

ESPECTROFOTOMETRIA NO UV-VIS

Ficha técnica do equipamento

Espectrofotômetro Shimadzu UV-1650PC

Fontes de excitação: Lâmpada de deutério e Lâmpada de tungstênio-halogênio

Seletores de comprimento de onda: Monocromadores

Sistema fotométrico: Duplo feixe

Detector: Fotodiodos de silício

Largura de banda: < 2 nm

Faixa de varredura: 190 – 1.100 nm

Velocidades de varredura: de 160 nm/min até 3.200 nm/min

Incrementos de comprimento de onda:

Determinação de permanganato em água

O permanganato de potássio pode ser encontrado em formulação farmacêutica na forma de comprimidos ou pós, sendo usado para a limpeza e o tratamento de afecções de pele. Como parte do controle de qualidade na produção desses tipos de formulação, a dosagem do princípio ativo faz-se necessária. A presente prática pode, por exemplo, ser usada para essa finalidade.

A espectrofotometria no UV-Vis utiliza uma fonte de luz monocromática ou policromática para obter informações de concentração de determinadas espécies químicas. Devido aos padrões diferentes de absorção entre diferentes substâncias, a espectrofotometria possibilita identificar e quantificar espécies químicas.

As medidas quantitativas são de relativa simplicidade. Um feixe de luz com determinado comprimento de onda (ou faixa de comprimentos de onda) passa através da amostra, e então o espectrofotômetro nos permite medir a quantidade de radiação transmitida através dessa solução, e, por conseguinte, a quantidade absorvida.

Para determinação da concentração de um analito em uma amostra utilizando essa técnica, geralmente utiliza-se uma comparação da absorbância da amostra com uma série de soluções-padrão, nas quais se conhece a concentração do analito de interesse.

DESENVOLVIMENTO DO EXPERIMENTO

Preparo das soluções para a curva analítica

A partir de uma solução estoque de permanganato de potássio 500 mg/L, preparar os padrões em água destilada, nas seguintes concentrações:

Tabela 1: *Diluições dos padrões usados na construção da curva analítica*

Concentração de permanganato (mg/L)	Volume da solução estoque (mL)	Volume aproximado de água (mL)	Volume total do balão volumétrico (mL)
10,0			100,0
20,0			100,0
30,0			100,0
40,0			100,0
50,0			100,0

Separar aproximadamente 70 mL de **cada** solução para a prática de FIA.

Varredura espectral para determinação do comprimento de onda ideal ($\lambda_{\text{máx}}$) para análise

- No modo de aquisição de dados espectrais do software, fazer os ajustes iniciais, zerando-se a linha de base registrada pelo espectrofotômetro (300 a 800 nm) (comando “Baseline”).
- Utilizando-se a solução-padrão de concentração 10,0 mg/L, fazer uma varredura espectral preliminar na faixa de 300 a 800 nm, utilizando a maior velocidade de varredura e os maiores passos (incrementos) de variação do monocromador.
- Selecionar uma janela de 200 nm ao redor da maior banda de absorção e repetir a varredura espectral com menor velocidade e menores passos (incrementos) de variação do monocromador.

- Comparar o melhor detalhamento espectral da segunda varredura e anotar o comprimento de onda máximo absorvido, a ser usado nos demais experimentos.

Curva analítica

As medições para a construção da curva analítica são feitas no modo fotométrico do software, indicando-se o comprimento de onda desejado para a leitura.

Para cada solução, realizar o seguinte procedimento:

- Inicialmente, garantir a limpeza da cubeta com água destilada, certificando-se da adequada limpeza das paredes do dispositivo e escoando-se toda a água do seu interior. Aproveitar essa solução para zerar inicialmente a leitura de absorvância do espectrofotômetro.
- Enxaguar a cubeta com um pequeno volume da solução de interesse (padrão ou amostra), para ambientar o dispositivo e evitar a diluição do padrão ou amostra. Em seguida, descarte essa solução. Repetir o procedimento.
- Preencher a cubeta com a solução de interesse, e garantir a secura das paredes externas desse dispositivo.
- Inserir a cubeta no espectrofotômetro e fazer a leitura de absorvância.
- Devolver a solução para o frasco original, preencher novamente a cubeta com a mesma solução e fazer a leitura novamente.
- Devolver a solução para o frasco original, preencher a cubeta pela terceira vez com a mesma solução e fazer a leitura. Ou seja, cada solução será analisada em triplicata.

