**BLOCO 1**

**Experimento 1 – Absorção Molecular**

**Determinação espectrofotométrica do ferro em complexos vitamínicos**

**1. Objetivo**

Determinar o comprimento de onda de máxima absorção no visível empregando o espectrofotômetro de arranjo de diodos.

Traçar a curva analítica para as determinações quantitativas.

Determinar a concentração de ferro presente na amostra desconhecida.

Discutir os fundamentos teóricos da técnica de espectrofotometria.

**2. Materiais e reagentes**

• 9 balões volumétricos de 100 mL

• 3 balões volumétricos de 250 mL

• 3 béqueres de 100 mL

• 1 Pipeta volumétrica de 2 mL

• 1 Pipeta volumétrica de 3 mL

• 1 Pipeta volumétrica de 5 mL

• 1 Pipeta volumétrica de 10 mL

• 1 Pipeta volumétrica de 25 mL

• 1 Pipeta graduada de 10 mL

• 1 Bastão de vidro

• Pipeta de Pasteur

• pHmêtro

• Micropipeta (100-1000µL)

• Hidroquinona 1% (m/v) (**Preparada pelos técnicos antes do experimento**);

• Tampão Ácido cítrico/Citrato de sódio 0,02 mol/L pH 3,5 (**Preparada pelos técnicos antes do experimento**);

• Solução hidroalcoólica (90:10 v/v) de orto-fenantrolina 0,25% (m/v) (**Preparada pelos técnicos antes do experimento**);

• Solução padrão de ferro (40 mg. L-1)

• Comprimidos de sulfato ferroso

• 1 par de cubetas

**3. Procedimento Experimental**

**3.1. Preparo da Amostra**

Pesar 10 comprimidos do produto farmacêutico e calcular a massa média de uma unidade.

Pesar a massa da amostra correspondente à massa média de um comprimido e colocar em um béquer de 100 mL. Adicionar 10 mL de solução tampão e agitar até a dissolução da amostra. Transferir quantitativamente a solução para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água deionizada. Realizar este procedimento em triplicata.

Transferir, com a micropipeta, 500 µL da solução preparada anteriormente para um novo balão volumétrico de 250 mL. Adicionar 25 mL de tampão, 5,0 mL de solução aquosa de hidroquinona 1% (m/v) e 7,0 mL de solução hidroalcoólica de *o*-fenantrolina 0,25% (m/v). Completar o volume com água deionizada. Verificar o pH, que deverá ser próximo de 3,5. Realizar este procedimento em triplicata.

**3.2. Branco dos reagentes**

Em um balão volumétrico de 100 mL, pipetar 10 mL de solução tampão, 2,0 mL de solução aquosa de hidroquinona 1% (m/v) e 3,0 mL de solução hidroalcoólica de o-fenantrolina 0,25% (m/v). Completar o volume com água deionizada. Verificar o pH, que deverá ser de ~3,5.

**3.3. Curva Analítica**

Pipetar 1,00, 2,00, 3,00, 5,00 e 10,00 mL da solução padrão de ferro (40 mg/L) em balões volumétricos de 100 mL identificando-os como A, B, C, D e E respectivamente. Em seguida, adicionar em TODOS os balões, 10 mL de solução tampão, 2,0 mL de solução aquosa de hidroquinona 1% (p/v), 3,0 mL de solução hidroalcoólica de o-fenantrolina 0,25% (p/v) e completar o volume com água deionizada. Verificar o pH de cada solução, que deverá ser de ~3,5.

**4. Leitura da Absorbância**

Deixar **todas as soluções em repouso por pelo menos 20 minutos** antes de efetuar a leitura da absorbância. (A cor é estável, de forma que todas as soluções podem ser preparadas e todas as absorbâncias medidas de uma só vez).

Determinar o λmáx do complexo de ferro com o-fenantrolina, através do espectro VIS de absorbância versus λ (em diferentes comprimentos de onda) no espectrofotômetro com detector de arranjo de diodos. **Obs.: Utilizar uma das amostras da curva analítica.**

Medir a absorbância, no espectrofotômetro de comprimento de onda fixo, de cada amostra no λmáx.

