

### 3

## Técnicas Experimentais

Faremos uma introdução sobre técnicas espectroscópicas utilizando principalmente os livros textos que constam nas referências: Lakowicz, 1983 e Valeur, 2001

### 3.1

#### Instrumentação para medição da absorbância

As medidas de absorção óptica serão feitas no espectrofotômetro Hewlett Packard, modelo HP – 8452 A, com sistema de detecção por arranjos de diodos e resolução de 2 nm, (Física, PUC-Rio). Apesar de variarem em desenho, todos os espectrofotômetros consistem de uma fonte de luz, um monocromador (para a seleção dos comprimentos de onda), um porta-amostra transparente chamado de cubeta, um detector de luz, e um registrador para acumular os dados de saída do detector. A Fig. 3.1 mostra o esquema.

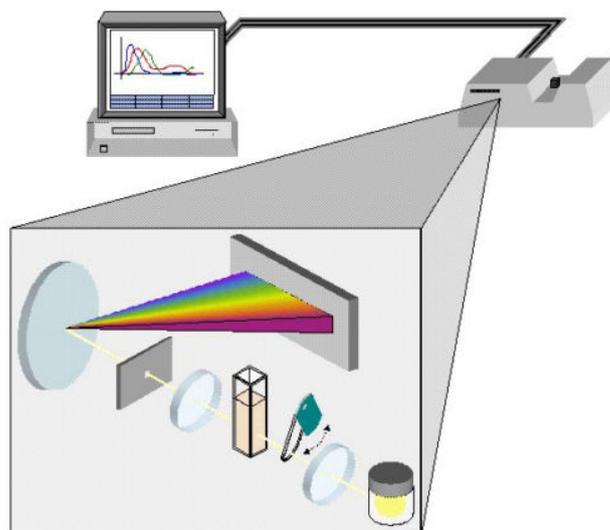


Figura 3.1. Esquema do espectrofotômetro HP-8452A. A luz da lâmpada passa através da amostra e solvente contidos em uma cubeta. Em seguida passa pela rede de difração, para seleção do comprimento de onda, e atinge o arranjo de diodos para a detecção.

Para fazer uma medição no espectrofotômetro, primeiro se obtém a medição de luz transmitida padrão da solução contendo o solvente (que pode ser um tampão ou uma solução de moléculas pequenas), seguida por uma medição da luz transmitida pela amostra quando dissolvida no mesmo solvente. O primeiro valor é, então, subtraído do segundo para se ter a absorbância do soluto. Isso é feito ao mesmo tempo para cada comprimento de onda da luz.

### 3.1.1 Fatores que afetam as propriedades de absorção de um cromóforo.

O espectro de absorção de um cromóforo é determinado pela estrutura química da molécula, mas tem outros fatores relacionados ao meio que produz mudanças detectáveis em  $\lambda_{\text{máx}}$  e  $\epsilon$ . Estes fatores podem ser mudanças no pH (que produzem mudanças na estrutura da molécula), polaridade do solvente ou de moléculas vizinhas, e a orientação relativa de cromóforos vizinhos. Estes efeitos do meio dão as bases para o uso da espectroscopia de absorção na caracterização das macromoléculas.

As características gerais desses efeitos relativos ao meio são os seguintes:

**Efeitos do pH.** O pH do solvente determina o estado de ionização de cromóforos ionizáveis (protonação e desprotonação pelo H<sup>+</sup>).

**Efeitos da polaridade.** Depende da estrutura do cromóforo e do tipo de transição. Para cromóforos polares, é freqüente que  $\lambda_{\text{máx}}$  ocorra para um comprimento de onda menor em solventes polares hidroxílicos (H<sub>2</sub>O, álcoois) que em solventes não polares.

**Efeitos da orientação.** Características geométricas (simetria, organização) freqüentemente têm fortes efeitos sobre  $\lambda_{\text{máx}}$  e  $\epsilon$ . O melhor exemplo é o hipocromismo de ácidos nucleicos.

## 3.2

### Instrumentação para Medição da Fluorescência

Como na espectroscopia de absorção, há muitos fatores que alteram o espectro de fluorescência. As medidas de fluorescência são mais sensíveis que as medidas de absorbância, apesar da espectroscopia de absorção ser mais simples de

se realizar. As medidas de fluorescência de macromoléculas podem nos dar informações sobre: conformação, sítios de ligação, interações com solventes, grau de flexibilidade, distâncias intermoleculares e coeficiente de difusão rotacional de macromoléculas.

As medidas de espectroscopia de fluorescência foram feitas utilizando-se o sistema de fluorescência no estado estacionário PTI – QMI (Departamento de Física, PUC-Rio). A Fig. 3.2 mostra um arranjo padrão para medidas de fluorescência. Um feixe de luz de alta intensidade passa através de um monocromador para a seleção de um comprimento de onda de excitação (um comprimento de onda eficientemente absorvido pelo fluoróforo). O feixe de luz de excitação passa através de uma célula contendo a amostra. Para evitar a detecção do feixe incidente, pode-se fazer a observação da fluorescência em ângulo reto com o feixe incidente, pois a amostra irá emitir em todas as direções. A luz emitida (fluorescência) passa através de um monocromador para a análise do comprimento de onda e depois vai para um detector fotossensível (tubo fotomultiplicador). Programas de computador automaticamente varrem os comprimentos de onda detectados e apresentam a intensidade de emissão como uma função do comprimento de onda da luz emitida.

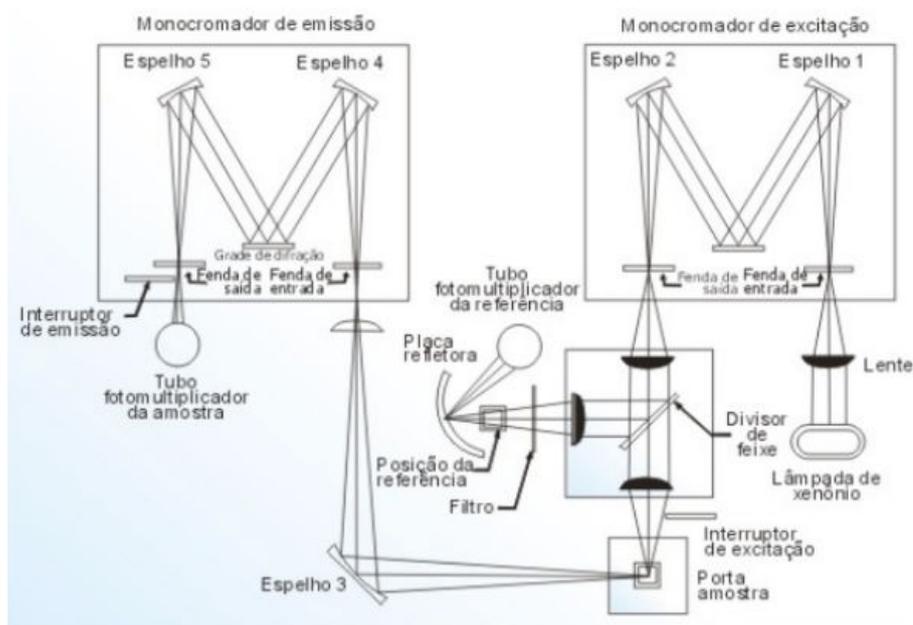


Figura 3.2. Esquema de um sistema de fluorescência semelhante ao utilizado no presente trabalho. ([www.chemkeys.com](http://www.chemkeys.com)).