eletromagnética plano-polarizada : E = campo elétrico; B = campo magnético. λ = comprimento de onda

Radiação eletromagnética

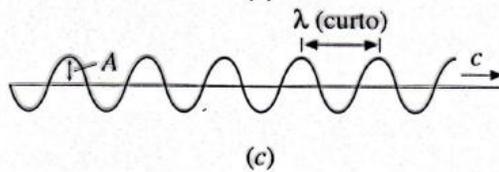
Grandezas importantes – Comprimento de onda (λ – lâmbda), frequência (ν), velocidade (v) e amplitude (A)



(a) Comprimento de onda, λ , longo e baixa frequência, ν .



(b) Comprimento de onda, λ , curto e alta frequência, ν .



(c) Mesmo comprimento de onda e mesma frequência do que em (b), mas baixa amplitude.

Figura 2: Ondas eletromagnéticas.

Unidade (λ) para várias regiões espectrais

Região	Unidade	Definição
Raio X	Angstrom \AA	10^{-10} m
Ultravioleta visível	Nanômetro, nm	10^{-9} m
Infravermelho	Micrometro μM	10^{-4} m

Unidade (ν): Hertz (Hz) ou ciclo/s

Unidade (v): m/s ou Km/ s

Radiação como partículas

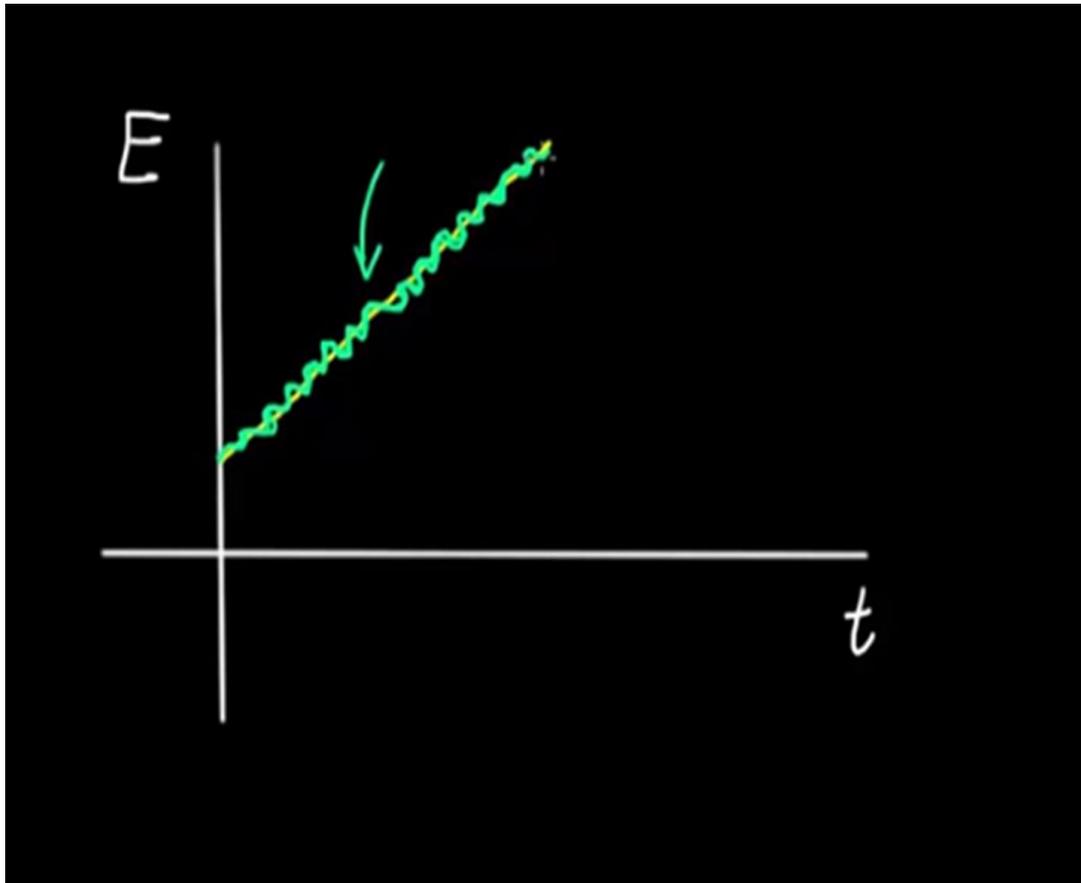


Fig. 3 - Energia de um feixe luminoso em função do tempo

**Partículas portadoras de energia
chamada fótons**

**A intensidade de um feixe de
radiação é proporcional ao
número de fótons**

Relações entre Energia (E), Frequência (ν) e comprimento de onda (λ)

$$E = h \cdot \nu \quad \text{em que, } h = 6,626 \times 10^{-34} \text{ j.s (constante de Planck).}$$

$$c = \lambda \cdot \nu \quad \text{em que, } c = 2,998 \times 10^8 \text{ m/s (velocidade da luz no vácuo)}$$

