

PRINCÍPIOS DA ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL

Henrique Bergamin Filho[†]

Francisco José Krug

Elias Ayres Guidetti Zagatto

Fábio Rodrigo Piovezani Rocha

†) In memoriam

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

2009

Apresentação

Esta postila foi originalmente editada em junho de 1988 com o saudoso Professor Bergamin e com o Professor Zagatto. A intenção nunca foi substituir os livros-texto, mas fornecer material didático que reunisse as informações apresentadas em aulas teóricas e práticas e que contivesse informações úteis sobre a espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta e visível. Em sua terceira edição (setembro de 2005) o texto foi revisado pela Química Iolanda Aparecida Rufini do CENA-USP e pela mestranda Quienly Godoi do IQSC-USP, a quem agradecemos. Esta 4^a edição apresenta algumas mudanças que visam a tornar o texto mais didático. Detalhes sobre a técnica podem ser encontrados na versão em português da 6^a edição da obra "*Principles of Instrumental Analysis*" de D. A. Skoog, F.J. Holler e T.A. Nieman e em outros excelentes livros mencionados no final deste texto.

Os autores

30 de novembro de 2009

ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL

A espectrofotometria é, reconhecidamente, uma das técnicas analíticas mais utilizadas para determinações quantitativas de espécies químicas, devido à robustez, instrumentação relativamente simples e de baixo custo e ao grande número de aplicações desenvolvidas. Esta técnica se baseia na medida da absorção de radiação eletromagnética nas regiões visível e ultravioleta por espécies químicas (moléculas ou íons) em solução. Na análise quantitativa, a atenuação do feixe de radiação é, dentro de certos limites, proporcional à concentração da espécie química a ser determinada. As espécies químicas de interesse geralmente estão presentes em solução líquida, embora seja também possível que as medidas sejam realizadas em fase sólida ou gasosa. Deve ser salientado que a espectrofotometria também se constitui em ferramenta valiosa para a identificação de grupos funcionais. Outros termos, como espectrometria de absorção molecular e espectrofotometria de absorção em solução tem sido também utilizados para designar esta técnica analítica.

I. A radiação eletromagnética

Muitos experimentos realizados em laboratório são melhor interpretados partindo da idéia de que a radiação se propaga na forma de ondas. Estas ondas são caracterizadas com respeito a algumas propriedades, tais como frequência, comprimento de onda e número de onda. O comprimento de onda (λ) refere-se à distância entre dos pontos equivalentes de ondas subseqüentes, por exemplo, duas cristas adjacentes, conforme ilustrado na Figura 1.

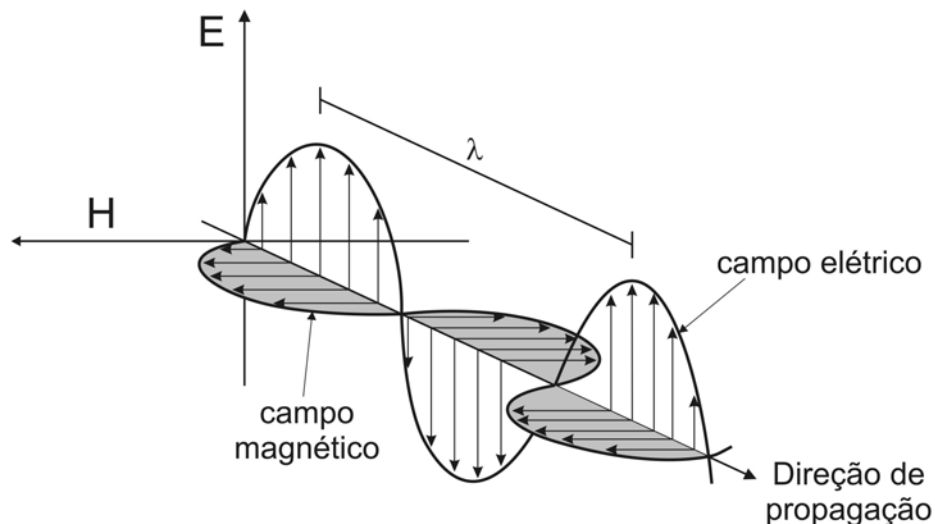


FIGURA 1. Ilustração de uma onda eletromagnética plano-polarizada: **E** = campo elétrico; **H** = campo magnético; λ = comprimento de onda.

O recíproco do comprimento de onda é denominado número de onda $\bar{\nu}$. Outra característica importante de uma onda eletromagnética é a sua frequência (ν), ou seja, o número de unidades completas de comprimentos de onda que passam por um ponto fixo por unidade de tempo. Isto decorre do fato de a onda se propagar a uma velocidade constante. Comprimento de onda, número de onda e frequência estão relacionadas com a velocidade da luz no vácuo (c), conforme as expressões:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad (1) \quad \text{e} \quad \nu = \frac{c}{\lambda} \quad (2)$$

A velocidade da luz no vácuo é cerca de $3 \times 10^{12} \text{ m s}^{-1}$, sendo reduzida a (c') em outros meios, conforme a equação:

$$c' = \frac{c}{n'} \quad (3)$$

onde n' = índice de refração do meio considerado, determinado experimentalmente como a razão entre as velocidades da luz no vácuo e no meio em questão.

A teoria ondulatória da radiação eletromagnética explica muitos fenômenos óticos, tais como a reflexão, a refração e a difração. No entanto, em alguns casos é conveniente considerar que a radiação é constituída de partículas portadoras de energia chamadas fótons. Assim, torna-se útil pensar no feixe de luz como sendo constituído por um “ conjunto de fótons. Cada fóton possui uma energia (E) característica, que está relacionada à frequência da radiação pelas equações:

$$E = h\nu \quad (4)$$

$$E = hc/\lambda \quad (5)$$

onde h =constante de Planck ($6,624 \cdot 10^{-27}$ J.s).

Dessa forma, a cada comprimento de onda está associada uma quantidade definida de energia. A intensidade de um feixe de radiação é proporcional ao número de fótons e independe da energia de cada fóton. Considerando o modelo ondulatório, a intensidade o feixe é proporcional ao módulo dos vetores indicados na Figura 1. A absorção de radiação tem como consequência a diminuição do número de fótons e da amplitude das ondas que constituem a radiação eletromagnética. Em outras palavras, a absorção de radiação não altera a energia do feixe e, conseqüentemente, o comprimento de onda da radiação incidente.

II. O espectro eletromagnético

As radiações de interesse para a humanidade variam desde aquelas de altíssima energia (raios gama) até aquelas de baixa energia (ondas de rádio). Dá-se o nome de espectro eletromagnético ao conjunto de radiações eletromagnéticas, divididas em função do comprimento de onda ou (energia), as quais recebem as denominações indicadas na Figura 2. A região relativamente estreita do espectro cujas radiações são perceptíveis pelo olho humano é chamada de região visível.

Dependendo da região do espectro eletromagnético considerada, diferentes unidades são empregadas para caracterizar as radiações.

Para as regiões do infravermelho próximo (NIR), visível (Vis) e ultravioleta (UV), o comprimento de onda é geralmente expresso em nanômetros (nm). Em textos antigos, o angstrom Å e o milimicron (mμ) eram utilizados. As relações de conversão são:

$$1 \text{ nm} = 1 \text{ m}\mu = 10 \text{ \AA}$$

Para outras regiões do infravermelho pode-se empregar o micrômetro, μm (micron e micra eram utilizados erroneamente no passado). A radiação infravermelha é também caracterizada pelo número de onda, expresso em cm^{-1} .

Por outro lado, para as regiões mais energéticas, considera-se a energia do fóton expressa em elétron-volt (eV), predominantemente keV (10^3 eV) para os raios – X e MeV (10^6 eV) para raios γ . A energia das transições eletrônicas nas regiões do Vis e UV são da ordem de eV.

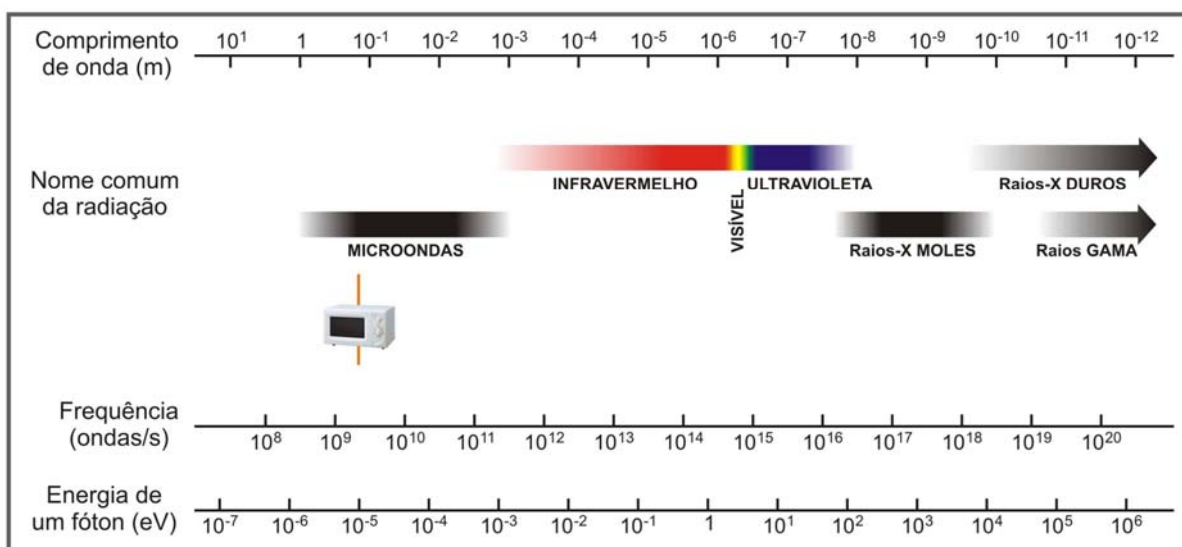


Figura 2. Representação parcial do espectro eletromagnético.

