

APLICAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS COM ESPECTROSCOPIA RAMAN EM SISTEMAS DE ETANOL-METANOL.

Antônio Carlos Marangoni
César Mello
Diórginis Ribeiro
Emiliane G. Ricci
Lucinda M. de F. R. Coelho - Uni-FACEF

INTRODUÇÃO

Em muitos sistemas químicos e biológicos ocorrem misturas de etanol e metanol. O metanol é altamente tóxico até mesmo em baixas concentrações, assim é muito importante a determinação de sua concentração em bebidas, comidas e artigos de consumo em geral. Daí o interesse em determinar as concentrações e as propriedades das estruturas específicas no nível molecular para estas misturas aparentemente homogêneas.

Etanol

O etanol é utilizado na obtenção de bebidas alcoólicas podendo ser elas: destiladas ou fermentadas; como combustível tanto puro como coadjuvante no aumento da octanagem das gasolinas; na formulação de produtos farmacêuticos, como: loções, pomadas, colônias e perfumes; nos laboratórios como solvente nas mais variadas sínteses químicas, bem como agente de limpeza de equipamentos e vidrarias; nas indústrias é como reagente de partida para vários compostos químicos, tais como ácido acético, butadieno, acetaldeído [1].

O etanol é hoje uma das principais fontes de energia renovável, pouco poluente. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e o maior produtor de açúcar e etanol. Isto se deve às novas variedades de matéria-prima, às condições climáticas favoráveis e à melhoria da eficiência industrial das unidades produtoras.

O etanol produzido a partir da cana-de-açúcar contém 35% de oxigênio e possui uma combustão limpa. A grande produção de etanol pode diminuir a necessidade do óleo importado e dos derivados de petróleo.

Quando o etanol substitui o petróleo, os benefícios ambientais incluem menores emissões de gás carbônico (CO₂). E ao contrário de outros combustíveis oxigenados o etanol não é nocivo ao meio ambiente no caso de ocorrerem derramamentos ou vazamentos. Por possuírem estes atributos, o etanol possui um futuro promissor como combustível alternativo ou combustível adicional para mecanismos de combustão interna.

Metanol

O metanol é utilizado como solvente industrial, pois dissolve alguns sais melhor que o etanol; nas indústrias de plásticos; na extração de produtos vegetais e animais; nas indústrias farmacêuticas, como solvente em reações, na síntese de vitaminas e hormônios; como matéria-prima na fabricação de formol (aldeído fórmico) e para produzir biodiesel [1].

Em caso de inalação pode causar uma leve irritação das membranas das mucosas e tem efeito tóxico no sistema nervoso, particularmente no nervo óptico. Os sintomas da exposição incluem dor de cabeça, náuseas, vômitos, cegueira, coma e até a morte. A dose fatal está entre 100 – 125 ml.

Quimiometria

O uso de computadores para analisar dados químicos cresceu muito nas últimas décadas, devido aos avanços em “hardware” e “software”. Por outro lado, a aquisição de dados principalmente na área de química analítica, atingiu um ponto bastante sofisticado com o interfaceamento de instrumentos aos computadores produzindo uma enorme quantidade de informação, muitas vezes complexa e variada. Uma das características interessante dos modernos instrumentos é o número das variáveis que podem ser medidas em uma amostra. Devido à grande quantidade de dados obtidos houve a necessidade de ferramentas novas e mais sofisticadas para tratar e extrair informações importantes dos espectros, essa busca por novas ferramentas cresceu rapidamente dando origem a quimiometria, a qual pode ser definida como uma área da química que usa métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar procedimentos ótimos de medidas e experimentos, e extrair o máximo da informação química relevante, com a análise dos dados químicos de natureza multivariada [2].

A classificação das amostras, de acordo com suas propriedades, bem como a quantificação de variáveis a até mesmo a previsão de resultados, tornaram a quimiometria indispensável em muitas áreas químicas como, por exemplo, nas análises por espectroscopia do Infra-vermelho próximo (NIR) e Raman [3].

Muitas vezes os dados são expressos em grandezas diferentes, ou apresentam muito ruído, e dependendo do tipo de informação que se deseja extrair, isto poderá ou não comprometer a análise. Um tratamento prévio dos dados, para ajustar as grandezas em valores equivalentes ou de possível comparação resolve este tipo de problema.

Este pré-processamento dos dados tem por objetivo adequar as amostras do conjunto de maneira a maximizar ou minimizar o efeito de certas variáveis no todo.

OBJETIVO

Caracterizar o comportamento da mistura etanol e metanol, utilizando a Espectroscopia Raman e a análise dos componentes principais (PCA).

MATERIAIS E MÉTODOS:

Utilizou-se:

- metanol anidro (Merck);
- etanol anidro (Merck);
- cubeta de quartzo;
- espectrômetro Raman (Renishaw Systems, Inc) (Watertown, MA).



Figura 1 - Espectrômetro Raman

A mistura de metanol/etanol

Em uma cubeta de quartzo contendo 0,5 ml de etanol anidro foram adicionados quarenta e uma adições sucessivas de 25 µl de metanol anidro. Três espectros Raman foram adquiridos com um tempo de integração de 10 segundos. O espectro final foi à média destes três espectros e resultaram em 41 espectros.

