

Espectrofotometria

Espectrofotometria

- ✓ É um método de análise quantitativa instrumental mais usado nas investigações biológicas e físico-químicas.
- ✓ Método de análise óptico baseado em medidas de absorção de radiação eletromagnética.
- ✓ Espectrofotometria Óptica
 - ✓ Comprimento de onda corresponde à luz visível ou ultra-violeta:
 - faixa entre aproximadamente 180 a 800 nm

Espectrofotometria

- ✓ Quando a luz atravessa uma substância, parte da energia é absorvida → **absorvância**
- ✓ A cor das substâncias se deve a absorção de certos comprimentos de ondas da luz branca que incide sobre elas, deixando transmitir aos nossos olhos apenas aqueles comprimentos de ondas não absorvidos → **transmitância**

Espectrofotômetro

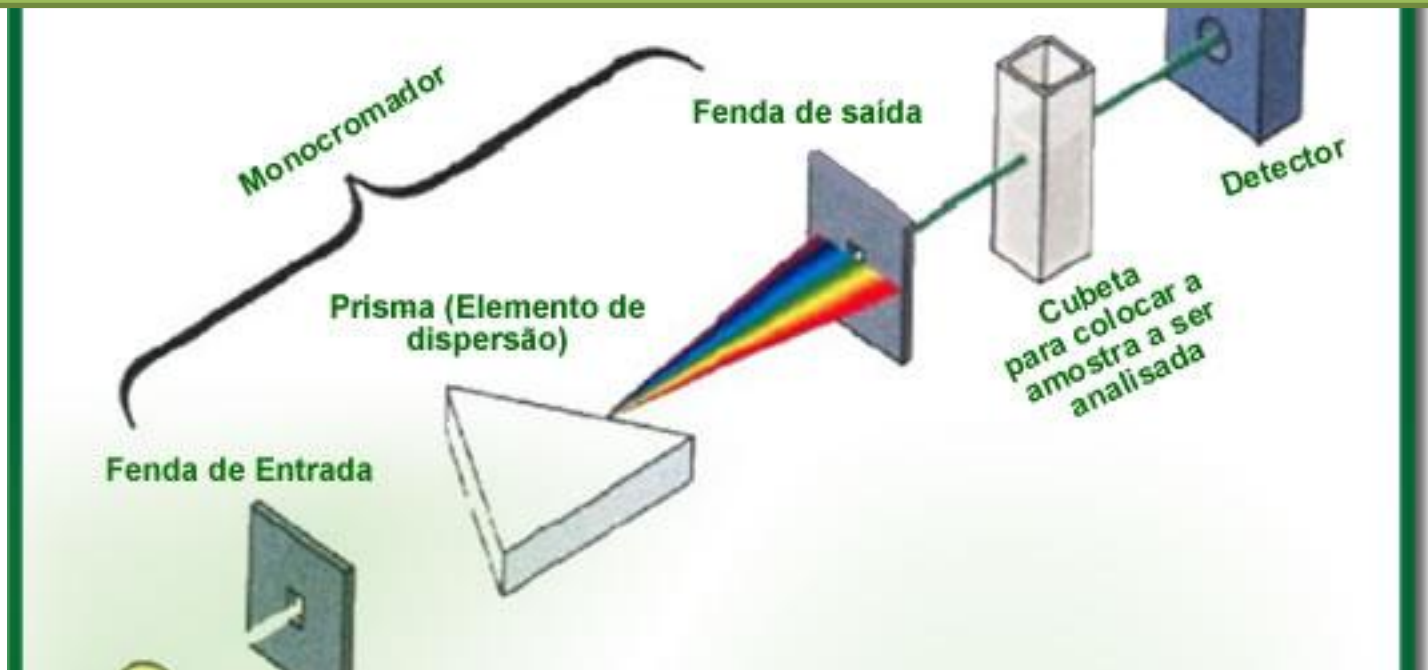
- ✓ O espectrofotômetro é um instrumento utilizado para medir a quantidade de luz (energia radiante) absorvida por uma determinada solução.
- ✓ Ou seja, medir a concentração de substâncias, que absorvem energia radiante, em um solvente.