Após a medida do primeiro calibrador, lavar a cubeta **apenas com água destilada (em abundância)**, preencher a cubeta com água destilada e fazer uma leitura para registro do **branco**.

Caso necessário, fazer um novo ajuste, zerando-se a absorvância registrada (comando "Auto zero").

Feito isso, passar para a segunda solução, repetindo o procedimento.

Devem-se intercalar as leituras de água (**branco**) entre **cada** solução dos padrões de calibração, conforme a Tabela 2. No caso dessa prática¹, por questões de simplicidade, a ordem das medidas deve ser da solução menos concentrada para a solução mais concentrada, e, ao final, as amostras.

Tabela 2: Curva analítica para o permanganato

Concentração de permanganato (mg/L)	Absorbância ($\lambda_{\text{máx}}$ = _____ nm)		
10			
1ª leitura do branco (água)			
20			
2ª leitura do branco (água)			
30			
3ª leitura do branco (água)			
40			
4ª leitura do branco (água)			
50			
5ª leitura do branco (água)			

Amostras desconhecidas

Após a aquisição dos dados para a curva analítica, analisam-se duas amostras de permanganato de concentração desconhecida, em triplicata.

¹ É importante salientar que em diversos protocolos de validação recomenda-se ou exige-se que a ordem das análises dos padrões calibradores e amostras seja aleatória, ao longo da sequência das medições, considerando-se tanto as diferentes concentrações quanto as diferentes replicatas dos padrões e amostras.

Tabela 3: Análise das amostras com concentração desconhecida

Amostra	Absorbância			Concentração de permanganato (mg/L)
A				
B				

Tratamento dos dados

Curva analítica

Construa a curva analítica do permanganato, montando um gráfico de absorbância (adimensional) x concentração de permanganato (mg/L), com todos os dados adquiridos (não apenas as médias). Obtenha o coeficiente angular e linear para a curva. Coloque os erros em cada ponto do seu gráfico. A partir dessas informações, calcular a concentração de permanganato nas amostras A e B.

Parâmetros analíticos

A partir das medidas efetuadas, determinar os seguintes parâmetros analíticos:

- Faixa linear
- Coeficiente de correlação
- Sensibilidade
- Ruído
- Limite de detecção (LD)
- Limite de quantificação (LQ)

Questões complementares

- 1) Faça um diagrama de blocos de um espectrofotômetro de UV-vis de feixe duplo, detalhando seus componentes principais e descrevendo sua função.
- 2) Defina os seguintes termos, e como são calculados:
 - i. Faixa linear
 - ii. Coeficiente de correlação
 - iii. Sensibilidade
 - iv. Detectabilidade

- v. Ruído
- vi. Limite de detecção (LD)
- vii. Limite de quantificação (LQ)

- 3) É possível analisarem-se dois analitos, simultaneamente, durante uma leitura no espectrofotômetro de UV-vis? Justifique.
- 4) Se a concentração de uma amostra é 50 vezes maior que aquela do último ponto de uma curva analítica, qual deve ser o procedimento para se analisar essa amostra?

ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)

Ficha técnica do equipamento

Espectrofotômetro FEMTO 700S, com cela de detecção em fluxo

Bomba peristáltica ISMATEC operando com 2 canais

Injetor manual “labmade”

Fontes de excitação: Lâmpada de deutério e lâmpada de tungstênio-halogênio

Seletores de comprimento de onda: Monocromadores com rede de difração

Sistema fotométrico: Feixe simples

Detector: Fotodiodo

Largura de banda: 5,0 nm

Faixa de varredura: 190 – 1100 nm

Determinação de permanganato em água

Uma alternativa para as análises de permanganato com detecção espectrofotométrica, conforme discutido na seção anterior é o processo de análise química por injeção em fluxo (FIA), esse processo tem como conceito básico a inserção da amostra em um fluido carregador que transporta a amostra, em última instância, até o detector. O carregamento e a medida da amostra são realizados a uma vazão constante o que permite que o sinal obtido seja proporcional à concentração da espécie de interesse.