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

Energia Alta, Frequência (ν) alta e λ pequeno

Energia Baixa, Frequência (ν) baixa e λ grande

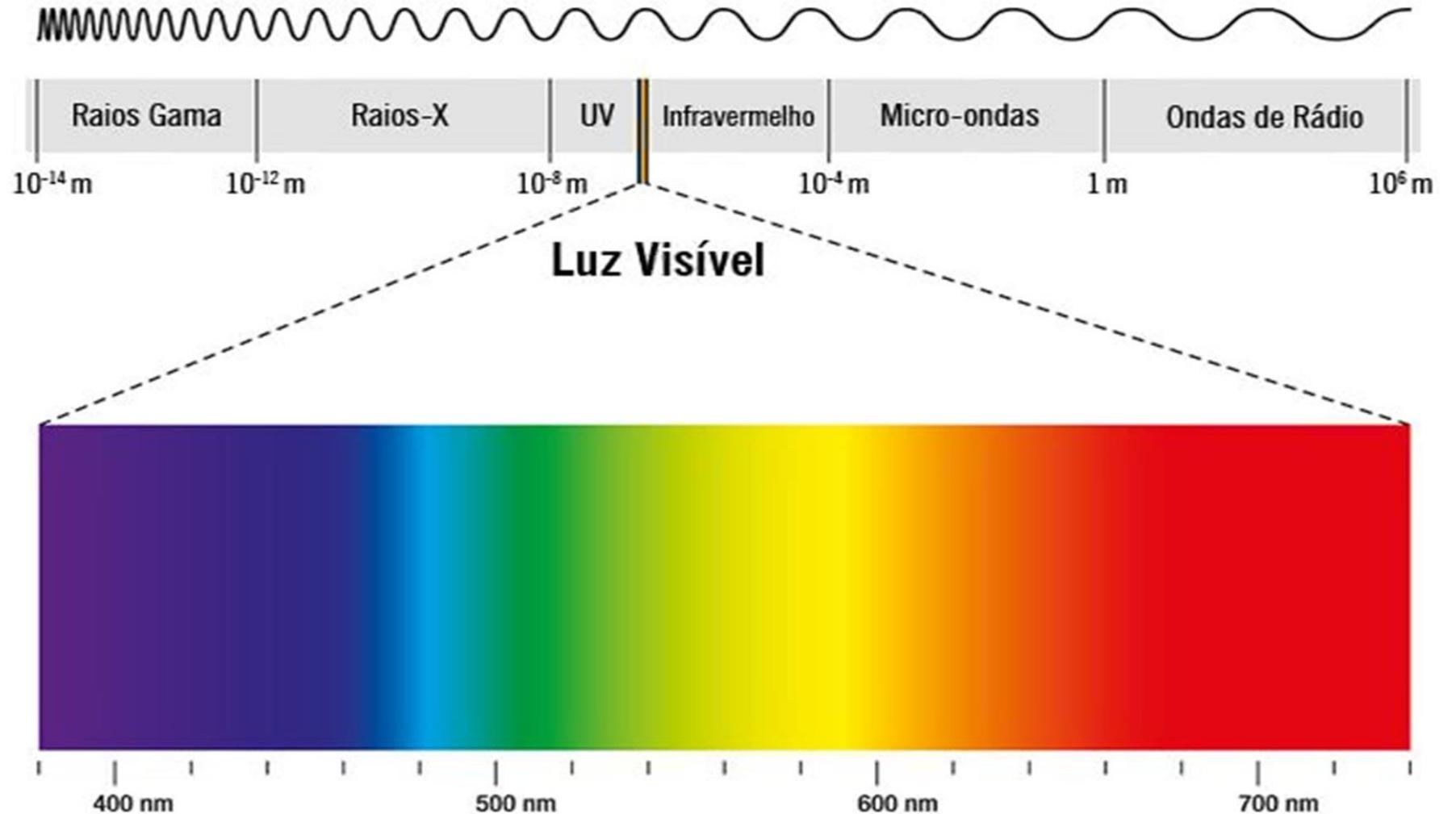
Planck – determinou a mínima quantidade de energia que um fóton pode transportar.

O espectro eletromagnético

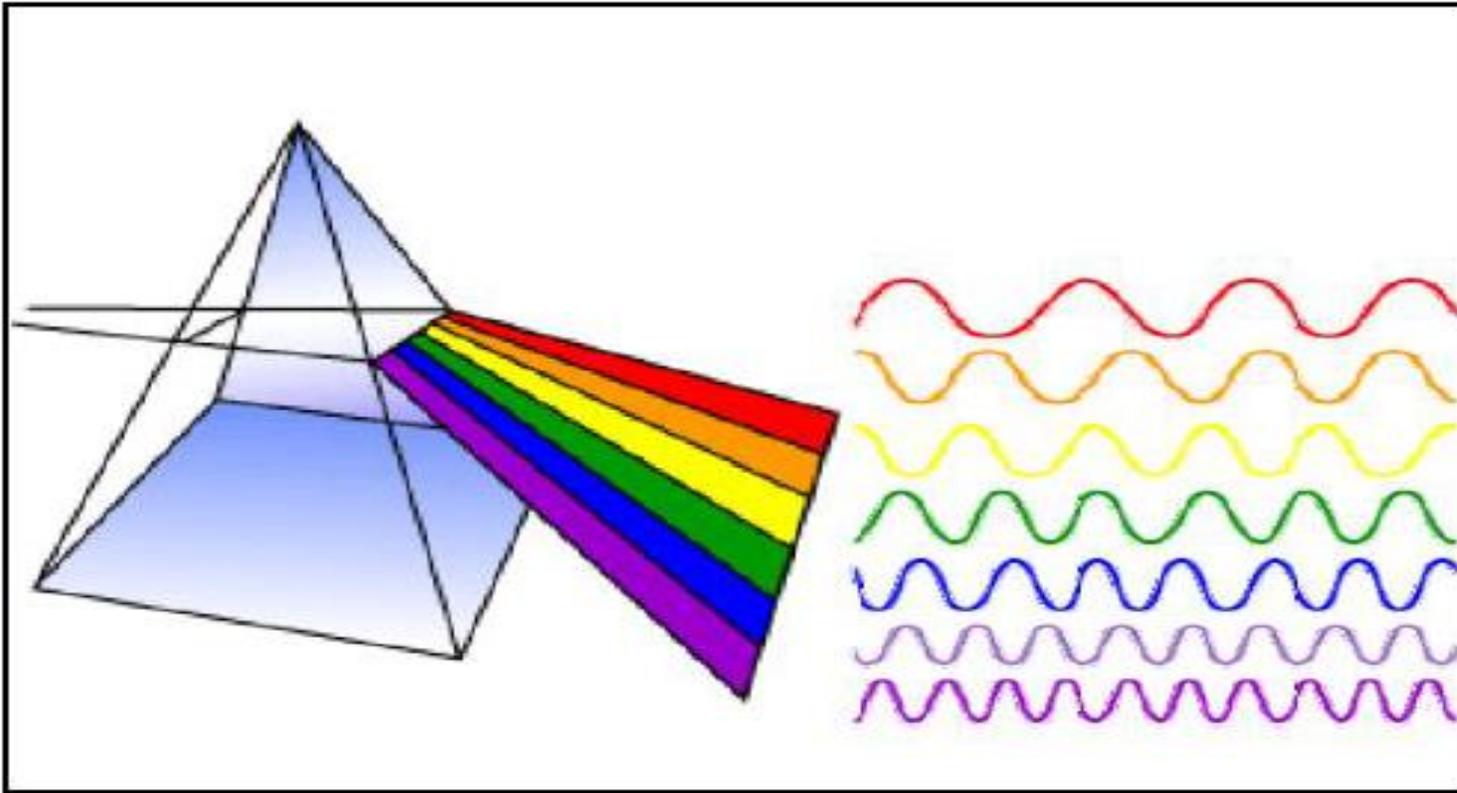
λ (comprimento de onda)

UV – 10 - 380 nm

Visível – 380 -750 nm



Setores de comprimento de onda



$$n = \frac{c}{v} = \frac{C}{\lambda \nu}$$

Absorção da Energia

- Quando um feixe atravessa uma camada de sólido, líquido e gás a energia é transferida aos átomos, moléculas ou íons presentes na amostra.



