



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectroscopia e Fotometria

Aula 12

Espectroscopia. Fotometria

**Jiří Borecký
CCNH
2014**



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectroscopia - introdução

Espectroscopia e Fotometria

➤ Espectroscopia:

- Originalmente um estudo da interação entre radiação e matéria em função de comprimento de onda (λ)
- Historicamente, a espectroscopia se referia a uso de luz visível dispersado de acordo com seu comprimento de onda pela prisma. Hoje é denominada como espectrofotometria.
- O conceito foi estendido posteriormente a inclusão de medição de qualquer quantidade em função ou de comprimento de onda ou frequência, incluindo um campo alternado ou frequência variável (ν).
- Hoje, o escopo da definição adicionou energia (E) como a variável, uma vez que a relação $E = h\nu$ para fótons foi descoberta (h é constante de Planck).
- Um gráfico da resposta em função do comprimento de onda ou frequência se refere a espectro.



Fotometria

Espectroscopia e Fotometria

➤ Fotometria:

- O ramo da óptica que se preocupa em medir a luz, em termos de como seu brilho é percebido pelo olho humano
- Diferencia-se da radiometria, que é a ciência que mede a luz em termos de sua potência absoluta – a fotometria descreve a potência radiante associada a um dado comprimento de onda usando a função de luminosidade modeladora da sensibilidade do olho humano ao brilho

Variável	Símbolo	Unidade SI	Símbolo	Notas
Energia luminosa	Q_v	lumen.segunda	$\text{lm}\cdot\text{s}$	unidade "talbot" Também chamado potência luminosa
Fluxo luminoso	F	lumen (= $\text{cd}\cdot\text{sr}$)	lm	
Intensidade luminosa	I_v	candela (= lm/sr) candela por metro quadrado	cd	unidade base da SI
Luminância	L_v		cd/m^2	unidade "nits" usada como incidência de luz na superfície
Iluminância	E_v	lux (= lm/m^2)	lx	usada para luz emitida da superfície
Emitância luminosa	M_v	lux (= lm/m^2)	lx	razão do fluxo luminoso a fluxo radiante
Eficácia luminosa	-	lumen por Watt	lm/W	



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectrômetros

Espectroscopia e Fotometria

➤ Espectrômetro de emissão óptica/atômica

- Estudo de quantidades de átomos pelo espectro de chama ou faísca



➤ Espectrômetro Raman

- Estudo de vizinhança (ambiente) dos átomos pelo espectro visível dos estados vibracionais-rotacionais





Universidade Federal do ABC

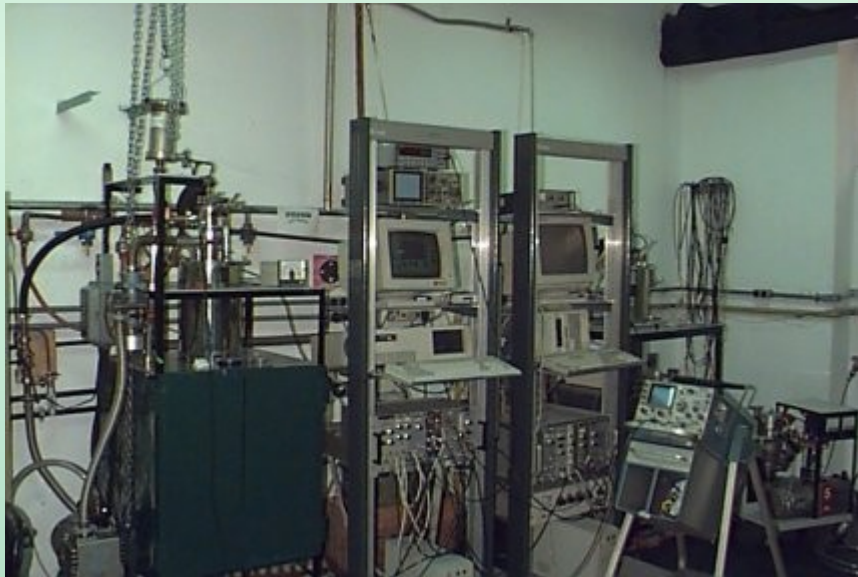
BC-1308 Biofísica

Espectrômetros

Espectroscopia e Fotometria

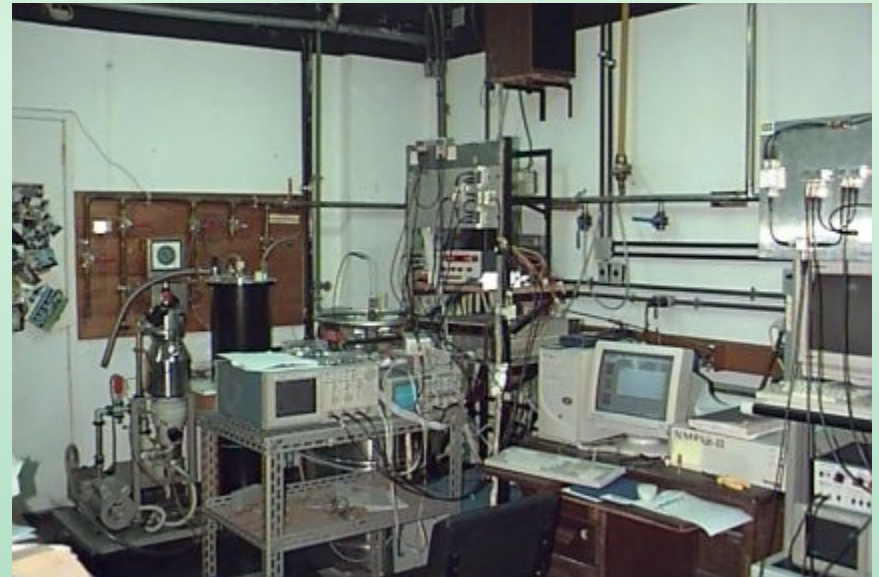
➤ Espectrômetro Mössbauer

- Estudo de vizinhança (ambiente) dos átomos pelo espectro gama



➤ Espectrômetro de NMR

- Estudo de vizinhança (ambiente) dos átomos pelo espectro de rádio em campo magnético forte





Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectroscopia

Espectroscopia e Fotometria

➤ Natureza da excitação medida

- Espectroscopia eletromagnética
 - radiação eletromagnética (luz).
- Espectroscopia eletrônica
 - Interação da matéria com feixe de elétrons. Por exemplo, a espectroscopia de Auger induz o efeito de Auger com o feixe de e^- , medindo a energia cinética do elétron como variável.
- Espectroscopia acústica
 - Interação da matéria com a frequência de som.
- Espectroscopia dielétrica
 - Interação da matéria com a frequência de um campo elétrico externo
- Espectroscopia mecânica
 - Interação da matéria com a frequência de um estresse mecânico externo, por exemplo uma torção aplicada a uma amostra de material

➤ Tipos de espectroscopia

- Espectroscopia por emissão (fluorescência de X, VIS)
 - Energia emitida X Comprimento de onda da radiação incidente
- Espectroscopia por absorção (X, UV, VIS, IR, NIR, micro-ondas)
 - Energia absorvida X Comprimento de onda da radiação incidente
- Espectroscopia por dispersão/espalhamento (Raman)
 - Energia dispersa sob a análise de parâmetros tipo: ângulo de incidência, ângulo de polarização ou comprimento de onda)



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectroscopias mais usadas

Espectroscopia e Fotometria

- Espectroscopia de micro-ondas
- Espectroscopia de infravermelho
- Espectroscopia Raman
- Espectroscopia UV/visível, Espectroscopia no visível ou Espectroscopia ultravioleta
- Espectroscopia de fluorescência ou fluorometria
- Espectroscopia de raios-X
- Espectroscopia de plasma ICP
- Espectroscopia fotoacústica
- Espectroscopia de absorção atômica
- Espectroscopia de absorção molecular
- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR)
- Espectroscopia de ressonância magnética eletrônica ou de Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)
- Espectroscopia de Mössbauer



Interação da radiação com a matéria

- O fundamento de qualquer espectroscopia é a interação de uma radiação eletromagnética e a matéria constituinte da amostra. A energia incidente pode ser refletida, transmitida ou absorvida.
- A interação ocorre se:
 - Houver ressonância entre dois entes:
 - a onda eletromagnética
 - uma partícula (átomo, molécula ou íon)
 - A energia for mais alta que a necessária para ocorrer uma transição eletrônica.
- As condições para que haja essa absorção são:
 - A frequência da onda incidente coincidir com uma frequência natural de um tipo de oscilação do sistema.
 - Sejam respeitadas as regras de seleção quânticas atinentes ao sistema e à faixa de frequências particular envolvida.



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Interação da radiação com a matéria

Espectroscopia e Fotometria

- A natureza ondulatória manifesta-se por meio da:
 - Interferência
 - Dispersão
 - Polarização
 - Coerência da radiação eletromagnética
- A natureza corpuscular manifesta-se por meio do:
 - Efeito Compton;
 - Efeito fotoelétrico.



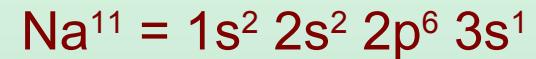
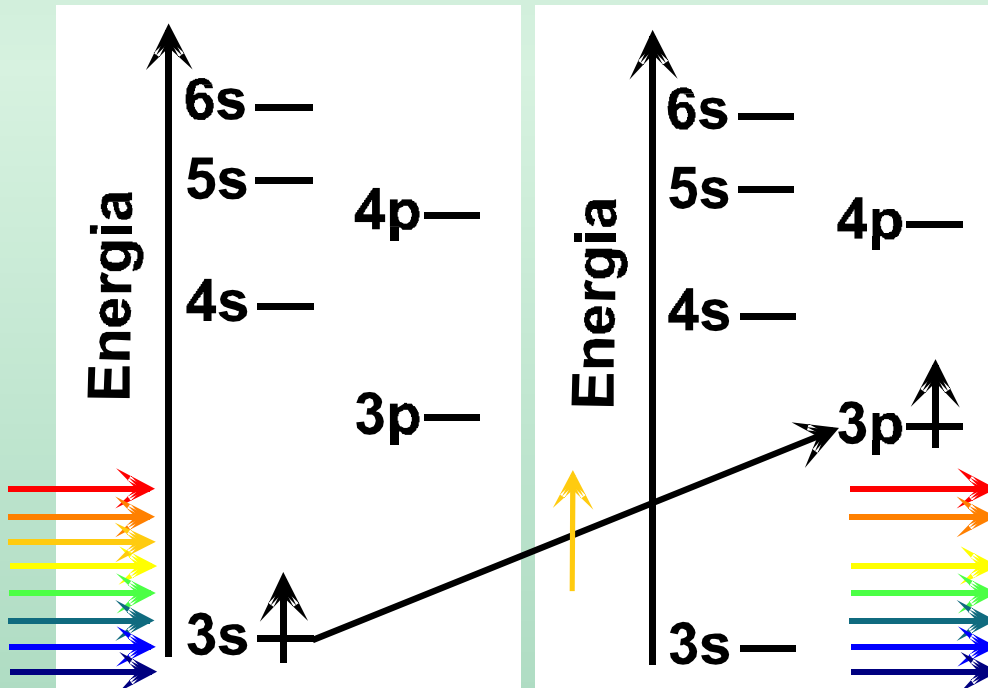
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Interação da radiação com a matéria

