



Disciplina: 7500043 -
Análise Instrumental I

Ano: 2023/1

Curso: Análise Instrumental I

Aula 4: Espectroscopia de absorção
molecular no UV/Visível

Professores da disciplina:
Laís Canniatti Brazaca
Emanuel Carrilho

Espectroscopia de absorção molecular no UV/Visível

- Medição da transmitância e da absorbância
 - Definições e equações
- A Lei de Beer
 - Derivação, aplicações e limitações
- Efeito do ruído instrumental nas medições espectrofotométricas
 - Fontes de ruído e erros
- Instrumentação
 - Desenho e configurações

Medição da Transmitância e Absorbância

- Espectroscopia de absorção molecular baseia-se na medida de transmitância, T , ou da absorbância, A , de uma solução contida em um recipiente transparente
- O valor de T ou A é correlacionado com a concentração c do analito responsável pela absorção e com o caminho óptico b do recipiente pela expressão:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc$$

- Medição deve ser feita comparativamente:

$$T = \frac{P_{\text{solução}}}{P_{\text{solvente}}} = \frac{P}{P_0} \quad \text{ou} \quad A = \log \frac{P_{\text{solvente}}}{P_{\text{solução}}} \approx \log \frac{P_0}{P}$$

Termos e símbolos em absorção molecular

<i>Termos e Símbolos</i>	<i>Definição</i>	<i>Nome Alternativo</i>
Potência Radiante P, P_0	Energia da radiação incidindo em uma área de 1 cm^2 de um detector por segundo	Intensidade da Radiação I, I_0
Absorbância A	$\log P_0/P$	Densidade ótica D , Extinção E
Transmitância T	P/P_0	Transmissão T
Caminho ótico da radiação b	-	l, d
Absortividade a	A/bc	Coeficiente de extinção k
Absortividade molar ϵ	A/bc	Coeficiente de extinção molar

Perdas por reflexão e espalhamento

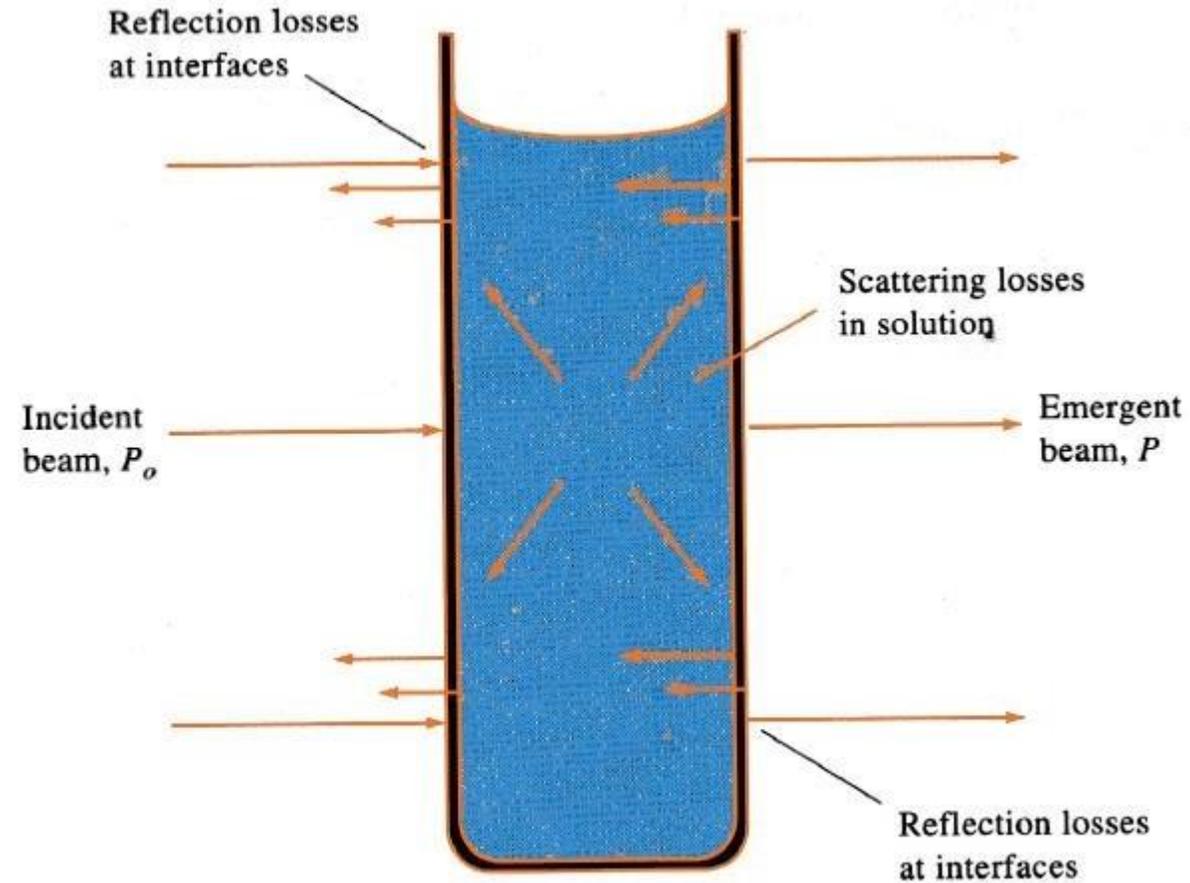


Figure 13-1 Reflection and scattering losses.

A lei de Beer

- Um feixe de radiação monocromática com potência P_0 atinge perpendicularmente a superfície;
- A potência diminui para P após percorrer toda a extensão b do material contendo n partículas absorventes de radiação
- Uma seção transversal do bloco com área S e espessura dx conterá dn moléculas que absorverão radiação;
- As moléculas preenchem, no total, uma fração dS da área indicando a probabilidade de absorção de um fóton por dS/S
- A potência do feixe entrando esta seção, P_x , é proporcional ao número de fótons por cm^2 e dP_x é a quantidade absorvida dentro da seção
- A fração absorvida na seção transversal será $-dP_x/P_x$ que também representa a probabilidade média de absorção

$$-\frac{dP_x}{P_x} = \frac{dS}{S}$$

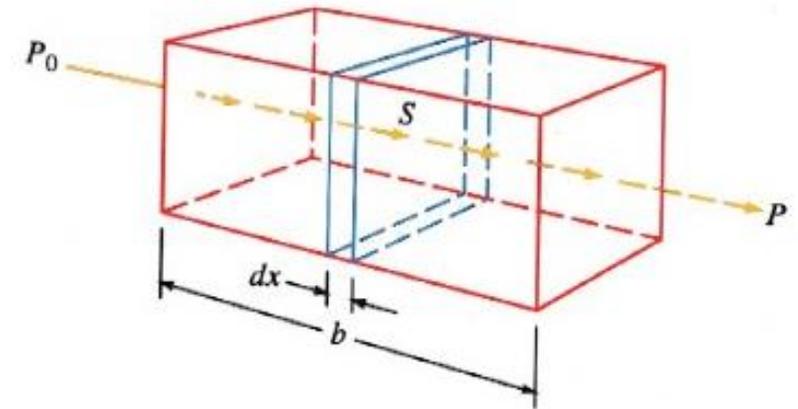


Figure 13-2 Attenuation of radiation with initial power P_0 by a solution containing c moles per liter of absorbing solute and with a path length of b cm. $P < P_0$.

