

Espectrometria

LCA 0405 – Análise de Alimentos

Profa. Gabriela Feltre

Roteiro da aula

- O que é espectroscopia?
- Espectro eletromagnético
- Absorção na região UV-VIS
- Lei de Beer-Lambert

O que é espectroscopia?

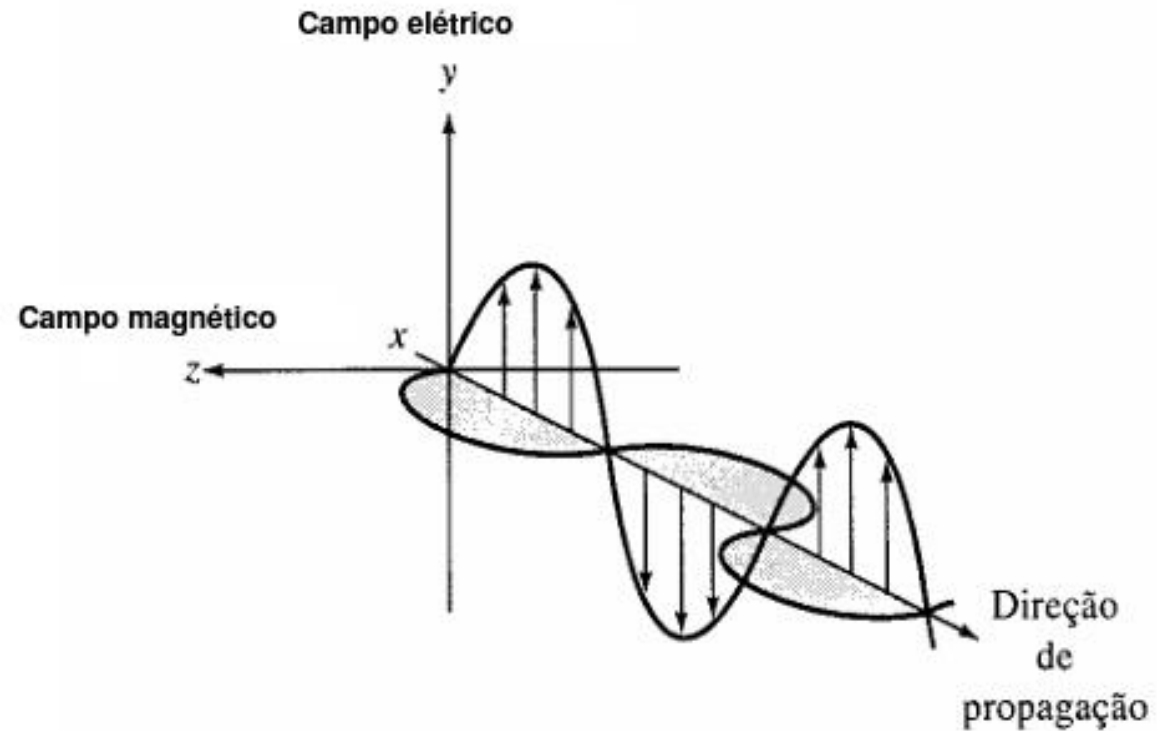
Espectroscopia x Espectrometria

- Espectroscopia é a ciência que estuda a interação da matéria com a energia irradiada
- Espectrometria é o método usado para adquirir uma medida quantitativa do espectro. É a aplicação prática.

Radiação eletromagnética

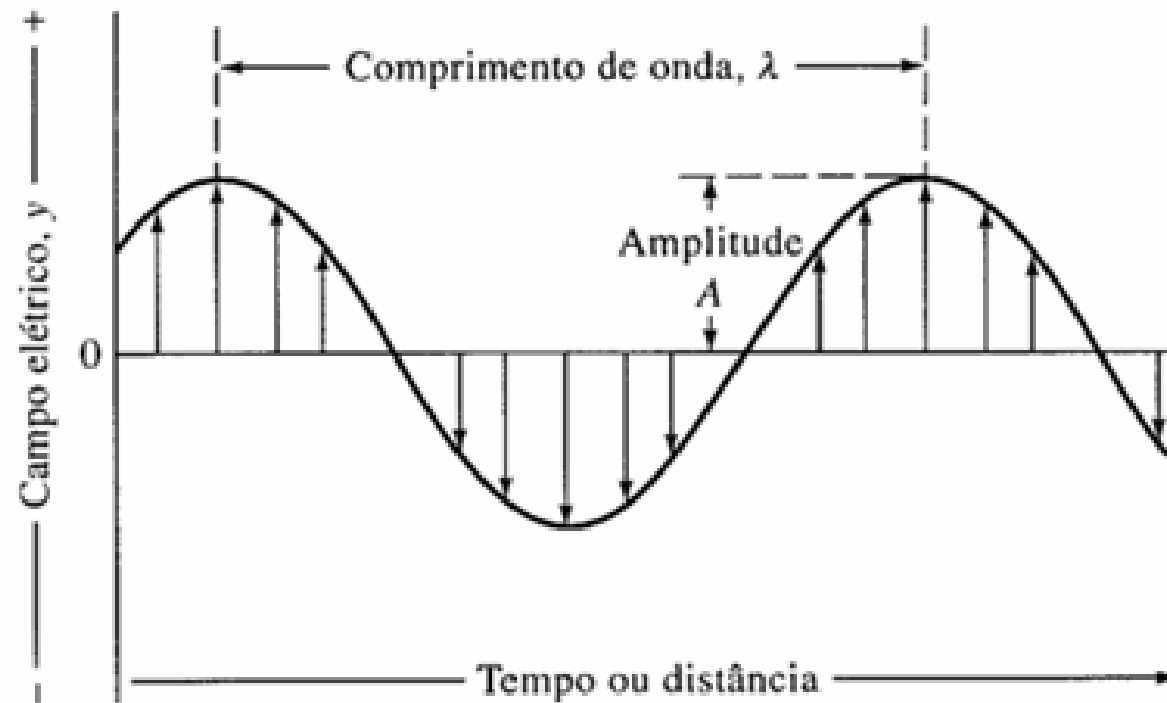
- Radiação eletromagnética: são ondas eletromagnéticas que consistem em dois campos oscilantes (um elétrico e um magnético), orientados em ângulos retos na direção de propagação.