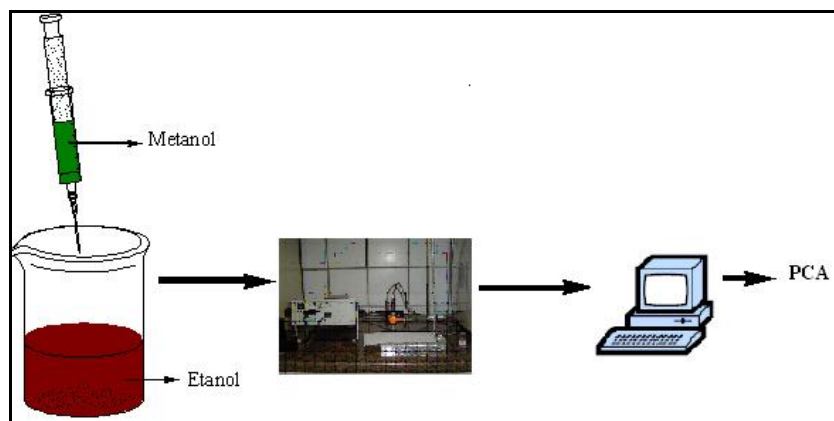


Figura 2 - Esquema da etapa experimental

A ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus objetivos a determinação dos níveis de energia de átomos ou moléculas [4]. Também nos permite obter informações sobre a estrutura molecular e as ligações químicas. Nas moléculas, a região espectral onde as transições são observadas depende do tipo de níveis envolvidos: eletrônicos, vibracionais ou rotacionais.

A energia total de uma molécula (equação 1) é a soma das energias eletrônica, vibracional e rotacional, sendo a energia eletrônica muito maior que a vibracional e esta muito maior do que a rotacional [4]:

$$E_{total} = E_{el} + E_{vibr} + E_{rot} \quad \text{eq.1}$$

As energias eletrônicas aparecem nas regiões ultravioleta-visível, as vibracionais aparecem na região do infravermelho e as rotacionais aparecem na região das microondas. Os níveis energéticos de uma molécula, quando comparados entre si, mostram valores bem diferentes, isto faz com que cada espectro possa ser estudado separadamente [4].

A separação entre os movimentos dos núcleos e dos elétrons em uma ligação química, conhecida como aproximação de Born-Oppenheimer, resulta principalmente da grande diferença entre as massas dos núcleos e dos elétrons.

Sendo o movimento dos elétrons muito mais rápidos do que dos movimentos vibracionais dos núcleos, pode-se considerar a posição dos núcleos fixada durante a transição eletrônica. Do mesmo modo, durante o movimento dos núcleos pode-se considerar uma distribuição média dos elétrons. A interação da radiação eletromagnética com o movimento vibracional dos núcleos origina os espectros vibracionais no infravermelho e no Raman [4, 5].

Quando um grupo de moléculas é iluminado por luz monocromática, cujo comprimento de onda não permite sua absorção, a maior parte da luz incidente é transmitida diretamente através da amostra e temos espalhamento Rayleigh, outra parte é espalhada em frequências menores ou maiores que da radiação original chamado espalhamento Raman, o qual pode ser de dois tipos: Stokes e anti-Stokes como mostra a figura 3 [6].

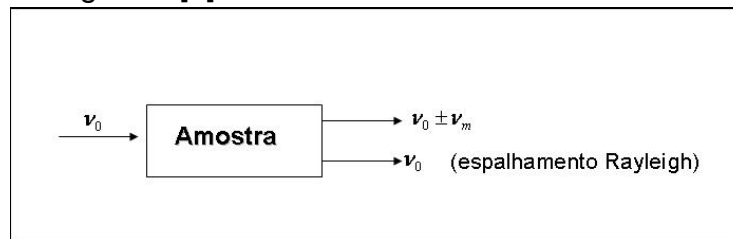


Figura 3 - mecanismo de interação da luz

Uma amostra é irradiada com luz de frequência ν_0 , decorrendo em dois tipos de espalhamento: o espalhamento elástico (*Rayleigh*) em que a luz espalhada tem a mesma frequência ν_0 da luz incidente, e o espalhamento inelástico (Raman) cuja luz espalhada tem a frequência igual à frequência da luz incidente ν_0 mais ou menos a frequência vibracional da molécula ν_m .

O espalhamento Raman envolve uma distorção momentânea dos elétrons distribuídos em torno de uma ligação na molécula, seguida por reemissão da radiação enquanto a ligação volta ao estado normal. Na sua forma distorcida, a molécula fica temporariamente polarizada. E de acordo com a mecânica quântica uma vibração é ativa no espectro Raman quando durante a vibração ocorre uma mudança na polarizabilidade da molécula. A polarizabilidade é a facilidade da molécula em sofrer distorção quando submetida a um campo elétrico, de modo que os núcleos são atraídos pelo pólo negativo e os elétrons são atraídos pelo pólo positivo [7].

No espalhamento *Rayleigh* as moléculas estão num estado denominado fundamental (que é o estado no quais as moléculas estão num menor nível de energia). Quando essas moléculas sofrem colisão com o fóton de energia (que é a luz incidente) passa do estado fundamental para um estado virtual e volta em seguida para o estado fundamental e o fóton é espalhado sem alteração de energia.

No espalhamento Raman Stokes as moléculas sofrem colisão com o fóton passa do estado fundamental para o estado virtual, e decai em seguida para um estado vibracional de energia. O fóton espalhado terá energia menor que a radiação incidente.

