

Prática 10 – Introdução à espectrofotometria e Lei de Lambert-Beer

1) Objetivos da aula

Aprender os princípios da espectrofotometria e sua utilização. Conhecer a Lei de Lambert-Beer e obter espectros de absorvância de diferentes espécies químicas na fase líquida (KMnO_4 e K_2CrO_4).

2) Introdução

O termo espectroscopia (ou em alguns casos espectrofotometria) é a designação para toda técnica de levantamento de dados físico-químicos através da transmissão, absorção ou reflexão da energia radiante incidente em uma amostra. O resultado gráfico obtido, o sinal do detector uma função do comprimento de onda - ou mais comumente a frequência - é chamado espectro. Sua impressão gráfica pode ser chamada espectrograma ou, por comodidade, simplesmente espectro.

Originalmente o termo espectroscopia designava o estudo da interação entre radiação e matéria como uma função do comprimento de onda (λ). De fato, historicamente, espectroscopia referia-se ao uso de luz visível dispersa de acordo com seu comprimento de onda, e.g. por um prisma.

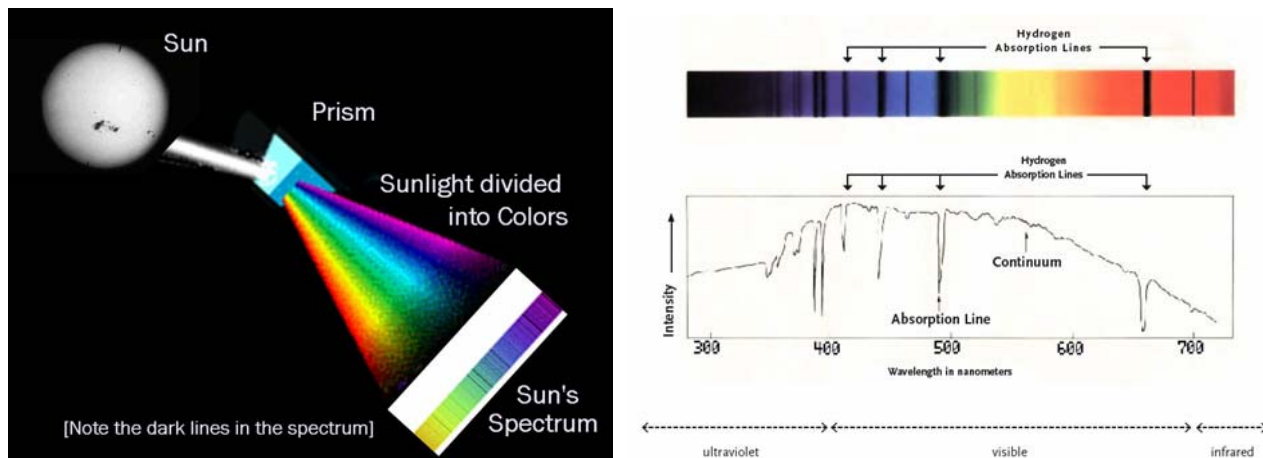


Figura 1. A) Esquema da dispersão da luz solar em um prisma e decomposição da luz em cores distintas e raias escuras (linhas espectrais). B) Gráfico da intensidade da radiação em função comprimento de onda – chamado de espectro.

Fonte <http://scope.pari.edu/> e http://www.pbs.org/wgbh/nova/teachers/activities/3113_origins_01.html

O fundamento da espectroscopia é a interação de uma radiação eletromagnética e a matéria constituinte da amostra. A energia incidente pode ser refletida, transmitida ou absorvida. Haverá interação não somente se houver ressonância entre dois entes: a onda eletromagnética e uma partícula (átomo, molécula ou íon) mas também se a energia for mais alta que a necessária para ocorrer uma transição eletrônica.

As condições para que haja essa absorção são: i) A frequência da onda incidente coincidir com uma frequência natural de um tipo de oscilação do sistema; ii) Sejam respeitadas as regras de seleção quânticas atinentes ao sistema e à faixa de frequências particular envolvida.

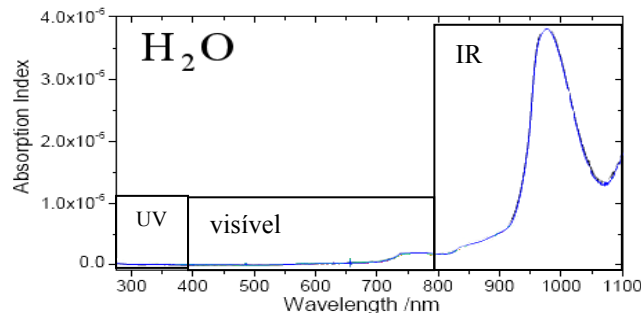
São três os principais tipos de processo pelos quais a radiação interage com a amostra e é analisada:

i) Espectroscopia de absorção - Correlaciona a quantidade da energia absorvida em função do comprimento de onda da radiação incidente.

ii) Espectroscopia de emissão - Analisa a quantidade de energia emitida por uma amostra contra o comprimento de onda da radiação absorvida. Consiste fundamentalmente na re-emissão de energia previamente absorvida pela amostra

iii) Espectroscopia de espalhamento (ou de dispersão)- Determina a quantidade da energia espalhada (dispersa) em função de parâmetros tais como o comprimento de onda, ângulo de incidência e o ângulo de polarização da radiação incidente.