Radiação eletromagnética



Radiação eletromagnética

PARÂMETROS DA ONDA



Radiação eletromagnética

A radiação eletromagnética se propaga numa velocidade constante.

O comprimento de onda (λ) depende de:

- Frequência (ν);
- Velocidade da luz (c);
- Índice de refração do meio

Radiação eletromagnética

$$\lambda = c/(\eta v)$$

Sendo c a velocidade da luz no vácuo (3×10^8 m/s)

No vácuo ou no ar temos $\eta=1$ e, então, o comprimento de onda é inversamente proporcional à frequência:

$$\lambda = c/v$$

Radiação eletromagnética

- Ondas eletromagnéticas são formadas por pequenos pacotes de energia chamados fótons.
- Planck relacionou a frequência dos fótons à energia associada a um fóton de radiação:

Radiação eletromagnética

- Cada λ está associado a uma quantidade definida de energia.
- A energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda.

Radiação eletromagnética

OU SEJA:

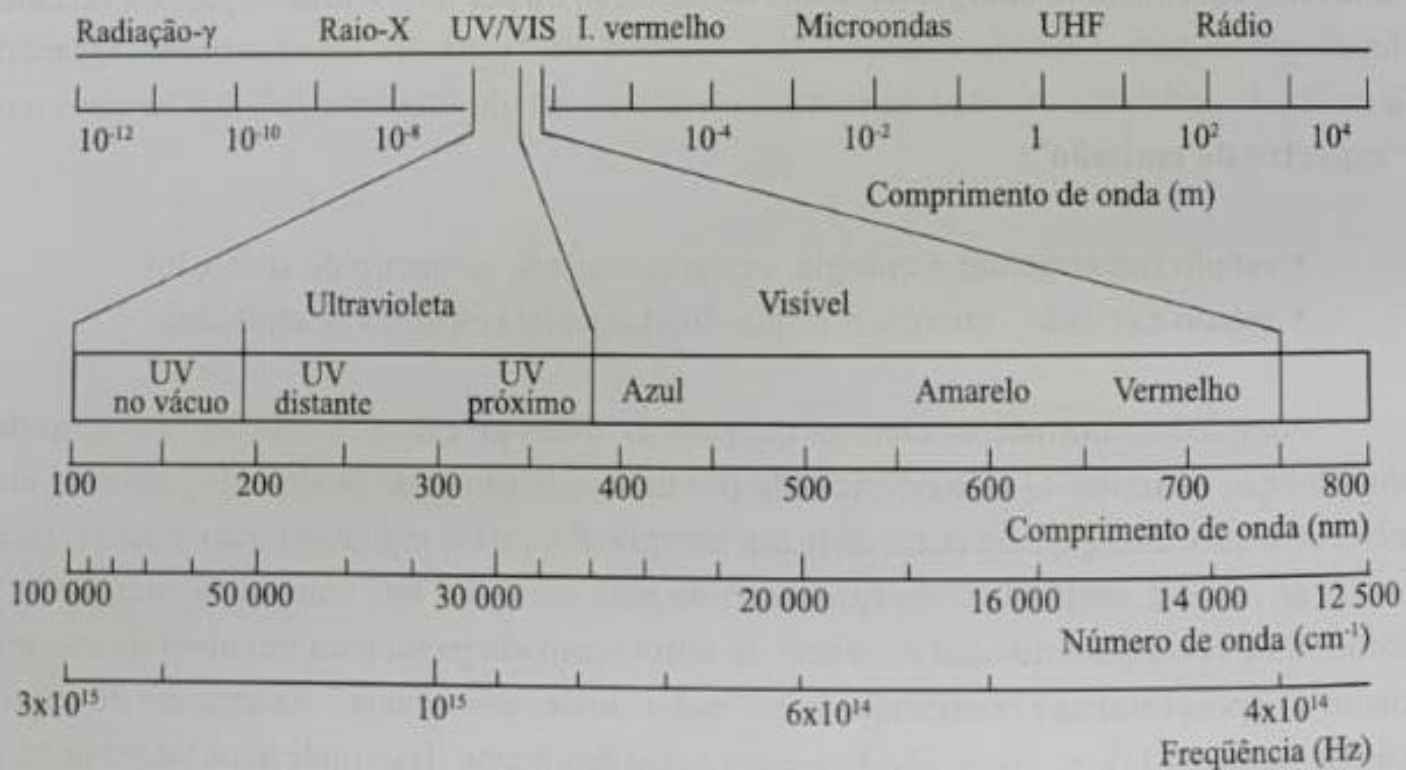
Quanto menor for o comprimento de onda maior será a quantidade de energia necessária para a absorção.