Menor λ maior E , maior alteração

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

Consequências da absorção da radiação

- Depende da quantidade de energia absorvida e do comprimento de onda

Radiações

Alterações

Raios γ

Promovem alterações no núcleo dos átomos

micro-ondas

Alteram somente o estado rotacional das moléculas.

UV-Vis

Rotações , vibrações ,
transições eletrônicas

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

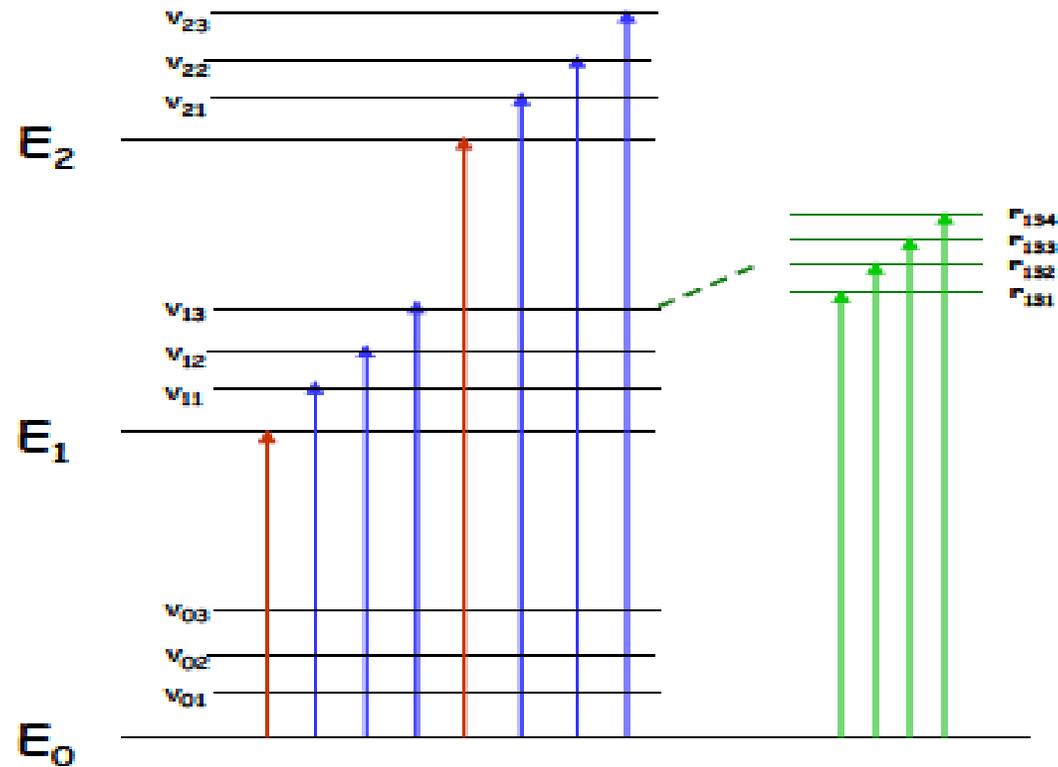


Figura 3. Diagrama de níveis de energia para uma molécula. Os níveis E_0 , E_1 e E_2 referem-se a três níveis eletrônicos, cada um deles com três níveis vibracionais (e.g. v_{01} a v_{03} para o nível E_0); os níveis rotacionais r_{131} a r_{134} estão associados ao nível vibracional v_{13} . São mostradas apenas as transições eletrônicas a partir do estado fundamental (E_0). Na prática, os níveis de energia não são equidistantes.

“Sempre que uma solução for colorida seu λ estará entre 400 e 700 nm”

λ / nm	absorvida ↓ cor	transmitida ↓ cor complementar
380-420	violeta	verde-amarelo
420-440	violeta-azul	amarelo
440-470	azul	laranja
470-500	azul-verde	vermelho
500-520	verde	púrpura
520-550	verde-amarelo	violeta
550-580	amarelo	violeta-azul
580-620	laranja	azul
620-680	vermelho	azul-verde
680-780	púrpura	verde

Comprimento de onda de Absorção máxima de compostos com ligações simples, duplas isoladas e duplas conjugadas.

Composto	Comprimento de onda de absorção máxima (λ)
$\text{CH}_2=\text{CH}_2$	162nm
$\text{CH}\equiv\text{CH}$	177nm
$\text{CH}\equiv\text{N}$	175nm
$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{O}$	187nm
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$	217nm
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$	258nm
Retinol (5 ligações duplas conjugadas)	360nm
Licopeno (com 14 ligações duplas conjugadas)	470nm

Espécies orgânicas com dupla e tripla ligação absorvem na região do ultravioleta

ESPECTROFOTOMETRIA

Espectroscopia: radiação eletromagnética

Espectrometria: É a medida de tais radiações

É o tipo de espectrometria que mede as intensidades das radiações emitidas ou absorvidas pelos sistemas em análise

Princípio básico: cada composto absorve ou transmite luz em uma certa amplitude de comprimento de onda

