

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”  
Departamento de Ciências Exatas  
LCE 116 Química Analítica Inorgânica Prática

## **AULA PRÁTICA 8**

### **ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR APLICAÇÃO NA QUANTIFICAÇÃO DE FÓSFORO FITODISPONÍVEL DE SOLOS**

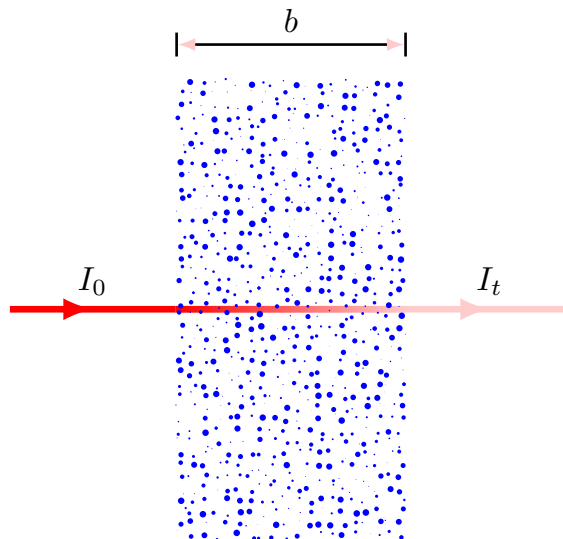
**PIRACICABA-SP**  
**JULHO - 2021**

## 1 Introdução

Ondas eletromagnéticas são aquelas formadas por um campo elétrico e um campo magnético perpendiculares entre si. Essas ondas podem se propagar no vácuo e apresentam velocidade constante aproximadamente igual a  $300.000 \text{ km s}^{-1}$ . Segundo a conhecida dualidade partícula-onda da mecânica quântica, a luz é formada por fótons e tem a sua intensidade ligada ao número deles. De maneira simplificada, pode-se dizer que os fótons são partículas que formam a radiação eletromagnética.

Considere um experimento no qual uma radiação eletromagnética de comprimento de onda  $\lambda$  e intensidade  $I_0$  fótons por segundo incida sobre uma solução colorida que se encontra em um recipiente denominado cubeta. Ao atravessar uma distância  $b$  dentro da solução a radiação sofre atenuação e emerge com intensidade  $I_t$  fótons por segundo de modo que  $I_t < I_0$ .

Esquematicamente, tem-se:



A atenuação da radiação consiste em uma diminuição do número de fótons em relação à quantidade de fótons incidentes. Essa diminuição pode ser entendida por meio de uma analogia mecânica segundo a qual os fótons deixam de existir após colidirem com moléculas do soluto que, por sua vez,

recebem a energia desses fótons. A intensificação da cor da solução contida na cubeta implica em maior absorção de fótons e, conseqüentemente, maior diminuição da quantidade de fótons emergentes ou transmitidos ( $I_t$ ).

A atenuação da radiação incidente sobre uma solução permite a quantificação de elementos químicos. Para tanto, são utilizados reagentes que formam com o elemento a ser analisado um composto específico que apresenta uma determinada cor que atenuará a radiação incidente. Quanto maior for quantidade do elemento mais intensa será a cor da solução e maior será a atenuação da radiação.

Duas simples leis de absorção da luz incidente por um meio colorido são a base dos métodos espectrofotométricos. Uma delas, a Lei de Lambert<sup>1</sup>, é baseada no fato de que a intensidade de radiação incidente decresce de forma exponencial com o aumento da espessura  $b$  por ela atravessada. Mais tarde, Beer<sup>2</sup> demonstrou que a absorção de fótons por uma solução colorida decresce exponencialmente com o aumento da concentração do elemento responsável pela formação da cor.