Espectroscopia e Fotometria

- Uma ampola de sódio (Na) no estado gasoso. As energias dos elétrons no átomo de Na estão quantizadas, i.e., não podem assumir qualquer valor. Portanto, quando um feixe de radiação eletromagnética de diferentes comprimentos de onda incide sobre a ampola, somente aqueles fótons, que possuem energia igual à diferença de energia entre um estado vazio e outro ocupado, serão absorvidos, provocando uma transição eletrônica.



$$E = h \nu$$



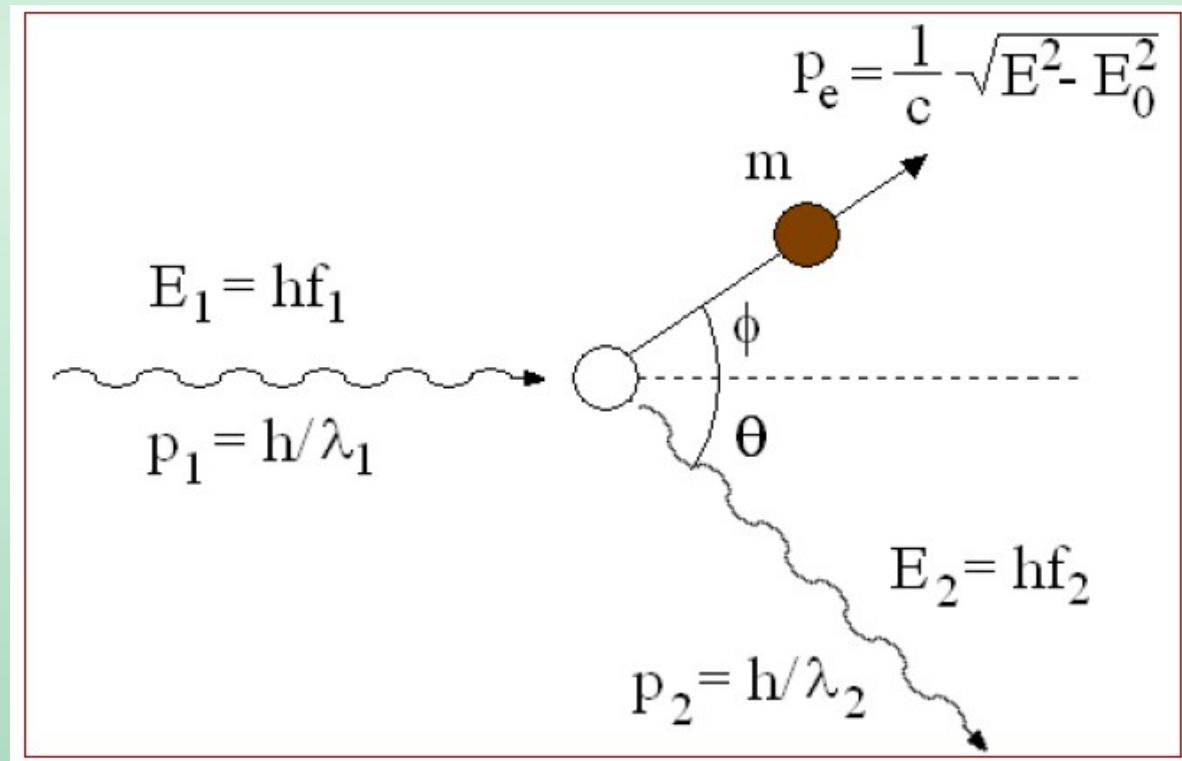
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Interação da radiação com a matéria

Espectroscopia e Fotometria

- Efeito Compton ou o Espalhamento de Compton, é a diminuição de energia (aumento de comprimento de onda) de um fóton de raio-X ou de raio gama, quando ele interage com a matéria





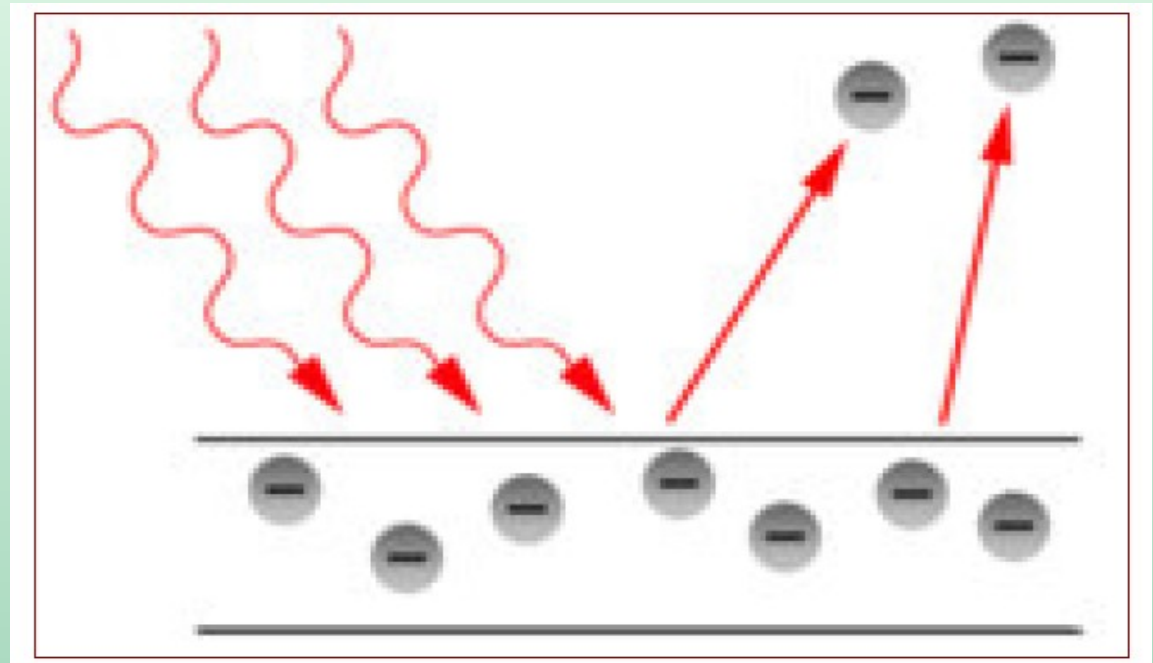
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Interação da radiação com a matéria

Espectroscopia e Fotometria

- O efeito fotoelétrico é a emissão de elétrons por um material, quando exposto a uma radiação eletromagnética (como a luz) de frequência suficientemente alta, que depende do material. Ele pode ser observado quando a luz incide numa placa de metal, literalmente arrancando da placa os elétrons. Esse efeito é bem observado quando se coloca algum objeto de metal no micro-ondas



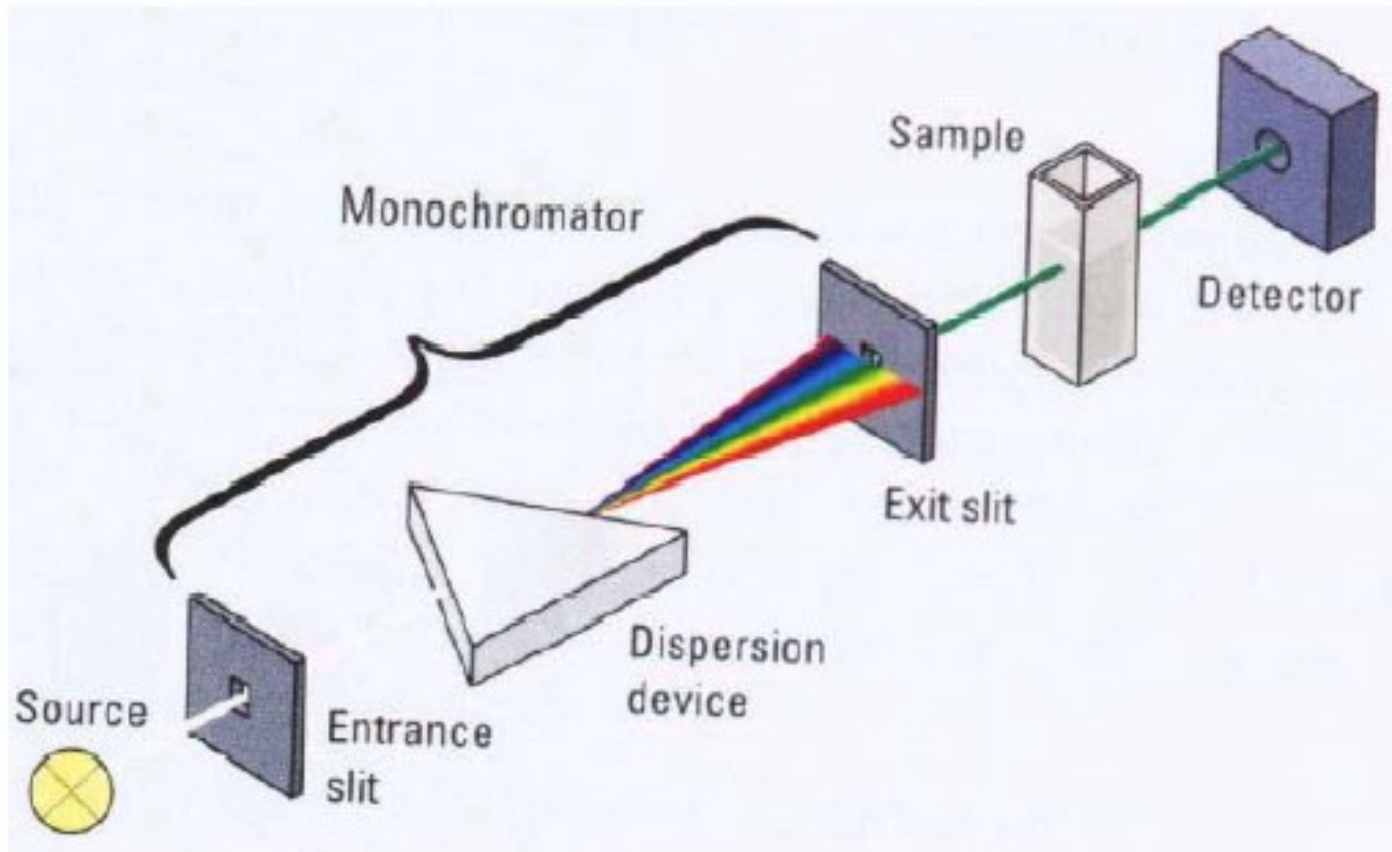


Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectrômetro

Espectroscopia e Fotometria





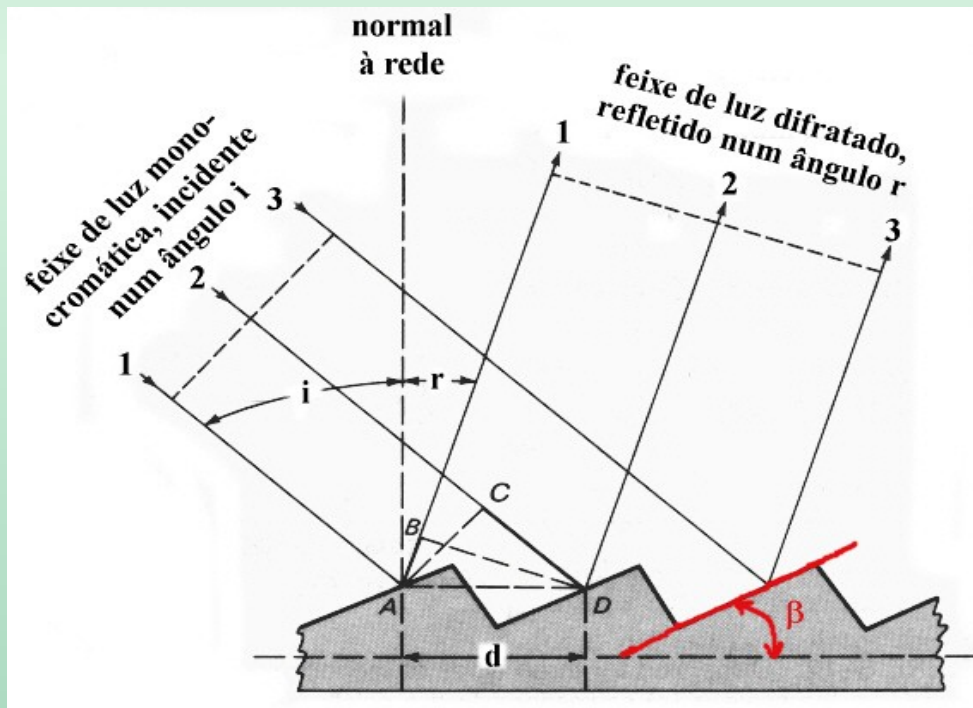
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Monocromadores