A base da espectrofotometria, portanto é passar um feixe de luz através da amostra e fazer a medição da intensidade da luz que atinge o detector.

O espectrofotômetro compara quantitativamente a fração de luz que passa através de uma solução de referência e uma solução de teste.

em recipientes apropriados como as cubetas e tubos de ensaio);

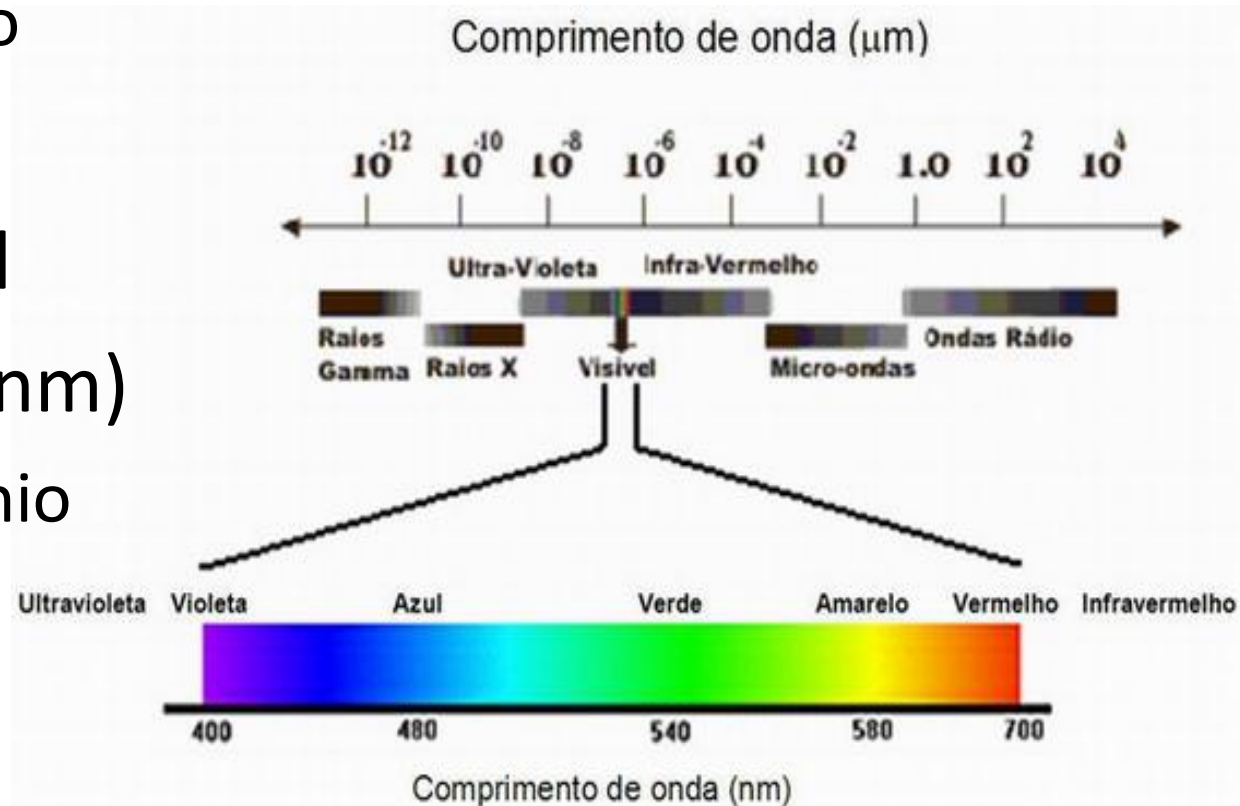


Um detector de radiação, que permite uma medida relativa da intensidade da luz.
teste);