Inicialmente a injeção da amostra no fluido carregador era feita utilizando uma seringa hipodérmica, o que deu nome ao processo. Atualmente são empregados outros dispositivos como válvulas rotativas, válvulas de seis ou oito vias, entre outros sistemas.

Durante o transporte até o detector a amostra pode reagir com outras substâncias (o que permite monitorar o produto da reação, por exemplo), ser diluída, separada ou concentrada, o que faz desta uma técnica muito versátil.

O sistema de injeção em fluxo é empregado para automatizar procedimentos analíticos clássicos, desta maneira, o manuseio da amostra pelo analista é

diminuído, assim é possível melhorar a precisão das medidas e aumentar o número de amostras processadas por unidade de tempo. Também é possível diminuir o consumo de reagentes, além da geração de resíduos.

DESENVOLVIMENTO DO EXPERIMENTO

Preparo das soluções para a curva analítica

As soluções para a curva analítica são compartilhadas com aquelas destinadas à prática de espectrofotometria no UV-Vis.

Curva analítica

Com a alça de 5 cm, faça a análise das soluções dos padrões, em triplicata.

Tabela 1: Curva analítica no FIA

Concentração de permanganato (mg/L)	Absorbância		
	($\lambda_{\text{máx}}$ = _____ nm); Alça: _____ cm		
10			
20			
30			
40			
50			

Amostras desconhecidas

Após a aquisição dos dados para a curva analítica, analisam-se duas amostras de permanganato de concentração desconhecida, em triplicata.

Tabela 2: Análise das amostras com concentração desconhecida

Amostra	Absorbância			Concentração de permanganato (mg/L)
	($\lambda_{\text{máx}}$ = _____ nm); Alça: _____ cm			
A				
B				

Estudo do efeito do tamanho da alça de amostragem

Escolher entre uma das 3 concentrações das soluções de permanganato (20, 30 OU 40 mg/L), e fazer a análise da solução, em triplicata, variando-se o tamanho da alça de amostragem. Fazer a injeção direta do padrão no espectrofotômetro para avaliação da absorção máxima.

Tabela 3: Efeito da alça de amostragem

Tamanho da alça (cm)	Absorbância		
	$(\lambda_{\text{máx}} = \text{_____ nm}); [\text{MnO}_4^-] = \text{_____ mg/L}$		
5			
9			
18			

Tratamento dos dados

Diagrama da análise por injeção em fluxo (fiagrama)

Construa o diagrama da análise por injeção em fluxo (fiagrama) do permanganato, montando um gráfico de absorbância (adimensional) x tempo de análise (min).

Curva analítica

Construa a curva analítica do permanganato, montando um gráfico de absorbância² (adimensional) x concentração de permanganato (mg/L), com todos os dados obtidos e não apenas as médias. Obtenha o coeficiente angular e linear para sua curva. Coloque os erros em cada ponto do seu gráfico. A partir dessas informações, calcular a concentração de permanganato nas amostras A e B.

² A absorbância utilizada no caso da técnica de FIA é aquela registrada no máximo do pico observado no fiagrama, descontada a leitura equivalente ao nível da linha de base do pico.

Dispersão da banda injetada

Com base nos resultados da avaliação do tamanho das alças de amostragem, calcule os coeficientes de dispersão obtidos com cada alça.

Comparação entre métodos

A partir das medidas efetuadas na espectrofotometria no UV-Vis e na análise por injeção em fluxo, comparar os resultados de ambas.

Questões complementares

- 1) Quais são as principais diferenças da análise por injeção em fluxo e por batelada?
- 2) Quais as principais vantagens do FIA?
- 3) Qual o efeito da alça de amostragem na análise?
- 4) Por que, os valores de absorbância se alteram com alças de tamanhos diferentes, mesmo quando usando uma única concentração de permanganato?
- 5) Além de ser utilizada na química analítica, qual outra aplicação da análise por injeção em fluxo?