O espectro da água no UV-VIS-IR



Lembrete prático:

- Soluções que absorvem no VERMELHO apresentam coloração AZUL-VERDE
- Soluções que absorvem no AZUL-VERDE apresentam coloração VERMELHO

3) Instrumentação

Em geral, espectrômetros ou espectroscópios são equipamentos destinados à análise de radiação, mormente ondas eletromagnéticas (incluindo-se nestas a luz visível). Desta forma, servem para a análise físico-química cujo processo é chamado espectroscopia. Os espectrômetros compreendem uma fonte de energia radiante, um sistema colimador (fenda, lentes...), um local destinado à amostra, um sistema monocromador e um sistema detector.

É comum ainda se confundirem estes termos com **espectrofotômetro**. Entretanto, ao termo espectrofotômetro reserva-se o sentido de ser um espectrômetro que utiliza radiação na zona da luz, ou seja, entre o infravermelho e o ultravioleta (inclusive). Neste sentido, existem espectrofotômetros UV-visível (ou apenas visível), de infravermelho e de fluorescência (ou fluorímetros).

Nos equipamentos de espectroscopia basicamente são comuns os seguintes componentes: Fontes de radiação (ex. lâmpada UV, Fonte de IR, luz Síncrotron), Colimadores, Recipientes para amostras, Monocromadores (prismas ou redes de difração), Detectores/Transdutores (ex: fotodiodo, fotomultiplicador, CCD), Processador, Saída (ex: monitor de computador).

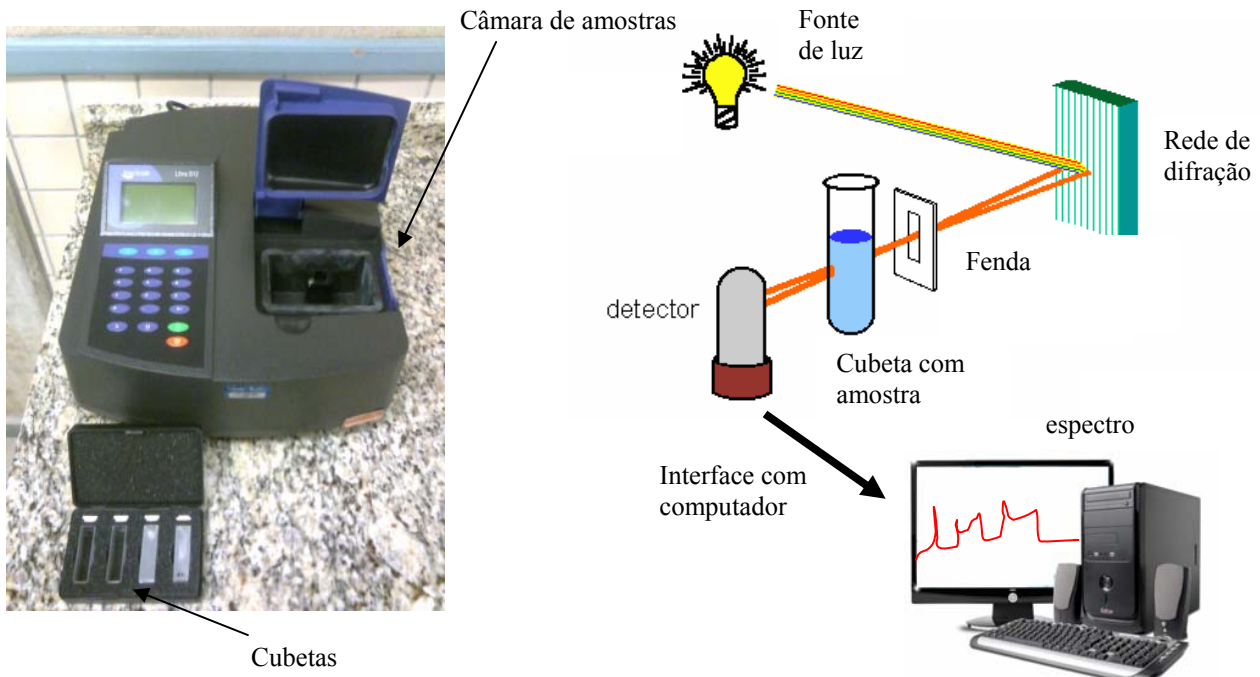
3.1) O espectrofotômetro UV-Vísível

Os espectrofotômetros são instrumentos de análise que permitem:

i) Selecionar o comprimento de onda (λ , lâmbda) da radiação adequado à análise de um determinado componente

ii) Medir a intensidade I do feixe emergente que corresponde a um determinado feixe incidente I_0 , convertendo o sinal recebido no detector em medida de absorbância (ou absorvância) para o comprimento de onda da análise.

iii) Determinar a concentração de uma espécie em solução a partir do gráfico da variação de absorbância (ou transmitância) em função da concentração de várias soluções-padrão.