No espalhamento Raman anti-Stokes o fóton encontra a molécula já em um estado excitado e leva a molécula a uma energia bem mais alta, quando chega ao estado virtual, a molécula decai para o estado fundamental. O fóton espalhado terá energia maior que a radiação incidente, conforme o diagrama da figura 4.

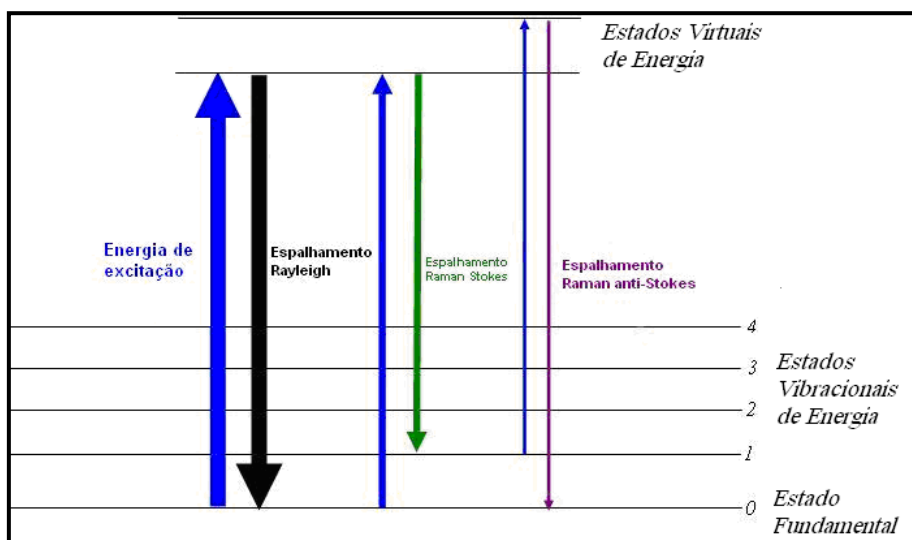


Figura 4 - Mecanismo de espalhamento Rayleigh e Raman.

O espectro Raman de uma determinada molécula consiste de uma serie de picos ou faixas, cada um transferido por uma freqüência vibracional característica daquela molécula. Cada molécula tem o seu próprio espectro característico, e dessa forma, o espectro Raman pode fornecer uma “impressão digital” de uma substância da qual a composição molecular pode ser determinada

[5]. As linhas espectrais são fornecidas em função de frequências denominadas em deslocamentos Raman (“Raman shift”) que são expressas em cm^{-1} .

A espectroscopia Raman tem sido amplamente aplicada no estudo de sistemas biológicos. As vantagens dessa técnica incluem a exigência de amostras pequenas, a sensibilidade mínima no tocante à interferência da água, o detalhamento espectral e a sensibilidade conformacional e ambiental. Na área químico-farmacêutica têm sido utilizadas na análise não-destrutiva de produtos acabados sólidos, líquidos e gases, e a rápida identificação de amostras [7].

Uma das vantagens da espectroscopia Raman é a possibilidade de se posicionar a amostra em recipientes de vidro, uma vez que estes são virtualmente transparentes à radiação na faixa do visível, ou apresentam sinais em uma região diferente daquelas regiões onde a maioria dos compostos de interesse apresenta suas bandas de espalhamento Raman.

PRÉ-PROCESSAMENTO DE DADOS

Antes de se iniciar qualquer tipo de análise multivariada, é necessária a realização prévia de uma manipulação matemática do conjunto de dados para adequação, às vezes até mesmo remoção de possíveis fontes de variação [8, 9]. É o caso, por exemplo, de variáveis medidas em diferentes unidades, com diferentes magnitudes. Outra circunstância onde se faz necessário tratar os dados seria no caso destes conterem informações correlacionadas, como ocorre, por exemplo, no caso de dados espectroscópicos. Há várias maneiras de se realizar este pré-processamento, alguns deles são *centrar os dados na média, escalamento pela variância, o autoescalamento, a normalização, a correção multiplicativa de sinal, o alisamento, a transformada de Fourier, e o método de Gram-Schmidt*. Todos estes métodos são sensíveis à presença de amostras anômalas, denominada *outlier*, que são amostras que apresentam um comportamento muito diferente do restante do conjunto.

Os espectros foram pré-processados utilizando-se filtro de transformada de Fourier para minimizar ruído. A faixa espectral do deslocamento Raman utilizada neste trabalho foi de 950 a 1250 cm^{-1} .

O FILTRO DE TRANSFORMADA DE FOURIER

A idéia básica deste tipo de filtro é aplicar a transformada de Fourier direta [10-12] dada pela Equação 2 para se obter o sinal analítico representado no domínio das freqüências (ν), ou melhor, aplica-se a transformada de Fourier direta para obter o espectro de freqüências $F(\nu)$, do sinal analítico.

$$F(\nu) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(\lambda) e^{i\lambda\nu} d\lambda \quad \text{eq. 2}$$

Na Equação 2, λ representa o domínio original do sinal analítico e $f(\lambda)$ o sinal analítico. Para espectros, λ representa os comprimentos de onda.

Uma vez obtido o espectro de freqüências do sinal analítico, deve-se cortar as freqüências altas, visto serem estas freqüências, na grande maioria dos casos, relacionadas ao ruído instrumental.

Finalmente aplica-se a transformada de Fourier inversa, dada pela Equação 3 e recupera-se o sinal analítico inicial, livre de ruído.

$$f(\lambda) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} F(\nu) e^{-i\lambda\nu} d\nu \quad \text{eq. 3}$$

A seqüência de operações utilizada no processo de remoção de ruído, através da transformada de Fourier, pode ser facilmente entendida se observarmos a Figura 5 [13-16].

