

Métodos Fotométricos

Guido Lenz
Biofísica, 1997

Os métodos fotométricos, como diz o nome, usa a luz (foto), para medir algo (métrico), geralmente a concentração de um cromóforo, isto é, um composto que tem capacidade de interagir com a luz.

Para entender os métodos fotométricos, é necessário possuir claramente os conceitos referentes à luz e à interação desta com a matéria. Primeiramente é preciso discutir alguns aspectos da luz.

1. Luz

A luz é uma onda eletromagnética, isto é, possui dois componentes, um componente elétrico e outro magnético, posicionados a um ângulo de 90° um em relação ao outro.

Todo movimento oscilatório possui um comprimento de onda, que é a distância entre dois máximos de onda. Na Figura 1 podemos ver uma onda com um comprimento de 360 e outro de 200 nm. A amplitude da onda (neste exemplo de 1,0 e 0,6) representa a intensidade da mesma.

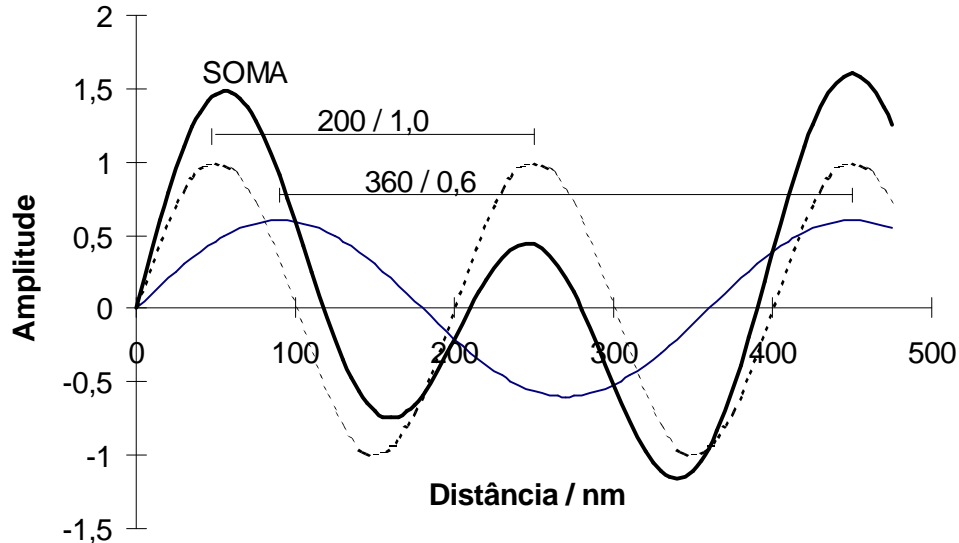


Figura 1. Ondas com diferentes λ s e amplitudes e a soma resultante.

Uma outra propriedade muito importante das ondas é que elas podem interagir umas com as outras. No exemplo da figura 1, as duas ondas na realidade se somam para produzir a onda marcado com SOMA. Este efeito de soma das ondas é particularmente importante no que se refere à interferência entre ondas, que, quando defasadas em π se anulam completamente (interferência destrutiva) e quando não possuírem defasagem (ou obviamente defasagem de 360,

720°...) se somam (interferência construtiva). Basta lembrar que a diferença entre uma luz normal e um laser é a interferência, que é construtiva neste e tanto construtiva como destrutiva naquele.

O comprimento de onda (λ) se relaciona com as outras propriedades das ondas através das seguintes equações:

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad E = h \nu$$

“c” é a velocidade da luz no vácuo ($\sim 3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$), ν é a frequência em s^{-1} , E a energia em Joules e h a constante de Plank ($6,6 \times 10^{-34} \text{ J s}$).

Estas duas equações indicam que tanto a frequência como a energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda. Desta forma, ondas mais energéticas tem um λ menor e uma frequência maior.

As ondas eletromagnéticas, dependendo da sua energia, possuem características diferentes, principalmente no que se refere a sua interação com a matéria, sendo utilizados para os mais diversos fins. É importante salientar que as propriedades de ondas eletromagnéticas (i. e. velocidade, interferência) permanecem inalteradas por todo o espectro de energia. A Figura 2 mostra o espectro de ondas eletromagnéticas, que vão desde um λ de quilômetros até fentômetros (10^{-15}).

As ondas eletromagnéticas que podem ser detectadas por nossos olhos, isto é, o visível, ocupam uma pequena faixa de todo o espectro. Dentro do visível, como bem sabemos, existem várias cores, que nada mais são do que ondas com diferentes λ s. As energias, as frequências e os comprimentos de onda das cores são mostradas na Tabela 1.

