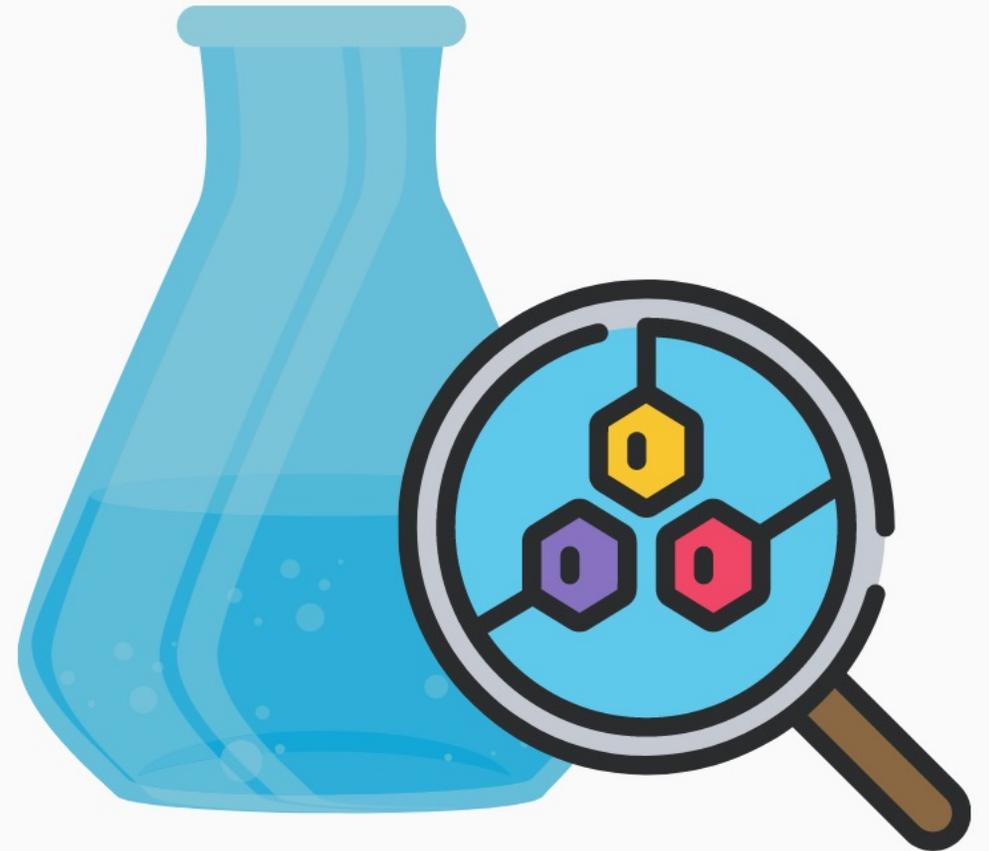


# Análise Instrumental



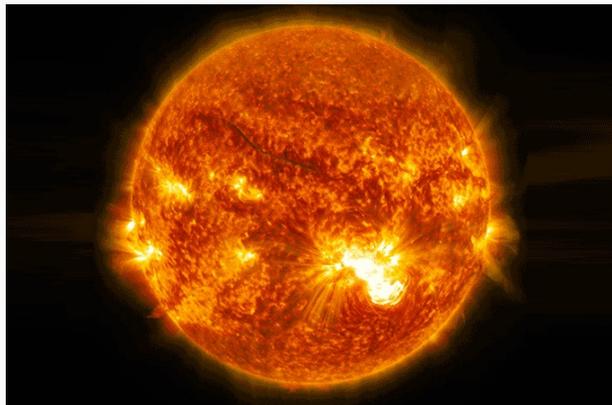
**Profa. Talita M. Lacerda**

- Departamento de Biotecnologia
- Escola de Engenharia de Lorena
- Universidade de São Paulo
- talitalacerda@usp.br
- 13 de setembro de 2021



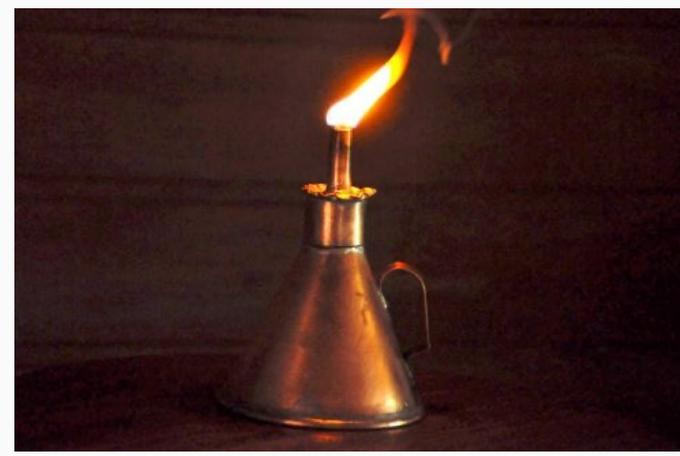
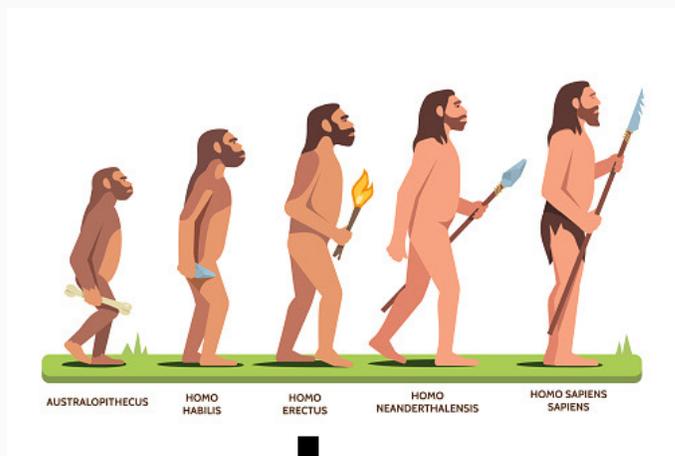


# LUZ



**Sol, Lua e estrelas:**  
únicas “fontes” de  
luz conhecidas

Surgimento do  
fogo: formas “não  
naturais”  
começam a ser  
usadas

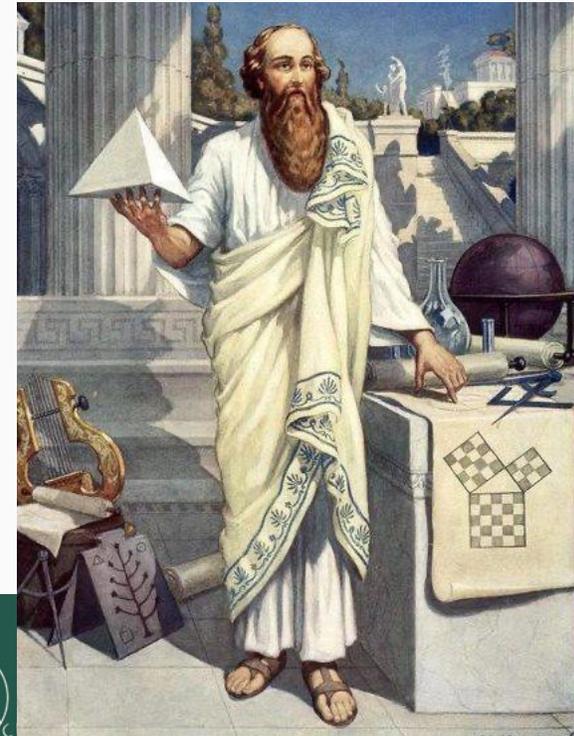
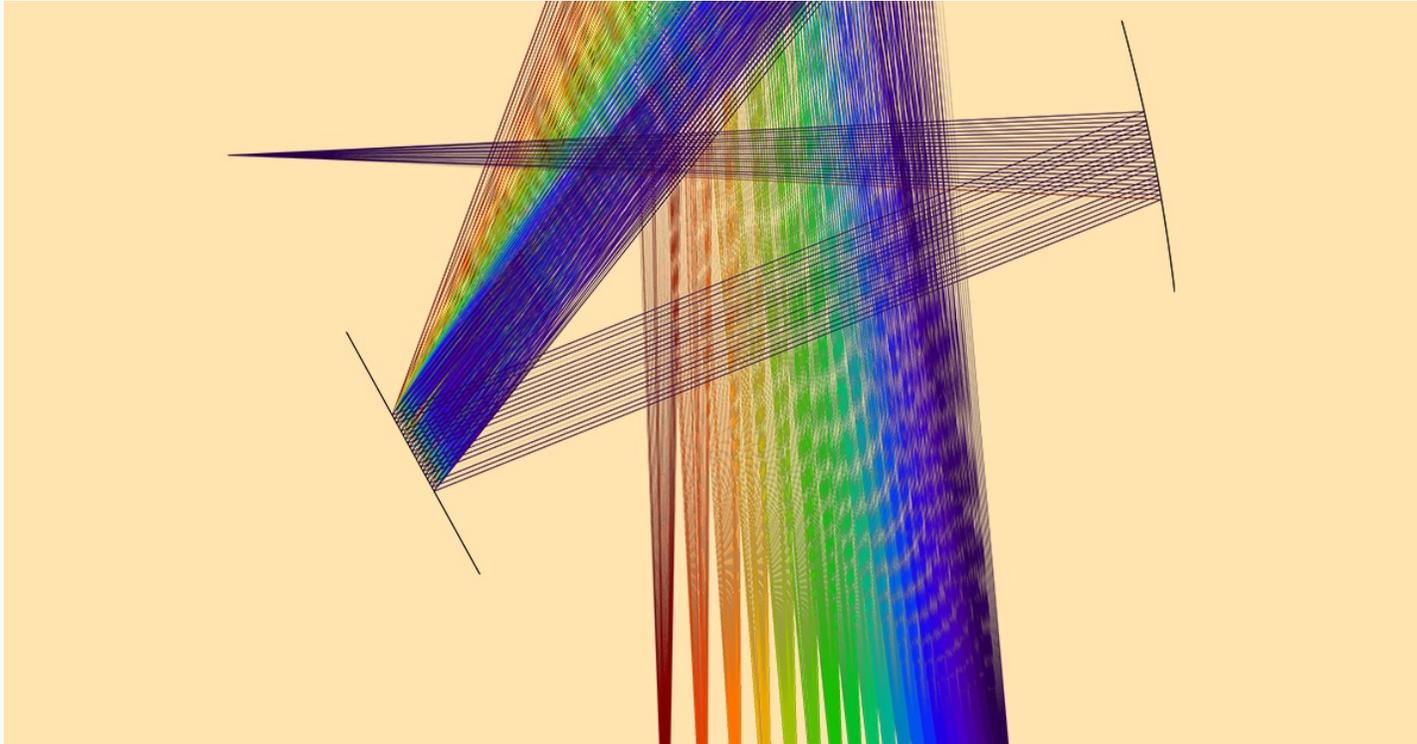


↳ 2.000.000 – 400.000 anos atrás



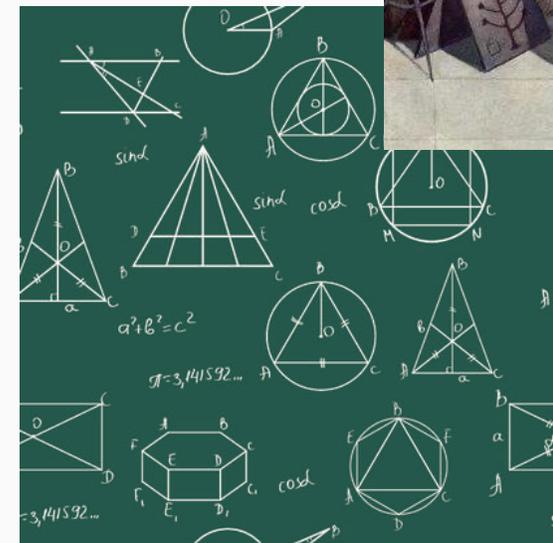
# LUZ

Ótica geométrica: luz se desloca segundo linhas retas



Pitágoras

★582aC - † 497aC



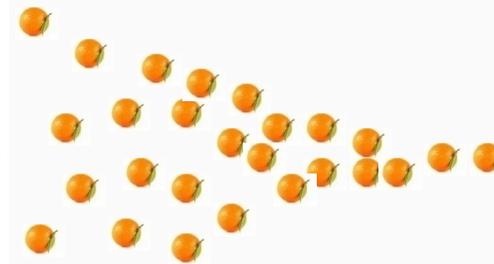
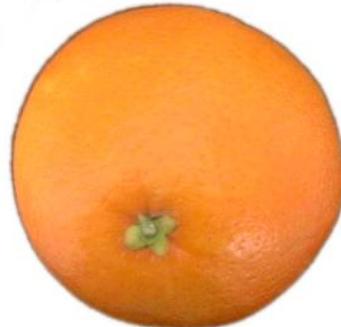


# LUZ



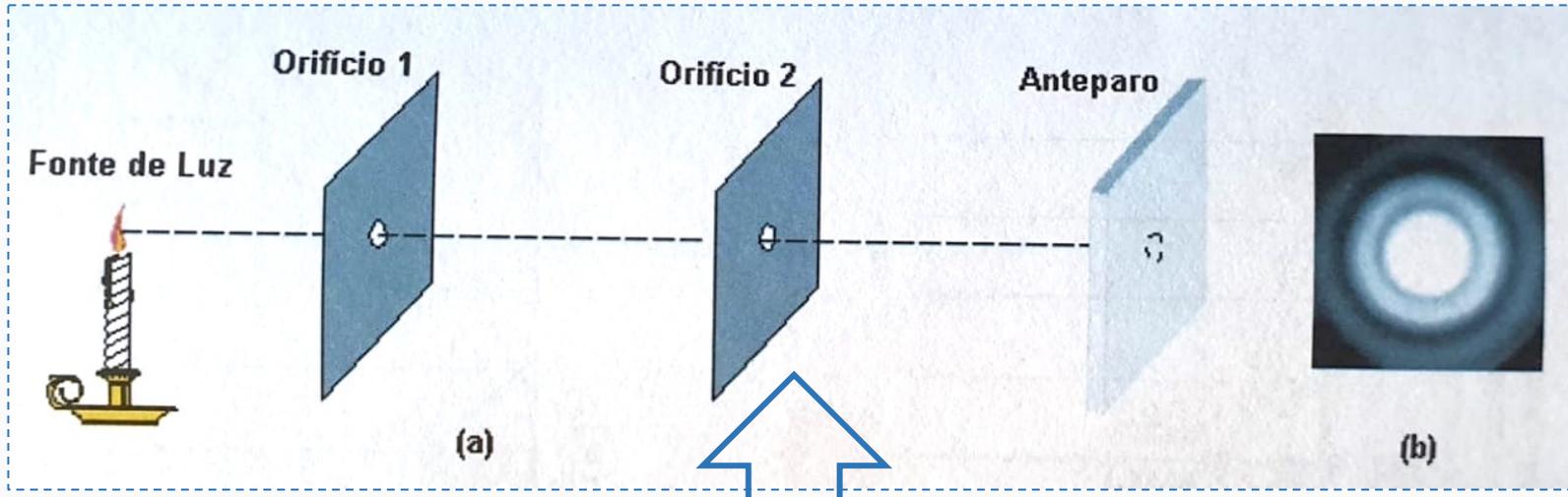
**Platão, modelo do *raio visual*:** a visão era devida ao encontro de “raios emitidos” pelos olhos e daqueles emitidos por corpos luminosos

**Filósofos gregos:** emissão de corpúsculos ou de vibrações a partir de um objeto iluminado por uma fonte de luz própria.





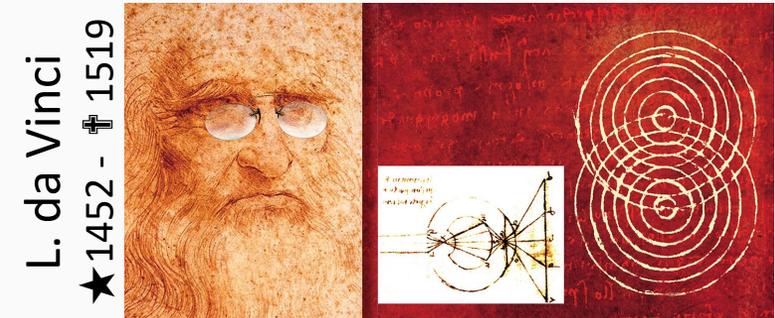
# LUZ



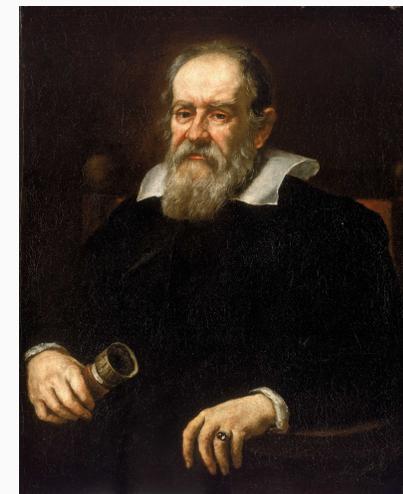
(a) Montagem experimental para observação da imagem do orifício 2. Este orifício, cuja imagem é projetada sobre um anteparo, é iluminado por uma fonte pontual de luz construída a partir de uma fonte de luz extensa e do orifício 1.