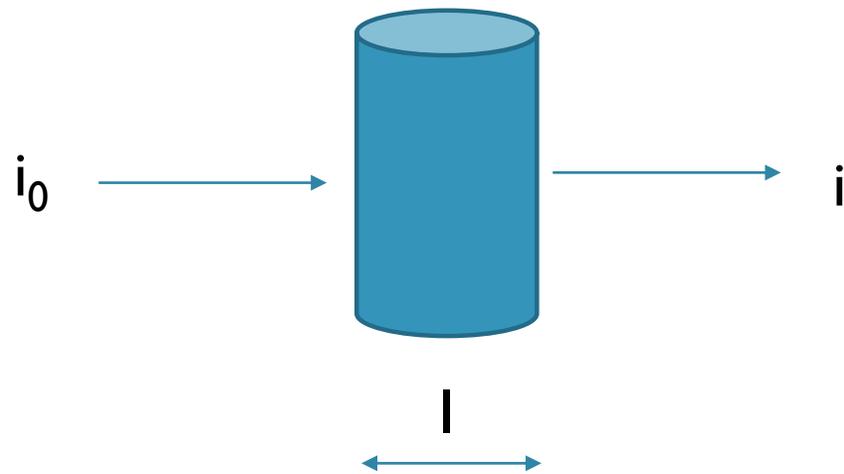
Aplicação: áreas química, física, biologia, bioquímica

ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISÍVEL

- Absorção de luz pelas soluções (ultravioleta – até região visível)

CORES	INTERVALOS DE COMPRIMENTO DE ONDA (nm)
Ultravioleta (não visível)	<380
Violeta	380 a 450
Azul	450 a 500
Verde	500 a 570
Amarela	570 a 590
Alaranjada	590 a 620
Vermelha	620 a 750
Infravermelha curta	750 a 2000

ABSORÇÃO DE LUZ

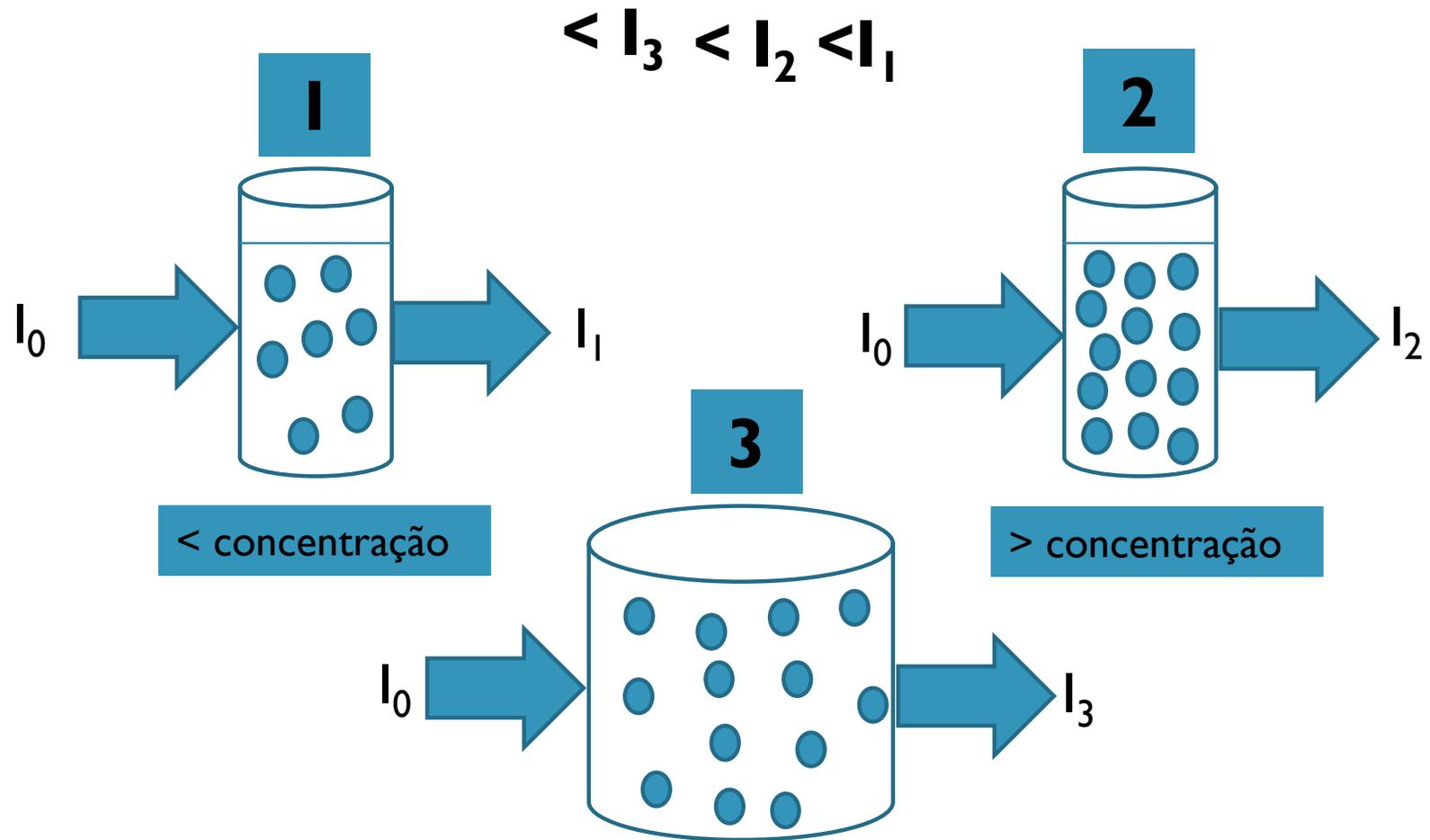


i_0 = Feixe de luz incidente

i = Feixe de luz de transmitido

l = Espessura da solução ou caminho ótico

ABSORÇÃO DE LUZ

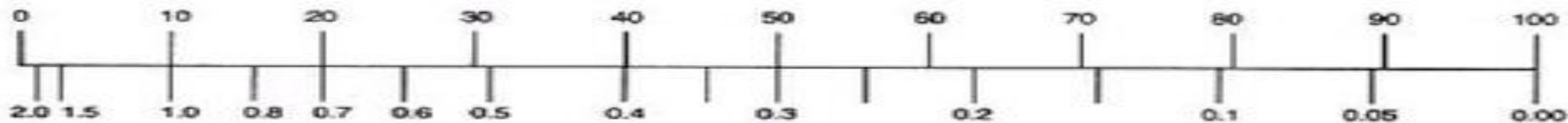


Transmitância

- capacidade de **transmitir a luz**

$$T\% = I_1/I_0 \times 100$$

Transmitância (%)