III. A absorção da radiação

Quando um feixe atravessa a camada de um sólido, líquido ou gás, radiações de certas frequências podem ser seletivamente absorvidas. Neste processo de absorção, a energia é transferida aos átomos, moléculas ou íons presentes na amostra. Como resultado, essas partículas passam de um estado de baixa energia para estados mais energéticos (estado excitado). O estado de energia mais baixa é denominado estado fundamental.

As conseqüências da absorção de radiação por espécies químicas dependem da quantidade de energia absorvida e, portanto, do comprimento de onda da radiação. Sendo a energia E inversamente proporcional ao comprimento de onda, radiações com menores λ provocam alterações mais significativas nas espécies absorventes (eq. 5). Enquanto os raios γ são suficientemente energéticos para promover alterações nos núcleos atômicos, radiações na região das micro-ondas, com comprimentos de onda muito maiores, alteram somente o estado rotacional das moléculas. Radiações eletromagnéticas das regiões UV-Vis apresentam comprimentos de onda com dimensões comparáveis às de vírus e bactérias (40 – 700 nm). Estes comprimentos de onda correspondem a energias suficientes para promover transições rotacionais, vibracionais e eletrônicas em espécies absorventes. Somente radiações ultravioletas com $\lambda < 250$ nm são suficientemente energéticas para quebrar ligações químicas. Em espectrometria UV-Vis, somente radiações com $\lambda > 200$ nm encontram aplicações práticas, visto que radiação com comprimentos de onda menores pode ser absorvida pela água ou por outras espécies presentes no ar. Desta forma, espectrômetros para medidas abaixo de 200 nm requerem sistemas ópticos purgados para a remoção destas espécies absorventes.

Em se tratando de absorção de radiação eletromagnética, deve-se enfatizar que as moléculas e íons são caracterizados por um número muito grande de níveis energéticos que decorrem das variações em suas energias eletrônicas, vibracionais e rotacionais. A Figura 3 é uma representação esquemática de alguns dos níveis de energia eletrônico, vibracional e rotacional molecular, onde pode se observar que cada nível eletrônico apresenta diversos estados vibracionais e rotacionais.

Observa-se que a diferença de energia entre os níveis eletrônicos é muito maior do que aquela entre os estados vibracionais de um mesmo nível eletrônico e que a diferença entre os estados vibracionais é significativamente maior do que aquela entre os estados rotacionais. Assim, para cada nível eletrônico de uma molécula há, também, superposições entre os estados vibracional e rotacional. Uma dada transição eletrônica pode também envolver mudanças vibracionais e rotacionais, o que permite a absorção de fótons de uma faixa de energias, caracterizando uma banda (espectro de absorção contínuo). Deve-se salientar ainda que, em um espectro contínuo de absorção, o comprimento de onda de máxima absorção corresponde à transição mais provável.

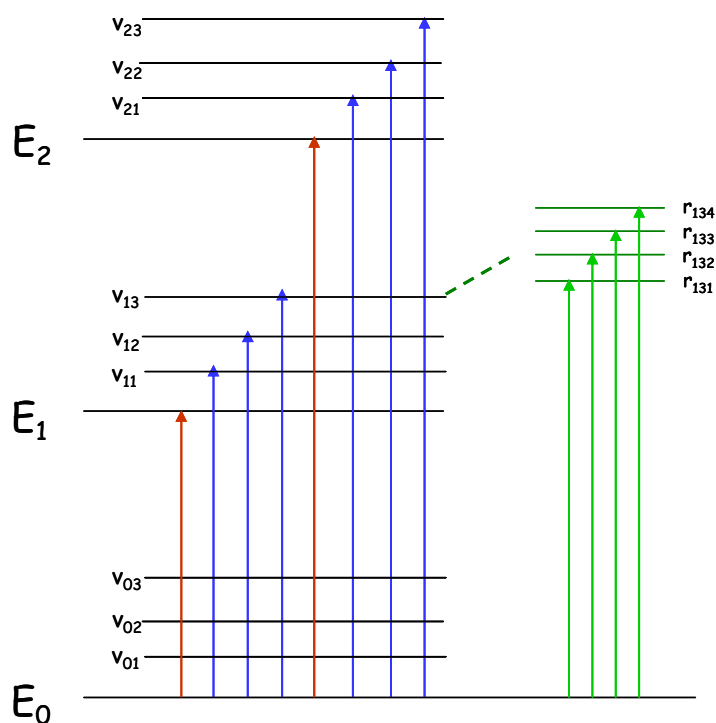


Figura 3. Diagrama de níveis de energia para uma molécula. Os níveis E_0 , E_1 e E_2 referem-se a três níveis eletrônicos, cada um deles com três níveis vibracionais (e.g. v_{01} a v_{03} para o nível E_0); os níveis rotacionais r_{131} a r_{134} estão associados ao nível vibracional v_{13} . São mostradas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

A absorção de radiação na região visível do espectro eletromagnético é responsável pela coloração das soluções. Utilizando-se o conceito de cores complementares, é possível deduzir a região do espectro na qual ocorre absorção de radiação. Por exemplo, uma solução que absorve radiação na região correspondente ao verde (480-560 nm) apresentará coloração vermelha, que corresponde à combinação das cores transmitidas (*i.e.* não absorvidas) pela solução. Na prática, no entanto, a região espectral na qual ocorre absorção de radiação é determinada a partir de um espectro de absorção. Este espectro consiste em um gráfico, que correlaciona um parâmetro proporcional à quantidade de radiação absorvida (absorbância, transmitância ou absorvidade molar), com o comprimento de onda da radiação incidente. Geralmente utilizam-se medidas de absorbância (vide p.12). Tomando-se por base apenas algumas transições eletrônicas, semelhante às mostradas na Figura 3, hipoteticamente poder-se-ia obter o espectro da Figura 4a. Entretanto, devido ao grande número de transições, e às pequenas diferenças de energia entre as transições e a resolução espectral dos espectrômetros existentes, em geral observa-se na prática um espectro contínuo (Figura 4b).

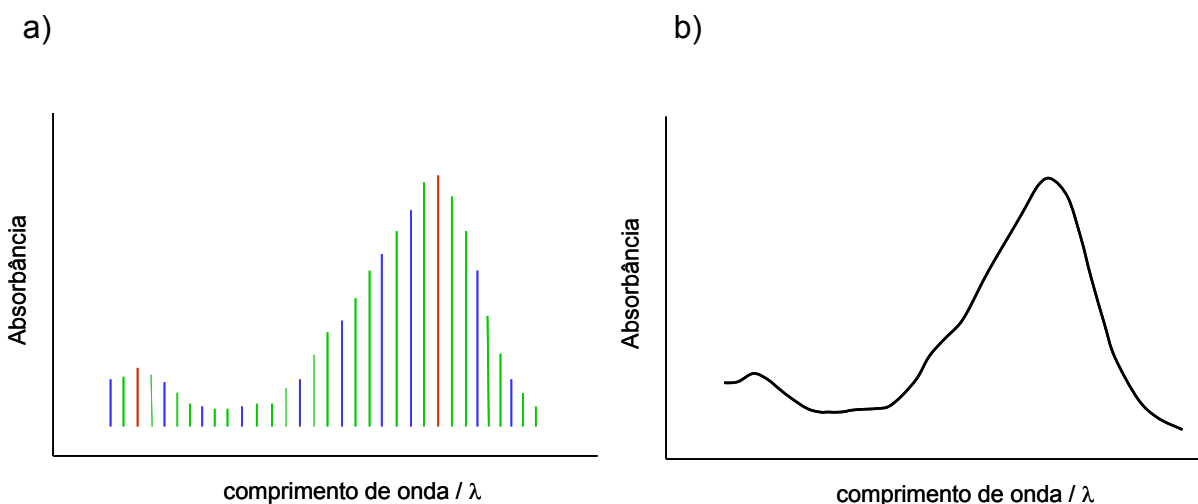


Figura 4. Representação de espectros de absorção na região do visível mostrando a) valores hipotéticos para as transições eletrônicas e b) espectro contínuo obtido na prática.

A partir dos espectros de absorção, é possível deduzir as transições eletrônicas possíveis e, conseqüentemente, obter informações que subsidiam a identificação de estruturas moleculares com informações obtidas por outras técnicas, como a espectrometria de massas e a espectrometria de ressonância magnética nuclear. Espectros de absorção também permitem identificar os comprimentos de onda de máxima absorção. Medidas de absorção nestes comprimentos de onda levam à maior atenuação do feixe de radiação e, portanto, à maior sensibilidade analítica. Espectros de absorção da espécie de interesse e de espécies concomitantes permitem conclusões relativas à seletividade das medidas (avaliação de possíveis interferências espectrais).

A maioria das espécies orgânicas, contendo duplas e triplas ligações, absorve radiação na região ultravioleta do espectro eletromagnético. A Figura 5 mostra um espectro típico de absorção de benzeno em etanol ilustrando estas considerações.

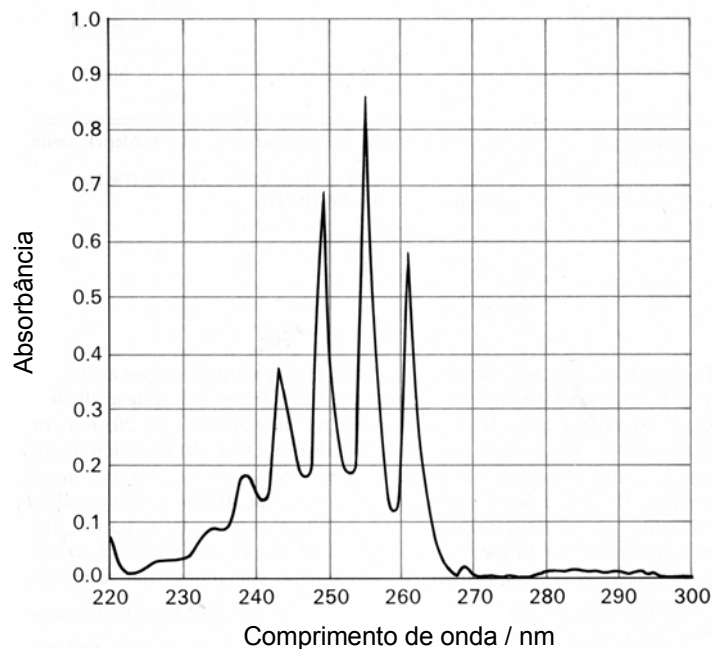


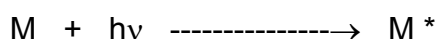
Figura 5. Espectro de absorção do benzeno em etanol. Adaptado da referência 12.