Fontes Luminosas

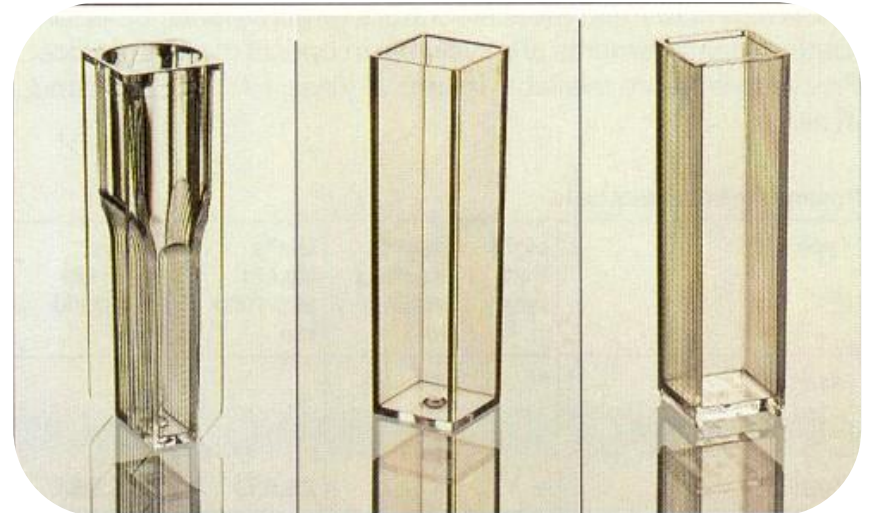
- Luz UV (180 a 400 nm)
 - Lâmpada de gás hidrogênio
 - Mercúrio

- Luz Visível (400 a 800 nm)
 - Tungstênio



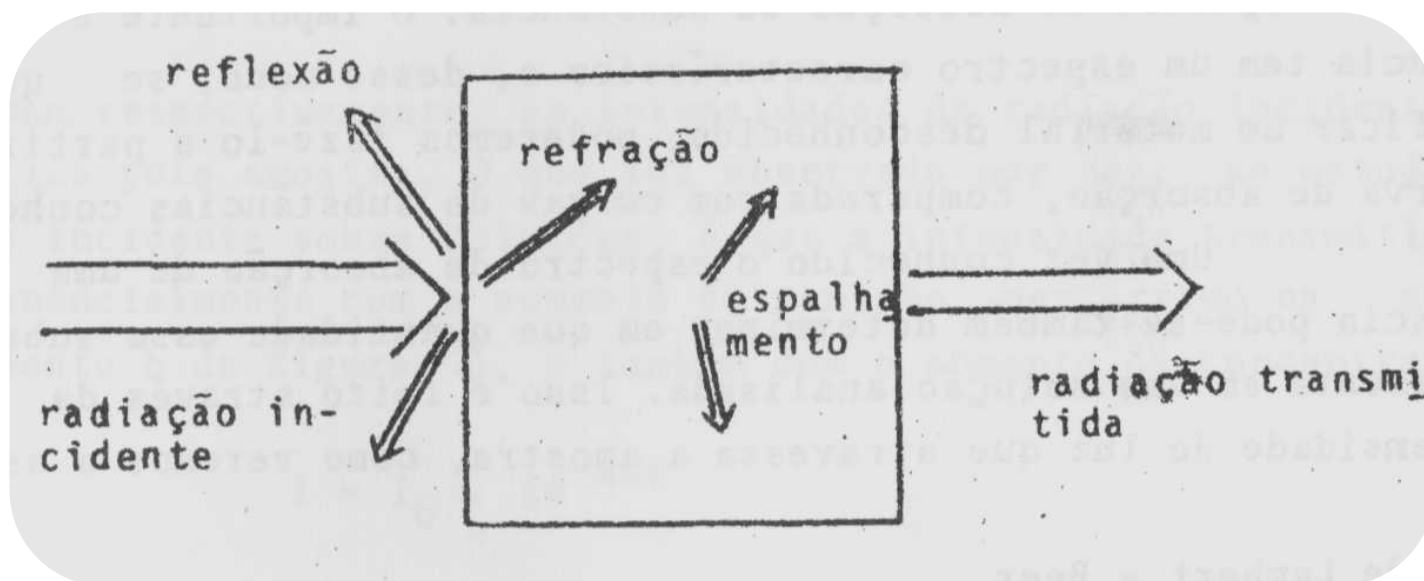
Cubetas

- Espectrofotometria de Luz Visível
 - Cubeta de Vidro ou Plástico
- Espectrofotometria de Luz Ultra- Violeta
 - Cubeta de Quartzo