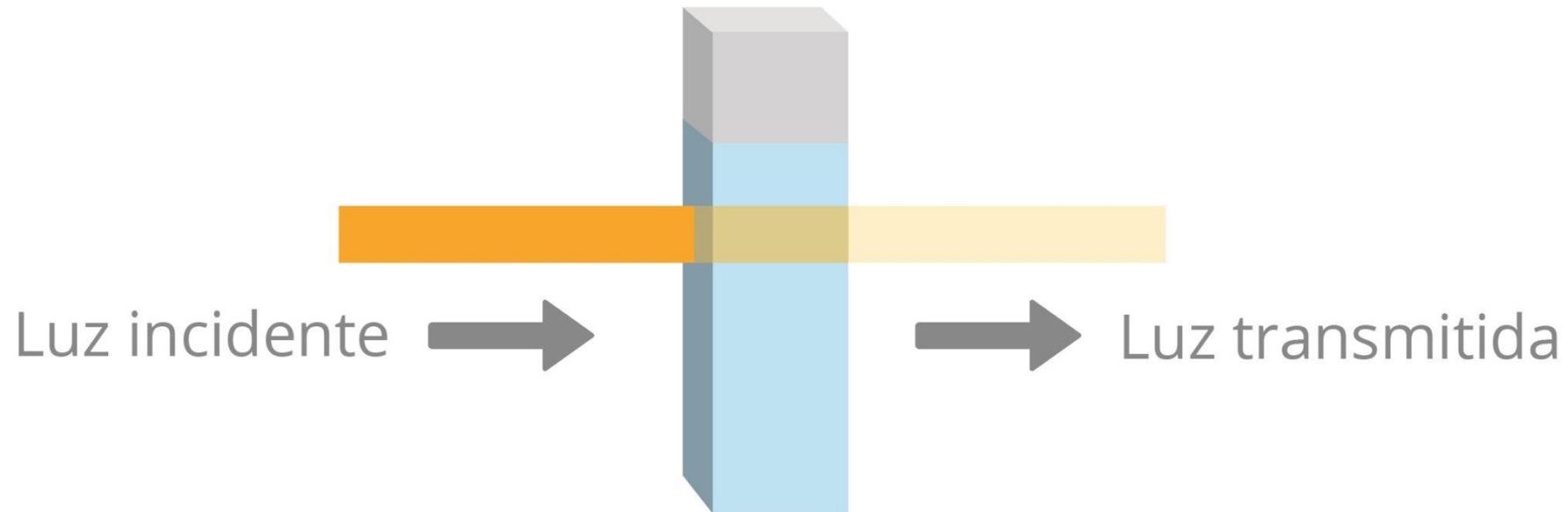
Absorbância

Absorbância

- capacidade de **absorver a luz**

$$A = -\log_{10} T = -\log_{10}(I_1/I_0)$$

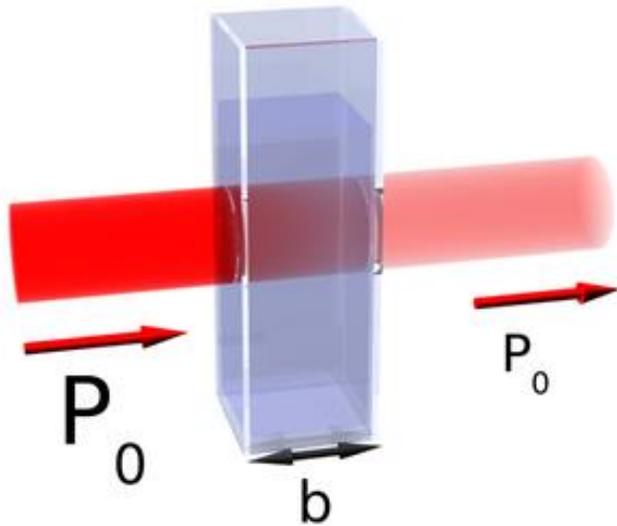
TRANSMITÂNCIA E ABSORBÂNCIA TENDEM A SER COMPLEMENTARES



LEI DE LAMBERT-BEER

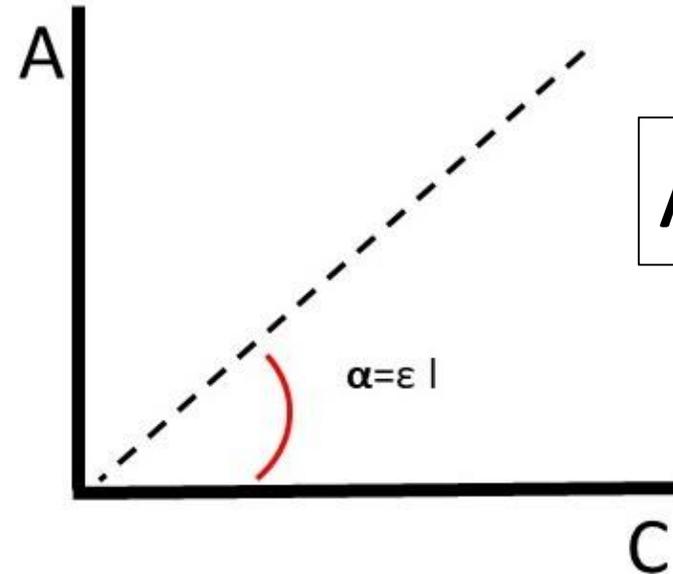
Lambert (1728-1777): observou que a intensidade da luz transmitida por um meio absorvedor era proporcional á espessura do meio pela qual a luz passava

Beer (1825-1863): Observou que a intensidade da luz transmitida por um meio absorvedor era proporcional á concentração da espécie absorvedora



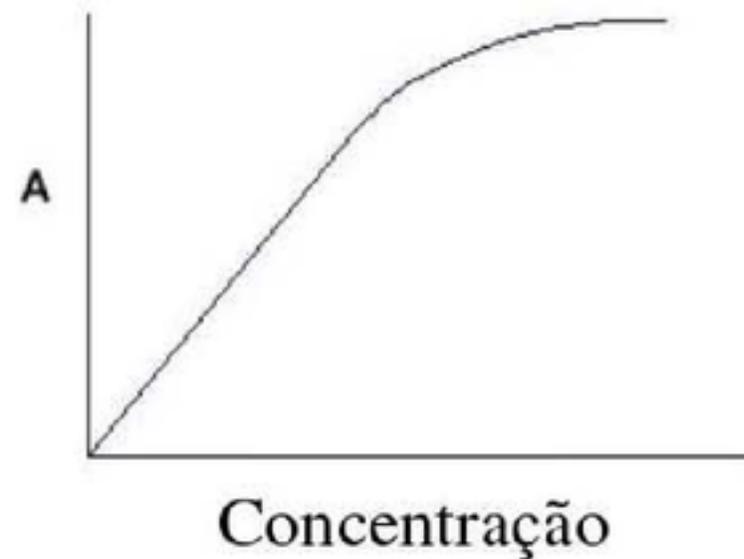
$$A = \epsilon l c$$

A=absorbância
 ϵ = coeficiente de absorção
l= distancia percorrida pela luz
C= concentração



DESVIOS DA LEI DE LAMBERT-BEER

- lei de Lambert-Beer válida para condições restritas:
- Radiações **monocromáticas**
- Para **soluções diluídas** ($\leq 0,01 \text{ mol L}^{-1}$).
- Não ter mais de uma substância absorvente de luz na mesma substância.