Espectro Eletromagnético

Espectro eletromagnético

- Conjunto de radiações eletromagnéticas divididas em função do comprimento de onda.
- Radiações de interesse variam desde aquelas de altíssima energia (raios gama) até aquelas de baixa energia (ondas de rádio).
- Região visível: região relativamente estreita do espectro cujas radiações são perceptíveis pelo olho humano.

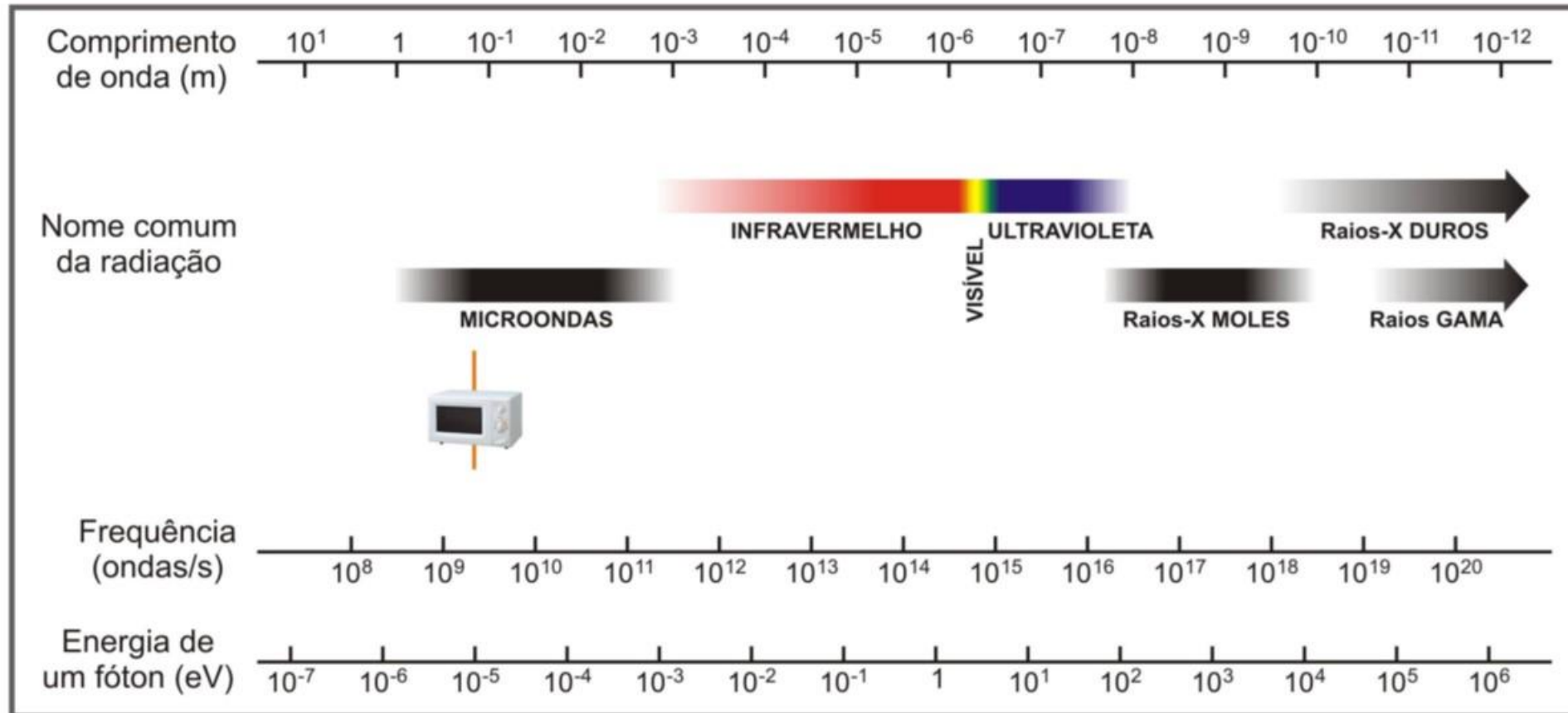
- raios cósmicos e raios gama (0 - 1A): transições nucleares;
- raios X (1A - 10 ηm): elétrons das camadas internas (K e L);
- UV distante (10 ηm - 200 ηm): ionização de átomos e moléculas (elétrons da camada do meio);
- UV (200 - 400 ηm) e visível (400 - 700 ηm): transições dos elétrons de valência;
- IV próximo (700 ηm - 2 μm) e I.V. (2 μm - 25 μm): vibrações moleculares;
- IV afastado (25 μm - 500 μm): rotações moleculares;
- microondas (500 μm - 3 cm): rotações de grupos;
- RES (ressonância eletrônica de *spin* - 3 cm - 5 m) e RMN (ressonância magnética nuclear - 5 m - 30 m): orientação do *spin*.



Espectro eletromagnético

Quanto maior o λ , menor a frequência e menor a energia necessária.

