



UnB

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DO USO DE IMAGENS DIGITAIS PARA DETERMINAÇÕES

QUANTITATIVAS EM ELETROFORESE EM GEL

Aluno: Gerson Francisco da Silva Neto

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Brasília, DF

2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Gerson Francisco da Silva Neto**, matrícula nº **17/0089029**, intitulada "*Avaliação do uso de imagens digitais para determinações quantitativas em eletroforese em gel*", apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 15 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Alexandre Fonseca
Presidente de Banca

Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga
Membro Titular

Dra. Gabriella Magarelli
Membro Titular Embrapa

Prof. Dr. Carlos Martín Infante Córdoba
Membro Suplente

Em 15 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, sem ele nada é possível

Aos meus pais Gerson e Lielen, pelo apoio durante o tempo de execução do Mestrado

Aos meus amigos de infância: João Lucas, Daniel, Anderson, Gabriel, Marcus, Lucas e Mathur, por estarem sempre comigo em quaisquer circunstâncias

Ao meu orientador, Dr. Alexandre Fonseca, pelos ensinamentos, broncas, paciência e histórias

Ao grupo LIAMA/AQQUA

Ao CNPq e Fap-DF pelo apoio financeiro

RESUMO

Eletroforese em gel(GE) é uma técnica de separação muito utilizada em análises biológicas, principalmente na separação de macromoléculas como proteínas e ácidos nucléicos. Sua aplicação em determinações químicas quantitativas ordinárias é muito restrita devida às dificuldades para a obtenção de um sinal analítico que possa ser relacionado com as concentrações. Nesse sentido, o presente trabalho propõe a combinação da GE e da detecção baseada em imagens digitais em tempo real para a separação e quantificação de compostos com baixo peso molecular. Nos estudos realizados foi demonstrada a possibilidade de separação e quantificação dos complexos de cobre e níquel com negro de eriocromo T e dos corantes artificiais alimentícios: azul brilhante, amaranço, amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo. A partir dos eletroferogramas obtidos com o uso de um programa desenvolvido no laboratório e de uma webcam para aquisição das componentes RGB das imagens foi possível obter curvas analíticas com adequadas linearidades ($R > 0,99$) para todos os analitos estudados. A estratégia proposta foi aplicada inicialmente para determinação de cobre e níquel em ligas metálicas, não sendo observadas diferenças significativas nos resultados obtidos em relação àqueles adquiridos por absorção atômica em chama ao nível de 95% de confiança. Além disso, precisões da ordem de 5% foram estimadas para as medidas. A avaliação da estratégia proposta para a quantificação de corantes foi realizada por testes de recuperação em refrescos em pó, sendo alcançados valores entre 93,3% a 107,7% que demonstraram uma exatidão adequada para o método proposto. Adicionalmente, coeficientes de variação da ordem de 5% indicaram uma precisão adequada para a estratégia de medida proposta. Os estudos relatados neste trabalho demonstram um bom desempenho analítico da técnica e abre a possibilidade de sua aplicação para diferentes amostras e analitos em trabalhos futuros.

Palavras-chaves: Eletroforese em gel, detecção baseada em imagem, corantes alimentares.

ABSTRACT

Gel electrophoresis (GE) is a separation technique widely used in biological analyzes, mainly in the separation of macromolecules as proteins and nucleic acids. GE application to ordinary quantitative determinations is very restricted due to the difficulties to obtain an analytical signal that can be related to the concentrations. In this sense, the present work proposes the combination of GE and the detection based on digital images in real time for the separation and quantification of compounds with low molecular weight. In the proposed studies, the separation and quantification of copper and nickel complexes with eriochrome black T, as the determination of some artificial food dyes (bright blue, amaranth, tartrazine yellow and twilight yellow) are shown. From the electropherograms obtained with the use of a program developed in the laboratory and a webcam to acquire the RGB components of the images, it was possible to obtain linear analytical curves ($R > 0.99$) for all analytes. The proposed strategy was initially applied for the determination of copper and nickel in metallic alloys, leading to no significant differences in the results when compared to those determined by flame atomic absorption spectrometry at 95% confidence level. In addition, precision of approximately 5% were estimated for the measurements. The evaluation of the proposed strategy for the quantification of food dyes was performed by recovery tests in powdered soft drinks, reaching values between 93.3% and 107.7% that showed an adequate accuracy for the proposed method. In addition, coefficients of variation of 5% indicated an adequate precision for the proposed measurement strategy. The studies reported in this work demonstrate a suitable analytical performance of the technique and opens the possibility of its application to different samples and analytes in future works.