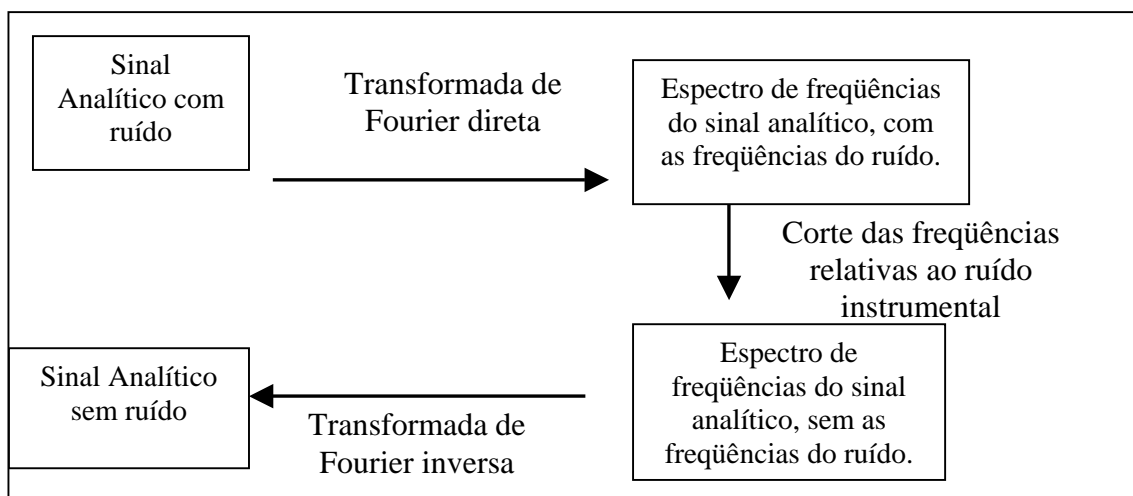


Figura 5 - Representação esquemática da seqüência de operações utilizada na aplicação do filtro de transformada de Fourier

RESULTADOS

Após a obtenção dos espectros, estes foram tratados no programa computacional *MATLAB*[®] 6.5. E a partir daí foram usadas as sub-rotinas do *pls_toolbox* para a determinação das componentes principais.

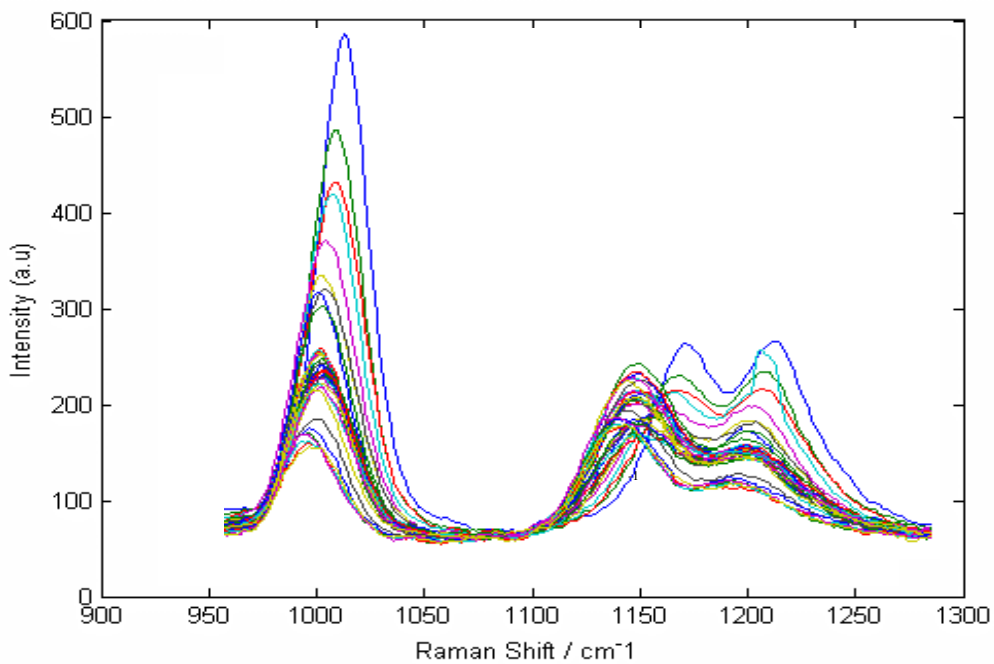


Figura 6 - Espectro Raman da mistura etanol e metanol antes do pré-processamento dos espectros.

A Figura 7 mostra os espectros Raman da mistura Etanol/Metanol após a aplicação do filtro da transformada de Fourier.