Espectro eletromagnético



Espectro eletromagnético

- Na região do UV-Visível, o comprimento de ondas é expresso em nanômetros (nm).
- As regiões UV e visível são classificadas juntas porque os 2 espectros são resultado de transições eletrônicas (da camada de valência)

Absorção na região UV-Visível

- Se uma radiação contínua de luz branca atravessa 1 amostra, a intensidade de radiação vai decrescer, de diferentes modos, para diferentes comprimentos de onda.
- Parte dessa radiação será absorvida pela amostra.
- Absorção: energia é transferida aos átomos, moléculas ou íons presentes na amostra.
- Passam de um estado de baixa energia (estado fundamental) para estados mais energéticos (estado excitado).

Absorção na região UV-Visível

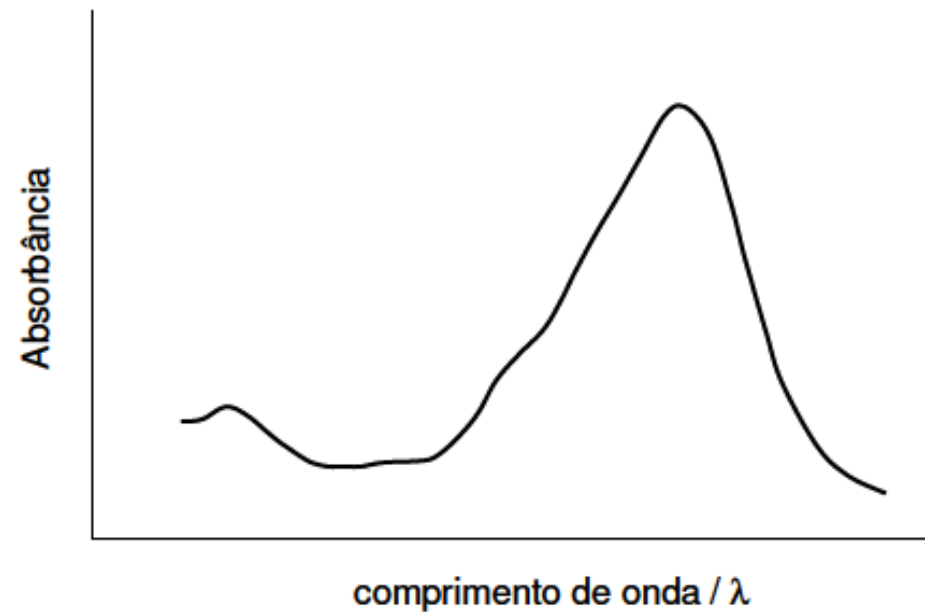
- Radiações na região UV-Vis apresentam λ entre 40 e 700 nm.
- Uma vez absorvidas, são energias suficientes para promover nas espécies:
 - Rotação;
 - Vibração;
 - Transições eletrônicas.
- Radiações com $\lambda < 250$ nm: podem quebrar ligações químicas.

Absorção na região UV-Visível

- A radiação emergente poderá ser colorida (região visível) ou invisível.
- A radiação absorvida é uma característica da amostra absorvente.

Absorção na região Visível

- Responsável pela coloração das soluções.
- Região espectral onde ocorre a absorção de radiação é determinada a partir do espectro de absorção.