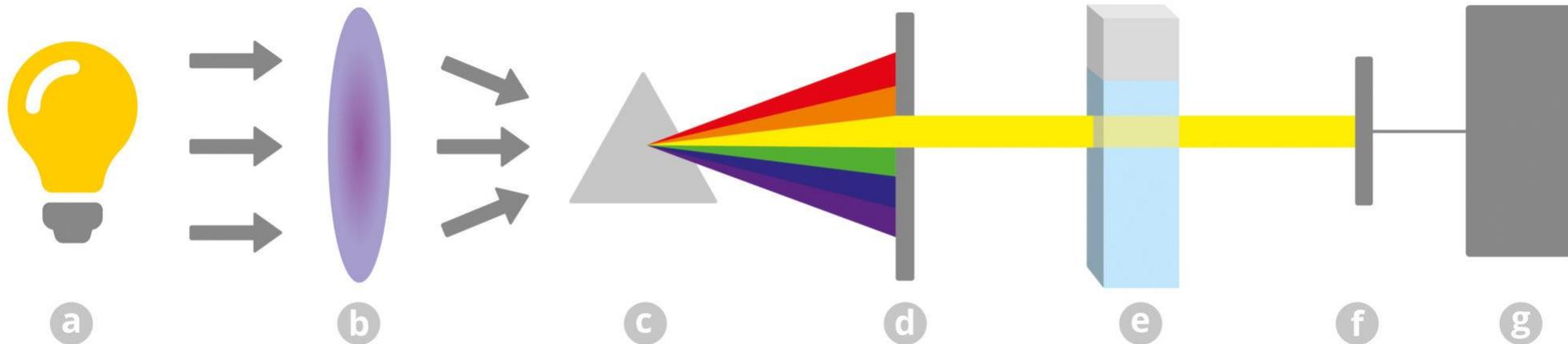


ESPECTROFOTÔMETRO

- Mede a quantidade de fótons absorvida depois de passar pela amostra.

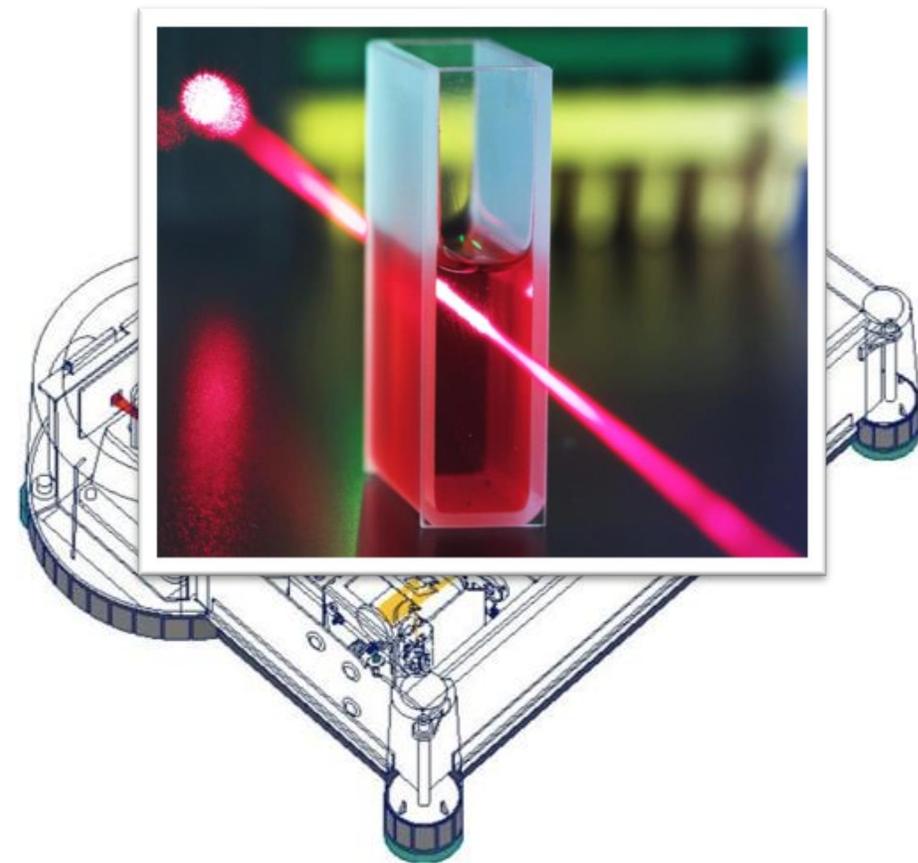
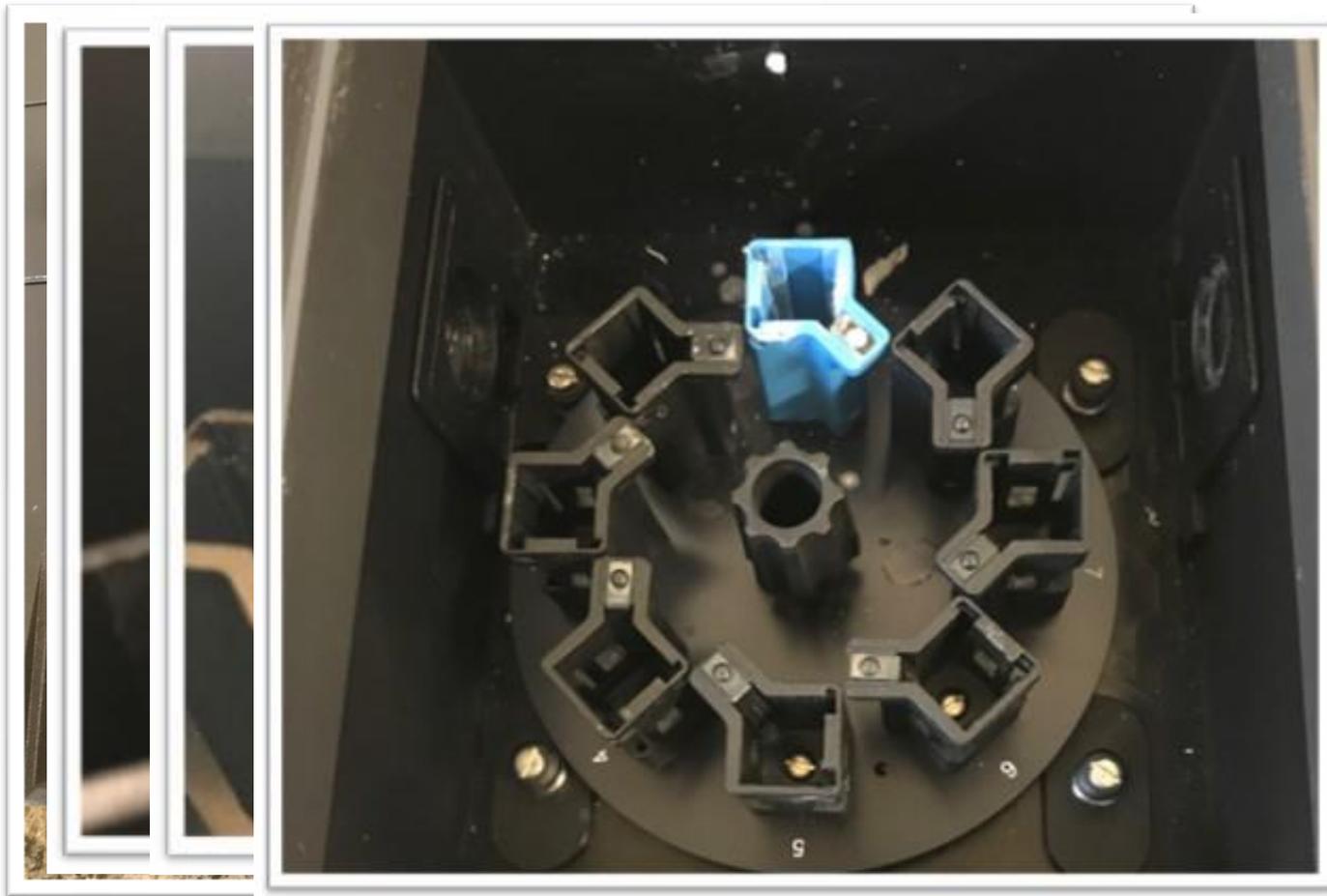