A Lei de Beer

$$-\frac{dP_x}{P_x} = \frac{dS}{S}$$

- Sendo dS a soma das áreas de todas as partículas absorvendo dentro da seção proporcional ao número de partículas

$$dS = a \, dn$$

Com dn sendo o número de partículas em uma determinada seção e a uma constante de proporcionalidade \rightarrow seção transversal de captura

$$-\int_{P_0}^P \frac{dP_x}{P_x} = \int_0^n \frac{a \, dn}{S}$$

- Resolvendo a equação temos:

$$-\ln \frac{P}{P_0} = \frac{an}{S}$$

$$-\ln \frac{P}{P_0} = \frac{an}{S}$$

A Lei de Beer

- Transformando em \log_{10}

$$\log \frac{P_0}{P} = \frac{an}{2,303S}$$

- Sendo n o número total de partículas no bloco de volume V em cm^3
- Relacionando a área em termos de volume

$$S = \frac{V \text{ cm}^3}{b \text{ cm}} = \text{cm}^2$$

- Temos a expressão logarítmica

$$\log \frac{P_0}{P} = \frac{anb}{2,303V}$$

A Lei de Beer

$$\log \frac{P_0}{P} = \frac{anb}{2,303V}$$

- Note que:

- n/V tem unidades de concentração, ou seja, o número de partículas por cm^3 ;
- Convertendo em mol/L

$$\text{no. mol} = \frac{n \text{ partículas}}{6,02 \times 10^{23} \text{ partículas/mol}}$$

E a concentração em mol/L

$$c = \frac{n}{6,02 \times 10^{23}} \text{ mol} \times \frac{1000 \text{ cm}^3/\text{L}}{V \text{ cm}^3} = \frac{1000n}{6,02 \times 10^{23} V} \text{ mol/L}$$

A Lei de Beer

- Finalmente, combinando

$$\log \frac{P_0}{P} = \frac{anb}{2,303V}$$

com

$$c = \frac{1000n}{6,02 \times 10^{23} V} \text{ mol/L}$$

Temos

$$\log \frac{P_0}{P} = \frac{6,02 \times 10^{23} abc}{2,303 \times 1000}$$

E agrupando todas as constantes, temos a **Lei de Beer**

$$\log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc = A$$

Aplicação da Lei de Beer para misturas

- O valor da absorbância em um dado comprimento de onda será a somatória das absorbâncias de cada espécie absorvendo em solução
 - É importante que não ocorra interação entre as espécies
 - Todas as espécies absorventes em solução obedecem a Lei de Beer
 - Para um sistema com n espécies é necessário obter n determinações em comprimentos de onda diferentes:

$$A_{total}^{\lambda_1} = A_1^{\lambda_1} + A_2^{\lambda_1} + \dots + A_n^{\lambda_1}$$

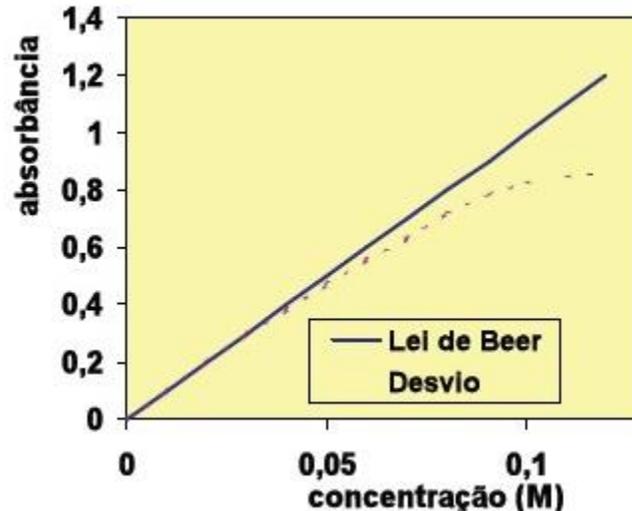
$$A_{total}^{\lambda_2} = A_1^{\lambda_2} + A_2^{\lambda_2} + \dots + A_n^{\lambda_2}$$

⋮

$$A_{total}^{\lambda_n} = A_1^{\lambda_n} + A_2^{\lambda_n} + \dots + A_n^{\lambda_n}$$

Limitações da Lei de Beer

- Quando a correlação linear entre absorbância e concentração não é obedecida?



$$\log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc = A$$

- Desvios/limitações instrumentais
 - São dependentes da forma como a medição é feita

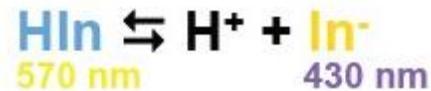
Desvios fundamentais/limitações reais da Lei de Beer

- A Lei de Beer é idealizada para soluções diluídas
 - Em soluções relativamente concentradas ($> 0,01$ mol/L) a distância média entre moléculas absorventes diminui e interações entre as mesmas começam a afetar a distribuição de cargas;
 - Este tipo de interação pode alterar a habilidade das espécies absorverem em um determinado comprimento de onda
 - Em soluções diluídas de analitos, porém com grandes concentrações de outras espécies (por exemplo, eletrólitos)
 - Interações eletrostáticas podem alterar a absorvidade molar ϵ das espécies
 - Em casos extremos, soluções tão diluídas quanto 10^{-6} mol/L são necessárias para a observação da Lei de Beer
 - Em teoria, ϵ é dependente do índice de refração n . Se a concentração do soluto alterar significativamente $n \rightarrow$ desvio da Lei de Beer $\rightarrow \epsilon n(n^2 + 2)^2$ substitui ϵ

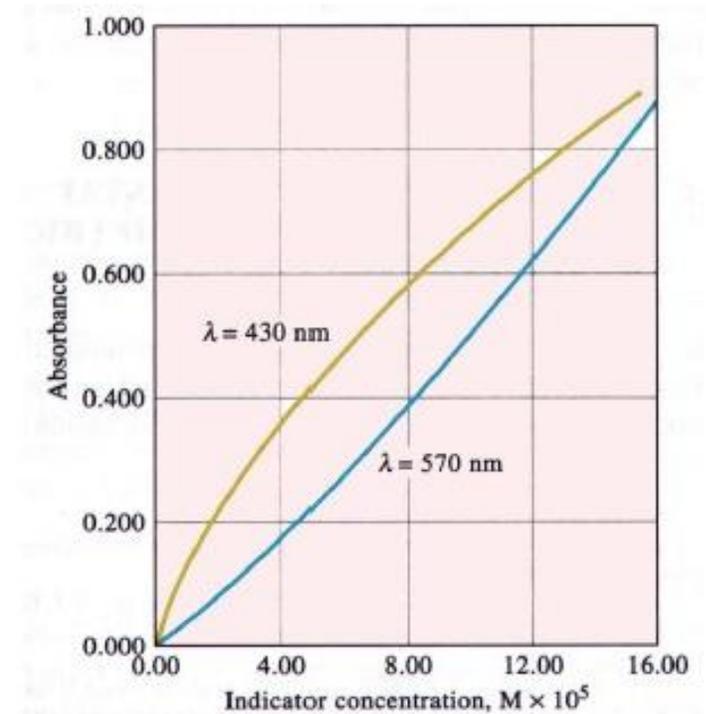
Desvios químicos aparentes

- Principal causa de desvios químicos ocorre quando o analito se dissocia, associa ou reage com as moléculas do solvente, gerando uma espécie química com espectro de absorção diferente.

