

Análise Instrumental



Profa. Talita M. Lacerda

- Departamento de Biotecnologia
- Escola de Engenharia de Lorena
- Universidade de São Paulo
- talitalacerda@usp.br
- 29 de novembro de 2021



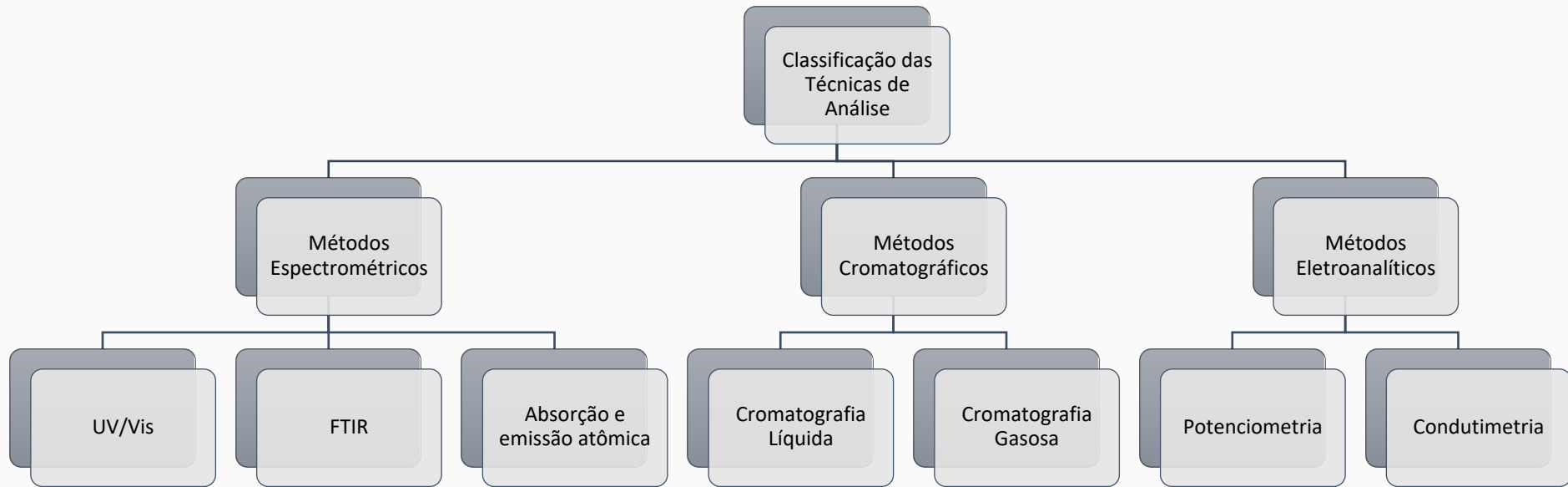
Estudos de Casos



Data	Atividade	Data	Atividade
13/09	Introdução/Apresentação dos casos	29/11	Aula teórica – Absorção e emissão atômica
20/09	CASOS I e II	06/12	CASOS VI, VII e VIII Entrega das soluções dos casos IV e V
27/09	CASOS I e II	13/12	CASOS VI, VII e VIII
04/10	Aula teórica - UV/Vis	20/12	Aula teórica – Cromatografia
18/10	CASO III Entrega das soluções dos casos I e II	03/01	CASOS IX e X Entrega das soluções dos casos VI, VII e VIII
25/10	Aula teórica – FTIR	10/01	Aula teórica - Eletroanalítica
08/11	CASOS IV e V Entrega das soluções do caso III	14/01	Entrega das soluções dos casos IX e X Preenchimento do formulário (auto-avaliação)
22/11	CASOS IV e V	17/01	Inserção de notas e frequências no Sistema JupiterWeb



Técnicas de Análise





Espectroscopia atômica

Baseada em medidas da luz absorvida ou emitida por **elementos** de uma amostra

- 1 - Espectroscopia de absorção atômica (AAS)
- 2 - Espectroscopia de emissão atômica (AES ou OES)

- Nos dois métodos há a necessidade de atomização da amostra.
- Esta é uma etapa de grande importância para a qualidade do método.
- Trata-se, portanto, de técnica que tem como objetivo a determinação da composição elementar de um analito.



Espectroscopia atômica

Baseada em medidas da luz absorvida ou emitida por **elementos** de uma amostra

Determinação de elementos inorgânicos em diversos tipos de amostras (análises qualitativas e quantitativas)

Análises clínicas: sangue, urina, cabelo...

Análises forenses: Pb (projéteis), elementos tóxicos (envenenamentos)...

Amostras ambientais: águas, solos, rochas, sedimentos, ar atmosférico...

Materiais metalúrgicos: ligas (pureza ou presença de contaminantes)...

Alimentos naturais e/ou processados...

Medicamentos...

Cosméticos...





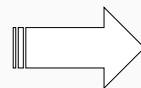
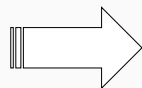
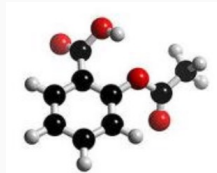
<https://www.youtube.com/watch?v=crWBFuUW6kI>



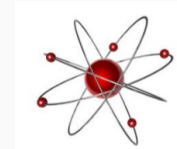
Introdução

- ✓ Substância que está sendo analisada é decomposta em átomos por meio de uma **chama**, um **forno** ou um **plasma**
- ✓ Quantidade de cada elemento: determinada pela *absorção ou emissão de radiação visível ou ultravioleta (UV-Vis)* pelos **átomos no estado gasoso**

AMOSTRA



ÁTOMOS





Introdução

- ✓ **Átomos gasosos no estado fundamental** absorvem **energia radiante** em comprimentos de onda específicos e que são capazes de promover a **excitação de elétrons da camada de valência**

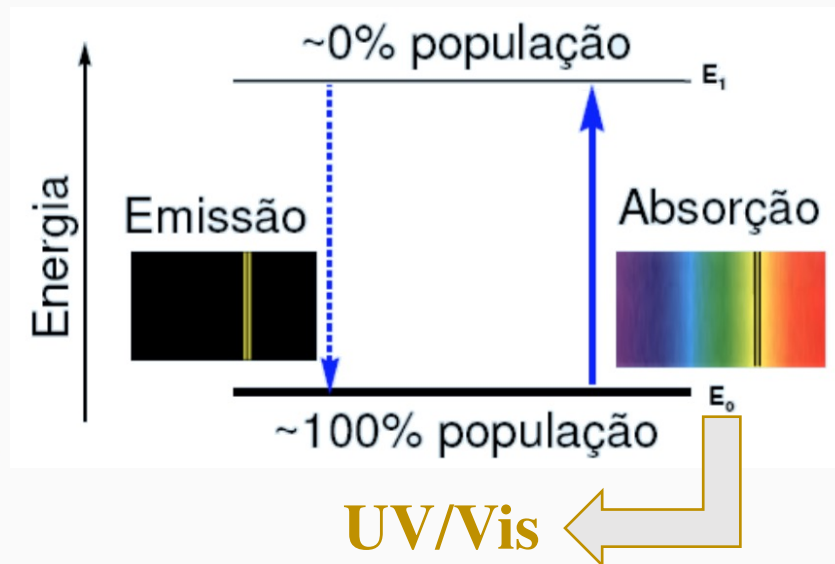
$$\Delta E = E_1 - E_0 = hc/\lambda$$

h= constante de Planck

c= velocidade da luz no vácuo

λ = comprimento de onda
(*característico dos elementos*)

ΔE é inversamente proporcional ao λ





Introdução

Teste de chama





Introdução



Pavio – Combustão – Energia para excitação eletrônica

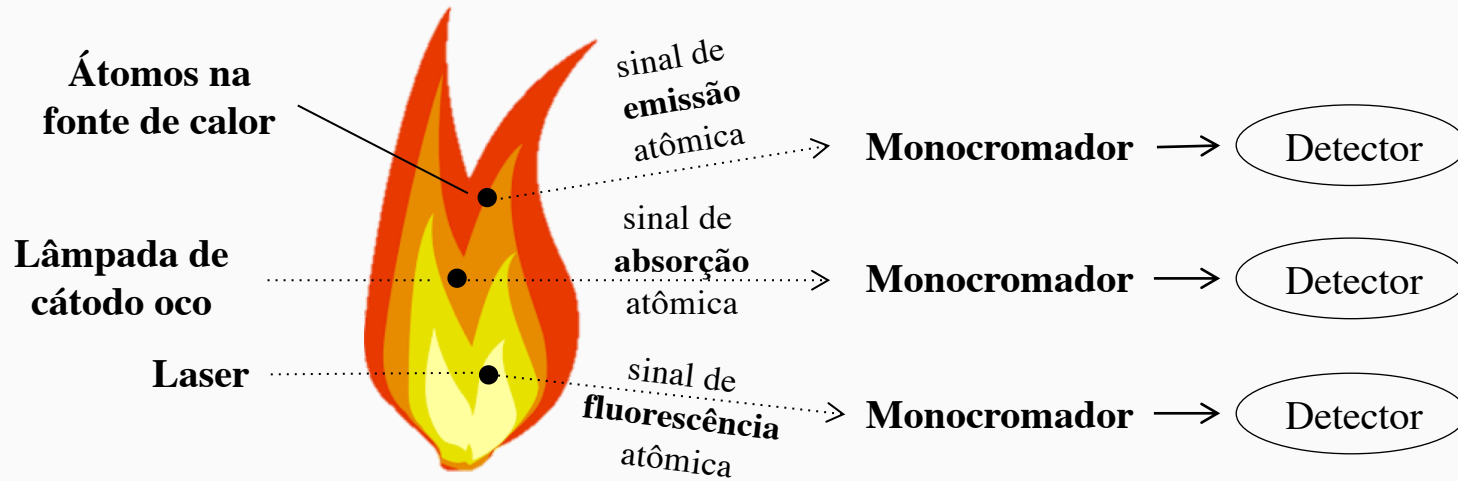
- Retorno ao estado fundamental com emissão de energia radiante (fóton) de comprimento de onda específico

Exemplos.