Key words: Gel electrophoresis, image-based detection, food dyes.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	3
RESUMO	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 Introdução a eletroforese	9
2.1.1 Suporte de Acetato de Celulose.....	12
2.1.2 Suporte de Gel de Agarose.....	12
2.1.3 Suporte de Gel de Poliacrilamida.....	13
2.2 Fatores que afetam a migração e resolução do gel	13
2.2.1 Concentração de agarose.....	13
2.2.2 Tamanho da molécula de migração.....	15
2.2.3 Agentes intercalantes.....	16
2.2.4 Limite de resolução	16
2.2.5 Tampão de corrida.....	17
2.2.6 Tampões de amostra.....	17
2.2.7 Voltagem aplicada.....	18
2.2.8 Anomalias de migração mais freqüentes.....	18
2.2.9 Protocolo experimental de preparação do gel e aplicação das amostras	19
2.3 Determinações utilizando imagens digitais	20
2.4 Corantes alimentícios.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Reagentes.....	25
3.2 Equipamentos	26
3.3 Construção de um ambiente de iluminação controlada.....	27
3.4 Programa de computador para a detecção baseada em imagens digitais	29
3.5 Preparação do gel e aplicação das soluções	31
3.6 Procedimento geral para as medidas.....	32
Parte I - Estudos com complexos metálicos.....	34
3.7 Testes iniciais com indicadores cromogênicos	34
3.8 Avaliação de migração de metais com os indicadores Murexida, Negro de eriocromo T e Alaranjado de Xilenol.....	35

3.9	Estudos mais aprofundados com o Negro de Eriocromo T	36
3.10	Estudos quantitativos para determinação de níquel e cobre	37
3.11	Otimização das condições para a realização de análises quantitativas	38
3.12	Determinação de Níquel em Arame de Alpaca, e de Níquel e Cobre em moedas	40
Parte II - Estudos com corantes alimentícios		41
3.13	Avaliações qualitativas para alimentos contendo corantes.....	41
3.14	Avaliação quantitativa para corantes alimentícios	41
3.14.1	Separação e quantificação de Amarantho e Azul brilhante.....	41
3.14.2	Separação e quantificação de Amarelo Tartrazina e Amarelo Crepúsculo	42
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO PARTE I – ESTUDO COM COMPLEXOS METÁLICOS	44
4.1	Testes iniciais com indicadores cromogênicos	44
4.2	Avaliação de migração de metais com os indicadores Murexida, Alaranjado de Xilenol e Negro de eriocromo T	47
4.3	Estudos mais aprofundados com o Negro de Eriocromo T.....	48
4.4	Estudos quantitativos para a determinação de níquel e cobre	53
4.4.1	Avaliação da configuração da imagem	53
4.4.2	Faixa linear para calibração.....	55
4.5	Otimização das condições para a realização de análises quantitativas	57
4.6	Determinação de Níquel e Cobre em Ligas metálicas.....	65
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO PARTE II – ESTUDO COM CORANTES ALIMENTÍCIOS	69
5.1	Primeiros estudos com alimentos contendo corantes	69
5.2	Avaliação quantitativa para corantes alimentícios	72
5.2.1	Separação e quantificação de Azul brilhante e Amarantho.....	72
5.2.2	Separação e quantificação de Amarelo Tartrazina e Amarelo Crepúsculo	77
6.	CONCLUSÕES.....	84
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A eletroforese em gel é uma técnica laboratorial bastante simples que utiliza a corrente elétrica para promover a separação de moléculas carregadas, como proteínas e ácidos nucleicos em diversos tipos de fluidos (principalmente os biológicos). As diferentes migrações dessas partículas ocorrem por diferença de carga elétrica no meio em estudo e por seu peso molecular, de forma que moléculas com carga oposta migrem em direções a eletrodos de carga oposta e compostos de menor peso migrem mais rapidamente do que os de maior peso. Após a separação das moléculas, as bandas referentes às amostras são visualizadas por radiação UV.