Com referência à absorção de radiação visível e ultravioleta por átomos gasosos, caso particular da espectrometria de absorção atômica, deve-se ressaltar que as transições eletrônicas envolvem um número relativamente limitado de níveis de energia. Assim, a absorção da radiação eletromagnética por um átomo pode

ocorrer somente se o fóton incidente possuir energia exatamente correspondente à diferença de energia entre dois níveis energéticos. Neste caso, um espectro de absorção discreto (formado por linhas e não bandas) é observado. A espectrometria de absorção atômica é tratada em outro texto especializado.

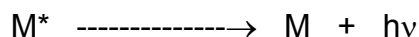
IV. Relaxação

A absorção de um fóton de radiação visível ou ultravioleta por uma espécie M resulta na formação de uma espécie excitada M* (excluindo aqui o processo de ionização) conforme a equação:



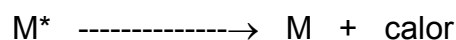
A vida média de M* é muito curta (10^{-8} a 10^{-9} s) e diferentes processos de relaxação contribuem para a perda de energia, sendo predominantes aqueles com constante de velocidade maior (mais rápidos). Dentre estes, citam-se:

a) Reemissão da radiação eletromagnética



Este é o principal processo associado à espectrometria de absorção atômica. Em se tratando de absorção por moléculas em solução, a radiação pode ser reemitida através de processos de fosforescência e fluorescência. Nesta situação, o comprimento de onda do fóton emitido é maior do que aquele do fóton incidente, ou seja, parte da energia é perdida por processos não radiativos.

b) Liberação de calor



De um modo geral, a quantidade de calor liberada para o meio é muito pequena. Entretanto, em alguns casos esta energia pode ser detectada (e.g. espectrofotometria com lentes térmicas, na qual é detectada a alteração do índice de refração do meio em função da variação de temperatura).

c) Decomposição fotoquímica ou reação fotoquímica

A relaxação pode ocorrer também pela decomposição da espécie excitada M^* , dando origem a novas espécies, processo chamado de reação fotoquímica:



Em síntese, considera-se que as medidas de absorção criam um mínimo de perturbação no sistema em estudo, porque o tempo de vida das espécies excitadas é muito curto e a quantidade de calor liberada é pequena. Exceção é feita quando ocorrem reações fotoquímicas e em espectrometria de absorção atômica.

V. Lei de Beer

Quando um feixe de radiação de comprimento de onda definido e de intensidade I_o incide sobre uma amostra, uma parte desta energia é absorvida (I_a), uma parte é transmitida (I_t) e outra é refletida ou espalhada (I_r), de forma que:

$$I_o = I_a + I_t + I_r$$

Sob o ponto de vista de instrumentação, I_r pode ser mantido constante (ou mesmo compensado) fixando-se as condições de medida (e.g. usando celas semelhantes para as medidas na presença e ausência de absorção) e evitando a presença de sólidos em suspensão que poderiam causar espalhamento de radiação). Nestas condições, a absorção da radiação dependerá do caminho percorrido no meio absorvente e da concentração da espécie considerada, ou seja, do número total de espécies absorventes que interagem com o feixe de radiação.

Em 1729, Bouguer estabeleceu a relação entre a absorção de radiação e o espaço percorrido no meio absorvente, sendo que em 1760 esta mesma relação foi descrita matematicamente por Lambert. Em 1852, Beer e Bernard, simultânea e independentemente, demonstraram que a fração da radiação absorvida por um meio absorvente, com uma determinada espessura, é proporcional à concentração da

espécie absorvente. O resultado destas duas observações foi expresso por uma equação relacionando a absorção da radiação com a concentração da espécie absorvente e com o caminho ótico da cela de medida:

$$A = abc = \log \frac{I_o}{I_t} \quad (6)$$

onde: A = absorbância (ou absorvância)

a = absortividade

b = espessura do meio absorvente (caminho ótico)

c = concentração da espécie absorvente.

Esta equação representa a expressão mais usual da Lei de Bouguer – Lambert – Beer – Bernard, mais conhecida como Lei de Beer, a qual se constitui na lei fundamental da espectrofotometria. Observa-se que a absorção da radiação depende do número total de centros absorventes, ou seja, do produto da concentração da espécie absorvedora pela espessura. É importante mencionar que a razão I_t/I_o denota a fração da radiação transmitida, a qual é denominada transmitância (T). Então, as seguintes relações podem ser utilizadas:

$$A = -\log T = \log \frac{1}{T} = a b c \quad (7)$$

Em espectrometria UV-Vis, as amostras são predominantemente constituídas por soluções confinadas em cubetas, para se procederem as medidas de absorção, conforme ilustrado na Figura 6.

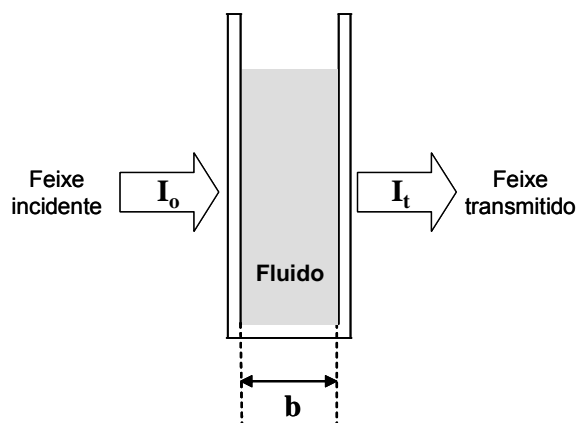


Figura 6. Cubeta com solução absorvente: I_0 e I_t correspondem às potências radiantes incidente e emergente (transmitida), b é a largura interna da cubeta (caminho óptico) e o fluido contém teor c da espécie absorvente.

Neste caso, desde que as medidas sejam feitas em cubetas idênticas, I_r pode ser desprezado porque a quantidade de radiação espalhada e refletida pelas paredes da cubeta é constante. Desta forma, apenas os valores de I_0 e I_t são considerados.

Em espectrofotometria UV-Vis, os parâmetros da Lei de Beer são geralmente particularizados como se segue:

- a = absortividade.** Quando a concentração do analito é expressa em mol l^{-1} , a constante a é denominado **absortividade molar (ϵ)**. Esta constante é característica de cada espécie química e é sempre referida a um determinado comprimento de onda, geralmente o de maior absorção (λ_{max}).
- b = espessura do meio absorvente.** Corresponde à largura interna da cubeta, expressa geralmente em cm.
- c = concentração da espécie química.** Pode ser expressa em mol l^{-1} ou outra unidade conveniente (mg l^{-1} , $\mu\text{g l}^{-1}$, por exemplo)

Consistentemente com a equação 7, a absortividade molar é expressa em $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. De um modo geral, métodos com boa sensibilidade são aqueles envolvendo absortividades molares maiores do que $10^4 \text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

A magnitude da absorptividade molar depende da secção de choque de captura do fóton pela espécie absorvente (S), bem como da probabilidade da ocorrência da transição eletrônica (P) considerada. A relação empírica entre a absorptividade molar e estes parâmetros pode ser expressa por:

$$\varepsilon = 8,7 \cdot 10^{19} P S$$

Para moléculas orgânicas típicas, S é da ordem de 10^{-15} cm^2 , ao passo que as probabilidades de transição variam entre 0 e 1. Para transições permitidas, de acordo com a mecânica quântica, os valores de P variam de 0,1 a 1, o que implica em valores de absorptividades molares entre 10^4 e 10^5 . Para transições proibidas, as probabilidades de transição são menores do que 0,01, de tal forma que valores de absorptividades molares menores do que 10^3 são observados.

Na prática, a absorptividade pode ser empregada para se estimar a mínima concentração detectável de uma espécie química, fornecidos o caminho ótico (b) e a menor absorbância mensurável. Assim, supondo um equipamento com boa estabilidade, o menor valor mensurável de absorbância diferente de 0,000 é de 0,001. Por exemplo, empregando-se o método de determinação de ferro com 1,10 fenantrolina ($\varepsilon = 1,1 \cdot 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 512 nm) em espectrofotômetro com cubeta com $b = 1,0 \text{ cm}$, a concentração mínima detectável de ferro, C_{min} , pode ser calculada:

$$C_{min} = \frac{A}{bc} = \frac{0,001}{1,1 \cdot 10^4 \cdot 1} = 9,1 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1} \text{ Fe}$$

Esta concentração pode ser expressa em $\text{mg l}^{-1} \text{ Fe}$:

$$C_{min} = 9,1 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1} \times 55,85 \text{ g mol}^{-1} = 5,1 \cdot 10^{-6} \text{ g l}^{-1} \text{ Fe}$$

ou

$$C_{min} \cong 0,0051 \text{ mg l}^{-1} \text{ Fe ou } 5,1 \text{ } \mu\text{g l}^{-1} \text{ Fe}$$

Evidentemente, este valor mínimo é considerado em ausência de incertezas nas medidas de absorbância e ausência de espécies químicas interferentes, aspectos que serão discutidos oportunamente.

VI. Espectrofotômetros

Um instrumento típico é constituído de:

- uma fonte de radiação estável;
- um recipiente para a amostra, transparente à radiação incidente;
- um sistema que permita isolar uma região restrita de comprimentos de onda do espectro eletromagnético;
- um transdutor (detector) para conversão de energia radiante em energia elétrica;
- um processador de sinais.

A Figura 7 mostra um diagrama de blocos de um espectrofotômetro de feixe único, também denominado, coloquialmente, de espectrofotômetro simples feixe.