- Oxalato de estrôncio (SrC_2O_4) ou nitrato de estrôncio ($(\text{Sr}(\text{NO}_3)_2)$): íons $\text{Sr}^{2+} \rightarrow$ cor **vermelha**;
- Cloreto ou nitrato de cobre (CuCl_2 e $\text{NH}_4\text{Cu}(\text{NO}_3)_3$), íons $\text{Cu}^{2+} \rightarrow$ cor **verde** ou **azul**.



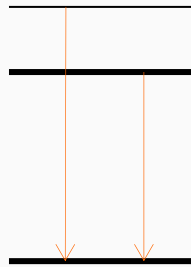
Visão geral da técnica





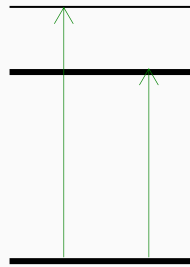
Visão geral da técnica

Emissão



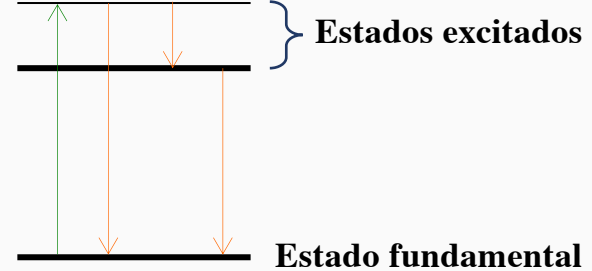
Colisões no **plasma** promovem átomos a estados eletrônicos excitados (emissão ao retornar ao estado fundamental)

Absorção



Amostra líquida aspirada para dentro de uma **chama a 2000-3000 K**; líquido **evapora** e **sólido é atomizado** na chama

Fluorescência

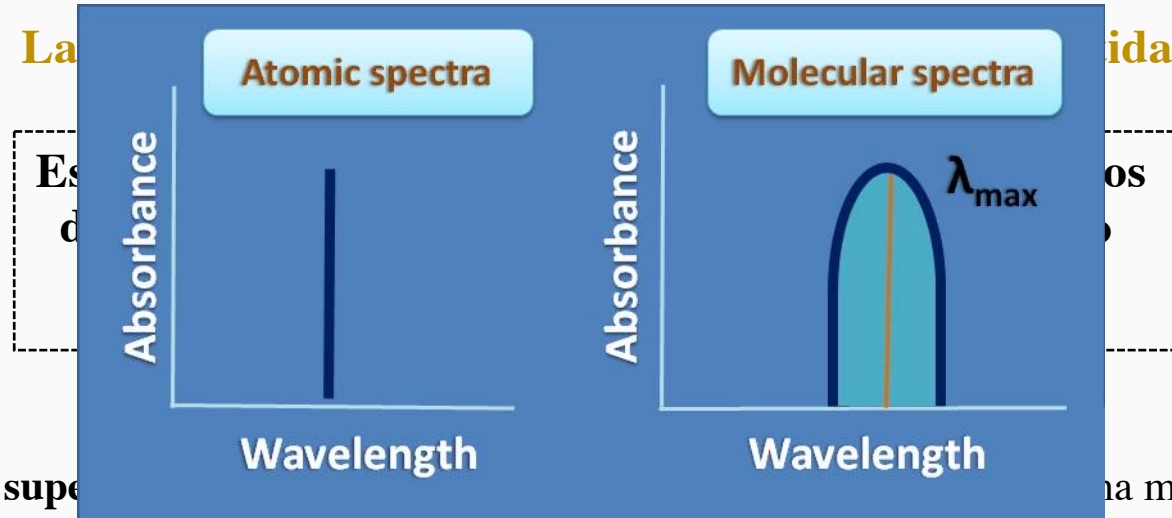


Átomos da chama são irradiados com um **laser**, são promovidos a um **estado excitado** e podem **fluorescer** ao retornar ao estado fundamental



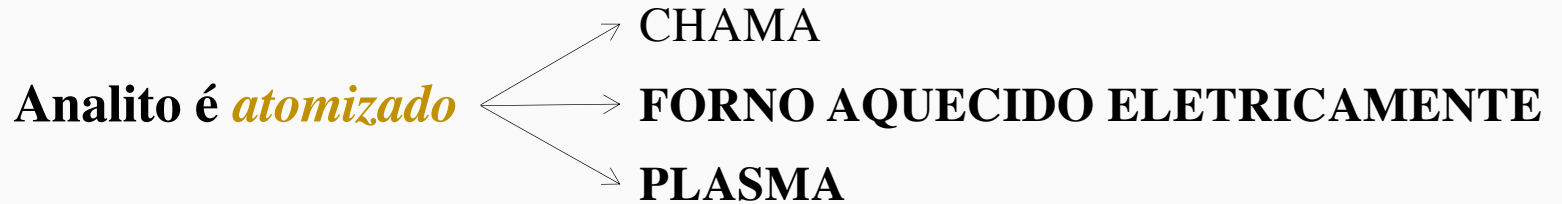
Visão geral da técnica

Absorção atômica vs. Absorção molecular





Sistemas de atomização

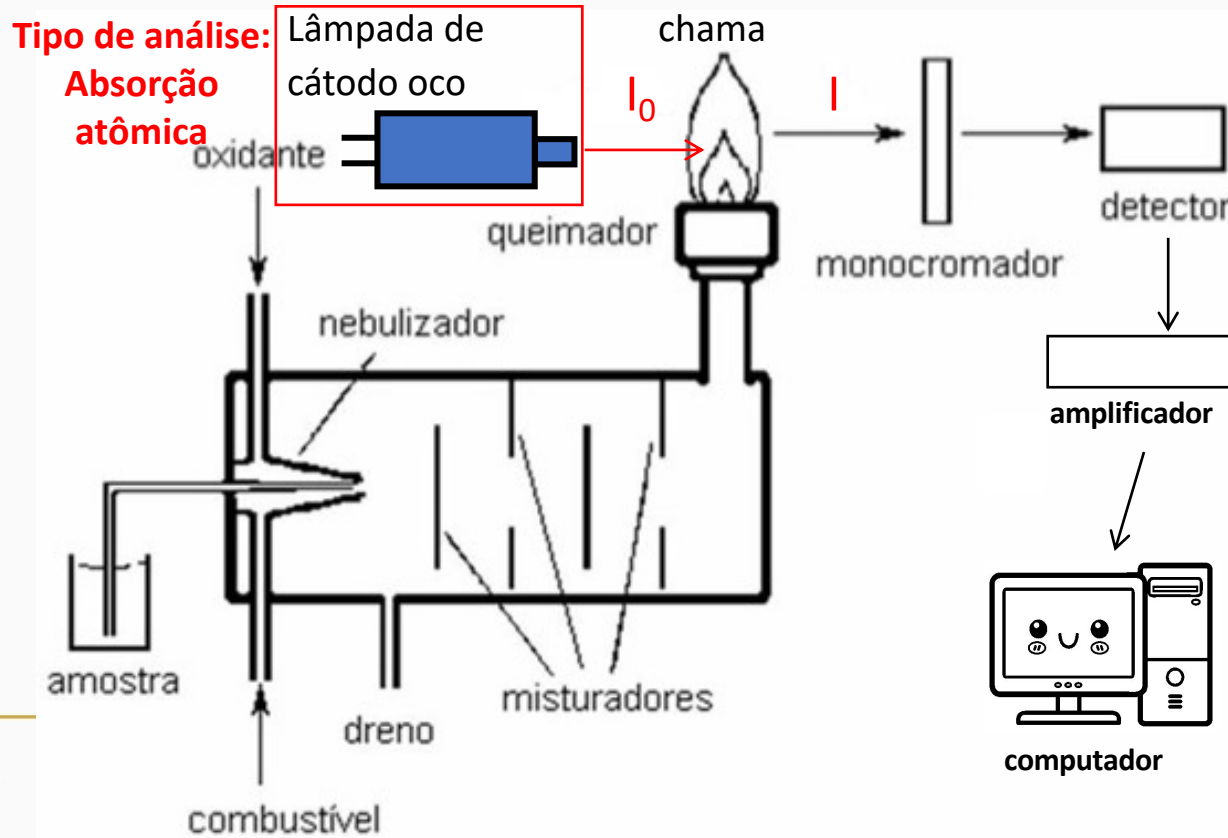


- ✓ **Atomizador de chamas:** comum em equipamentos mais antigos
- ✓ Chamas emitem luz: **intensidade deve ser subtraída do sinal total para se obter o valor correspondente ao sinal do analito**