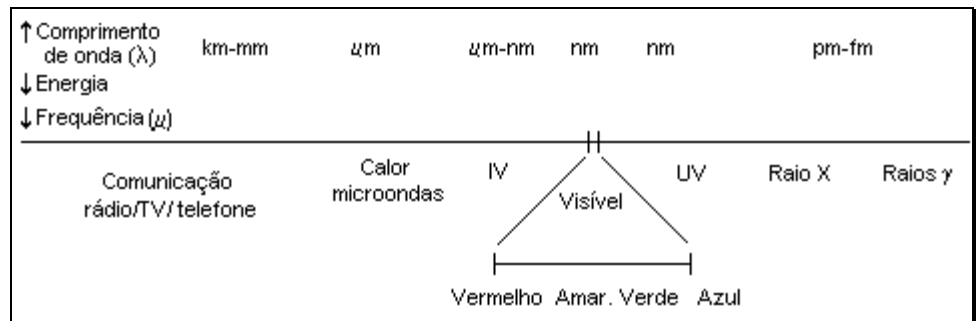


Figura 2. Ondas eletromagnéticas de diferentes energias.

Tabela 1. Propriedades da luz visível, IV e UV.

Cor	Cor Complementar	λ/nm	$\nu/(10^{14} \text{ Hz})$
Ultravioleta (UV)		<380	7,89
Violeta	Verde-amarelado	380-435	7,89-6,90
Azul	Amarelo	435-480	6,90-6,25
Azul-esverdeado	Alaranjado	480-490	6,25-6,12
Verde-Azulado	Vermelho	490-500	6,12-6,00
Verde	Púrpura	500-560	6,00- 5,36
Verde-amarelado	Violeta	560-580	5,36-5,17
Amarelo	Azul	580-595	5,17-5,04
Alarajado	Azul-esverdeado	595-650	5,04-4,62
Vermelho	Verde-azulado	650-780	4,62-3,85
Infravermelho (IV)		> 780	3,85

As ondas eletromagnéticas que podem ser detectadas por nossos olhos, isto é, o visível, ocupam uma pequena faixa de todo o espectro. Dentro do visível, como bem sabemos, existem várias cores, que nada mais são do que ondas com diferentes λ s. As energias, as frequências e os comprimentos de onda das cores são mostradas na Tabela 1.

2. Interação da luz com a matéria

Radiações eletromagnéticas interagem com a matéria de muitas formas. Como trataremos somente das radiações no visível e das radiações com energias próximas a este, como o UV e o IV, serão analisadas somente as interações que as radiações eletromagnéticas desta faixa de energia produzem.

Para podermos compreender a interação da luz com a matéria é necessário fazer uma rápida revisão sobre a constituição da matéria. Como todos sabemos, os átomos e portanto as moléculas, são constituídas por um núcleo (prótons + nêutrons) e por elétrons. As energias das radiações eletromagnéticas na faixa do visível não possuem energia suficiente para alterar os núcleos¹, podendo alterar somente as distribuições eletrônicas dos átomos e das moléculas. É interessante lembrar que os elétrons são distribuídos em orbitais preenchidos segundo as regras de distribuição eletrônica de Pauling.

Um átomo ou molécula possui orbitais ocupados e orbitais não ocupados. No estado fundamental os elétrons se distribuem de forma a minimizar a energia. Existe porém, a possibilidade de ocupação de orbitais mais energéticos, se for proporcionada uma certa quantidade de energia. Isto pode acontecer quando um fóton de luz atingir um átomo ou molécula como visto na

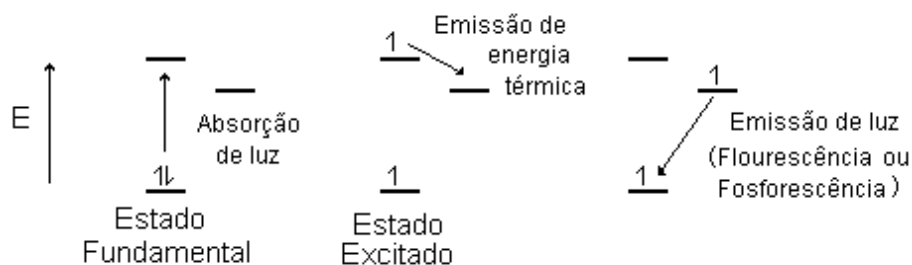


Figura 3. Orbitais eletrônicos e a absorção e emissão de luz.

Figura 3.

Este elétron no estado excitado tenderá a voltar para o estado fundamental, o que geralmente ocorre por um caminho tortuoso, na qual o elétron passa para um estado metaestável, emitindo com isso energia térmica², e deste estado volta ao estado fundamental, emitindo luz. Esta emissão de luz é classificada como fluorescência quando a emissão cessa logo após a extinção da excitação e fosforescência³ quando a emissão espontânea continua por períodos de

¹ só conseguido com energias como as dos raios γ

² isto porque esta transição geralmente não é muito energética, fazendo com que o λ destas radiações seja na faixa de μm , as mesmas dos forno de microondas, ou seja, em forma de energia térmica.