Nos últimos anos, diversos trabalhos relatam a utilização das imagens digitais adquiridas por máquinas fotográficas, *scanners*, *webcam* e até mesmo por *smartphones* para a determinação de espécies químicas, se mostrando uma alternativa eficiente e de baixo custo para a realização de medidas qualitativas e quantitativas. Essas determinações, na maior parte das vezes, utilizam informações bem simples das imagens capturadas, como os valores de cores baseados no sistema RGB (do inglês Red, Green e Blue).

Desta maneira, este trabalho busca ampliar o uso de eletroforese em gel em determinações químicas, simplificando a sua aplicação por meio de imagens digitais obtidas por *webcam* em tempo real durante e após corridas eletroforéticas. Fora do cenário biológico a eletroforese em gel não vem sendo aplicada em determinações de metais, por exemplo, e muito menos utilizam imagens digitais para o processamento e interpretação dos dados adquiridos. Dessa forma, o principal objetivo do trabalho foi demonstrar o potencial de aplicação da eletroforese em gel acoplado a um sistema de detecção baseado no sistema RGB em determinações químicas.

Esta aplicação foi, em primeiro momento, demonstrar a separação e quantificação de íons metálicos complexados a algum tipo de ligante. E em parte posterior, a separação e quantificação de corantes alimentícios comumente presentes na alimentação diária.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Introdução a eletroforese

O termo eletroforese é comumente utilizado para descrever migração de macromoléculas de uma mistura carregadas sob influência de um campo elétrico, permitindo a separação dos diferentes componentes e determinando as proporções relativas de cada constituinte. Sob condições de corrente constante, o deslocamento dessas partículas é influenciado por um conjunto de fatores como a carga efetiva em meio de estudo, molaridade/composição do tampão e da resistência do meio usado como suporte (ágar, acetato ou gel capilar) [1,2].

Para compreender melhor como essas partículas são separadas é interessante conhecer algumas equações básicas da eletroforese. Quando é aplicada uma diferença de potencial (Voltagem, V) entre o pólo positivo (ânodo) e o negativo (cátodo), gera-se um gradiente de potencial (E), que é a razão entre a voltagem aplicada V e distância d entre os dois eletrodos (Equação 1). Quando se aplica um determinado gradiente de potencial, E , a força que age sob a molécula com determinada carga q em coulombs é Eq Newtons, direcionando esta molécula ao eletrodo de carga oposta [3].

$$E = \frac{V}{d} \text{ (Equação 1)}$$

Existem algumas forças que retardam o movimento destas moléculas carregadas, chamadas de força de resistência friccional, proveniente do tamanho hidrodinâmico da molécula, da forma da molécula, do tamanho do poro em que a eletroforese está sendo conduzida e da viscosidade do tampão. A velocidade v de migração das moléculas pode ser representado pela Equação 2, onde f é conhecido como coeficiente de fricção, resultado das forças de resistência friccional [3].

$$v = \frac{Eq}{f} \text{ (Equação 2)}$$

Assim, basicamente, a separação das partículas depende da mobilidade eletroforética (μ), que matematicamente é dado pela razão entre a velocidade v e o gradiente de potencial E (Equação 3). Desta maneira, após a aplicação de potencial, moléculas com diferentes cargas líquidas irão se separar devido às diferenças de

movilidade eletroforética, e as moléculas com carga similar serão separadas devido a diferença de tamanho, e, portanto, diferenças nas forças friccionais (Equação 4) [3].