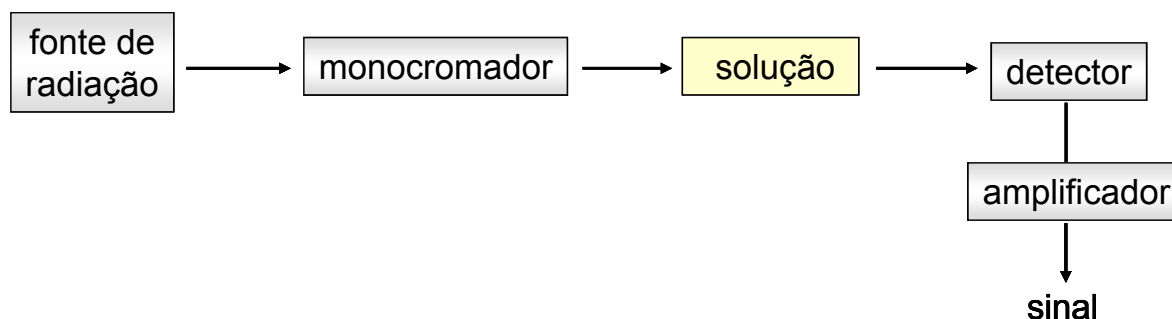


Figura 7. Diagrama de bloco de espectrofotômetro com feixe único.

Nota: Apesar do uso coloquial, a IUPAC não recomenda o uso do termo “colorímetro”. Em alguns casos, a baixa resolução espectral muda o nome de espectrofotometria para fotometria, por exemplo quando filtros são utilizados para a seleção da faixa de radiação incidente.

Fontes de radiação.

Idealmente, uma fonte deve ser estável e emitir um feixe de radiação com intensidade suficiente para ser detectável mesmo após sua monocromação e absorção parcial. A sua estabilidade está, em geral, associada à sua fonte de alimentação, a qual é geralmente regulada. Em alguns instrumentos, o problema da instabilidade da fonte é superado dividindo-se o feixe de radiação em dois (equipamentos de duplo feixe). Como fontes de radiação, em geral são empregadas fontes contínuas.

Lâmpadas de filamento de tungstênio. Apresentam emissão apreciável na faixa de 320 a 2500 nm, sendo largamente utilizadas para a região visível (400 a 700 nm) e do infravermelho próximo (NIR). Estas lâmpadas consistem de um filamento de tungstênio, que se torna incandescente pela passagem de corrente elétrica (aquecimento resistivo). O filamento é mantido em atmosfera inerte (argônio) dentro de um bulbo de vidro transparente à radiação emitida. O espectro de emissão da lâmpada se assemelha ao espectro de emissão contínua de um corpo negro (lâmpada usualmente opera a temperatura entre 2500-3000°C). A elevação da temperatura desloca o máximo de emissão para regiões de menores comprimentos de onda, ou seja, do infra-vermelho próximo para o visível. Desta forma, para evitar flutuações da emissão da fonte, é necessário que o filamento atinja uma temperatura constante, o que justifica ligar a lâmpada no mínimo 10 min antes das medidas.

Lâmpadas de tungstênio-halogênio. Contém uma pequena quantidade de iodo dentro do envelope de quartzo onde está também o filamento de tungstênio. Apresenta vida útil superior à lâmpada de tungstênio comum. O iodo adicionado reage com vapor de tungstênio, formando WI_2 que se redeposita sobre o filamento aquecido na forma de tungstênio.

Lâmpadas de deutério. A lâmpada de deutério consiste de um invólucro de vidro com uma janela de quartzo (sílica fundida), preenchido com gás deutério (ou hidrogênio) a baixa pressão (Figura 8). Produz um espectro contínuo útil na região entre 160 e 375 nm, sendo geralmente usada para medidas na região entre 200 e 400 nm. A emissão é produzida por excitação elétrica do gás. A corrente de descarga entre 2 eletrodos excita as moléculas de deutério formando moléculas

excitadas D_2^* . Estas moléculas se dissociam liberando energia na forma de um contínuo na região UV:

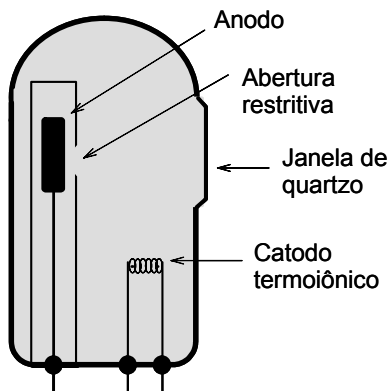


Figura 8. Corte esquemático de uma lâmpada de deutério.

A Figura 9 mostra como varia a intensidade de emissão das lâmpadas de deutério e de filamento de tungstênio em função do comprimento de onda. Idealmente, a intensidade de emissão deveria ser aproximadamente constante para todas as frequências da região espectral considerada, mas não é o que se observa com as fontes de radiação mencionadas

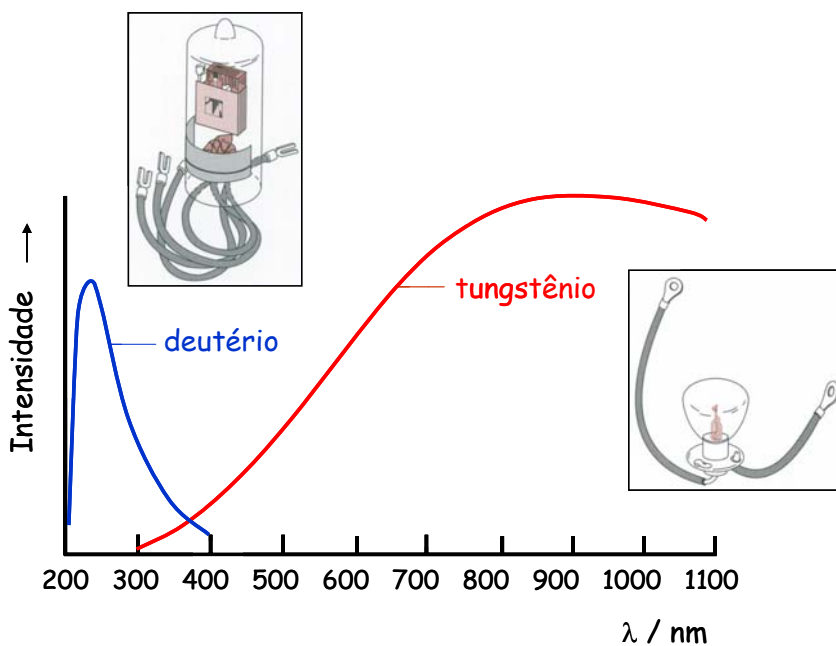


Figura 9. Espectros de emissão de fontes contínuas de deutério e de filamento de tungstênio. Adaptada da referência 7.

Outras fontes de radiação usadas em espectrometria UV-Vis são os diodos emissores de luz (LED's), lâmpadas de xenônio e lasers.

Recipientes de amostra

Usualmente denominados cubetas, são construídos de material transparente à radiação na região espectral de interesse. Suas janelas devem ser perfeitamente normais à direção do feixe incidente, de forma a serem minimizadas as perdas por refração. Tais perdas são mais pronunciadas em cubetas cilíndricas. Dentre os materiais para sua confecção destacam-se o vidro borossilicato, transparente entre 380 e 2000 nm, e o quartzo ou sílica fundida (transparente entre 160 e 3500 nm) invariavelmente utilizados para medidas conduzidas na região ultravioleta (Figura 10). Cubetas de plástico descartáveis (normalmente construídas em acrílico) podem ser empregadas na região visível.



Figura 10. Cubetas retangulares de quartzo com 10,00 mm de caminho óptico: (a) convencional e (b) para sistemas de injeção em fluxo, produzidas pela Hellma.

Seleção de comprimentos de onda

Rigorosamente, a lei de Beer somente é obedecida para feixes de radiação monocromáticos. Como fontes de emissão contínuas são normalmente empregadas, é necessário o emprego de seletores de comprimentos de onda (filtros de absorção ou interferência e monocromadores). O emprego de uma banda mais estreita de

radiação também tende a melhorar a sensibilidade e a seletividade das medidas espectrofotométricas.

O efeito da banda passante (permitida pelo monocromador) na absorvidade pode ser melhor compreendido com auxílio da Figura 11. O ponto de máximo do espectro de absorção corresponde à máxima absorbância e, conseqüentemente, à máxima absorvidade. Desta forma, quando um feixe de radiação de largura espectral muito pequena ($1 - 1'$) e comprimentos de onda próximos àquele de máxima absorção forem utilizados, a absorvidade experimental será praticamente igual à teórica, assumindo valor máximo. Se a seleção de comprimentos de onda for feita para bandas passantes maiores, a absorbância medida será a média das absorbâncias relativas aos intervalos de comprimentos de ondas considerados ($2 - 2'$ e $3 - 3'$). A absorvidade média será, então, menor do que a teórica.

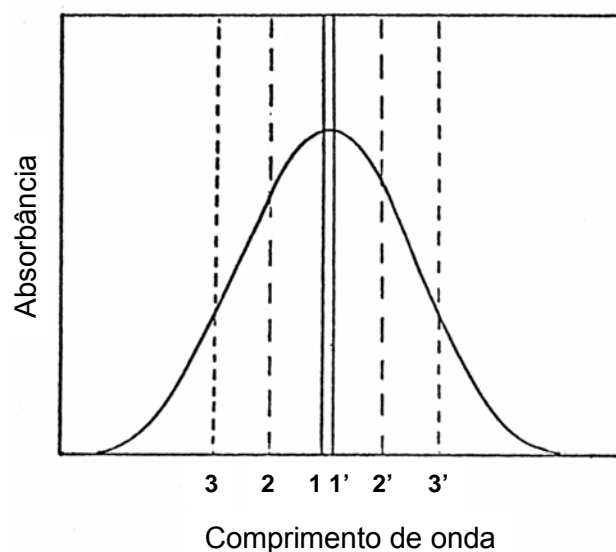


Figura 11. Dependência entre absorvidade molar e largura espectral (adaptada de Marczenko, 1976)

A seleção de comprimentos de onda é geralmente feita com monocromadores. Os conjuntos monocromadores permitem uma variação contínua de comprimentos de onda ao passo que os filtros selecionam uma região de comprimentos de onda.