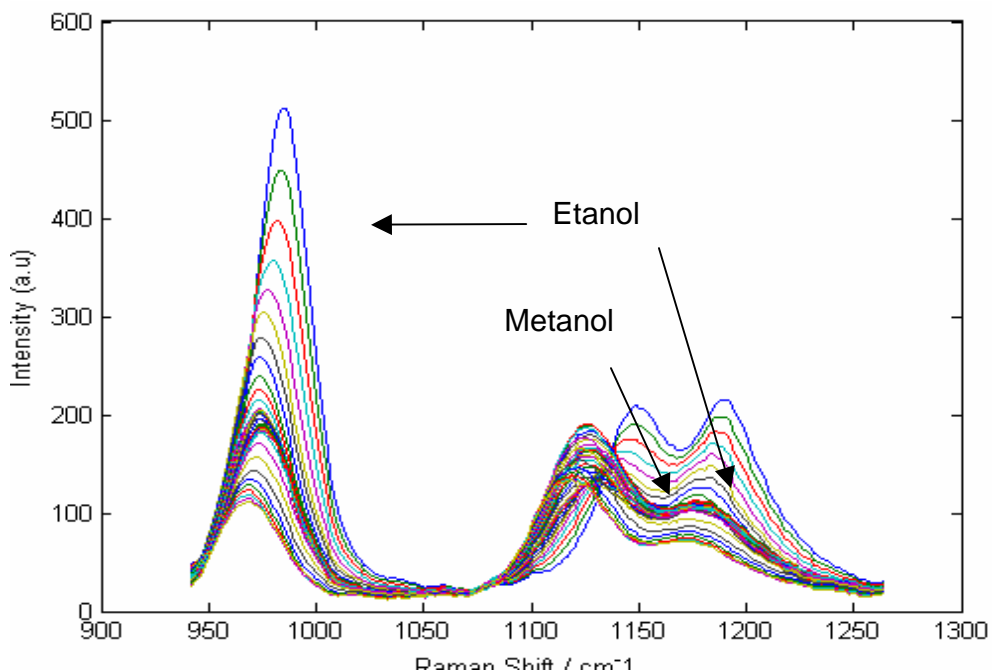


Figura 7 - Espectro Raman da mistura etanol e metanol após o pré-processamento dos espectros

Análise das componentes principais

Para fazer a análise dos componentes principais (PCA), os dados foram centrados na média e autoescalados.

Uma análise de componente principal simples (PCA) mostrou que há quatro componentes diferentes na mistura de etanol e metanol, como mostrado na Figura 8.

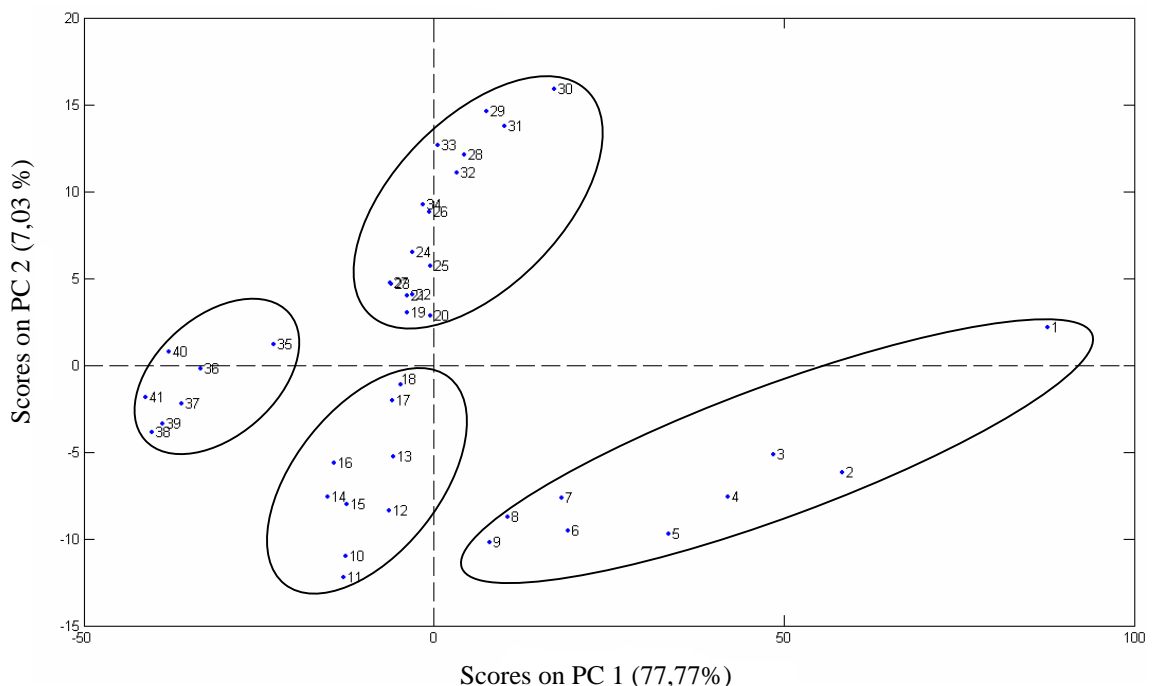


Figura 8 - Análise dos componentes principais (PCA) do espectro Raman

Inicialmente, têm-se uma mistura de 0,50 ml de etanol e 0,25 ml de metanol, o espectro médio que se obtém é a mistura do espectro de etanol com o espectro do metanol. Porém, como havia mais etanol, o espectro médio teve uma contribuição maior do etanol e, portanto este ficou mais semelhante ao espectro do etanol puro e mudou-se pouco a pouco devido as adições de metanol, nesta fase

houve uma diferença pequena de um espectro para o outro, assim notou-se uma grande distância entre os pontos da PCA. Não houve interações ou reações químicas entre metanol e etanol, a interação que existe foi basicamente interações físicas de atração e de dispersão e ligações de hidrogênio entre os agrupamentos, anéis e cadeias do metanol e do etanol. Assim terminou-se a primeira fase que formou o primeiro agrupamento do diagrama de PCA que pode ser observado na Figura 9.