Por meio da combinação dessas duas Leis foi obtida a Lei de Lambert-Beer, a qual pode ser expressa pela seguinte equação:

$$I_t = I_0 e^{-kcb} \quad (1)$$

---

<sup>1</sup>Johann Heinrich Lambert (26/08/1728 - 25/09/1777) foi um polímata suíço que deu importantes contribuições para a matemática, a física, a filosofia, a astronomia e a cartografia.

<sup>2</sup>August Beer (31/07/1825 - 18/11/1863) foi um físico, químico e matemático alemão.

em que:

$I_t$  é a intensidade de fótons transmitida expressa em fótons por segundo;

$I_o$  é a intensidade de fótons incidentes também expressa em fótons por segundo;

$e$  é base dos logaritmos neperianos (2,71828 ...);

$k$  é uma constante denominada absortividade molar; seu valor depende do comprimento de onda da radiação incidente e da natureza da solução;

$c$  é a concentração do analito;

$b$  é a espessura da cubeta, também conhecida como caminho óptico.

Rearrajando a equação (1) tem-se:

$$\frac{I_t}{I_o} = e^{-kcb} \quad (2)$$

Aplicando-se o logaritmo neperiano em ambos os membros da equação (2) tem-se:

$$\ln \frac{I_t}{I_o} = \ln e^{-kcb} \quad (3)$$

Assim:

$$\ln \frac{I_t}{I_o} = -kcb \quad (4)$$

Multiplicando-se a igualdade por -1:

$$\ln \frac{I_o}{I_t} = kcb \quad (5)$$

Transformando-se o logaritmo neperiano em logaritmo decimal:

$$2,303 \log_{10} \frac{I_o}{I_t} = kcb \quad (6)$$

Assim:

$$\log_{10} \frac{I_0}{I_t} = \frac{kb}{2,303} c \quad (7)$$

Para cada solução a ser analisada em um mesmo equipamento tem-se que a absorvidade molar  $k$  e a espessura da cubeta  $b$  são constantes. Assim:

$$\log_{10} \frac{I_0}{I_t} = K c \quad (8)$$

Por definição, o termo  $\log_{10} I_0/I_t$  é denominado absorbância, grandeza representada por  $A$ . Assim, finalmente, tem-se:

$$A = K c \quad (9)$$

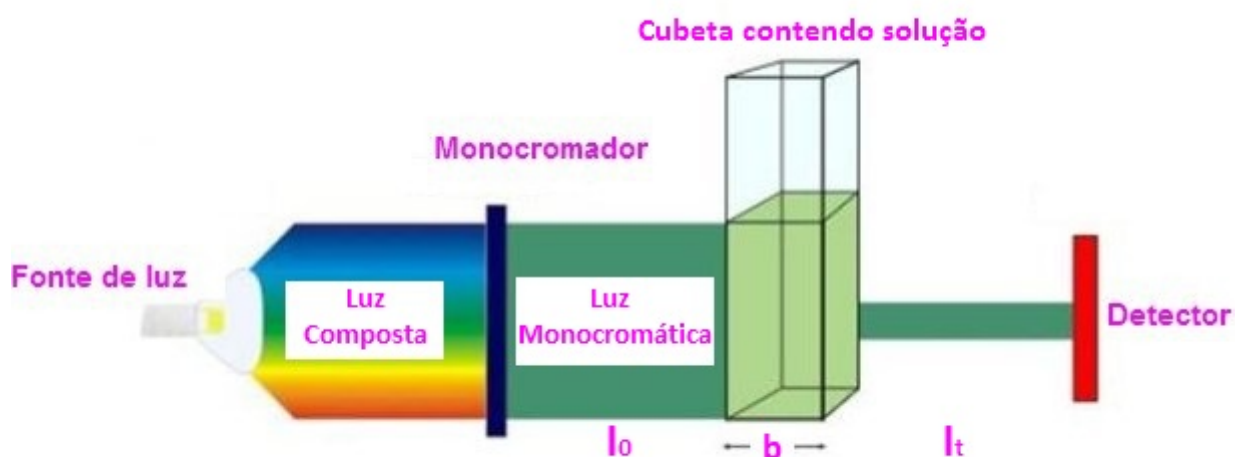
A equação (9) pode ser comparada à equação da reta  $y = ax + b$  sendo  $y = A$ ,  $a = K$ ,  $x = c$  e  $b = 0$ .