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (\text{Equação 3})$$

$$\mu = \frac{q}{f} \quad (\text{Equação 4})$$

Assim, removendo-se o campo elétrico após a corrida eletroforética, quando a primeira molécula chega bem próximo a um dos eletrodos, os componentes da mistura devem estar separados no gel de acordo com sua mobilidade eletroforética, indenificados no gel por meio de coloração de corantes adequados, já que a maioria das amostras não apresentam coloração [3,4].

Grande parcela da corrente entre os eletrodos é conduzida pelos íons presentes no tampão, enquanto uma quantia ínfima pelos íons da própria amostra. A lei de Ohm (Equação 5) expressa a relação entre corrente (**i**), voltagem (**V**) e resistência (**R**) [5].

$$R = \frac{V}{i} \quad (\text{Equação 5})$$

Assim, para acelerar uma separação eletroforética, é conveniente aumentar a voltagem aplicada, aumentando-se a respectiva corrente, e conseqüentemente diminuindo o tempo de análise. No entanto, o aumento da corrente de forma muito acentuada, gera um dos principais problemas na eletroforese, que é a geração de calor [3,6], como descrito na Equação 6, onde **W** (watts) é potência gerada durante a corrida eletroforética [5].

$$W = i^2 \cdot R \quad (\text{Equação 6})$$

Como grande parte desta potência é dissipada como calor, este aquecimento indesejado gera algumas conseqüências, tais como:

- Aumento na difusão dos íons contidos na amostra e no tampão levando ao alargamento das bandas;
- Formação de correntes convexas, que resulta na mistura das amostras separadas;
- Instabilidade de amostras sensíveis ao calor (ex: desnaturação de proteínas);

- Diminuição na viscosidade do tampão e, portanto, diminuição na resistência do meio.

Durante as corridas eletroforéticas com aplicação de voltagem constante, observa-se que a corrente aumenta, devido à diminuição da resistência no meio, aumentando ainda mais o calor liberado (Equação 6). Por este motivo, é utilizado para essas práticas fontes de tensões estabilizadas, que fornecem voltagem constante, eliminando flutuações na migração devido ao aquecimento. Uma solução para a realização das medidas seria a utilização de voltagens pequenas (correntes baixas) para evitar aquecimento, porém isso resultaria em separações com resolução baixa devido o aumento de difusão das moléculas decorrente de um tempo muito elevado de separação. Assim, na maioria das vezes, as corridas são realizadas em condições de voltagem e tempo intermediários que resultem em uma separação satisfatória, mantendo-se o sistema eletroforético sob temperaturas baixas [6].

Outro fator que afeta, porém de forma menos significativa, a separação eletroforética são as chamadas forças eletroendosmóticas, decorrente da presença de algum grupo carregado na superfície no suporte utilizado para a separação que interaja com os analitos, como exemplo os grupos fosfatos que podem estar presentes em agarose dependendo da sua pureza [2].

Até o momento, existem dois métodos de eletroforese: a convencional e a capilar. O primeiro baseado na migração das partículas através dos poros presentes em suportes de acetato, agarose ou poliacrilamida, formando zonas de separação e o segundo na separação dos componentes pela passagem destes em um fluxo de tubo capilar. O segundo apresenta altíssima resolução e custos elevados comparada a primeira, permitindo a separação de diversas substâncias como hidrocarbonetos, vitaminas, fármacos e ácidos orgânicos [7], porém como a separação é baseada em outras características físico-químicas esses aspectos não serão abordados neste trabalho [8].