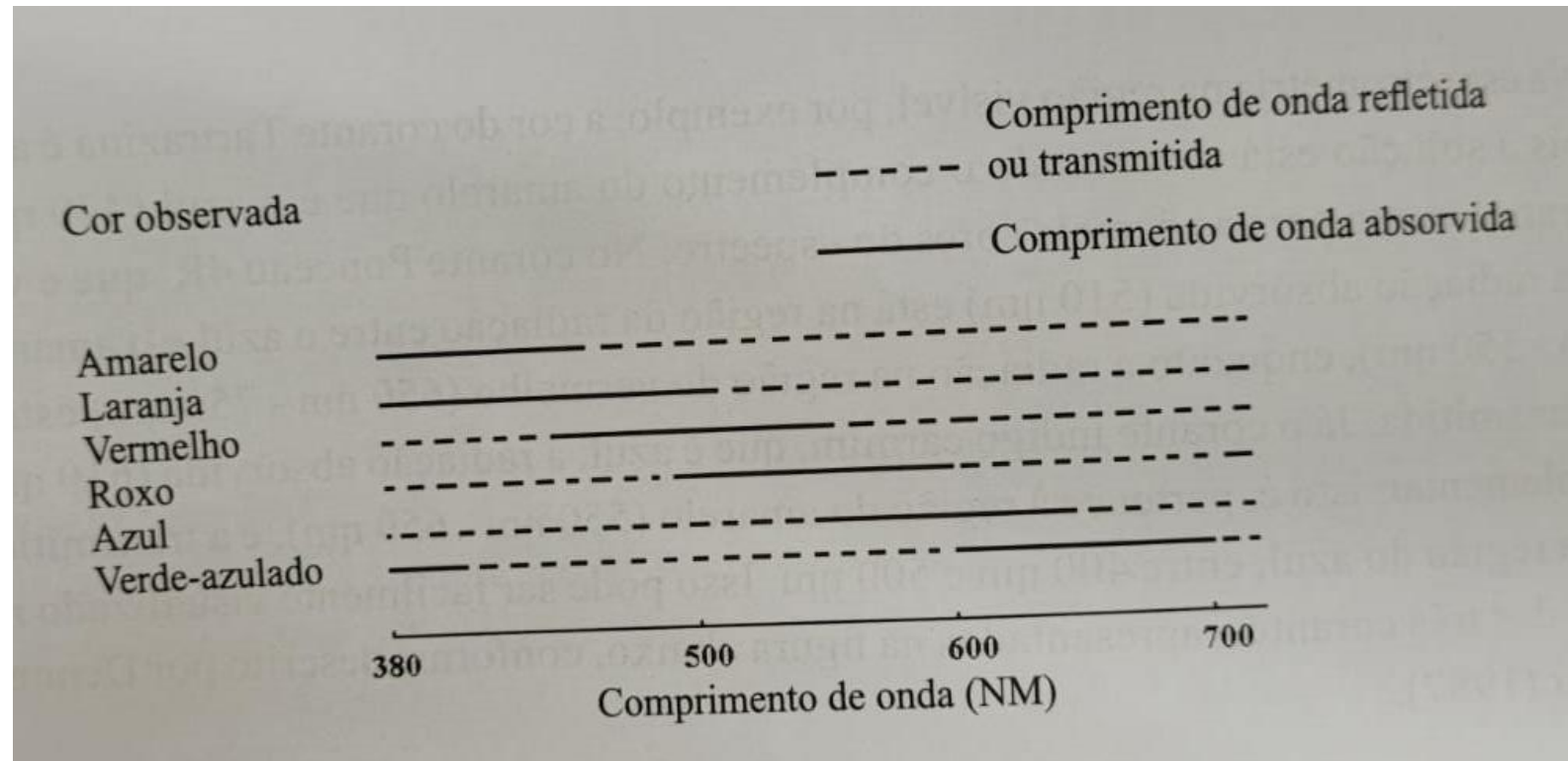
Absorção na região Visível

- Se a amostra absorve luz de comprimento de onda da luz azul, então a radiação que veremos é a radiação emergente e será seu complemento (luz amarela)
- Exemplo: corante Ponceau 4R (vermelho), a radiação absorvida (510 nm) está na região da radiação entre o azul e o amarelo (450 – 550 nm) e a radiação na região do vermelho (650-750 nm) estará sendo transmitida.

Absorção na região Visível

- Às vezes, a solução não apresenta coloração, mas através de reações químicas, podemos colorir as reações e analisá-las no espectro de absorção visível.
- Exemplo: determinação de fósforo em alimentos – reação com algumas soluções que forma complexo amarelo. A radiação absorvida deve ser complementar ao da cor amarela, que será azul (450-480 nm).

Absorção na região Visível



Absorção na região UV

- Algumas substâncias incolores podem ser analisadas sem nenhuma reação colorimétrica (absorção de radiação ultravioleta).
- Exemplos: ácido benzóico e ácido sórbico – são incolores e não há reação para torná-los coloridos.

Absorção na região UV-Visível

- Absorciometria – termo geral em análise para medida de absorção.
- Espectrofotometria – uma subdivisão da absorciometria e refere-se ao uso de um espectrofotômetro.

Absorção na região UV-Visível

- A radiação das regiões UV-Vis é suficiente apenas para causar a excitação dos elétrons das camadas externas – apenas os elétrons que formam as ligações são afetados.
- 3 tipos de elétrons:
 - Sigma (σ) - ligações simples: C – C
 - Pi (π) – ligações duplas: C = C
 - Elétrons que não são de ligação nos orbitais atômicos - elétrons não ligantes (n)

Absorção na região UV-Visível

- Ligações sigma (σ) – são fortes e absorção no UV é difícil.
- Então a transição eletrônica σ - σ^* se dá no UV do vácuo.
- Exemplo: compostos saturados, como hidrocarbonetos.
- Propano - 135 nm.

Absorção na região UV-Visível

- Ligações pi (π) – são mais fracas e possuem grande absorção nas regiões do vis e UV.
- Compostos insaturados, com ligações duplas conjugadas (ex. anel benzeno) absorvem radiação na região UV (200-380 nm).
- Carotenóides (compostos com mais de 7 duplas ligações conjugadas) absorvem na região vis (380-700 nm).