Espectroscopia e Fotometria

- Os monocromadores se baseiam em prismas. No entanto, neste curso nós só revisaremos os conceitos básicos relacionados a monocromadores baseados em redes de difração.
- A diferença de caminho óptico d entre os feixes 1 e 2 é $CD - AB$. Portanto, para que haja interferência construtiva, essa diferença deve ser igual a $m\lambda$.



$$\overline{CD} = d \sin(i)$$

$$\overline{AB} = d \sin(r)$$

$$m\lambda = d [\sin(i) - \sin(r)]$$



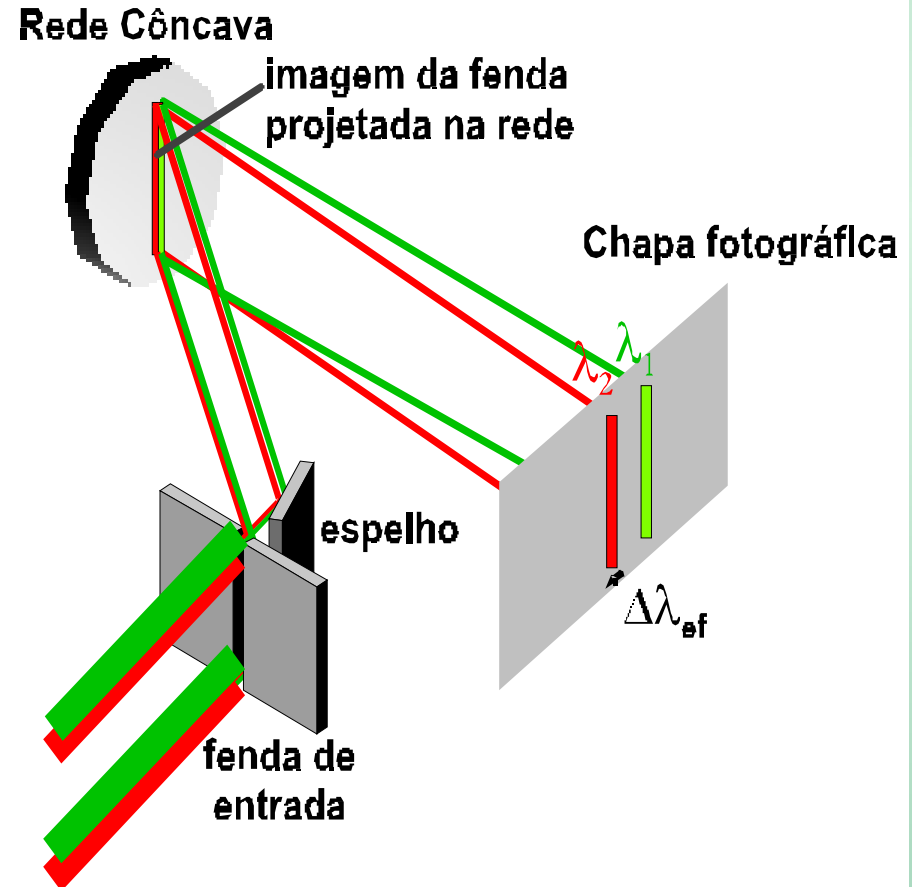
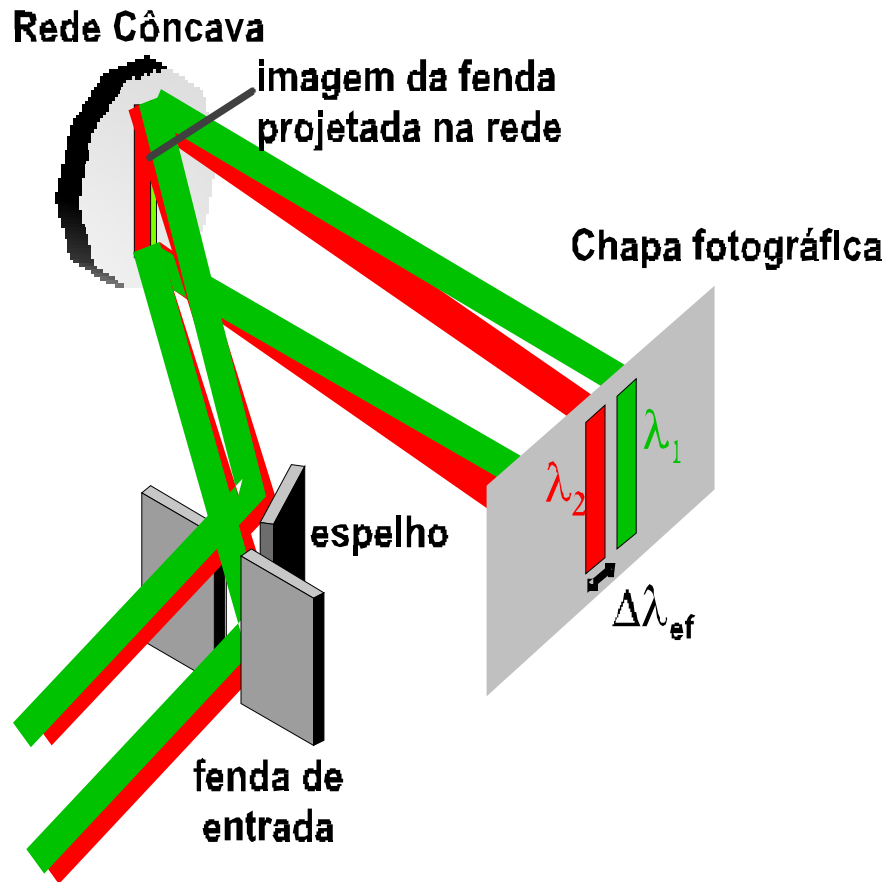
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Resolução

Espectroscopia e Fotometria

- Resolução espectral: para uma mesma dispersão, quando menor a abertura da fenda, melhor a resolução espectral





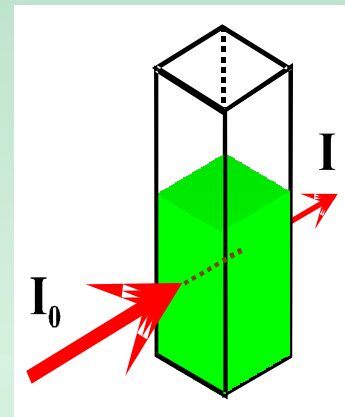
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

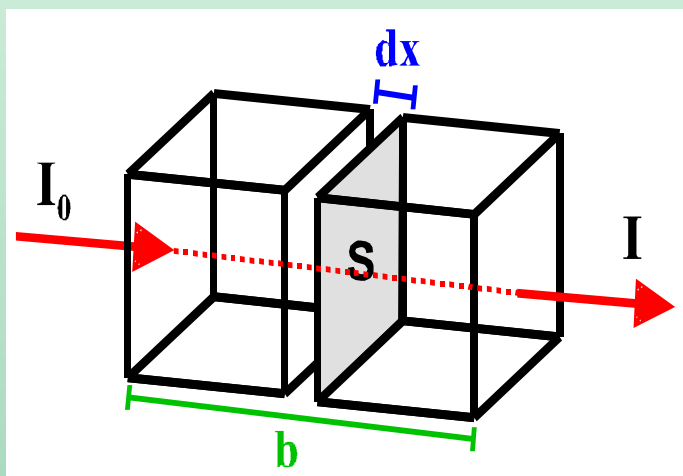
Intensidade do sinal

Espectroscopia e Fotometria

Quando radiação eletromagnética atravessa um meio absorvente, fótons irão interagir com as espécies presentes no meio (átomos, íons ou moléculas). Como resultado dessa interação, fótons serão absorvidos, passando a existir uma diferença entre a intensidade da luz antes da interação com a matéria (I_0) e a intensidade de luz após a interação com a matéria. A relação entre a quantidade de luz absorvida pelo meio e a concentração da espécie absorvente (os feixes de luz, I_0 e I , são monocromáticos) é dada pela absorbância A_λ , ou transmitância T , onde ϵ = coeficiente de extinção, l = caminho ótico e c = concentração do composto absorvente



$$A_\lambda = -\ln(T) = -\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon \cdot l \cdot c$$



A região delimitada pelo elemento infinitesimal dx contém dn partículas absorventes. A cada partícula podemos associar uma secção transversal dS que captura o fóton incidente. Portanto, a probabilidade de um fóton ser capturado por uma partícula em toda a área da secção, S , é dS/S .

