

# Espectrofotometria - Conceitos e Aplicações

ERIK MUHAI BARBOSA MATSUNAGA 11202421756

EDUARDO DO AMARAL SILVA E BIELLA 11202421958

LEONARDO DIAS CRUZ TERRAZAS 11202421555

## Introdução:

Espectrofotometria é um método para análises bioquímicas. Através dele podemos determinar a concentração de um analito através da intensidade, luz absorvida ou transmitida pela solução. Sabendo a concentração e coletamos os dados de absorbância no espectrofômetro podemos desenhar uma curva padrão geralmente uma reta. Devido a natureza única de cada um dos analitos, cada absorve em alguns comprimentos de onda específicos como a água que absorve a região do infravermelho, mas podem variar desde as maiores ondas (ultravioleta) até maiores (infravermelho).

A partir disso podemos inferir caso coletado dados suficiente e através dessa reta padrão podemos inferir a partir de uma absorbância de uma amostra desconhecida sua concentração por interpolação por exemplo.

## Método:

## Princípio do Método(Parte Teórica)

A quantificação de proteínas foi realizada pela técnica de espectrofotometria na região ultravioleta (UV), aproveitando a capacidade de absorção de luz dos anéis aromáticos dos resíduos de aminoácidos **Triptofano e Tirosina** no comprimento de onda de **280 nm**. A relação linear entre a concentração de albumina e a absorbância segue a Lei de Lambert-Beer, permitindo a determinação do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ).

## Procedimento Analítico

1. Os dados de Absorbância (A) de uma curva-padrão de albumina foram fornecidos para concentrações conhecidas na faixa de **0 a 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$** .
2. A partir desses dados, foi construído um gráfico de regressão linear (Absorbância versus Concentração em  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) para obter a equação da reta ( $A = \epsilon \cdot c + b$ ).
3. O valor de  $\epsilon$  foi determinado a partir do coeficiente angular da reta, assumindo um caminho óptico (b) de 1 cm.

4. A concentração da amostra desconhecida foi calculada por interpolação na equação da reta, utilizando sua Absorbância

## Princípio do Método (Parte Prática)

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método indireto do **Biureto**, que se baseia na **formação de um complexo de cor violeta** entre íons **Cu<sup>2+</sup>** (presentes no reagente) e as ligações peptídicas da proteína, em meio alcalino. A intensidade da coloração, que absorve luz no **comprimento de onda de 550 nm**, é diretamente proporcional à concentração da proteína na solução.

## Materiais (Apenas as Soluções Principais)

- Soluções-padrão de Albumina Bovina (BSA) em concentrações conhecidas (faixa de 0 a 60  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).
- Solução-problema (concentração desconhecida).
- Reagente de Biureto (contendo CuSO<sub>4</sub>, tartarato de sódio e potássio, e NaOH).

## Procedimento Experimental

O procedimento envolveu a preparação de tubos para a curva-padrão e para a amostra desconhecida, seguida da incubação e leitura espectrofotométrica.

1. **Preparação:** Um conjunto de tubos de ensaio foi identificado para a curva-padrão (0 a 60  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e para a amostra problema, além de um tubo "**Branco**" contendo apenas água destilada.
2. **Adição de Amostras:** Foi adicionado **1.5 mL** de cada solução de albumina padrão e da amostra problema nos seus respectivos tubos.
3. **Reação Colorimétrica:** Em seguida, foram adicionados **1.5 mL** do **Reagente de Biureto** a cada tubo, incluindo o Branco. As soluções foram agitadas manualmente para homogeneização.
4. **Incubação:** As soluções foram incubadas por **5 minutos** para permitir a formação completa do complexo de cor violeta.
5. **Leitura no Espectrofotômetro:** O espectrofotômetro foi ajustado para o comprimento de onda de **550 nm**.
6. **Taragem:** O tubo "**Branco**" foi transferido para uma cubeta e utilizado para **zerar a absorbância** do espectrofotômetro, compensando a cor inerente ao reagente.
7. **Medição:** A absorbância das soluções padrão e da amostra desconhecida foi lida sequencialmente, transferindo o conteúdo para a cubeta e limpando as faces antes de cada leitura.

## Resultados:

### Parte Teórica

Concentração uM	Concentração (mol/L)	Absorbância em 280 nm
0	0	0
2	0,000002	0,0787
4	0,000004	0,1547
6	0,000006	0,2443
8	0,000008	0,3414
10	0,00001	0,3887
12	0,000012	0,475
14	0,000014	0,5426
16	0,000016	0,6217
18	0,000018	0,7016
20	0,00002	0,7632
Desconhecido		
10,96222212	0,00001096222212	0,4289