- Ex.: indicadores ácido-base ($K_a = 1,42 \times 10^{-5}$)



- Quando a concentração total do indicador é alterada, a concentração de cada uma das espécies se altera de maneira não-linear;
- HIn e In⁻, individualmente, obedecem a lei de Beer;



Desvios instrumentais aparentes com radiação policromática

- Outra limitação importante da Lei de Beer → obtenção de radiação verdadeiramente monocromática

$$\log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc = A$$

$$A_m = \log \frac{(P'_0 + P''_0)}{(P' + P'')}$$

$$A_m = \log \frac{(P'_0 + P''_0)}{(P'_0 10^{-\epsilon' bc} + P''_0 10^{-\epsilon'' bc})}$$

Se $\epsilon' = \epsilon''$

$$A_m = \epsilon' bc = \epsilon'' bc$$

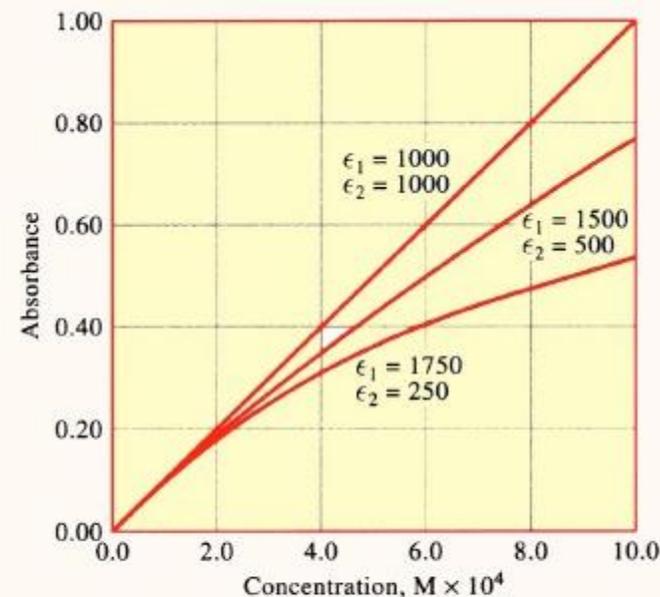
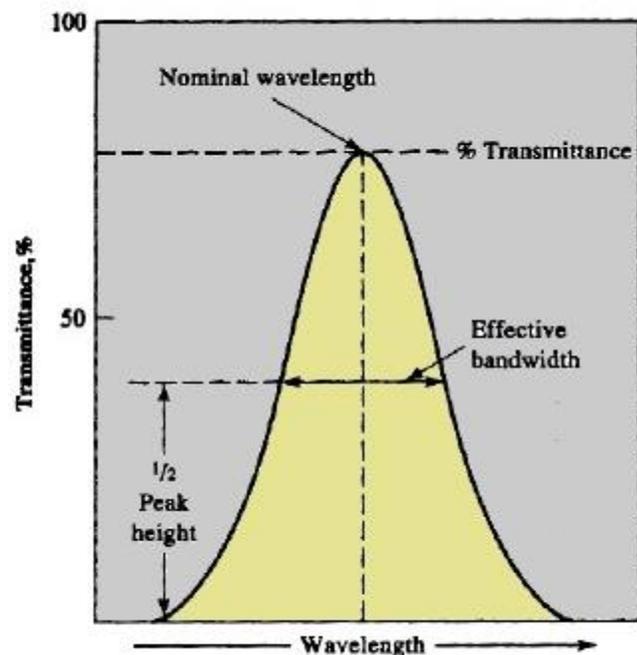


Figure 13-4 Deviations from Beer's law with polychromatic light. The absorber has the indicated molar absorptivities at the two wavelengths λ' and λ'' .

Como escolher o melhor λ

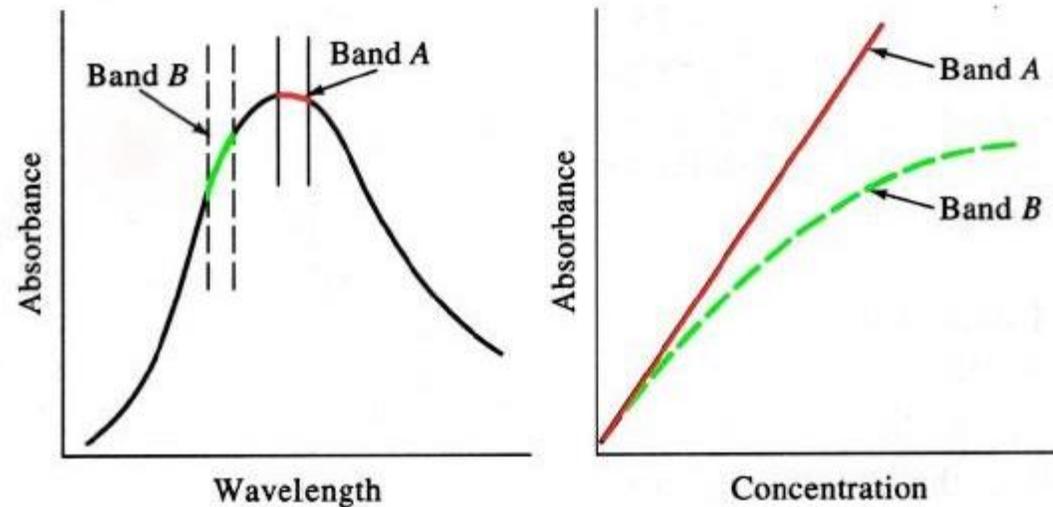


Figure 13-5 The effect of polychromatic radiation upon Beer's law. Band A shows little deviation because ϵ does not change greatly throughout the band. Band B shows marked deviation because ϵ undergoes significant changes in this region.