05/10/2021



telescópio refrator



Galileu Galilei  
★1564 - †1642



# LUZ



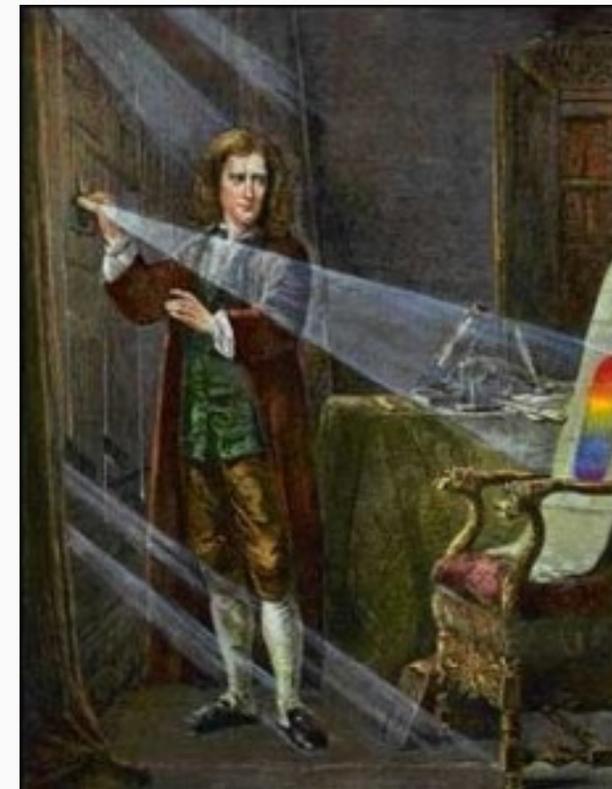
Christiaan Huygens

★1629 - † 1695

**1678:**  
interpretava a  
luz em  
termos de  
ondas  
longitudinais

**~1650:** luz  
composta por  
partículas  
pequenas que não  
poderiam ser  
vistas em sua  
unidade  
(**corpúsculos de  
luz**)

*spectrum* (imagem); -  
*copio* (observar)



Isaac Newton

★1642 - † 1727



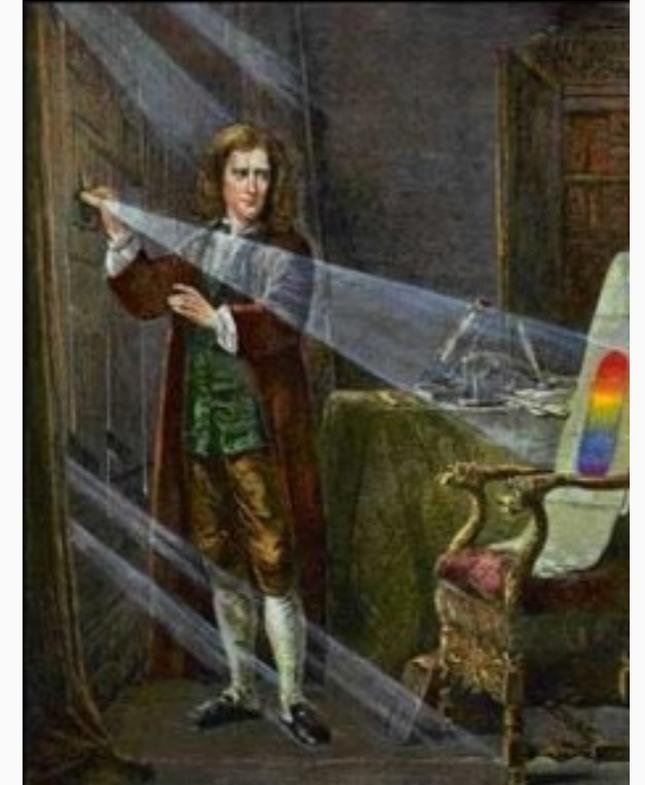
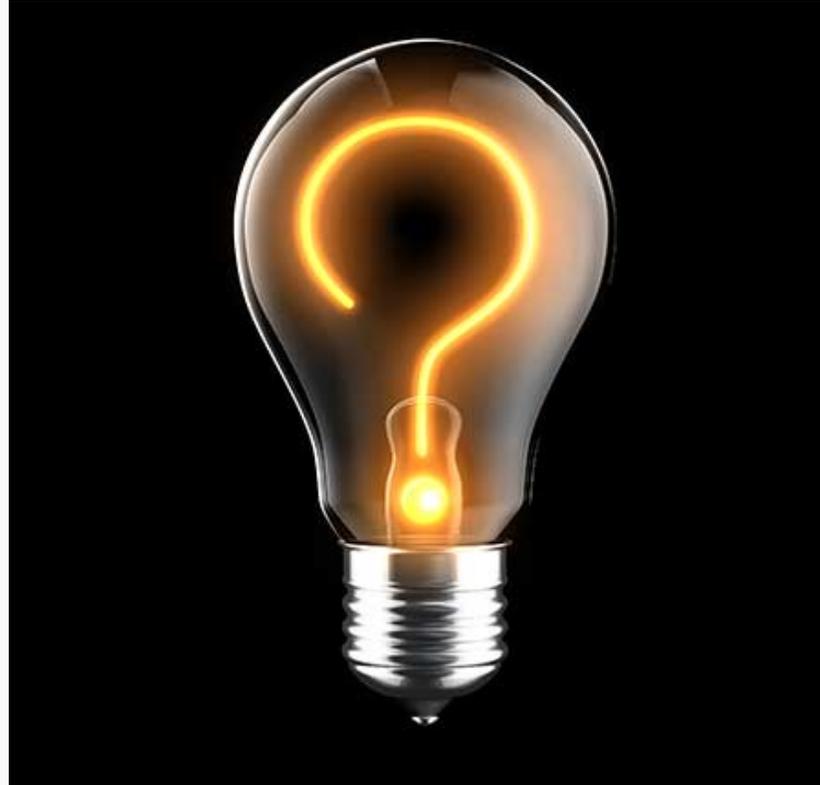


# LUZ

*spectrum* (imagem); -  
*copio* (observar)



Christiaan Huygens  
★1629 - † 1695



Isaac Newton  
★1642 - † 1727





# LUZ

## A teoria ondulatória

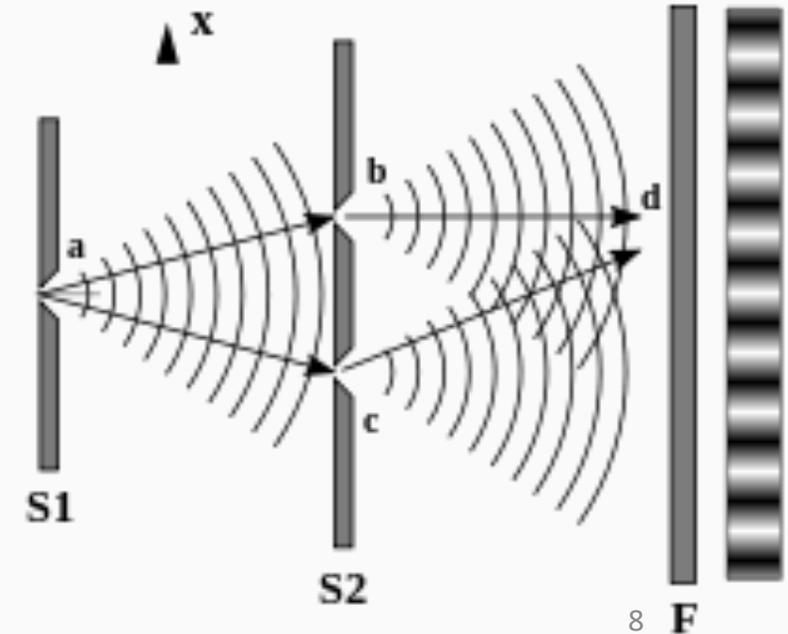
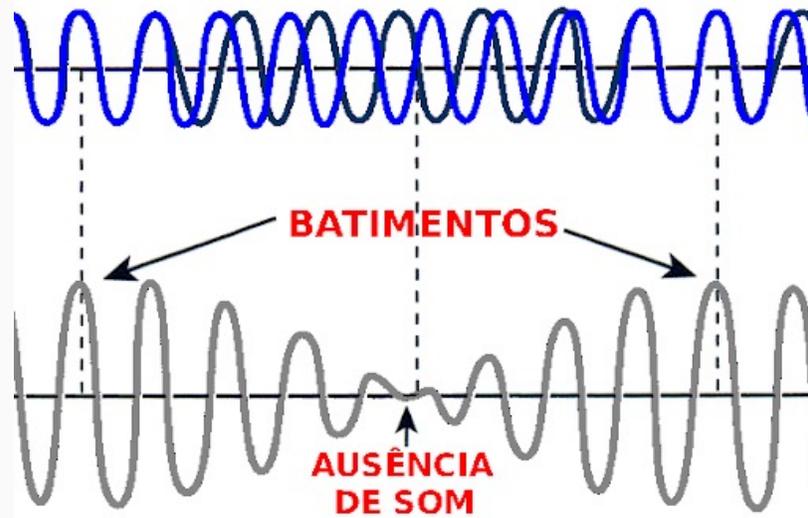


Thomas  
★1773



Augustin J. Fresnel  
★1788 - † 1827

**1803, hipótese:** Poderiam duas ondas luminosas adicionarem-se para produzir a escuridão? *Se fossem compostas de partículas a resposta seria não. Por outro lado, se tivessem uma natureza ondulatória, a resposta seria sim.*

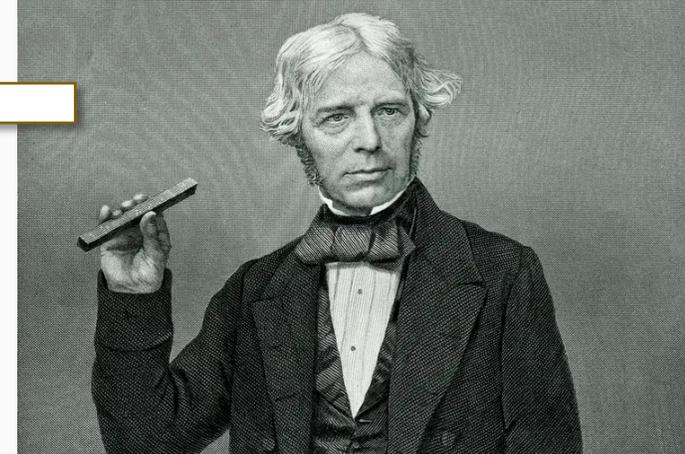
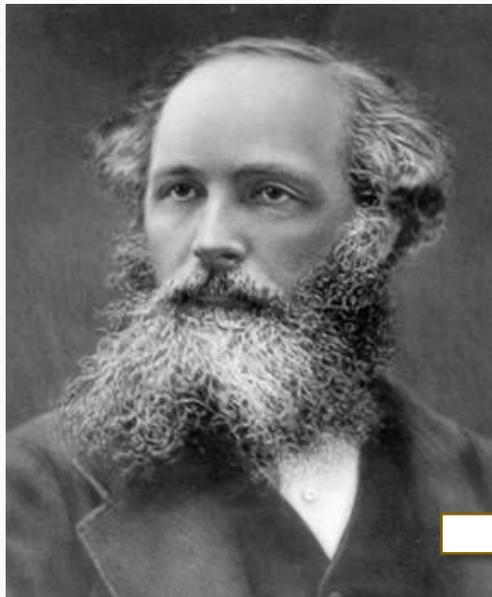


# LUZ

**1845:** Observou que o campo magnético podia rodar a polarização de ondas luminosas ao passarem por uma região magnetizada

James C. Maxwell

★1831 - † 1879



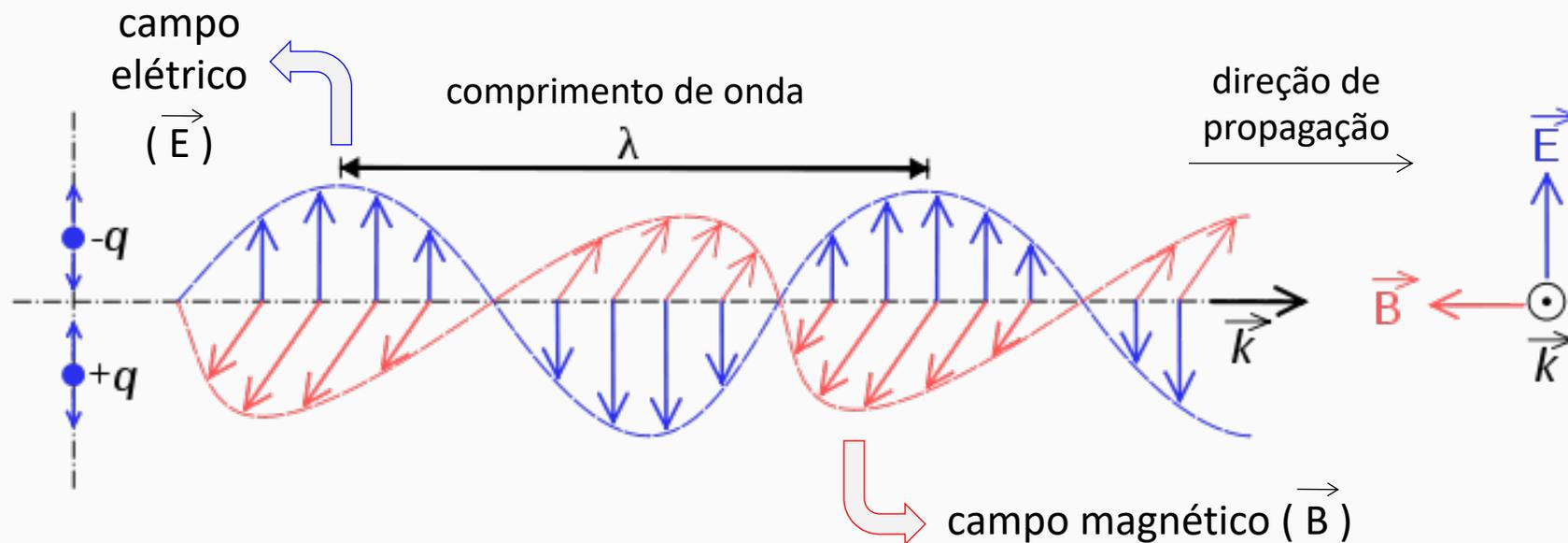
Michael Faraday

★1791 - † 1867

**1864:** Formulação matemática que identificava a luz como “uma perturbação eletromagnética na forma de ondas se propagando por meio do campo eletromagnético de acordo com as leis do eletromagnetismo”.



# LUZ

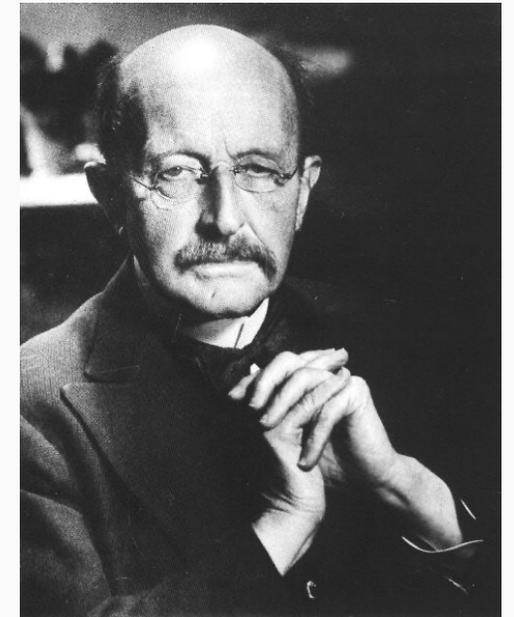
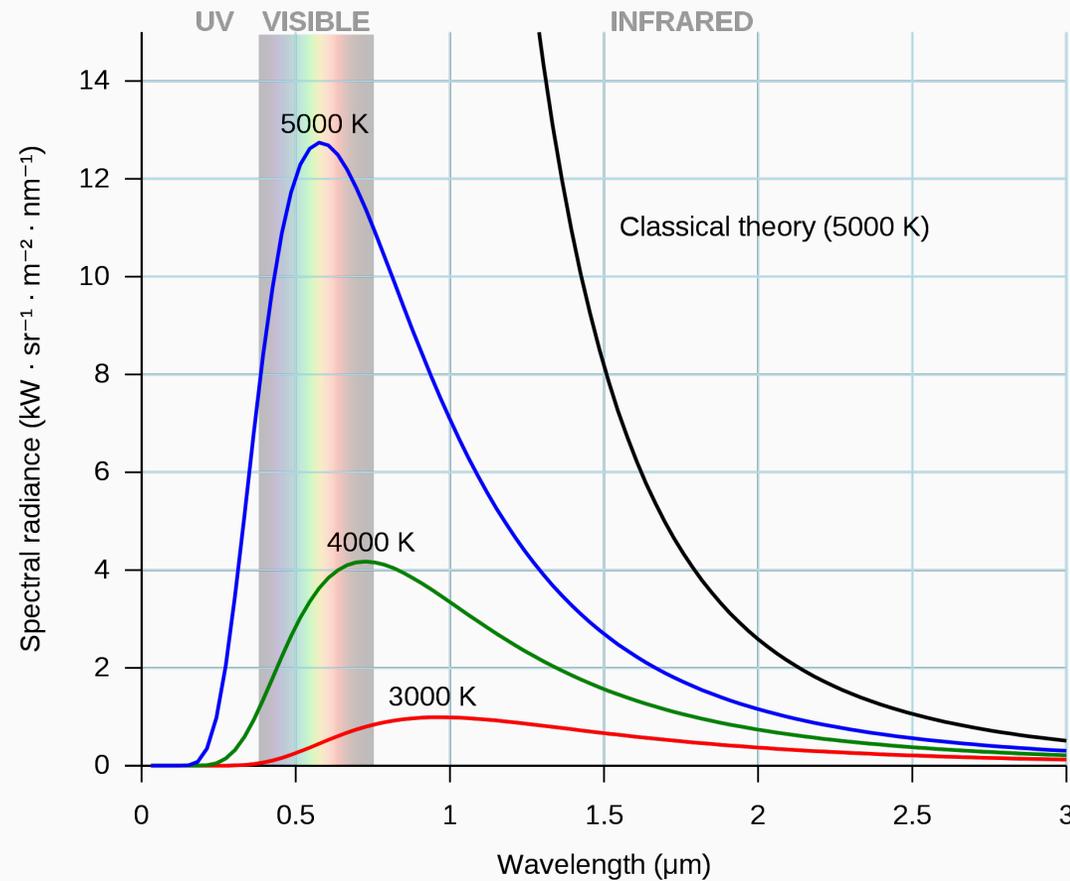
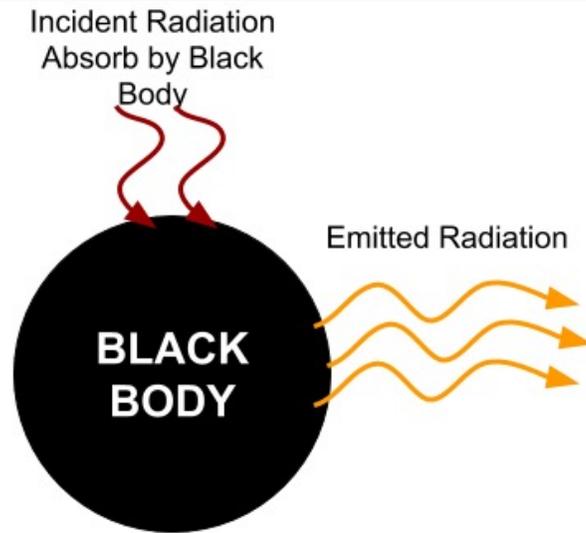


○  
○  
●

**A PROPAGAÇÃO DE UMA ONDA ELETROMAGNÉTICA ENVOLVE TANTO O CAMPO ELÉTRICO QUANTO O CAMPO MAGNÉTICO!**



# CATÁSTROFE DO ULTRAVIOLETA



Max Planck  
★1858 - †1947

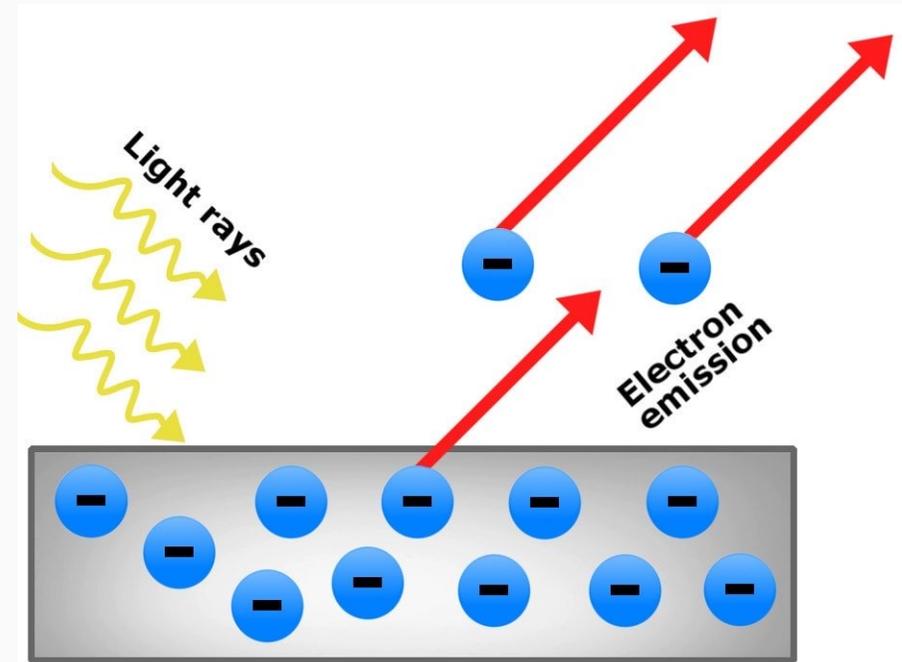
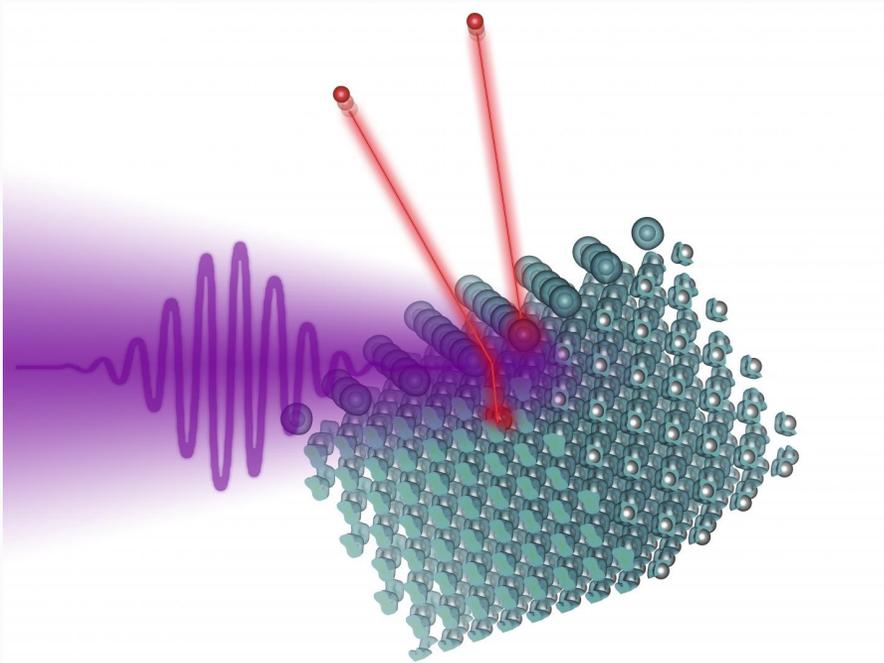