Em relação aos métodos convencionais, o utilizado neste trabalho foi o de agarose, porém vale destacar os três principais logo a seguir, com o intuito de mostrar que o escolhido apresenta características que podem auxiliar a separação de espécies químicas por apresentar resolução adequada e modo de preparo fácil do suporte de análise.

2.1.1 Suporte de Acetato de Celulose

O suporte para a migração das moléculas é preparado a partir da reação de celulose com anidrido acético e ácido acético, utilizando ácido sulfúrico como catalisador. Inicialmente, observam-se diversas vantagens como neutralidade do material (diminuindo os efeitos das forças eletroendosmóticas), absorção uniforme de proteínas, microporos homogêneos, formação de filmes transparentes que facilitam a leitura, permitindo assim, o fracionamento de proteínas, lipoproteínas, hemoglobinas e substâncias com baixo peso molecular como aminoácidos, peptídeos e nucleotídeos, de forma rápida e com custo relativo baixo. No entanto, com o desenvolvimento de novas técnicas que permitem a obtenção dos resultados com melhor resolução, esta caiu em desuso [9].

2.1.2 Suporte de Gel de Agarose

O gel de agarose é um polissacarídeo linear não absorvível, não fermentável, sem toxicidade, proveniente de diversos gêneros de algas marinhas. Por isso apresenta sua constituição em diversas substâncias como fibras, sais minerais e próprias proteínas, que podem influenciar a separação eletroforética principalmente pelos efeitos eletroendosmóticos. Assim, para sucesso desta técnica é imprescindível a utilização de ágar com apreciável pureza [9].

Uma das principais vantagens desse suporte se deve ao fato de poder se variar a concentração de agarose (0,5 a 2% m/v), variando assim o tamanho dos poros do gel, e conseqüentemente o tamanho de moléculas a serem separadas, já que em concentrações elevadas de agarose o tamanho do poro diminui, devido o aumento de densidade do gel, facilitando assim a separação de moléculas menores. Desse modo, essa técnica apresenta resolução superior a de acetato, por poder se variar a concentração do suporte, porém apresenta uma pequena desvantagem que é a fragilidade do filme utilizado em concentrações pequenas (0,5% m/v), podendo ser facilmente danificado durante a aplicação de amostra ou durante a corrida eletroforética [10].

2.1.3 Suporte de Gel de Poliacrilamida

O gel é sintetizado pelo processo de polimerização da vinílica da acrilamida, um monômero, e da bisacrilamida, utilizando riboflavina ou o persulfato de amônio como catalisador. Quando comparada com as demais técnicas, esse suporte permite o fracionamento com melhores resultados, pois possibilita a visualização de um número mais elevado de proteínas em concentrações menores. Entretanto, o emprego desse gel apresenta a desvantagem da preparação devido à dificuldade de execução de síntese, além da utilização de monômeros que apresentam elevado poder neurotóxico, sendo seu efeito acumulativo, limitando a utilização dessa técnica em casos específicos de pesquisas [11].

2.2 Fatores que afetam a migração e resolução do gel

Nesta seção serão apresentados alguns fatores que influenciam na velocidade de migração e o poder de resolução de um gel. As características e detalhes mais importantes para a obtenção de bons resultados após a corrida eletroforética serão discutidos a seguir [6].

2.2.1 Concentração de agarose

A agarose é um heteropolímero linear, composto por D- e L-galactose (Figura 1), presentes em paredes celulares de determinadas espécies de algas vermelhas. Após a solubilização da agarose em altas temperaturas na presença de solução tampão adequada, obtém-se uma complexa rede desse polímero transparente e homogênea. Ao atingir temperaturas próximas de 50 °C, a solução é transferida a um molde para ocorrer à polimerização e formação de poços para a aplicação de amostras (Figura 2).

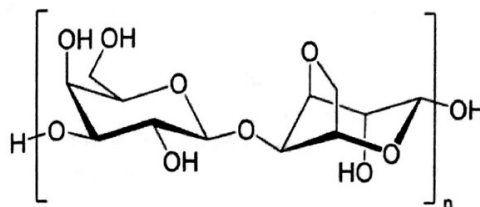


Figura 1. Fórmula estrutural da agarose. Adaptado de [6].