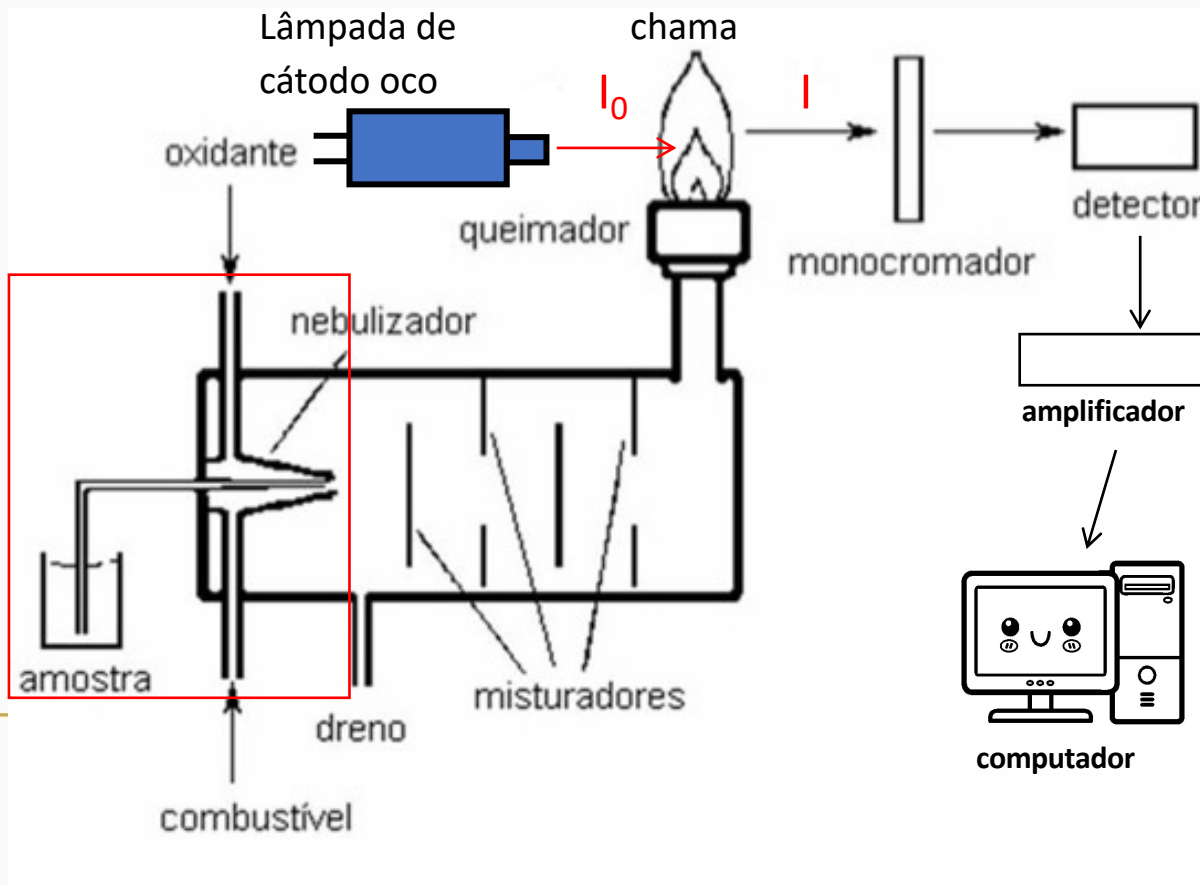
Chama





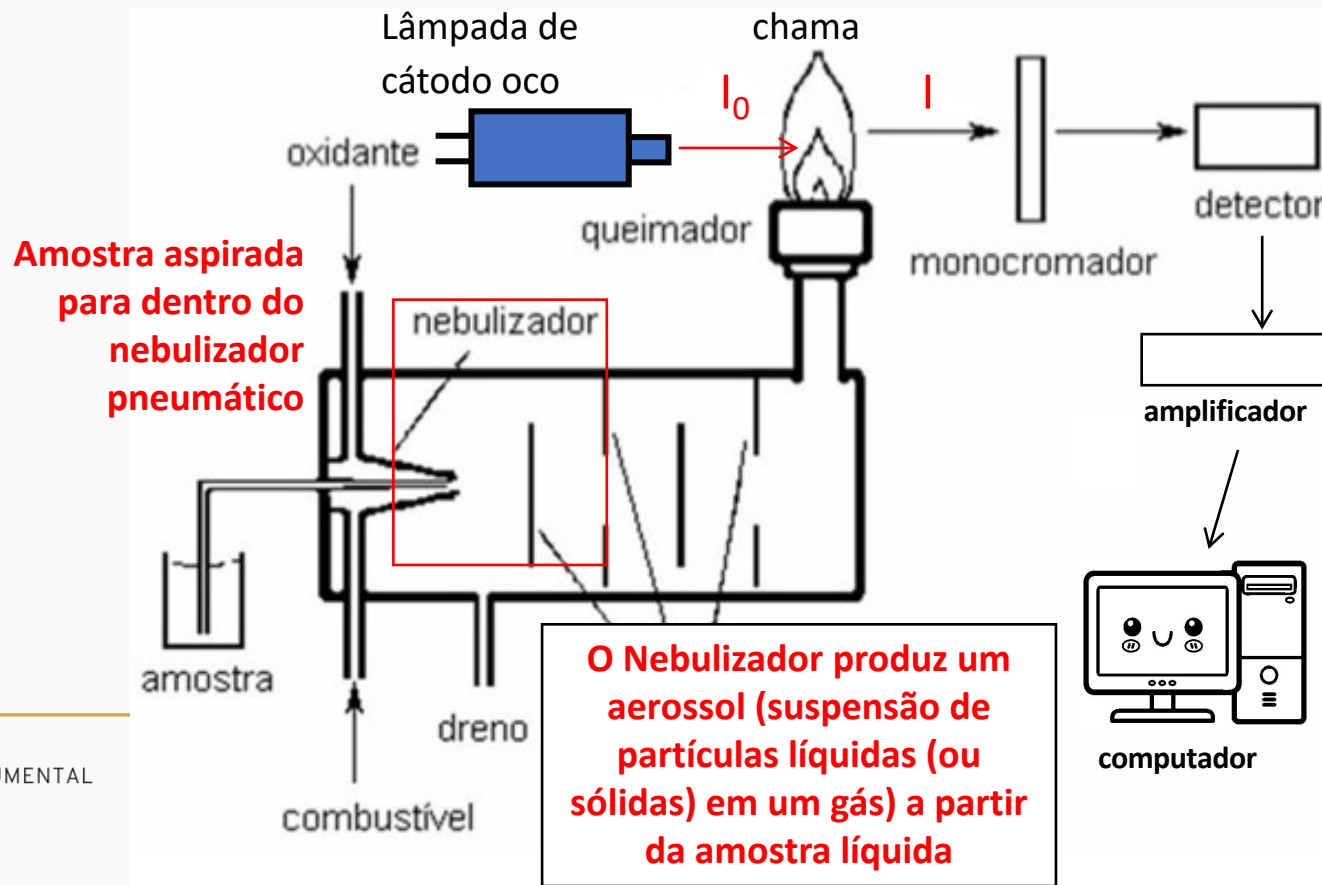
Chama

Queimador por
mistura prévia



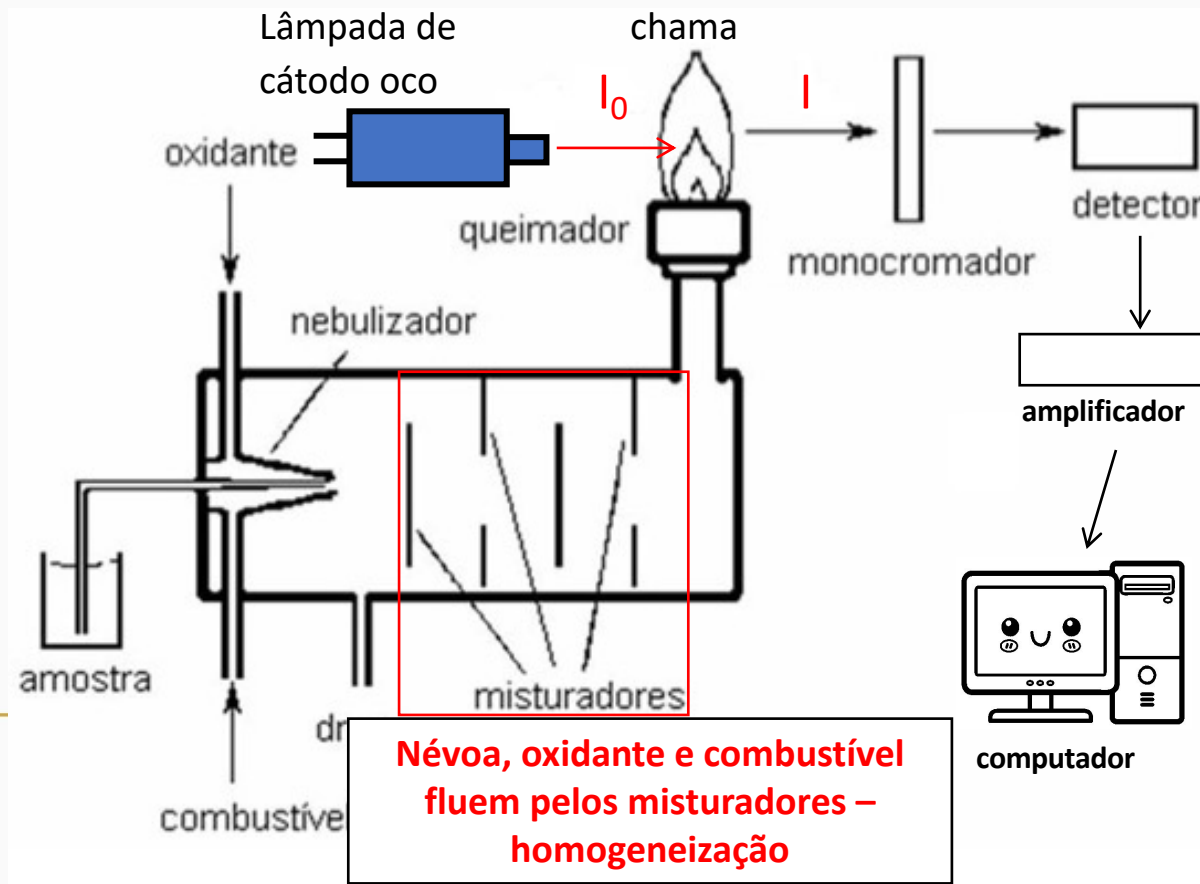


Chama



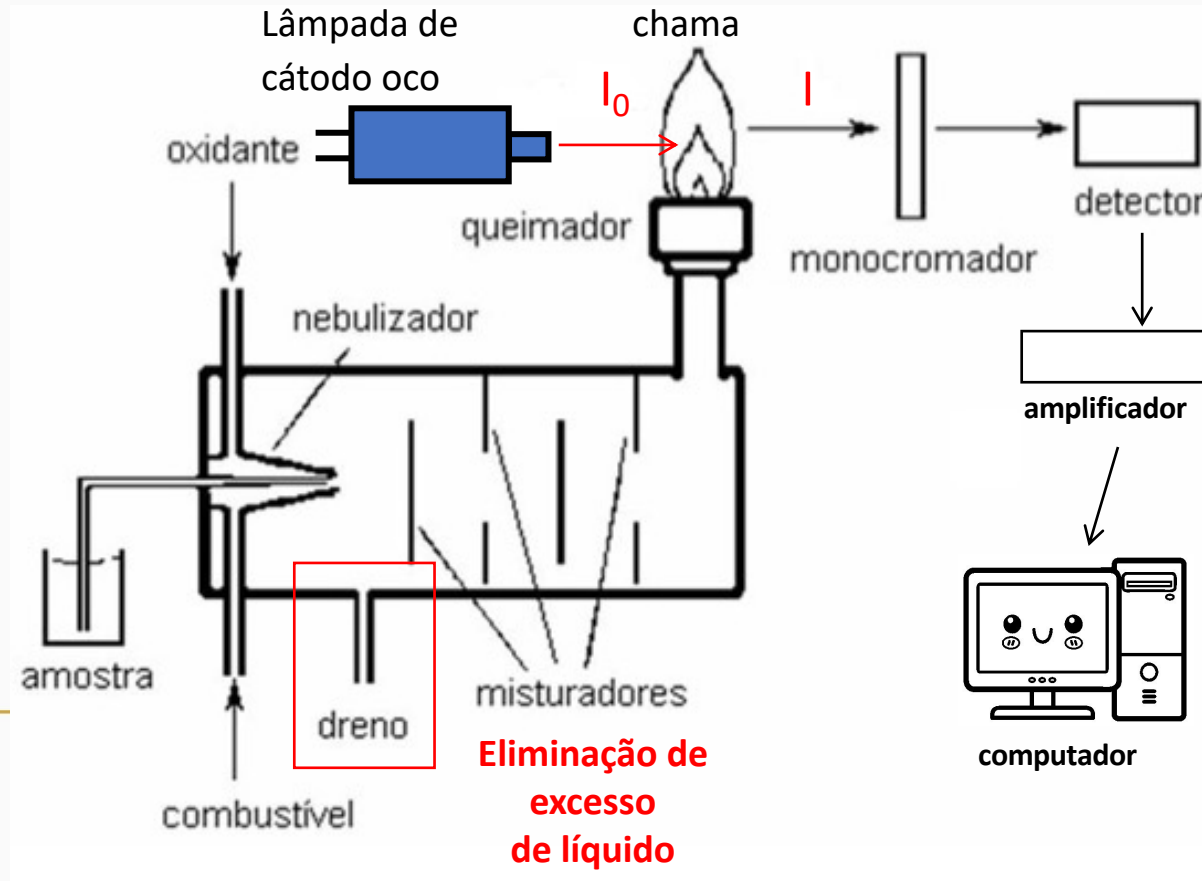


Chama





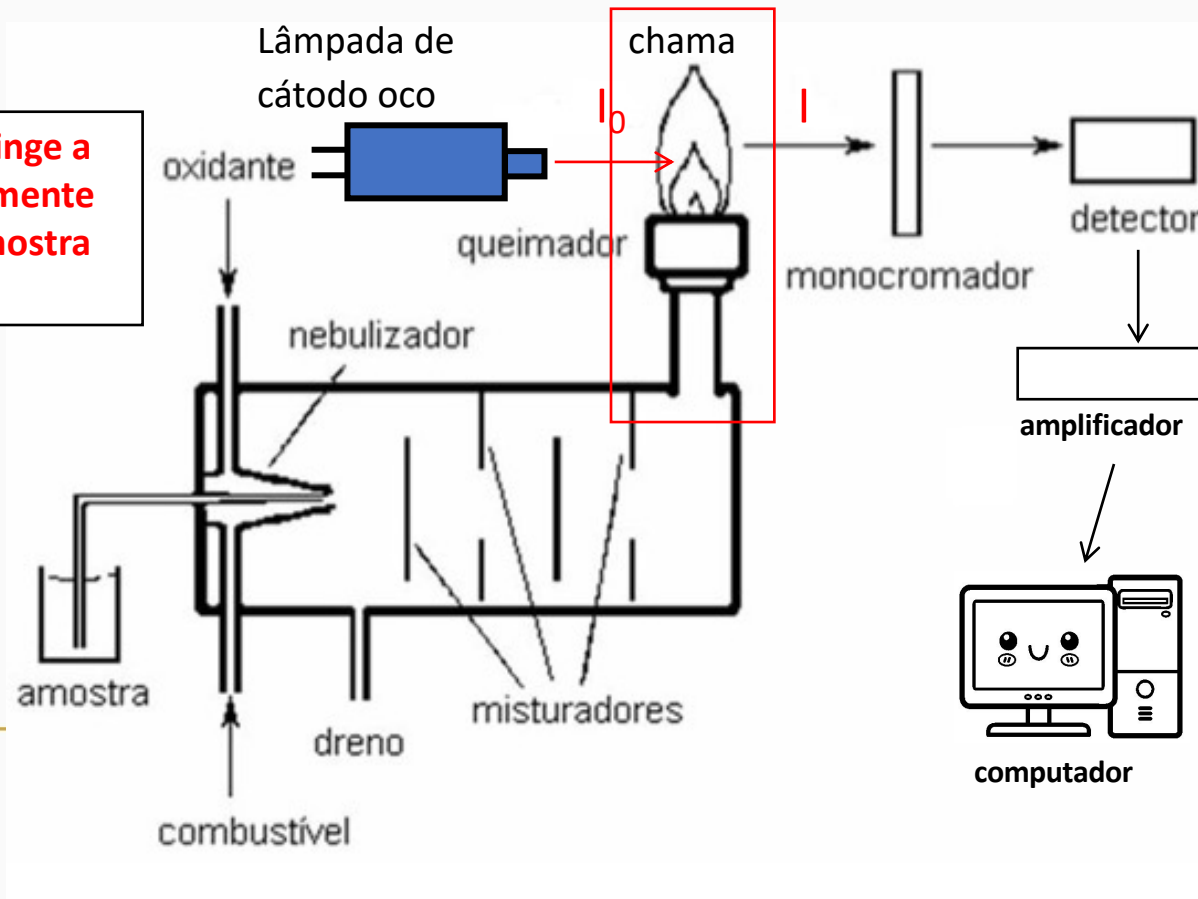