Valores de absorbância são obtidos experimentalmente por meio de medidas de intensidade transmitida de fótons ( $I_t$ ). Essas medidas são feitas em equipamentos denominados espectrofotômetros de absorção molecular. Esses aparelhos, por sua vez, possuem uma lâmpada que emite luz composta por diferentes comprimentos de onda e um monocromador que permite a passagem de apenas um comprimento de onda. Esse comprimento de onda é estabelecido por meio do estudo do espectro de absorção e corresponde àquele que possibilita o maior valor de absorbância. Para a quantificação de fósforo, por exemplo, emprega-se o comprimento de onda de 640 nm; já para a quantificação do ânion nitrato o comprimento de onda empregado é o de 410 nm.

Após passar pelo monocromador, a radiação incide com intensidade  $I_0$  em uma cubeta que contém a solução a ser analisada e a atravessa sendo

parcialmente absorvida. A radiação remanescente atinge o detector de fótons que os quantifica dando assim origem ao valor  $I_t$ . Tendo em vista que o valor de  $I_0$  é fixo, o valor de  $I_t$  é finalmente convertido pelo próprio aparelho em valor de absorbância ( $A$ ).

Esquemáticamente, tem-se:



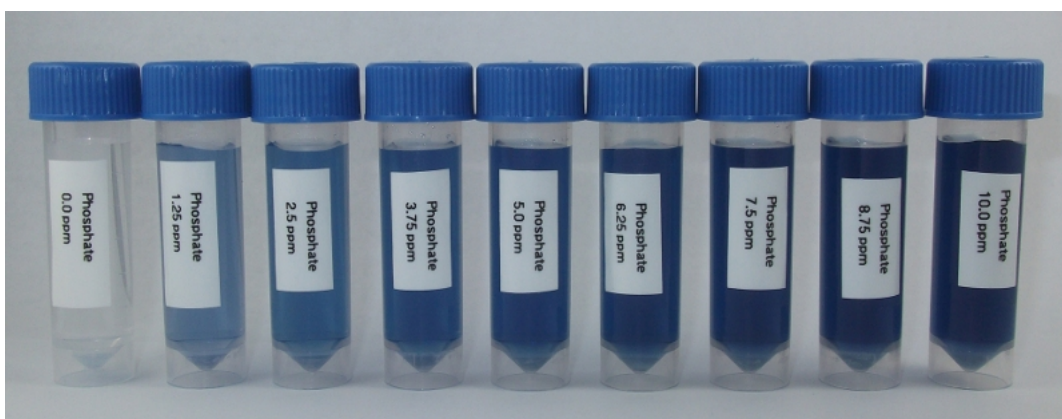
## 2 Etapas do método espectrofotométrico

### 2.1 Calibração do espectrofômetro

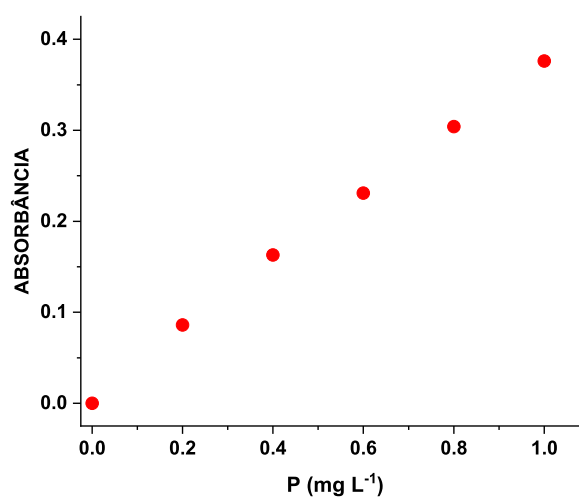
A primeira etapa de uma análise espectrofotométrica consiste em se obter a equação da reta (Eq. 9) que relaciona os valores de absorbância aos respectivos valores de concentração do elemento a ser analisado, procedimento que recebe o nome de calibração.