De um modo geral, os filtros são utilizados em equipamentos mais simples que operam na região visível. Os filtros transmitem radiações com uma largura de banda efetiva que varia, geralmente, entre 20 e 50 nm. A largura da banda efetiva, largura espectral instrumental ou simplesmente banda passante é a faixa de comprimentos de onda onde a transmitância atinge metade de seu valor máximo (Figura 12).

Filtros de absorção de vidro ou de polímeros coloridos são comumente empregados. Os chamados filtros de interferência apresentam como vantagens bandas passantes mais estreitas e melhor transmissão de radiação (Figura 13). Existem filtros que fornecem bandas passantes estreitas, mas que absorvem uma fração significativa da radiação desejada. Em alguns casos, a transmitância é de apenas 10%.

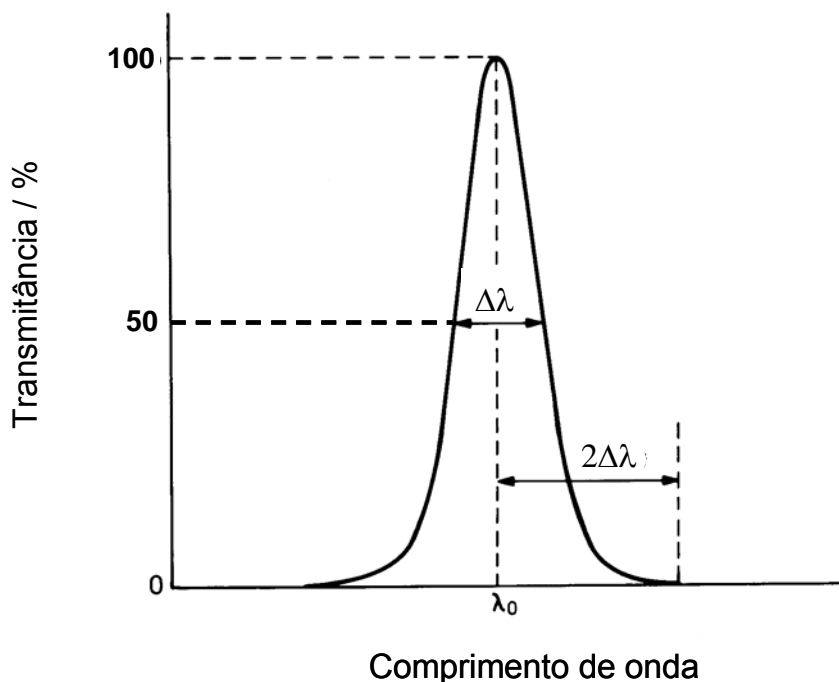


FIGURA 12. Ilustração da largura espectral ($\Delta\lambda$)

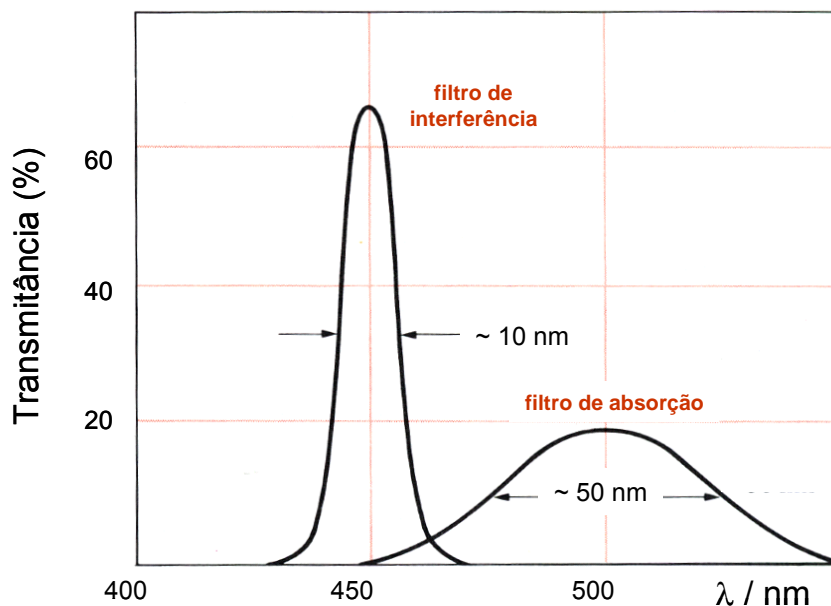


Figura 13. Transparência e largura espectral de dois tipos de filtros. Adaptada da referência 7.

A seleção de comprimentos de onda também pode ser feita por meio de monocromadores. Todos os monocromadores são constituídos por uma fenda de entrada, um espelho colimador (ou uma lente) para produção de feixe paralelo de radiação, um prisma ou uma rede de difração para a dispersão da radiação e um espelho focalizador (ou lente) para projeção das imagens formadas sobre um plano focal onde reside uma fenda de saída. A Figura 14 mostra um tipo de monocromador com rede, bastante utilizado em espectrofotômetros, cuja fenda de entrada é iluminada por uma fonte de radiação contínua,. A radiação passa através de fenda de entrada retangular, é colimada pelo espelho côncavo e atinge a superfície da rede de difração. Nesta rede, ocorre uma dispersão angular que promove a separação das radiações de diferentes comprimentos de onda. Finalmente, com auxílio do segundo espelho côncavo, a radiação de comprimento de onda desejado é focalizada diretamente na fenda de saída.

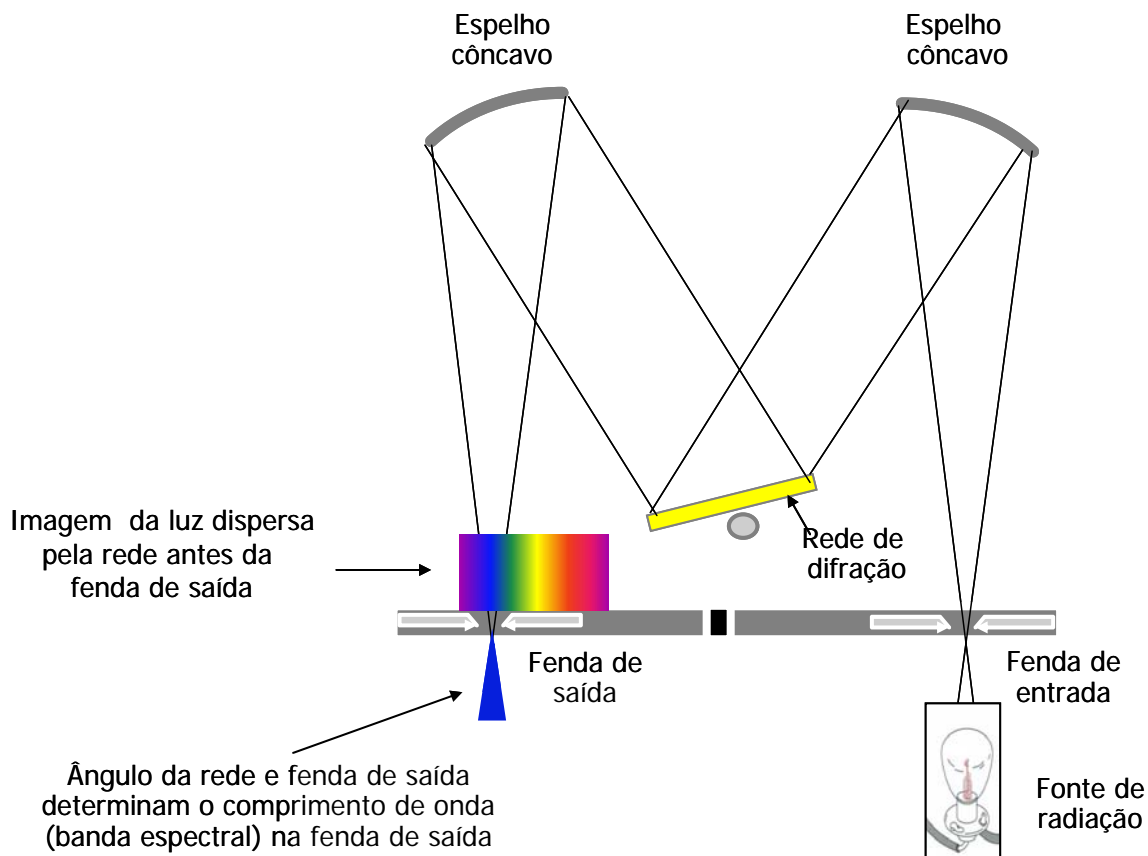


Figura 14. Ilustração de um monocromador Czerny-Turner com fonte de radiação iluminando a fenda de entrada, dispersão da radiação por uma rede de difração e seleção do comprimento de onda através da fenda de saída.

Detectores de radiação

Os primeiros detectores utilizados foram o olho humano e as emulsões fotosensíveis (filmes fotográficos). Nos espectrofotômetros são utilizados transdutores que convertem a energia radiante em sinal elétrico. Idealmente, um detector deve apresentar alta sensibilidade, alta razão sinal / ruído e resposta para uma faixa considerável de comprimentos de onda. Além disto, é fundamental que o tempo de resposta seja bastante curto e que, na ausência de iluminação, o sinal gerado seja o menor possível. Finalmente, o sinal elétrico produzido pelo transdutor deve ser proporcional à intensidade de radiação (I). Assim, se S é a resposta elétrica em termos de corrente, voltagem ou resistência e k é uma constante de calibração, $S = k \times I$.

A maioria dos detectores apresenta uma pequena e constante resposta na ausência de radiação a qual é denominada corrente de fundo, do inglês “dark current”. Entretanto, a maioria dos equipamentos possui um circuito eletrônico que compensa esta corrente.