³ compostos fosforescentes são colocados em interruptores de luz e nas estrelinhas dos quartos de crianças para que eles possam ser vistos à noite.

tempo mais elevados (até mesmo horas, mas caracteristicamente segundos ou frações de segundos).

Uma característica muito importante a que deve ser considerada quando se leva em consideração estas transições energéticas entre orbitais é a quantização. **As transições só ocorrem quando a energia fornecida pela radiação é igual a energia de transição entre os dois orbitais**, sendo que tanto energias inferiores como superiores são incapazes de produzir a transição eletrônica.

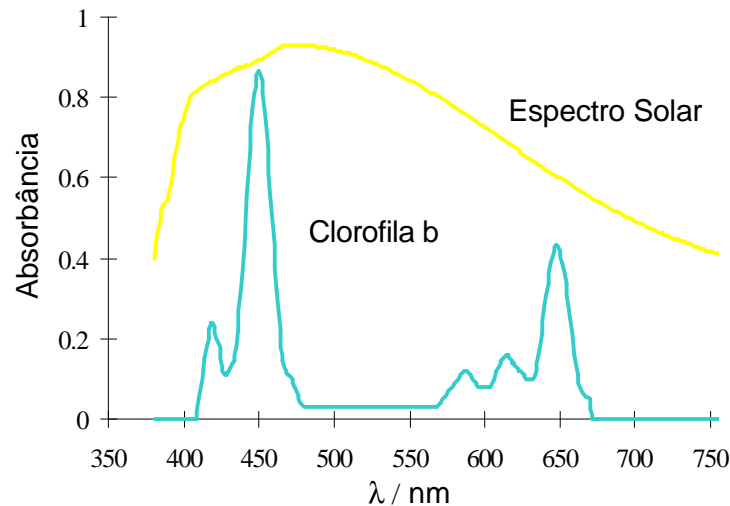


Figura 4. Espectro de absorção de vários pigmentos fotossintéticos.

As transições energéticas que ocorrem em um átomo ou molécula podem ser determinados através de um espectro de absorbância, que é a medição da quantidade de luz absorvida em vários λ s, como visto na Figura 4.

É interessante ressaltar que é justamente nestas transições eletrônicas que está o motivo do mundo colorido que vivenciamos. Vejamos o caso da clorofila, que como todos sabemos é responsável pelo maravilhoso verde das matas, possui uma forte absorção na região do azul e do vermelho. Isto significa dizer que quando olhamos para uma folha, estamos recebendo em nossos olhos a luz filtrada, isto é, a luz branca (que possui todos os λ s) subtraídos do azul e do vermelho (Figura 4), fazendo com que somente o que não for absorvido seja captado pelos nossos olhos, isto é, o verde ($\lambda = 530$). Da mesma forma, todas as colorações que vemos são resultado da absorção seletiva de algum λ , restando a cor. Neste ponto é interessante filosofar que pode ter havido uma pressão seletiva durante a evolução dos órgãos responsáveis pela detecção da luz (leia-se olhos) para que fossem detectadas justamente os λ s entre 400 e 700nm pois esta região é riquíssima em transições observadas na natureza, trazendo desta forma uma quantidade de informações imensa (muito provavelmente o mundo em λ diferentes do visível seja bastante “cinza” ou monótono - isto é, contém muito menos informação). Ver Tabela 1.

3. Fotometria

De acordo com o senso comum, quanto mais cromóforo (substância que absorve luz) uma solução tiver, mais escura ela será. Todo dia inferimos a quantidade de café pela aparência do cafezinho! No início, a fotometria utilizou exatamente este instrumento, ou seja, o olho humano, para determinar a concentração de substâncias cromóforas. Para facilitar esta tarefa, uma vez que o nosso olho não é um equipamento absoluto, usou-se cores ou concentrações padrões com os quais a solução em análise poderia ser comparada. A precisão deste método, porém, não era adequada devido às propriedades da visão e também do componente subjetivo, que sempre que possível deve ser eliminado na quantificação. O advento de equipamentos capazes de quantificar a luz permitiu que a quantidade de fótons pudesse ser medida, permitindo uma quantificação muito mais precisa.

Antes de abordar os aparelhos responsáveis pelas medidas fotométricas, é importante discutir um pouco as bases teóricas que permitem a aplicação da absorção da luz como método quantitativo.

3.1 Transmitância

Se passarmos um feixe de luz de intensidade conhecida (I_0) através de uma amostra e medirmos a intensidade da luz que emergiu, podemos calcular a transmitância (T) desta amostra da seguinte forma: $T = I / I_0$, isto é, a razão de luz que atravessa a amostra.

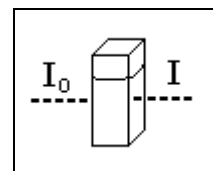


Figura 5. Transmitância.