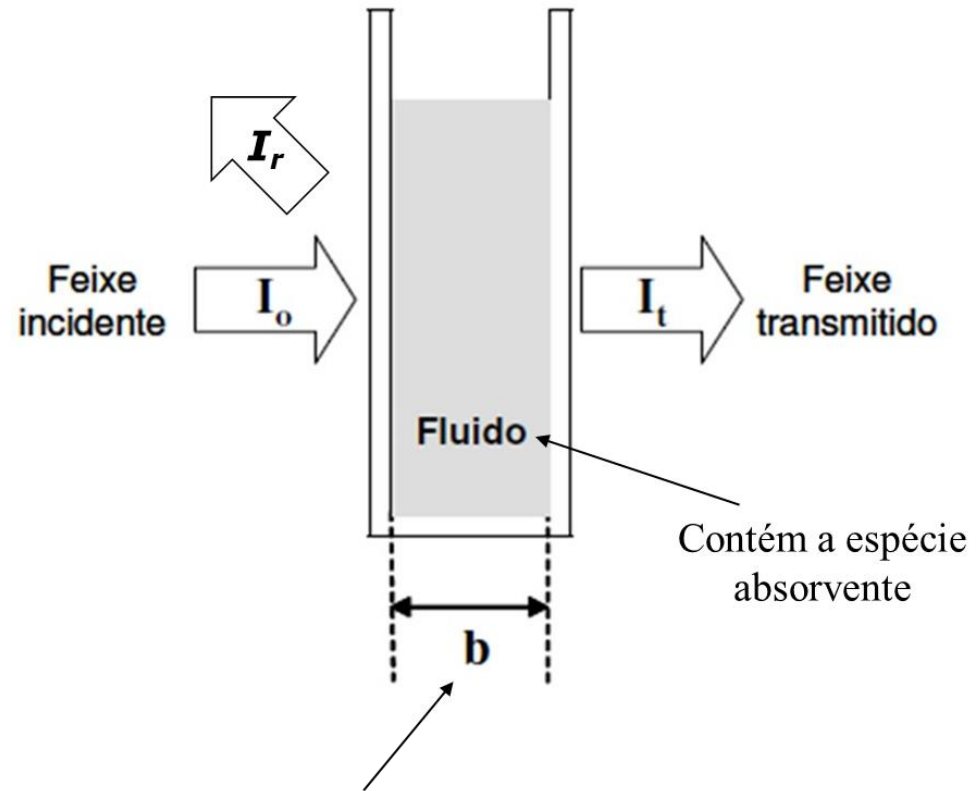
Lei de Beer-Lambert

Lei de Beer-Lambert

- Lei de Beer-Lambert:

A passagem de um feixe de radiação monocromática (um único comprimento de onda) num número sucessivo de moléculas absorventes idênticas resulta na absorção de frações iguais da energia radiante que as atravessa.

Lei de Beer-Lambert



b = largura interna da cubeta = caminho óptico

Lei de Beer-Lambert

- Quando um feixe de radiação de λ definido e de intensidade I_0 incide sobre uma amostra, parte da energia é absorvida (I_a), parte é transmitida (I_t) e parte é refletida ou espalhada (I_r):

$$I_0 = I_a + I_t + I_r$$

Lei de Beer-Lambert

- I_r pode ser mantido constante ou ser compensado fixando-se as condições de medida e evitando a presença de sólidos em suspensão que podem causar espalhamento de radiação.
- Assim, a absorção da radiação dependerá do caminho óptico e da concentração da espécie (número total de espécies absorventes que interagem com o feixe de radiação).

Lei de Beer-Lambert

$$A = abc = \log \frac{I_0}{I_t}$$

- **A** = absorvância
- **a** = absortividade
- **b** = largura interna da cubeta
- **c** = concentração da espécie absorvente

Lei de Beer-Lambert

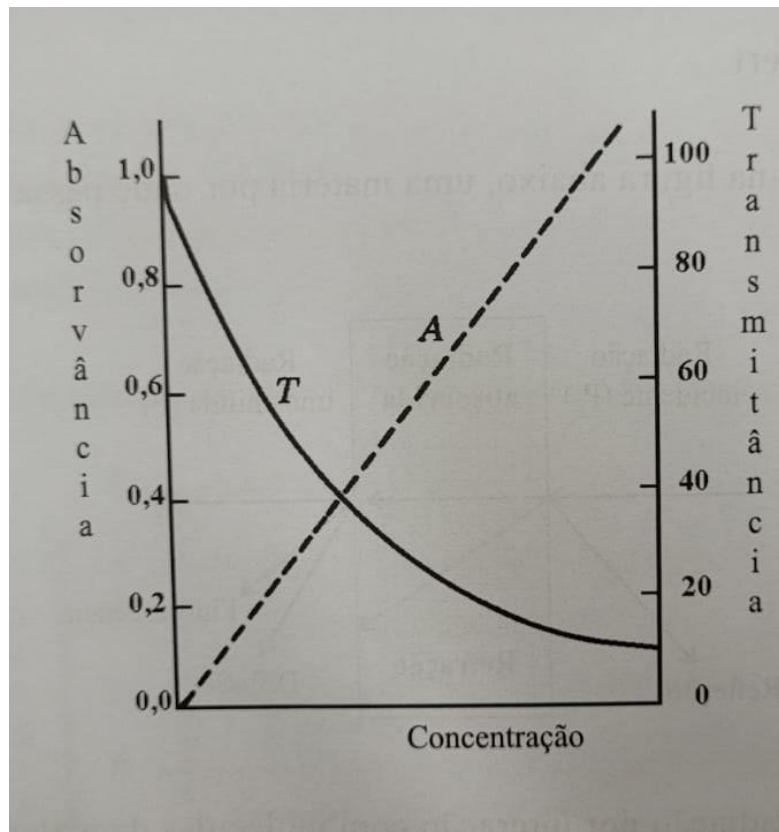
- Transmitância é a razão entre o poder radiante transmitido pela amostra e o poder radiante incidente na amostra:

- $T = I_t/I_0$

$$A = -\log T = \log \frac{1}{T} = abc$$

Lei de Beer-Lambert

- Absorbância é o log do inverso da transmitância:



Lei de Beer-Lambert

- Absortividade molar: é a constante a da equação quando a concentração do analito é expressa em mol/L.
- A constante a é característica de cada espécie química e é referida a um determinado λ , geralmente o de maior absorção λ_{\max} .

Lei de Beer-Lambert

- Pela Lei de Beer podemos concluir que a Absorbância de uma solução é diretamente proporcional à concentração da espécie absorvente quando se fixa o comprimento do percurso.
- A absorbância é diretamente proporcional ao caminho do percurso quando se fixa a concentração.