# EFEITO FOTOELÉTRICO

**LUZ = ONDA:**

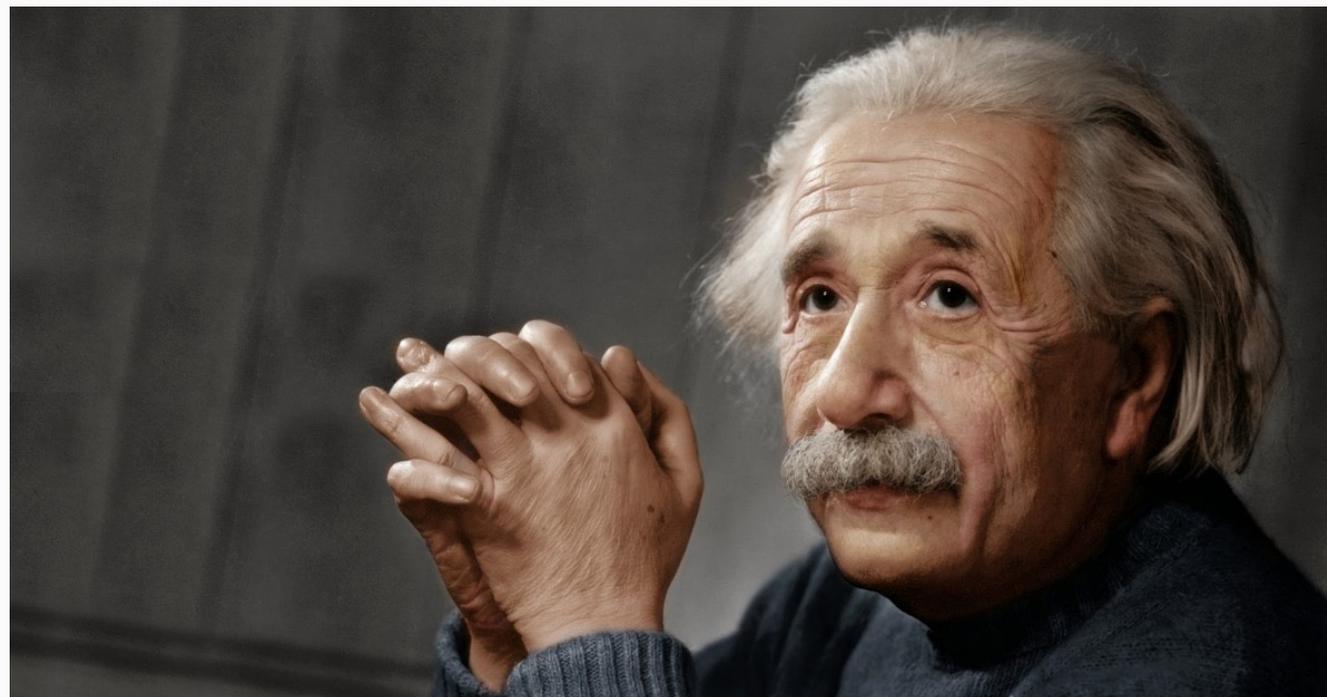
não explica o chamado “efeito fotoelétrico”





# EFEITO FOTOELÉTRICO

Em 10 de novembro de 1922, **Einstein** foi agraciado com o Prêmio **Nobel** de Física de 1921 "por suas contribuições à física teórica e, especialmente, por sua descoberta da lei do efeito fotoelétrico".



Albert Einstein

★1879 - † 1955



# DUALIDADE ONDA-PARTÍCULA



Muitas propriedades são descritas pelo *modelo clássico de onda senoidal...*

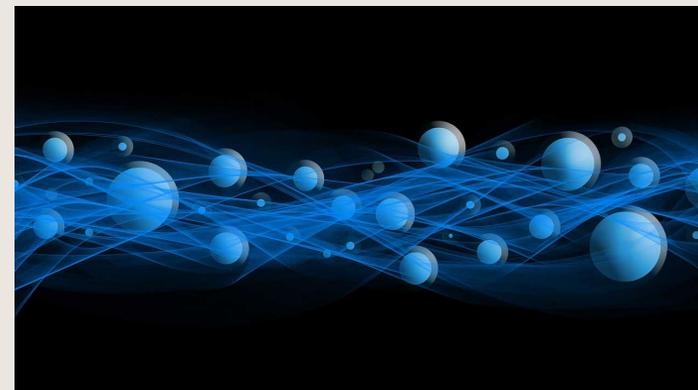
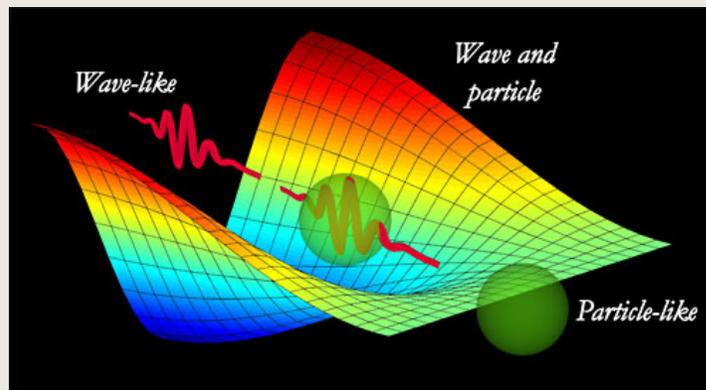
...mas

*Modelo não considera fenômenos associados com absorção e emissão de energia radiante → modelo de partícula*

[shorturl.at/cqLNT](https://shorturl.at/cqLNT)

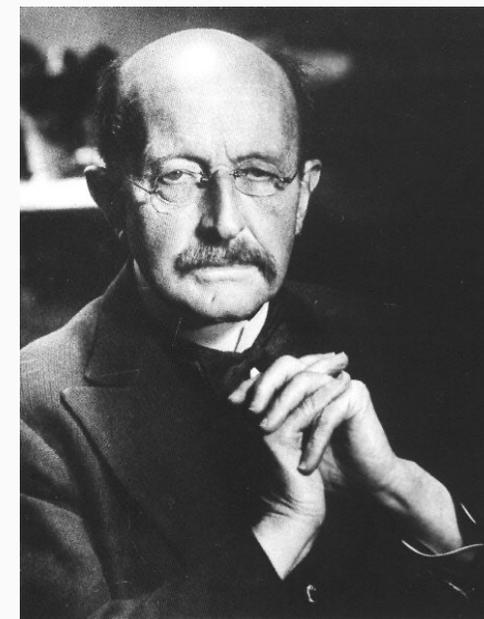
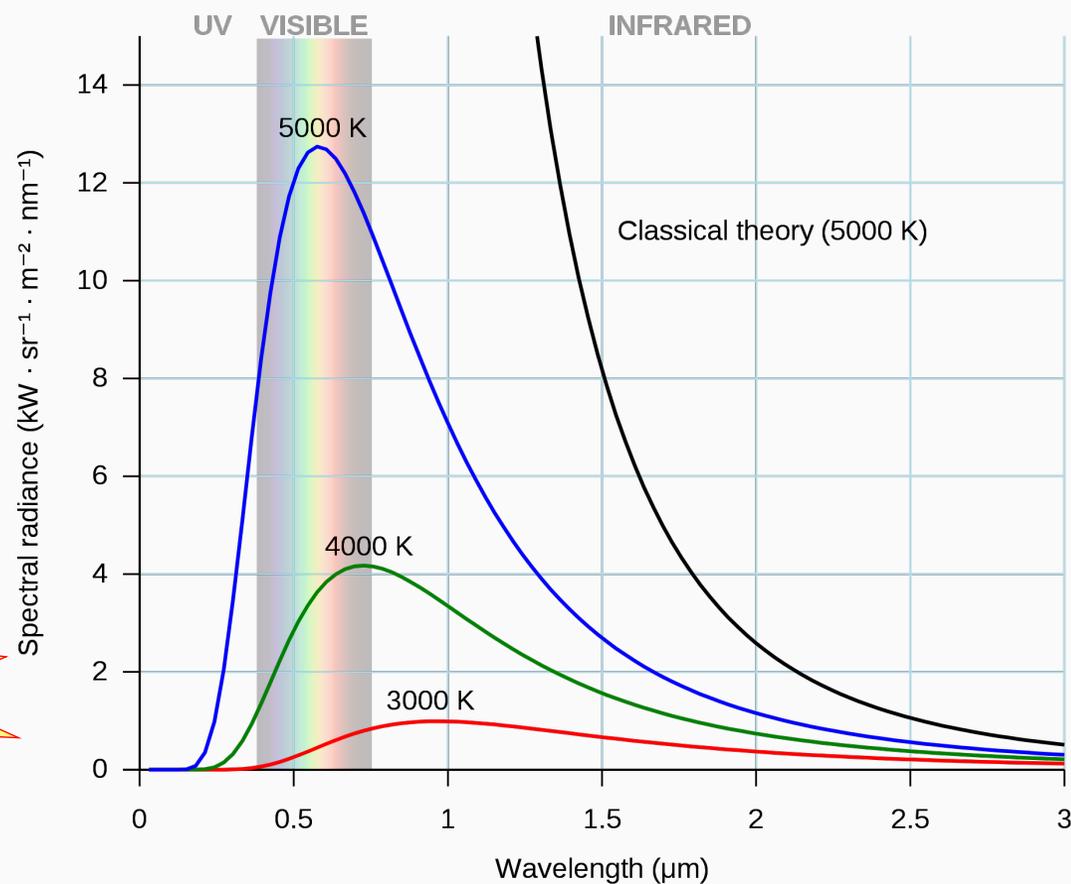
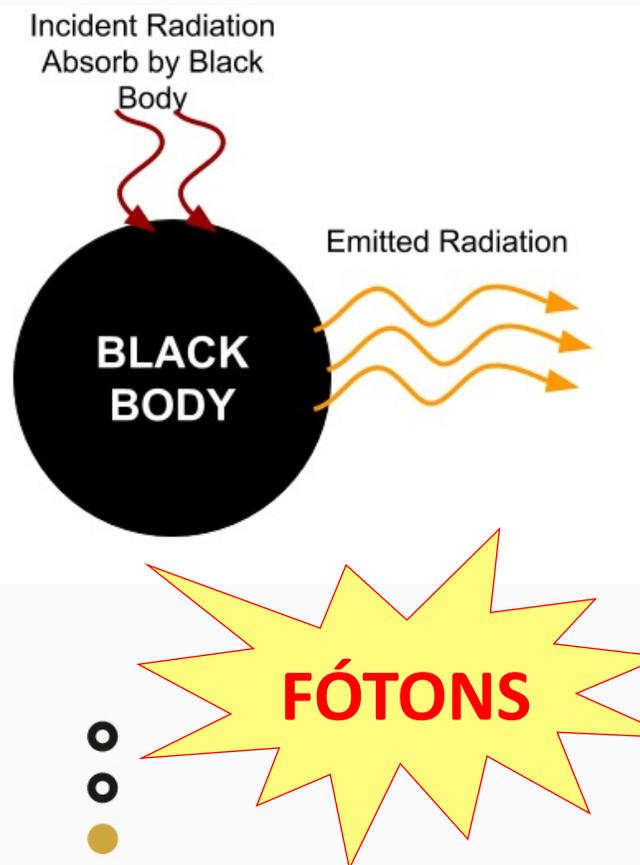
## FEIXE DE PARTÍCULAS

(“pacotes” de energia/fótons) em que a energia é proporcional à frequência da radiação





# CATÁSTROFE DO ULTRAVIOLETA



Max Planck  
★1858 - †1947

$$E = h \cdot \nu$$

$$h = 6,63 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$$

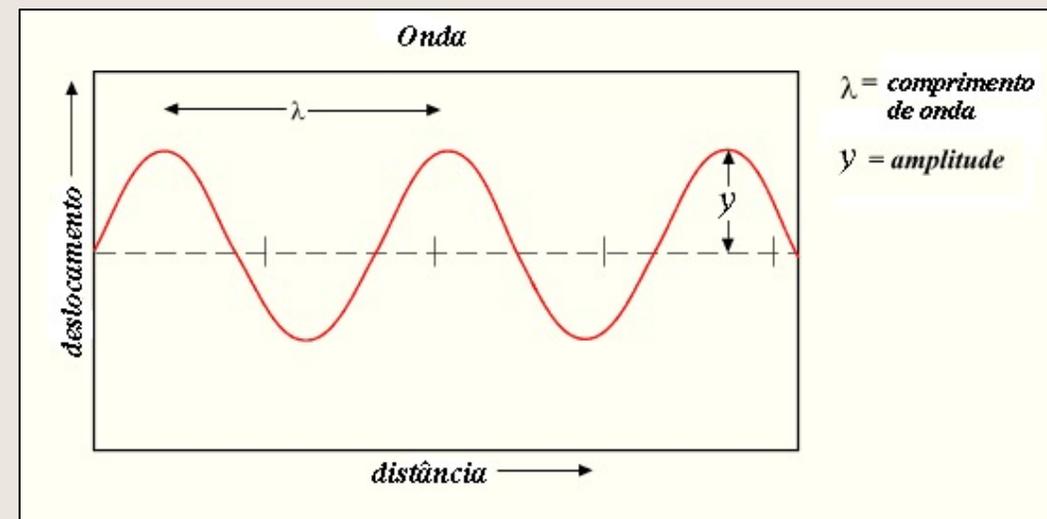
# DUALIDADE ONDA-PARTÍCULA



**Luz visível + outras frequências:** formas de energia

**Frequência:** número de ciclos por unidade de tempo (*quanto maior a frequência maior a energia armazenada na onda e menor o comprimento de onda*)

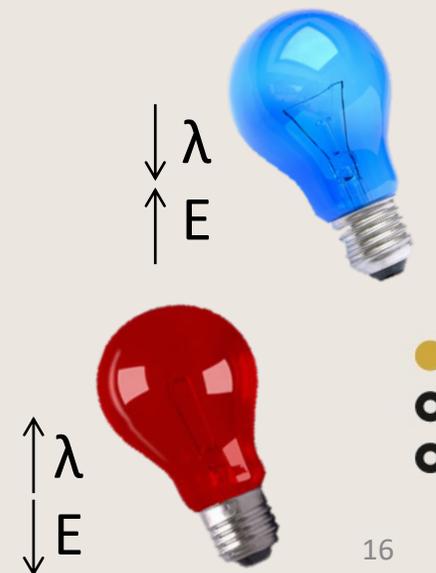
$$F = \frac{n}{\Delta t}$$



$$E = \frac{h.c}{\lambda} = h.c.\bar{\nu}$$

$$\left( \bar{\nu} = \text{número de onda} = \frac{1}{\lambda} \right)$$

A energia é **inversamente proporcional** ao comprimento de onda e **diretamente proporcional** ao número de onda





# ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO

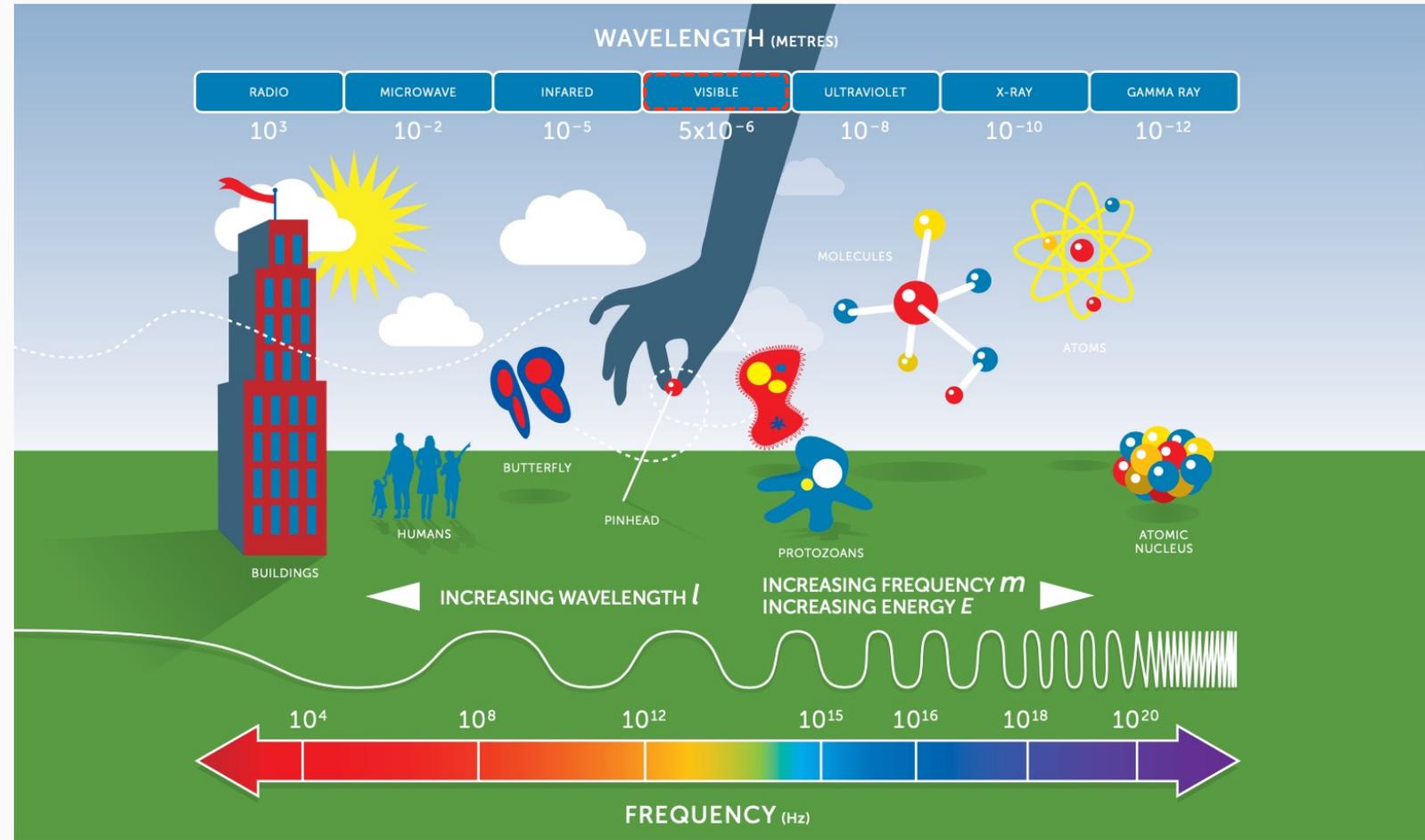
PROPRIEDADES  
ONDULATÓRIAS



PROPRIEDADES  
MECÂNICO-QUÂNTICAS



05/10/2021



\*espectro visível: sensibiliza a retina

**$4,5 \cdot 10^{14}$  Hz** (vermelho) a  
 **$7,5 \cdot 10^{14}$  Hz** (violeta)

# MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS

MÉTODOS ANALÍTICOS BASEADOS NA  
ESPECTROSCOPIA ATÔMICA OU MOLECULAR

## **Interação**

entre a energia  
eletromagnética  
e a matéria

## **Fenômenos possíveis**

Absorção, emissão,  
fotodecomposição,  
reflexão, aquecimento...





# ESPECTROSCOPIA vs. ESPECTROMETRIA

É a **ciência** que estuda a interação entre a matéria e a energia radiante

É o método usado para adquirir uma medida quantitativa (= um espectro)

?