A calibração do espectrofotômetro é realizada por meio do preparo de soluções cujas concentrações do elemento a ser analisado são exatamente conhecidas e da determinação de seus valores de absorbância. Em seguida, elabora-se um diagrama de dispersão que deverá indicar uma relação linear entre os valores de concentração e seus respectivos valores de absorbância.

Na figura abaixo é apresentado um conjunto de soluções que contém quantidades crescentes de fósforo e que podem ser utilizadas na calibração do espectrofotômetro. A tabela abaixo apresenta valores de concentração de fósforo e seus respectivos valores de absorbância para seis soluções aquosas. O diagrama de dispersão dos pontos experimentais indica a existência de relação linear entre as variáveis supracitadas.



| P (mg L <sup>-1</sup> ) | ABSORBÂNCIA |
|-------------------------|-------------|
| 0                       | 0           |
| 0,2                     | 0,086       |
| 0,4                     | 0,163       |
| 0,6                     | 0,231       |
| 0,8                     | 0,304       |
| 1,0                     | 0,376       |



Uma vez constatada essa relação linear, procede-se à determinação da equação que relaciona seus pontos. Essa equação, que consiste no modelo linear  $y = ax + b$ , é obtida por meio de um procedimento estatístico denominado análise de regressão linear. No caso do exemplo acima, os dados da tabela permitiram a obtenção da seguinte equação de regressão:  $y = 0,37171x + 0,00748$ , em que  $y$  é a absorbância e  $x$  é a concentração de P expressa em  $\text{mg L}^{-1}$ .

## 2.2 Análise da amostra

Uma vez obtida a equação da reta de calibração do espectrofotômetro, pode-se proceder à análise da amostra. Tal análise consiste em se tomar uma alíquota da solução a ser analisada e a ela adicionarem-se os reagentes que permitirão a obtenção de uma solução colorida. A única diferença entre essa etapa e a etapa de calibração do espectrofotômetro reside no fato de que na calibração tomou-se uma alíquota de uma solução cuja concentração do elemento era conhecida ao passo que, na análise, a concentração do elemento na solução cuja alíquota será tomada é desconhecida.

Considere-se que 10 mL de uma solução foram transferidos para um balão volumétrico de 50 mL cujo volume foi completado por meio da adição de água e de soluções reagentes. Promoveu-se, assim, uma diluição de  $50 \text{ mL} / 10 \text{ mL} = 5$  vezes da solução a ser analisada. Considerando-se que a absorbância obtida para a solução colorida foi igual a 0,200, pode-se calcular a concentração de P na solução colorida utilizando-se a equação de calibração do espectrofotômetro:

$$y = 0,37171x + 0,00748 \quad (10)$$



$$0,200 = 0,37171x + 0,00748 \quad (11)$$

Logo,  $x = 0,52 \text{ mg L}^{-1}$

Como a solução colorida era 50 vezes diluída em relação à solução analisada, tem-se que a concentração de P na solução cuja alíquota foi tomada para análise era igual a  $50 \times 0,52 \text{ mg L}^{-1} = 26 \text{ mg L}^{-1}$ .

### 3 Quantificação espectrofotométrica de fósforo

Embora a espectrofotometria de absorção molecular possa ser utilizada para a quantificação de vários elementos, ela será aqui estudada tomando-se como exemplo uma adaptação da determinação de fósforo proposta por Murphy & Riley (1962)<sup>3</sup>.