Em espectrofotômetros UV-Vis são utilizados transdutores que respondem à radiação incidente, os quais são denominados detectores fotoelétricos ou transdutores fotônicos. Estes transdutores têm uma superfície ativa capaz de absorver a energia da radiação. Em alguns casos, a absorção da radiação promove uma emissão de elétrons produzindo uma fotocorrente. Em outros, a absorção da radiação promove aumento da condutividade, o fenômeno sendo denominado de fotocondução. Para radiação infravermelha, transdutores sensíveis ao calor são geralmente utilizados.

Existem vários tipos de detectores fotoelétricos:

- a) Células fotovoltaicas. A energia radiante gera uma corrente elétrica na interface de uma camada semi-condutora e um metal. Estas células são usadas principalmente na região do visível.
- b) Válvulas fotoelétricas. A energia radiante provoca emissão de elétrons quando incide em uma superfície sólida de material adequado (efeito fotoelétrico). Estas células são usadas nas regiões UV e visível.
- c) Válvulas fotomultiplicadoras. A energia radiante causa emissão (ejeção) de elétrons de uma superfície sólida (cátodo semi cilíndrico), também por efeito fotoelétrico. Os elétrons ejetados são acelerados em direção a um eletrodo (dinodo), a uma diferença de potencial da ordem de 90 V em relação ao cátodo, removendo outros elétrons que são acelerados para a superfície de um segundo dinodo, e assim sucessivamente, resultando em uma “cascata de elétrons”(amplificação em cascata). Tipicamente, 10^7 elétrons são coletados no anodo para cada fóton incidente no catodo. As válvulas fotomultiplicadoras apresentam excelente desempenho em termos de sensibilidade para a região UV-Vis (Fig.15), com resposta muito rápida.

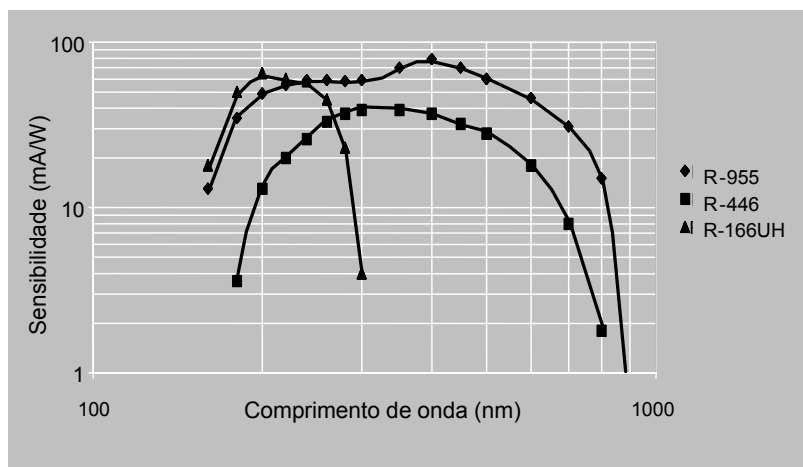


Figura 15. Respostas relativas de válvulas fotomultiplicadoras (cortesia Varian).

d) Fotodiodos de silício (detectores de fotocondutividade). Os fótons aumentam a condutância através de uma junção p-n reversamente polarizada. São usados também nas regiões visível e UV. Os fotodiodos são semi-condutores, normalmente obtidos por dopagem em silício que, quando inversamente polarizados resultam na separação de cargas elétricas e, conseqüentemente, em baixa condutividade elétrica na ausência de radiação. A absorção de radiação com energia apropriada promove a formação de elétrons e lacunas, provocando um fluxo de corrente proporcional à intensidade (potência) do feixe de radiação.

NOTAS:

i) Existem instrumentos cujo transdutor é constituído por um arranjo (normalmente linear) de diodos (do inglês “diode array”) fotossensíveis. Em geral estes dispositivos empregam de 512 a 4096 elementos sensíveis e permitem a detecção simultânea de radiações de comprimento de onda na faixa de 200 a 800 nm com resolução ao redor de 1 nm. Neste caso, todos os elementos do espectro são observados simultaneamente, em contraste com os chamados espectrofotômetros de varredura ou monocanais (Figura 16). Espectrômetros portáteis são produzidos comercialmente usando este detector, empregando módulos independentes (fonte de radiação, suporte para a cubeta e interface contendo o monocromador e o arranjo de fotodiodos) conectados por fibras ópticas (Figura 17).

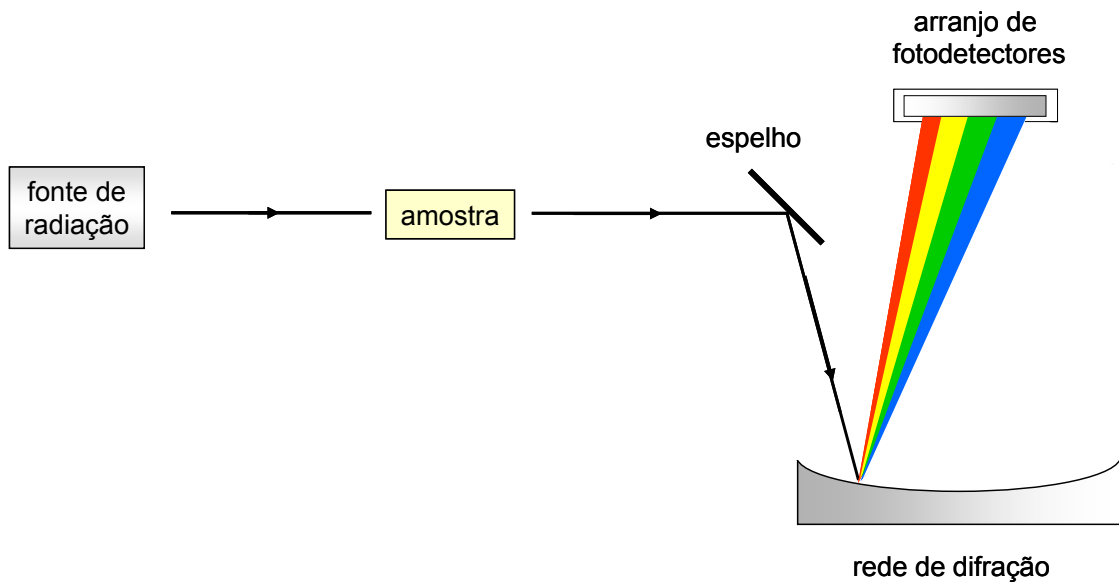


Figura 16. Diagrama de blocos de um espectrofotômetro multicanal.

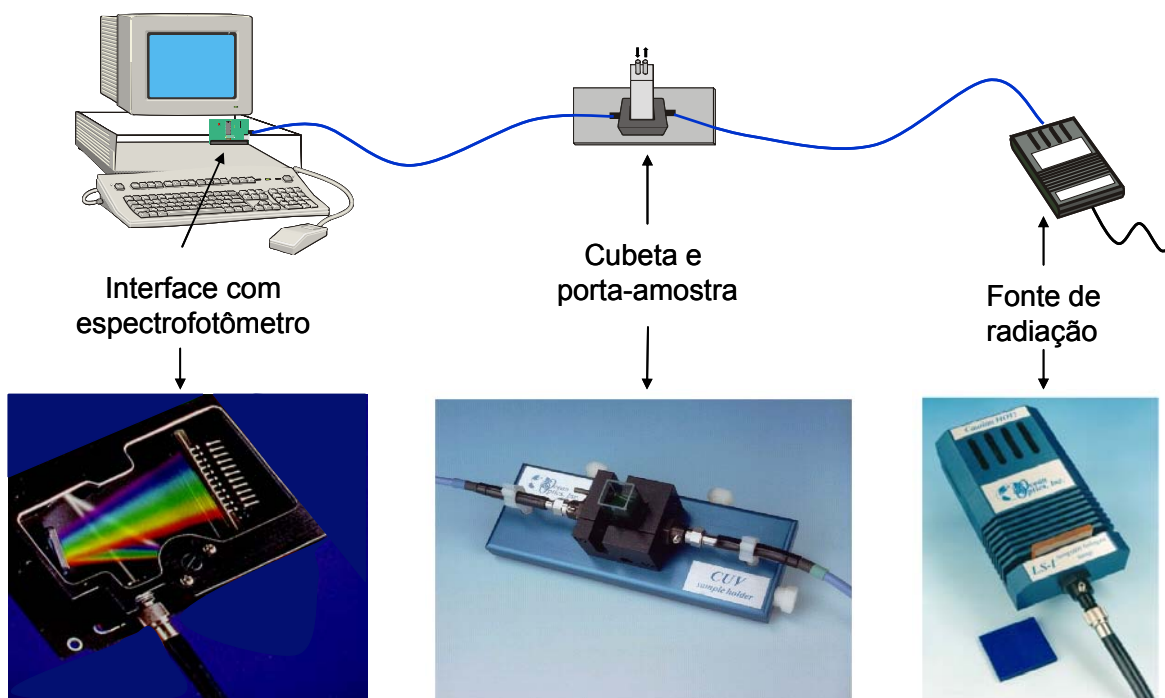


Figura 17. Espectrofotômetro multicanal com transmissão de luz através de fibras ópticas e detecção com arranjo linear de fotodiodos (Adaptado de Ocean Optics Inc.)

ii) Detectores fotoacústicos são utilizados para espectrofotometria UV-Vis de sólidos, semi-sólidos e soluções turvas. Para detalhes, veja, por exemplo: A. ROSENCWAIG, Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy, Wiley, N. York, 1980, ou J.F. McChelland, Anal. Chem. 55 (1983) 89.

Espectrofotômetros feixe único vs duplo feixe

Como o próprio nome indica, espectrofotômetros de feixe único (também denominados de *simples feixe*) são instrumentos que operam com um único feixe de radiação, o qual vai da fonte ao detector, passando diretamente pelo sistema de seleção de comprimento de onda e pela amostra, ou vice-versa. Os espectrofotômetros de duplo feixe têm seu feixe de radiação original dividido em dois, um dos quais passa pela referência e o outro pela amostra. Existem dois tipos de espectrofotômetros de duplo feixe. Em um tipo, os dois feixes são separados no espaço e simultâneos no tempo; no outro, os feixes são alternados no tempo e quase coincidentes no espaço.