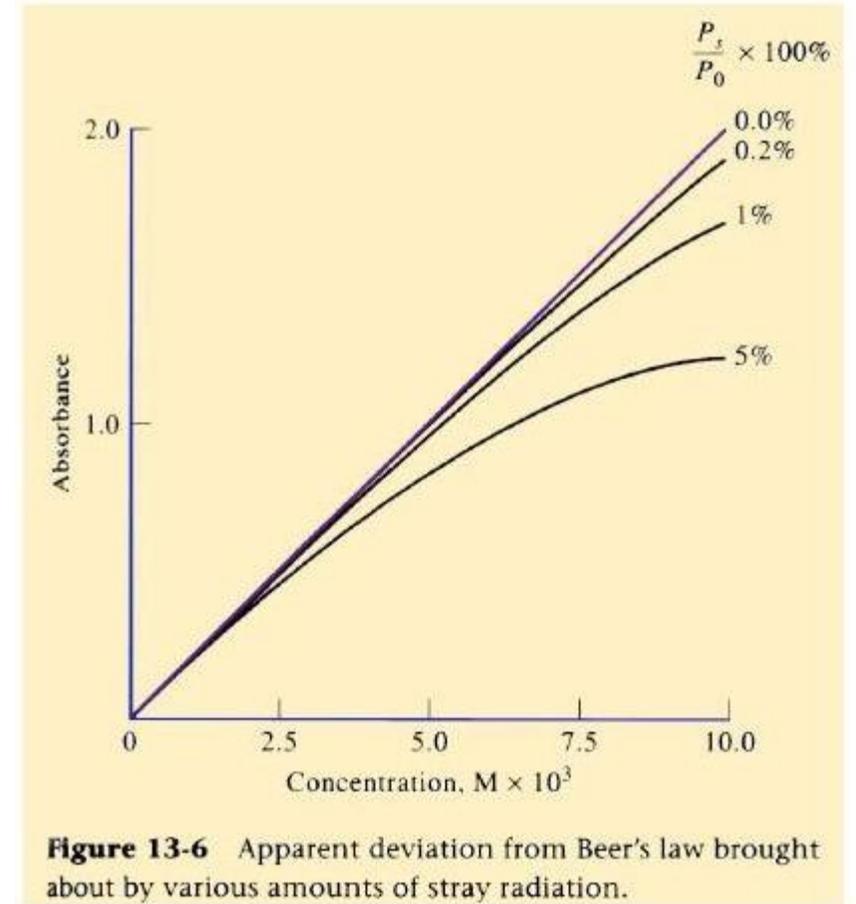
- Efeito desprezível se a largura da banda efetiva do monocromador (ou filtro) $< 1/10$ da metade da largura do pico a meia altura

Desvios instrumentais na presença de radiação espúria

- Se P_s for a radiação espalhada não absorvida pela amostra;

$$A' = \log \frac{P_0 + P_s}{P + P_s}$$

- Obs.: Note que desvios instrumentais são sempre negativos;



Efeito do ruído instrumental em análises espectrofotométricas

- Precisão e exatidão são normalmente afetadas pela incerteza associada com o ruído de um instrumento;
- Uma medição instrumental é normalmente melhor representada pela relação sinal/ruído

$$\frac{S}{R} = \frac{\text{média}}{\text{desvio padrão}} = \frac{\bar{x}}{\sigma} = \frac{1}{dpr}$$

Efeito do ruído instrumental em análises espectrofotométricas

- Fontes de ruído instrumentais – eletrônica
 - Ruído térmico (Johnson) – gerado pela agitação térmica de carga (geralmente elétrons) dentro de um condutor elétrico em equilíbrio, independente da voltagem aplicada;
 - Ruído eventual (shot) – flutuações aleatórias de corrente DC (cargas discretas - elétrons)
 - Ruído trêmulo (flicker) – acredita-se que seja causado por cargas que fiquem presas entre interfaces de materiais;
 - Ruído ambiental

Erros intrínsecos com a medição de transmitância

- Ajuste de 0% de T
- Ajuste de 100% de T
- Medição de % de T
- A incerteza na determinação da concentração c pode ser relacionado como:

$$A = -\log T = \epsilon b c \Rightarrow$$
$$c = \frac{-\log T}{\epsilon b} = -\frac{0,434}{\epsilon b} \ln T$$

- Após algumas transformações:

$$\frac{s_c}{c} = \frac{0,434 s_T}{T \log T}$$

Fontes de Erros Instrumentais

$$\frac{s_c}{c} = \frac{0,434s_T}{T \log T}$$

TABELA 13-3 Tipos e fontes de incertezas nas medidas de transmitância

Categoria	Caracterizada por^a	Fontes típicas	Pode ser importante em
Caso I	$s_T = k_1$	Resolução limitada de leitura	Fotômetros e espectrofotômetros de baixo custo com medidores ou escalas digitais restritas
		Ruído Johnson no detector térmico	Espectrofotômetros para as regiões de IR e IR próximo e fotômetros
		Corrente de escuro e ruído do amplificador	Regiões onde a intensidade da fonte e a sensibilidade do detector são baixas
Caso II	$s_T = k_2 \sqrt{T^2 + T}$	Ruído tipo <i>shot</i> do detector de fótons	Espectrofotômetros UV-VIS de alta qualidade
Caso III	$s_T = k_3 T$	Incertezas devidas ao posicionamento da célula	Espectrofotômetros UV-VIS e IR de alta qualidade
		Ruído flicker da fonte	Fotômetros e espectrofotômetros de baixo custo