3.2) Cobertura espectral

Cobertura espectral é o nome que se dá a faixa de comprimentos de onda de um dado espectro. Este pode cobrir uma região grande ou não, por exemplo, se cobrir toda a parte visível a cobertura espectral será de 400-800nm. Outros exemplos de espectros com cobertura espectral são 200-400nm, 175-190nm, 1 μ m- 3.31 μ m, 12eV-40eV, etc.

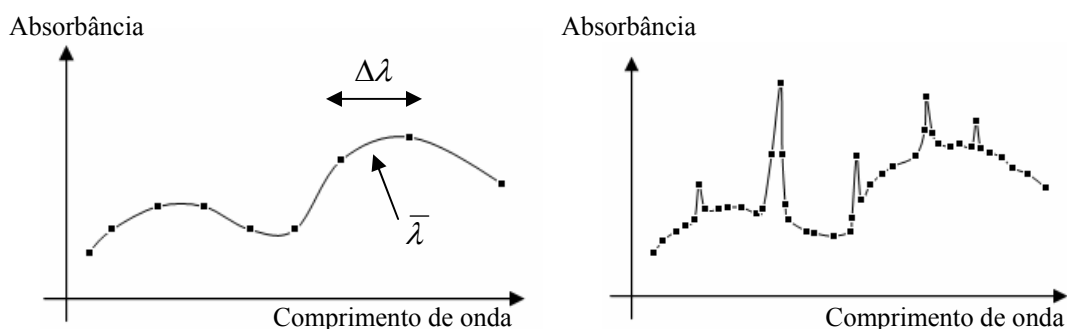
Obs. ver detalhes sobre a radiação ultravioleta em http://pt.wikipedia.org/wiki/Radiação_ultravioleta

3.3) Resolução espectral

A resolução de um espectro pode ser definida como o quociente entre o valor de um dado comprimento de onda (ex. comprimento de onda médio, $\bar{\lambda}$), e a diferença entre os comprimentos de onda medidos antes e depois desse valor médio ($\Delta\lambda$).

$$R = \frac{\bar{\lambda}}{\Delta\lambda}$$

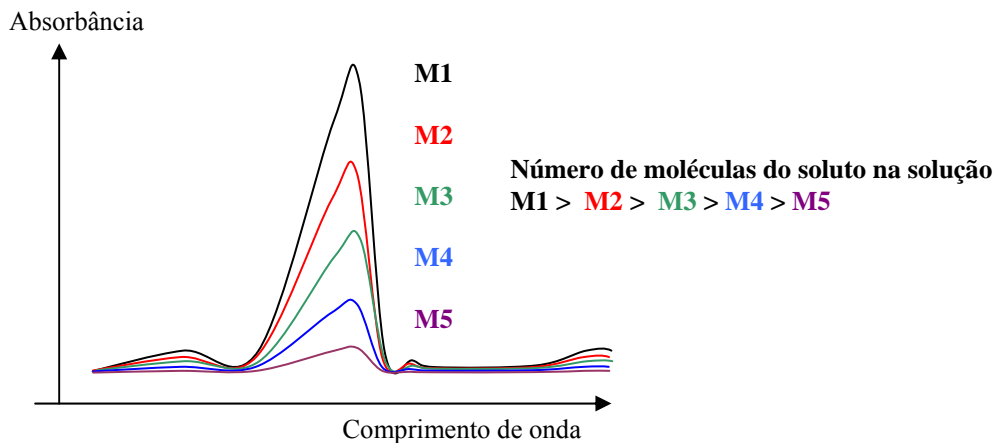
Na figura abaixo vemos dois espectros com diferentes resoluções. Como o espectro da direita $\Delta\lambda$ é menor a resolução R é maior e portanto é possível identificar algumas características espectrais (linhas espectrais) que não são evidentes no espectro de resolução menor



Obs. Em um espectro com grande cobertura espectral, se todas as medidas tiverem sido obtidas com o mesmo espaçamento entre comprimentos de onda, iremos ter nas extremidades do espectro duas resoluções bem distintas. Nesse caso a resolução maior será na parte dos comprimentos de onda mais longos.

3.4) Sensibilidade

É a capacidade do instrumento de detectar (ou medir) uma quantidade mínima de amostra. Na figura abaixo podemos um exemplo de espectros de absorção de soluções com diferentes concentrações de um composto. Dependendo da sensibilidade da sensibilidade do equipamento este consegue “medir” mais ou menos moléculas do soluto na solução (ou da própria amostra).