Comparativamente aos espectrofotômetros duplo feixe, os espectrofotômetros de feixe único

- a) são mais simples em construção e, conseqüentemente, de menor custo;
- b) apresentam maior razão sinal/ ruído e, conseqüentemente, melhor limite de detecção;
- c) podem apresentar maior instabilidade com o tempo (“drift”) causada por alterações na resposta do detector ou na emissão da fonte;

Espectrofotômetros duplo feixe (Figura 18) são caracterizados por:

- a) compensação automática de eventuais variações na intensidade de emissão da fonte;
- b) obtenção de espectros de maneira bastante simples, envolvendo menor número de operações relativamente aos espectrofotômetros de feixe único.

- c) menor razão sinal/ruído. Em todos os espectrofotômetros ocorre uma diminuição na intensidade da radiação (I_0) durante o transporte em direção ao detector. Esta diminuição ocorre em cada componente óptico colocado no trajeto (lentes, espelhos, elementos dispersores, fendas). Assim, por exemplo, um feixe pode ser atenuado de 10 a 30% quando é refletido por um simples espelho. Os espectrofotômetros de duplo feixe possuem entre 10 e 15 elementos no trajeto da radiação, ao passo que, em um feixe único, este número varia geralmente de 3 a 6. Conseqüentemente, em um espectrofotômetro de duplo feixe, a intensidade de radiação que incide na amostra é menor do que num feixe único, partindo de uma mesma fonte de radiação.
- d) exigência de cubetas idênticas para amostra e para a referência.

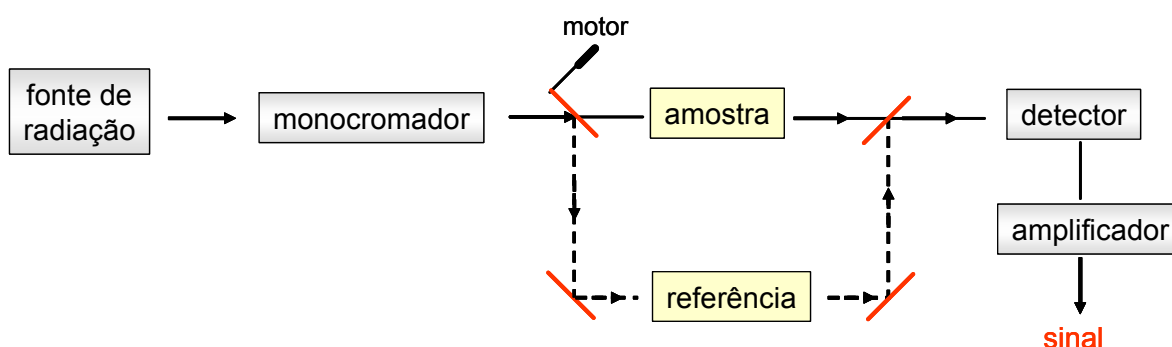


Figura 18. Diagrama de blocos de um espectrofotômetro de duplo feixe.

Face ao exposto, um dos principais fabricantes de espectrofotômetros do mundo, que havia colocado no mercado o primeiro duplo feixe comercial, decidiu investir num modelo feixe único equipado com microprocessador para controle, aquisição de dados, processamento e arquivo. As desvantagens inerentes ao tempo de processamento das amostras foram significativamente diminuídas, sendo comparáveis às do duplo feixe. Com eletrônica mais moderna, incluindo circuitos de realimentação, flutuações na alimentação da fonte de radiação são desprezíveis.

Pode-se então afirmar que, modernamente, os espectrofotômetros feixe único são equipamentos perfeitamente adequados para as análises quantitativas, quando

um único comprimento de onda é utilizado, face à razão sinal / ruído mais favorável. Para a obtenção de espectros de absorção, a escolha pode recair ou num equipamento de feixe único multicanal ou num duplo feixe tradicional.

VII. Limitações da Lei de Beer

A linearidade da função $A = f(c)$ pode não ser observada em algumas aplicações analíticas. Os principais fatores que determinam desvios da Lei de Beer são discutidos a seguir.

A Lei de Beer pode ser aplicada com sucesso somente para descrever o comportamento da absorção de soluções diluídas. Em altas concentrações, a absorvidade sofre pequena alteração em função de interações intermoleculares e da força iônica do meio. Em soluções muito concentradas, desvios determinados pela variação da absorvidade com o índice de refração da solução também podem ocorrer. Com relação à medida espectrofotométrica, a mesma é limitada pela quantidade de luz transmitida que diminui com o aumento da concentração da espécie absorvente. Na prática, recomenda-se a diluição da amostra para superação destes efeitos de forma que as leituras sejam menores que 1,0 de absorbância (10% de transmissão), visando minimizar erros associados às medidas instrumentais de I_t (ver equação 6).

De um modo geral, as principais limitações à aplicabilidade da Lei de Beer são devidas a algumas características instrumentais e, muitas vezes, às reações químicas envolvidas.

No caso de limitações causadas por reações químicas, os desvios podem aparecer quando a espécie química de interesse sofre processos de dissociação, associação ou mesmo interação com o solvente. Soluções aquosas de cromato de potássio constituem-se em exemplo clássico deste tipo de desvio. Nesta solução existem os íons CrO_4^{2-} , HCrO_4^- e $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, os quais absorvem radiação em diferentes extensões (apresentam valores distintos de absorvidade molar). As concentrações relativas destas espécies dependem da concentração total de crômio(VI) na solução e do pH.

Limitações podem também ser devidas à insuficiência da concentração do reagente. Evidentemente, o efeito desta insuficiência será mais pronunciado sob maiores concentrações do analito, situação onde maior concentração do reagente é requerida. Como consequência, desvio negativo da Lei de Beer é observado.

É importante salientar que estrita aderência à Lei de Beer somente é observada com radiação verdadeiramente monocromática. Na prática, estes desvios são pouco significativos quando a largura da banda de emissão é inferior a 10 nm. Este fenômeno pode ser explicado com o auxílio da Figura 19, a qual mostra os espectros de absorção de duas soluções preparadas a partir do mesmo soluto colorido (B = solução mais diluída; C = solução mais concentrada) e a largura da banda de radiação transmitida. Observa-se que a área 1 – 2 – 2' – 1' sob o espectro de absorção da solução B situa-se dentro da banda passante. As sub-áreas 2 – 3 – 4 e 2' – 3' – 4' da área 1 – 3 – 3' – 1' sob a curva do espectro da solução C estão fora da banda passante transmitida pelo monocromador. Conseqüentemente, a absorbância aumenta menos com o aumento da concentração que o previsto pela lei de Beer. O resultado deste efeito é um desvio negativo (Figura 20). Assim, quanto mais estreita for a banda passante, menor a possibilidade de ocorrência de desvios da Lei de Beer. O efeito da radiação policromática é mais evidente em instrumentos de baixa resolução espectral (banda passante > 20 nm). Deve aqui ser salientado que este efeito se pronuncia quando as medidas são conduzidas fora da região de máxima absorção o que deve, sempre que possível, ser evitado.

Finalmente, a linearidade da função $A = f(c)$ pode ser também ser prejudicada pela radiação difusa (“stray light”) durante as medidas. O efeito é mais pronunciado para maiores absorbâncias ou seja, quando a luz transmitida é fator limitante na medida. A radiação difusa pode ser considerada como uma “contaminação” da radiação monocromática utilizada para as medidas, sendo oriunda da radiação espalhada por poeira e manchas nas superfícies óticas; de imperfeições nas superfícies óticas de espelhos, lentes e paredes da cubeta; da radiação espalhada por difração nas fendas e das múltiplas reflexões após a saída do monocromador.

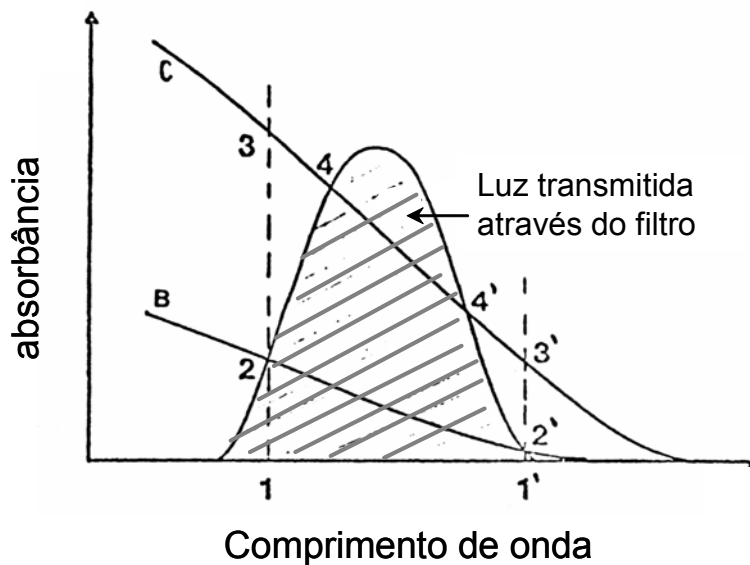


Figura 19. Efeito da radiação policromática na Lei de Beer (adaptada de Marczenko, 1976)

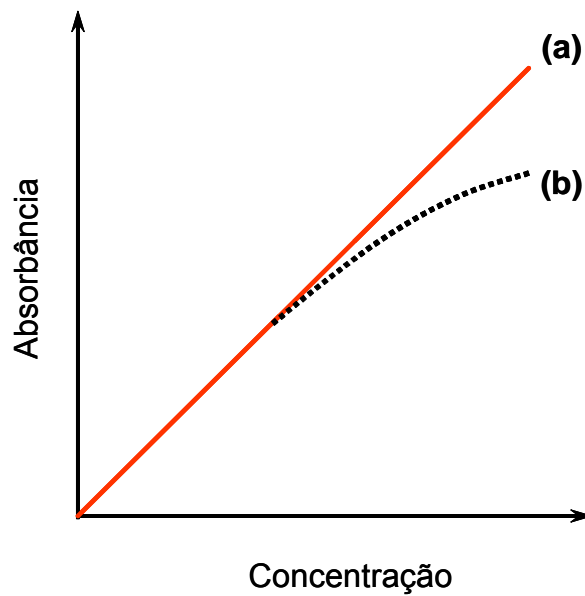


Figura 20. Curvas analíticas: (a) prevista pela Lei de Beer; (b) com desvio negativo da Lei de Beer.