**FUNDAMENTO:** A quantificação do fósforo dissolvido em solução aquosa é realizada por meio da medida da absorbância da forma reduzida do ácido 18-molibdobismutofosfórico (18-MBiPA). O ácido 18-MBiPA é formado na reação do ânion ortofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) com o ânion molibdato ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) e o cátion bismuto ( $\text{Bi}^{3+}$ ). Essa reação ocorre em meio ácido e a redução do ácido 18-MBiPA ocorre pela ação do ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ). A forma reduzida do ácido 18-MBiPA confere à solução coloração azulada cuja intensidade é proporcional à quantidade de fósforo nela dissolvida.

---

<sup>3</sup>Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, v. 27. p. 31-36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)

## Equações simplificadas representativas das reações ocorrentes

### Formação do ácido 18-MBiPA



### Redução do ácido 18-MBiPA pelo ácido ascórbico



## PROCEDIMENTO

### 1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE SOLO

**1.1** Uma subamostra de 5 cm<sup>3</sup> (0,005 dm<sup>3</sup>) de um solo agrícola e 100 mL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,025 mol L<sup>-1</sup> foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 250 mL;

**1.2** A suspensão foi agitada por 15 minutos e filtrada através de papel de filtro Whatman® n° 1;

**1.3** Os extratos foram armazenados em frascos plásticos.

### 2 CALIBRAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO

**2.1** 0,0110 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (136 mg mmol<sup>-1</sup>) previamente seco em estufa a 105 °C por duas horas foram dissolvidos em 250 mL de água. Essa solução apresentou 10 mg L<sup>-1</sup> P;

**2.2** Seis alíquotas da solução supracitada (0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL) foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL que, em seguida, receberam as seguintes soluções: 20 mL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,025 mol L<sup>-1</sup>, 5 mL de reativo sulfo-bismuto-molíbico e 1 mL de solução de ácido ascórbico 30 g L<sup>-1</sup>. Ao final completou-se o volume de cada balão com água destilada. Passados 15 minutos,

determinaram-se as absorvâncias ( $A$ ) de cada solução em cubeta de 10 mm de espessura ( $b$ ) colocada em espectrofotômetro operado no comprimento de onda de 640 nm. Os respectivos valores encontrados para a absorvância foram:

| P (mg L <sup>-1</sup> ) | ABSORVÂNCIA | P (mg L <sup>-1</sup> ) | ABSORVÂNCIA |
|-------------------------|-------------|-------------------------|-------------|
| 0                       | 0           | 0,6                     | 0,228       |
| 0,2                     | 0,078       | 0,8                     | 0,304       |
| 0,4                     | 0,157       | 1,0                     | 0,378       |

**2.3** Equação obtida para a reta de calibração:  $y = 0,37700x + 0,00233$ , em que  $y$  = absorvância e  $x$  = concentração de P na solução (mg L<sup>-1</sup>).

### 3 ANÁLISE DO EXTRATO DE SOLO

**3.1** Transferir 10 mL de extrato para balão volumétrico de 50 mL;

**3.2** Adicionar 5 mL de reativo sulfo-bismuto-molíbico;

**3.3** Adicionar 1 mL de solução de ácido ascórbico 30 g L<sup>-1</sup>;

**3.4** Completar o volume com água destilada;

**3.5** Aguardar 15 minutos;

**3.6** Determinar a absorvância em cubeta de 10 mm de espessura no comprimento de onda de 640 nm.

### 4 CÁLCULOS

Considerando-se que a absorvância obtida para a solução colorida foi igual a 0,095, calcular o teor de P da amostra de solo expressando-o em mg dm<sup>-3</sup>.