Absorção de Radiação

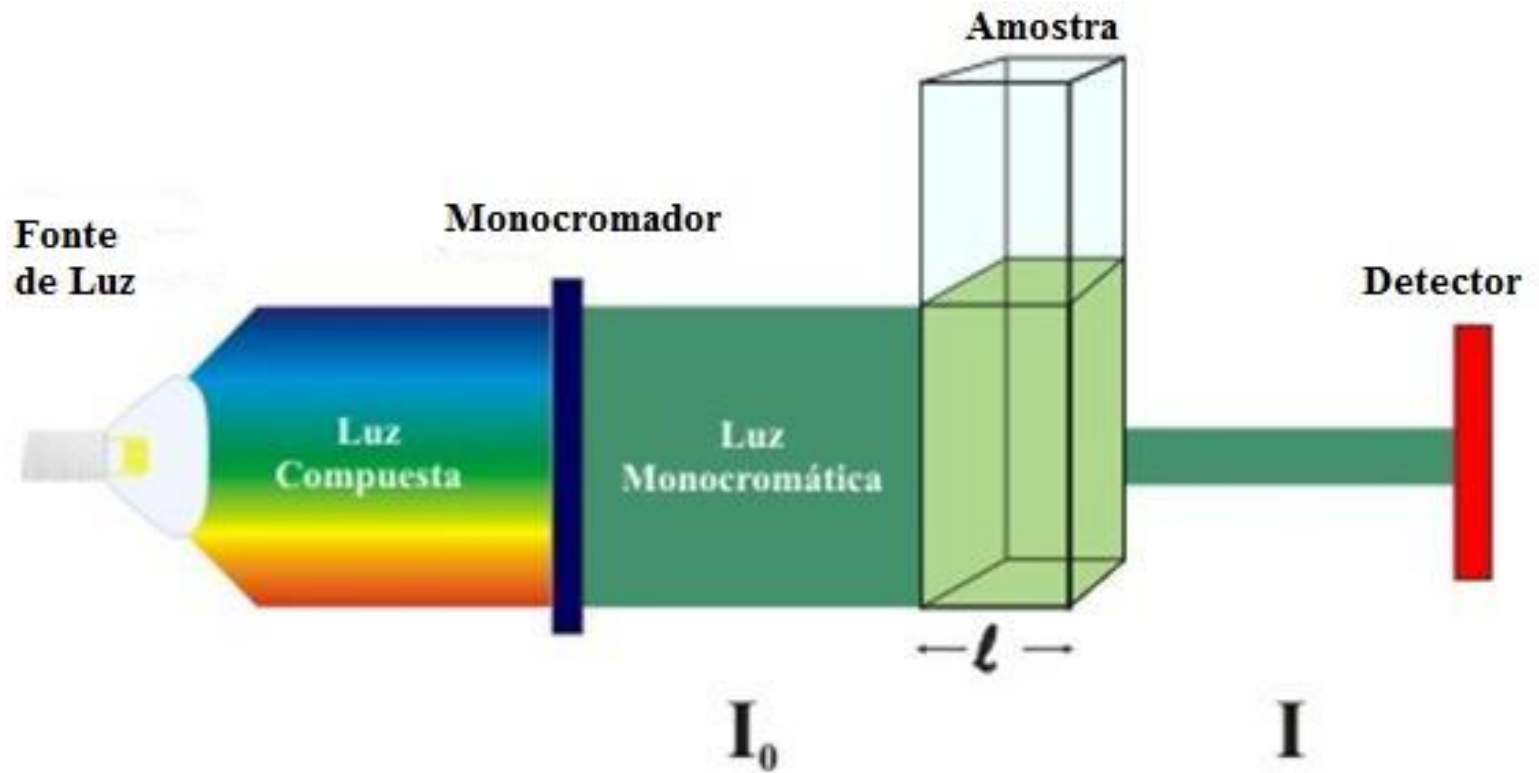
- Vários fenômenos podem ocorrer com a radiação luminosa, como: reflexão, refração, espalhamento ou ser absorvida pelo material.