Em geral, o efeito é mais sério nos extremos da faixa espectral do operação do espectrofotômetro. Saliente-se que os valores de radiação difusa apresentados pelos fabricantes se referem a instrumentos novos e que tais valores aumentam com o envelhecimento dos componentes ópticos. Os comprimentos de onda da radiação difusa freqüentemente variam bastante com comprimento de onda selecionado. Quando as medidas são realizadas na presença de radiação difusa significativa, a absorbância (A') será:

$$A' = \frac{I_o + i}{I_t + i}$$

onde i é a intensidade da radiação difusa. A Figura 21 ilustra os efeitos da radiação difusa (expressa em porcentagem de I_o) na curva analítica.

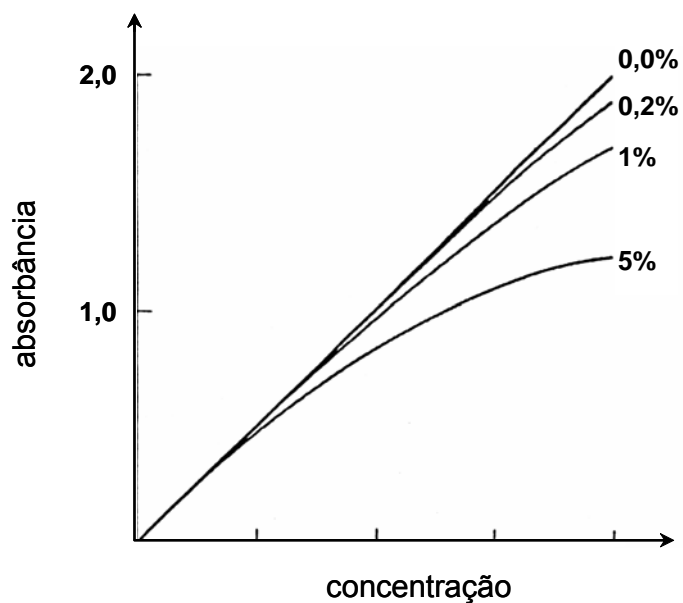


Figura 21. Desvios da Lei de Beer causados por radiação difusa de diferentes intensidades.

VIII. Análise multicomponente

Em espectrofotometria, é possível a determinação de mais de um constituinte em uma única solução. Supondo que uma solução contenha duas espécies absorventes, X e Y, a complexidade do problema dependerá da sobreposição dos espectros de absorção de X e de Y.

- a) Os espectros não se interpenetram ou se interpenetram parcialmente (Figura 22a), de tal maneira que é possível selecionar um comprimento de onda no qual o componente X absorve e Y não, e vice-versa. Nesta situação, X não interfere na medida de Y e vice-versa, as medidas sendo efetuadas em λ_1 e λ_2 .
- b) Um dos espectros é totalmente interpenetrado pelo outro (Figura 22b). Nesta situação, o componente X não interfere na medida do componente Y em λ_2 , mas Y absorve significativamente em todo espectro de X, inclusive em λ_1 . Em princípio, a solução deste problema é simples. A concentração de Y é determinada diretamente a partir da absorbância da solução em λ_2 . A contribuição de Y em λ_1 é calculada a partir do conhecimento da absorvidade molar de Y neste comprimento de onda. Esta contribuição é subtraída da absorbância da solução em λ_1 , de tal forma que a absorbância devida somente ao componente X é obtida. Isto é possível, uma vez que as absorbâncias são aditivas. A concentração é então calculada da maneira usual.
- c) A interpenetração dos espectros é severa (Figura 22c). Como não é possível encontrar nenhum comprimento de onda onde somente um dos componentes absorve, torna-se necessário resolver um sistema de duas equações a duas incógnitas. Se:

A_1 = medida de absorbância em λ_1

A_2 = medida de absorbância em λ_2

ax_1 = absorvidade molar de X em λ_1

ax_2 = absorvidade molar de X em λ_2

ay_1 = absorvidade molar de Y em λ_1

ay_2 = absorvidade molar de Y em λ_2

c_x = concentração molar de X

c_y = concentração molar de Y

b = largura da cubeta

e aplicando a lei da aditividade das absorbâncias,

$$A_1 = ax_1 \cdot b \cdot c_x + ay_1 \cdot b \cdot c_y$$

$$A_2 = ax_2 \cdot b \cdot c_x + ay_2 \cdot b \cdot c_y$$

Como as absorbâncias são medidas e as absorvidades molares são determinadas com auxílio de soluções puras de X e de Y, apenas as concentrações c_x e c_y são desconhecidas. O cálculo é feito, então, da maneira convencional.

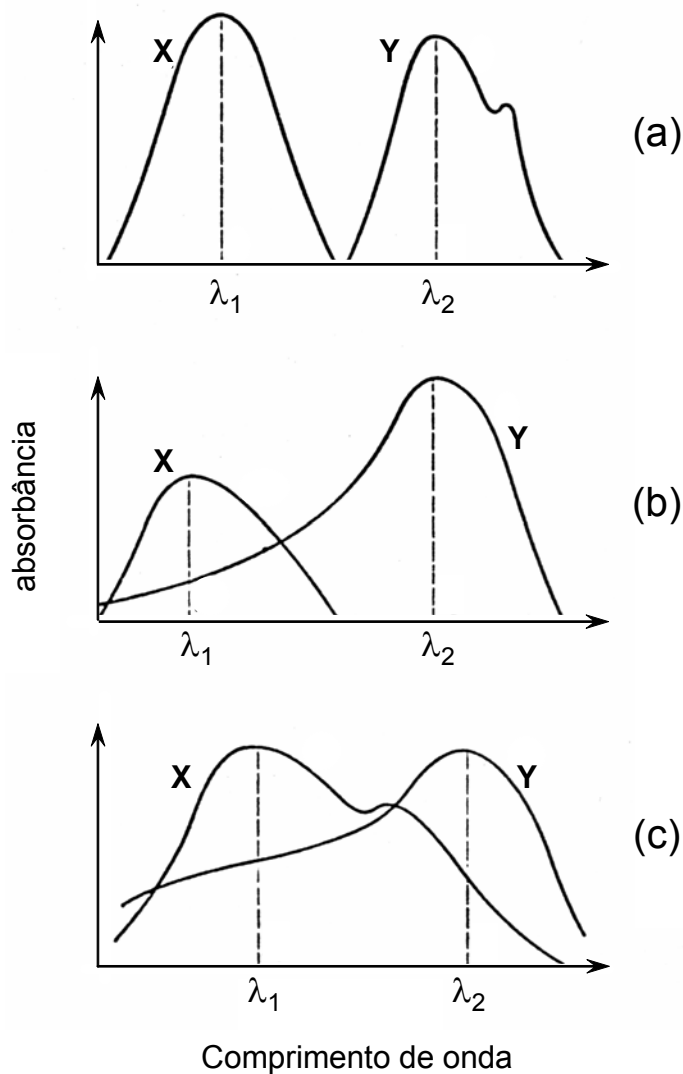


Figura 22. Espectros de absorção de dois componentes: (a) sem interpenetração; (b) interpenetração parcial; (c) interpenetração severa.

Em se tratando de n componentes, cálculo matricial é utilizado. Equipamentos mais modernos incluem detecção simultânea em n comprimentos de onda e “software” adequado para o cálculo envolvido. Assim, a utilização de espectrofotômetros com arranjo de diodos constitui-se em excelente opção. Este

tratamento requer que não ocorra interações intermoleculares, o que poderia afetar a aditividade dos valores de absorvância (efeitos sinérgicos ou antagônicos).

Deve-se finalmente salientar que recentemente tem sido apresentados programas computacionais específicos para análise espectral visando determinações multi-componente. Isto se constitui em uma das vertentes da quimiometria.

Referências Bibliográficas

1. W.R. Brode. Chemical Spectroscopy. Chapman, New York, 677 pp, 1943.
2. R.A. Day e A.L. Underwood. Quantitative analysis, 3^a Ed, Prentice Hall, Englewood Cliffs, 534 pp, 1974.
3. J. Ingle Jr e S.R. Crouch. Spectrochemical Analysis. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 590 pp, 1988.
4. Z. Marczenko. Spectrophotometric determination of elements, Ellis Horwood, Chichester, 641 pp, 1976.
5. W.J. Moore. Physical Chemistry, 3^a Ed, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 844 pp, 1962.
6. R.L. Pecsok. Modern methods of chemical analysis, John Wiley, New York, 480 pp, 1968.
7. D.A. Skoog. Principles of Instrumental Analysis, 3^a Ed, Saunders College, Tokyo, 879 pp, 1985.
8. D.A. Skoog, F.J. Holler e T.A. Nieman. Princípios de Análise Instrumental, 5^a Ed, Bookman, Porto Alegre, 836 pp, 2002.

9. H.H. Willard, L.L. Merrit, J.A. Dean e F.A. Settle. Instrumental methods of analysis, 6^a Ed, van Nostrand, New York, 1030 pp, 1981.

10. D.C. Harris, Análise Química Quantitativa, 6^a Ed, Rio de Janeiro, LTC, 876 pp, 2005.

11. M.L.S.S. Gonçalves, Métodos instrumentais para Análise de Soluções. Análise Quantitativa, 4^a Ed, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2001.

12. J.S. Fritz e G.H. Schenk, Quantitative Analytical Chemistry, 3^aEd, Allyn and Bacon, Boston, 689 pp, 1974.