

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSCar

Gabriela Gomes Guimarães

Espectrofotômetro de Absorção UV-VIS

São Carlos

2021

GABRIELA GOMES GUIMARÃES

Espectrofotômetro de Absorção UV-VIS

Trabalho para a disciplina de Espectroscopia Óptica

Orientador: Dr. Sebastião Pratavieira; Dr. Vanderlei Bagnato

São Carlos

2021

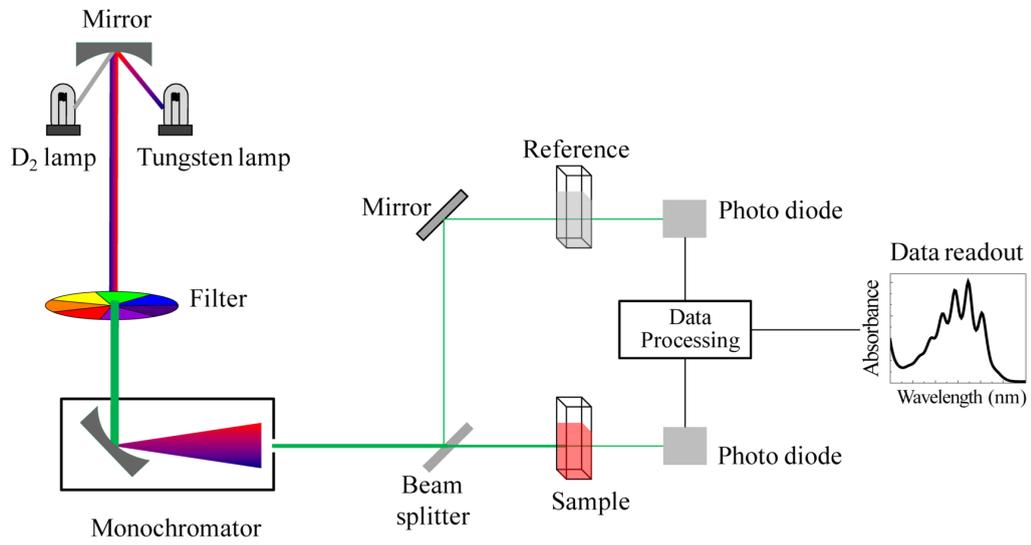
1 Introdução

Espectrofotometria na região UV-VIS do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função de robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas. Os procedimentos envolvem medidas diretas de espécies que absorvem radiação, medidas após derivação química e acoplamento a diversas técnicas ou processos, como cromatografia, eletroforese e análises em fluxo. Além disso, constitui-se em uma importante ferramenta para determinação de parâmetros físico-químicos, tais como constantes de equilíbrio e de velocidade de reações (ROCHA, 2014).

A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se: $A = \log(I_0 / I) = \epsilon bc$, onde A é a absorvância, I_0 é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absorvidade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo c é a concentração da espécie absorvente e b , a distância percorrida pelo feixe através da amostra (PERKAMPUS, 1992).

