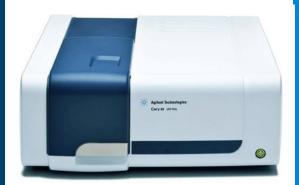
UV-Vis e Fluorescência: teoria e aplicações

Dra. Luciana Assis Terra

Cientista de Aplicação – Espectroscopia Molecular e Raman









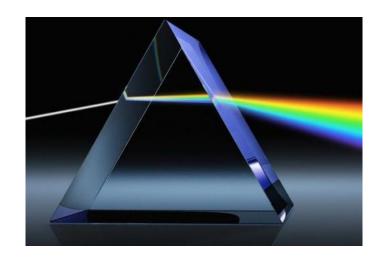
DE. 3497453704

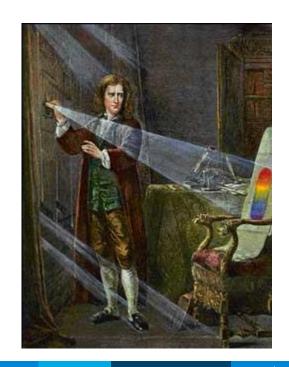
Introdução

Espectroscopia é o estudo da interação da matéria com a radiação eletromagnética.

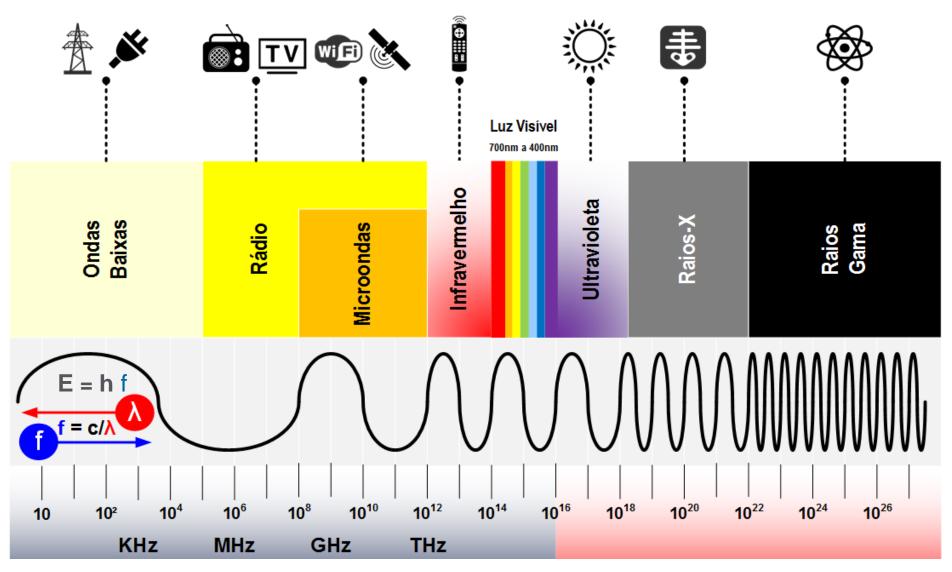
Historicamente, a espectroscopia teve origem através do estudo de luz visível dispersa por um prisma (Newton, 1666).

Mais tarde, o conceito foi expandido para compor qualquer interação com a energia em função de seu comprimento de onda ou frequência.





Espectro Eletromagnético



Fonte: https://medium.com/ubntbr/como-o-sinal-wifi-%C3%A9-propagado-na-natureza-d87daef39575



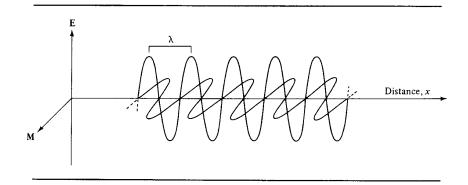
Definições Luz

A luz pode ser descrita de duas maneiras:

- Propriedades semelhantes a ondas Termos como comprimento de onda e frequência são frequentemente usados.
- Propriedades semelhantes a partículas Estes são expressos em termos de pacotes de energia chamados fótons.

Estes termos são válidos ao longo de todo o espectro eletromagnético e não se limitam ao que normalmente é considerado "luz" (visível, ultravioleta, e infravermelho).

A luz é considerada como onda na natureza, pois consiste em oscilar campos elétricos (E) e magnéticos (M). Estes campos estão em ângulos retos uns aos outros, e viajam a uma velocidade constante em um determinado meio. No vácuo, essa velocidade é 3 x 108 ms⁻¹.



Parâmetros-chave Comprimento de onda e Frequência

A energia associada com a radiação eletromagnética pode ser definida da seguinte forma:

Nota: Na espectroscopia, o comprimento de onda é geralmente expresso em micrômetros, nanômetros ou números de onda $(1/\lambda)$.

$$E = h \cdot \nu$$

A frequência está relacionada ao comprimento de onda

Por:
$$v = \frac{c}{\lambda}$$

E Energia (J)

H Constante de Planck (6.62 x 10⁻³⁴ Js)

v Frequência (s⁻¹)

C Velocidade da luz (3 x108 ms⁻¹)

λ Comprimento de onda (nm)

Parâmetros-chave Absorção e Emissão

As interações da radiação eletromagnética com a matéria podem ser amplamente classificadas em:

Absorção:

A radiação eletromagnética de uma fonte é absorvida pela amostra e resulta em uma diminuição na energia radiante que atinge um detector.

· Emissão:

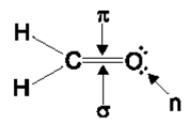
A radiação eletromagnética emana da amostra, resultando em um aumento na potência radiante que atinge um detector.