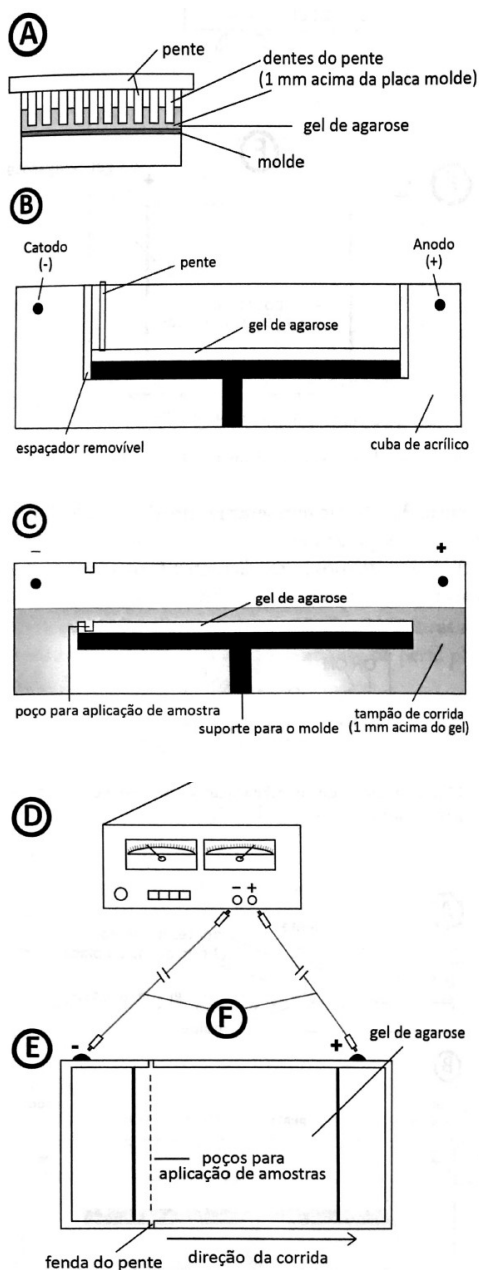


Figura 2. Representação do material utilizado em eletroforese em gel de agarose. Pente utilizado para a formação de poços onde serão aplicadas as amostras (A), vista lateral da cuba de corrida contendo o gel com pente (B), vista lateral da cuba de corrida com indicação da deposição das amostras (C), fonte de tensão constante (D), vista frontal da cuba de corrida contendo gel, indicando os poços de deposição de amostras e a direção da suposta corrida eletroforética (E) e cabos de conexão entre a fonte de tensão e a cuba de corrida (F). Adaptado de [6].

A concentração de agarose apresenta notória importância na resolução, sabendo que a densidade do polímero formado determina o tamanho das moléculas que podem ser separadas adequadamente (Tabela 1). Vale destacar que o diâmetro de poros formados após a gelificação é diretamente proporcional a concentração do polímero utilizada, assim concentrações mais elevadas do gel, permite a separação de moléculas

menores. No entanto, concentrações elevadas do gel proporcionam separações com menores resoluções, sendo concentração do gel e resoluções parâmetros inversamente proporcionais nesta técnica.

