

## **Espectrofotometria I**

### Introdução

Espectrofotometria encontra ampla aplicação em biociências. Espectrofotômetros são instrumentos relativamente fáceis de se usar, que funcionam de acordo com princípios bem estabelecidos e de fácil compreensão. Os experimentos propostos para esta aula deverão ilustrar duas dentre as várias aplicações da fotometria: quantificação e caracterização de compostos químicos em solução.

### **Objetivos:**

- Adquirir familiaridade com uso e funcionamento de espectrofotômetros.
- Determinar experimentalmente espectro de absorção de compostos químicos.
- Verificar propriedades da lei de Lambert-Beer. Escalas de absorbância (A) e transmitância (T).
- Discutir aplicações da espectrofotometria em química analítica, bioquímica, etc.

### **Material:**

- Espectrofotômetro digital. Cubetas.
- Vidraria e pipetas, para preparo de soluções.
- Soluções: p-NO<sub>2</sub>-anilina (pNA) 0.25 mM; KMnO<sub>4</sub> 1.5 mM; verde de metila 50 µM; H<sub>2</sub>O. Bateria de pNA em concentrações de 5 a 100 µM.

### **Procedimentos experimentais:**

#### A) Espectro de absorção

a) Dilua, separadamente, 1.0 ml de cada solução estoque de pNA, KMnO<sub>4</sub> ou verde de metila em 4.0 ml de H<sub>2</sub>O e agite.

b) Tendo unicamente solvente na cubeta do espectrofotômetro, H<sub>2</sub>O no caso, ajuste a leitura de absorbância (A) para zero no comprimento de onda (λ) de 370 nm.

c) Com cada uma das soluções diluídas, em cubetas separadas, tome as respectivas leituras de A em 370 nm e anote o valor.

d) Repita, sucessivamente, as operações b) e c) após ajustar o comprimento de onda do espectrofotômetro para valores 15 nm maiores, até 700 nm, anotando os valores lidos.

e) Mostre, em um único gráfico, os espectros de absorção para as três substâncias. Espectro de absorção é obtido colocando-se em gráfico A em função de  $\lambda$ .

## B) Lei de Beer

Usando H<sub>2</sub>O como referência, meça as A<sub>410nm</sub> de cada solução de pNA nas concentrações de 5 a 100  $\mu$ M e anote. Construa gráfico A<sub>410nm</sub> vs. pNA ( $\mu$ M).

## Discussão

- Qual o enunciado da Lei de Beer e da Lei de Lambert-Beer?
- Quais instrumentos disponíveis no laboratório poderiam comprovar a lei de Lambert-Beer?
- Como se convencer, experimentalmente, de que um composto colorido absorve luz de  $\lambda$  complementar?
- A Lei de Beer é intuitiva? E o fato de A ser proporcional ao *logaritmo* de 1/T?

## Material acessório

Disco com cores do espectro visível. Cores complementares estão opostas no disco.