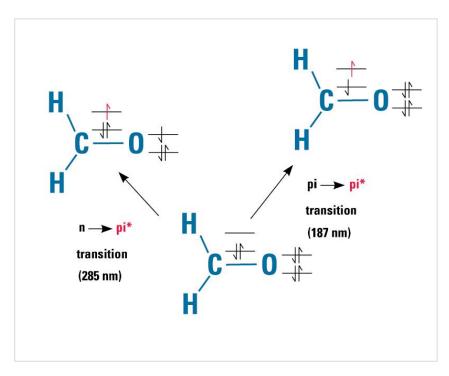
Parâmetros-chave Absorção e Emissão

Uma transição eletrônica consiste na passagem de um elétron de um orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) no estado fundamental para um orbital não ocupado de menor energia (LUMO) por absorção de um fóton.

Esta figura mostra um exemplo de transições eletrônicas em formaldeído e os comprimentos de onda de luz que as causam.

Essas transições devem resultar em bandas de absorbância muito estreitas em comprimentos de onda altamente característicos da diferença nos níveis de energia das espécies absorventes.





Transições eletrônicas no formaldeído (metanal)

Energia:

$$n \to \pi^* < \pi \to \pi^* < n \to \sigma^* < \sigma \to \pi^* < \sigma \to \sigma^*$$

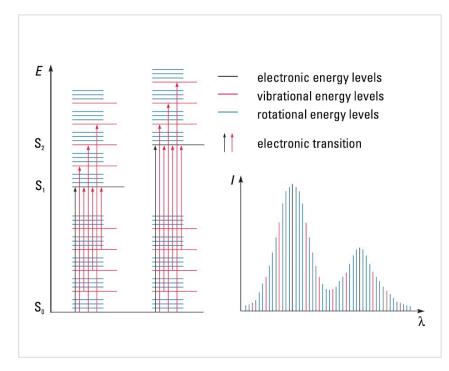


Parâmetros-chave Absorção e Emissão

Aqui vemos os níveis de energia vibracional e rotacional sobrepostos aos níveis de energia eletrônica.

Como muitas transições com energias diferentes podem ocorrer, as faixas são ampliadas.

O alargamento é ainda maior em soluções devido às interações solvente-soluto.



Transições eletrônicas e espectroscopia UV-Vis em moléculas

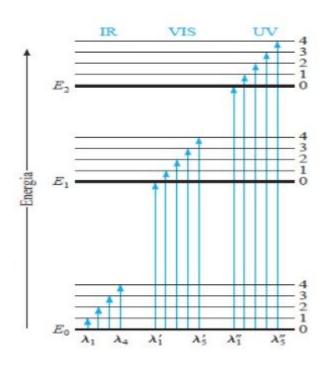
Espectroscopia Molecular

Processos de absorção e emissão envolvem **Transições** entre diferentes níveis de energia ou estados.

Para que ocorra uma transição, um fóton incidente deve ter energia **igual à diferença de energia entre os dois estados**. Se este for o caso, a energia pode ser absorvida, e uma transição para um estado excitado pode ocorrer.

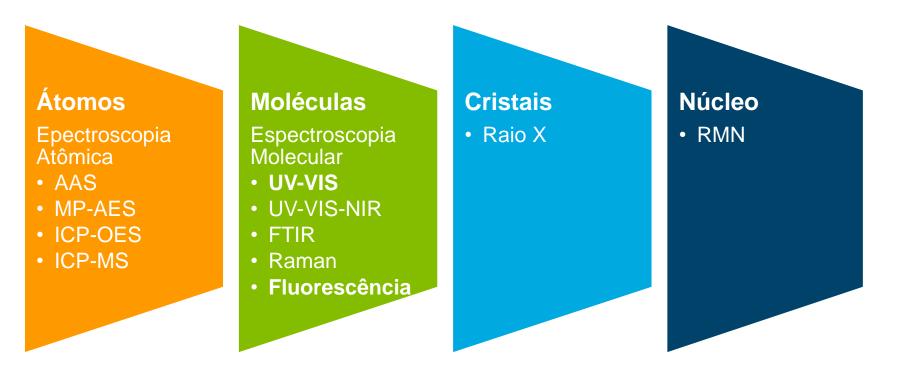
Tais transições podem envolver mudanças em:





Introdução Classificações

A espectroscopia é um campo amplo com muitas subdisciplinas, que podem ser classificadas pelo tipo de material que está sendo analisado.



Espectroscopia UV-Vis



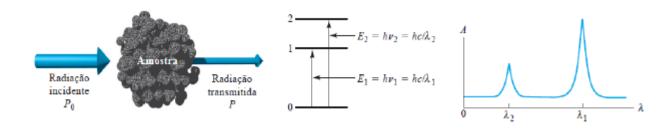


Ultravioleta - Visível (UV-Vis)

Princípios

- ❖ A região ultravioleta está contida na faixa de 200 a 400 nm com energia ao redor de 150 a 72 k.cal.mol⁻¹
- ❖ A região do visível fica entre 400 a 800 nm com energia ao redor de 72 a 36 k.cal.mol⁻¹

Energias dessa magnitude correspondem, à diferença entre **estados eletrônicos** de muitas moléculas.



De um ponto de vista prático, o aspecto mais importante do cálculo quântico é a determinação de quanta luz é absorvida pela amostra. Isto é descrito pela *lei de Beer-Lambert*.