Lei de Beer-Lambert

- Desvios da Lei de Beer-Lambert
 - Desvios químicos: quando há interação das moléculas do soluto entre si e com o solvente, através de dissociação e associação (para evitar, trabalha-se com soluções diluídas)

Lei de Beer-Lambert

- Desvios da Lei de Beer-Lambert

- Desvios instrumentais:

A iluminação não é monocromática

O sinal do detector não é nem linear nem proporcional à concentração da solução.

Análises qualitativa e quantitativa

Análise qualitativa

- Realizada pela comparação com padrões do valor do comprimento de onda, onde a absorção é máxima, e do perfil do espectro total.
- Necessário fazer a confirmação da identidade por outros métodos, pois pode haver dois compostos que tenham absorção máxima no mesmo comprimento de onda, além de perfis muito semelhantes.

Análise quantitativa

- A quantidade do composto é medida pelo valor da absorbância máxima. Para medidas quantitativas, deve-se escolher um comprimento em que a absorvidade esteja num máximo, isto é, no topo de um pico de absorção.
- Ou seja: A escolha do comprimento de onda máximo deve ser onde haja máxima absorbância e mínima transmitância.

Análise quantitativa

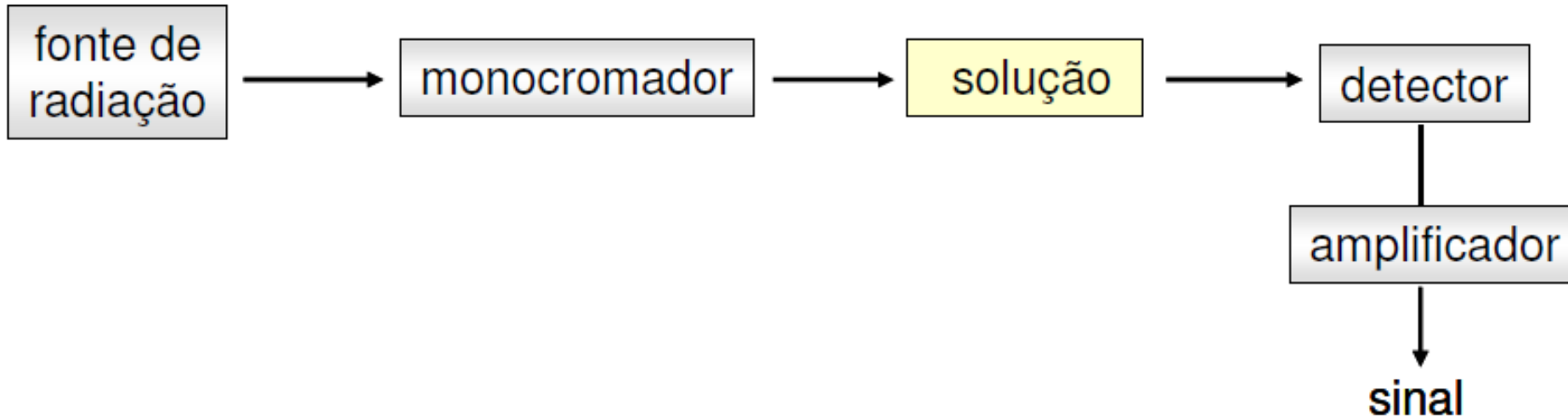
- Por que?
 - A variação na absorbância para uma dada mudança de concentração será maior (maior sensibilidade e precisão)
 - Efeito de outras substâncias é minimizado
 - A mudança de absorbância com o comprimento de onda é menor devido ao espectro de abs médio ser relativamente plano no topo do pico. A medida não é afetada seriamente por pequenos erros no ajuste do comprimento de onda.

Análise quantitativa

- Cálculos
- A) Se eu tiver a absorvidade conhecida: usar a Lei de Beer-Lambert e achar o valor de c ($A = abc$) – Exemplo: carotenóides.
- B) Seu não tiver o valor de a : Fazer curva padrão (linearidade)
CUIDADO: acima de certa concentração, a curva deixa de ser linear.