Não gera resultados! É a abordagem teórica da ciência.

É a **aplicação prática**, em que os resultados são gerados.





# ESPECTROSCOPIA

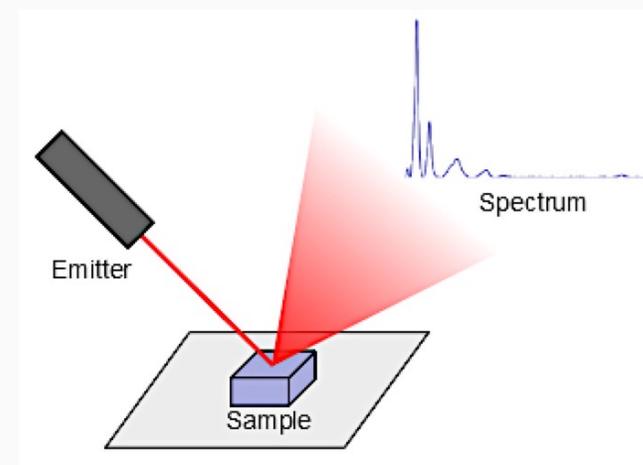
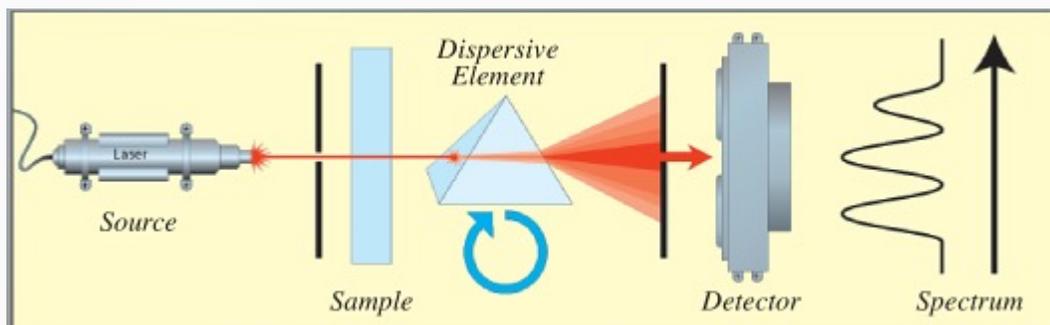
Interações entre:

**radiações  
eletromagnéticas**  
(luz visível, calor radiante,  
raios gama, raios X,  
radiações UV, microondas  
e rádiofrequência)

**ondas acústicas**

**feixes de partículas**  
(íons e elétrons)

## E A MATÉRIA





# TEORIA QUÂNTICA

Átomos, íons e moléculas podem existir somente em certos **estados discretos**, caracterizados por **quantidades definidas de energia**. Quando uma espécie altera seu estado, absorve ou emite uma quantidade de energia exatamente igual à diferença de energia entre os estados.

Quando átomos, íons e moléculas absorvem ou emitem radiação ao efetuar uma transição de um estado de energia para outro, a radiação de frequência  $\nu$  ou de comprimento de onda  $\lambda$  está relacionada com a diferença de energia entre os dois estados pela **equação**:

$$E_1 - E_0 = h.\nu = hc/\lambda$$





# TEORIA QUÂNTICA

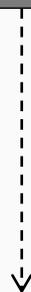
## ESTADOS ENERGÉTICOS DAS ESPÉCIES QUÍMICAS

estados eletrônicos



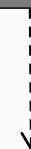
**movimento dos  
elétrons em torno do  
núcleo positivamente  
carregado**

estados vibracionais



**energia das vibrações  
interatômicas**

estados rotacionais



**rotação das  
moléculas em torno  
de seu centro de  
gravidade**



**Estado de menor energia:** estado fundamental

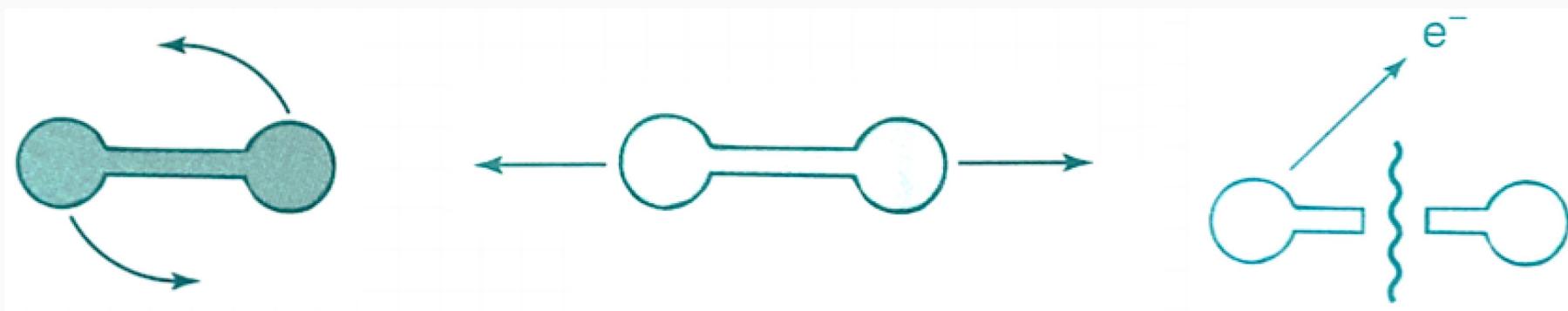
**Estados de energia mais altos:** estados excitados



# TEORIA QUÂNTICA

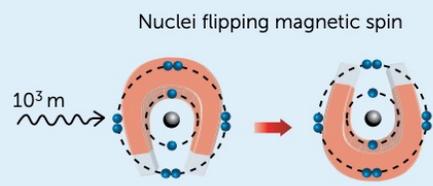
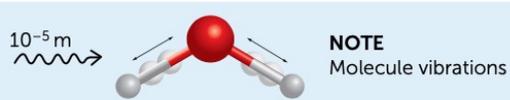
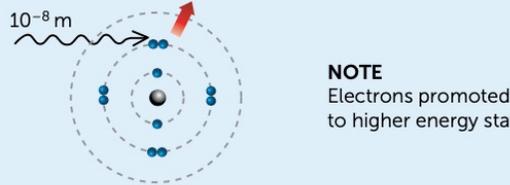
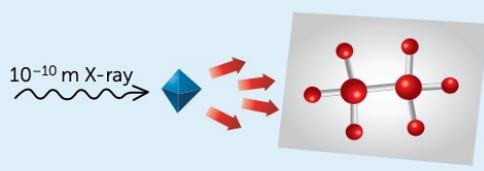
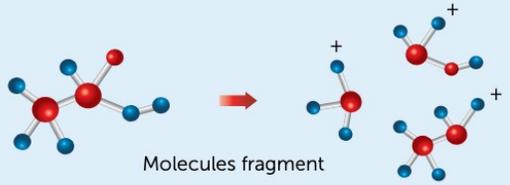
## ESTADOS ENERGÉTICOS DAS ESPÉCIES QUÍMICAS

- Radiação na região de **microondas**: movimentos de **rotação**
- Radiação na região do **infravermelho**: movimentos de **vibração**
- Luz **visível** e radiação **ultravioleta**: transferência de elétrons para **estados de maior energia**
- **Raios-X** e radiação ultravioleta de **baixo comprimento de onda**: **rompimento** da ligações e **ionização** das moléculas





# ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO

TECHNIQUE	RADIATION		WHAT CAN IT SEE?
Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy	Radio waves ( $10^3$ m)		How neighbouring atoms of certain nuclei (e.g. $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{19}\text{F}$ , $^{31}\text{P}$ ) in a molecule are connected together, as well as how many atoms of these types are present in different locations in the molecule.
Infrared spectroscopy	Infrared ( $10^{-5}$ m)		The functional groups that are present in a molecule.
Ultraviolet-visible spectroscopy	Ultraviolet ( $10^{-8}$ m)		Conjugated systems (i.e. alternating single and double bonds) in organic molecules as well as the metal-ligand interactions in transition metal complexes.
X-ray crystallography	X-rays ( $10^{-10}$ m)		How all the atoms in a molecule are connected in a three-dimensional arrangement.
Mass spectrometry	Non-spectroscopic technique		The mass to charge ratio of the molecular ion (i.e. the molecular weight) and the fragmentation pattern, which may be related to the structure of the molecular ion.



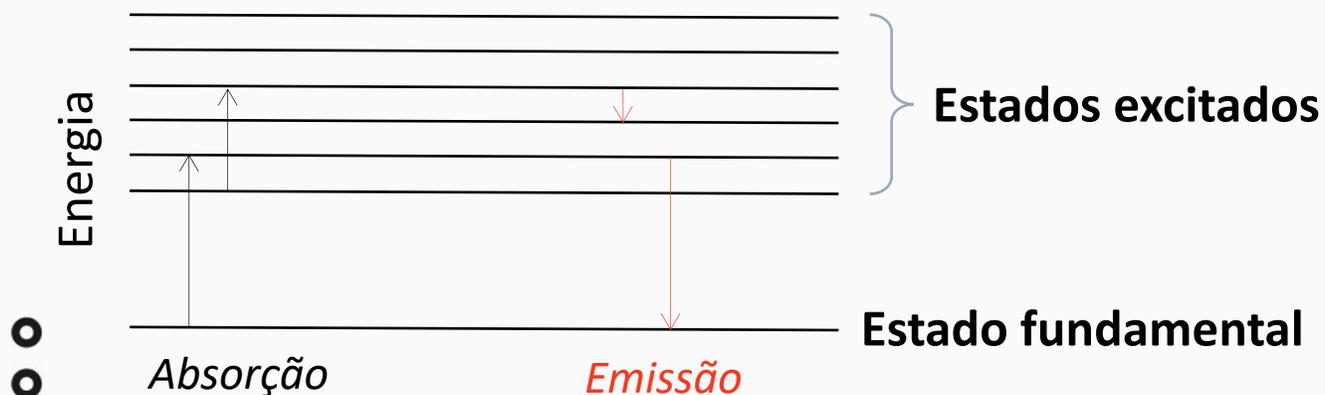


# TEORIA QUÂNTICA

## Estados energéticos das espécies químicas

Absorção de um fóton por uma molécula: promoção a um **estado excitado**

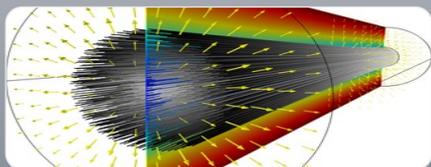
Emissão de um fóton por uma molécula: retorno ao **estado fundamental**



$$E = h \cdot \nu = hc / \lambda$$



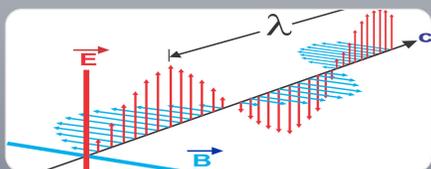
# EMISSÃO DE RADIAÇÃO



Bombardeamento com elétrons



Exposição a corrente elétrica, faísca ou fonte de calor



Irradiação com radiação eletromagnética



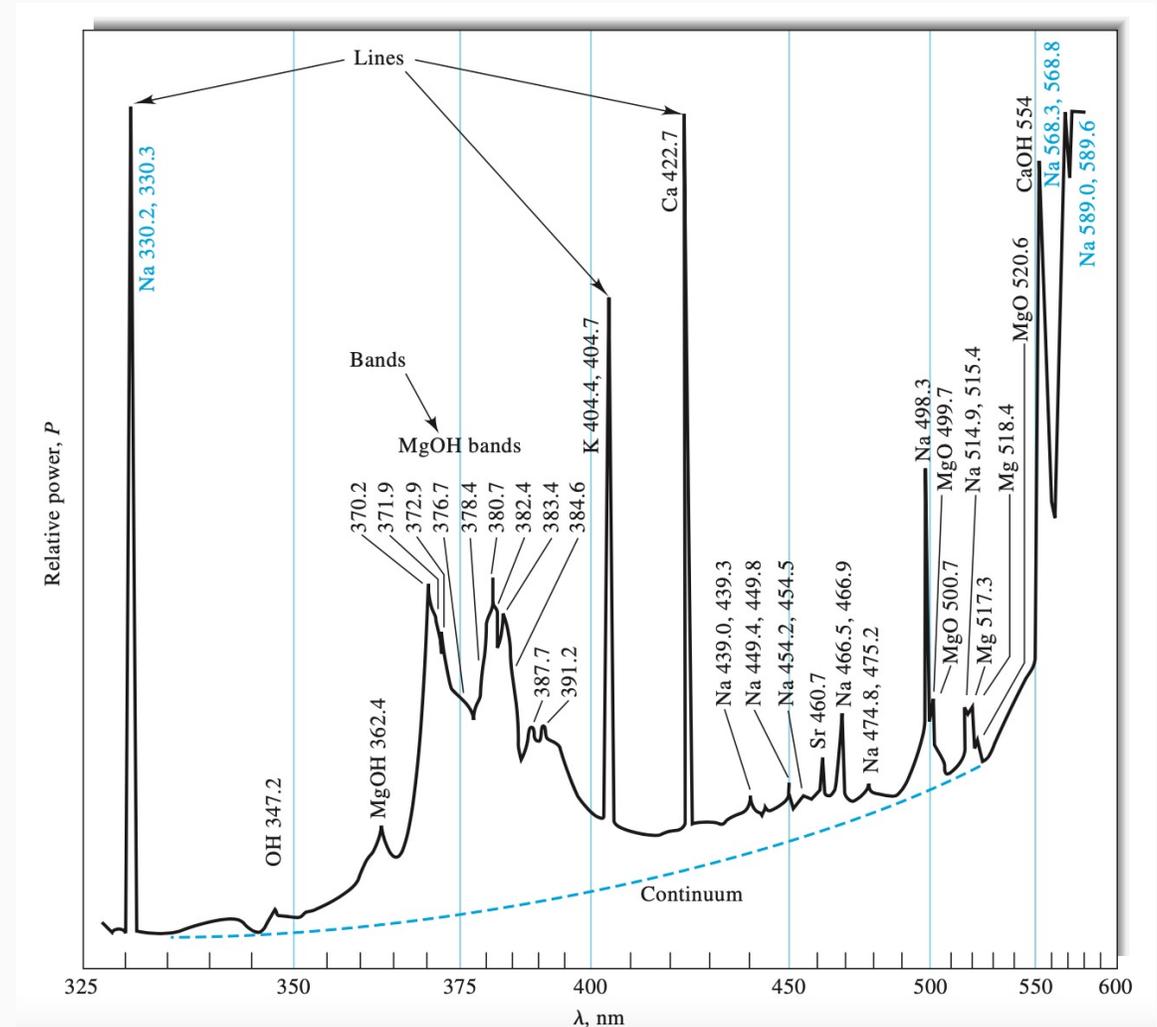
Reação química





# EMISSÃO DE RADIAÇÃO

Espectro de emissão:  
potência relativa da  
radiação vs.  
comprimento de  
onda ou frequência



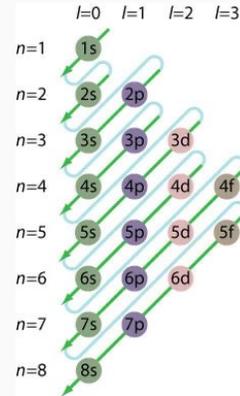
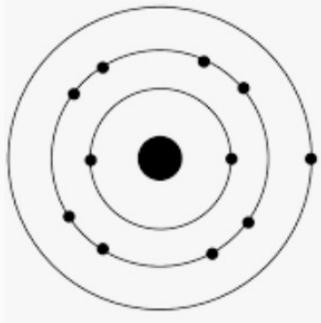
linhas, bandas e contínuo





# EMISSÃO DE RADIAÇÃO

Na

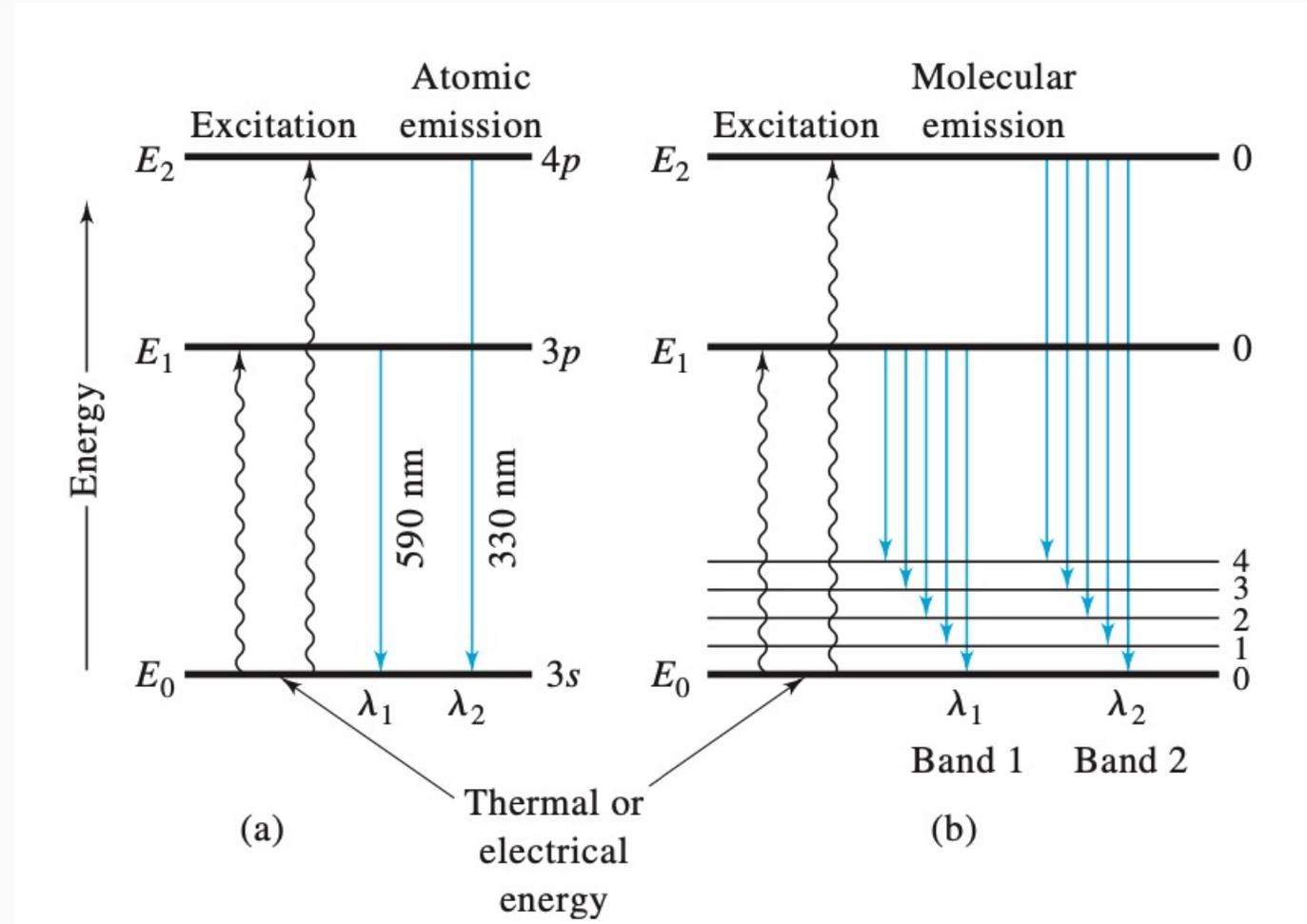


**Fóton emitido:**

Frequência e comprimento de onda podem ser calculados

$$\nu_1 = (E_1 - E_0)/h$$

$$\lambda_1 = hc/(E_1 - E_0)$$





# ABSORÇÃO DE RADIAÇÃO

Energia do fóton de excitação deve ser exatamente igual à diferença de energia entre o estado fundamental e um estado excitado da amostra absorvedora