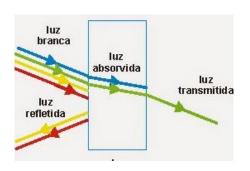
Parâmetros-chave Absorção e Transmissão

Quando a radiação interage com a matéria uma série de processos podem ocorrer:

Absorbância

· Reflexão;

Transmissão;



Quando a luz passa por uma amostra, a quantidade de luz absorvida é igual à razão da radiação transmitida (I) à radiação incidente (Io).

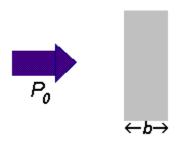
$$T = \frac{I}{I_0} \qquad T = \left(\frac{I}{I_0}\right) \cdot 100$$

(Transmissão)

$$A = -\log_{10} T$$
 (Absorção)

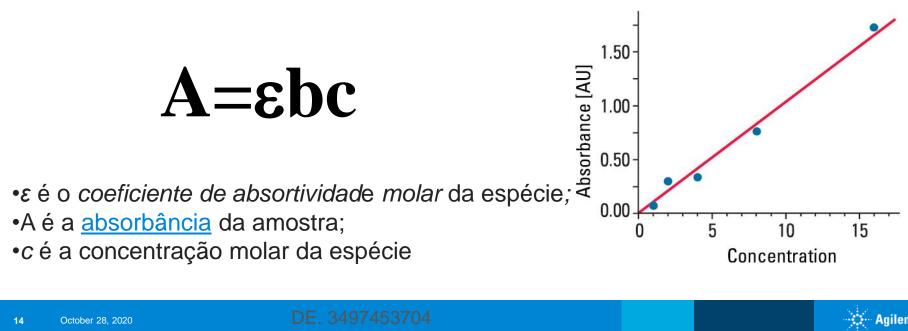
Lei de Beer-Lambert

A quantidade de luz absorvida pela amostra é proporcional a concentração do analito.



Transmitância, $T = P/P_0$

 $A = - \log T$



Ultravioleta - Visível (UV-Vis)

Nos compostos orgânicos, os que possuem **dupla ligação** absorvem fortemente no ultravioleta. Os compostos que possuem ligações **simples e duplas alternadamente**, chamadas de ligações conjugadas, produzem absorção em comprimentos de ondas maiores. Quanto **mais extenso for o sistema conjugado**, mais longos serão os comprimentos de onda absorvidos, podendo chegar à **região do visível**.

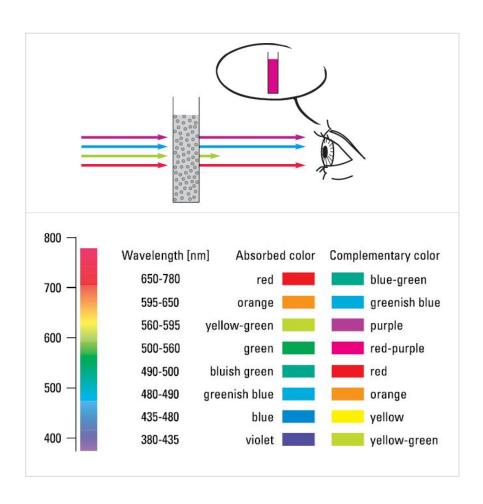
Nos inorgânicos, o comprimento de onda de absorção das transições "d-d" depende do **metal envolvido**, do **número de grupos coordenados**, da **basicidade**, dos **átomos doadores** e da **geometria** dos grupos coordenados.

Análise de íons metálicos, através da transferência de carga. Ex: fenantrolina.

Grupos cromóforos e sua absorção máxima			
Cromóforo	Fórmula	Exemplo	λ_{max} (nm)
Carbonil (cetona)	RR'C=O	Acetona	271
Carbonil (aldeído)	RHC=O	Acetaldeído	293
Carboxil	RCOOH	Ácido acético	204
Amida	RCONH ₂	Acetamida	208
Nitro	RNO ₂	Nitrometano	271

Espectroscopia UV-Vis Análise qualitativa e quantitativa

A cor é uma propriedade importante de uma substância. A cor da matéria está relacionado à sua absortividade ou refletividade. O olho humano vê a cor complementar àquilo que é absorvido.



Fonte: Fundamentals of UV-visible spectroscopy



Espectroscopia UV-Vis

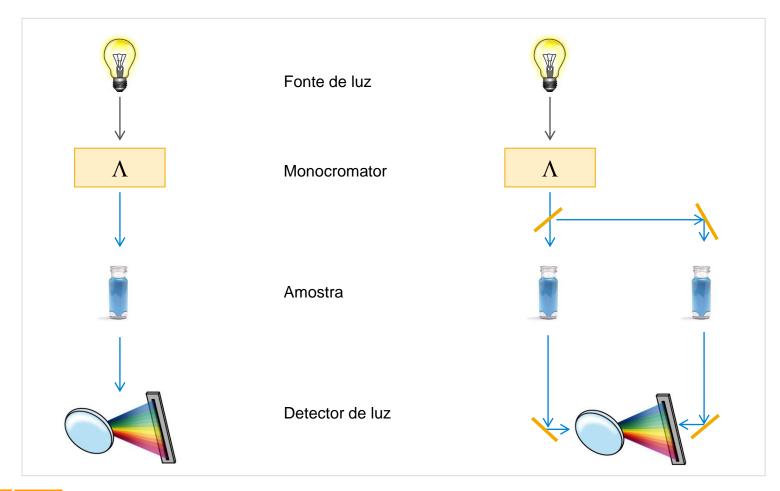
Geral



- Lâmpada (fonte) emite luz através de uma gama de comprimento de onda
- Monocromator (dispositivo de dispersão) seleciona um comprimento de onda
- Absorção da luz (área de amostra)
- A luz transmitida é medida (detector)
- Concentração é determinada em comparação com os padrões

Espectroscopia UV-Vis

Configuração Geral: Espectrômetro single vs. Dual Beam



A abordagem do feixe duplo permite a correção de variações na intensidade da luz.