3.2 Lei de Lambert-Beer

Para que esta diminuição na intensidade da radiação possa ser utilizada para a determinação da concentração de um cromóforo, é necessário relacionar estas duas grandezas, o que é realizado pela lei de Lambert-Beer.

Primeiramente é necessário esclarecer que a luz atravessa um caminho óptico no qual se encontram uma certa quantidade de moléculas do cromóforo, sendo que somente uma parte destas podem interagir de forma adequada com a luz para que esta possa ser absorvida. Importante mencionar aqui é que a quantidade de cromóforos que interagem com a luz neste caminho óptico é proporcional à concentração do cromóforo na cubeta (recipiente no qual passa a luz).

Uma teoria que pretende relacionar a concentração de um cromóforo com a quantidade de luz absorvida deve levar em consideração que cada interação adequada da luz com o cromóforo diminui a intensidade do feixe de luz⁴ numa quantidade infinitesimal dP , no qual P é a

⁴ no qual existe uma quantidade imensa de fótons, sendo que somente um fóton pode ser absorvido por cada cromóforo

intensidade radiante e d é uma quantidade infinitesimal. Esta redução na intensidade radiante é proporcional à concentração do cromóforo e à intensidade do feixe de luz (quanto mais concentrado e quanto mais fótons tiver, maior a probabilidade de haver um choque fóton - cromóforo).

Podemos então escrever a equação como sendo:

$$dP \propto C P db \quad (1) \quad dP = -k C P db \quad (2)$$

no qual db representa uma quantidade infinitesimal do caminho óptico percorrido (o necessário para encontrar um cromóforo pronto para absorver um fóton), k é a constante de proporcionalidade e o sinal negativo significa que a intensidade da luz está diminuindo.

Bem, mas o que interessa é a quantidade de luz absorvida ao longo de um certo caminho óptico de, por exemplo, 1 cm e não infinitesimal. Para chegarmos à equação que descreve isto, devemos somar as dP s em todos os db s, o que matematicamente é conseguido com a integração, o que fornece: $\ln P/P_0 = -k b C$

considerando que, $\ln = \log_{2,303}$

$$-\log \frac{P}{P_0} = \frac{k}{2,303} b C$$

e finalmente considerando que $P/P_0 = T$ e $k/2,303 = \epsilon$. temos:

$$A = \epsilon b C \quad \text{sendo que} \quad A = -\log T$$

Nesta equação, que é denominada de Lambert-Beer, o ϵ (epsilon) é a absortividade molar, uma constante dependente do λ , do cromóforo, do solvente e da temperatura. Um ϵ elevado significa uma grande capacidade de um cromóforo absorver luz de um certo λ em determinadas condições. Por exemplo, o ϵ da clorofila em 480nm é um dos mais elevados da natureza, o que condiz com a sua utilização como captadora de luz para a fotossíntese.

Como mostrado na Figura 6, a lei de Lambert-Beer fornece um traçado gráfico de $A \times [C]$