COMPONENTES DO ESPECTROFOTÔMETRO



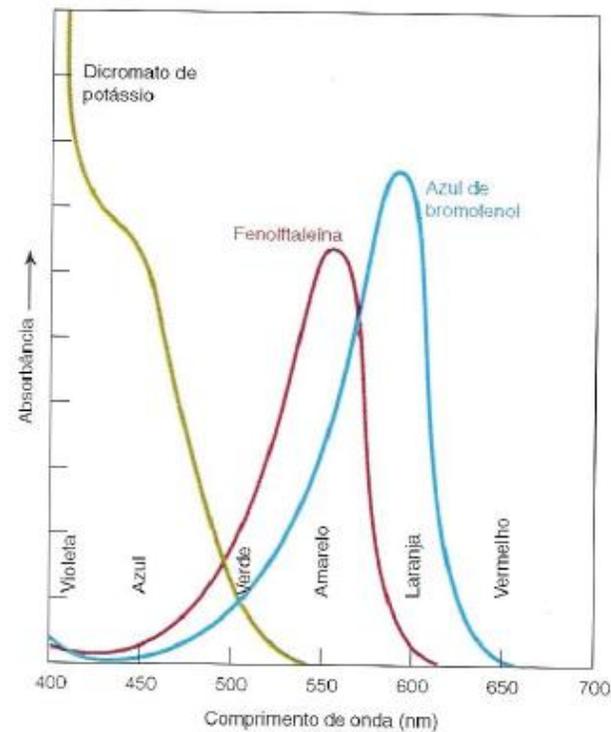
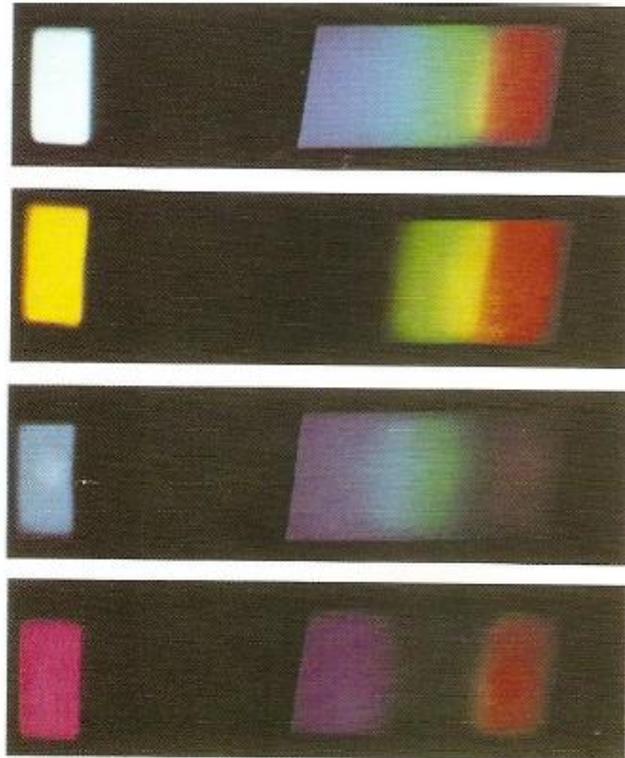
- a- Lâmpada
- b - Colimador
- c - Prisma ou rede de difração
- d - Fenda seletora
- e - Cubeta
- f - Detector
- g - Leitor

ESPECTROFOTÔMETRO



ESPECTRO DE ABSORÇÃO

- é um gráfico mostrando como absorbância ou a absortividade molar variam com o comprimento de onda