^a k_1 , k_2 e k_3 são constantes para um dado sistema

Quanto cada erro vale

$$\frac{s_c}{c} = \frac{0,434s_T}{T \log T}$$

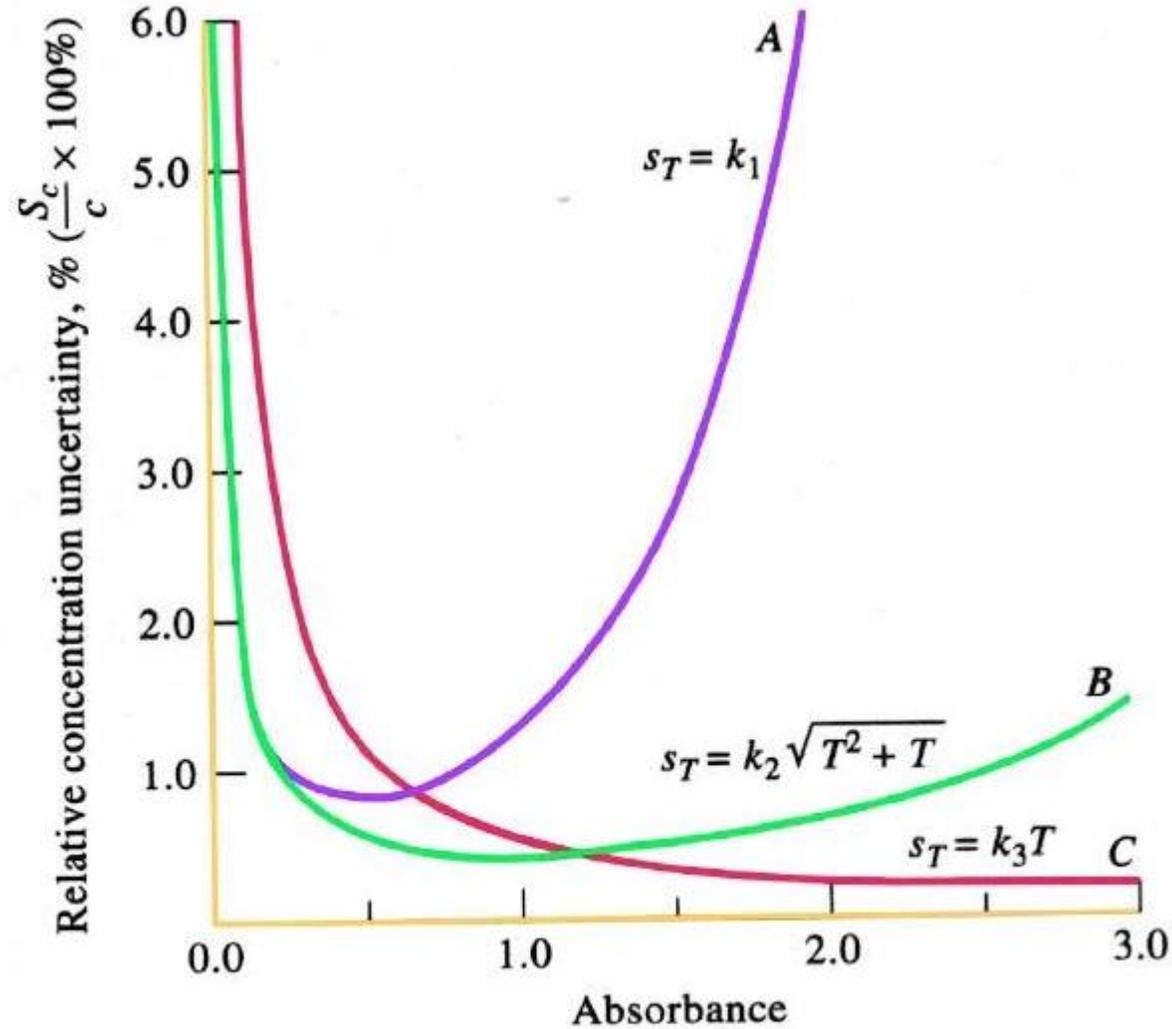


TABLE 13-4 Relative Precision of Concentration Measurements as a Function of Transmittance and Absorbance for Three Categories of Instrument Noise

Transmittance, T	Absorbance, A	Relative Standard Deviation in Concentration ^a		
		Case I Noise ^b	Case II Noise ^c	Case III Noise ^d
0.95	0.022	±6.2	±8.4	±25.3
0.90	0.046	±3.2	±4.1	±12.3
0.80	0.097	±1.7	±2.0	±5.8
0.60	0.222	±0.98	±0.96	±2.5
0.40	0.398	±0.82	±0.61	±1.4
0.20	0.699	±0.93	±0.46	±0.81
0.10	1.00	±1.3	±0.43	±0.56
0.032	1.50	±2.7	±0.50	±0.38
0.010	2.00	±6.5	±0.65	±0.2
0.0032	2.50	±16.3	±0.92	±0.23
0.0010	3.00	±43.4	±1.4	±0.19

^a $(s_c/c) \times 100$.

^bFrom Equation 13-13 with $s_T = k_1 = \pm 0.0030$.

^cFrom Equation 13-14 with $k_2 = \pm 0.0030$.

^dFrom Equation 13-15 with $k_3 = \pm 0.013$.

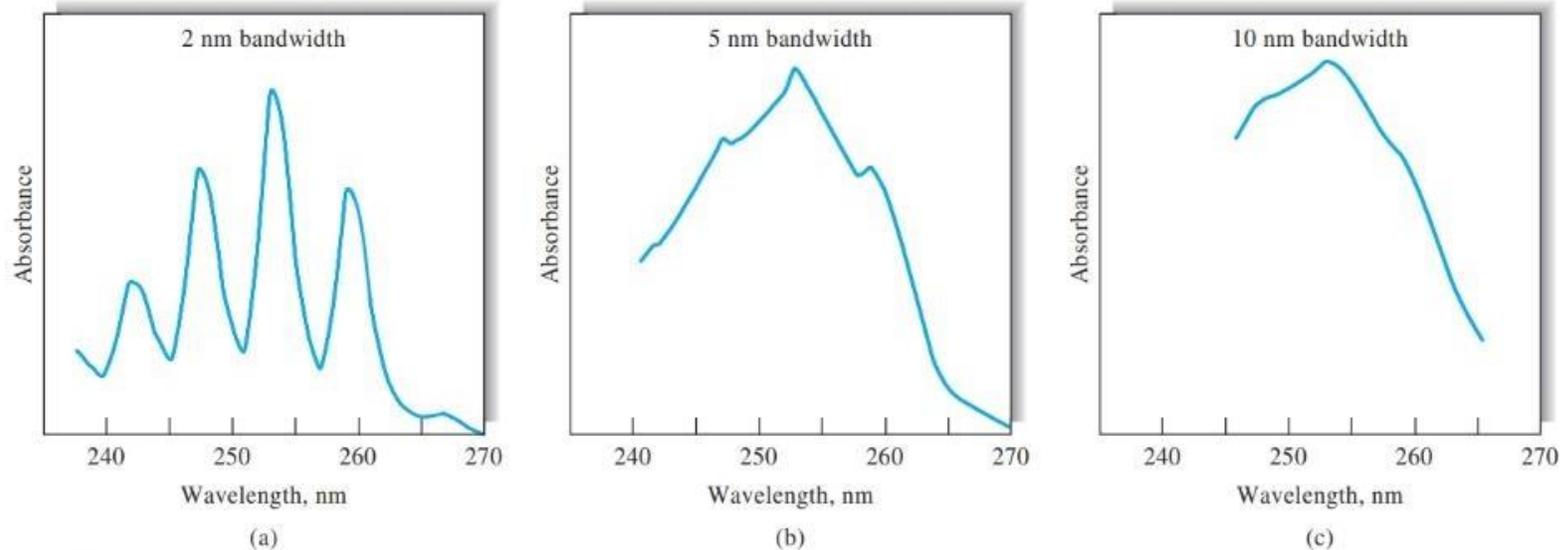


FIGURE 13-8 Effect of bandwidth on spectral detail for a sample of benzene vapor. Note that as the spectral bandwidth increases, the fine structure in the spectrum is lost. At a bandwidth of 10 nm, only a broad absorption band is observed.