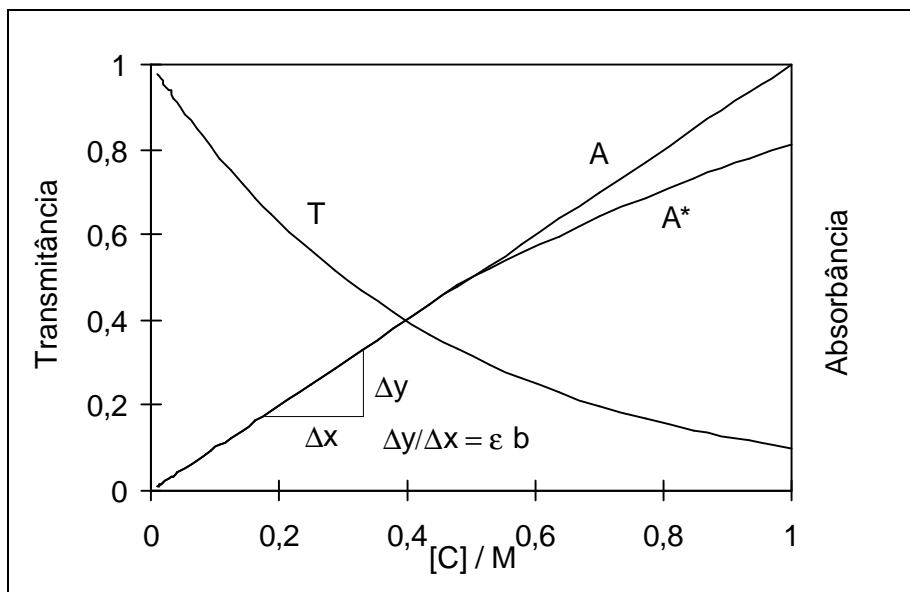


Figura 6. Transmitância, absorbância e seus desvios

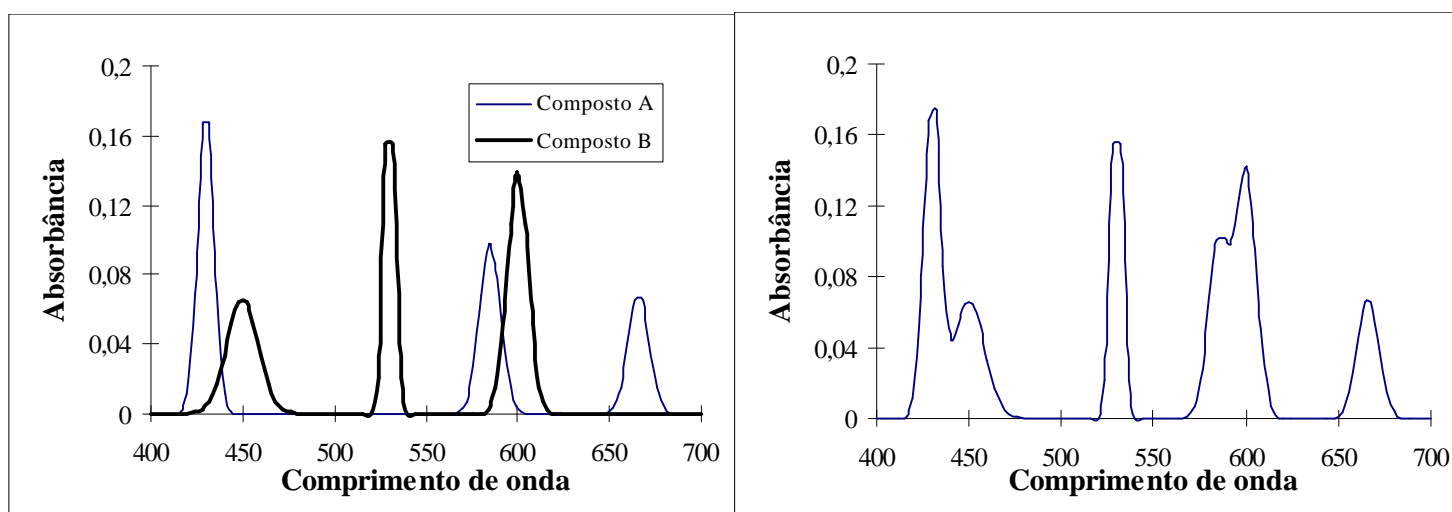
em forma de reta enquanto que a transmitância fornece uma curva descendente, quando a abscissa é a concentração do cromóforo ($[C]$). Neste gráfico a inclinação da reta fornece o valor de “ ϵb ”, ou seja, um gráfico de $A \times [C]$ pode ser utilizado para o cálculo do absorvidade molar.

É importante mencionar que a lei de Lambert-Beer somente se aplica quando as seguintes considerações forem obedecidas: a) a radiação incidente deve ser monocromática, isto é, possuir somente um λ ; e b) os centros absorventes devem atuar independentemente uns dos outros no processo de absorção. Também é necessário destacar que quanto maior o ϵ mais precisa será a determinação, o que significa dizer que o λ mais adequado para a determinação da concentração de um cromóforo através da lei de Lambert-Beer é o λ de absorbância mais intensa, ou seja, o **pico de absorbância**.

3.2.1 Determinações simultâneas

Dois ou mais cromóforos podem ser quantificados independentemente quando presentes em uma mistura. Para que isto seja possível é necessário que algumas condições sejam satisfeitas: o cromóforo A deve possuir pelo menos um pico de absorbância no qual a absorbância do cromóforo B seja negligenciável e vice-versa. A Figura 7 mostra a absorbância de dois compostos separadamente e somados⁵. Neste caso o pico de 670nm seria melhor para a detecção do composto A e o pico de 530nm para o composto B. Embora seja aconselhável escolher o pico de maior ϵ para a determinação da concentração de um composto, neste caso o pico de 670nm é indicado pois ele não sofre a interferência do espectro de absorção do composto B.

É importante mencionar que, como a absorção total é a soma da absorção dos diversos componentes, é possível até fazer uma determinação simultânea quando os dois espectros se sobrepõem completamente, contanto que se conheça os espectros isolados e os ϵ s de cada pico⁶.



⁵ o que realmente apareceria em um espectro, da mistura dos compostos A e B.

Figura 7. Determinação simultânea em uma mistura de dois cromóforos.

⁶ Para o pico 1: $A_{total} = \epsilon_{A1} b C_A + \epsilon_{B1} b C_B$ e para o pico 2: $A_{total} = \epsilon_{A2} b C_A + \epsilon_{B2} b C_B$ - duas equações e duas variáveis (C_A e C_B) - desta forma é possível determinar a concentração dos dois compostos.