Chama





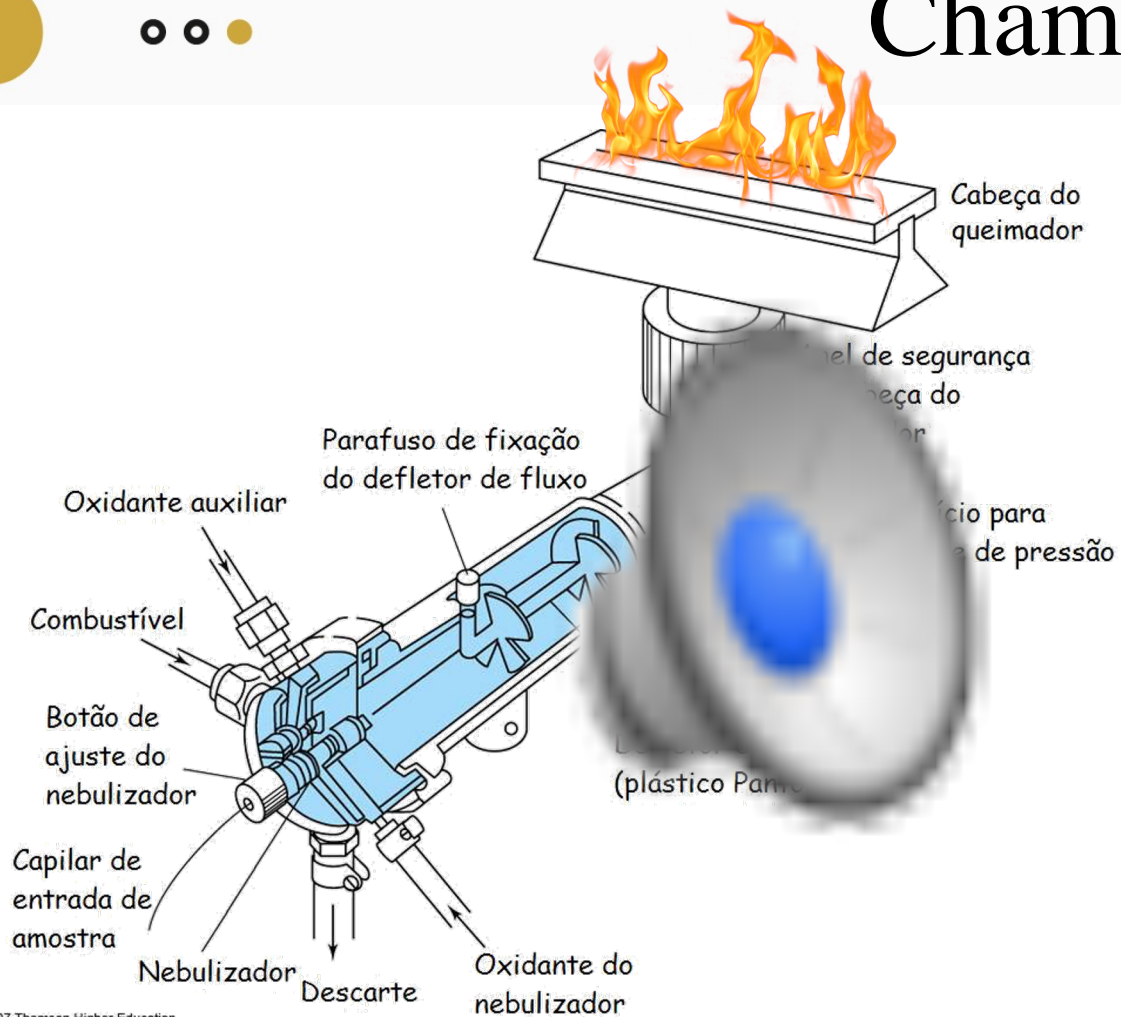
Chama

O Aerossol que atinge a chama contém somente cerca de 5% da amostra inicial





Chama





Chama

- **Combinação mais comum combustível/oxidante:**
acetileno e ar ($T_{\text{chama}} = 2400 - 2700 \text{ K}$)