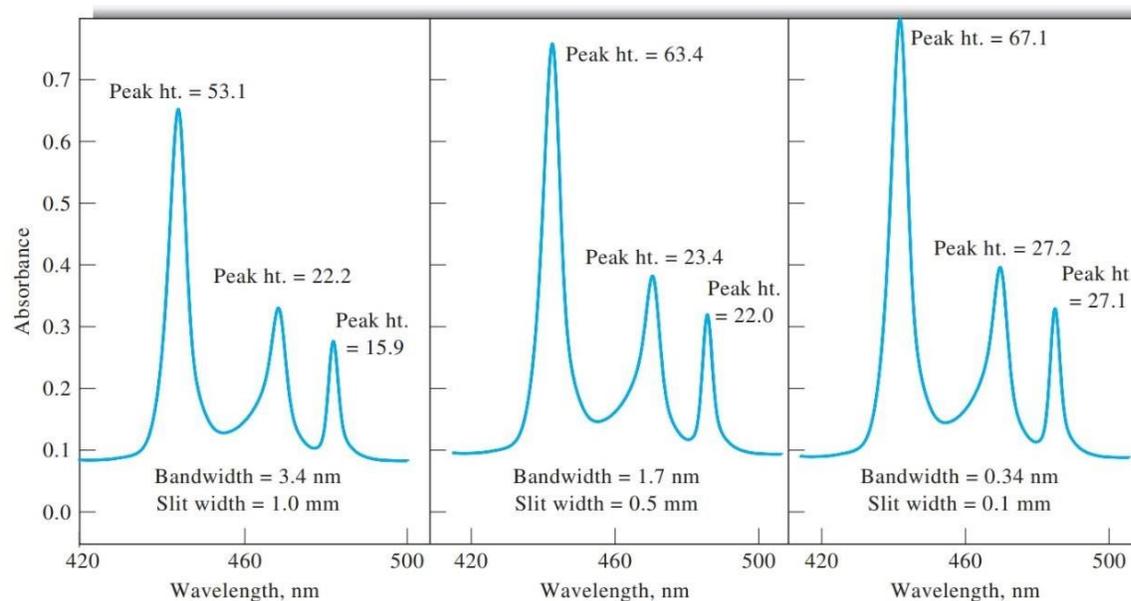
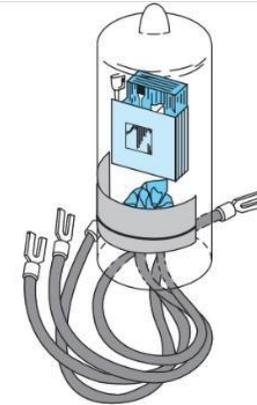


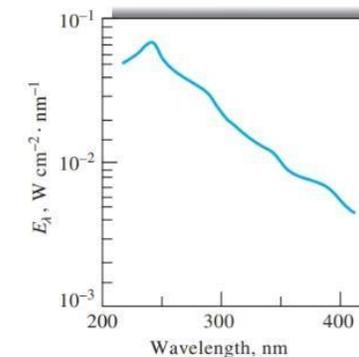
FIGURE 13-9 Effect of slit width (spectral bandwidth) on peak heights. Here, the sample was a solution of praseodymium chloride. Note that as the spectral bandwidth decreases by decreasing the slit width from 1.0 mm to 0.1 mm, the peak heights increase. (Data courtesy of Dr. Hilarío López González, Departamento de Química, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, México.)¹⁰

Instrumentação - espectrofotometria UV-Vis

- Fontes de radiação
 - Lâmpadas de deutério ou hidrogênio
 - $D_2 + E_e \rightarrow D_2^* \rightarrow D' + D'' + h\nu$
 - Emissão contínua de 160 a 375 nm;
 - Lâmpada deve ser feita de quartzo



(a)



(b)

FIGURE 13-11 (a) A deuterium lamp of the type used in spectrophotometers and (b) its spectrum. The plot is of irradiance E_λ (proportional to radiant power) versus wavelength. Note that the maximum intensity occurs at ~ 225 nm. Typically, instruments switch from deuterium to tungsten at ~ 350 nm.

Instrumentação – espectrofotometria UV-Vis

- Fontes de radiação:
 - Lâmpada de filamento de tungstênio
 - Utilizada para região do visível e IV
 - Emissão contínua de 350 a 2500 nm
 - Distribuição: corpo negro

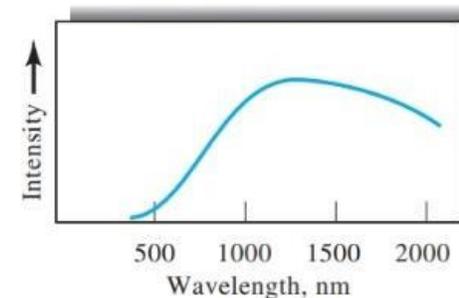
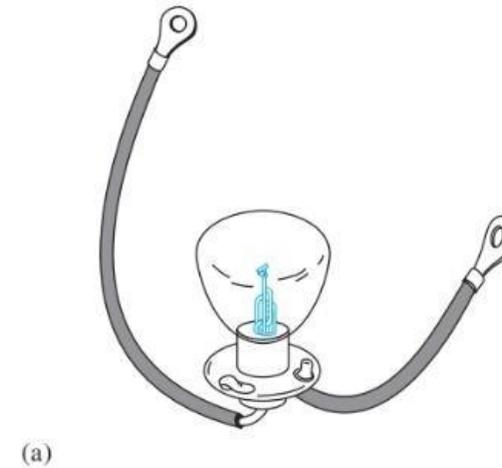
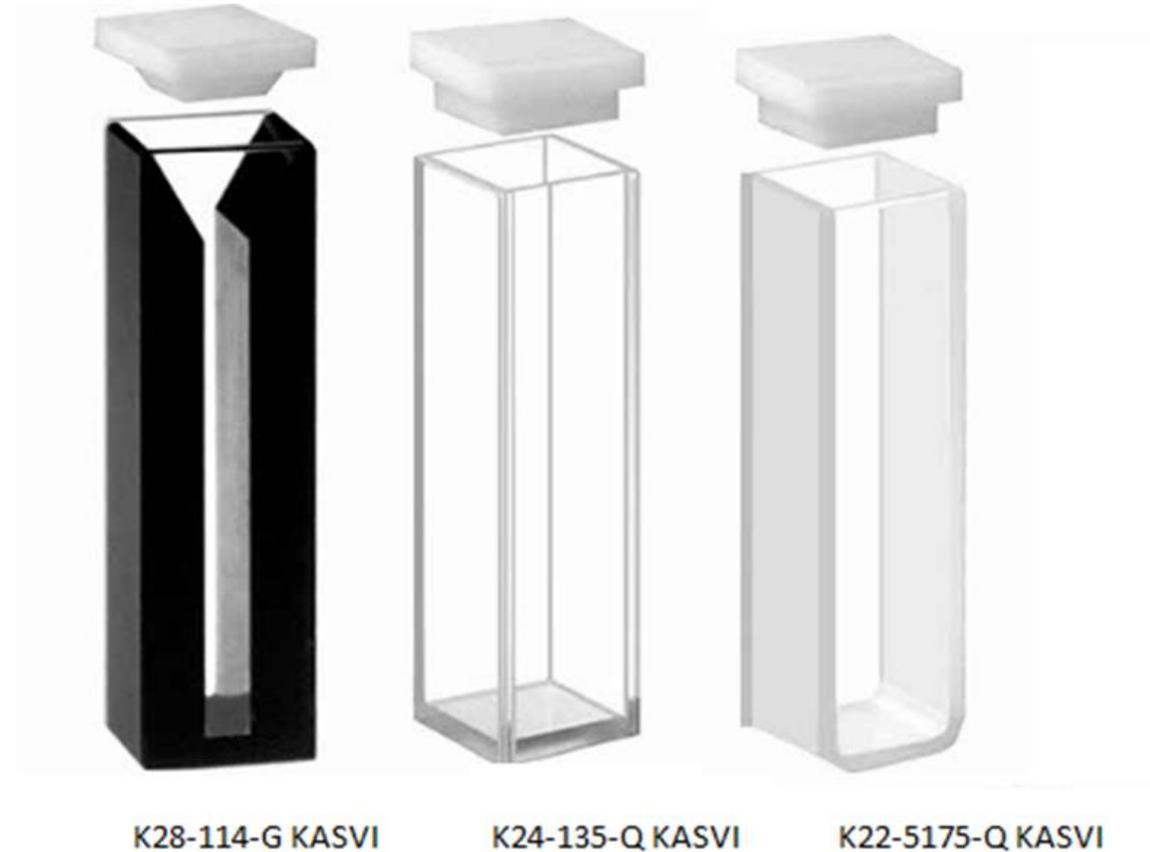