3.2.2 *Desvios na lei de Lambert-Beer*

Como abordado anteriormente, a Lei de Lambert-Beer somente se aplica quanto os centros absorventes não interagem uns com os outros. Isto obviamente só é conseguido em concentrações muito pequenas. Em termos práticos, as concentrações limites até as quais esta lei é obedecida situam-se na faixa de 10^{-2} M para a maioria dos compostos. Até estas concentrações as moléculas (centros absorventes) interagem predominantemente com o solvente. Em concentrações superiores, iniciam-se interações também entre as moléculas do soluto (cromóforo), fazendo com que o ϵ e o λ de certos picos de absorbância sejam alterados (“blue ou red shift” - deslocamento para o azul ou vermelho). Lembrem-se de que um certo espectro com os seus respectivos ϵ s é característico daquela substância em um determinado solvente. Em concentrações muito altas, as interações entre as moléculas do soluto se tornam tão elevadas que predominam sobre as interações solvente-soluto, fazendo com que o próprio soluto aja como solvente, produzindo alterações na absorbância.

Outra fonte de erro pode ser o índice de refração, que pode aumentar significativamente em soluções concentradas, desviando parte da luz e diminuindo a intensidade detectada. Na Figura 6 pode-se ver o desvio da lei de Lambert-Beer na curva A*.

O equipamento de detecção também pode representar uma fonte de erro, principalmente em concentrações muito baixas ou muito elevadas, nas quais a intensidade de luz transmitida é muito próxima ou muito distante, respectivamente, da intensidade do feixe que não passa pela amostra, fazendo com que as comparações se tornem muito menos precisas.

3.3 *Fluorescência*

Como descrito no item 2, a fluorescência é devido à emissão de luz após uma excitação, sendo que aquela sempre acontece em λ s maiores do que esta. A fluorescência possui várias vantagens em relação à absorbância, entre as quais pode-se destacar a maior sensibilidade, a maior seletividade e a maior dependência do meio circundante.

A sensibilidade da fluorescência é aproximadamente 2 ordens logarítmicas maior do que a absorbância. Quanto à seletividade é interessante mencionar que um composto fluorescente geralmente possui mais de um espectro de emissão, cada qual para um certo λ de excitação, fazendo com que este método também seja melhor do que a absorbância para a determinação qualitativa do composto.

Além destas vantagens, a fluorescência é extremamente sensível ao meio em que se encontra o composto. Existem várias substâncias que suprimem a emissão de fluorescência (“quencher”) dentre os quais se pode citar o O_2 . Isto pode ser utilizado para detectar, por exemplo, se um grupo fluorescente está em contato com o meio ou está protegido dele (na parte interna de uma proteína, por exemplo). Esta técnica é bastante utilizada no auxílio da determinação de estruturas de proteínas usando o amino-ácido triptofano como grupo fluorescente.

3.4 Métodos fotométricos na análise qualitativa

Como discutido anteriormente, o espectro é uma característica de uma certa substância em um certo solvente. Obviamente isto pode ser utilizado para a análise qualitativa, o que geralmente acontece por comparação, isto é, se compara o espectro de um composto desconhecido com espectros de padrões. O espectro de absorção fornece algumas informações sobre a natureza do composto. A absorção na faixa do visível e do IV geralmente indica ligações duplas conjugadas para compostos orgânicos e complexos de metais de transição no caso de compostos inorgânicos.

Um exemplo interessante de utilização da absorvância é a determinação se o DNA está na forma de simples ou dupla fita. As bases do DNA absorvem na faixa do UV, em torno de 260 nm, sendo que esta absorção é aumentada quando a dupla hélice é separada, fazendo com que a absorvância neste λ seja um bom método para a determinação da conformação do DNA (Figura 8).

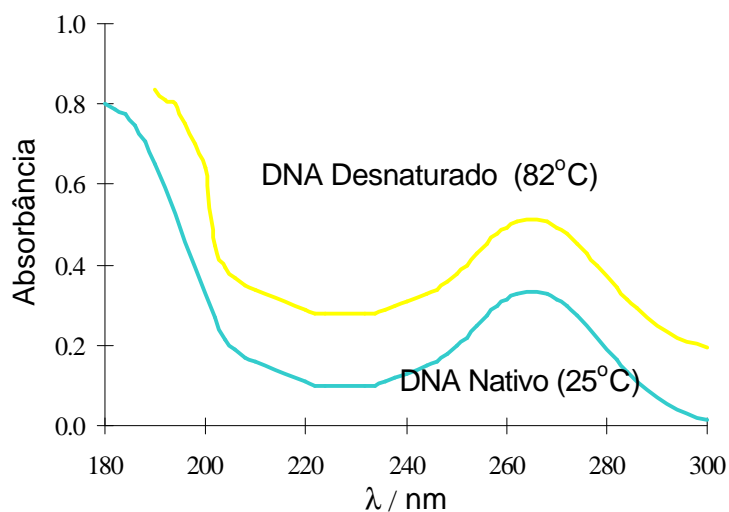


Figura 8. Espectro de Absorbância do DNA Simples ("Native") e dupla fita ("Denatured").