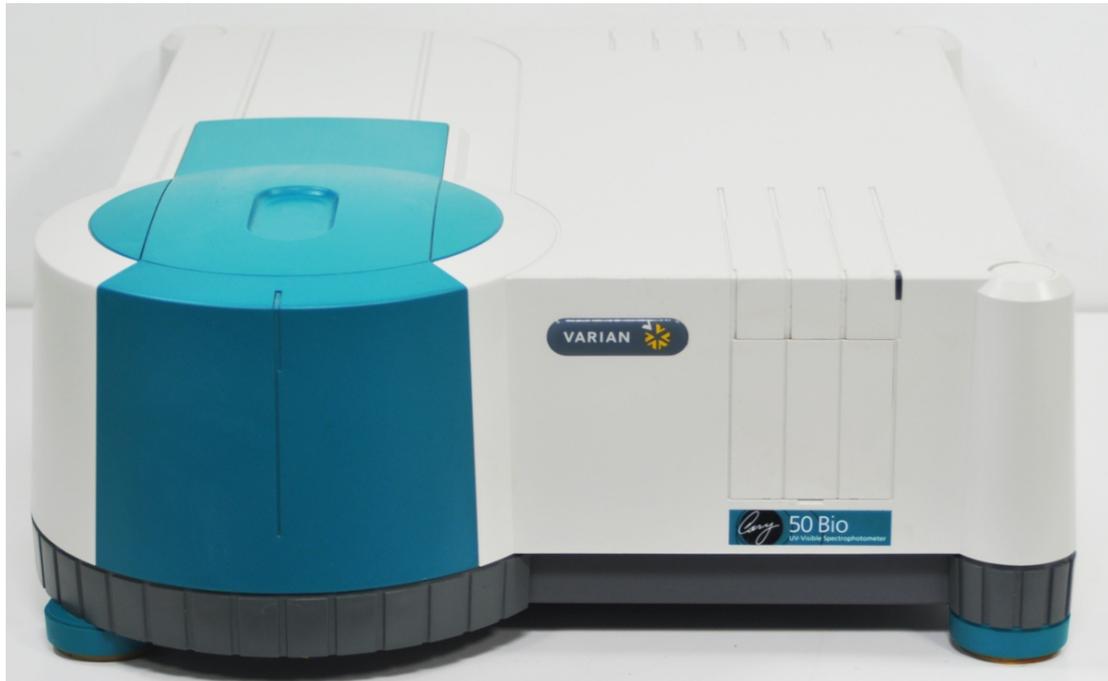
A luz ultravioleta e a luz visível fornecem energia causando as transições eletrônicas, promoção de um elétron para um orbital de maior energia. Dependendo da energia necessária para a transição eletrônica, a molécula pode absorver na região do ultravioleta ou no visível. A luz ultravioleta é a radiação eletromagnética com comprimento de onda entre 180 e 400 nm, a luz visível apresenta o comprimento de onda na região entre 400 e 780 nm. Os espectrofotômetros podem ser de feixe simples ou de feixe duplo onde um feixe de luz passa por um divisor de feixe o qual alternadamente direciona este para a amostra ou para a cela de referência várias vezes por segundo (SPUDEIT, 2009).

Figura 1: Diagrama de um espectrofotômetro de duplo feixe.



2 Caracterização Espectrofotômetro Varian Cary 50

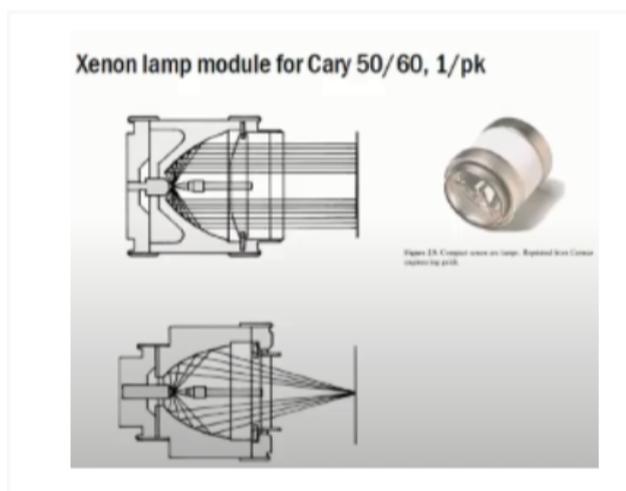
Figura 2. Espectrofotômetro Varian Cary 50



2.1 Fonte de Luz

O Espectrofotômetro Varian Cary 50, possui um feixe duplo, monocromador, com uma fonte única de lâmpada de pulso Xe (Xenônio) de espectro total com vida excepcionalmente longa, com detectores de diodo duplo de Si (Silício), óptica revestida de quartzo.

Figura 3: Lâmpada de pulso de Xenônio



2.2 Range (Alcance)

O Espectrofotômetro Varian Cary 50, possui uma faixa de comprimento de onda de 190-1100 nm, aproximadamente 1,5 nm largura de banda espectral fixa, com taxas de varredura de até 24.000 nm / min.

2.3 Detectores

O Espectrofotômetro Varian Cary 50, possui 2 detectores de silício.

Figura 4. Fotodiodo de Silício



2.4 Tipos de medidas

A transmitância na espectroscopia óptica, é a fração da luz incidente com um comprimento de onda específico, que atravessa uma amostra de matéria, portanto, ela mede o número de fótons emitidos, pelo número de fótons incidente, e também é relacionado diretamente com a absorbância. A absorbância é a capacidade intrínseca dos materiais em absorver radiações em frequência específica.