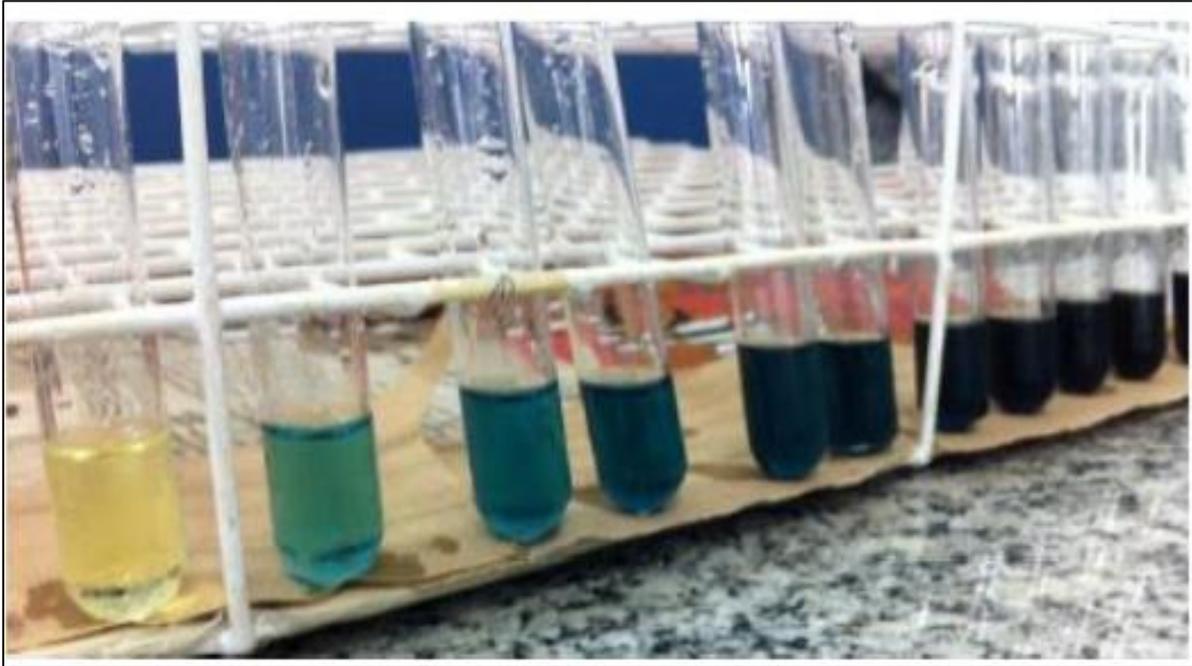


PRINCIPAIS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE CHOs

Método	Princípios	Vantagens	Desvantagens
Antrona	Colorimetria (hidrólise com oxalato de amônio, reação com antrona e posterior medição de absorvância em espectrofotômetro)	<ul style="list-style-type: none">• É específica para determinar açúcares• Baixo custo• É um método preciso	<ul style="list-style-type: none">• É uma análise muito sensível• Pode conter interferentes que alteram a absorvância afetando o resultado• Análise laboriosa, várias etapas• Não permite identificar e quantificar os CHOs individualmente
Fenol com extração em etanol 80%	Colorimetria (reação com fenol e ac. Sulfúrico e posterior medição de absorvância em espectrofotômetro)	<ul style="list-style-type: none">• Especifica para determinar açúcares• Baixo custo• Método preciso• Dispensa hidrólise da amostra, pois utiliza ac. Sulfúrico concentrado.	<ul style="list-style-type: none">• É uma análise muito sensível• Pode conter interferentes que alteram a absorvância afetando o resultado• Fenol é cancerígeno• Não permite identificar e quantificar os CHOs individualmente

Adaptado Dubois et al., 1956; Deriaz ,1961.

PRINCIPAIS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE CHOs



Antrona



Fenol com extração em etanol 80%

Comparação entre técnicas para determinação de açúcares solúveis em alimentos utilizados na nutrição de ruminantes

Comparison of techniques for determination of soluble sugars used in feed for ruminant nutrition

Cândida Camila dos Reis^{1*}; Douglas Sampaio Henrique²; Edimara Schervinski³; Juliano Zanela⁴; Leonel Vinicius Constantino⁵; Rafael Dallo⁶

Tabela 1. Composição bromatológica e concentração dos carboidratos solúveis da cana-de-açúcar, capim estrela, milho moído e farelo de soja.

Composição*	Cana-de-açúcar	Capim estrela	Milho moído	Farelo de soja
MS	913,2	905,2	877,0	908,3
PB	36,16	143,47	90,03	487,96
EE	15,5	11,6	45,6	18,5
MM	43,4	79,3	22,1	75,9
CT	904,9	770,8	842,3	417,6
CHOs _(antrona)	228,17	11,70	22,91	113,40
CHOs _(fenol)	216,52	19,38	27,35	116,80

* Valores expressos em g kg⁻¹

MS Matéria Seca; PB Proteína Bruta; EE Extrato Etéreo; MM Matéria Mineral; CT Carboidratos Totais; CHOs_(antrona) Carboidratos Solúveis determinados pela técnica da antrona; CHOs_(fenol) Carboidratos Solúveis determinados pela técnica do fenol.

Fonte: Elaboração dos autores.

PRINCIPAIS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE CHOS

Método	Princípios	Vantagens	Desvantagens
Fenol com extração em água	Colorimetria (hidrólise reação com fenol e ac. sulfúrico e posterior e medição de absorbância em espectrofotômetro)	<ul style="list-style-type: none">• É específica para determinar açúcares• Baixo custo (não utiliza etanol para extração)• Maior bem-estar ao laboratório, visto que não vai inalar álcool proveniente da extração, quando se volatiliza durante o banho maria• Dispensa hidrólise da amostra, pois utiliza ac. sulfúrico concentrado, assim a metodologia tem menos etapas	<ul style="list-style-type: none">• É uma análise muito sensível• Pode conter interferentes que alteram a absorbância afetando o resultado• Fenol é cancerígeno• Não permite identificar e quantificar os CHOs individualmente



Ana Paula da Silva

annaps@usp.br

Claudia Helena de Magalhães

claudia.magalhaes@ifmg.edu.br

Obrigada pela atenção