3.5 Métodos fotométricos na análise quantitativa

O principal uso dos métodos fotométricos é na quantificação de substâncias. Em anexo se encontra um protocolo que mostra como que estes métodos podem ser utilizados para a determinação da concentração de um cromóforo, a partir de soluções com concentrações conhecidas ou então com a utilização da constante ϵ para as condições nas quais se está fazendo a determinação. Na construção de uma curva de calibração é importante utilizar todas as condições nas quais se encontra a amostra cuja concentração se deseja determinar, pois pequenas alterações no solvente, pH ou força iônica podem produzir alterações nas propriedades dos cromóforos.

4. Equipamento

Os equipamentos mais utilizados nos métodos fotométricos são discutidos a seguir.

4.1 Espectrofotômetro

A Figura 9 mostra um esquema de um espectrofotômetro, com os seus principais componentes numerados de 1 a 5, sendo 1 - fonte, 2 - prisma para seleção do λ , 3 - fenda, 4 - cubeta com a amostra e 5 - detector produzindo o resultado final.

Os espectrofotômetros modernos geralmente utilizam feixes duplos produzidos através de espelhos semitransparentes, sendo que um feixe passa através da amostra enquanto o outro feixe não, e a comparação entre a intensidade destes dois feixes produz a leitura final do equipamento. Isto elimina problemas como flutuações na fonte, diferente detecção para diferentes λ s, etc.

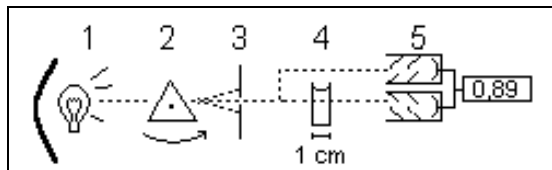


Figura 9. Esquema de um espectrofotômetro.

4.1.1 Fonte

A fonte de energia eletromagnética precisa fornecer radiação estável e com intensidade razoavelmente constante por toda a faixa de λ na qual se pretende usar. Devido a essas exigências, geralmente utiliza-se um lâmpada para a região do visível e do IV e outra lâmpada para o UV.

A fonte de radiação visível e IV mais utilizada é a lâmpada incandescente de tungstênio, que devido a sua alta temperatura (2600-3000°C) fornece uma radiação razoavelmente constante entre 350 a 2500 nm. No caso da radiação UV, as fontes mais utilizadas são as lâmpadas fluorescentes de hidrogênio e hélio, que fornecem radiações com λ de 180 a 350 nm.

4.1.2 Seleção do Comprimento de Onda (λ)

Uma das premissas da lei de Lambert-Beer é a luz monocromática, isto é, que tenha somente um determinado λ , que precisa ser selecionado do vasto espectro geralmente fornecido pela fonte.

A seleção do λ pode ser realizado de várias formas. Nos fotocolorímetros, esta seleção se dá através do uso de filtros, que nada mais são do que vidros coloridos. Obviamente as cores destes vidros foram cuidadosamente escolhidos para que estes permitam a passagem de um λ específico. Na realidade a seleção do λ usando-se filtros geralmente consegue uma precisão de somente alguns nm, ou seja, consegue selecionar uma faixa de λ s em vez de um λ específico.

Nos espectrofotômetros utiliza-se geralmente prismas ou grades de difração para uma seleção mais precisa do λ . Diferentes λ s viajam com velocidades diferentes através da matéria, sendo que λ s menores sofrem mais difração do que λ s maiores.

Usando-se um prisma móvel juntamente com lentes adequadas e uma fenda se consegue selecionar λ s com a precisão de até 1 nm.

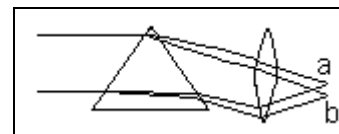


Figura 10. Prisma. ($\lambda_a > \lambda_b$)

Outra forma de seleção do λ é o uso de uma grade de difração⁷, que nada mais é do que uma superfície irregular que consegue refletir a luz. A interferência desta luz

⁷ um bom exemplo de grade de difração são os discos de CD, que contém uma infinidade de minúsculos furos, que funcionam como as diferentes superfícies de reflexão.

refletida fornece um espectro, do qual se pode seleccionar os λ s de forma semelhante ao descrito para o prisma.

4.1.3 Fendas e lentes

Existem nos espectrofotômetros várias lentes e fendas, que tem como objetivo colimar e seleccionar os feixes de luz apropriados.