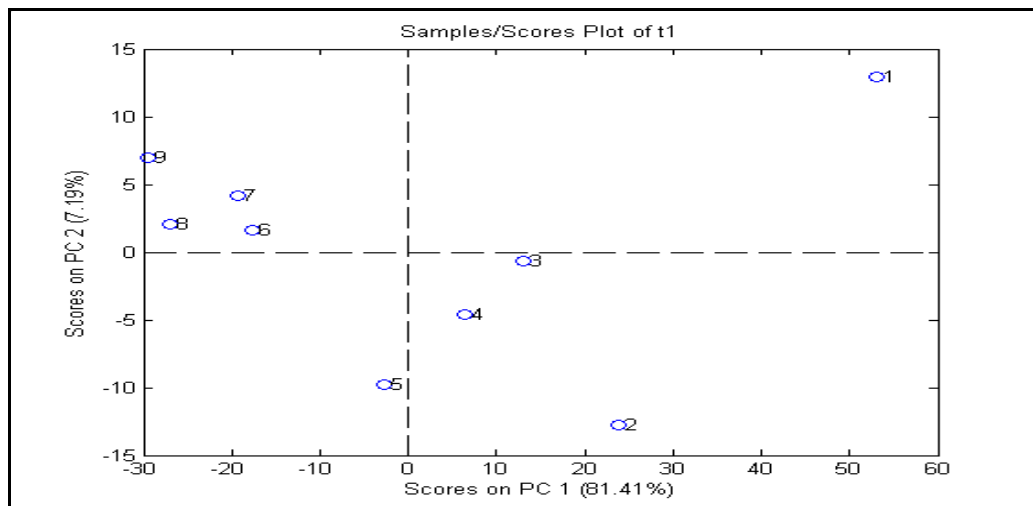


Figura 9 - Diagrama do primeiro agrupamento da PCA

Na adição seguinte têm-se 0,50 ml de etanol e 0,50 ml de metanol. Formou-se um grupo de espectros diferente do anterior, com os pontos da PCA mais próximos um do outro e, originando o segundo agrupamento da PCA como mostrado na Figura 10.

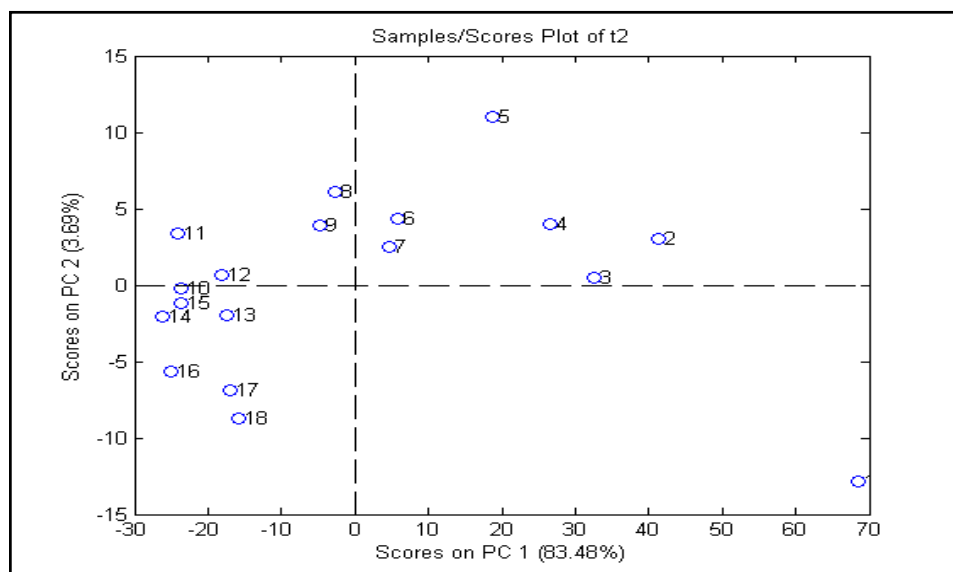


Figura 10 - Diagrama do segundo agrupamento da PCA

No terceiro agrupamento da PCA têm-se 0,50 ml de etanol e 0,75 ml de metanol. Os espectros gerados são semelhantes ao espectro do metanol, devido a concentração da mistura. Não ocorrendo interações químicas, apenas interações físicas do tipo atração e dispersão e ligações de hidrogênio basicamente entre os agrupamentos, anéis e cadeias do metanol e do etanol. Este grupo foi um pouco mais numeroso, devido ao aumento da concentração de metanol alguns espectros do fim deste grupo já ficam mais próximos do grupo 4. Desta maneira forma-se, o terceiro agrupamento da PCA como mostrado na Figura 11.