3.5) Lei de Lambert-Beer

A lei de Lambert-Beer (tambem conhecida como lei de Beer-lambert, Lei de Beer ou ainda lei de Beer-Lambert-Bouguer) relaciona a absorção da luz (radiação eletromagnética em geral) com as propriedades do material pela qual a luz esta passando.

Essa lei diz que existe uma dependência logarítmica entre a transmissão (ou transmissividade), T , da luz através de uma substancia e o produto da entre o coeficiente de absorção da substancia, α , a distancia que a luz percorre dentro de substancia (caminho percorrido), l . O coeficiente de absorção pode ser escrito como um produto entre uma grandeza chamada de absorvidade molar dos absorvedores, ϵ , e a concentração, c . A absorvidade molar esta associado com transições eletrônicas, rotacionais ou vibracionais de cada espécie considerada podendo ser considerada como uma “impressão digital” de cada espécie química. O coeficiente de absorção pode ser definido também como um produto entro uma seção de choque de absorção, σ , e a densidade numérica N de absorvedores.

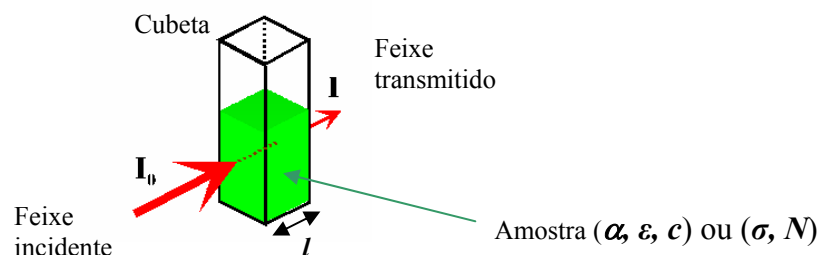
Para líquidos, estas relações podem são mais comumente escritas como

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\alpha l} = 10^{-\epsilon l c}$$

Enquanto que para gases e sólidos, e em particular, para estudos físicos, físicos-químicos e espectroscópicos elas também podem ser escritas como

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-\alpha' l} = e^{-\sigma l N}$$

onde I_0 e I são a intensidade da radiação incidente e transmitida, respectivamente. Σ é a seção de choque de absorção da lus por uma única partícula (ou molécula) e N é a densidade numérica (partículas por unidade de volume) de absorvedores. A diferença entre a utilização de base 10 ou base e (no logaritmo) é puramente convencional, exigindo a multiplicação de uma constante pare converter uma na outra. A figura abaixo mostra ilustra as variáveis no calculo da lei de Lambert-Beer para amostras liquidas dentro de cubetas especiais para medições espectroscópicas.



A transmissão (ou transmissividade) pode ser expressa em termos da absorbância que para líquidos é definida como:

$$A = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) = -\log_{10} T$$

enquanto para gases ou sólidos é usualmente definida como:

$$A' = -\ln \left(\frac{I}{I_0} \right) = -\ln T$$

Isto implica que a absorbância varia linearmente com a concentração da amostra (ou densidade numérica de absorvedores) de acordo com as relações

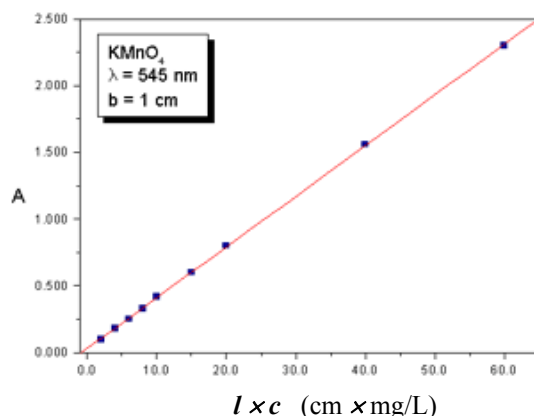
$$A = \epsilon l c = \alpha l$$

← Lei de Beer na sua forma mais usual

e

$$A' = \sigma l N = \alpha' l$$

para cada um dos casos, respectivamente. Dessa forma, se o comprimento l e a absorptividade molar ϵ (ou a seção de choque de absorção, σ) são conhecidos e a absorbância é medida e, conseqüentemente, a concentração da substância, c , (ou o número de absorvedores, N) pode ser deduzido. Na figura abaixo temos um exemplo de um gráfico A versus $l \times c$ obtido em um certo comprimento de onda. O ajuste linear aos pontos experimentais nesse tipo de gráfico nos dá diretamente o valor da absorptividade molar ϵ no comprimento de onda estudado.



3.6) Unidades

Se a concentração, c , é expressa em termos da fração molar, i.e., um fração dimensional, a absorptividade molar, ϵ , assume a mesma dimensão do coeficiente de absorção, ou seja, $1/m$. Entretanto, se a concentração for expressa em moles por unidade de volume, a absorptividade molar ϵ , será expressa por $cm^{-1} L mol^{-1}$ ou m^2/mol (no sistema internacional).