#### 4.1 DADOS

- Quantidade analisada de solo:  $0,005 \text{ dm}^3$
- Volume de extrato: 100 mL ou 0,1 L
- Alíquota do extrato utilizada na análise: 10 mL
- Volume da solução colorida: 50 mL
- Equação da reta:  $y = 0,37700x + 0,00233$
- Absorbância: 0,095

#### 4.2 CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE P NA SOLUÇÃO AZUL

Utilizando-se o valor obtido para a absorbância e a equação da reta pode-se calcular a concentração de P na solução azul:

$$y = 0,37700x + 0,00233 \quad (12)$$

$$0,095 = 0,37700x + 0,00233 \quad (13)$$

Logo,  $x = 0,25 \text{ mg L}^{-1}$

#### 4.3 CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE P NO EXTRATO

Segundo os dados do problema, 10 mL do extrato foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL para que a solução azul fosse preparada. Dessa forma, houve uma diluição do extrato de  $50 \text{ mL} / 10 \text{ mL} = 5$  vezes. Logo, a concentração de P na solução azul é 5 vezes menor que no extrato; assim a concentração de P no extrato será igual a  $5 \times 0,25 \text{ mg L}^{-1} = 1,25 \text{ mg L}^{-1}$ .

#### 4.4 CÁLCULO DA MASSA DE P CONTIDA NO EXTRATO

O volume do extrato igual a 100 mL ou 0,1 L e sua concentração de P igual a 1,25 mg L<sup>-1</sup>. Lembrando que  $c = m/V$  tem-se que  $m = cV$  e assim  $m = 1,25 \cdot 0,1$ . Logo  $m = 0,125$  mg.

#### 4.5 CÁLCULO DA MASSA DE P CONTIDA NA AMOSTRA DE SOLO

Todo o fósforo contido no extrato é proveniente da amostra de solo analisada. Assim, em 0,005 dm<sup>3</sup> havia 0,125 mg de P.

#### 4.6 CÁLCULO DO TEOR DE P CONTIDO NA AMOSTRA DE SOLO

Se em 0,005 dm<sup>3</sup> de solo havia 0,125 mg de P em 1 dm<sup>3</sup> haverá 25 mg de P. Logo, o teor de P do solo é de **25 mg dm<sup>-3</sup>**.

## **RELATÓRIO 6. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR. APLICAÇÃO NA QUANTIFICAÇÃO DE FÓSFORO FITODISPONÍVEL DO SOLO**

**FORMATO** Elabore o relatório utilizando o editor Word com fonte Tahoma, tamanho 11, margens superior e esquerda de 2,5 cm e margens inferior e direita de 2 cm. Envie o relatório via MOODLE, em formato portable document file (PDF), até o dia 09/07/2021.

**1 DESCRIÇÃO GERAL** Nesse item, explique de modo geral o procedimento que deve ser seguido para a quantificação do fósforo fitodisponível de solos.

### **2 REAGENTES E MATERIAIS**

Nesse item, faça uma listagem dos reagentes e dos materiais e equipamentos utilizados. Em relação aos materiais, elabore uma tabela e apresente na mesma imagens obtidas da web de todos os materiais e equipamentos descritos na presente NOTA DE AULA COMPLEMENTAR. Liste também todas as soluções utilizadas nas diferentes etapas do método.

### **3 QUESTÕES**

- Soluções totalmente “transparentes” podem ser analisadas com o método estudado? Explique.
- O que é e qual a finalidade da etapa de calibração do espectrofotômetro?
- Por que muitas vezes é necessário proceder-se à diluição do extrato para a quantificação colorimétrica de fósforo?
- Considere uma amostra de solo ( $0,005 \text{ dm}^{-3}$ ) que foi colocada em contato com 125 mL de solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,025 \text{ mol L}^{-1}$  para a extração de fósforo. Após a filtragem da suspensão, 12,5 mL do extrato foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL ao qual foram também adicionados reagentes para o desenvolvimento da cor azul; em seguida o volume do

balão foi completado com água deionizada. Se a equação da reta de calibração do espectrofotômetro é dada por  $y = 0,37700x + 0,00233$  e a absorbância da solução azul é igual a 0,350, calcule o teor de fósforo do solo expressando-o em  $\text{mg dm}^{-3}$ . **RESPOSTA = 92  $\text{mg dm}^{-3}$**