Espectroscopia UV-Vis Fonte de Luz

A fonte de luz ideal produziria uma intensidade constante sobre todos os comprimentos de onda com baixo ruído e estabilidade a longo prazo.

Fontes comumente utilizadas em espectrofômetros UV-Vis:

- Lâmpada de arco de deutério
 Intensidade útil na região ultravioleta
- Lâmpada tungstênio-halogênio ->
 boa intensidade sobre parte do
 espectro ultravioleta e toda a faixa
 visível





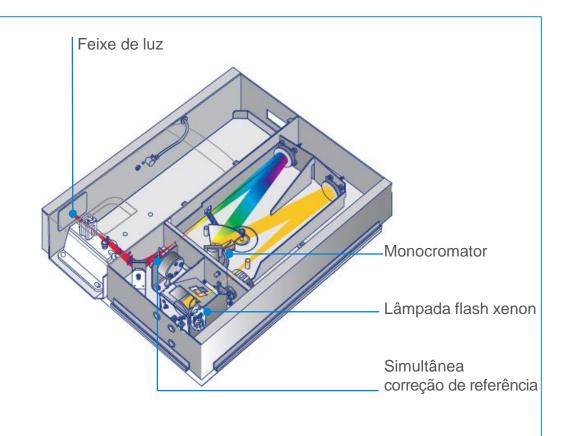
Fonte de deutério (acima) e lâmpada tungstênio-halogênio (inferior) usadas com sistemas ultravioleta

Espectroscopia UV-Vis Sistema

Principais aplicações

- Monitorando cinética
- Caracterizando compostos
- Avaliando a pureza do DNA
- Quantificando DNA e proteínas
- Analisando nutrientes na água, alimentos, e agricultura;
- Fármacos





Espectroscopia UV-Vis Aplicações

Mercado	Aplicativos		
Material	 Materiais a granel Componentes ópticos: filters, lentes, espelhos, divisores de feixe, polarizadores, vidro Filmes finos, revestimentos ópticos e anti-reflexivos, materiais nanocompostos, tintas, células solares Óculos de segurança Celulose e papel Material de camuflagem Óculos Tecidos/têxteis 		
Química	 QA/QC em matérias-primas e produto acabado na fabricação Identificação química ou estudo de processos químicos: laboratórios de química sintética, pesquisa de fotoquímica, caracterização nanopartículas, pesquisa de química superficial Química analítica Medidas de cores: Tintas e têxteis (correspondência de cores, QA/QC em tecidos, medições de FPS) 		
Biotecnologia e Pharmaceutical	 Ensaios de ligação de drogas Reações enzimáticas Análise de amostras biológicas turvas, tecidos, homogenetas celulares Medições intracelulares de íons Ácido nucleico (RNA/DNA) e determinação proteica Medições de DNA e desnaturação de proteínas/renaturação 		

Espectroscopia UV-Vis



The determination of drug tablet concentration in pharmaceutical applications for drug development using the Agilent Cary 60 UV-Vis with fiber optics

Application Note

Pharma

Author

Fyfe, DJ

Fyfe Science, West Lakes Shore, SA 5020, Australia **Note:** All of this work was conducted under controlled conditions in a GMP laboratory within a leading global pharmaceutical manufacturing company.

Summary

The Agilent Cary 60 UV-Vis spectrophotometer is the new, improved

Farmacêuticas:

 Quantificação de API em medicamentos

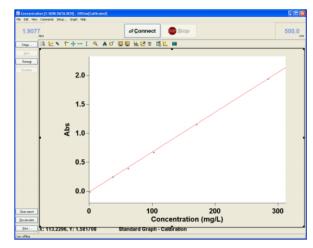


Figure 1. Concentration curve for anti-malarial API standards. Calibration equation: Abs = 0.00688*Conc -0.01056; correlation coefficient= 0.99976. The dissolution bath was used to facilitate the dissolution to completion, and the sample was analysed for total dissolved active ingredient after time, The concentration measurement of the unknown sample was made at the end of the dissolution reaction.

Fonte: https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-7945EN.pdf



Espectroscopia UV-Vis



Measuring the purity of low volumes of DNA at 4 °C using the Agilent Cary 60 UV-Vis spectrophotometer with fiber optics microprobe

Application Note Pharma/Biotech

Author

*Fyfe, DJ and **Comerford, JC

*Fyfe Science, West Lakes Shore, SA 5020, Australia

**Agilent Technologies, 679 Springvale Road, Mulgrave 3179, Australia

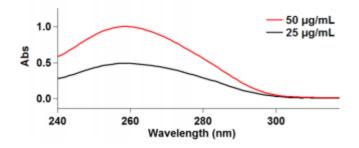
Summary

The Agilent Cary 60 UV-Vis spectrophotometer is the ideal instrument for measuring small amounts of biological samples directly from their storage environment, e.g., a refrigerator. This application note demonstrates how the Cary 60 is used to measure the purity of DNA at 4 °C using the micro fiber optics accessory – resulting in significant time and cost savings without compromise in the accuracy and reproducibility of data quality.