**5. Questões:**

**1)** Construir a curva analítica (absorbância *vs* concentração de ferro (g/L)).

**2)** Calcule a concentração de Fe (*o*-fenantrolina)32+ na amostra (g/L ou mol/L) e determine a absortividade média (Ɛ, g-1 cm-1 L ou mol-1 cm-1 L) das cinco leituras de absorbâncias. (Lembre-se que todo ferro foi convertido no complexo de fenantrolina).

**3)** Usando a curva analítica, calcule a massa (mg/g) de ferro no comprimido.

**4)** Faça um esquema e explique os diferentes sistemas de detecção dos espectrofotômetros de comprimento de onda fixo e arranjo de diodos (DAD).

**5)** O que ocorreria se as leituras de absorbância das soluções fossem realizadas em comprimento de onda diferente do λmáx?

**6)** Explique a reação química que ocorre durante o preparo de amostra.

**7)** Anexe todos os seus resultados e cálculos junto ao relatório.

**8)** Uma amostra aquosa contendo Fe2+ é tratada com 1,10-fenantrolina para formar um complexo colorido para detecção. A solução tratada dá uma absorbância de 0,367 quando medida com uma cubeta de 1,00 cm em 510 nm. Em seguida, 5,0 mL de uma solução de Fe2+ 0,02 M são adicionados a 10,0 mL de amostra desconhecida e tratada com 1,10-fenantrolina da mesma forma que no exemplo anterior, constando-se uma absorbância de 0,538 em 510 nm. Com base nesta informação, qual a concentração de Fe2+ na amostra desconhecida original?

**6.0 Bibliografia**

HARRIS, Daniel C. *Análise química quantitativa.* 5ª ed. Rio de Janeiro, LTC, 1999.

**Experimento 2 - Fotometria de Chama**

**Determinação de Na+ e K+ em amostras**

**1. Objetivo**

 Familiarização com a técnica da espectroscopia de emissão atômica com auxílio de chama e sua aplicação à determinação dos metais alcalinos mais abundantes em amostras reais.

**2. Instruções gerais**

 Para realização do experimento, com uso dos equipamentos disponíveis no laboratório, deve-se seguir corretamente as instruções operacionais contidas no manual do fabricante.

**3. Materiais**

• Balão volumétrico de 10 mL (1)

• Balão volumétrico de 50 mL (11)

• Balão volumétrico de 500 mL (2)

• Balão volumétrico de 25 mL (2)

• Béquer de 100 mL (1)

• Béquer de 50 mL (7)

• Proveta de 10 mL (1)

• Pipeta volumétrica 5 mL (1)

• Pipeta graduada 5 mL (2)

• Pipeta de Pasteur (1)

• Micropipeta (100-1000 µL)

• Equipamento para fotometria de chama (1)

• Solução estoque NaCl 100 mg/L

• Solução estoque KCl 100 mg/L

• Suco de laranja

• Água de coco

• Shoyo normal e light

• Soro fisiológico

**Observações: Não lavar as vidrarias com detergente, somente com água deionizada.**

**4. Obtenção das curvas analíticas para análise de sódio e potássio:**

**(a)** Preparar 5 soluções (50 mL) contendo íons Na+ e K+ em conjunto. As concentrações finais de íons Na+ e K+, respectivamente, deverão ser: 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 mg. L-1. As soluções estoque de KCl e de NaCl contém 100 mg. L-1 de cada íon metálico.

**(b)** Preparar também uma solução (50 mL) aquosa contendo 10,0 mg. L-1 de Na+ e outra com 10,0 mg L-1 de K+.

**(c)** Ligar e ajustar o instrumento de acordo com as instruções no manual, utilizando água destilada para definir o zero da escala e a solução-padrão mais concentrada contendo Na+ e K+ para ajustar o limite superior da escala arbitrária de intensidade de emissão.