4.1.4 Cubeta

A característica fundamental da cubeta é que ela seja transparente à radiação. No caso da radiação UV utiliza-se quartzo ou sílica fundida enquanto que na região do visível podem ser utilizados materiais mais baratos como o vidro ou plásticos. Geralmente as cubetas possuem um caminho óptico (espessura) de um centímetro, tamanho padronizado na lei de Lambert-Beer.

Sempre é bom lembrar que estas cubetas devem ser rigorosamente limpadas para que sujeiras ou mesmo a gordura dos dedos não interfira na leitura. É conveniente que as cubetas sejam regularmente limpas com agentes oxidantes como por exemplo solução sulfocrômica para retirar qualquer traço de sujeira.

4.1.5 Detectores

Existem várias formas de se detectar ondas eletromagnéticas, sendo que todas estão baseadas na conversão da energia radiante em energia elétrica, que podem então ser detectados por um equipamento convencional. Os três tipos diferentes de detectores mais utilizados são discutidos a seguir.

As células fotovoltaicas baseiam-se na geração de força eletromotriz quando se ilumina uma placa metálica recoberta com uma camada de material semiconductor como o selênio e o óxido de cobre. As células fotovoltaicas são utilizadas principalmente no caso de uma iluminação alta, pois a amplificação deste tipo de célula é difícil de ser conseguida.

As células fotoelétricas tem como princípio o efeito fotoelético, que consiste na liberação de um elétron de uma superfície (geralmente constituída de óxidos alcalinos) quando um fóton de luz visível ou UV atingir a placa. Estes elétrons liberados podem ser captados por um ânodo, o que produzirá uma corrente elétrica detectável.

Uma modificação das células fotoelétricas, denominados fotomultiplicadores, (Figura 11) utilizam a emissão induzida

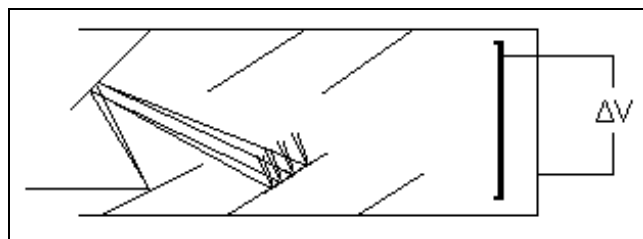


Figura 11. Fotomultiplicador

por fótons e elétrons para amplificar o sinal. O fóton bate na primeira placa e 2 a 5 elétrons secundários são emitidos, que são atraídos pela placa seguinte (dínodo) através de uma voltagem de aproximadamente + 90V. Cada qual destes elétrons podem por sua vez produzir 2 a 5 outros

elétrons e assim sucessivamente. Com a utilização de 9 a 16 dínodos, cada qual com uma voltagem de +90 V em relação ao anterior, pode se conseguir uma amplificação de até 10^8 , considerando-se que cada passo tenha um fator multiplicador de 4,5. Desta forma é possível detectar uma quantidade ínfima de luz. Devido a sua alta sensibilidade, os tubos fotomultiplicadores não podem ser utilizados para intensidades de luz muito elevadas.

4.2 Fluorímetro

A diferença básica no fluorímetro é a geometria da detecção da luz, que se localiza a um ângulo de 90° em relação à fonte. Este desenho geométrico é utilizado no intuito de maximizar a detecção da fluorescência e minimizar a detecção da luz referente à transmitância. Outra diferença fundamental é a presença de um segundo sistema de seleção de λ após a passagem da luz pela amostra, possibilitando desta forma a escolha do λ de emissão, além obviamente, do λ da excitação.

5. Conclusão

Ondas eletromagnéticas, como a luz, fornecem inúmeras informações sobre a fonte que a produziu e também sobre o caminho percorrido, isto é, as interações sofridas com a matéria ao longo do caminho. Para ilustrar isto é interessante mencionar que a fonte de informação mais poderosa sobre a constituição do universo vem da luz, que vem ao nosso encontro das estrelas mais distantes. Esta luz possui as bandas características dos componentes dos quais as estrelas são formadas e desta forma é possível determinar a concentração dos componentes presentes nas estrelas. Se voltarmos um telescópio para uma estrela distante alguns bilhões de anos luz, estaremos vendo a luz primordial, provavelmente emitida por ela a alguns bilhões de anos, permitindo o conhecimento da constituição da matéria naqueles primórdios.

Este exemplo mostra a quantidade de informações que a luz é capaz de carregar fazendo com que ela pode ser uma informante poderosa da constituição qualitativa e quantitativa da matéria.

6. Referências

- Ohweiler, O. A., Química Analítica Quantitativa, vol. 3, Livros Técnicos Científicos SA, Rio de Janeiro, (1974).
- Voet, D, Voet, J. G., Biochemistry, 2nd Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, (1995).
- Atkins, P. W., Physical Chemistry, 5th Ed. Oxford Univ. Press, (1994).