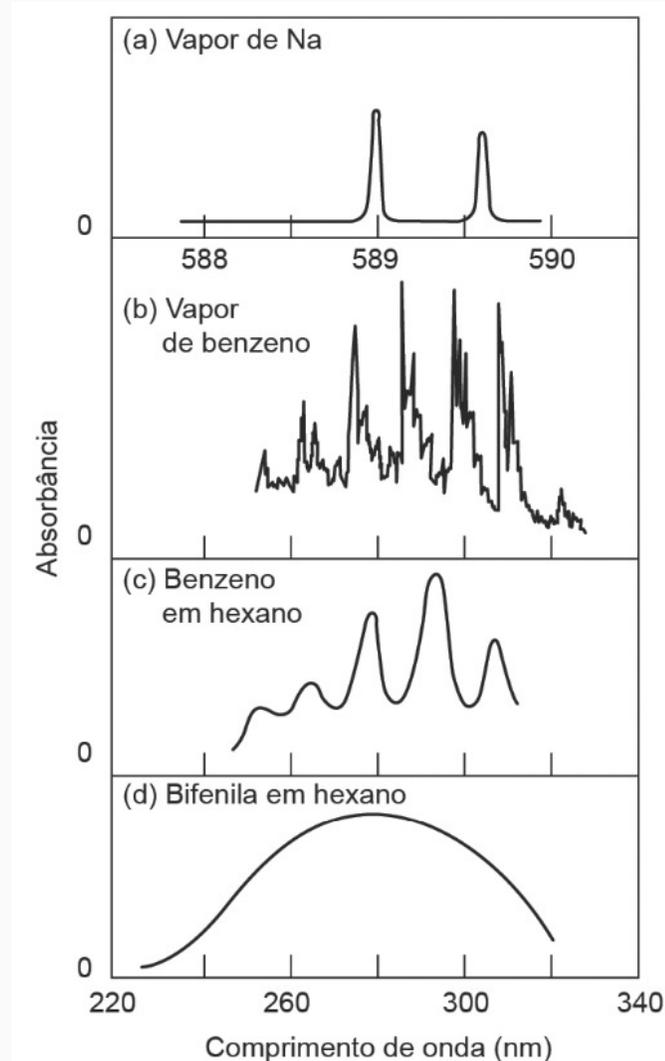
**única para cada espécie**

**absorbância vs. comprimento de onda ou frequência**

**MOLÉCULAS X ÁTOMOS**

**ABSORÇÃO  
ATÔMICA**

**ABSORÇÃO  
MOLECULAR**





# ABSORÇÃO DE RADIAÇÃO

## ABSORÇÃO ATÔMICA

## ABSORÇÃO MOLECULAR

- Passagem de radiação visível ou ultravioleta policromática através de um meio constituído de partículas monoatômicas → **absorção de algumas frequências bem definidas**
- ✓ “Simplicidade” espectral: pequeno número de estados de energia possíveis = **linhas estreitas e bem definidas**
- ✓ Radiação visível e UV: ↓ E, transição de elétrons de **camadas mais externas**
- ✓ Raios X: ↑ E, interação com **elétrons mais próximos do núcleo atômico**





# ABSORÇÃO DE RADIAÇÃO

## ABSORÇÃO ATÔMICA

## ABSORÇÃO MOLECULAR

- Espectros muito mais complexos: **número enorme de estados de energia**

$$E = E_{\text{eletrônica}} + E_{\text{vibracional}} + E_{\text{rotacional}}$$

- ✓ Espectro UV-Vis: regiões de absorção que abrangem **intervalos** de comprimentos de onda
- ✓ **Região do infravermelho**: absorção vibracional pura (energia da radiação é insuficiente para provocar transições eletrônicas)
- ✓ **Região de microondas**: espectros rotacionais puros





# MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS

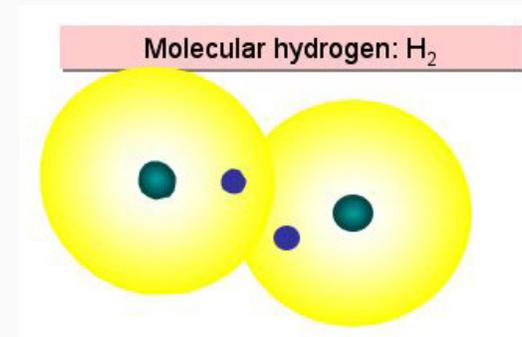
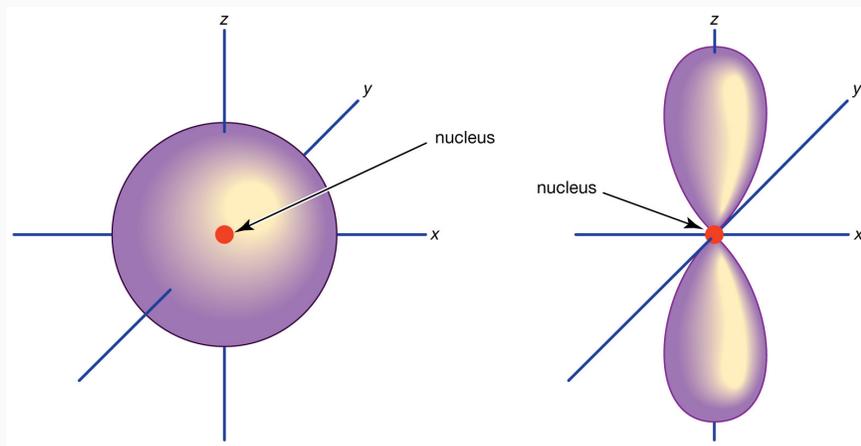
<b>Tipo de espectroscopia</b>	<b>Faixa de comprimento de onda usual</b>	<b>Faixa de número de onda usual, <math>\text{cm}^{-1}</math></b>	<b>Tipo de transição quântica</b>
<b>Emissão de raios gama</b>	0,005 – 1,4 Å	–	Nuclear
<b>Absorção, emissão, fluorescência e difração de raios-x</b>	0,1 – 100 Å	–	Elétrons internos
<b>Absorção de ultravioleta de vácuo</b>	10 – 180 nm	$1 \times 10^6$ a $5 \times 10^4$	Elétrons ligados
<b>Absorção, emissão e fluorescência no UV/Visível</b>	180 – 780 nm	$5 \times 10^4$ a $1,3 \times 10^4$	Elétrons ligados
<b>Absorção no IV e espalhamento Raman</b>	0,78 – 300 $\mu\text{m}$	$1,3 \times 10^4$ a 33	Rotação/vibração de moléculas
<b>Absorção de microondas</b>	0,75 – 375 $\mu\text{m}$	13 a 0,03	Rotação de moléculas
<b>Ressonância de spin eletrônico</b>	3 cm	0,33	Spin de elétrons em um campo magnético
<b>Ressonância Magnética Nuclear</b>	0,6 – 10 m	$1,7 \times 10^{-2}$ a $1 \times 10^{-3}$	Spin de núcleos em um campo magnético



<https://www.youtube.com/watch?v=NhmSGCqVR7k>



# ORBITAIS ATÔMICOS E MOLECULARES



$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2}{\partial x^2} + V$$

Operador Hamiltoniano

Operador = instrução, prescrição

Precisa agir sobre uma função!

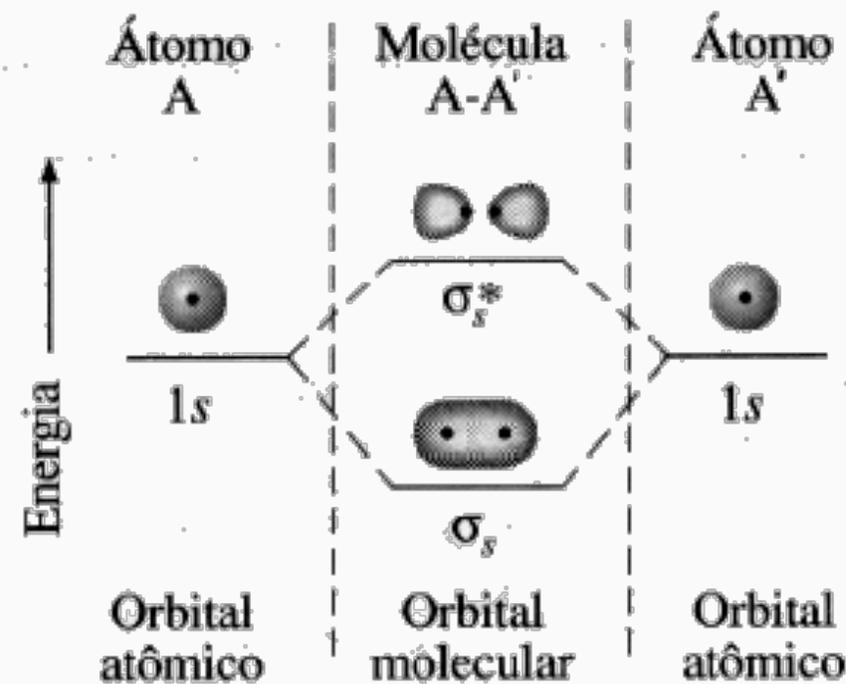
$$\hat{H} \psi = E \psi$$

operador

função

número

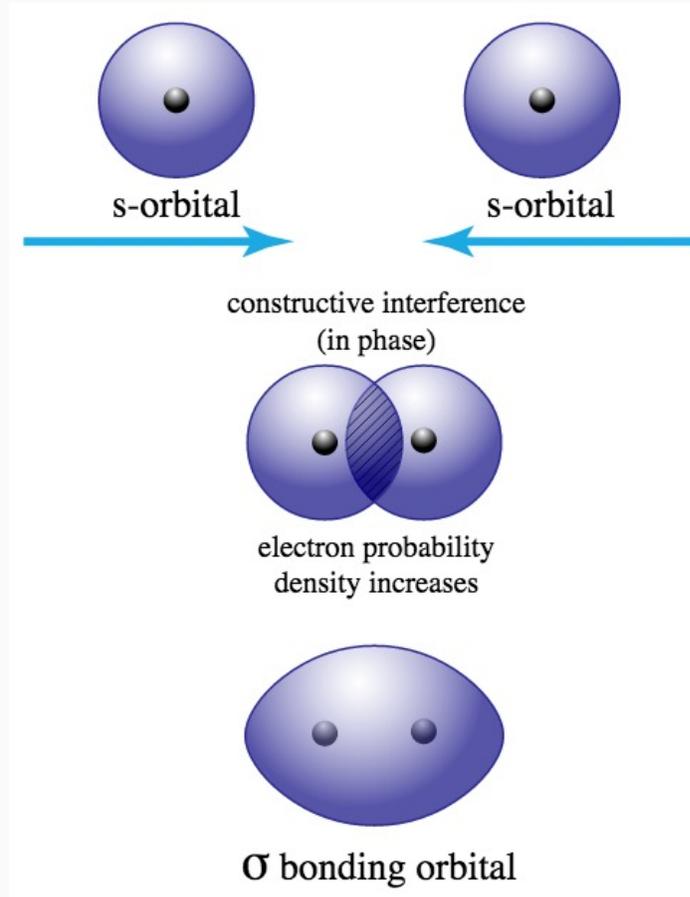
função



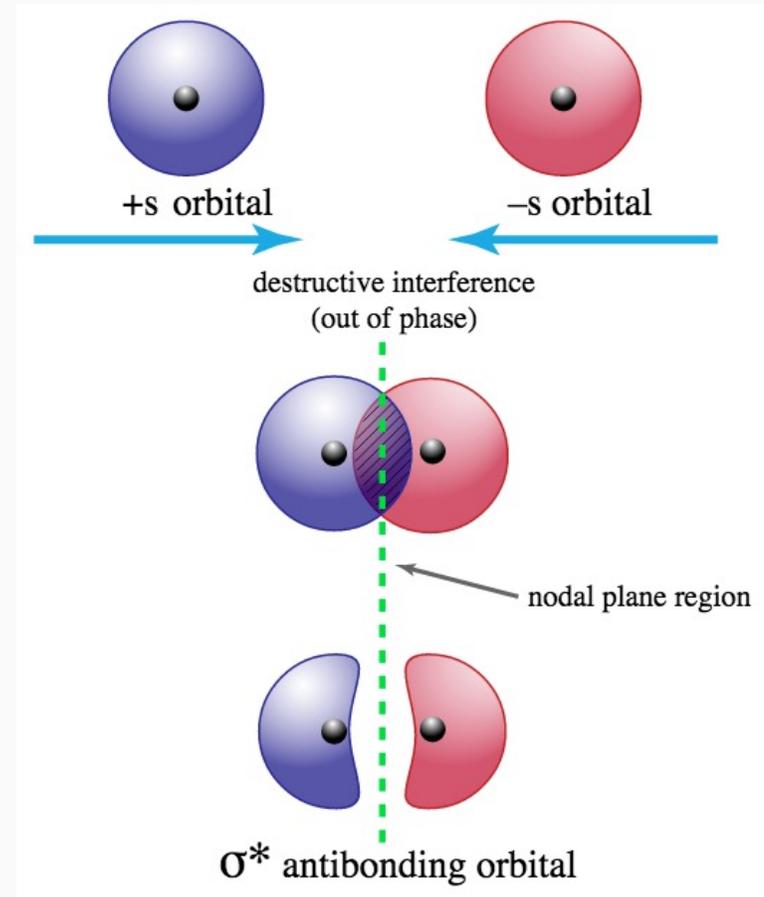


# ORBITAIS ATÔMICOS E MOLECULARES

## Orbitais ligantes:



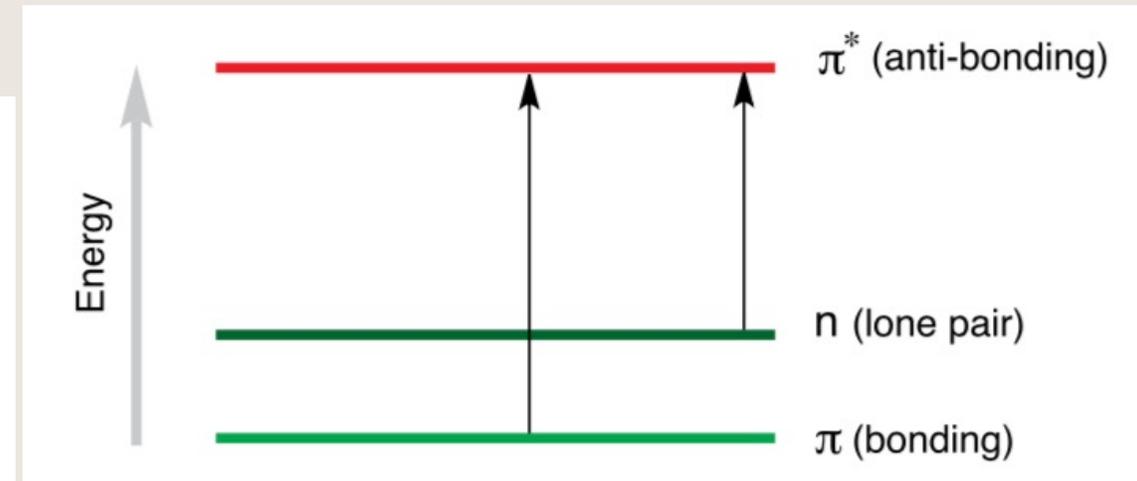
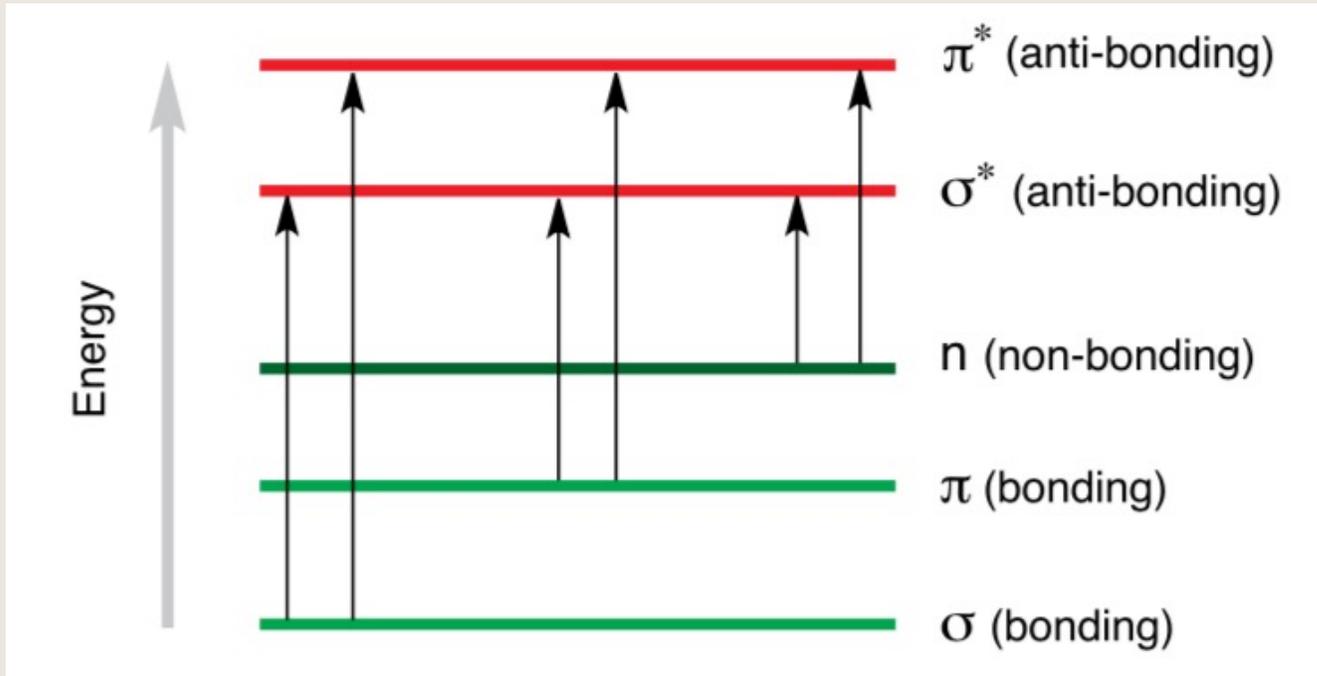
## Orbitais anti-ligantes (\*):