**(d)** Conferir as leituras com a solução de 10,0 mg. L-1, cada metal alcalino separadamente (a de Na+ deveria dar leitura idêntica à do item c para sódio e nula para K+ e vice-versa para a solução de K+).

**(e)** Determinar, sucessivamente, as intensidades de emissão das soluções padrão, em duplicata para cada concentração.

**(f)** Com o auxílio de uma proveta determinar a vazão com que a solução é aspirada (mL min-1).

**5. Determinação de Na+ e K+ nas amostras de suco de laranja, água de coco e nas amostras de molho Shoyo “normal” e “light” e soro fisiológico**

 De acordo com o especificado no rótulo dos produtos, diluir o conteúdo com água deionizada/ou água do Tipo 1 para que concentração das amostras estejam no intervalo da curva analítica.

* **Suco de laranja:** diluir 0,5 mL da amostra em um balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água deionizada.
* **Água de coco:**
	+ Para análise de sódio, diluir 1 mL da amostra em um balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água deionizada.
	+ Para análise de potássio: diluir 2,5 mL da solução anterior (utilizada para a determinação de sódio) em um balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água deionizada.
* **Soro fisiológico:** diluir 1 mL da amostra em um balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, diluir 0,4 mL desta solução para um balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água deionizada.
* **Shoyo:** diluir 1 mL da amostra para um balão volumétrico de 500 mL. Após pipetar 1 mL dessa solução para um balão volumétrico de 25 mL e completar o volume com água deionizada. **Repetir este procedimento para o shoyo light.**
* **Todos os grupos deverão fazer todas as amostras e curvas analíticas.**
* **Preparar as amostras em triplicata (Não é ler 3 vezes a mesma amostra!).**

Após terminar o experimento, deixe passar água destilada/ ou água do Tipo 1 pelo queimador por alguns minutos e, se não houver outro grupo esperando, desligue o aparelho, certificando-se de que a chama está apagada e o registro de gás, fechado.

**6. Questões**

**1)** Esquematizar o aparelho com o tipo correto de queimador, indicando o combustível, o comburente, a temperatura provável da chama e o consumo medido de amostra (mL.min-1). Não é para copiar na internet o equipamento. Desenhe um diagrama de blocos do mesmo.

**2)** Com os dados de leitura obtidos, construir as curvas analíticas para cada íon (triplicata para cada íon) e determinar o coeficiente de correlação e o resíduo da curva.

**3)** Determinar a quantidade de sódio e potássio nas amostras e conferir com o esperado (valor especificado no rótulo das embalagens). Calcular o erro relativo observado.

**4)** Calcule o desvio padrão relativo entre as amostras de cada produto analisado. Discuta esses resultados.

**5)** O Li foi determinado por emissão atômica, utilizando o método de adição de padrão. A partir dos dados constantes na tabela abaixo, encontrar a concentração de lítio na amostra desconhecida pura. O padrão de Li continha 1,62 µg Li/mL.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  **Amostra desconhecida (mL)** | **Padrão (mL)** | **Volume final (mL)** | **Emissão** |
| 10,0 | 0,0 | 100,0 | 309 |
| 10,0 | 5,00 | 100,0 | 452 |
| 10,0 | 10,0 | 100,0 | 600 |
| 10,0 | 15,0 | 100,0 | 765 |
| 10,0 | 20,0 | 100,0 | 906 |

**Experimento 3 – Absorção atômica**

**Determinação de Cobre em amostras de aguardente**

**1. Objetivo**

Nesta prática objetiva-se determinar a concentração de Cobre em aguardente de diferentes fabricantes e comparar com os valores preconizados na legislação (Norma NBR 13921). Cada grupo deve trazer uma amostra de aguardente de diferentes fabricantes (artesanal, industrializada, etc).

**2. Bibliografia adicional**

Norma NBR 13921 de agosto de 1997.