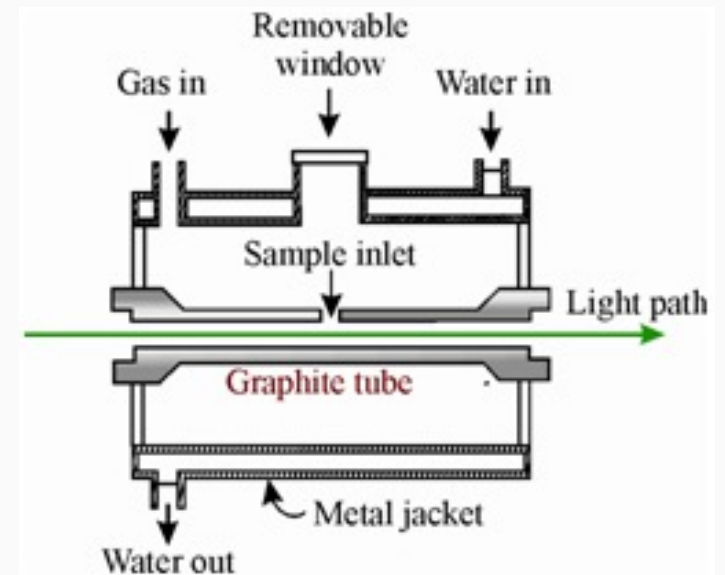
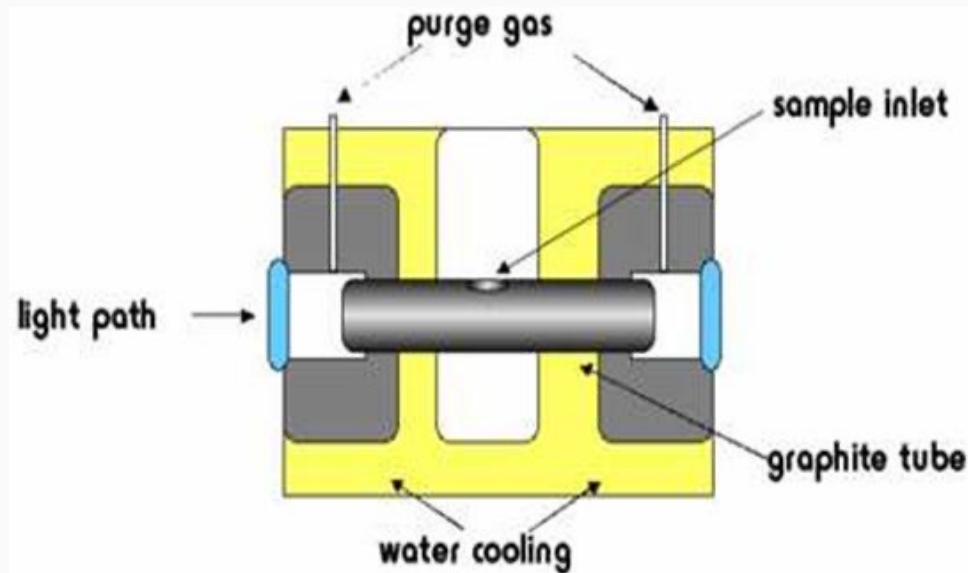
	Combustível	Oxidante	Temperatura (K)
H—C≡C—H	Acetileno	Ar	2400 - 2700
	Acetileno	Óxido nitroso (N ₂ O)	2900 - 3100*
	Acetileno	Oxigênio	3300 - 3400
	Hidrogênio	Ar	2300 - 2400
	Hidrogênio	Oxigênio	2800 - 3000
N≡C—C≡N ←	Cianogênio	Oxigênio	4800

* para atomização de elementos com alto ponto de ebulição (elementos refratários)



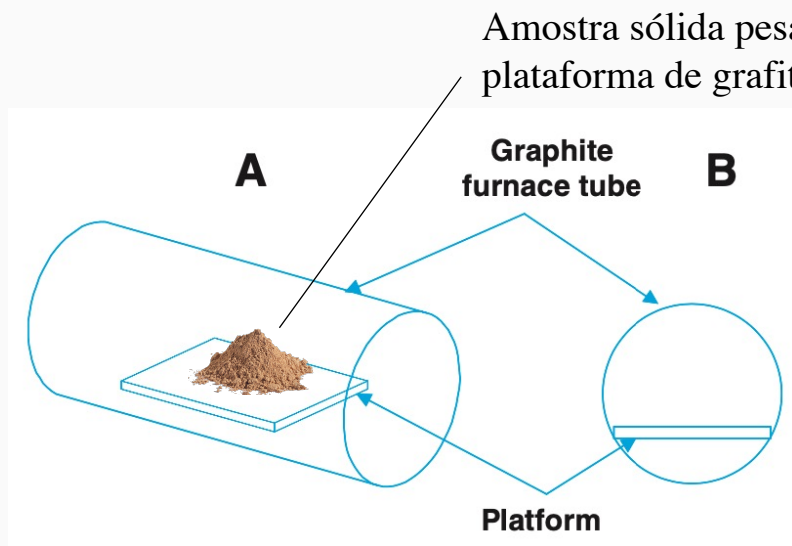
Forno

- ✓ **Forno de grafite:** oferece maior sensibilidade e requer menos amostra



Forno

- **Vantagem importante: amostragem direta de sólidos** (análise de sólido sem prévia manipulação)



Exemplo.

Análise de traços de **tungstênio** em componentes industriais

- 0,1 a 100 mg de amostra – Forno aquecido a 2600 °C (atomização APENAS de impurezas)
- Após várias corridas, análise do material residual (tungstênio)

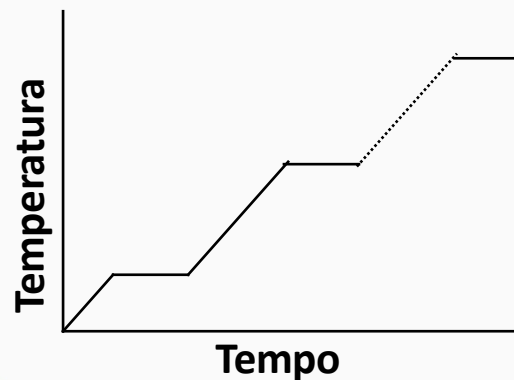


Forno

✓ Programa de temperatura:

- **Secagem (50 - 200 °C):** Eliminação do solvente
- **Calcinação (200 - 800 °C):** Eliminação da matriz (mineralização)
- **Atomização (2000 - 3000 °C):** Produção de vapor atômico

Forno é aquecido em etapas para atomizar corretamente a amostra

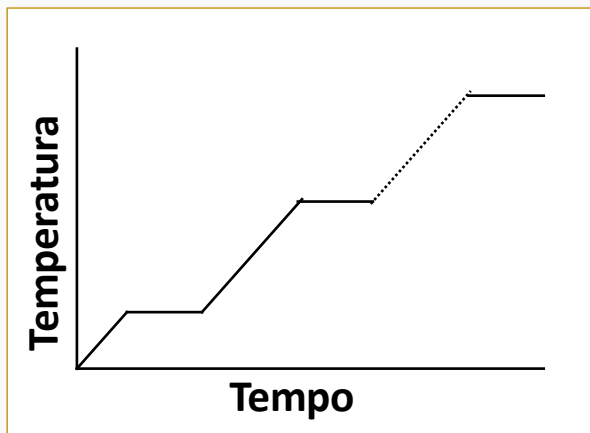




Forno

Exemplo.

Teor de ferro em uma proteína:



- **10 μL** de amostra contendo 0,1 ppm de Fe (forno a 90 $^{\circ}\text{C}$)
 - **Secagem** a 125 $^{\circ}\text{C}$ por 20 s
- **Queima** a 1400 $^{\circ}\text{C}$ por 60 s (destruição da matéria orgânica = pirólise)
- **Atomização a 2100 $^{\circ}\text{C}$ por 10 s** (absorbância atinge valor máximo e diminui com a evaporação do Fe)
- **Eliminação de resíduos** a 2500 $^{\circ}\text{C}$ por 3 s



Forno

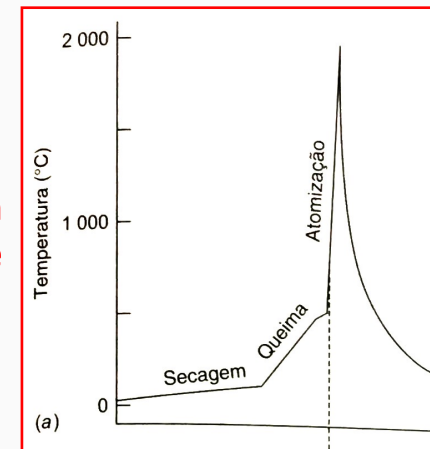
- **Modificadores de matriz:**

Exemplo.

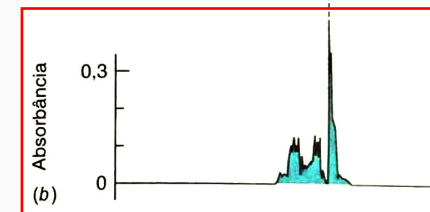
Determinação de Mn em água do mar

NH_4NO_3 reage com NaCl para formar **cloreto de amônio** (NH_4Cl) e **nitrito de sódio** (NaNO_2) \rightarrow **evaporam de maneira limpa**, sem produzir fumaça

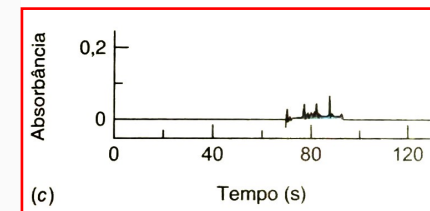
Perfil de temperatura da análise



Espectro da mostra sem a adição de nitrito de amônio



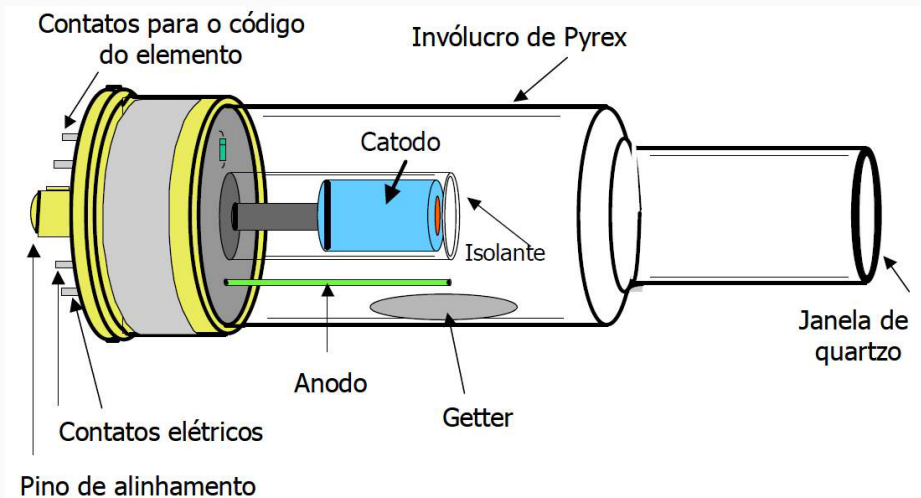
Espectro da mostra com a adição de nitrito de amônio