Quando a absorvância de uma solução aumenta, a transmitância diminui, elas tendem a ser grandezas complementares. Assim, sua soma (para a mesma energia e comprimento de onda incidente), é aproximadamente igual a 1, ou 100%, portanto, se 90% da luz é absorvida, então 10% é transmitida.

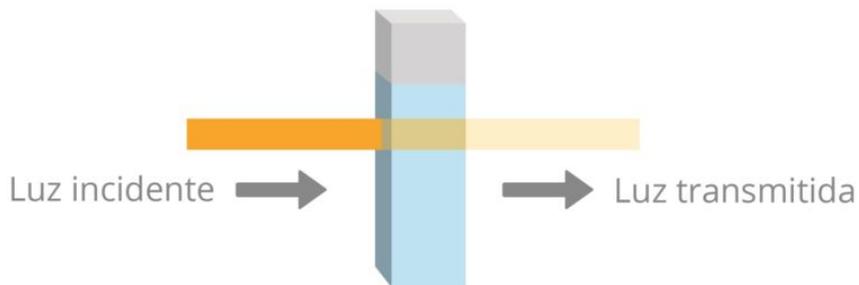
Figura 5. Equações e relação entre transmitância e absorvância.



Transmittance $T = \frac{I_1}{I_0}$

Absorbance $A = -\log T = -\log \frac{I_1}{I_0}$

Figura 6. Relação transmitância e absorvância.

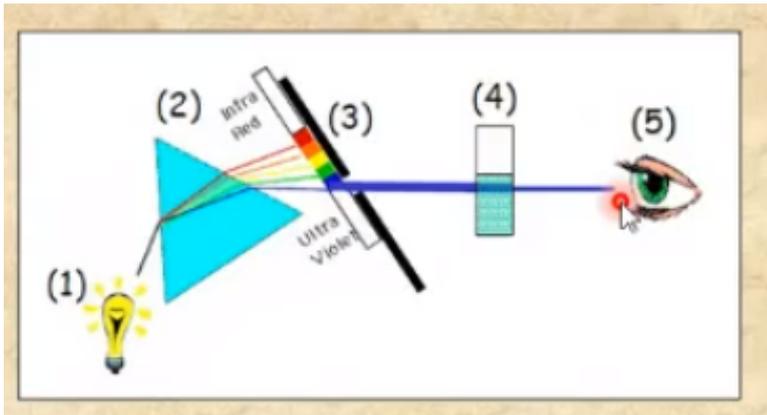


Como realizar um espectro de absorção na prática?

A ideia ao realizarmos um espectro de absorção, é medirmos o quanto de luz é absorvida por uma determinada estrutura.

1. Fonte de luz específica
2. Elemento dispersivo (prisma, grade de difração, e etc).
3. A luz irá passar através da amostra
4. A luz transmitida é medida com um fotodetector
5. Compare a quantidade de luz recebida com e sem amostra

Figura 7. Espectro de absorção



Já a reflectância, é a proporção entre o fluxo de radiação eletromagnética incidente numa superfície e o fluxo que é refletido, ou seja, é a fração incidente refletida pela matéria.

Figura 8. Equação reflectância.

$$R = \frac{F_r}{F_T}$$

R: reflectância;

Fr: fluxo de radiação eletromagnética refletido;

Ft; fluxo de radiação eletromagnética incidente;

2.5 Qual cubeta melhor para cada situação?

- **Cubeta de plástico:** Uso no visível (~380 nm - 780 nm)

A cubeta de plástico é ideal para a maioria das medidas, em especial com solventes que dissolve a cola das cubetas.

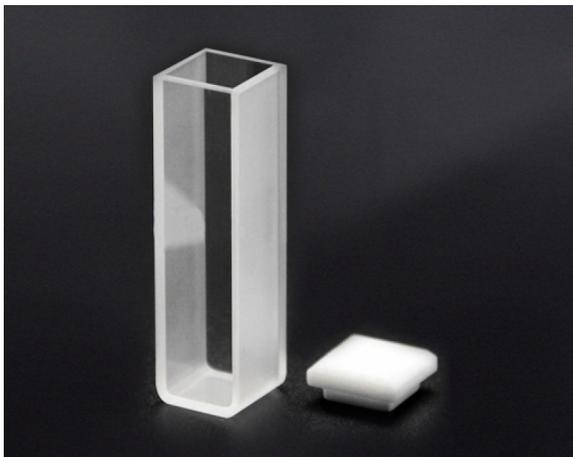
Figura 9. Cubeta de plástico



- **Cubeta de vidro:** Uso no visível (~380 nm - 780 nm).