- · No more need for cuvettes
- Measure samples directly from the refrigerator at 4 °C
- · Save time and money per analysis



Figure 1. The Cary 60 instrument fitted with the Fiber Optics Accessory taking a reading of 150 μL DNA in an Eppendorf tube at 4 °C



Espectroscopia UV-Vis Análise qualitativa e quantitativa



Simple, automated measurements of the photocatalytic properties of colorimetric species using the Agilent Cary 60 UV-Vis spectrophotometer with fiber optics

Application Note Chemicals

Author

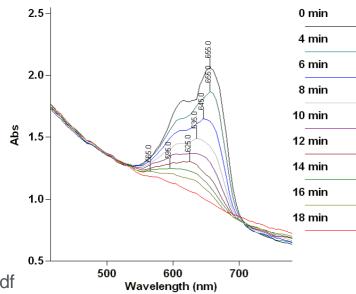
*Fyfe, DJ and **Wang, XD
*Fyfe Science, West Lakes
Shore, SA 5020, Australia
**PFPC School of Chemistry,
University of Melbourne,
3010, Australia

Summary

The Agilent Cary 60 UV-Vis spectrophotometer is the new, improved successor to the award-winning Cary 50 UV-Vis. In this short review, this instrument platform was evaluated for its potential to measure small (40 μ L) samples of methylene blue in situ during exposure to high-intensity UV irradiation. Methylene blue is combined with other compounds used in a variety of applications, including use in cosmetics and sun screen products and environmental remediation in contaminated air and polluted water.



Figure 1. The Cary 60 UV-Vis fitted with the fiber optics microprobe accessory provides a simple mechanism to measure a sample in situ and remote to the instrument



Fonte: https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-7864EN.pdf

Espectrômetros UV-Vis e UV-Vis-NIR da Agilent

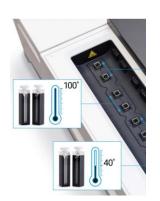
Cary 60



Cary 3500



- Monitor enzymatic reactions at temperature
- Calibrate and determine sample
 concentration
- Perform temperature ramping experiments
- Quantify nucleotides and proteins



Cary 7000 UMS

Cary 5000







Espectroscopia UV-Vis Capacidades

A simples relação linear entre absorção e concentração e a relativa facilidade de medição da luz visível uv fizeram da espectroscopia uvvisível a base para milhares de métodos analíticos quantitativos.

Espectroscopia UV-Vis

Vantagens

- Ampla aplicação para análise qualitativa e quantitativa
- Pode ser usado para muitos tipos de orgânicos, inorgânicos e íons.
- Fácil de usar
- Rápido
- Baixa manutenção
- Medição não destrutiva.

Limitações (será?)

- Bandas de absorção sobrepostas podem interferer – Quimiometria.
- Pode ser difícil para compostos sensíveis à luz se usar a fonte D2 e QI (não aplicável se usar fonte Xenônio).

Espectroscopia de Fluorescência





Espectroscopia de Fluorescência Geral

Luminescência

absorve energia da luz fornecida por determinada fonte e emite radiação visível.

Fluorescência

Quando o fornecimento de energia acaba, a emissão da radiação **pára** imediatamente.





O nome desse fenômeno veio do fato de que ele foi observado em um mineral denominado <u>fluorita</u>.

Fosforescência

Mesmo depois que o fornecimento de energia parou, a substância fosforescente continua por algum tempo emitindo luz visível.





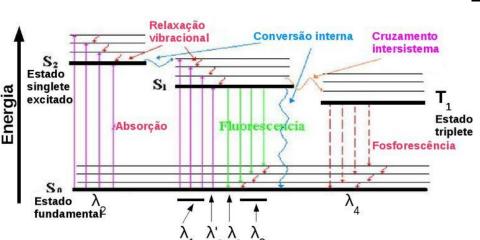
Esse fenômeno recebeu esse nome porque o elemento e outros materiais são usados <u>fósforo</u> em objetos feitos para brilharem no escuro.

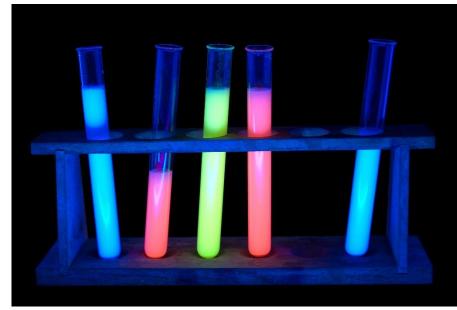
Espectroscopia de Fluorescência

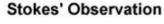
Geral

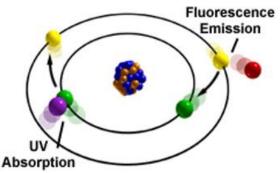
Fluorescência é a emissão de fótons após excitação por fótons de energia superior.

Os espectrômetros de fluorescência oferecem alta sensibilidade (picomolar), pois estão detectando um sinal contra um fundo escuro, ao contrário dos espectrofotômetros.





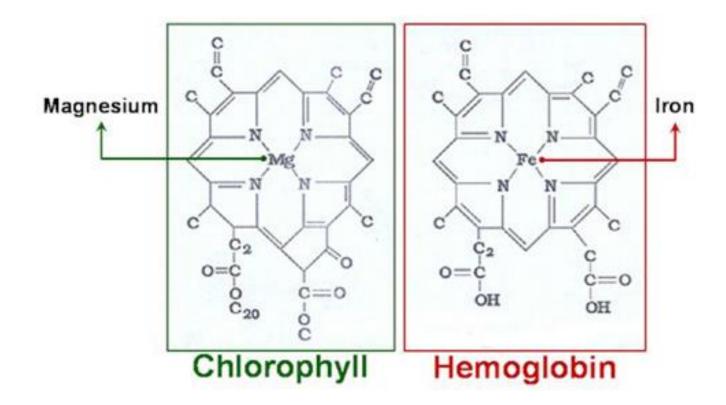






Qual é a sua Molécula Favorita?