De forma sintética podemos escrever as equações anteriores para transmitância e absorbância como:

$$T = \frac{I_1}{I_0} = e^{-\sigma l N} = e^{-\alpha' l}$$

$$A' = -\ln \left(\frac{I_1}{I_0} \right) = \alpha' l = \sigma l N \quad e \quad A = -\log_{10} \left(\frac{I_1}{I_0} \right) = \frac{\alpha' l}{2.30} = \alpha l = \epsilon l c.$$

3.7) Relacionando Absorbância com a Transmitância.

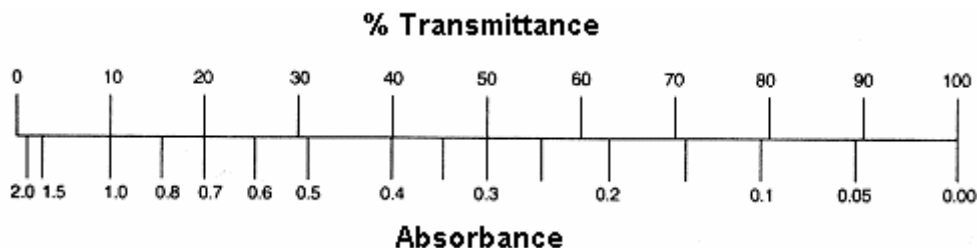
As equações a seguir mostram como relacionar Absorbância com a Transmitância:

$$A = \log_{10} 1 / T$$

$$A = \log_{10} 100 / T(\%)$$

$$A = 2 - \log_{10} T(\%)$$

A última das equações acima, $A = 2 - \log_{10} T(\%)$, é importante pois permite calcular facilmente a absorvância a partir da transmitância percentual. A relação entre Absorvância e transmitância é ilustrada no diagrama seguinte, onde colocamos as escalas de cada uma:



Então, se a luz passa através de uma solução *sem* absorção nenhuma, a absorvância é zero, e a transmitância percentual é 100%. No caso em que toda a luz é absorvida, a transmitância percentual é zero e a absorvância é infinita.

3.8) Desvios da Lei de Lambert-Beer:

Desvios Reais: São desvios que ocorrem devido às interações dos centros absorventes e a variação do índice de refração.

Na derivação da Lei de Beer admitimos que os centros absorventes não tem interações entre si ou com outras espécies presentes na solução isso faz com que a Lei de Beer tenha caracter de uma lei limite aplica principalmente para soluções muito diluídas. Essa interação altera a distribuição de cargas na espécie absorvente, modificando a energia necessária para sua excitação, portanto a posição, a forma e a altura da banda de absorção podem sofrer alterações.

Outro Desvio Real da Lei de Beer é a possibilidade de haver uma variação do índice de refração "n" da solução com a concentração. Isso decorre do fato de ϵ depender do índice de refração da solução. Para soluções de baixas concentrações "n" é constante, porém pode variar consideravelmente para soluções com concentrações mais altas.

Desvios Aparentes: podem ser classificados em:

1-Desvios Químicos: aqueles que ocorrem devido a associação ou dissociação da espécie absorvente ou então o constituinte não é completamente convertido em uma única espécie absorvente

2-Desvios Instrumentais: i) são desvios que ocorrem devido ao instrumento utilizado na medição da absorvância. ii) Largura finita da faixa espectral escolhida; iii) Radiação estranha refletida dentro do equipamento que alcançou o detector; iv) Variação da resposta do detector; v) Flutuação da intensidade da fonte.

4) Parte experimental:

Dicas importantes:

- A cubeta tem dois lados que são foscos, os quais devem ser utilizados para segurá-la e para colocar no compartimento de amostra do espectrofotômetro. Evite tocar nos lados transparentes da cubeta, pois constituem o caminho ótico. A oleosidade dos dedos influencia na medida da absorbância.

- Devido à presença de radiação na faixa do ultravioleta, prejudicial aos olhos, mantenha a tampa da câmara de amostras do espectrofotômetro sempre fechada e evite olhar para seu interior enquanto aberta.

- Feche a tampa da câmara de amostras do espectrofotômetro antes de iniciar a leitura.

- Lembre-se. Não toque na parte transparente das cubetas!

Materiais:

12 balões volumétricos de 100 mL

01 béquer de 250 mL

01 pipeta graduada (5 mL)

02 Béqueres 500 mL (descarte)

03 cubetas de vidro (uma somente para água destilada)

02 tubos de ensaios

Água destilada

K_2CrO_4 0,02 mol/L (250 mL)

$KMnO_4$ 0,02 mol/L (250 mL)

Papel macio para limpeza das cubetas

EXPERIMENTO 1) Determinação do espectro de absorção de soluções aquosas de permanganato de potássio ($KMnO_4$) e de cromato de potássio (K_2CrO_4).

Para cada uma das soluções fazer o seguinte procedimento.

a) Antes das medidas das soluções calibrar o espectrômetro (=definir o ponto zero da absorbância) com uma cubeta contendo apenas água .