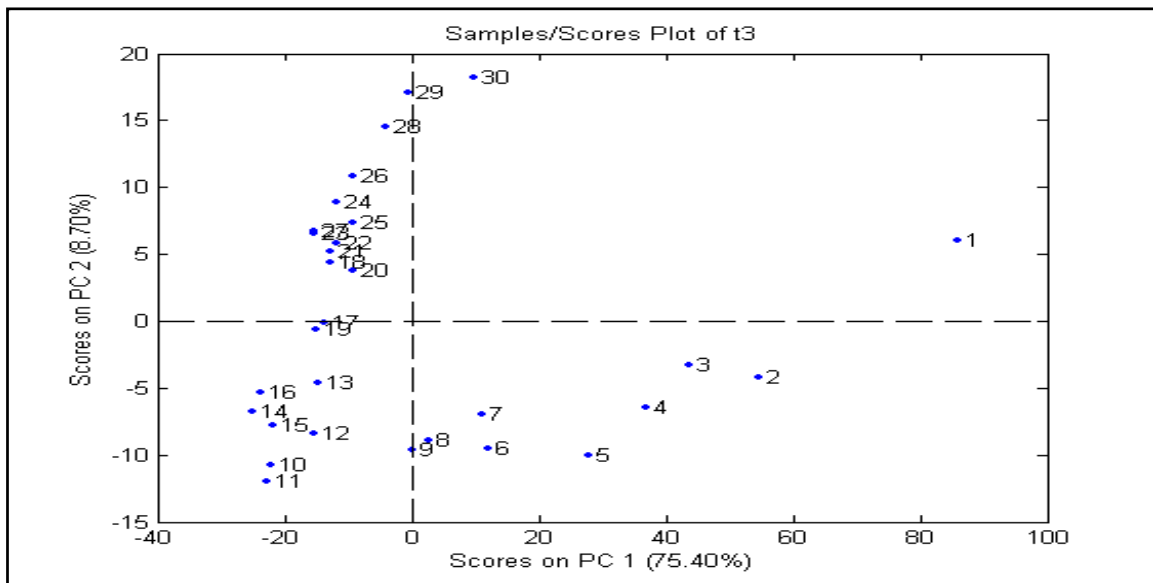


Figura 11 - Diagrama do terceiro agrupamento da PCA

Nesta última etapa do experimento têm-se uma mistura de 0,50 ml de etanol e 1,00 ml de metanol.

Os espectros eram mais semelhantes ao espectro do metanol puro, por esta razão os pontos deste agrupamento da PCA são muito próximos. Nós temos o quarto e último agrupamento como mostrado na Figura 12.

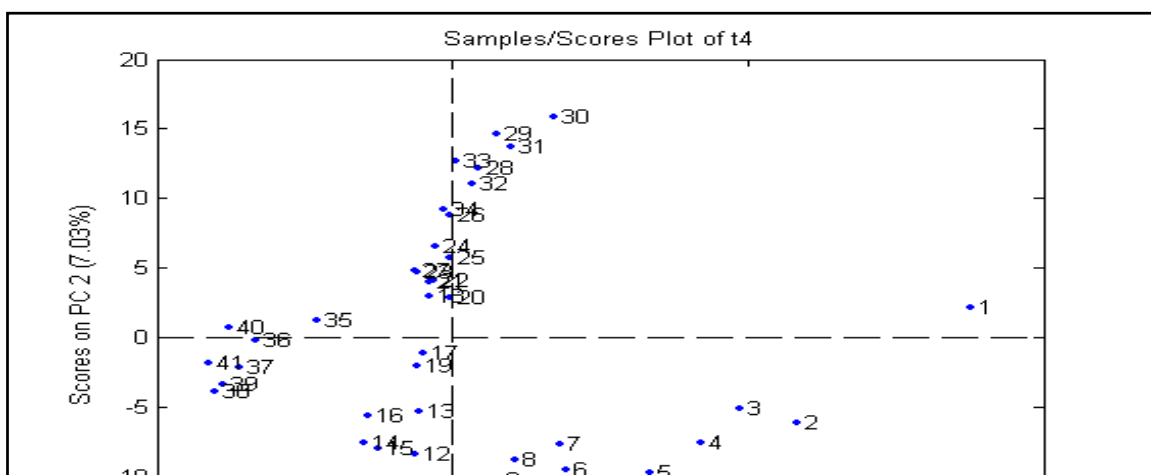
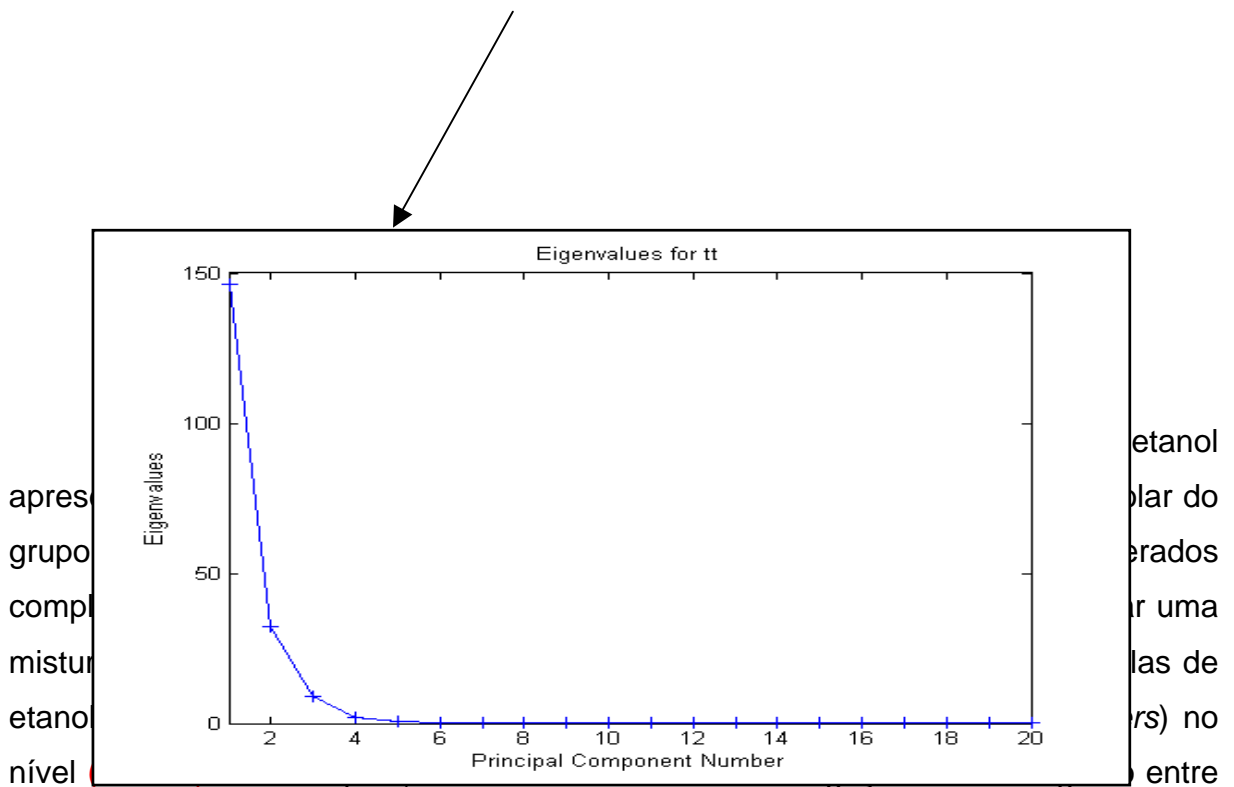