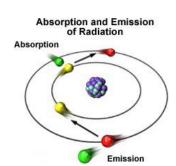
Uma molécula é essencial para a vida tanto dos animais quanto das plantas.



Fluorescência e a natureza das partículas da luz

A absorção da luz aumenta a velocidade de um elétron principalmente mudando sua direção, não sua velocidade.

Assim, o elétron passará por uma transição eletrônica do estado fundamental para um estado excitado



Quatro coisas podem acontecer enquanto ele está neste estado de excitação:

- 1) Ele pode sofrer uma perda de radiação (relaxamento vibracional) de energia eletrônica por meio de colisões e outras interações. A maioria das moléculas não sofre fluorescência por causa desse processo de desativação.
- 2) Ele pode emitir um fóton de luz (fluorescência).
- 3) Ele pode sofrer uma transição para um estado metaestável (tripleto) e **fosforescente.**
- 4) Se a molécula vai para o estado de fosforescência e então volta para o estado singlete (estado de fluorescência) e então libera um fóton, isto é fluorescência retardada e é emitida após o pulso parar.

Fluorescência: quais são os benefícios?

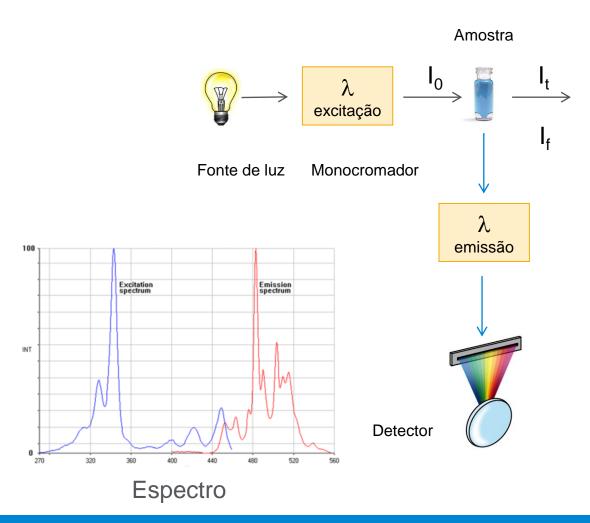
- Sensibilidade Mede as espécies de interesse com alta sensibilidade (ppb, ppt);
- Seletividade Meça um componente individual em uma matriz complexa sem a necessidade de cromatografia;
- High Information Informações sobre espécies emissoras, concentração, cinética de reação, interações, movimento molecular, etc.
- •Não-destrutiva fluorescência permite executar testes preliminares de forma não destrutiva.

Espectroscopia de Fluorescência Geral



- Lâmpada (fonte) emite luz em uma faixa de comprimento de onda;
- Monocromador seleciona comprimento de onda de excitação;
- A área da amostra contém a amostra, o analito absorve luz;
- Luz emitida em um comprimento de onda maior;
- Monocromador seleciona o comprimento de onda de emissão;
- A luz transmitida é medida (detector).

Espectroscopia de Fluorescência Geral



Nota: O detector não está em linha reta com a fonte de luz para minimizar o risco de luz incidente transmitida ou refletida atingir o detector.

Espectroscopia de Fluorescência Sistema

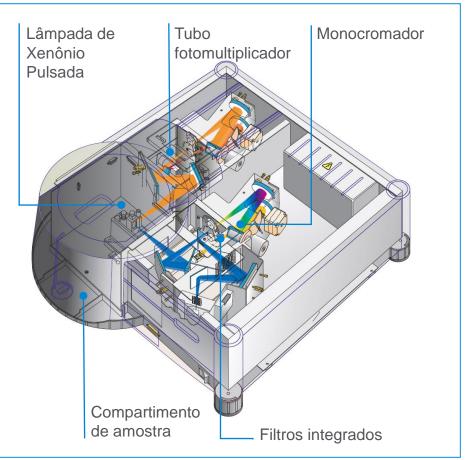
Principais aplicações:

Estabilidade térmica de biocatalisadores

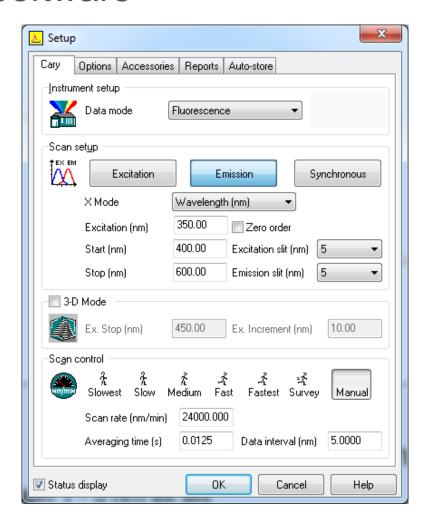
Caracterização de biomarcadores para imagens de células vivas