Absorção de Radiação

- O comprimento de onda que uma certa substância absorverá a radiação luminosa é característico da sua estrutura, diferindo de substância para substância
- Ex:
 - DNA e RNA = 260 nm
 - Proteínas = 280 nm
 - Azul de metileno = 660 nm

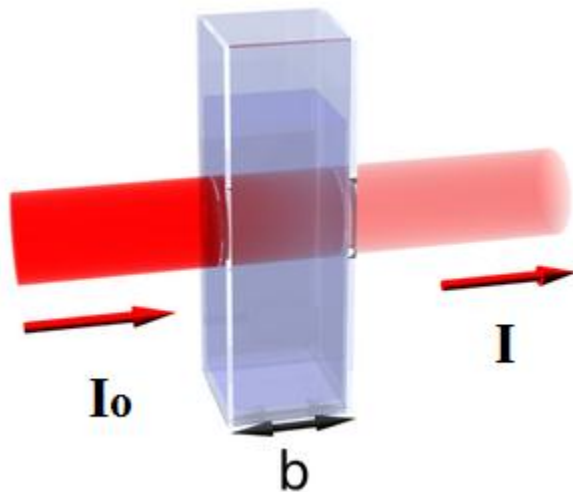
Absorção de Radiação



$$I_0 = I_a + I_t + I_r$$

Transmitância

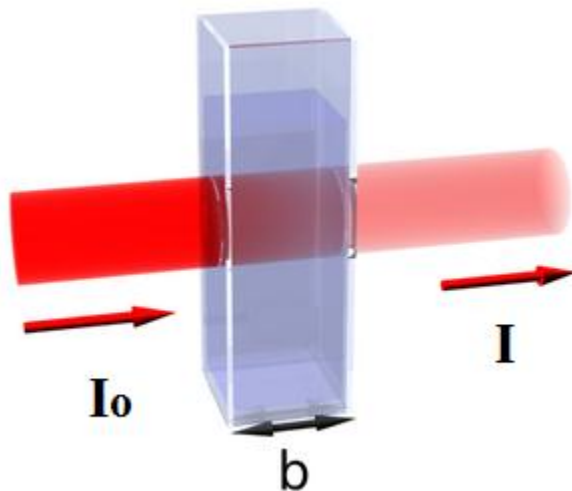
- Transmitância é a fração da luz incidente em um comprimento de onda específico, que atravessa uma amostra de matéria.