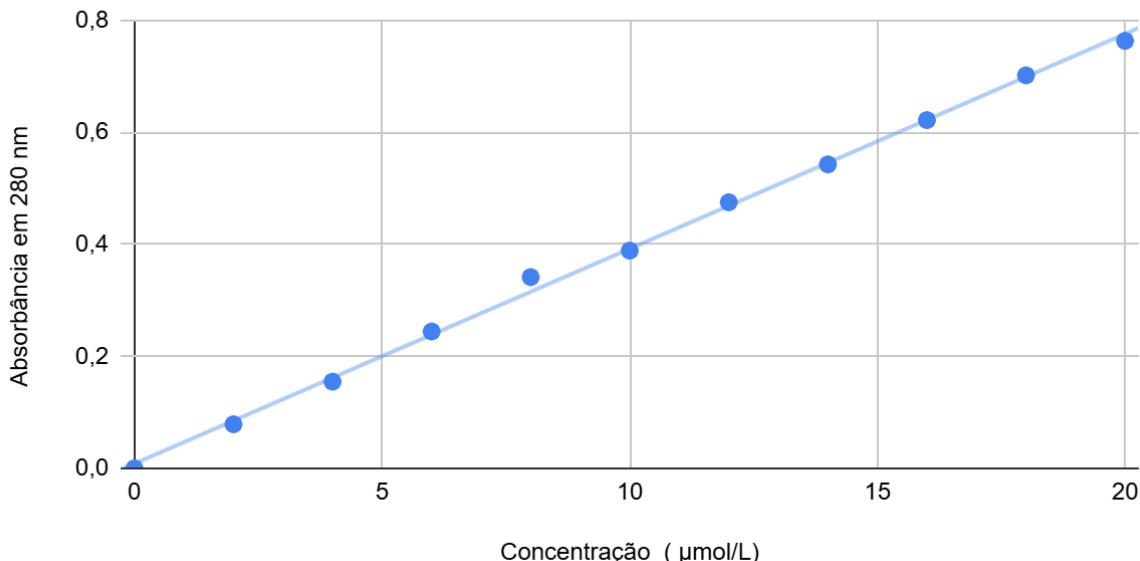
Absorvância (E, Coeficiente Angular)=38358,18182 L/mol x cm

Interseção (b)=0,00840909090

Coeficiente R<sup>2</sup>=0,09983072728

## Concentração versus Absorbância

● Absorbância em 280 nm    — Linha de tendência para Absorbância em 280 nm  $R^2 = 0,998$



## Parte Prática

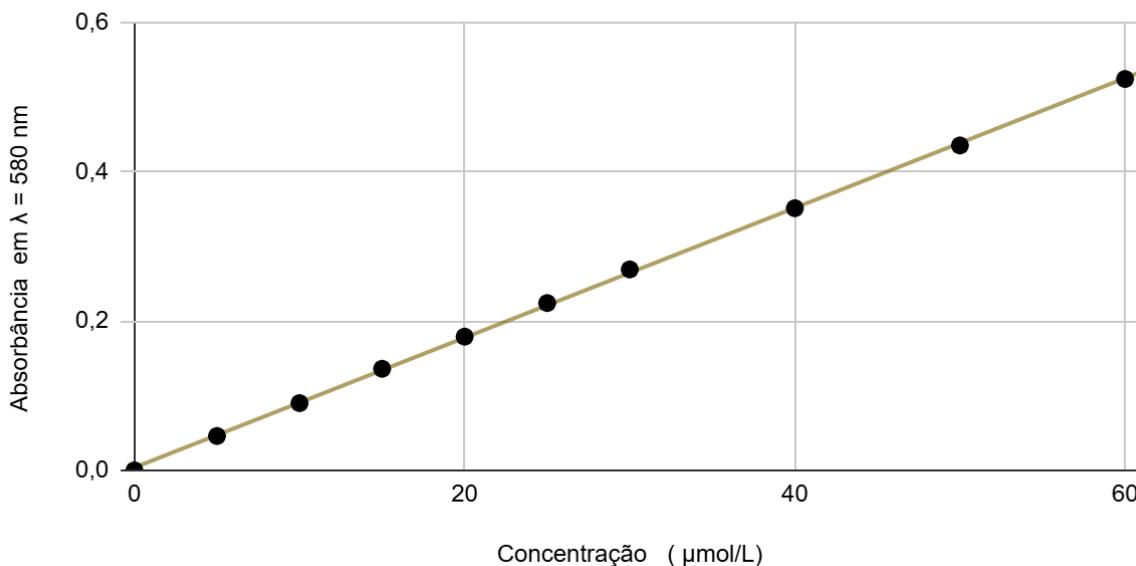
Concentração μM ( μmol/L)	Concentração (mol/L)	Absorbância em $\lambda = 580 \text{ nm}$
0	0	0
5	0,000005	0,046
10	0,00001	0,09
15	0,000015	0,136
20	0,00002	0,179
25	0,000025	0,224
30	0,00003	0,269
40	0,00004	0,351
50	0,00005	0,435
60	0,00006	0,524
Desconhecida		
24,76344745	0,00002476344	0,219
745		

Absorvância (E, Coeficiente Angular)=8689,12887 L/mol x cm  
Interseção (b)=0,003827213823

Coeficiente R<sup>2</sup>=0,09997585627

### Concentração versus Absorbância das amostras

● Absorbância em  $\lambda = 580$  nm    └ Linha de tendência para Absorbância em  $\lambda = 580$  nm  $R^2 = 1$



### Discussão:

#### Validação da Curva-Padrão e Lei de Lambert-Beer

Conforme previsto pela teoria da espectrofotometria, observou-se um padrão linear no crescimento da Absorbância (A) em relação ao aumento da concentração do analito (c). Essa linearidade confirmou a aplicabilidade da **Lei de Lambert-Beer** ( $A=\epsilon \cdot b \cdot c$ ) para a dosagem de proteínas na faixa de concentrações analisada.

A curva de calibração obtida demonstrou alta confiabilidade, evidenciada pelo **Coeficiente de Determinação (R2) próximo a 1**. Um R2 elevado indica que a variação na absorbância é explicada quase totalmente pela variação na concentração, permitindo a utilização da equação da reta para quantificação precisa.

#### Determinação da Concentração Desconhecida

A partir da regressão linear, foi determinado o **Coeficiente de Extinção Molar ( $\epsilon$ )**, cuja unidade é  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Assumindo que a cubeta possui um caminho óptico (b) de 1 cm,

$\epsilon$  corresponde ao coeficiente angular da reta, que é constante sob as condições experimentais utilizadas (comprimento de onda, solvente e temperatura).

Com o valor de  $\epsilon$  estabelecido, foi possível calcular a concentração das amostras desconhecidas. A alta linearidade da curva confere uma boa confiança ao valor de concentração obtido para as amostras problema.