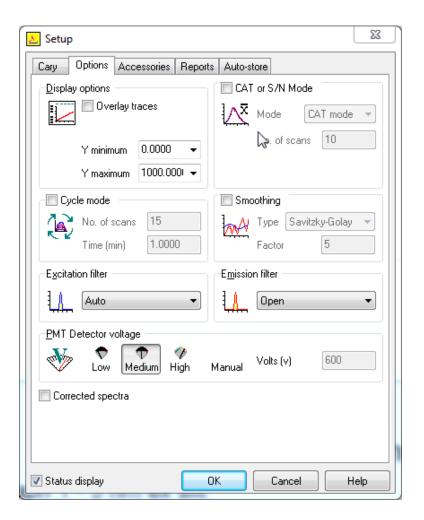
Misturas de hidrocarbonetos em óleos de petróleo





Cary Eclipse Software

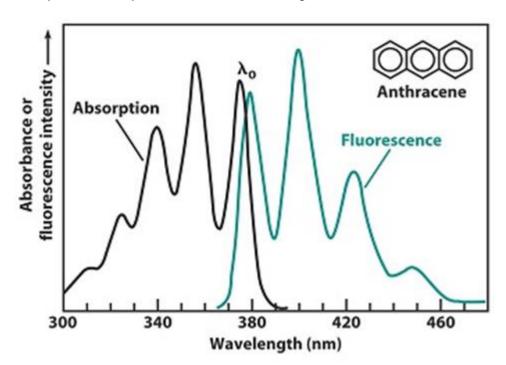


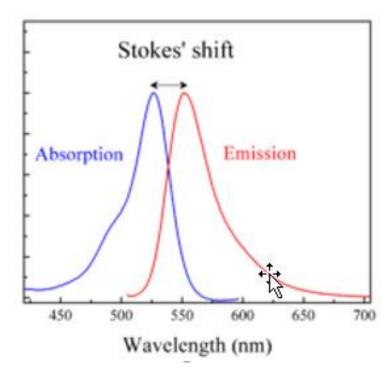


Espectroscopia de Fluorescência Princípios

O espectro de excitação é idêntico ao espectro de emissão.

O espectro de emissão é a imagem especular da banda de absorção de comprimento de onda mais longa e ocorre em comprimentos de onda mais maiores do que o espectro de absorção.





Aplicações

Mercado	Aplicações
Química	Pesquisa fotoquímica
	 Caracterização de nanopartículas
	 Pesquisa de química de superfície
	Química Analítica
Pharma e Biotech	Pesquisa bioquímica e biofísica
	 Quantificação de proteínas e estudos estruturais: interações proteína-proteína, estudos de membrana
	 Enzimologia: cinética enzimática usando um substrato fluorescente
	 Biologia molecular: quantificação de DNA e RNA

For Research Use Only. Not for diagnostic procedures.





Using the Agilent Cary Eclipse to measure the chemiluminescence from a ruthenium complex

Application Note

Author

Mr. Stuart Purcell and Assoc. Professor Neil Barnett School of Biological and Chemical Sciences Deakin University Geelong, 3217, Australia

Introduction

Chemiluminescence is emission resulting from a chemical reaction, as opposed to fluorescence or phosphorescence, both of which are emission resulting from the absorption of light. Since the emission is generated without light, no source is needed when measuring the signal. In a conventional fluorescence spectrophotometer the light source must be off during the measurement phase, so as not to interfere with the signal being measured. The chemiluminescence signal is also generally weak. Achieving good signal to noise and a low limit of detection depends on how well the sample is shielded from room light. It is absolutely essential that the instrument has excellent light-sealing capabilities. The Agilent Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer addresses both these requirements which makes it an excellent analyser for chemi- or bio- luminescent applications. With a red-sensitive detector as standard and the excellent sensitivity of the gratings in the visible region, emissions well into the red can be measured with the Eclipse, without the expense of purchasing components which allow measurement in this region.

This application note demonstrates the Cary Eclipse chemiluminescence capabilities by measuring the emission from a ruthenium complex upon reaction with codeine. Figure 1 shows a photograph of the mixing of the two non-emitting samples to produce a chemiluminescence product.

Esta nota de aplicação demonstra a quimioluminescência Cary Eclipse capacidades medindo a emissão de um complexo de rutênio sobre reação com codeína.

A Figura 1 mostra uma fotografia da mistura dos duas amostras não emissoras para produzir um produto de quimioluminescência.

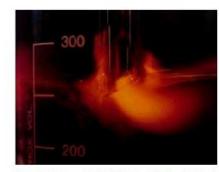
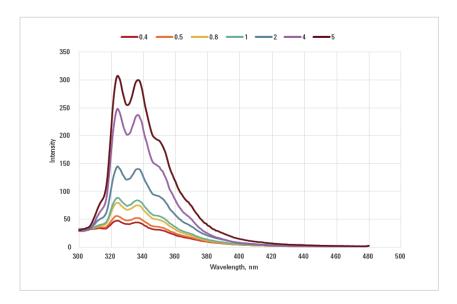


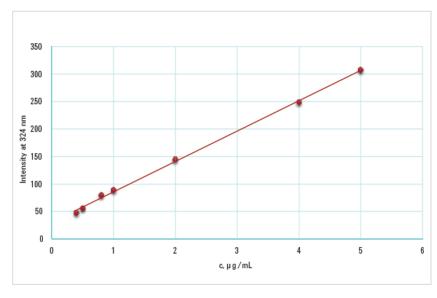
Figure 1: Photograph of tris(2,2' - bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence via the reaction with codeine

Fonte: https://www.agilent.com/cs/library/applications/app03.pdf



Espectroscopia de Fluorescência Quantificação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos do petróleo