$$T = I / I_0$$

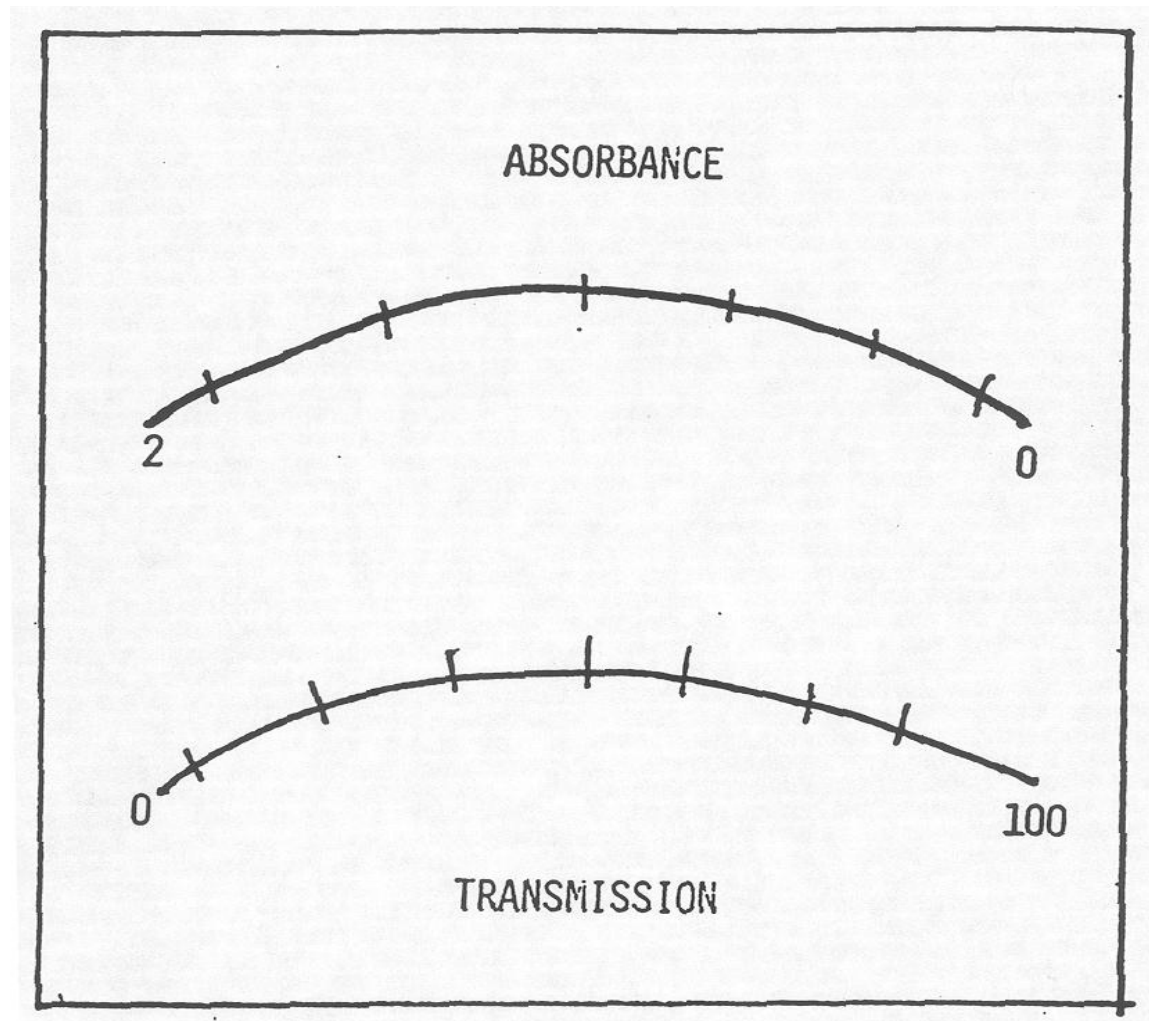
Absorvância

- É a fração da energia luminosa que é absorvida por um determinado material.



$$A = -\log_{10} T$$

Absorbância X Transmitância



Lei de Lambert-Beer

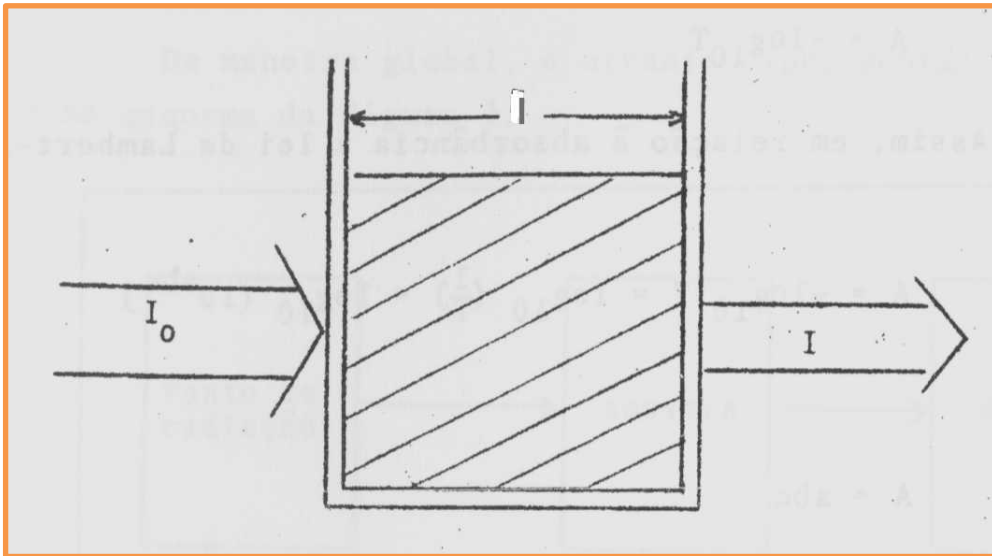
- ✓ A absorvância é proporcional à concentração da espécie química absorvente, sendo constantes o comprimento de onda, a espessura atravessada pelo feixe luminoso e demais fatores.