FIGURE 13-12 (a) A tungsten lamp of the type used in spectroscopy and its spectrum (b). Intensity of the tungsten source is usually quite low at wavelengths shorter than about 350 nm. Note that the intensity reaches a maximum in the near-IR region of the spectrum (~1200 nm in this case).

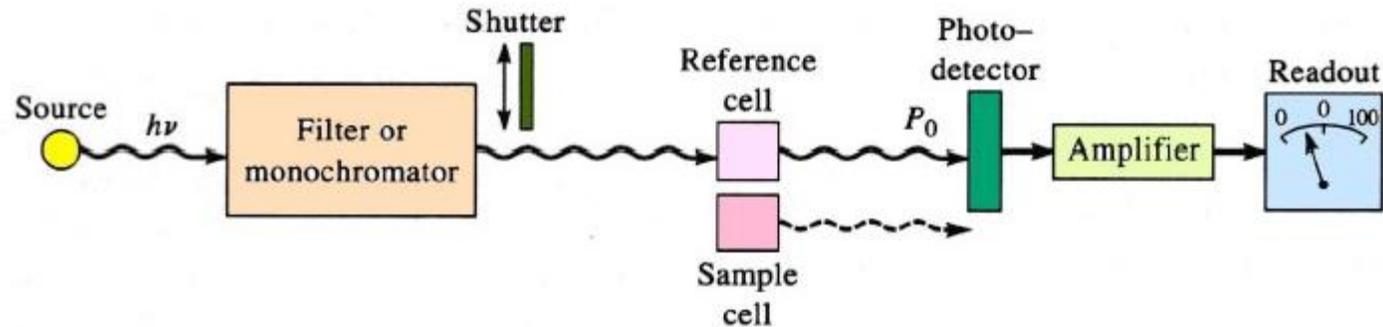
Instrumentação – espectrofotometria UV-Vis

- Compartimento de amostra
 - Cubetas de quartzo ($\lambda < 350$ nm)
 - Vidros borossilicatos
 - Plásticos
 - $b = 1$ cm (padrão)



Tipos de instrumentos

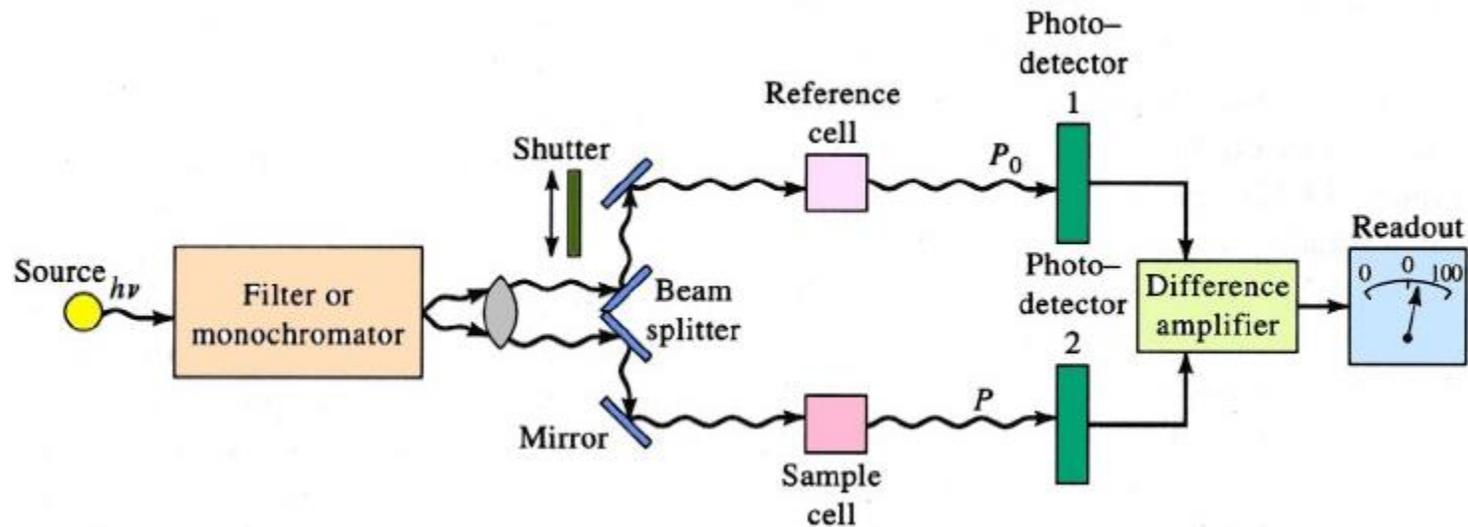
- Feixe único



- Componentes podem ser simples ou sofisticados
- Geralmente de custo mais reduzido
- Cubetas idênticas são fundamentais