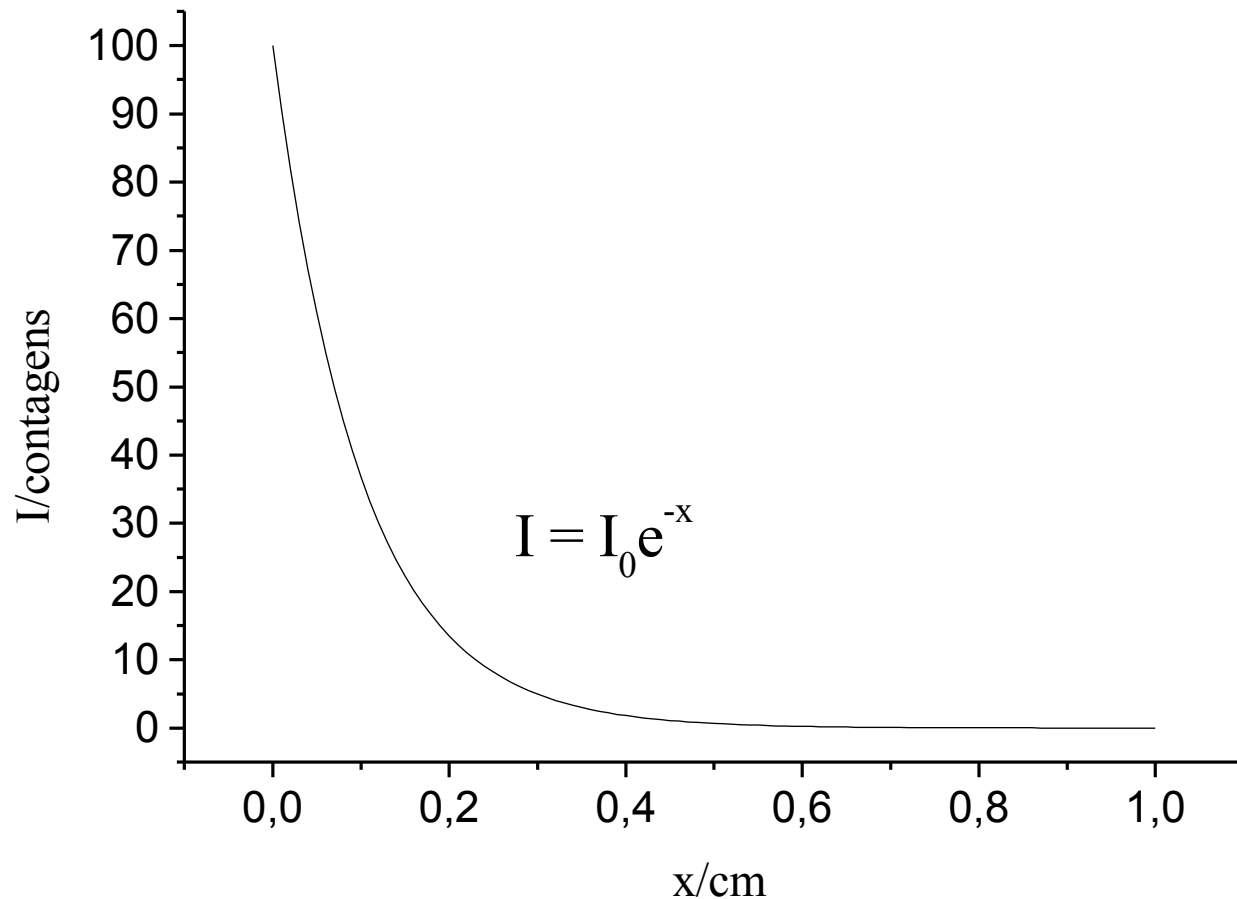


Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Intensidade do sinal

Espectroscopia e Fotometria



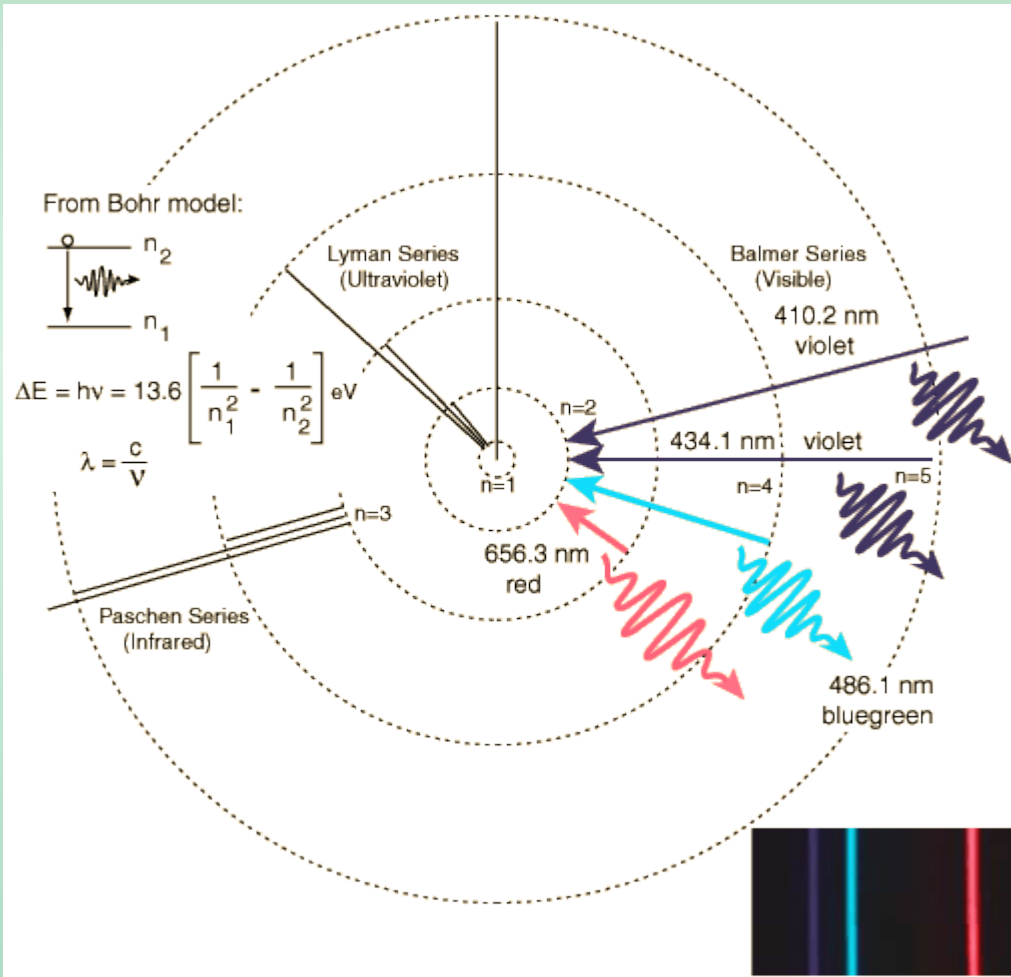


Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectrometria atômica

Espectroscopia e Fotometria



Os Espectros de Emissão Atômica se baseiam na quantização da energia, consequência imediata da resolução da equação de Schrödinger. Os elétrons de um determinado átomo, que se encontram num determinado nível energético, são elevados a um nível mais alto de energia – estado excitado – e retornam ao estado anterior emitindo um fóton correspondente à diferença de energia



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

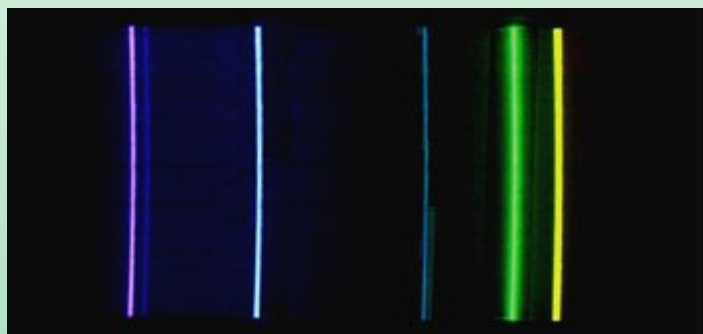
Espectros de linha

Espectroscopia e Fotometria

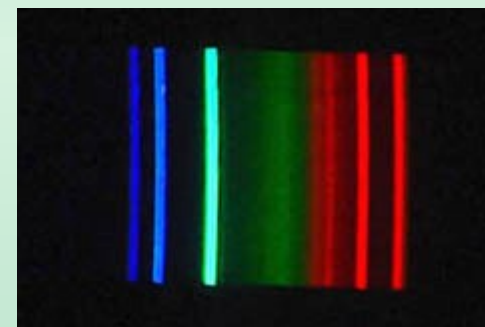
➤ Linhas espectrais mais intensas do He



➤ Linhas espectrais mais intensas do Hg



➤ Linhas espectrais mais intensas do Cd



Vejam espectros de vários átomos no site:
<http://student.fizika.org/~nnctc/spectra.htm>



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectroscopia Raman

Espectroscopia e Fotometria

- Análise baseada na luz monocromática, dispersada ao incidir sobre o material a ser estudado.
- Maior parte da luz é dispersada elasticamente (apresenta a mesma frequência como a luz incidente) – não revela qualquer informação sobre o material – dispersão Rayleigh
- Uma pequena porção da luz é dispersada inelasticamente e apresenta rápidas mudanças de frequência, devido à interação da luz com a matéria – é uma característica intrínseca do material analisado e independe da frequência da luz incidente – dispersão Raman.



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectroscopia Raman

Espectroscopia e Fotometria

- O efeito Raman pode ser explicado pela colisão não-elástica entre o fóton incidente e a molécula. Isto muda os níveis das energias rotacional, vibracional e/ou eletrônica (rovibrônicas) da molécula por um incremento ($\pm \Delta E$).
- Se a molécula absorve energia, ΔE é positiva, $\nu_{\text{incidente}} > \nu_{\text{espalhada}}$
– estas são as linhas Stokes do espectro (regra de Stokes de fluorescência).
- Se a molécula perde energia, ΔE é negativa, $\nu_{\text{incidente}} < \nu_{\text{espalhada}}$
– são linhas anti-Stokes do espectro.

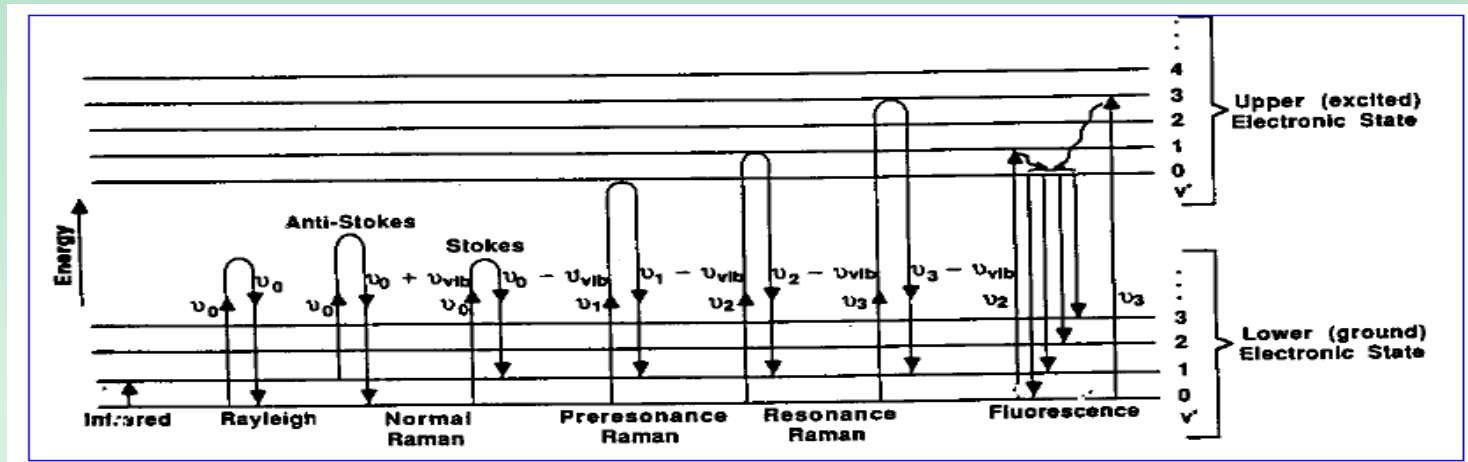


Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectroscopia Raman

Espectroscopia e Fotometria



- Raman comum - as vibrações são excitadas a um estado metaestável pela luz visível monocromática (laser He/Ne) irradiada, cuja frequência é $>$ frequência de vibração, porém $<$ frequência das transições eletrônicas.
- Raman ressonante - a frequência do laser é maior ainda, o que excita as vibrações para as de nível eletrônico mais alta.
- As linhas Stokes são normalmente empregadas por serem mais intensas, pois correspondem a uma transição ($0 \rightarrow 1$) a partir de um estado com maior população de moléculas.
- As vibrações ativas são aquelas que provocam mudanças na polarizabilidade da molécula, assim, as espectroscopias de IR e Raman são complementares



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectroscopia Raman

Espectroscopia e Fotometria

➤ Exemplo de estudo de vibrações de ligações intramoleculares do complexo DNA-histona

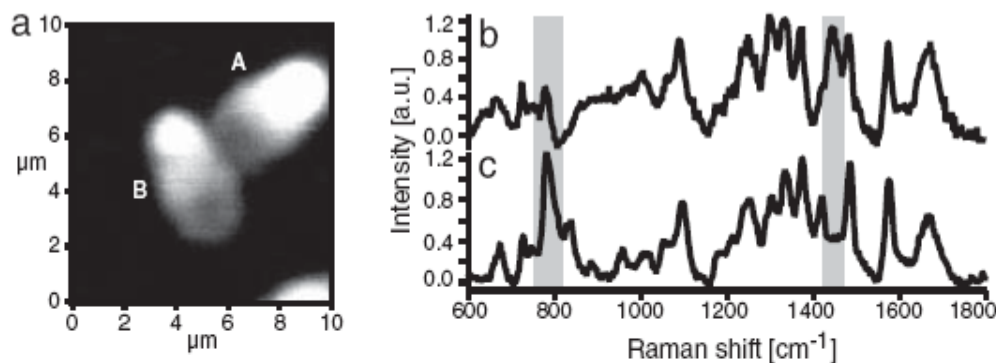


Figure 1 (a) Confocal autofluorescence image of a normal human sperm cell head (A) and a pear-shaped sperm cell head (B) immobilized on a quartz optical flat. (b) Spontaneous micro-Raman spectrum of the central part of the normal sperm head A. (c) Spontaneous micro-Raman spectrum of calf-thymus DNA gel. Raman peaks with the most significant differences for this study are highlighted by gray shades.