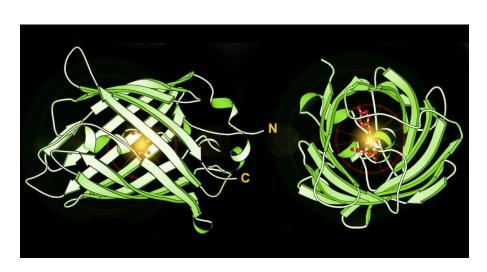




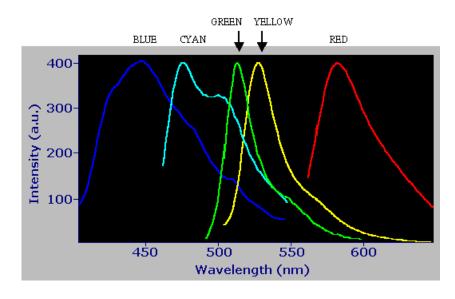
Espectro de fluorescência de naftaleno, Ex. comprimento de onda 250 nm, Ex. fenda 10 nm, Em. fenda 5 nm (esquerda); gráfico de calibração (os pontos para a mesma concentração são calculados) para a determinação fluorométrica de naftaleno a 324 nm, Ex. comprimento de onda 250 nm, Ex. fenda 10 nm, Em. fenda 5 nm.

> Fonte: Quantification of complex polycyclic aromatic hydrocarbons or petroleum oils in water with Cary eclipse fluorescence spectrophotometer According to astm d 5412-93 (2000)

Expressão citosólica por espectroscopia de fluorescência de proteína fluorescente verde (GFP)



Representação esquemática da proteína verde fluorescente. Tripeptídeo fluoróforo em vermelho.



Emissão para todo o espectro de proteínas fluorescentes.

Fonte: Cytosolic expression of Green Fluorescent Protein (GFP) and its derivatives in the yeast Saccharomyces cerevisiae: Detection in vivo using the Agilent Cary Eclipse

Expressão citosólica por espectroscopia de fluorescência de proteína fluorescente verde (GFP)

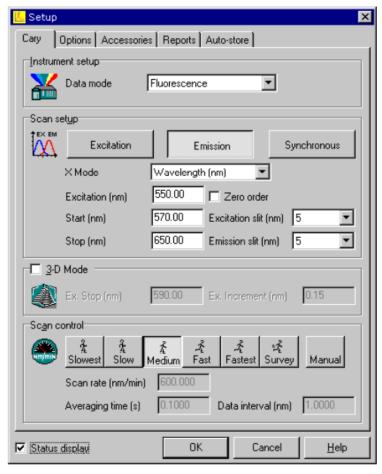
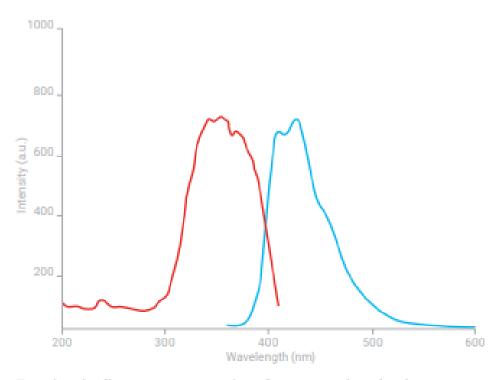


Figure 2. Instrumental parameters for detecting DsRed emission spectra (Emission maxima 583 nm) following excitation with 550 nm (peak excitation 558 nm)



Fluorescência de branqueadores ópticos em detergentes para a roupa.



Examine the fluorescent properties of a common laundry detergent

The excitation and emission spectra of the powder show optical brighteners absorbing in the region between 320 and 390 nm and emitting over the 400–500 nm range. Fabrics washed in this detergent would exhibit a blue hue.

Cary Eclipse

- Lâmpada de xenônio pulsada;
- Ele mede a emissão de luz de amostras em quatro modos: fluorescência, fosforescência, quimi / bio-luminescência e fosforescência resolvida no tempo;
- Amostras de pequeno volume: mede as concentrações de fluoresceína picomolar de baixo volume (<0,5 mL) e também amostras grandes de tamanho estranho;
- Cinética rápida: varreduras a 24.000 nm / min sem alterações de pico usando tecnologia de lâmpada de flash de xenônio e até 80 pontos por segundo no modo de fluorescência de estado estacionário;.



Capacidades

Em baixas concentrações, a intensidade da fluorescência geralmente será proporcional à concentração do fluoróforo.

Os efeitos do "quenching" podem influenciar o resultado pois descreve a diminuição da intensidade de fluorescência de uma determinada substância e pode ser o resultado de vários processos, como reações de estado excitado ou extinção por colisão.

Espectroscopia de Fluorescência

Vantagens

- Extremamente sensível a compostos aromáticos e insaturados
- Pode ser aplicado a outros compostos com derivatização ou marcação
- Fácil de usar
- Baixa manutenção

Limitações

- Limitado a certos tipos de compostos
- As misturas podem exigir cleanup
- Possibilidade de efeito "quenching"

Conclusão

- ❖Possibilidade de uso das técnicas de UV-Vis e Fluorescência para diversas áreas de aplicação;
- Fácil operação e robustez.







Siga a página da Agilent Brasil: https://lnkd.in/d2rJ99Q

Webinars - https://www.agilent.com/en/training-events/eseminars/eseminars-brazil -





Obrigada!



luciana.terra@agilent.com

Cientista de Aplicação – Espectroscopia Molecular e Raman

DE. 3497453704