**3. Materiais e Reagentes**

• Balões volumétricos de 10 mL (1)

• Balões volumétricos de 25 mL (10)

• Balões volumétricos de 200 mL (1)

• Micropipeta (100 – 1000 µL)

• Pipeta volumétrica (20 mL) (1)

• Pipeta de Pasteur (1)

• Água deionizada / Tipo 1

• Solução padrão estoque de cobre de 1000 mg L-1

• Etanol 95% (v/v)

**3.1. Solução-padrão de cobre 100 mg. L-1.**

 A partir da solução estoque a 1000 mg L-1 preparar 10 mL de uma solução-padrão de cobre na concentração de 100 mg L-1.

**3.2. Solução hidro alcoólica a 40% (v/v) (aproximadamente)**

 A partir da solução estoque a 95% preparar 200 mL da solução hidroalcoólica a 40%.

**4. Determinação da concentração de cobre pela padronização externa e adição de padrão**

**4.1. Padronização externa**

Utilizando a micropipeta, transferir quantitativamente, 250 µL, 500 µL, 750 µL e 1000 µL da solução estoque de cobre 100 mg L-1 para balões volumétricos de 25 mL, completando o volume com a solução hidroalcoólica a 40%. Preparar também o branco, contendo apenas a solução hidroalcoólica a 40%. Fazer as leituras em duplicata empregando como comprimento de onda 324,7 nm.

**4.2. Amostra de aguardente**

Aspirar a amostra diretamente e determinar a concentração de cobre na aguardente.

**4.3. Determinação da concentração de cobre pelo método de adição de padrão**

Em 5 balões volumétricos de 25 mL, adicionar com o auxílio de uma pipeta volumétrica 20 mL de aguardente. Adicionar a cada um dos balões 0 µL, 250 µL, 500 µL, 750 µL e 1000 µL de solução estoque de cobre 100 mg L-1 e completar o volume com **água deionizada**. Realizar as leituras **em duplicata** empregando como comprimento de onda 324,7 nm.

**5. Questões:**

**1)** Construir as curvas analíticas obtidas pela padronização externa e pela adição de padrão. Determinar a concentração de cobre na aguardente pelos dois métodos de quantificação empregados (padronização externa e adição de padrão). Comparar os resultados obtidos e os coeficientes angulares das duas curvas analíticas.

**2)** A concentração determinada de cobre está de acordo com as normas da NBR?

**3)** Quando e porque o método de adição de padrão deve ser utilizado?

**4)** Porque a curva analítica obtida pelo método de padronização externa foi preparada em solução hidroalcoólica? Explique.

**5)** Explique a possível interferência nas leituras de absorbância de uma amostra de cachaça. O que devemos fazer para solucionar este problema?

**6)** Cromo foi determinado em uma amostra aquosa pipetando-se 10,0 mL de uma solução desconhecida em cada um dos cinco frascos volumétricos de 50,0 mL.Vários volumes de padrão contendo 12,2 mg L-1 de Cr foram adicionados aos frascos, e depois as soluções foram diluídas para o volume final.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Desconhecida (mL)** | **Padrão (mL)** | **Absorbância** |
| 10,0 | 0,0 | 0,201 |
| 10,0 | 10,0 | 0,292 |
| 10,0 | 20,0 | 0,378 |
| 10,0 | 30,0 | 0,467 |
| 10,0 | 40,0 | 0,554 |

**a)** Represente os dados em um gráfico.

**b)** Obtenha uma equação para a relação entre absorbância e o volume do padrão.

**c)** Calcule a concentração de Cr na amostra.

**Experimento 4 - Análise por Injeção em Fluxo (FIA)**

**Determinação de íons fosfato em amostras de Coca-Cola e Biotônico Fontoura**

**1. Determinação de íons fosfato**

Um método espectrofotométrico amplamente utilizado para determinação da concentração de fosfato é baseado em sua reação com molibdato de amônio e ácido ascórbico em meio ácido. Fosfato forma um heteropoliácido com molibdato, que é posteriormente reduzido por ácido ascórbico com a formação de um produto azul:



A determinação de fosfato pode ser implementada com o sistema FIA esquematizado a seguir:



Na posição mostrada na figura, a amostra é aspirada com uma seringa hipodérmica, preenchendo a alça de amostragem (L), enquanto o transportador (C, H2O) e os reagentes R1 (molibdato de amônio 2,5 mmol L-1 em meio HNO3 0,2 mol L-1) e R2 (ácido ascórbico 2,5 % (m/v)) são continuamente bombeados. Os reagentes R1 e R2 se misturam na bobina B1 (50 cm). Quando a porção central do injetor é movimentada no sentido pela seta, a alíquota de amostra é inserida no transportador, sendo conduzida em direção ao detector. No ponto de confluência x, a amostra recebe os reagentes e a reação se processa a bobina B2. A vazão total e o comprimento de B2 (250 cm) definem o tempo médio de residência (tempo disponível para ocorrência da reação química). O produto formado é detectado em λ= 660 nm, no espectrofotômetro equipado com uma cela de fluxo.

**2. Materiais:**

• Balão volumétrico de 25 mL (7)

• Pipeta graduada de 2 mL (1)

• Pipeta graduada de 5 mL (1)

• Micropipeta (100-1000 µL)

• Micropipeta (10-100 µL)

• Pipeta de Pasteur

• Equipamento para FIA (1)

• Padrão de fosfato (hidrogenofosfato de sódio)

• Molibdato de amônio 2,5 mmol L-1 em meio HNO3 0,2 mol L-1 (50 mL)

• Ácido ascórbico 2,5% (m/v) (50 mL)

• Coca-cola

• Biotoônico

**3. Procedimento:**

Preparar soluções padrão de fosfato 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg L-1, em balões de 25 mL a partir de uma solução estoque 100 mg L-1. A amostra de Coca-cola deve ser previamente degaseificada. As amostras de Coca-Cola e Biotônico devem ser previamente diluídas, respectivamente, 62,5 e 500 vezes, ambas em balão de 25 mL.

**I.** Empregando a solução de 10 mg L-1, avaliar o efeito da variação do volume de amostra (75, 150 e 300 µL) substituindo a alça de amostragem (L);

**II**. Com a alça de 150 µL, determinar a concentração de fosfato nas amostras. Efetuar três medidas para cada padrão ou amostra. Fazer um gráfico das absorbâncias do pico obtidas (valor médio) em função da concentração de e calcular a concentração de fosfato nas amostras.

**III.** Parar a bomba peristáltica com o centro da zona de amostra no interior da cela de fluxos.

**4. Questões**

**1)** Discutir a influência do volume de amostra e do percurso analítico (B2) no sinal analítico, com base nos dados experimentais obtidos pelo grupo.

**2)** Os dados da figura abaixo foram obtidos por um determinado grupos durantes as aulas experimentais. Com base nesta figura, discutir a influência do volume de amostra (25, 50, 100 e 200 µL) no sinal analítico. Sendo que as concentrações de R1 (molibdato de amônio) estudadas foram 2,50x10-3 e 1,0x10-2 mol L-1, enquanto que a concentração de R2 (ácido ascórbico) foi mantida fixa em 2,50% (m/v).



**2)** Discuta o perfil do sinal obtido com base na dispersão da amostra.

**3)** Compare a determinação espectrofotométrica convencional com a efetuada em fluxo, comente vantagens e desvantagens.

**4)** Supondo a possibilidade de variar a rotação da bomba peristáltica, como o sinal seria afetado?

**5)** Discuta o método *Stop Flow* e o efeito do aumento da vazão na dispersão da zona da amostra e na detectabilidade do método (sinal analítico).

**6)** Calcule a concentração de fosfato nas amostras, expressando como H3PO4 em mg L-1 (considerar o máximo de algarismos significativos e expressar o desvio das medidas).

**7)** Compare o resultado experimental com o especificado no rótulo do biotômico. Existem diferenças significativas em um intervalo de confiança de 95%?

**8)** Estime a frequência de amostragem e o consumo de mobilidato de amônio e de ácido ascórbico por determinação.