A cubeta de vidro é ideal para medidas com necessidade de uma maior precisão, pois o ruído irá ser baixo, ou a amostra não pode ter contato com o plástico,

Figura 10. Cubeta de vidro



- **Cubeta de quartzo:** Uso no UV/Visível/NIR (~190 nm - 2000 nm)

A cubeta de quartzo é ideal para amostras que necessitam de transmissão/detecção fora do visível, particularmente no UV.

Figura 11. Cubeta de quartzo.



2.6 Dicas de como medir soluções com microorganismos

Ao realizarmos medidas de soluções contendo microorganismos, devemos:

❑ Utilizar a cubeta ideal para aquela situação (plástico ou vidro).

❑ Selecionar o comprimento de onda adequado de acordo com o microorganismo.

❑ Ter cuidado ao manusear o equipamento, para não contaminá-lo.

❑ Deixá-lo limpo após utilizar, para que outra possa usá-lo, e não contaminar suas amostras.

Protocolo para a operação do Espectrofotômetro Varian Cary 50

Antes de começar:

- Planeje para ligar o equipamento 30 minutos antes de começar as leituras, para que a lâmpada possa estabilizar;
- Escolha uma cubeta limpa e sem riscos;
- Antes de colocar a cubeta no equipamento, certifique-se que ela não apresente bolhas, partículas, nem nenhum tipo de sujeira;

Inicialização

1. Ligue o computador. Não é necessário apertar nenhum botão no equipamento;
2. Abra o *software* “Scan”, que está na área de trabalho do computador;
3. Clique em “Connect” e aguarde a inicialização do equipamento. Você saberá que está pronto quando, no lugar do “Connect”, surgir o botão “Start”;
4. Clique em “Setup”, no lado esquerdo, para selecionar o método de aquisição de dados;
5. Na janela principal do “Setup”, selecione os parâmetros ideais.
6. Clique na aba lateral que diz “Baseline” e selecione “zero/baseline”;
7. Selecione “Ok” para concluir o Setup;
8. Insira a cubeta com o branco no equipamento; tome cuidado com a orientação da mesma, não esquecendo que o feixe de luz deve atravessar as faces translúcidas da cubeta.
9. Clique no botão “Zero” até que o indicador de absorbância no lado esquerdo da tela indique um valor próximo de zero; não há problema se esse valor for negativo;
10. Então clique no botão “Baseline”; o programa vai emitir uma mensagem pedindo para que você coloque a solução de branco, que já deve estar lá; aperte “Ok”;
11. Em seguida, o programa vai mostrar outra mensagem, pedindo para que você bloqueie o feixe de luz com um objeto e aperte “Ok”;
12. Remova o objeto bloqueando o feixe de luz;

13. Selecione “*Start*”. O programa vai pedir para que você escolha a pasta em que vai salvar os dados, e dê um nome ao ser arquivo; esse nome corresponde ao conjunto de todas as leituras que serão feitas na sequência; Aperte “Ok”;
14. Agora você deve inserir o nome da sua primeira amostra. Faça uma leitura do branco para garantir que a linha de base foi feita corretamente;
15. Os valores de absorbância para o branco devem ser todos em torno de zero; caso haja alto ruído, algum pico inesperado, ou alguma distorção, descarte o conteúdo da cubeta, lave-a bem, e repita os passos 8 e 14.

Referências

KASSAB, Giulia. Protocolo para a operação do Espectrofotômetro Varian Cary 50. 2018, 3 páginas.

ROCHA, Fábio. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectroscopia UV-VIS. **Química Nova**, v.27, n.5, p.807-812, 2004.

SPUDEIT, Daniel. Determinação de parâmetros de qualidade do biodiesel utilizando espectrofotometria UV/VIS. 2009. p.2. Relatório apresentado ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

PERKAMPUS, Heiz. UV-VIS Spectroscopy and Its Applications. **Springer Laboratory**, 1992.