Espectrofotômetros

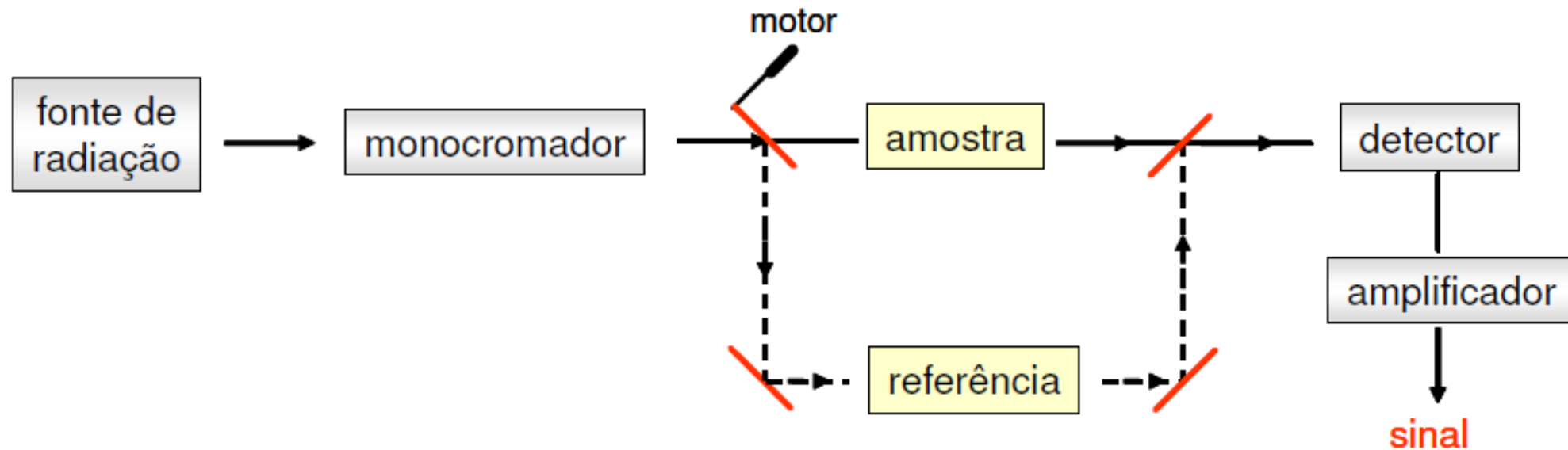
Espectrofotômetro de feixe único



Espectrofotômetro de feixe único

- Opera com um único feixe de radiação, que vai da fonte ao detector, passando pelo sistema de seleção de λ e pela amostra.
- Menor custo que os de duplo feixe.
- Apresenta boa razão sinal/ruído e bom limite de detecção.
- Adequados para análises quantitativas quando um único comprimento de onda é utilizado.

Espectrofotômetro de feixe duplo



Espectrofotômetro de feixe duplo

- Permite obtenção de espectros por varredura mecânica.
- Menor razão sinal/ruído e pior limite de detecção, quando comparado ao de feixe único, devido à atenuação na I_0 que incide na amostra até a chegada no detector.
- Cubetas usadas para mensurar padrão e amostra devem ser idênticas.

Fonte de radiação

- Idealmente, devem ser estáveis e emitir um feixe de radiação com intensidade suficiente para ser detectável mesmo após a monocromação e a absorção parcial.
- Principais:
 - Lâmpadas de filamento de tungstênio (região do Vis).
 - Lâmpadas de deutério (região do UV).

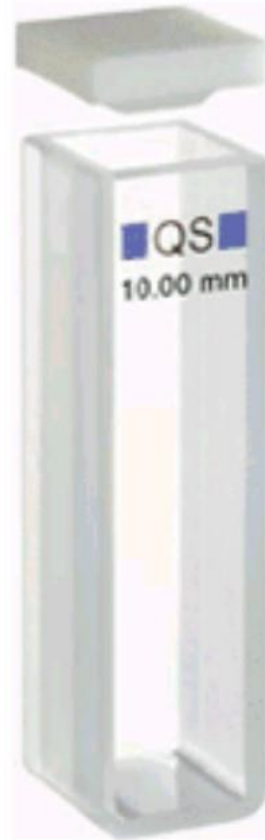
Seleção do λ

- Rigorosamente, a Lei de Beer é aplicada para feixes de radiação monocromáticos (em uma faixa estreita de λ).
- Devido ao uso de fontes de emissão contínuas, faz-se necessário o uso de seletores de λ :
 - Monocromadores;
 - Filtros de absorção ou interferência (em equipamentos mais simples, que operam na região do Vis).

Cubetas

- Construídas de material transparente à radiação na região espectral de interesse.
- Janelas devem ser perfeitamente normais à direção do feixe incidente para minimizar perdas por refração.
- Principais materiais:
 - Vidro borossilicato, transparente entre 380 e 2000 nm;
 - Quartzo, transparente entre 160 e 3500 nm (**únicas apropriadas para uso na região UV**).

Cubetas



Detectores de radiação

Idealmente, devem apresentar:

- Alta sensibilidade;
- Alta razão sinal/ruído;
- Resposta para uma faixa considerável de λ ;
- Tempo de resposta bastante curto.

Detectores de radiação

- São transdutores que convertem a energia radiante em sinal elétrico.
- Sinal elétrico produzido deve ser proporcional à intensidade da radiação (I).
- Maioria dos detectores apresenta uma pequena e constante resposta na ausência de radiação, denominada corrente de fundo (*dark current*), mas adição de circuito eletrônico compensa esta corrente.

Detectores de radiação

- Respondem à radiação transmitida e são denominados detectores fotoelétricos ou transdutores fotônicos.
- Têm superfície ativa capaz de absorver a energia da radiação.
- Absorção da radiação promove:

Emissão de elétrons produzindo uma fotocorrente

OU

Aumento da condutividade, ou seja, fotocondução.

Referências Bibliográficas

- H. Bergamin Filho, F.J. Krug, E.A.G. Zagatto, F.R.P. Rocha. Espectrofotometria no ultravioleta e visível. Apostila. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2010.
- D.C. Harris, Análise Química Quantitativa, 6ª Ed, Rio de Janeiro, LTC, 876 p, 2005.
- D.A. Skoog, F.J. Holler e T.A. Nieman. Princípios de Análise Instrumental, 5ª Ed, Bookman, Porto Alegre, 836 p, 2002.
- R.A. Day e A.L. Underwood. Quantitative analysis, 3ª Ed, Prentice Hall, Englewood Cliffs, 534 p, 1974.
- H.H. Willard, L.L. Merrit, J.A. Dean e F.A. Settle. Instrumental methods of analysis, 6ª Ed, van Nostrand, New York, 1030 p, 1981.
- Z. Marczenko. Spectrophotometric determination of elements, Ellis Horwood, Chichester, 641 p, 1976.

Obrigada!