# ABSORÇÃO DE LUZ



Absorção de um fóton por uma molécula: promoção a um **estado excitado**

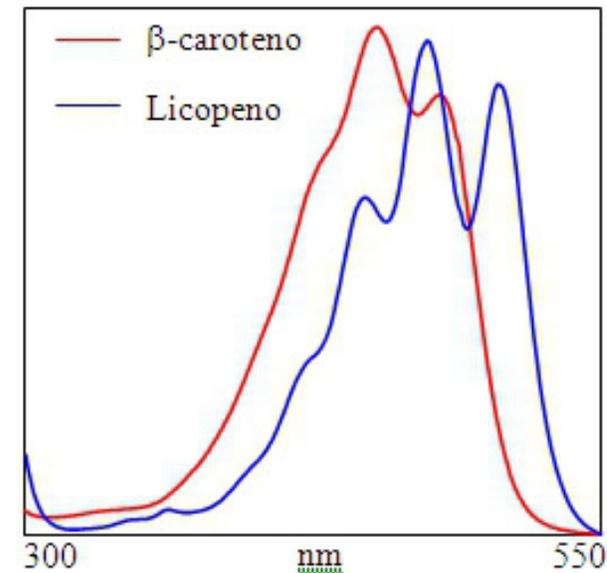
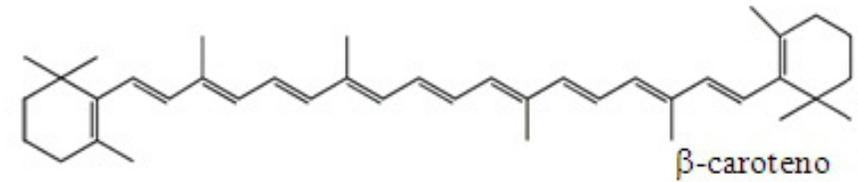
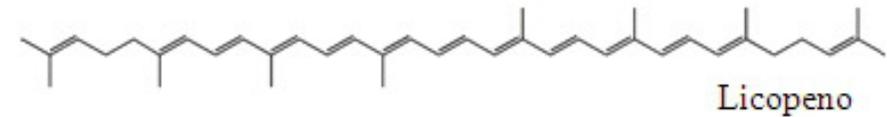
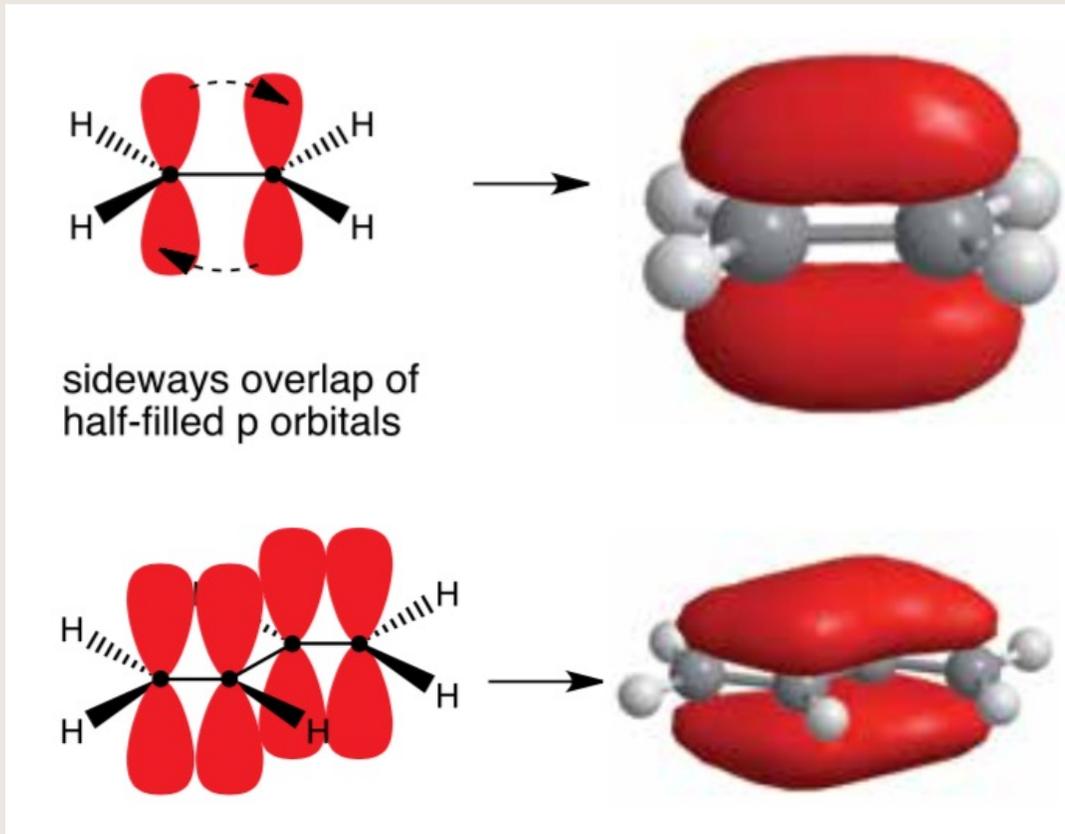


TRANSIÇÕES POSSÍVEIS  
APÓS ABSORÇÃO DE LUZ  
NA REGIÃO DO UV-  
VISÍVEL



# ABSORÇÃO DE LUZ

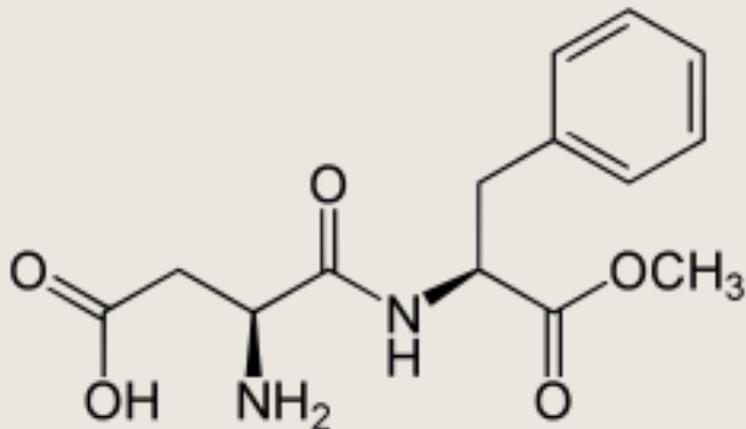
Absorção de um fóton por uma molécula: promoção a um **estado excitado**



# GRUPOS CROMÓFOROS



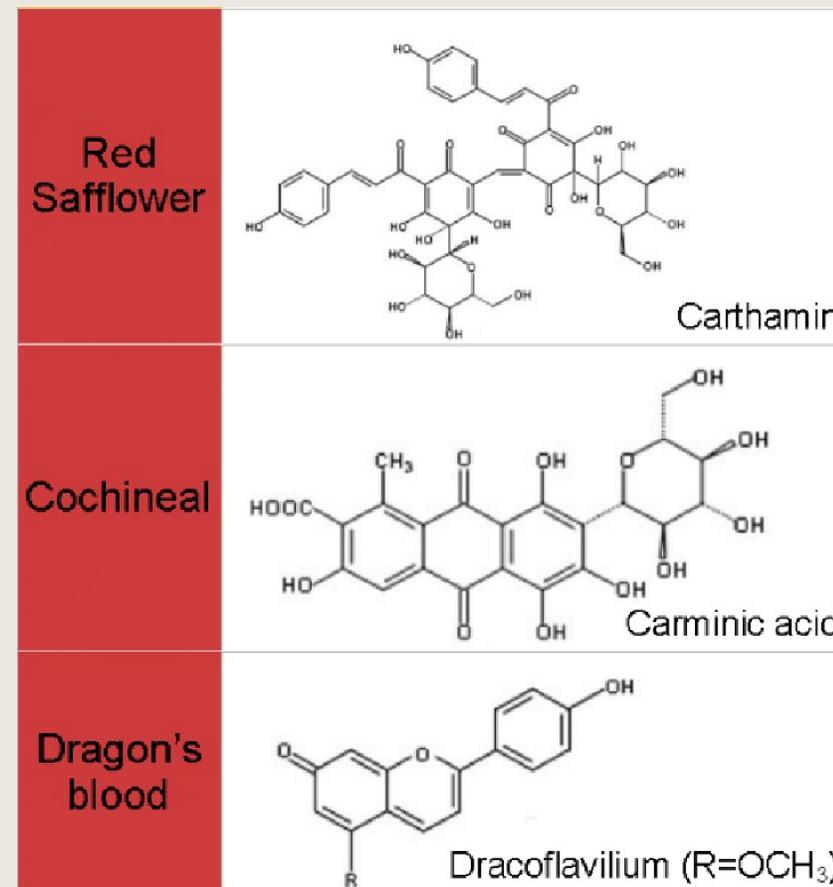
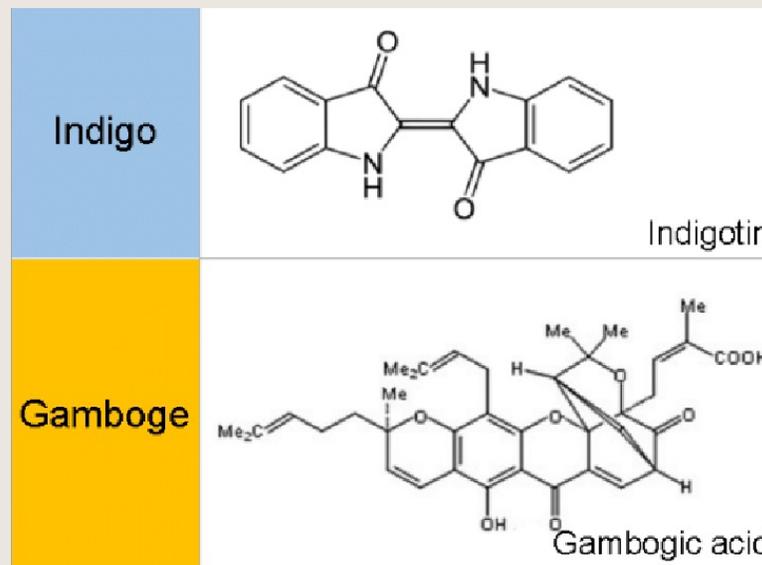
São grupos funcionais com absorção característica na região do **ultra-violeta ou do visível**



**Aspartame:** éster metílico da L- $\alpha$ -aspartil-L-fenilalanina

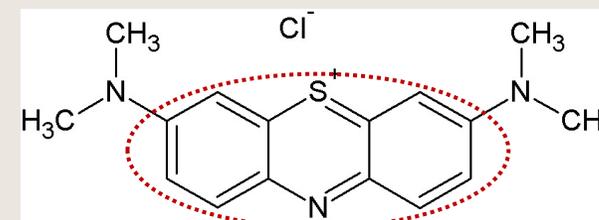
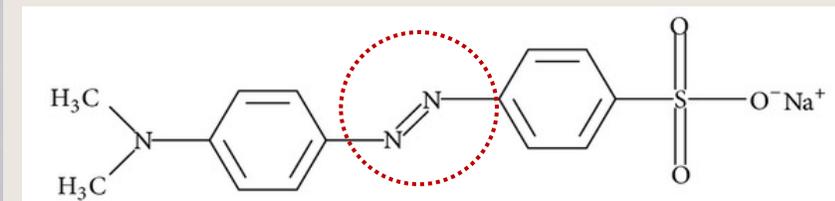
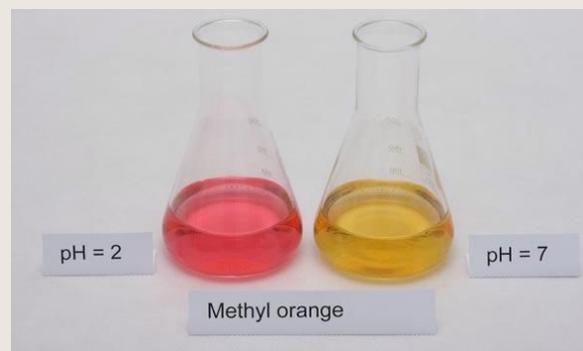
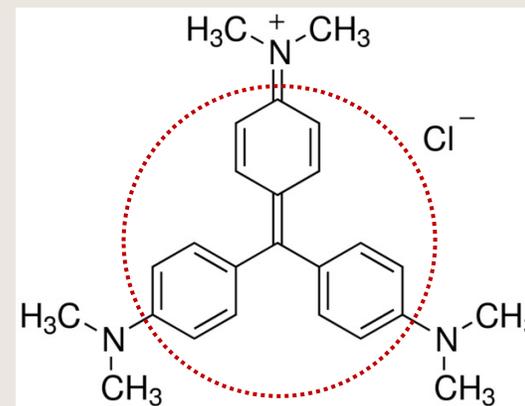
Ex. Grupo carboxila (-COOH):  
200-210 nm

05/10/2021



# GRUPOS CROMÓFOROS

- Carboxila (-COOH): **200 – 210 nm**
- Aldeído (-CHO): **210 nm; 280 – 300 nm**
- Amino (-NH<sub>2</sub>): **195 nm**
- Haletos (-Br): **208 nm**
- Dissulfeto (-S-S-): **194 nm; 255 nm**
- Éster (-COOR): **205 nm**
- Éter (-O-): **185 nm**
- Nitro (-NO<sub>2</sub>): **210 nm**
- Nitroso (-NO): **302 nm**
- Tiocarbonila (=C=S-): **205 nm**
- Tioéter (-S-): **194 nm; 215 nm**
- Tiol (-SH): **195 nm**



# GRUPOS CROMÓFOROS

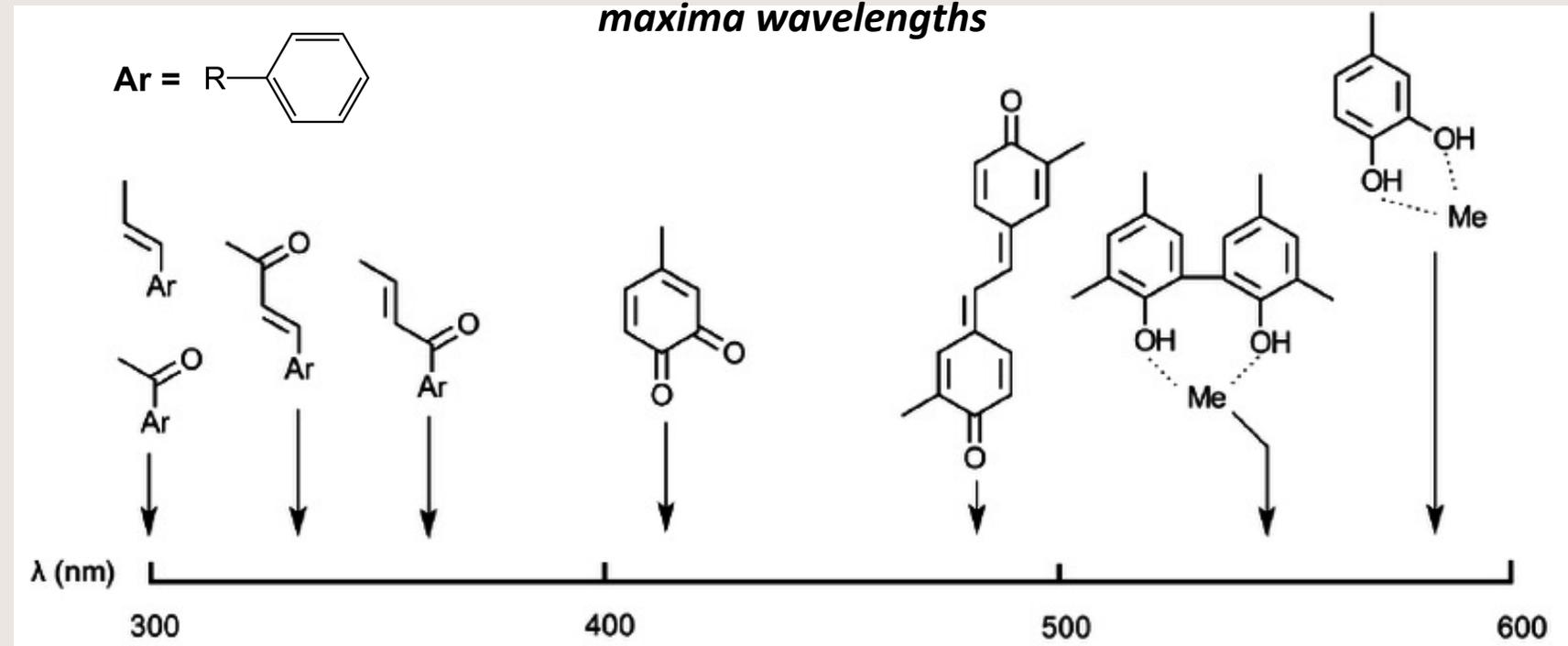
PEER-REVIEWED REVIEW ARTICLE

**bioresources.com**

## REVIEW: LIGHT-INDUCED YELLOWING OF LIGNOCELLULOSIC PULPS – MECHANISMS AND PREVENTIVE METHODS

Magnus Paulsson<sup>a,b,\*</sup> and Jim Parkås<sup>c</sup>

### *Lignin-related chromophores in lignin-rich pulps and their approximate absorption maxima wavelengths*



05/10/2021



# UV/Vis - EQUIPAMENTOS



Equipamentos diferem entre si quanto a maior ou menor sensibilidade e faixa de trabalho

160-380 nm → *Ultravioleta*

380-780 nm → *Visível*



**(Foto)colorímetro: 380-780 nm**



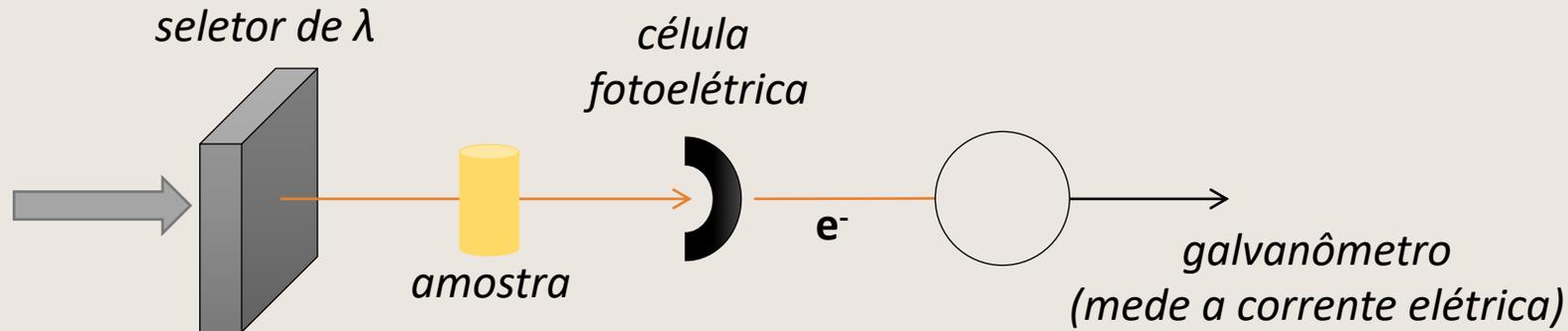
**Espectrofotômetro: 200-1000 nm**



<https://www.youtube.com/watch?v=XAp-5r3LxQo>

# UV/Vis - EQUIPAMENTOS

- Medem a quantidade de luz transmitida quando um raio luminoso incide em uma solução
- Luz é convertida em energia elétrica (células fotoelétricas ou fotovoltaicas)



**Escala do galvanômetro:**  
transmitância ou  
absorbância

## Transmitância:

0% (T=0) até 100% (T=1)  
 $I = I_0$ ;  $T = I/I = 1$

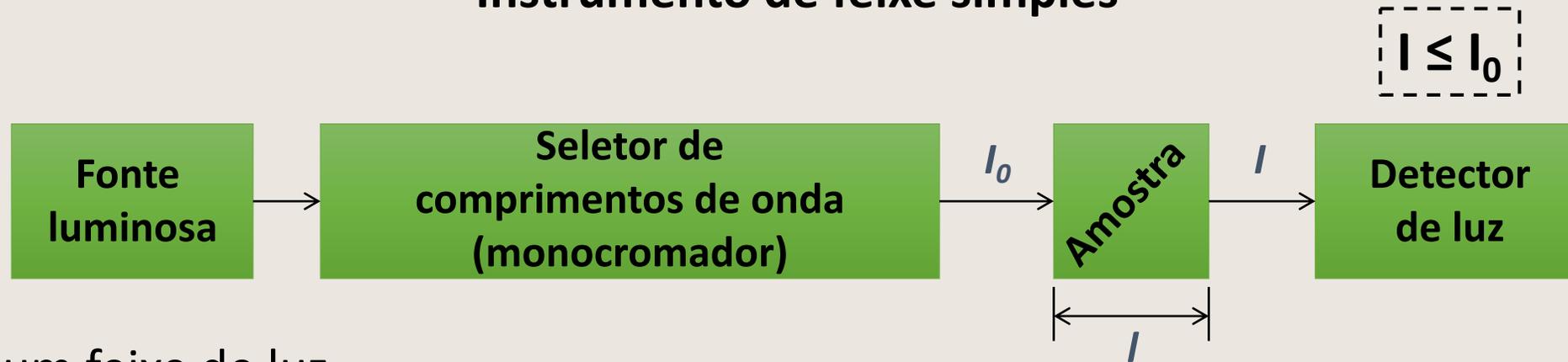
## Absorbância:

0 (T = 100%  $\rightarrow$  T = 1, A =  $-\log 1 = 0$ )  
até  
 $\infty$  (T = 0%  $\rightarrow$  T = 0, A =  $-\log 0 = \infty$ )