Lâmpada de cátodo oco

- ✓ Monocromadores: geralmente não conseguem isolar linhas mais estreitas que $10^{-3} - 10^{-2}$ nm
- ✓ **Lâmpada de cátodo oco:** produz linhas estreitas e com a frequência correta



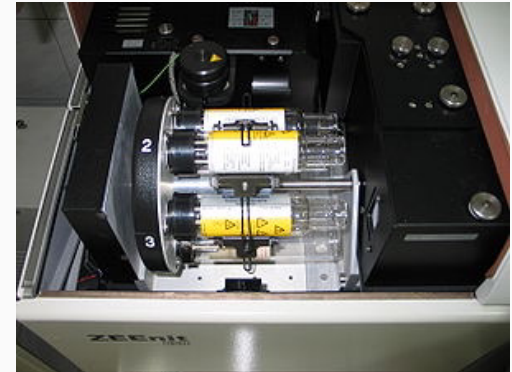
Contém gases **Ne ou Ar**, em uma pressão de $\sim 130 - 700$ Pa (1 – 5 Torr)



Lâmpada de cátodo oco

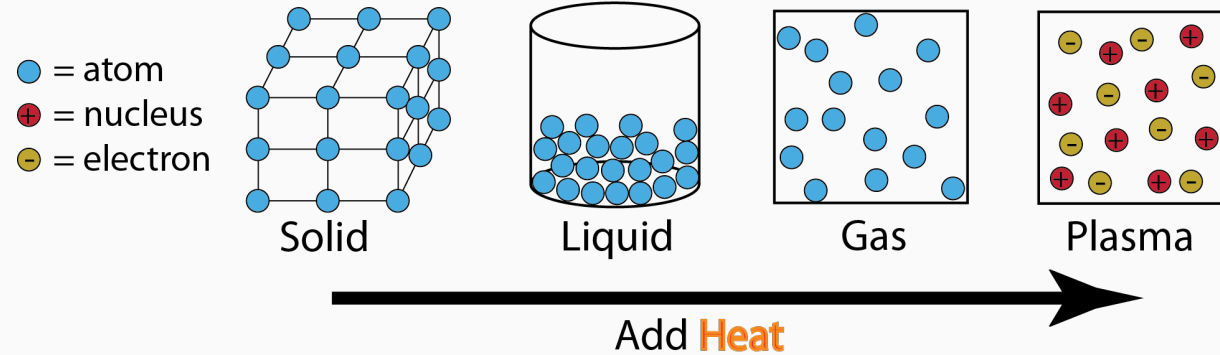
Qual a necessidade de **monocromador** em um sistema de espectroscopia atômica???

- ✓ **Selecionar** uma linha emitida pela lâmpada de cátodo oco
- ✓ **Rejeitar** as emissões provenientes do forno ou da chama

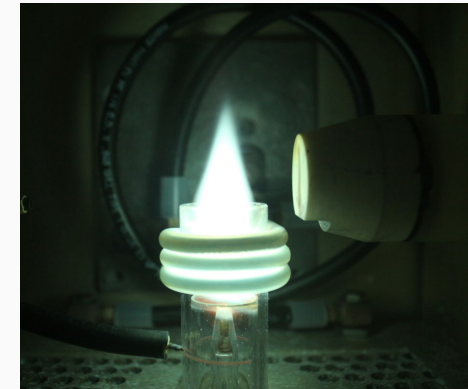




Plasma



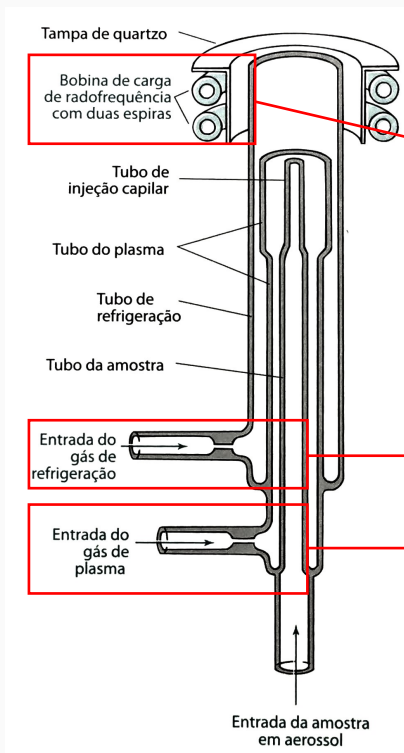
- ✓ Estado físico da matéria (gás ionizado)
- ✓ Descrito pela primeira vez em 1920 (Irving Langmuir)
- ✓ Não existe na natureza em condições normais de temperatura e pressão
- ✓ Obtido por ação de **temperatura** ou de **campo magnético** forte





●●● Plasma acoplado indutivamente (ICP)

duas vezes mais quente que a chama de combustão



→ **Bobina emite uma faísca:** Gás Ar se ioniza, elétrons livres são acelerados e colidem com átomos, transferindo energia para todo o gás

Elétrons absorvem energia suficiente da bobina para manter a temperatura no plasma entre 6000 e 10000 K

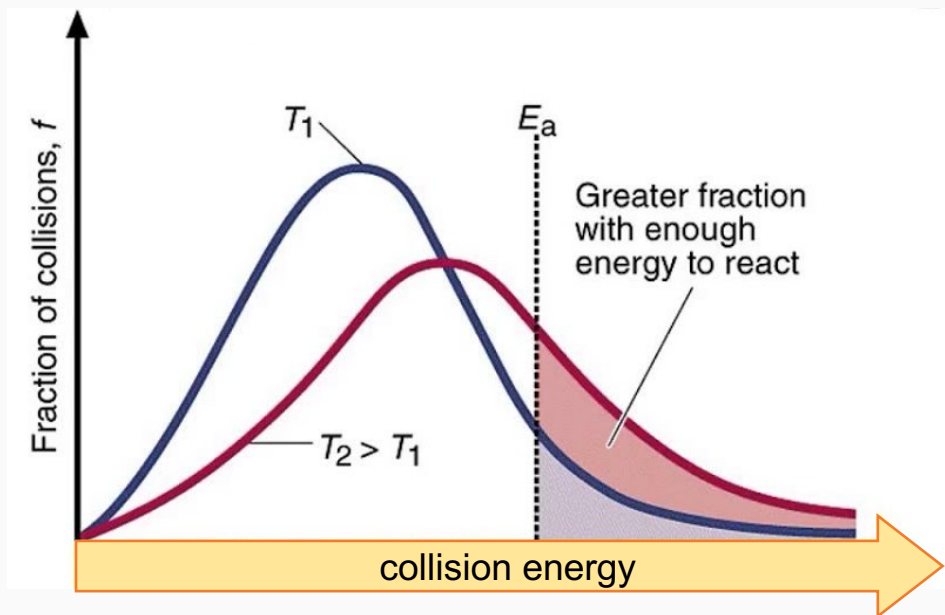
→ Gás de refrigeração (argônio) protege o sistema contra superaquecimento

→ Argônio de alta pureza alimentado pela entrada de gás de plasma



Observação

efeito da temperatura na espectroscopia atômica



Distribuição de Boltzmann:

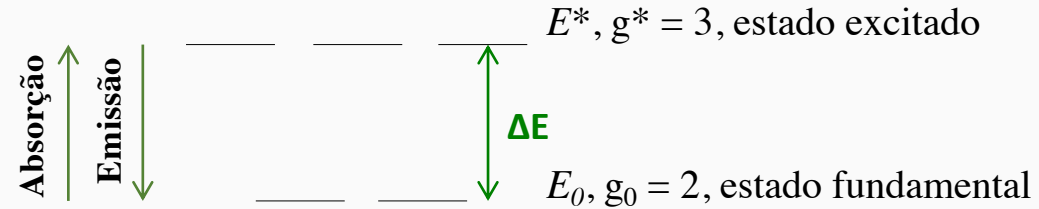
- Relaciona a **temperatura** com a **fração de átomos** em diferentes estados de energia;
- Permite calcular a *função distribuição* para um número fracionário de partículas (N^*/N_0) ocupando um conjunto de estados de diferente energia



Observação

efeito da temperatura na espectroscopia atômica

Átomo com níveis de energia E_0 e E^* separados pela diferença de energia ΔE



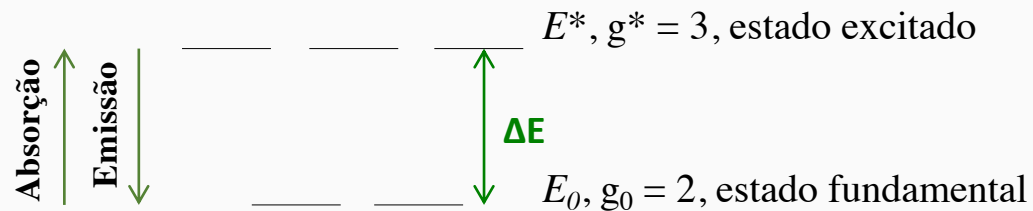
- Átomo (ou molécula): pode ter **mais de um estado disponível (g)** em um determinado nível de energia
- Número de estados em cada nível de energia: **degeneração ou degenerescência** ($g_0 = 2$ e $g^* = 3$)



Observação

efeito da temperatura na espectroscopia atômica

Átomo com níveis de energia E_0 e E^* separados pela diferença de energia ΔE



Distribuição de Boltzmann

$$\frac{N^*}{N_0} = \frac{g^*}{g_0} e^{-\Delta E/kT}$$

onde T é a temperatura (K) e k é a constante de Boltzmann ($= 1,381 \times 10^{-23}$ J/K)



Observação

efeito da temperatura na espectroscopia atômica

Absorção

Ocorre a partir de átomos no **estado fundamental**: valor e estabilidade da temperatura é importante, mas **não imprescindível**.