Raman frequency in Assignment ^a	wavenumber units (cm ⁻¹)
--	--------------------------------------

642	dC
670	dT
681	dG
728	dA
785	dT, dC, bk
831	ν OPO
890	d
960	d
1053	ν CO
1092	ν PO ₂ ⁻
1213	dC, dT
1237	dT, dC
1255	dA, dC
1292	dC
1302	dA
1315	dG
1335	dA, dG
1374	dT, dA, dC
1420	dA
1442	d(CH ₂ δ)
1484	dG, dA
1575	dG, dA
1665 (broad)	dC, dG, dA, dT

^a Abbreviations: ν and δ indicate stretching and deformation vibrations, respectively. bk indicates a vibration of the DNA backbone; d indicates a vibration localized in the deoxyribose moiety; C, T, A, G are DNA bases. See text for more details. Assignments are based on [18, 19, 41–44].



Espectroscopia óptica

- Base da espectroscopia óptica e mudança da intensidade do feixe incidente após a passagem pela amostra (ou intensidade de fluorescência emitida pela amostra)

$$A_{\lambda} = -\ln(T) = -\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon \cdot l \cdot c$$

- O rendimento do sinal (especialmente da fluorescência) do fluoróforo pode ser estimado pela comparação com fluoróforos com ganho conhecido (variáveis com índice R)



$$Q = Q_R \frac{I}{I_R} \frac{OD_R}{OD} \frac{n^2}{n_R^2}$$



Universidade Federal do ABC

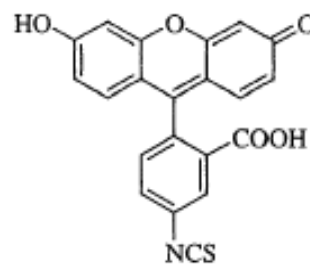
BC-1308 Biofísica

Espectroscopia óptica

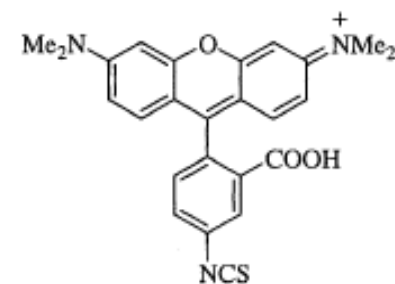
Espectroscopia e Fotometria

➤ Espectroscopia VIS/NIR em imunoensaios

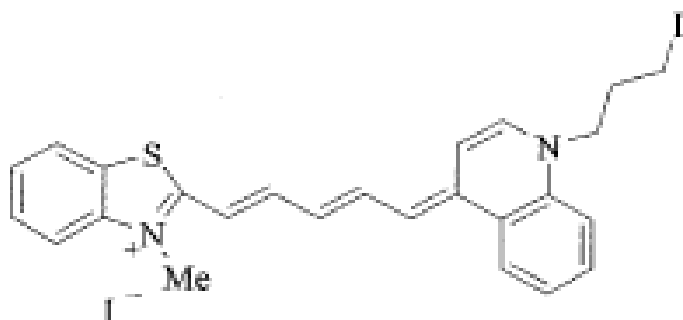
- Sondas fluorescentes – fluoresceína [1] e rodamina [2]
- CyDyes [17]
- Verde de tiazola (TAG) [34]



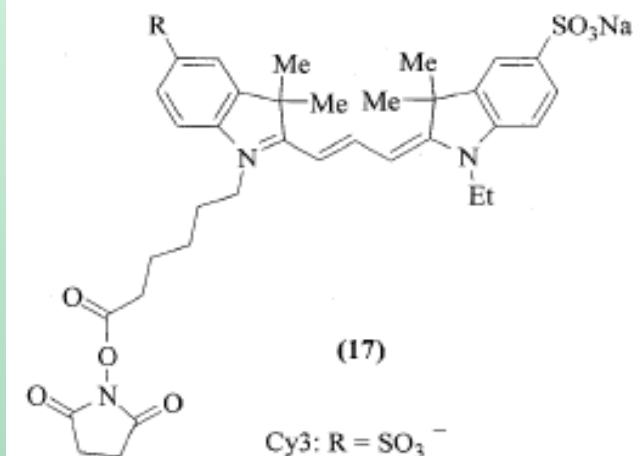
(1)



(2)



(34)



(17)

Cy3: R = SO₃⁻
CyNOS: R = H

$$Q = Q_R \frac{I}{I_R} \frac{OD_R}{OD} \frac{n^2}{n_R^2}$$



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectroscopia óptica

Espectroscopia e Fotometria

- Espectroscopia VIS/NIR em sequenciamento de DNA
 - Sondas fluorescentes para sequenciamento

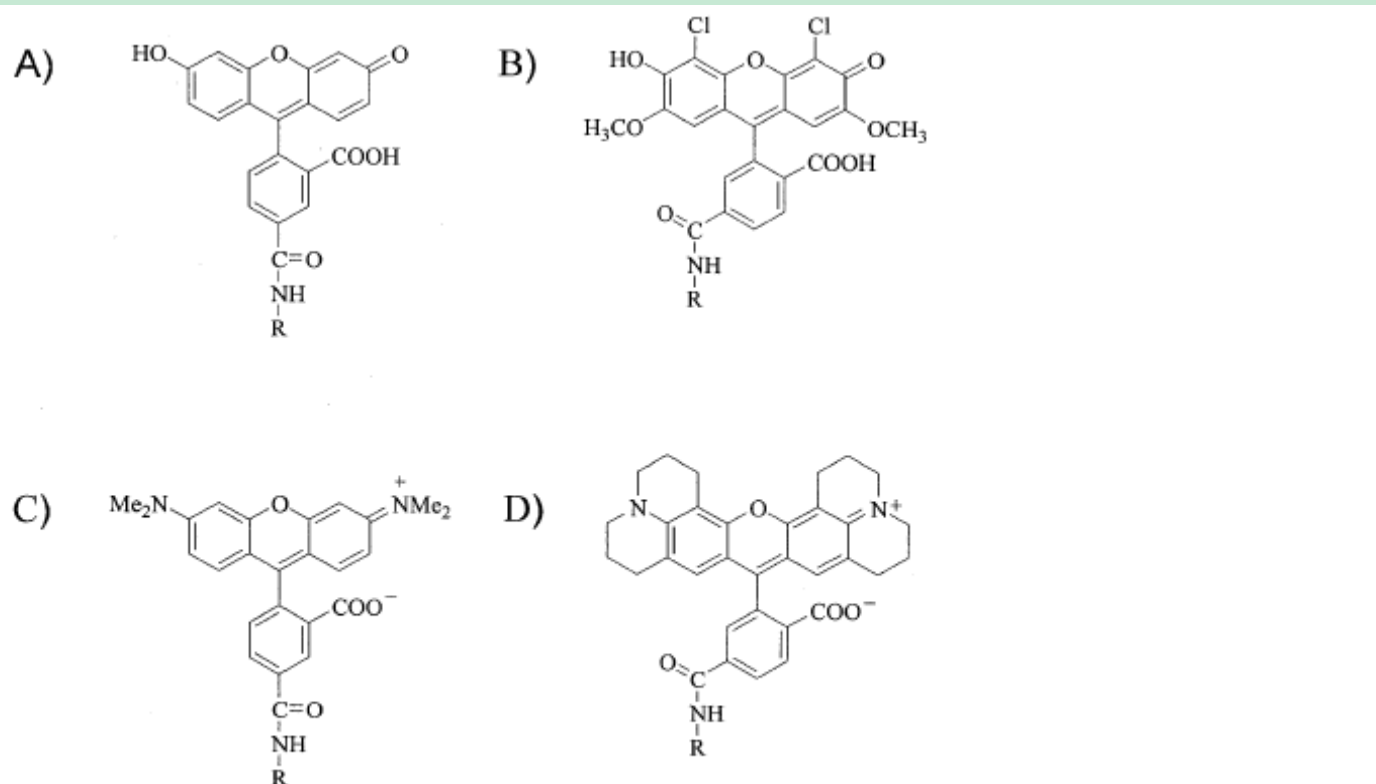


Fig. 14.14 Structures of the four visible dyes used in DNA sequencing: A) FAM, B) JOE, C) TAMRA and D) ROX. R denotes a linker between the chromophore and the nucleotide primer.