Figura 12 - Diagrama do quarto agrupamento da PCA

Observando-se a Figura 13, ela indica o número de componentes principais significativas. Através dessa Figura, verificou-se que a partir de 4 componentes principais não existe mais uma variância significativa no autovalor. Pelo fato de que 5 componentes situa-se muito próxima ao zero.



apres grupo compl mistur etano nível

etanol
plar do
erados
r uma
las de
rs) no
entre

as moléculas de álcool. Tais estruturas não reagem mutuamente devido a ligação química, mas somente por ligações de hidrogênio e energias (U) de coesão e/ou dispersão. Os agrupamentos de metanol interagem fortemente com agrupamentos de metanol por ligações de hidrogênio e fracamente com agrupamentos de etanol por energias de coesão e/ou dispersão e exatamente o mesmo aconteceu com o etanol.

CONCLUSÃO

Como pôde ser visto nesse trabalho, o uso da Espectroscopia Raman combinada com o método quimiométrico, PCA, é uma alternativa bastante viável às técnicas amplamente estabelecidas especialmente em processos industriais.

Utilizamos os álcoois etanol e metanol por serem álcoois homólogos e simples. O teor de metanol deve ser rigorosamente controlado nas indústrias de alimentos, bebidas e fármacos devido ao seu teor tóxico.

Demonstramos através da análise dos componentes principais (PCA) que foi verificado um fenômeno quando se misturou metanol e etanol, pois obtivemos uma mistura aparentemente homogênea no nível (**estado**) macroscópico enquanto que microscopicamente parece ser uma mistura heterogênea complexa. Além disso, podemos concluir que nesse sistema não houve problemas em relação à entropia, pois tivemos um sistema mais desorganizado com o aumento da entropia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SOLOMONS, T. W. G. *Química Orgânica*. 6. ed, LTC-Livros Técnicos e Científicos, 1996.
2. FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P, L. O. Quimiometria I: Calibração Multivariada, um tutorial. *Química Nova*, v.22, n.5, p.724-731, 1999.
3. NORRIS, K.; WILLIAMS, P., *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, Mionnesota: Americam Association of Cerial Chemists (AACC), 1990.
4. SALA, O. *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho*. São Paulo: Editora da UNESP, 1995.

5. LORINCZ, A.; HADDAD, D.; NAIK, R.; NAIK, V.; FUNG, A.; CAO, A.; MANDA, P.; PANDYA, A.; AUNER, G.; RABAH, R.; LANGENBURG, S. E.; KLEIN, M. D. Raman Spectroscopy for Neoplastic Tissue Differentiation: a pilot study. *Journal of Pediatric Surgery*. v.39, n.6, p.953-956, June 2004.
6. FERRARO, J. R. e NAKAMOTO, K. *Introductory Raman Spectroscopy*. Academic Press, Inc., EUA, 1994.
7. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de análise instrumental*. 5.ed. Porto Alegre:Bookman, 2002.
8. BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ; M. B.; *Chemometrics: A Practical Guide*, Wiley-Interscience Publication, Nova Iorque, 1998.
9. BEEBE, K. R.; KOWALSKI, K. R. An Introduction to multivariate calibration and analysis. *Analytical Chemistry*, v. 59, 17, 1987.
10. HENRY, J. B. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. São Paulo: Manole, 1997.
11. HANLON, E. B.; et al. *Phys. Med. Biol.*, v. 45, p. R1-R59, 2000
12. GEMPERLINE, P. J. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 39, n. 29, 1997.
13. BRACEWELL, R. *The Fast Fourier Transform e its application*, McGraw-Hill, New York, 1965
14. NUSSBAUMER, J. H. *The fast Fourier Transform e convolution algorithms*, Springer- Verlag, New York, 1982.
15. MELLO, C. *Redes Neurais e técnicas de pré-processamento de sinais em espectroscopia de reflectância difusa no infravermelho próximo*. 1997. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

16.HIRSCHFELD, T.; CHASE, B. FT-Raman spectroscopy – development and justification. *Applied Spectroscopy*. n.40, p.133-137, 1986.