Emissão

Ocorre a partir de átomos no **estado excitado**: **imprescindível** que temperatura seja alta e muito estável

$$\frac{N^*}{N_0} = \frac{g^*}{g_0} e^{-\Delta E/kT}$$

$$\frac{N^*}{N_0} = \frac{2}{1} e^{-(3,371 \times 10^{-19} \text{ J}) / [(1,381 \times 10^{-23} \text{ J/K})(2600 \text{ K})]} = 1,67 \times 10^{-4}$$

$$\frac{N^*}{N_0} = \frac{2}{1} e^{-(3,371 \times 10^{-19} \text{ J}) / [(1,381 \times 10^{-23} \text{ J/K})(2610 \text{ K})]} = 1,74 \times 10^{-4}$$



Observação

efeito da temperatura na espectroscopia atômica

Chama a 2500 K vs. Plasma a 6000 K

Diferença do comprimento de onda entre estados (nm)	Diferença de energia entre estados (J/átomo)	Fração de estados excitados (N^*/N_0)	
		2500 K	6000K
250	$7,95 \times 10^{-19}$	$1,0 \times 10^{-10}$	$6,8 \times 10^{-5}$
500	$3,97 \times 10^{-19}$	$1,0 \times 10^{-5}$	$8,3 \times 10^{-3}$
750	$2,65 \times 10^{-19}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-2}$

Razão (N^/N_0) obtida da distribuição de Boltzmann, sendo $g^* = g_0 = 1$*



ICP-OES
Fundamentals:
Revealing the
Sample's Secrets

<https://www.youtube.com/watch?v=aCi72rj0fYA>

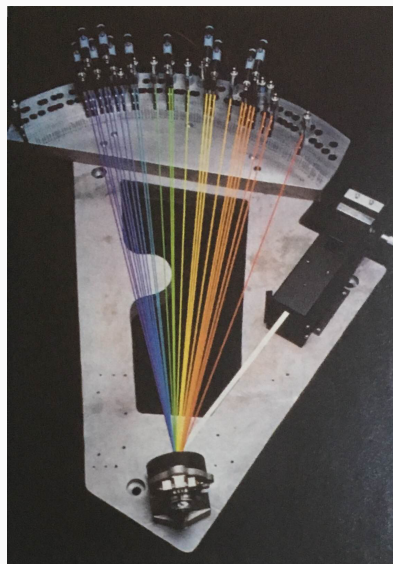


ICP-OES

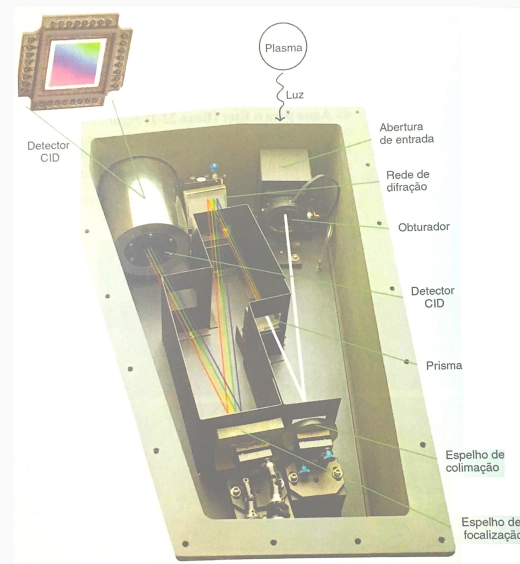
Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy

Deteccão simultânea de até 70 elementos!

**UM DETECTOR PARA
CADA ELEMENTO**



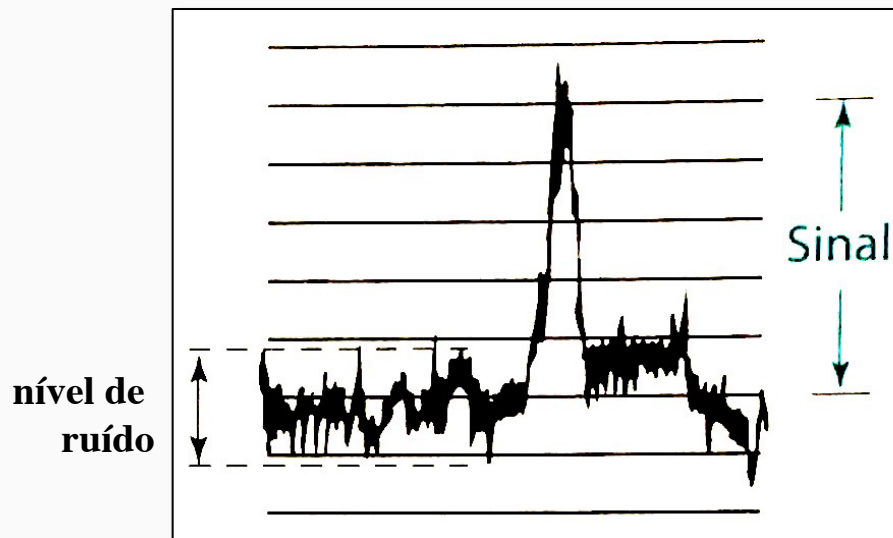
**UM DETECTOR PARA
TODOS OS ELEMENTOS**





Limites de detecção

“Concentração de um elemento que produz um sinal cuja intensidade é *duas vezes maior* que o nível de ruído da linha-base



IMPORTANTE

Nível de ruído da linha-base deve ser medido usando-se um **branco**



Limites de detecção

Elementos	Limites de detecção (ng/g)		
	<i>Chama</i>	<i>Forno</i>	<i>ICP</i>
<i>Sódio (Na)</i>	0,2	0,005	3
<i>Bário (Ba)</i>	10	0,04	0,6
<i>Alumínio (Al)</i>	30	0,01	2
<i>Rutênio (Ru)</i>	60	1	10
<i>Ferro (Fe)</i>	5	0,02	0,7
<i>Fósforo (P)</i>	40000	30	7



Comparação entre métodos

	Absorção de chama	Absorção em forno	ICP	ICP-MS
Limites de detecção (ng/g)	10 – 1000	0,01 – 1	0,1 – 10	0,00001 – 0,0001
Interferência química	Raras	Raras	Muitas	Poucas
Interferência espectral	Muitas	Muitas	Raras	Poucas
Interferência de ionização	Não há	Não há	Não há	Muitas
Tempo por amostra	10 – 15 s por elemento	3 – 4 min por elemento	6 – 60 elementos por minuto	Todos os elementos em 2 – 5 min
Volume de amostra	Grande	Muito pequeno	Médio	Médio



Espectroscopia Atômica

Espectroscopia atômica vs. Espectroscopia molecular



- ✓ **Fonte de luz** (ou falta de fonte de luz na espectroscopia atômica de emissão)
 - ✓ **Recipiente da amostra** (chama, forno ou plasma)
- ✓ Necessidade de se **subtrair a emissão de fundo** do sinal observado

Largura das linhas
espectrais

Correção da radiação
de fundo

Interferências



Largura das linhas espectrais

Para que a **absorbância** medida seja **proporcional** à **concentração** do analito (Lei de Beer):



Largura de linha da fonte
de radiação



Largura de linha da
absorção pela amostra

**Linhas de absorção atômica:
largura de $\sim 10^{-4}$ nm**



Largura das linhas:

Princípio da incerteza de Heisenberg (1927)

<https://www.youtube.com/watch?v=TQKELOE9eY4>



Largura das linhas espectrais

Princípio da Incerteza de Heisenberg:



“Quanto menor a vida média do estado excitado, maior será a incerteza em sua energia.”

$$\delta E \delta t \geq \frac{h}{4\pi}$$

δE : incerteza na diferença de energia entre os estados fundamental e excitado

δt : tempo de vida do estado excitado antes de decair para o estado fundamental

h : constante de Planck (= $6,62 \times 10^{-34}$ J.s)



Largura das linhas espectrais

Princípio da Incerteza de Heisenberg:



$$\delta E \delta t \geq \frac{h}{4\pi}$$

Exemplo.

O tempo de vida de um estado excitado de um átomo gasoso isolado é $\sim 10^{-9}$ s. **Cálculo da incerteza em sua energia:**

$$\delta E \geq \frac{h}{4\pi\delta t} = \frac{6,6 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}}{4\pi(10^{-9} \text{ s})} \cong 10^{-25} \text{ J}$$



Largura das linhas espectrais

Princípio da Incerteza de Heisenberg:

Supondo que a diferença de energia (ΔE) entre os estados excitado e fundamental de um átomo corresponde à luz visível com um comprimento de onda $\lambda = 500 \text{ nm}$:

$$\text{Diferença de energia} = \Delta E = hc^*/\lambda = 4,0 \times 10^{-19} \text{ J}$$

**Incerteza relativa na
diferença de energia**

$$\frac{\delta E}{\Delta E} = \frac{10^{-25} \text{ J}}{4,0 \times 10^{-19} \text{ J}} = 2 \times 10^{-7}$$



Largura das linhas espectrais

Princípio da Incerteza de Heisenberg:

A incerteza relativa no comprimento de onda ($\delta\lambda/\lambda$) é igual à incerteza relativa na energia!!

$$\frac{\delta\lambda}{\lambda} = \frac{\delta E}{\Delta E} \geq 2 \times 10^{-7} \Rightarrow \delta\lambda \geq 2 \times 10^{-7} \times 500 \text{ nm} = \mathbf{10^{-4} \text{ nm}}$$