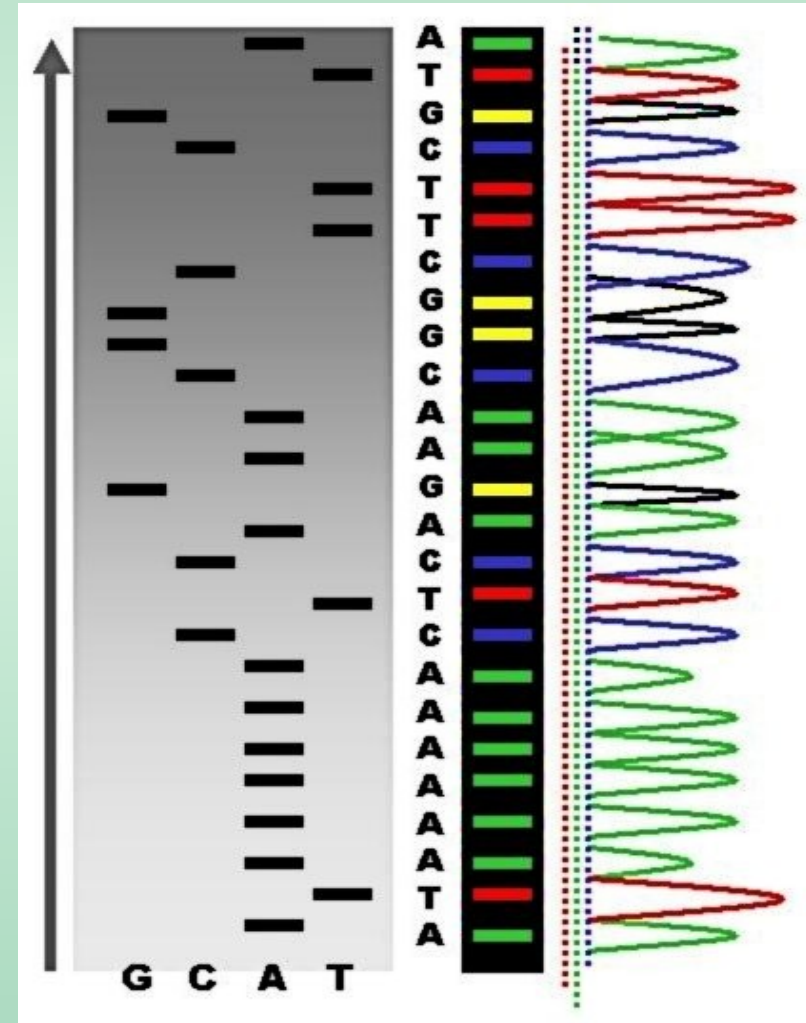
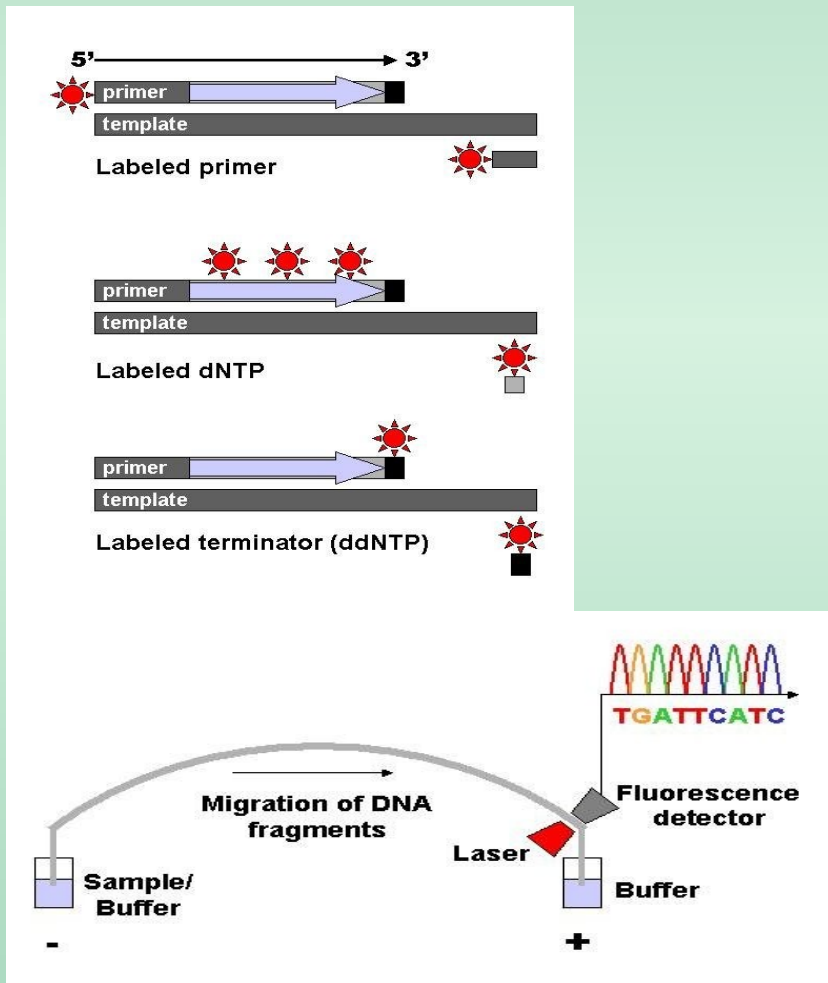
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectroscopia óptica

Espectroscopia e Fotometria

➤ Preparo da amostra e sequenciamento





Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectroscopia óptica

Espectroscopia e Fotometria

➤ Detecção do sinal de nucleotídeos

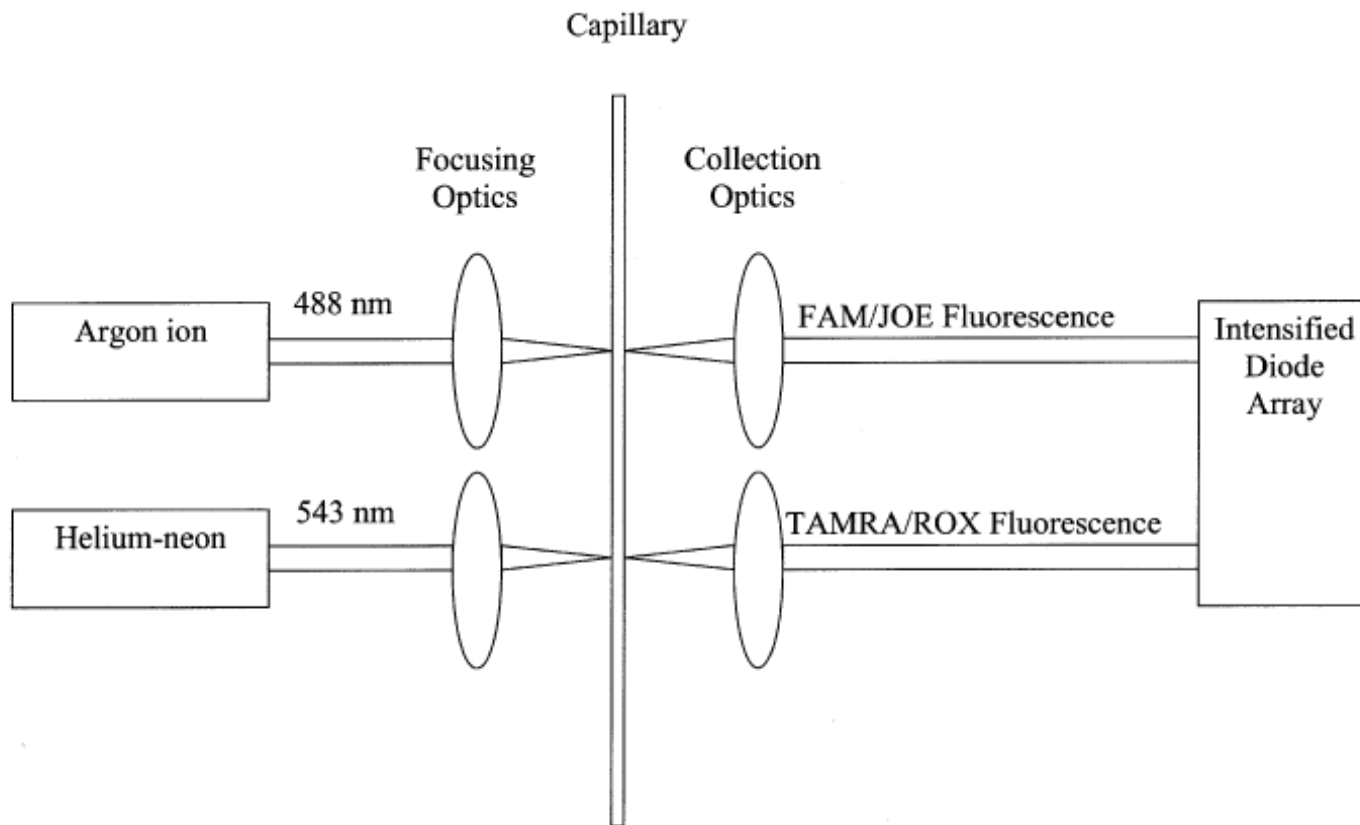


Fig. 14.15 Schematic of two-laser, two-detection window, four-dye DNA sequencing instrumentation developed by Karger and co-workers. Adapted from ref. 104.



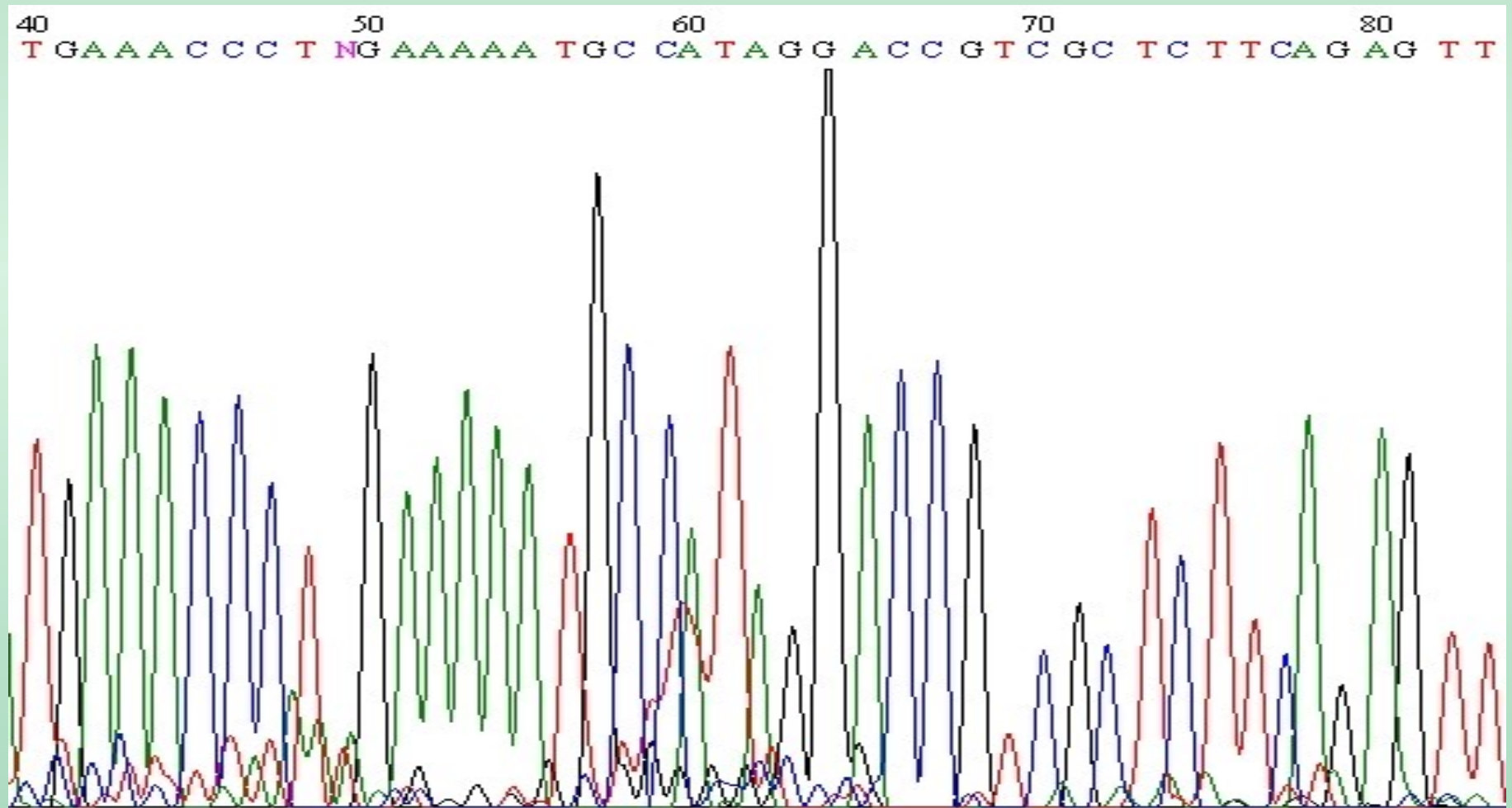
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectroscopia óptica

