



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DISCIPLINA: BIOFÍSICA / PROFª BIANCA MENDES MACIEL

VII. ESPECTROFOTOMETRIA

NOME DOS COMPONENTES:

DATA: ____/____/____

OBJETIVOS:

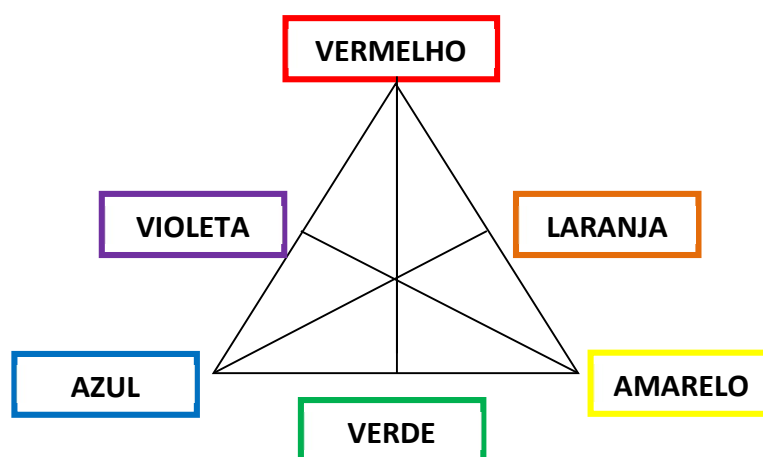
- Familiarizar o estudante com a técnica analítica de espectrofotometria e suas aplicações;
- Determinar o espectro de absorção de uma substância;
- Produzir um gráfico de curva padrão para determinar a concentração de uma amostra desconhecida.

CONSIDERAÇÕES:

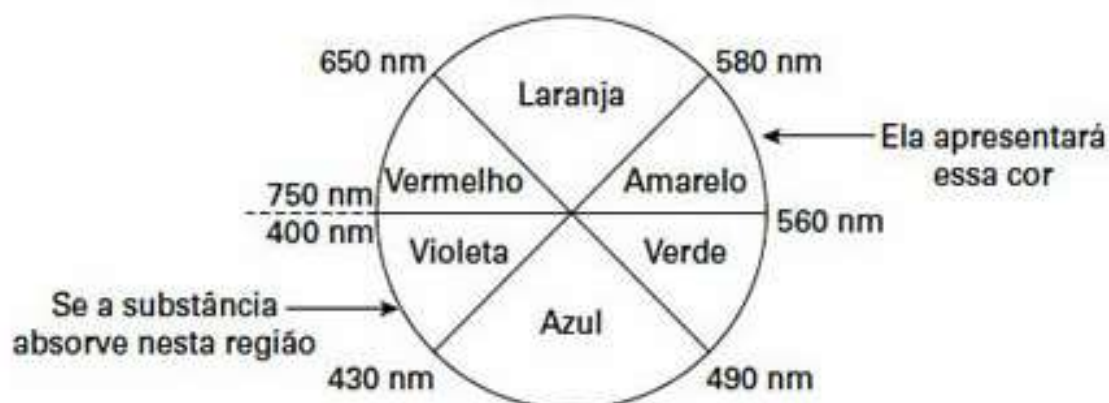
➤ **COLORIMETRIA**

- Compreende os métodos analíticos que se baseiam na medição da quantidade de luz absorvida por uma solução.
- Uma solução colorida apresenta máxima absorção de luz para a sua cor complementar. Assim, a cor da solução é determinada pela cor da luz transmitida.

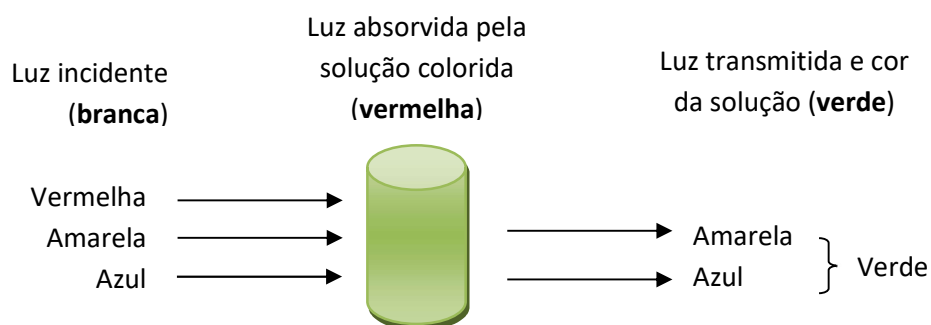
- TRIÂNGULO DE CORES -



- 1) Vértices = cores primárias (vermelho, azul e amarelo);
- 2) Laterais = cores secundárias (verde, violeta e laranja);
- 3) Medianas = cores complementares