Lei de Lambert-Beer

- ✓ Por meio dessa lei, intensidades da radiação incidente e emergente podem ser relacionadas com as concentrações do material presente na solução.
- ✓ Efeitos de reflexão, refração e espalhamento não são considerados nessa lei.
- ✓ A radiação incidente deve ser monocromática

Lei de Lambert-Beer

- I_0 = intensidade da radiação incidente
- I = intensidade transmitida pela amostra
- l = comprimento



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

Lei de Lambert-Beer

- Transmitância:

$$T = I / I_0$$

- Na Lei de Lambert-Beer

$$T = 10^{-\epsilon lc}$$

Lei de Lambert-Beer

- Absorvância

$$A = -\log_{10} T$$

- Na Lei de Lambert-Beer

$$\begin{aligned} A &= -\log_{10} T = \log_{10} (1/T) = \log_{10} (1/10^{-\epsilon lc}) \\ &= \log_{10} 10^{\epsilon lc} = \epsilon lc \log_{10} 10 = \epsilon lc \end{aligned}$$

Lei de Lambert-Beer

Curva padrão

- ✓ Expressa a relação entre a Absorvância e a Concentração de soluto de uma determinada amostra;
- ✓ A Concentração de um soluto numa solução é diretamente proporcional a absorvância medida por um espectrofotômetro;
- ✓ Por meio da Curva Padrão podemos determinar a relação matemática (equação da reta)
- ✓ Com base na análise gráfica é possível verificar a linearidade da reação e calcular um fator de conversão de valores de absorvância em concentração.