# UV/Vis - EQUIPAMENTOS



## Instrumento de feixe simples



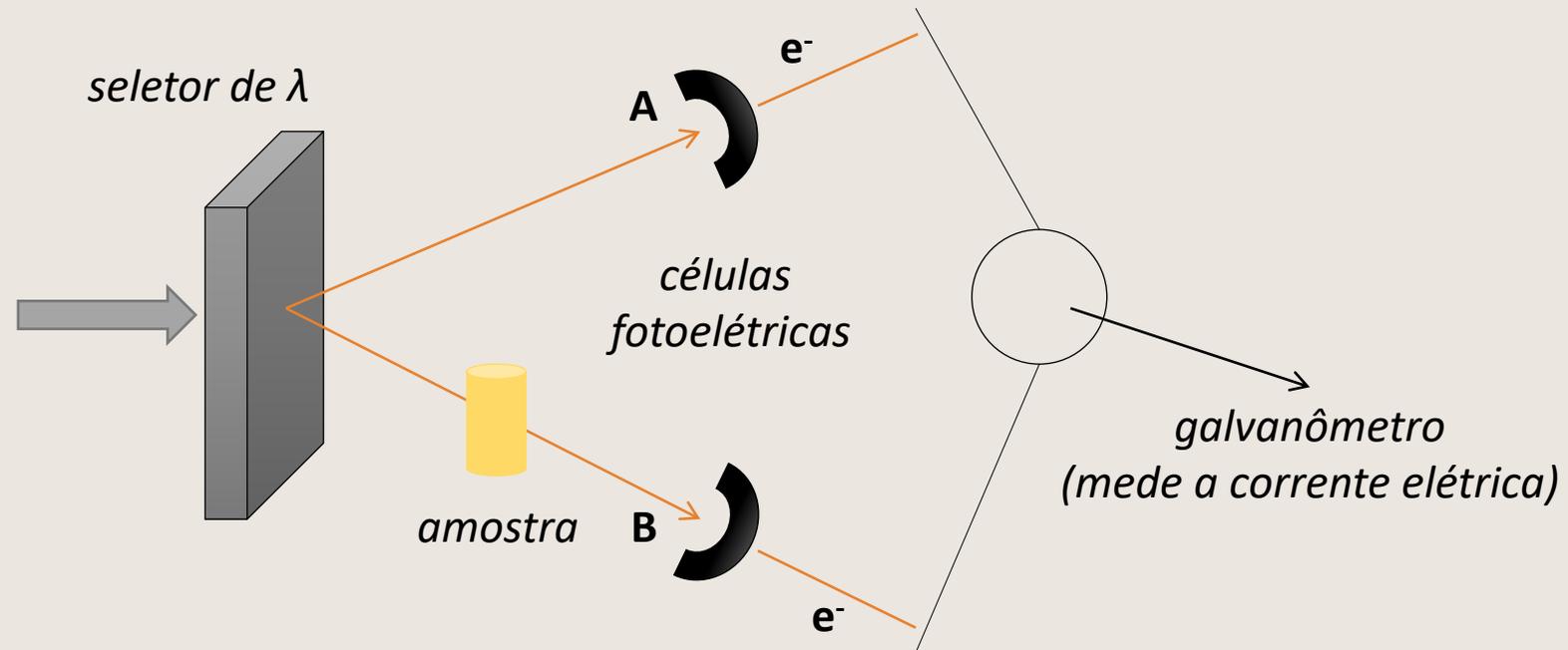
- Apenas um feixe de luz
- Medida inicial da luz radiante que passa através de uma cubeta de referência (solvente puro) –  $I_0$
- Na sequência: medida da amostra –  $I$
- **Em posse de  $I_0$  e  $I$ : cálculo da transmitância (T) e da absorbância (A)**



# UV/Vis - EQUIPAMENTOS



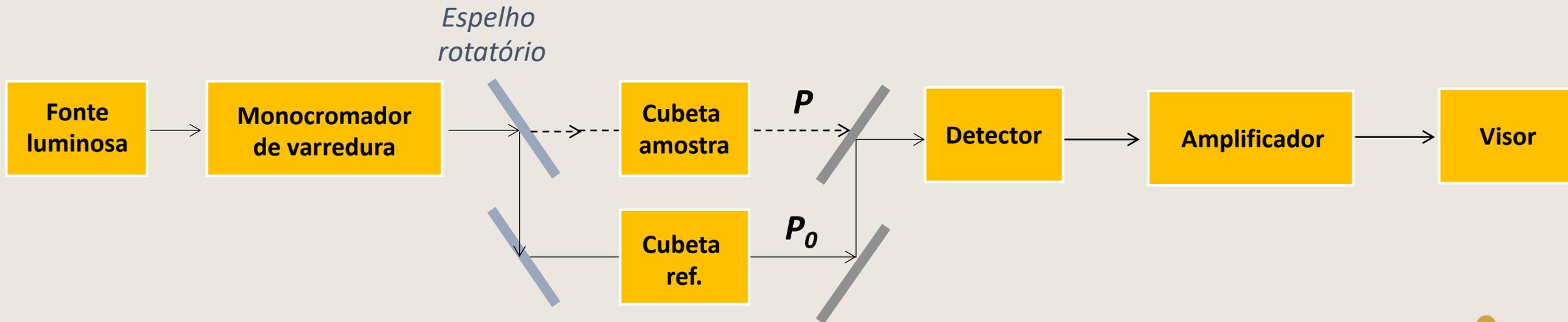
- Em geral: sistema de célula fotoelétrica dupla



# UV/Vis - EQUIPAMENTOS



## Instrumento de feixe duplo



# UV/Vis – ASPECTOS PRÁCTICOS



## CUVETTE BUYING GUIDE

A comprehensive list of premium quality cuvettes for a wide variety of applications and instruments.

CUVETTES SPECIFICALLY FOR YOUR MAKE & MODEL

- Spectrophotometer cuvettes
- Fluorometer cuvettes
- Cuvette accessories
- Tablet dissolution & flow cells
- Sub-micro volume cuvettes
- Dye laser cells
- Plates & discs
- Microfluidic chips
- Flow channel cells
- Gas cells
- Custom manufacturing
- UV/VIS/NIR spectrophotometer calibration standards
- Fluorescence calibration standards
- Evacuable dies
- Refractometers
- and much more...

fireflysci.com  
PRECISION QUARTZ GLASS MANUFACTURING

# UV/Vis – ASPECTOS PRÁTICOS



- **Cubetas:** confeccionadas a partir de diferentes materiais

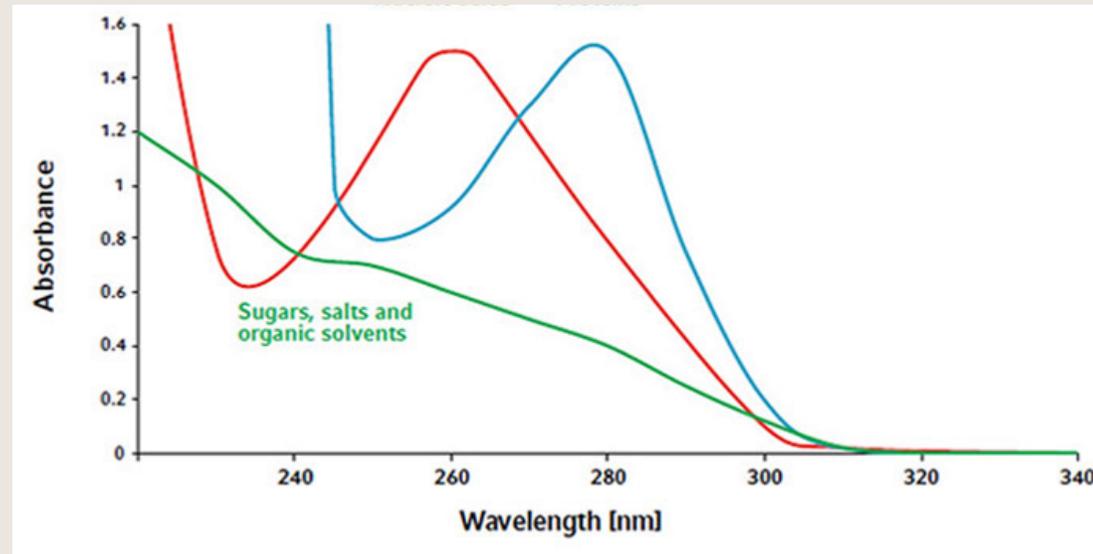
Material	Comprimento de onda (nm)	Região do espectro
Vidro ou Borossilicato	380-780	Visível
Plástico (poliestireno, polimetacrilato...)	380-780	Visível
Quartzo fundido	Menos de 380	Ultravioleta
Quartzo UV	185	Ultravioleta



# UV/Vis – ASPECTOS PRÁTICOS



- Curvas de [% T ou A (y) vs. comprimento de onda ( $\lambda$ )]



- Amostra: dois picos (um coincide com o branco, o outro não)
- Absorbância e comprimento de onda de interesse: referentes ao segundo pico (não há influência do branco)



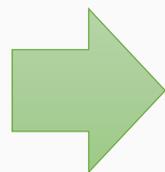
# LEI DE BEER-LAMBERT



Johann H. Lambert  
(1728-1777)

**Transmitância:** fração da luz que *passa* pela amostra

$$T = \frac{I}{I_0}$$
$$0 \leq T \leq 1$$



Observou que a **intensidade da luz** transmitida por um meio absorvedor era proporcional à **espessura do meio** pelo qual a luz passava

Observou que a **intensidade da** luz transmitida por um meio absorvedor era proporcional à **concentração da espécie** absorvedora



August Beer  
(1825-1863)





# LEI DE BEER-LAMBERT

*Sendo uma equação exponencial,  
pode ser expressa na forma linear se  
tomarmos o logaritmo decimal de  
ambos os membros*

$$T = 10^{-\epsilon \cdot c \cdot l}$$

$$\log T = -\epsilon \cdot c \cdot l \quad \Rightarrow \quad -\log T = \epsilon \cdot c \cdot l$$

*ABSORBÂNCIA (ou  
densidade ótica)  
da solução*

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

**$\epsilon$ : absortividade molar** (ou coeficiente de extinção), é característica de uma substância e indica qual a quantidade de luz absorvida em determinado comprimento de onda

**Unidades:**

A – adimensional;  $\epsilon$ -  $M^{-1}cm^{-1}$ ; l (caminho ótico) – cm; c – M





# LEI DE BEER-LAMBERT

## Determinação de concentrações

(A) Por comparação com solução padrão

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$



**Absorbância** diretamente proporcional à **concentração** do soluto

Leitura da absorbância de uma solução padrão de concentração conhecida seguida da leitura da absorbância da amostra desconhecida

**Condições em que a lei de Beer é obedecida**

$$\frac{C_x}{C_p} = \frac{A_x}{A_p} \quad e \quad C_x = \frac{A_x C_p}{A_p}$$





# LEI DE BEER-LAMBERT

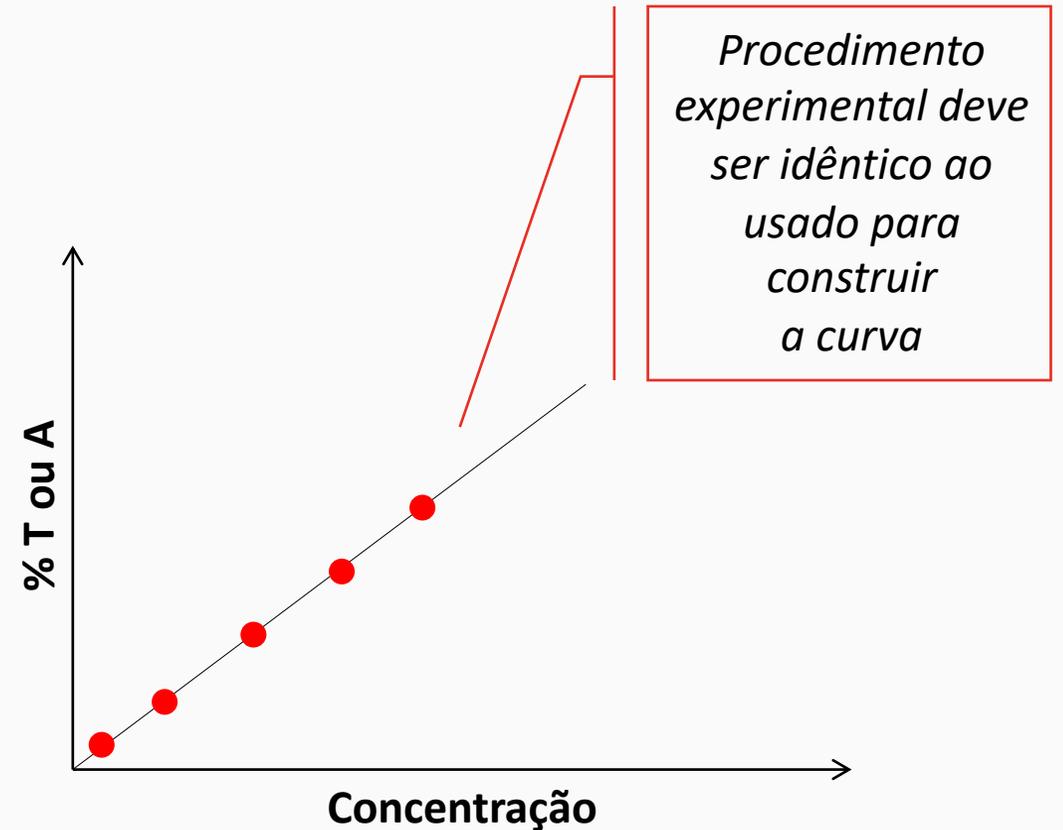
## Determinação de concentrações

### (B) Uso de curvas de calibração

**1-** Prepara-se uma série de soluções da substância problema numa faixa de concentração próxima do esperado

**2-** Medidas de % T ou A

**3-** Construção de curva de calibração [concentração (x) vs. % T ou A (y)] - (Se a lei de Beer for obedecida, comportamento linear)



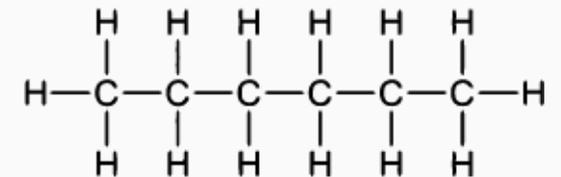
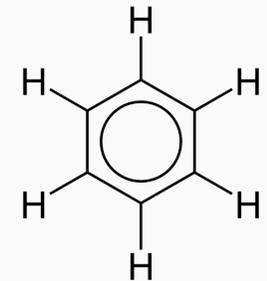
# A LEI DE BEER-LAMBERT NA ANÁLISE QUÍMICA

(a) Uma solução preparada dissolvendo-se 25,8 mg de benzeno em hexano e diluindo-se a 250 mL tem um pico de absorção em 256 nm e uma absorbância de 0,266 em uma célula de 1 cm de caminho ótico. Determine a absorptividade molar do benzeno neste comprimento de onda.

$$[\text{Benzeno}] = \frac{(0,0258 \text{ g}) / 78,11 \text{ g.mol}^{-1}}{0,250 \text{ L}} = 1,32 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$\text{Absortividade molar} = \varepsilon = \frac{A}{b \cdot c} = \frac{0,266}{(1 \text{ cm})(1,32 \times 10^{-3} \text{ M})} = 201,5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

**Exemplo.** Determinação da quantidade de benzeno presente em hexano



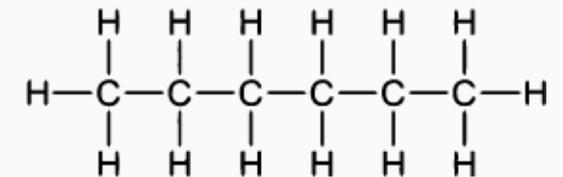
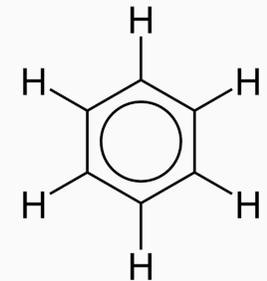
# A LEI DE BEER-LAMBERT NA ANÁLISE QUÍMICA

**(b)** Uma amostra de hexano, contaminada com benzeno, tem uma absorvância de 0,070 em 256 nm em uma célula de 5 cm de caminho ótico. Determine a concentração de benzeno em  $\text{mg.L}^{-1}$ .

$$[\text{C}_6\text{H}_6] = \frac{A}{\epsilon \cdot b} = \frac{0,070}{(201,5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})(5 \text{ cm})} = 6,9 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$[\text{C}_6\text{H}_6] = (6,9 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}) \times (78,11 \times 10^3 \text{ mg.mol}^{-1}) = 5,4 \text{ mg.L}^{-1}$$

**Exemplo.** Determinação da quantidade de benzeno presente em hexano



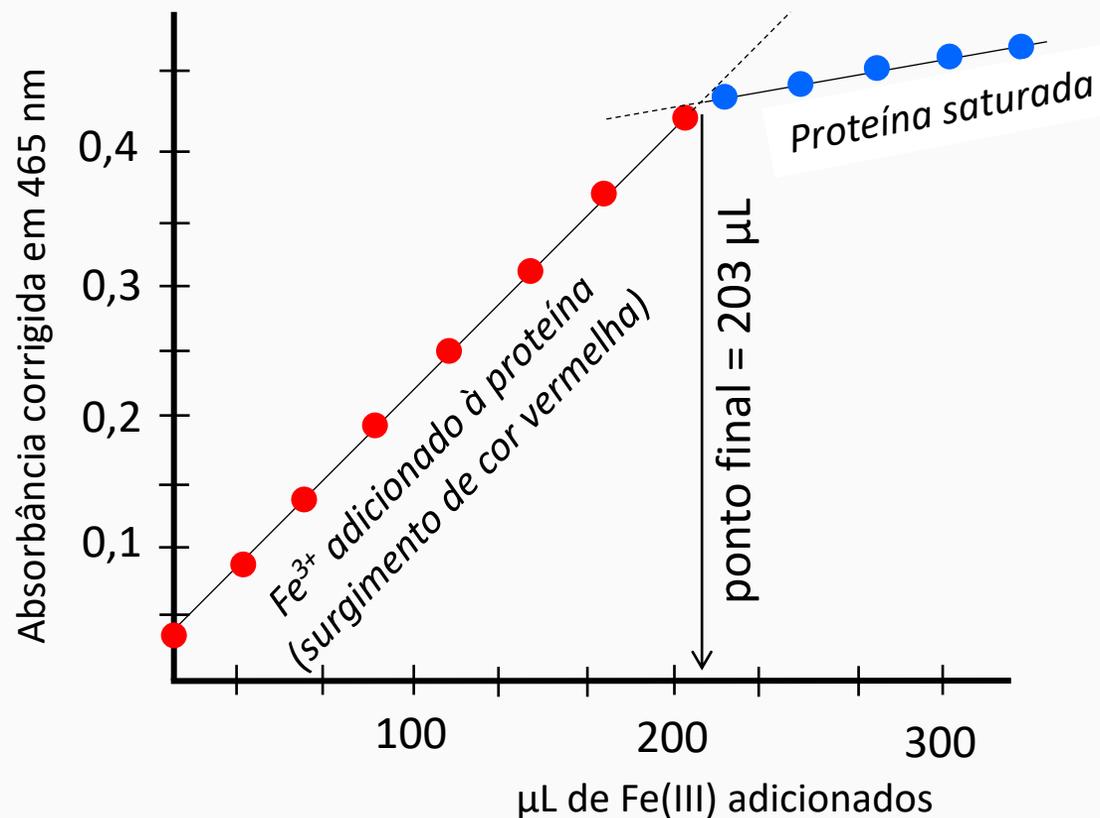


# TITULAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS



## EXEMPLO

2 mL  
apotransferrina  
vs.  
nitrilotriacetato  
férico 1,79 mM

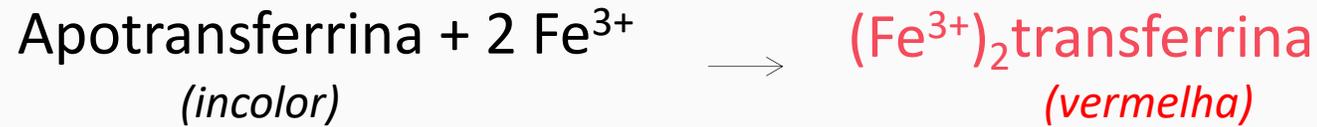


05/10/2021





# TITULAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

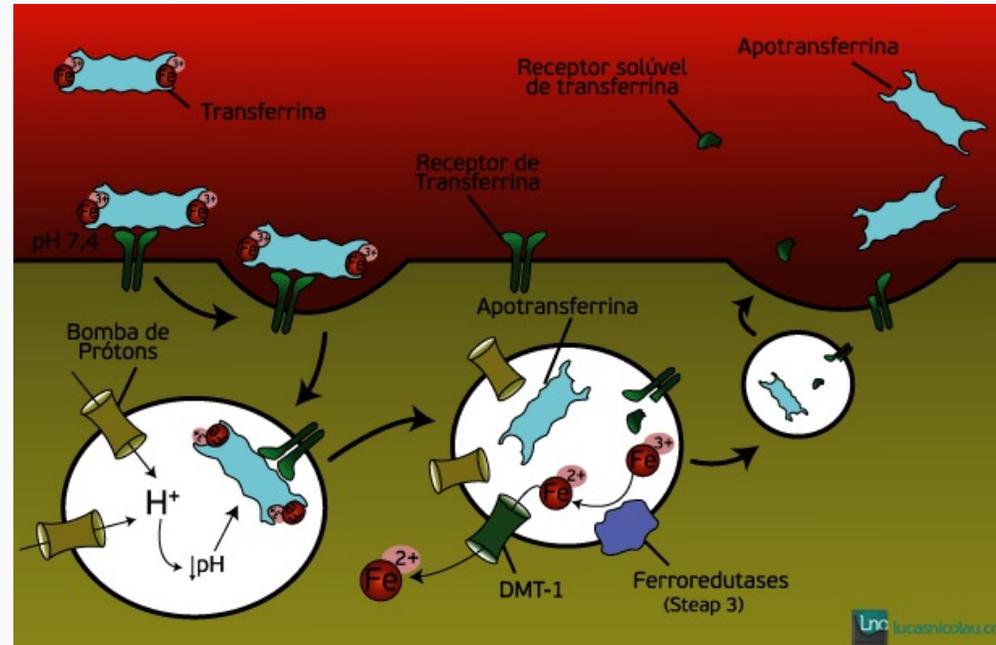


Ponto final = 203  $\mu\text{L}$

0,363  $\mu\text{mol}$

Mas: cada molécula de proteína se liga a 2 íons  $\text{Fe}^{3+}$

Portanto, número de mols de proteína = **0,182  $\mu\text{mol}$**



**Absorbância deve ser corrigida pelo efeito da diluição!**

○  
○  
●

$$\text{Absorbância corrigida} = \left( \frac{\text{volume total}}{\text{volume inicial}} \right) \times \text{Absorbância observada}$$





# TITULAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS



Ponto final = 203  $\mu\text{L}$



0,363  $\mu\text{mol}$

Mas: cada molécula de proteína se liga a 2 íons  $\text{Fe}^{3+}$

Portanto, número de mols de proteína = **0,182  $\mu\text{mol}$**

**Exemplo.** A absorbância medida após a adição de 125  $\mu\text{L}$  de nitrilotriacetato férrico a 2 mL de apo transferrina foi de 0,260. Calcule a absorbância correta levando em consideração os efeitos de diluição.

$$\text{Absorbância corrigida} = \left( \frac{2,125 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \right) \times 0,260 = 0,276$$

$$\text{Absorbância corrigida} = \left( \frac{\text{volume total}}{\text{volume inicial}} \right) \times \text{Absorbância observada}$$



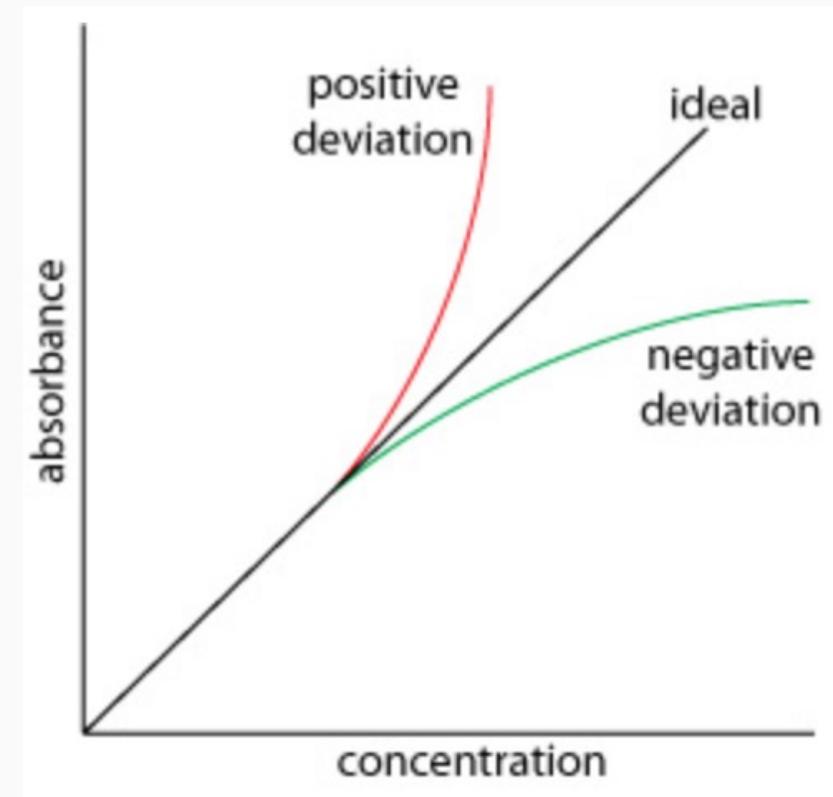
# DESVIOS DA LEI DE BEER-LAMBERT

“A lei de Beer é válida para **radiação monocromática** passando através de uma **solução diluída ( $\leq 0,01M$ )**, na qual a espécie absorvente não esteja participando de um equilíbrio que seja dependente da concentração”

- **Soluções concentradas:** absorvidade molar varia em função da proximidade das moléculas
- **Absorvidade molar varia com a concentração.**  
Exemplo: ácido fraco em solução concentrada: dissociação pequena; ácido fraco em solução diluída: dissociação aumenta



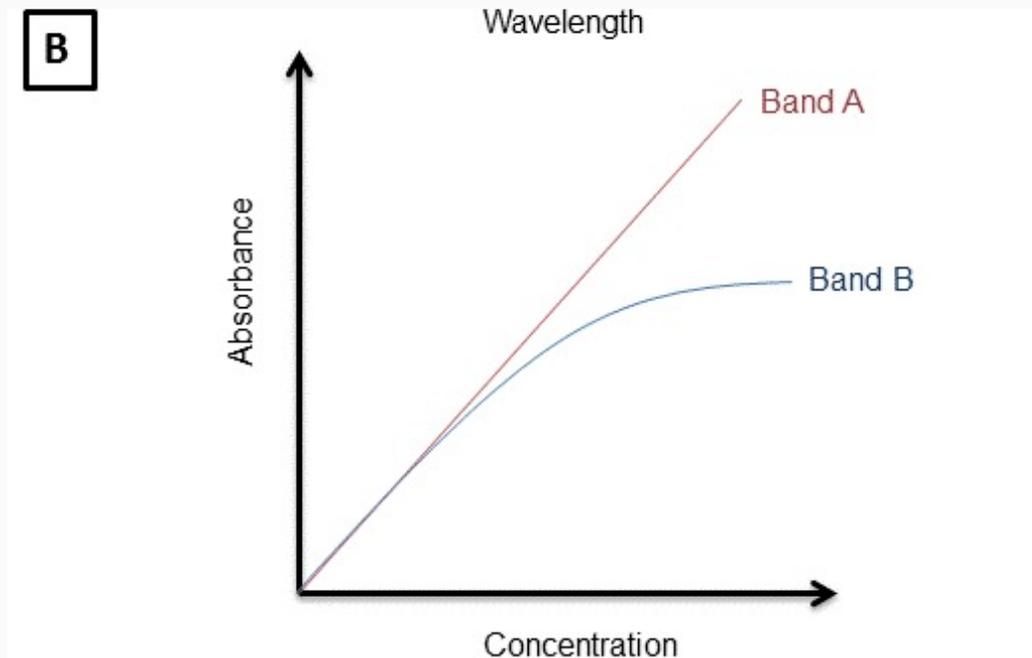
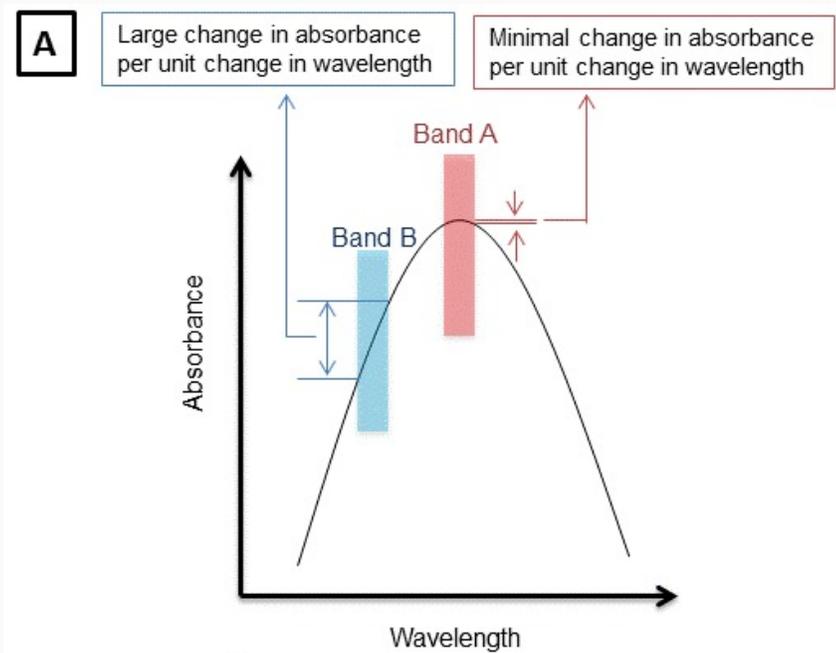
05/10/2021





# DESVIOS DA LEI DE BEER-LAMBERT

“A lei de Beer é válida para **radiação monocromática** passando através de uma **solução diluída ( $\leq 0,01M$ )**, na qual a espécie absorvente não esteja participando de um equilíbrio que seja dependente da concentração”





# DESVIOS DA LEI DE BEER-LAMBERT

## DESVIOS QUÍMICOS

- 1- Interações químicas do soluto  
(Ex. sistemas com formação de diferentes complexos com valores de absorvidade diferentes ou presença de impurezas)
- 2- Mudanças do índice de refração com a concentração
- 3- Variações no pH
- 4- Pureza e estabilidade dos reagentes

05/10/2021

## DESVIOS INSTRUMENTAIS

- 1- Esgotamento da célula fotoelétrica
- 2- Troca da lâmpada de maneira a alterar a quantidade de luz que chega à célula
- 3- Poeira dentro do equipamento (provoca desvios da luz)
- 4- Troca de filtros sem a devida calibração posterior
- 5- Uso de células feitas com material inadequado para a medida





# LEI DE BEER-LAMBERT

Desvios aparentes da Lei de Beer surgem quando um analito se dissocia, se associa, ou reage com um solvente para dar um produto que tem um espectro de absorção diferente do analito

**IMPORTANTE**



A lei de Beer também se aplica a um meio contendo mais de uma espécie de substâncias absorventes. Neste caso, a absorbância total para um sistema com múltiplos componentes é dada por:

$$A_{\text{total}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \epsilon_1 bc_1 + \epsilon_2 bc_2 + \dots + \epsilon_3 bc_3$$

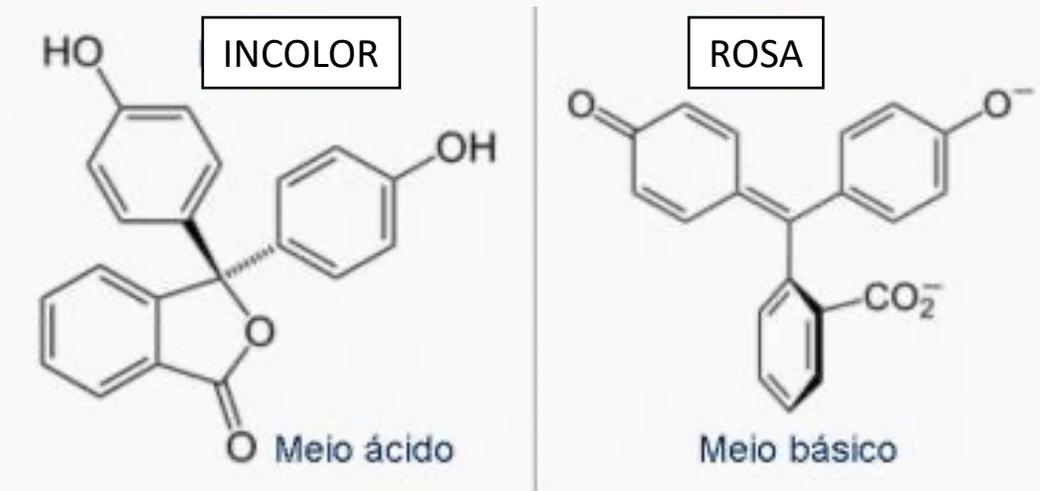




# LEI DE BEER-LAMBERT

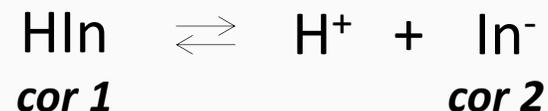
Desvios aparentes da Lei de Beer surgem quando um analito se dissocia, se associa, ou reage com um solvente para dar um produto que tem um espectro de absorção diferente do analito

**Exemplo prático.** Soluções aquosas de indicadores ácido-base





# LEI DE BEER-LAMBERT



As absorptividades molares a 430 e 570 nm do ácido fraco HIn ( $K_a = 1,42 \times 10^{-5}$ ) e sua base conjugada  $\text{In}^-$  foram determinadas por medidas em soluções fortemente ácidas e fortemente alcalinas do indicador. Nessas condições, essencialmente todo o indicador está nas formas HIn e  $\text{In}^-$ , respectivamente. Os resultados foram:

		$\epsilon_{430}$	$\epsilon_{570}$
ÁCIDA $\longrightarrow$	HIn	$6,30 \times 10^2$	$7,12 \times 10^3$
BÁSICA $\longrightarrow$	$\text{In}^-$	$2,06 \times 10^4$	$9,61 \times 10^2$

- Calcule as absorvâncias para soluções que têm concentrações totais de indicador iguais a 2, 4, 8, 12 e  $16 \times 10^{-5}$  M.



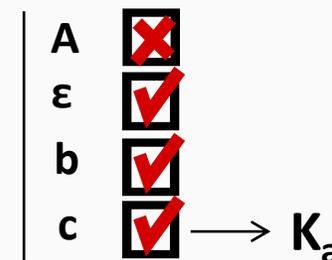
# LEI DE BEER-LAMBERT

Calcule as absorvâncias para soluções que têm concentrações totais de indicador iguais a 2, 4, 8, 12 e 16 x 10<sup>-5</sup> M.

1- Determinação das incógnitas:  $A = \epsilon \cdot b \cdot c$

2- Construção de tabela com os valores calculados e posterior construção de curvas [A (y) vs. Concentração de indicador (x)] em 430 e 570 nm

$C_{HIn}, M$	[HIn]	[In <sup>-</sup> ]	$A_{430}$	$A_{570}$
$2,00 \times 10^{-5}$	$K_a$	$K_a$	$\epsilon \cdot b \cdot c$	$\epsilon \cdot b \cdot c$
$4,00 \times 10^{-5}$	$K_a$	$K_a$	$\epsilon \cdot b \cdot c$	$\epsilon \cdot b \cdot c$
$8,00 \times 10^{-5}$	$K_a$	$K_a$	$\epsilon \cdot b \cdot c$	$\epsilon \cdot b \cdot c$
$12,00 \times 10^{-5}$	$K_a$	$K_a$	$\epsilon \cdot b \cdot c$	$\epsilon \cdot b \cdot c$
$16,00 \times 10^{-5}$	$K_a$	$K_a$	$\epsilon \cdot b \cdot c$	$\epsilon \cdot b \cdot c$





# LEI DE BEER-LAMBERT



Soma das concentrações das espécies HIn e  $\text{In}^-$  = CONCENTRAÇÃO  
TOTAL ANALÍTICA DO INDICADOR =  $2,00 \times 10^{-5} \text{ M}$

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{In}^-]}{[\text{HIn}]} \longrightarrow \frac{[\text{In}^-]^2}{2,00 \times 10^{-5} - [\text{In}^-]} = 1,42 \times 10^{-5}$$

$$[\text{In}^-]^2 + 1,42 \times 10^{-5}[\text{In}^-] - 2,84 \times 10^{-10} = 0$$

Solução positiva:  $[\text{In}^-] = 1,12 \times 10^{-5}$

Sendo  $[\text{HIn}] + [\text{In}^-] = 2,00 \times 10^{-5} \text{ M} \longrightarrow [\text{HIn}] = 0,88 \times 10^{-5} \text{ M}$





# LEI DE BEER-LAMBERT



**Cálculo a partir do  $K_a$ :**  $[\text{In}^-] = 1,12 \times 10^{-5}$  e  $[\text{HIn}] = 0,88 \times 10^{-5}$  M

**Lei de Beer para misturas:**

$$A_{\text{total}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \epsilon_1 b c_1 + \epsilon_2 b c_2 + \dots + \epsilon_n b c_n$$

$$A_{430} = A_{\text{HIn}(430\text{nm})} + A_{\text{In}^-(430\text{nm})} = \epsilon_{\text{HIn}} b c_{\text{HIn}} + \epsilon_{\text{In}^-} b c_{\text{In}^-}$$

$$= (6,30 \times 10^2 \times 1,00 \times 0,88 \times 10^{-5}) + (2,06 \times 10^4 \times 1,00 \times 1,12 \times 10^{-5})$$





# LEI DE BEER-LAMBERT



**Cálculo a partir do  $K_a$ :**  $[\text{In}^-] = 1,12 \times 10^{-5}$  e  $[\text{HIn}] = 0,88 \times 10^{-5}$  M

**Lei de Beer para misturas:**

$$A_{\text{total}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \epsilon_1 b c_1 + \epsilon_2 b c_2 + \dots + \epsilon_n b c_n$$

$$A_{570} = A_{\text{HIn}(570\text{nm})} + A_{\text{In}^-(570\text{nm})} = \epsilon_{\text{HIn}} b c_{\text{HIn}} + \epsilon_{\text{In}^-} b c_{\text{In}^-}$$

$$= (7,12 \times 10^3 \times 1,00 \times 0,88 \times 10^{-5}) + (9,61 \times 10^2 \times 1,00 \times 1,12 \times 10^{-5})$$





# LEI DE BEER-LAMBERT

Calcule as absorvâncias para soluções que têm concentrações totais de indicador iguais a 2, 4, 8, 12 e 16 x 10<sup>-5</sup> M.

1- Determinação das incógnitas:  $A = \epsilon \cdot b \cdot c$

2- Construção de tabela com os valores calculados e posterior construção de curvas [A (y) vs. Concentração de indicador (x)] em 430 e 570 nm

$C_{HIn}, M$	[HIn]	[In <sup>-</sup> ]	$A_{430}$	$A_{570}$
2,00 x 10 <sup>-5</sup>	0,88 x 10 <sup>-5</sup>	1,12 x 10 <sup>-5</sup>	0,236	0,073
4,00 x 10 <sup>-5</sup>	2,22 x 10 <sup>-5</sup>	1,78 x 10 <sup>-5</sup>	0,381	0,175
8,00 x 10 <sup>-5</sup>	5,27 x 10 <sup>-5</sup>	2,73 x 10 <sup>-5</sup>	0,596	0,401
12,00 x 10 <sup>-5</sup>	8,52 x 10 <sup>-5</sup>	3,48 x 10 <sup>-5</sup>	0,771	0,640
16,00 x 10 <sup>-5</sup>	11,9 x 10 <sup>-5</sup>	4,11 x 10 <sup>-5</sup>	0,922	0,887

A

$\epsilon$

b

c  →  $K_a$





# LEI DE BEER-LAMBERT

Exemplo de desvio da Lei de Beer que surge quando o **sistema absorvedor sofre dissociação**