FONTE: ENEM 2011



RELAÇÃO ENTRE O COMPRIMENTO DE ONDA, A COR ABSORVIDA E A COR COMPLEMENTAR

Comprimento de onda	Cor absorvida	Cor complementar
Abaixo de 380	Ultravioleta	
380 a 435	Violeta	Verde-amarelado
435 a 480	Azul	Amarelo
480 a 490	Azul-esverdeado	Alaranjado
490 a 500	Verde-azulado	Vermelho
500 a 560	Verde	Púrpura
560 a 580	Verde-amarelado	Violeta
580 a 595	Amarelo	Azul
595 a 650	Alaranjado	Azul-esverdeado
650 a 780	Vermelho	Verde-azulado
Acima de 780	Infravermelho	

FONTE: http://www.ufrgs.br/leo/site_espec/naturezadacor.html

- À medida que a concentração de um corante aumenta, a quantidade de luz que atravessa a solução diminui, indicando maior absorção. Ou seja, a

intensidade da cor de uma solução é proporcional à concentração das moléculas absorventes de luz.

- **LEI DE LAMBERT-BEER:** “A intensidade da energia radiante absorvida por uma solução varia exponencialmente com a concentração e com a espessura do meio atravessado”.

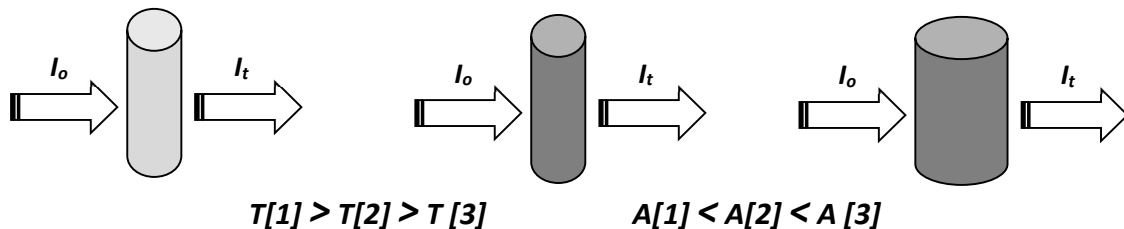
$$T \text{ (Transmitância)} = I_t / I_o$$

$$A \text{ (Absorbância)} = -\log T$$

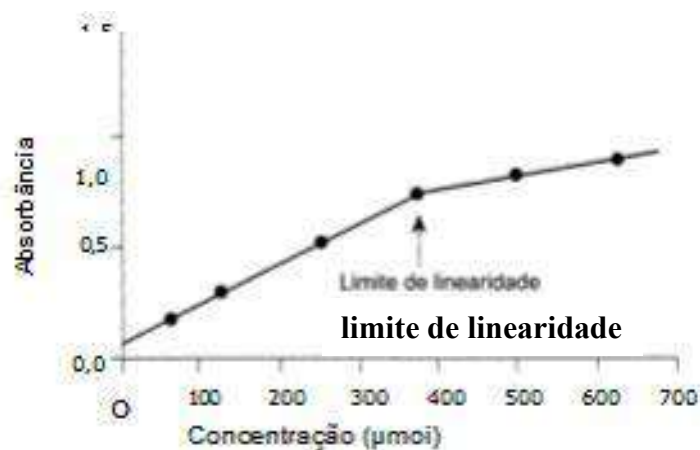
T – Transmitância (mede a intensidade de luz transmitida em relação ao que foi projetado);

I_t - intensidade de luz transmitida; I_o - intensidade de luz incidente

A – Absorbância (mede a quantidade de luz absorvida, é o inverso da transmitância)



Desvios da lei de Lambert-Beer: Para concentrações superiores ao limite de linearidade (limite de concentração para a qual a lei de Lambert-Beer é válida), a proporcionalidade linear entre concentração e absorbância deixa de existir. Ocorre quando a solução é muito concentrada, necessitando, portanto, a diluição da amostra para determinação de sua absorbância.