Obs. Alguns espectrômetros permitem medir ao mesmo tempo a absorbância de duas cubetas, uma delas com o intuito de calibração. Outros espectrômetros necessitam que se meça a absorbância do solvente puro ($A_{solvente}$) antes ou depois de se medir a absorbância da solução a ser estudada ($A_{solução}$). Por fim, a absorbância corrigida da solução (A_c) é obtida por: $A_c = A_{solução} - A_{solvente}$. Com esse procedimentos subtraímos o efeito do solvente e da própria cubeta na absorção da radiação.

Outros espectrofotômetros é feito uma calibração interna considerando a absorbância do solvente. Nesse caso o valor medido já é direto a absorbância do solvente.

Preste atenção ainda se o valor medido for em transmitância percentual $T(0-100\%)$ nesse caso para determinar absorbância fazer o calculo $A = 2 - \log_{10} T(\%)$.

b) Pipetar 2 mL de cada solução estoque de concentração $2,0 \cdot 10^{-2}$ mol/L, e transferir para um balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com água destilada até o menisco e homogeneizar a solução.

c) Complete a tabela da próxima pagina com os valores das absorbâncias medidas. Se necessário calcule a absorbância corrigida das soluções (A_c) usando a Eq. do item 1.

d) Construir um único gráfico, exibindo a absorbância (A_c) em função do comprimento de onda, mostrando os dois conjuntos de pontos experimentais. Utilize bolinhas e triângulos para marcar os pontos referentes ao $KMnO_4$ e K_2CrO_4 , respectivamente. Ligue os pontos referentes a cada espécie química de forma a ficar mais fácil a visualização do espectro.

Comprimento de onda (nm)	Absorbância Água	Absorbância Solução de KMnO_4	Absorbância Solução de KMnO_4 (corrigida)	Absorbância Solução de K_2CrO_4	Absorbância Solução de K_2CrO_4 (corrigida)
200					
250					
300					
350					
355					
360					
365					
370					
375					
390					
400					
415					
430					
440					
450					
460					
470					
480					
490					
500					
510					
520					
530					
540					
550					
560					
570					
580					
590					
600					
650					
700					
750					
800					
850					
900					
950					

Obs. Lembre-se de utilizar a expressão $A_c = A_{\text{solução}} - A_{\text{solvente}}$ para calcular a absorbância corrigida das soluções se necessário. Caso o espectrofotômetro permita a determinação direta da absorbância corrigida desconsidere as colunas 2, 3 e 4 da tabela acima.

e) Calcule a resolução dos espectros em torno dos comprimentos de onda 415nm e 850nm.

EXPERIMENTO 2) Determinação do coeficiente de absorvidade molar de soluções aquosas de permanganato de potássio (KMnO₄) e de cromato de potássio (K₂CrO₄) em 3 comprimentos de onda fixos.

Para cada uma das soluções fazer o seguinte procedimento.

a) A partir da solução estoque de concentração $2,0 \cdot 10^{-2}$ mol/L, preparar soluções padrão, utilizando uma pipeta graduada, pipetando os volumes de, 1mL, 2 mL, 4 mL, 8 mL e 10mL, em balões volumétricos de 100 mL. Completar o volume com água destilada até o menisco e homogeneizar a solução.

b) Com base no espectro obtido anteriormente escolher dois comprimentos de onda para cada espécie química. Um referente a onde ocorreu o **máximo de absorção** de cada composto e outro em fixo em **500 nm**. Complete as tabelas abaixo com os valores obtidos para os dois compostos.

Obs. Antes de efetuar as medidas de absorção das soluções verificar se o espectrofotômetro já esta calibrado para absorbância igual a zero através de uma medida feita em uma cubeta contendo apenas água destilada. Se necessário calcule a concentração das soluções usando as informações do item **a** e faça as medidas de absorbância. Obs. $A_c = A_{solução} - A_{solvente}$

Solução de KMnO₄

Comprimento de onda (Abs. Max.): _____ nm

$A_{solvente} =$ _____

Comprimento de onda: 500 nm

$A_{solvente} =$ _____

Volume inicial pipetado (mL)	Concentração Molar (Mol/L)	Absorbância Corrigida
1		
2		
4		
8		
10		

Volume inicial pipetado (mL)	Concentração Molar (Mol/L)	Absorbância Corrigida
1		
2		
4		
8		
10		

Solução de K₂CrO₄

Comprimento de onda (Abs. Max.): _____ nm

$A_{solvente} =$ _____

Comprimento de onda: 500 nm

$A_{solvente} =$ _____

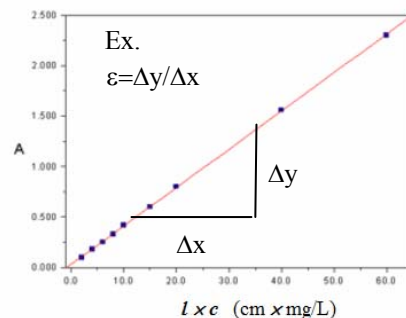
Volume inicial pipetado (mL)	Concentração Molar (Mol/L)	Absorbância Corrigida
1		
2		
4		
8		
10		