Largura da linha inerente de um sinal de absorção ou de emissão atômica

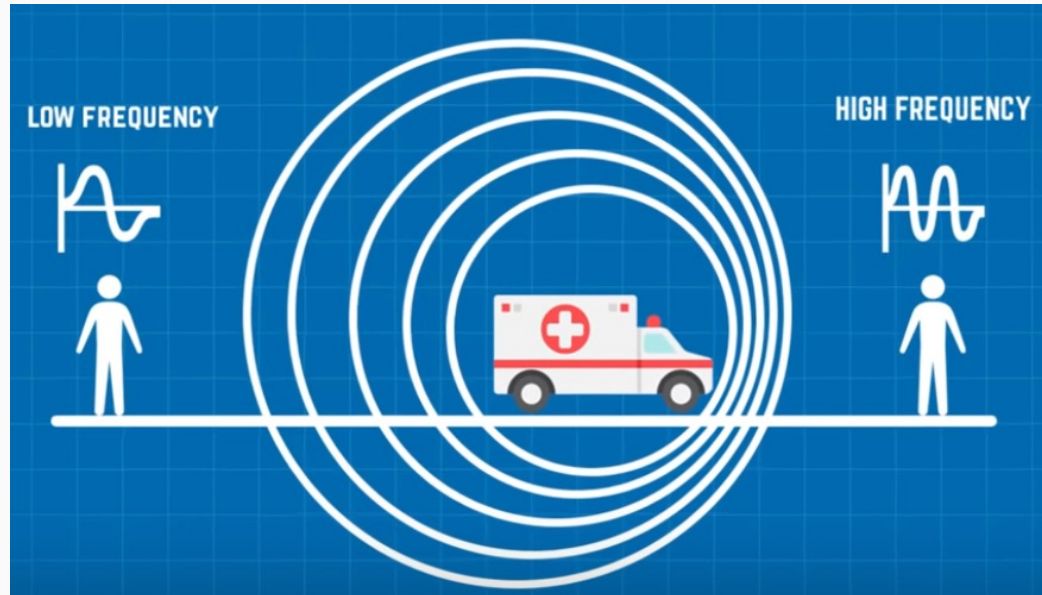
Mecanismos de alargamento (10^{-3} a 10^{-2} nm) das linhas espectrais

**Efeito Doppler
Alargamento devido à pressão**



Largura das linhas espectrais

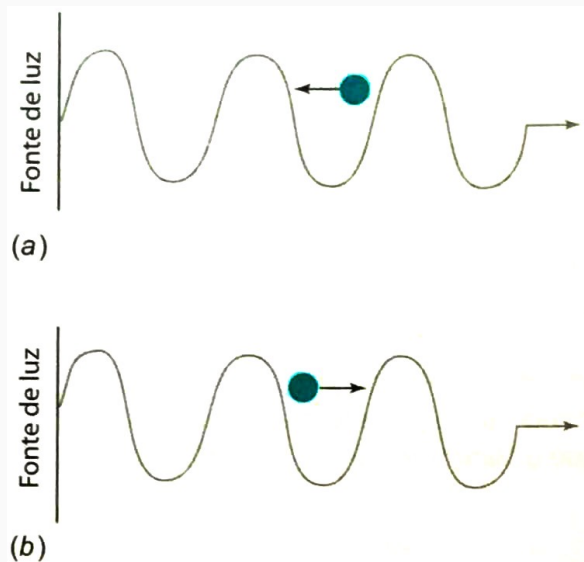
Alargamento das linhas por efeito Doppler





Largura das linhas espectrais

Alargamento das linhas por efeito Doppler



“Um átomo que se move **na direção** da fonte de radiação (a) sente a onda eletromagnética com uma **frequência maior** do que um átomo que esteja se afastando da fonte (b)”

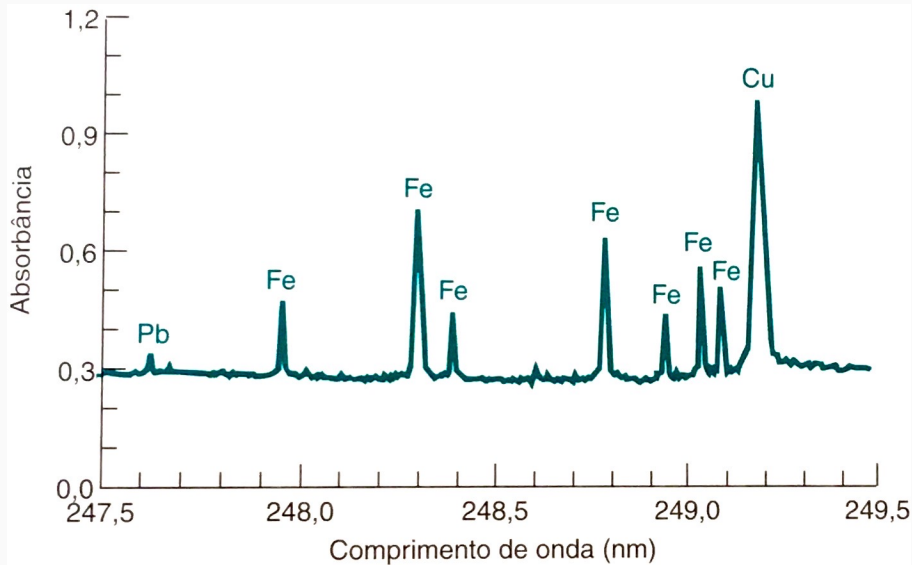
Largura de linha ($\delta\lambda$) devida ao efeito Doppler

$$\delta\lambda \approx \lambda(7 \times 10^{-7}) (T/M)^{1/2}$$

T = temperatura (K) e M = massa do átomo (unidades de massa atômica)



Correção da radiação de fundo

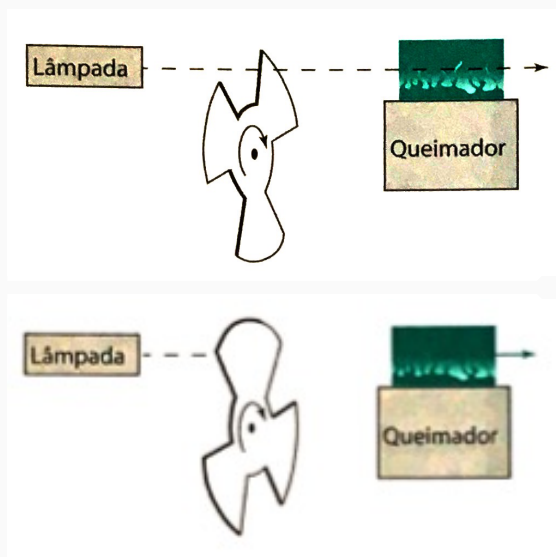


- Sinais atômicos **superpostos** a radiação de fundo com **absorbância de 0,3**
- Correção é mais importante em fornos de grafite (**fumaça da queima**)



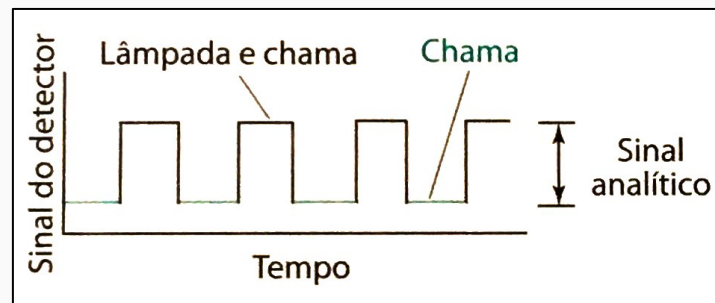
Correção da radiação de fundo

Interruptor rotatório de feixe luminoso



A emissão da lâmpada e da chama atingem o detector simultaneamente

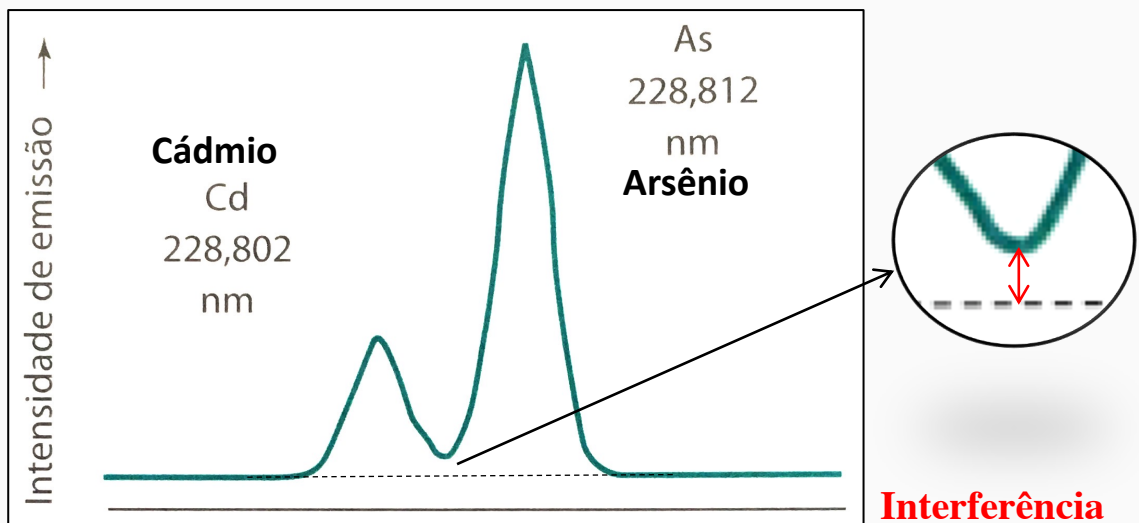
Somente a emissão da chama atinge o detector





Interferências

Espectral – Química – De Ionização

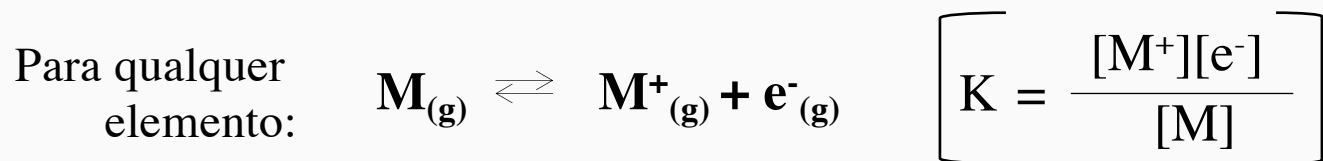


Superposição do sinal do analito aos sinais devidos a outros elementos presentes na amostra



Interferências

Espectral – Química – De Ionização



Metais alcalinos: mais facilmente ionizáveis

Ex. 2450 K, 0,1 Pa: *Na é 5% ionizado e K é 33% ionizado*

Adição de 1000 ppm de CsCl para análises de potássio – ionização do céσιο suprime a ionização do potássio