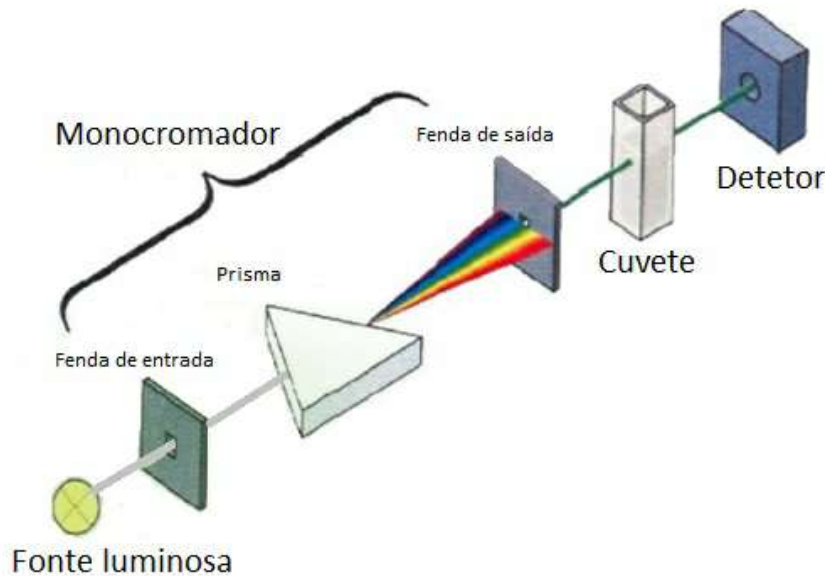


FONTE: Compri-Nardi et al., 2013

➤ **ESPECTROFOTÔMETRO**

- Instrumento utilizado para determinar os valores de transmitância (luz transmitida) e absorbância (luz absorvida) de uma solução em um ou mais comprimento de onda.

FUNCIONAMENTO DE UM ESPECTROFOTÔMETRO



FONTE: <http://quimicanastaipas.wordpress.com>

- A sensibilidade do método depende da escolha do melhor comprimento de onda eletromagnética para leitura, que deve ser determinado pela curva de espectro de absorção.
- A curva de espectro de absorção determina a faixa de melhor comprimento de onda para a leitura espectrofotométrica de uma determinada solução, onde há maior absorbância e menor transmitância.
- Para quantificação de amostras desconhecidas, é necessário estabelecer, inicialmente, uma “curva padrão” (ou “curva de calibração”), que corresponde à relação gráfica entre os valores de absorbância e os valores das concentrações conhecidas de uma determinada solução.
- **Curva padrão**: realizada a partir da determinação das absorbâncias de, pelo menos, cinco diluições de uma solução conhecida (5 padrões). Prepara-se um gráfico da concentração (eixo x) *versus* absorbância (eixo y). A concentração da amostra desconhecida pode, então, ser determinada neste gráfico e através de uma equação de regressão.

MATERIAL

I. Equipamentos:

- Espectrofotômetro com cubetas

II. Vidrarias e utensílios:

- Frasco de vidro âmbar de 1L
- Becker de 100 mL
- Tubos de ensaio de 15 mL (de vidro)

- Pipetas graduadas (de 5 ou 10 mL)
- Canetas para marcação em vidro
- Estantes para tubo de ensaio
- Pipetadores (ou peras)
- Micropipeta de 1000 μL
- Ponteiras
- Papel toalha

III. Reagentes:

- KMnO_4
- Água destilada (1L)

PROCEDIMENTO:

1. Preparar uma solução de KMnO_4 a 0,1 g/L (solução estoque). Armazená-la em frasco âmbar.
2. Zerar o aparelho com o tubo branco (água destilada);
3. Realizar as leituras espectrofotométricas em cada comprimento de onda, conforme tabela 1 e determinar o melhor comprimento de onda;

Tabela 1: Determinação do melhor comprimento de onda para leitura espectrofotométrica do KMnO_4

λ (nm)	A	T
400		
420		
440		
460		
480		
500		
520		
540		
560		
580		
600		
620		
640		
660		
680		
700		

4. Dilua a solução estoque conforme indicado na tabela 2;
5. Determine a concentração (g/L) de cada diluição e realize a leitura espectrofotométrica (valores de absorbância), de acordo com a determinação do melhor comprimento de onda.

TUBOS	SOL. ESTOQUE KMnO ₄ 0,1 g/L	ÁGUA DESTILADA (mL)	CONCENTRAÇÃO (g/L)	ABSORBÂNCIA (= _____ nm)
1	1mL	9		
2	2mL	8		
3	3mL	7		
4	4mL	6		
5	5mL	5		
Solução X	-	-	?	
Branco	-	10	-	Zerar

EXERCÍCIOS:

1) Elabore uma curva (no Excel) determinando o espectro de absorção da solução de permanganato de potássio (cole abaixo):

2) Qual a importância da determinação do espectro de absorção?

3) Elabore uma curva padrão a partir das diluições da solução estoque e determine a concentração da solução desconhecida (solução X):