Volume inicial pipetado (mL)	Concentração Molar (Mol/L)	Absorbância Corrigida
1		
2		
4		
8		
10		

e) Para cada composto construa um gráfico da absorbância versus $l \times c$ e ajuste uma reta aos pontos experimentais. Tendo em mente a lei de Beer,

$$A = \epsilon lc$$

onde l é a distancia que a luz percorre dentro da solução (o comprimento da cubeta), ϵ é absorvidade molar e c é a concentração molar, determine pelo coeficiente angular do gráfico o coeficiente de absorvidade molar das espécies estudadas nos 3 comprimentos de onda selecionados neste experimento.



f) Qual dos dois compostos apresentou o maior o coeficiente de absorvidade molar em 500 nm?

EXPERIMENTO 3) Cálculo da concentração molar de soluções aquosas de permanganato de potássio (KMnO₄) e de cromato de potássio (K₂CrO₄) a partir de medidas de absorbância.

Procedimento:

a) Separe dois tubos de ensaio e identifique-os como A para a solução de KMnO₄ e B para a solução de K₂CrO₄.

b) Coloque o equivalente a ± 2 dedos de água destilada em cada tubo e depois adicione ± 3 gotas das soluções estoque de KMnO₄ e K₂CrO₄ (concentração $2,0 \cdot 10^{-2}$ mol/L) no tudo. Objetivo dessa etapa é preparar soluções cujas concentrações sejam desconhecidas. Posteriormente, faça movimentos circulares para homogeneizar a solução dentro do tubo de ensaio.

c) Encha uma cubeta com a solução de cada um dos tubos de ensaio e obtenha a absorbância A_c de cada cubeta no comprimento de onda máximo de absorção da respectiva substância (ver item 2 acima).

d) Sabendo o comprimento da cubeta l , o valor da absorbância A_c e absorvidade molar ϵ (ver item e do experimento 2) de cada substância no comprimento de onda em questão, calcule a concentração molar das soluções dentro dos tubos de ensaio A e B.

5. Bibliografia e literatura adicional.

- Constantino, M.G., da Silva G. V. J., Donato P. M. 2004, "Fundamentos de Química experimental", Editora EdUsp, São Paulo

- Castellan G., 1986, "Fundamentos de Físico-Química"; Editora LTC, 1a ed..

- Atkins P., de Paula J., 1008, "Físico-Química"; 8a ed., vol 1; Editora LTC.

- Russel J, Química geral vol. 1 e 2., ed. Makron Books.

Funcionamento de um espectrofotômetro: <http://www.youtube.com/watch?v=R4ZT3g2-Ryg>
http://www.youtube.com/watch?v=0n-dbLzj_HM

Espectroscopia: <http://astro.if.ufrgs.br/rad/espec/espec.htm>

NIST database: <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>

UV-Vis Hand book: <http://bit.ly/a0MPJ7>

K₂CrO₄: http://pt.wikipedia.org/wiki/Cromato_de_potássio

KMnO₄: http://pt.wikipedia.org/wiki/Permanganato_de_potássio

Apêndice A. Informações adicionais sobre espectros no UV-VIS

Na presença de radiação eletromagnética, elétrons de camada de valência são excitados e promovidos a orbitais de maior energia.

Na faixa do UV-Vis, os fótons fornecem energia suficiente para mover os elétrons dos orbitais ligados de Valência.

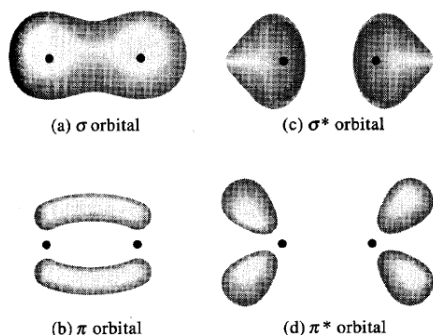
Organic molecules

$$\Psi_{\sigma} = \Psi_{s_A} + \Psi_{s_B} \quad \text{Bonding } \sigma \text{ molecular orbital}$$

$$\Psi_{\sigma^*} = \Psi_{s_A} - \Psi_{s_B} \quad \text{Antibonding } \sigma^* \text{ molecular orbital}$$

$$\Psi_{\pi} = \Psi_{p_A} + \Psi_{p_B} \quad \text{Bonding } \pi \text{ molecular orbital}$$