Tipos de instrumento

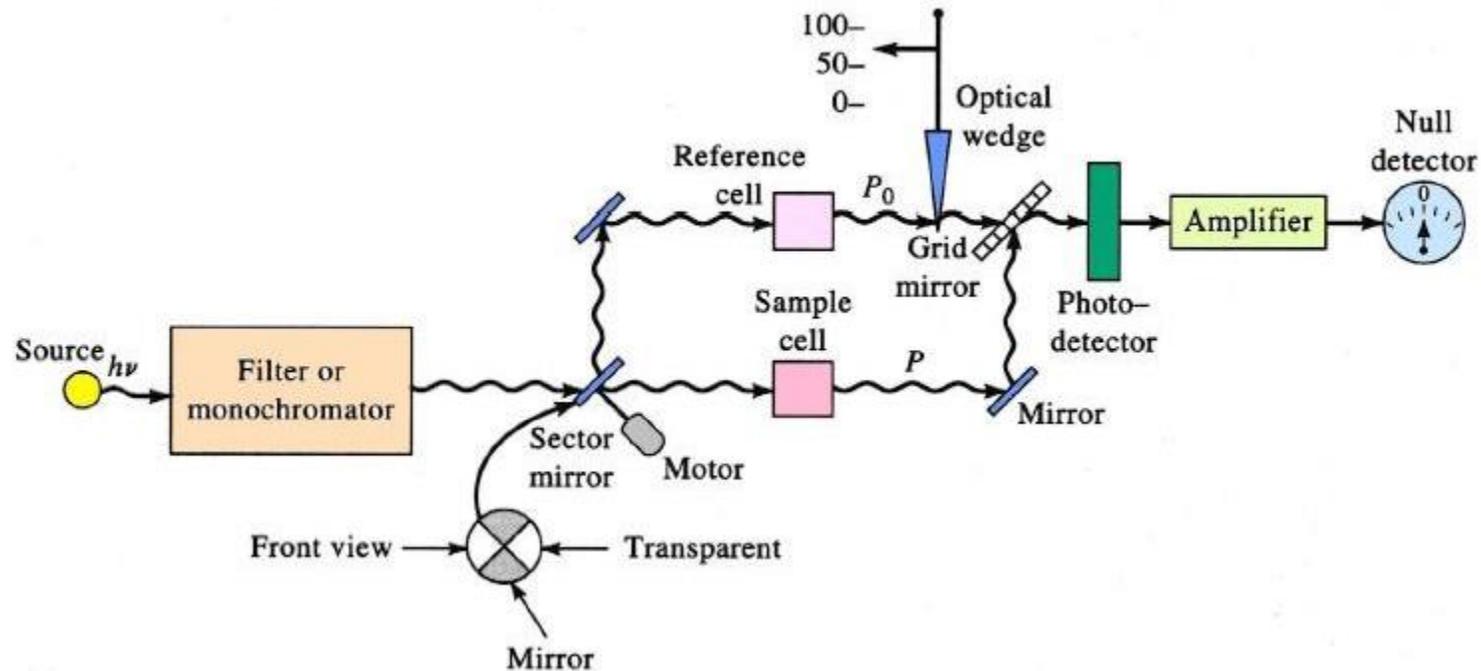
- Feixe duplo no espaço



- Usa um divisor de feixe e dois transdutores;
- Ajuste de 0% T e mede-se %T
- Compensam flutuações na fonte de radiação

Tipos de Instrumentos

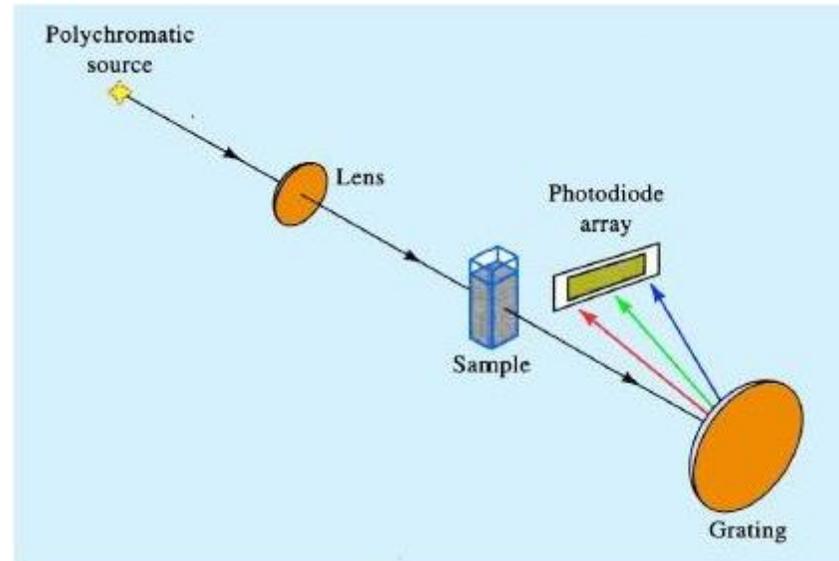
- Feixe duplo no tempo



- Compensação por variação de potência em função de λ
- A maioria dos espectrofotômetros modernos tem essa configuração

Tipos de instrumento

- Canais múltiplos – DAD



- Vantagens:
 - Determinação simultânea de todos os λ – rapidez
 - Melhoria da relação sinal/ruído – sensibilidade
 - Análises rápidas minimizam foto-decomposição

Product Lineup



UV-1900i

The UV-1900i is a double-beam UV-Vis Spectrophotometer using Shimadzu's original LO-RAY-LIGH™ diffraction grating technology.



UV-2600i/2700i

The compact UV-2600i/2700i is a universal, research-grade spectrophotometer that can be used in a wide range of fields, and easily expanded to suit the measurement objective.

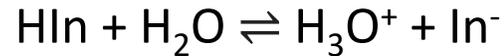


UV-3600i Plus

UV-3600i Plus, the Multi-purpose large-sample compartment and the Integrating sphere attachment also feature three detector, enabling the high-sensitivity measurement of solid samples.

Questões

- 1) Converta os seguintes valores de transmitância para absorbância: a) 5,38%; b) 0,124; c) 23,8%
- 2) Uma solução contendo 3,92 mg/100 mL de A (335 g/mol) tem uma transmitância de 64,1% em uma célula de 1,50 cm a 425 nm. Calcule a absorvidade molar de A neste comprimento de onda;
- 3) A constante de equilíbrio do par conjugado ácido-base



é $8,00 \times 10^{-5}$. A partir das informações na tabela 1 (parte inferior do slide):

- a) Calcule a absorbância em 430 nm e 600 nm para as seguintes concentrações de indicador: $3,00 \times 10^{-4}$ M, $1,00 \times 10^{-4}$ M, $0,250 \times 10^{-4}$ M;
 - b) Plote a absorbância em função da concentração do indicador;
- 4) Cite algumas das principais limitações da Lei de Beer;
 - 5) Quais as principais diferenças entre os equipamentos de feixe duplo no tempo e no espaço? Qual a vantagem de se utilizar um equipamento de feixe duplo no tempo?
 - 6) Cite algumas fontes de incerteza na medida de T, em que categoria se encontram (I, II ou III) e a equação de s_t .

Tabela 1. Absorvidade molar das espécies HIn e In⁻ (Questão 3)

Species	Absorption Maximum, nm	Molar Absorptivity	
		430 nm	600 nm
HIn	430	8.04×10^3	1.23×10^3
In ⁻	600	0.775×10^3	6.96×10^3