Espectroscopia e Fotometria

➤ Resultados de sequenciamento da AtPUMP





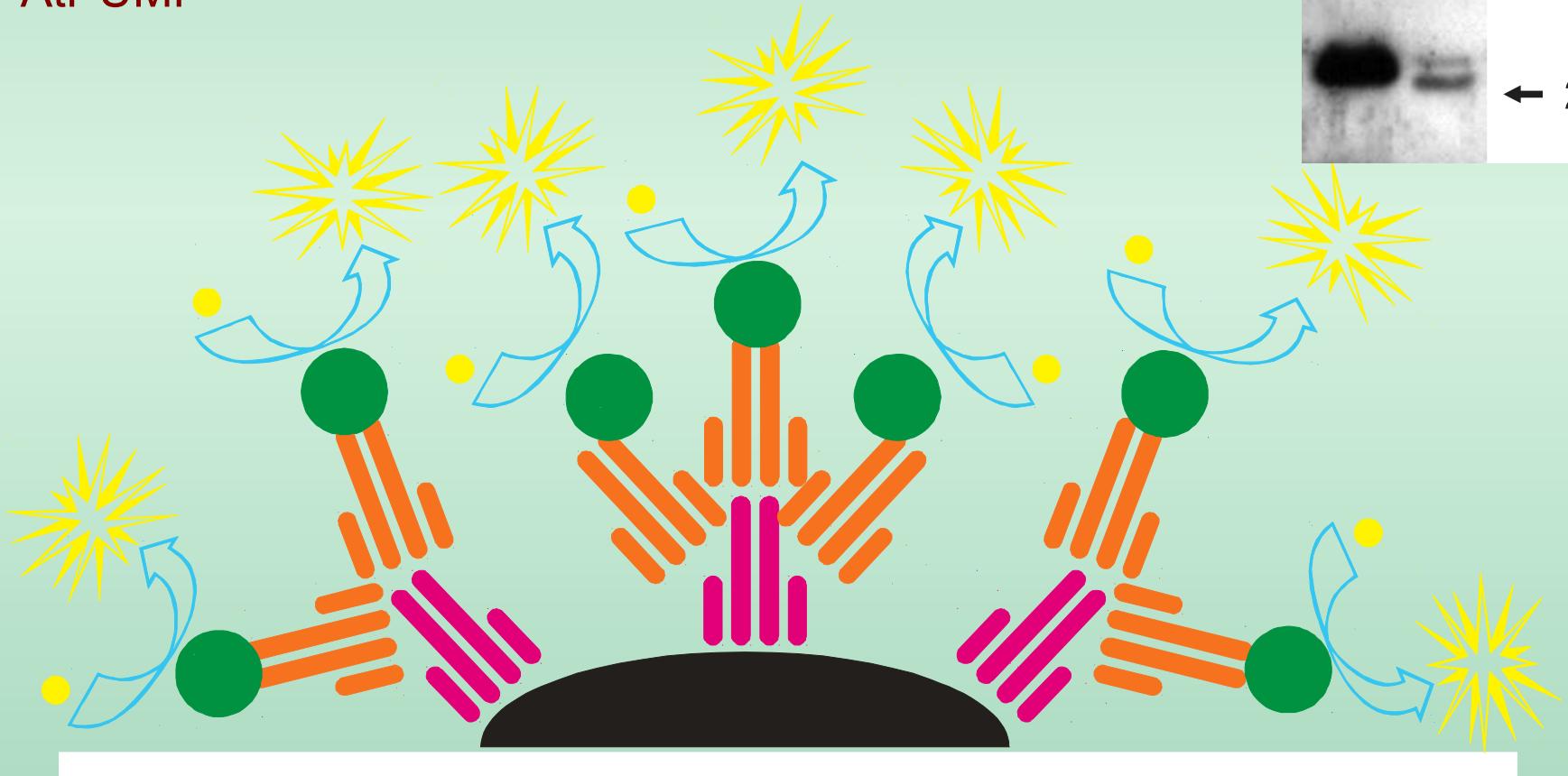
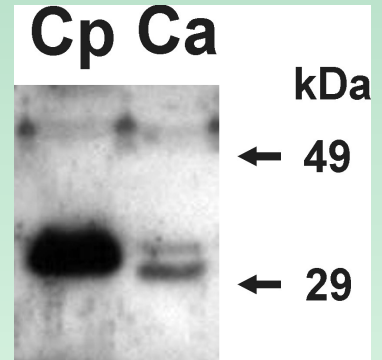
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectroscopia óptica

Espectroscopia e Fotometria

- Fluorescência de CSPD pela fosfatase alcalina conjugada a anticorpo secundário contra anticorpo primário contra AtPUMP





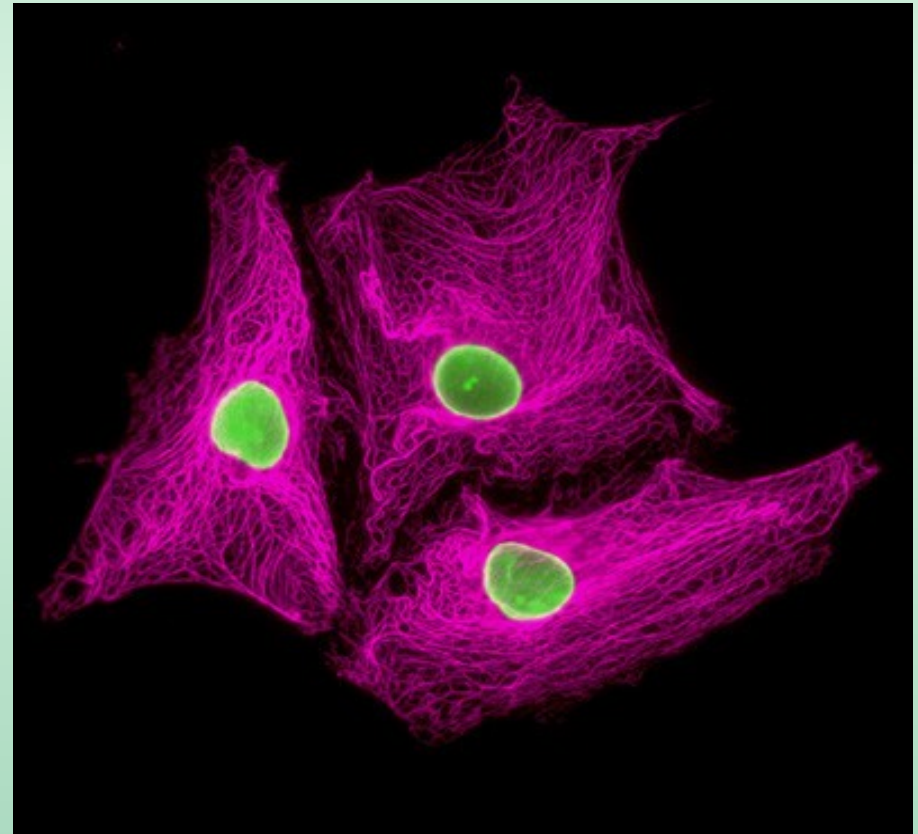
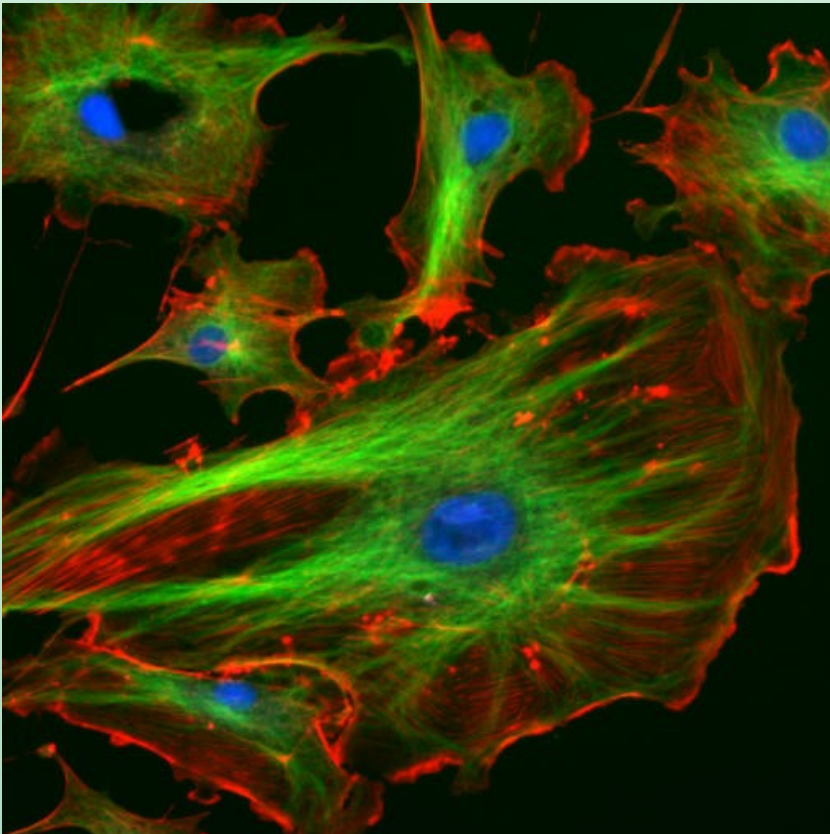
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectroscopia óptica

Espectroscopia e Fotometria

- Mapeamento de citoesqueleto por marcação com proteínas ou sondas fluorescentes





Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Espectroscopia óptica

Espectroscopia e Fotometria

- As sondas fluorescentes são utilizadas para estudar movimento celular ou dos motores moleculares
- pax_gr.mov
 - 120014--KinBead2.avi



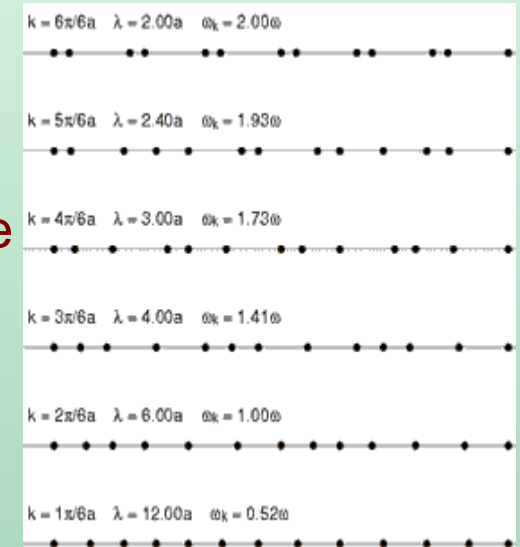
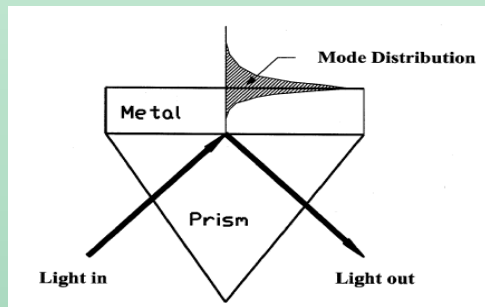
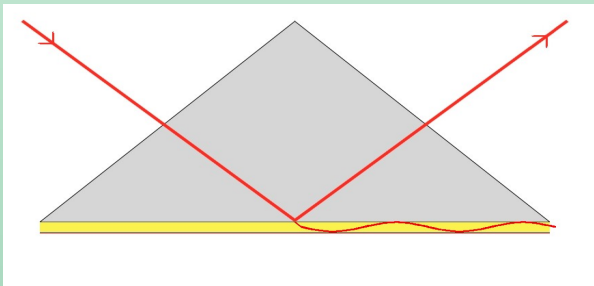
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Ressonância de plasmons da superfície - SPR