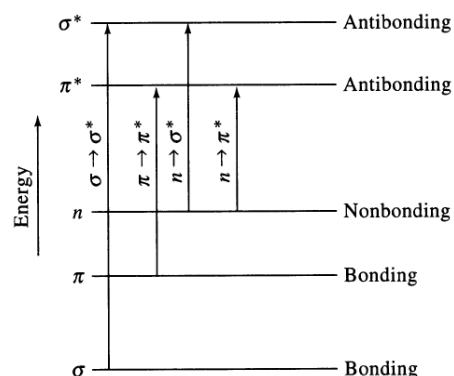
$$\Psi_{\pi^*} = \Psi_{p_A} - \Psi_{p_B} \quad \text{Antibonding } \pi^* \text{ molecular orbital}$$



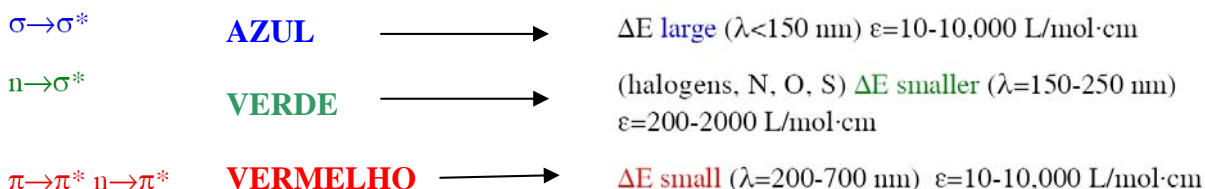
σ , π (bonding) and n (non-bonding) electrons



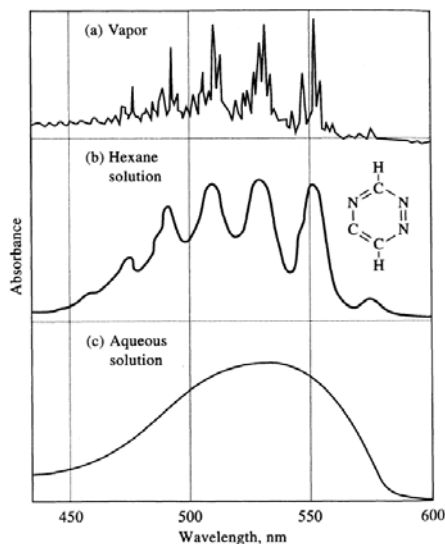
Arrange in terms of **energy**:



Em geral as em moléculas orgânicas as seguintes transições acontecem:

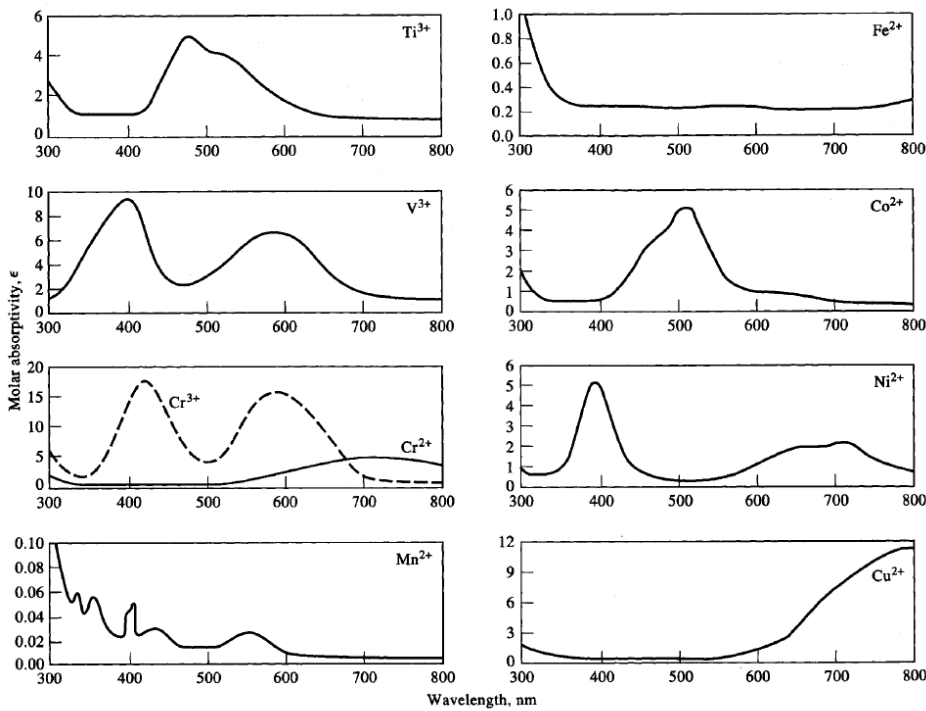


OBS. Na presença de solvente as características espectrais apresentam-se mais “alargadas”



Íons inorgânicos:

A maioria dos íons de metais de transição são coloridos (absorvem no UV-VIS) devido a transições eletrônicas entre orbitais $d \rightarrow d$.



Lembrete:

- Soluções que absorvem no **VERMELHO** mostram-se **AZUL-VERDE**
- Soluções que absorvem no **AZUL-VERDE** mostram-se **VERMELHO**

Ref: <http://www.cem.msu.edu/~cem333/index.html>