Lei de Lambert-Beer

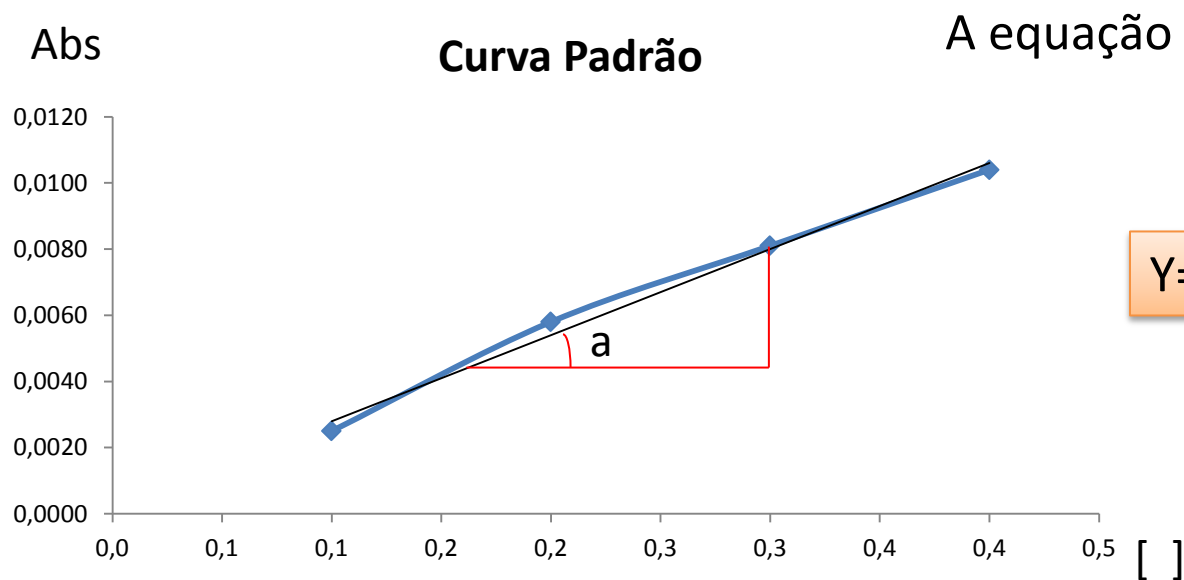
Curva padrão

✓ Inicialmente, verificamos no espectrofotômetro a absorvância (A) das soluções cujas concentrações sejam conhecidas:

X	Y
Concentração (M)	Absorvância (A)
0,1	0,0025
0,2	0,0058
0,3	0,0081
0,4	0,0104

Lei de Lambert-Beer

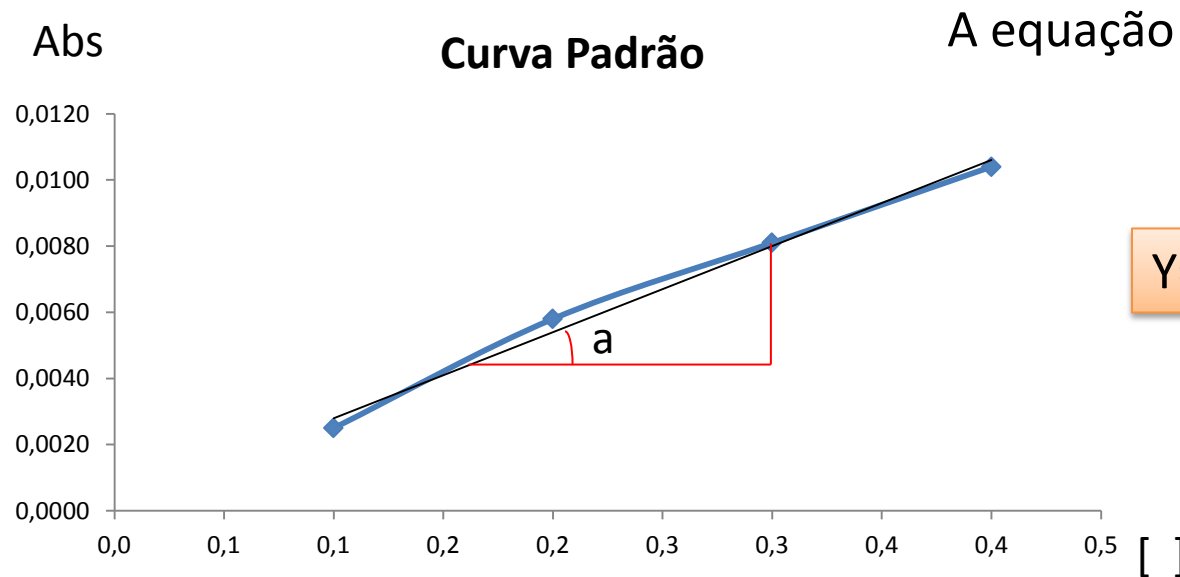
Curva padrão



✓ Com a curva padrão, obtendo o valor da absorvância por meio do espectrofotômetro podemos determinar a concentração do soluto a partir da equação da reta.

Lei de Lambert-Beer

Curva padrão



$$Y = a \cdot (x) + b$$

$$Y = 0,0026 \cdot (x) + 0,0002$$

$$a = \text{tg} = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

✓ A inclinação da reta (a) é portanto o coeficiente de extinção (ϵ) da Lei de Lambert-Beer.

$$\checkmark A = \epsilon \cdot l \cdot c$$