Espectroscopia e Fotometria

- Plasmons da superfície, também chamados polaritonos de plasma de superfície, são **flutuações da densidade eletrônica** na interface de dois materiais. Plasmons são vibrações coletivas do gás eletrônico (plasma) que circunda a rede atômica do metal.
- Quando os plasmons se combinam com o fóton, a partícula resultante se chama polariton. Este se propaga ao longo da superfície até se:
 - Extingue
 - Absorve
 - Converte em fonons
 - Transita em emissão de fóton
- A SPR é usada para detectar ligação de DNA ou proteínas com outras moléculas aderidas na superfície





Universidade Federal do ABC

Ressonância de plasmons da superfície - SPR

BC-1308 Biofísica

Espectroscopia e Fotometria

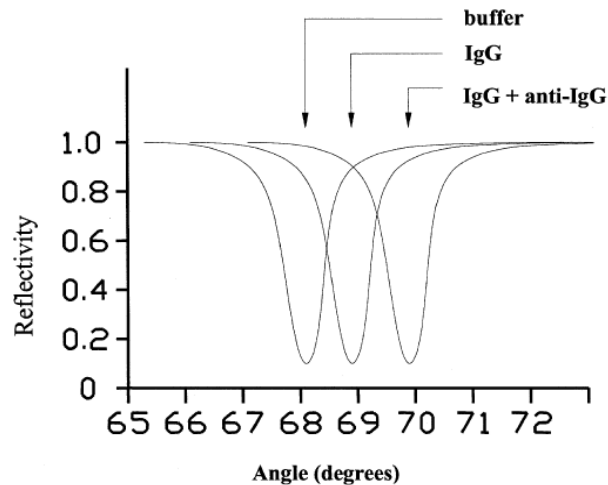
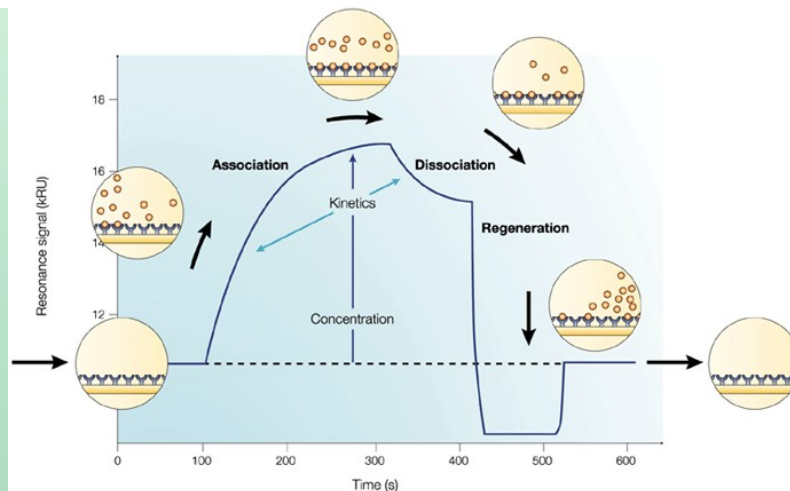
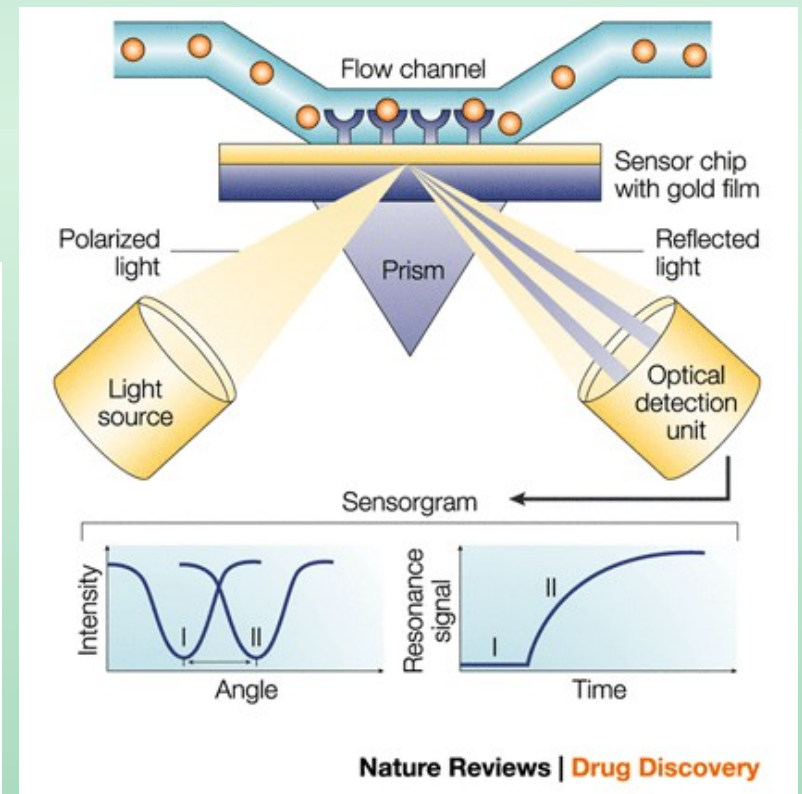


Fig. 14.44 Illustration of the shift in resonance angle at various stages in the adsorption of biomolecules to the metal surface.



Nature Reviews | Drug Discovery



Nature Reviews | Drug Discovery



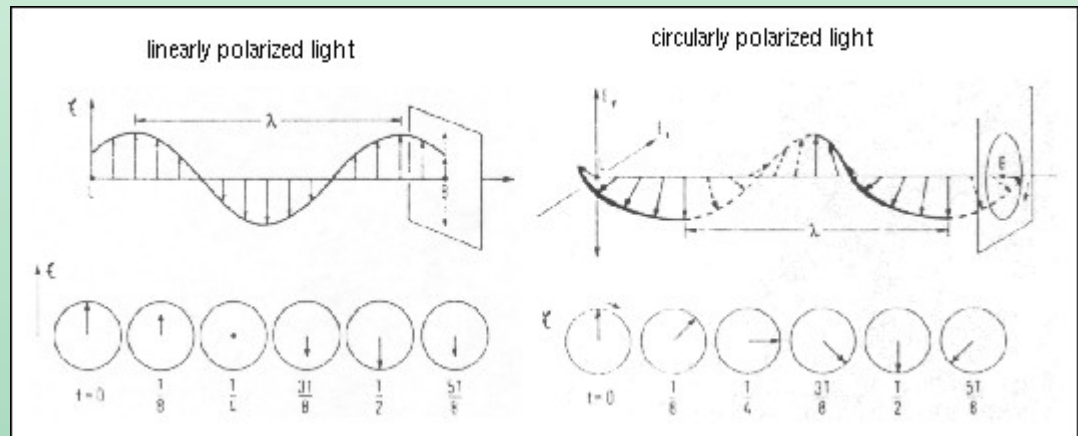
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Dicroísmo circular (CD)

Espectroscopia e Fotometria

- Dicroísmo circular (CD, do inglês *circular dichroism*) é uma forma de espectroscopia que faz uso da absorção diferenciada da luz polarizada no sentido horário ou no sentido anti-horário. Este fenômeno é rotineiramente utilizado no estudo da estrutura secundária de proteínas.
- A luz linearmente polarizada é composta de duas componentes circularmente polarizadas de mesma intensidade. Em cada uma dessas componentes, o vetor eletromagnético roda na direção de propagação. Observando-se o perpendicularmente a variação no vetor elétrico com o tempo, percebe-se que a ponta deste vetor segue uma hélice, rodando no sentido horário para a luz polarizada circularmente para a direita e anti-horário para a esquerda.



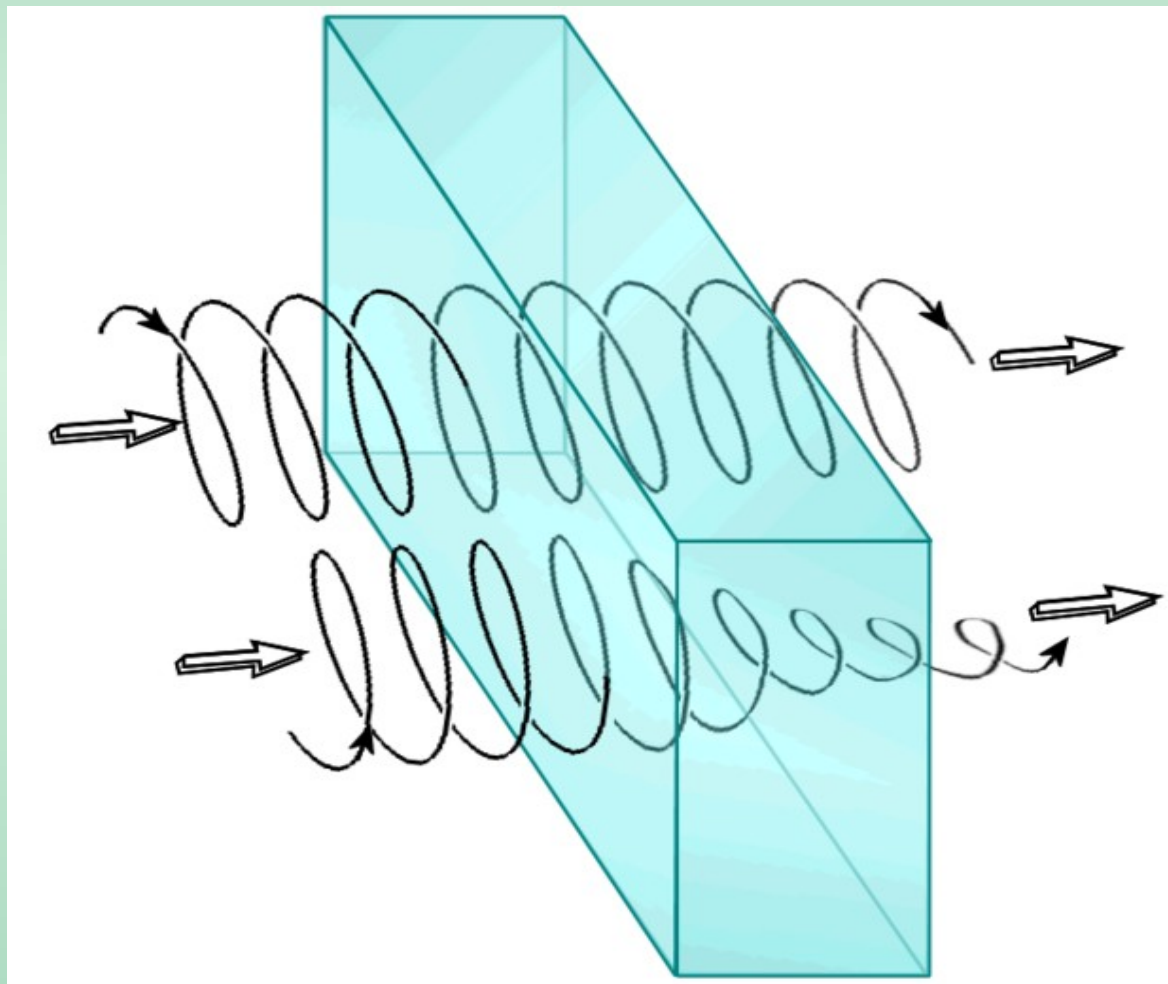


Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Dicroísmo circular (CD)

Espectroscopia e Fotometria





Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Dicroísmo circular (CD)

Espectroscopia e Fotometria