Tabela 1. *Faixa de tamanho de fragmentos de DNA que podem a princípio ser separados em relação à concentração da agarose, utilizando como parâmetros o tamanho de moléculas de DNA. Retirada de [6].*

Concentração de agarose [%m/v]	Faixa de tamanho de DNA(Kb*)
0,3	0,5-60
0,5	0,7-25
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,8	0,5-15
1,0	0,25-12
1,2	0,15-6
1,5	0,08-3
2,0	0,05-2

kb* (1000 pb = 1000 pares de base)

Normalmente, em análises laboratoriais, a faixa de concentração do gel utilizada é entre 0,3 a 2,0 % (Tabela 1), que consegue separar de maneira eficiente, 50 pares de base (pb) em concentrações elevadas e cerca de 60.000 pb em concentrações menores, para moléculas de DNA, por exemplo. Géis com concentrações altas tendem a ser muito rígidos, quebradiços e com superfície irregular, comprometendo assim a separação, enquanto géis com concentrações menores são mais difíceis de serem manipulados e suas corridas são extremamente longas. Deste modo, um estudo deve ser realizado com o objetivo de encontrar uma determinada concentração de gel que permita uma separação de maneira mais satisfatória [6,12].

2.2.2 Tamanho da molécula de migração

Para a molécula de DNA, um das principais utilizadas nessa técnica, sua migração é inversamente proporcional ao \log_{10} do número de pb (pares de bases) da mesma. Moléculas maiores migram mais lentamente em razão do maior efeito friccional de arraste e porque essas promovem menor aquecimento durante o trajeto de migração entre os poros do gel [6,7].

2.2.3 Agentes intercalantes

Como normalmente, em análises biológicas, as moléculas a serem separadas por eletroforese apresentam coloração transparente, como a própria coloração do gel, é necessária a utilização de agentes colorimétricos que facilitem a visualização de migração após as corridas eletroforéticas. Para isso, geralmente é utilizado o brometo de etídeo (Figura 3), uma molécula muito parecida com as bases de DNA, que se intercalam entre as bases a serem identificadas sem alguma especificidade. Após o fim da corrida, o gel com as bandas eletroforéticas são expostas a radiação UV no comprimento próximo de 254 nm, e as moléculas de DNA absorvem a radiação e transferem ao brometo de etídeo, que emite em 590 nm [6], região do visível, com luz vermelho alaranjado [13]. Assim, por se implementar um agente as moléculas a serem separadas, este também influencia na velocidade de migração por ser uma molécula volumosa, e retardando assim a corrida.

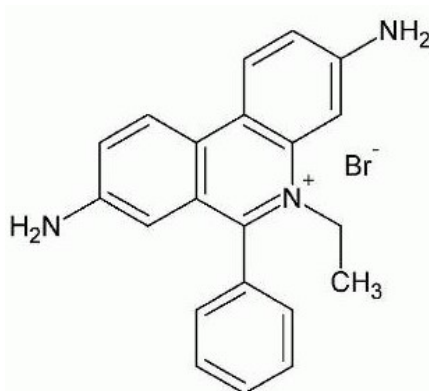


Figura 3. *Fórmula estrutural do brometo de etídeo (Agente intercalante).*

2.2.4 Limite de resolução

Utilizando como referência o DNA, uma das principais moléculas utilizadas em eletroforese em gel, o limite de detecção é por volta de 10 ng/banda, no entanto concentrações muito elevadas (> 1 µg/banda) resultam em migrações mais rápidas e bandas apresentando tamanho menores do que o real. Em situações com grande concentrações de DNA, a migração de moléculas presentes pode atrapalhar a migração de outras por estarem em grande quantidade, induzindo ao analista um erro de interpretação [6].

2.2.5 Tampão de corrida

Quando o gel é submetido a um campo elétrico, em virtude da presença de agrupamentos nas moléculas a serem separadas, existe a tendência de moléculas com carga negativa migrarem em direção ao anodo, ou seja, pólo ou eletrodo positivo, enquanto moléculas positivas migrarem em direção ao cátodo, ou seja, pólo ou eletrodo negativo (Figura 2). O tampão de corrida é utilizado, devido a carga das moléculas a serem separadas dependem do pH, que varia ao longo da corrida eletroforética, assim sua principal função é minimizar esta variação de pH.

A composição e força iônica do tampão de corrida influenciam diretamente na migração e na qualidade do resultado de uma eletroforese. O tampão ideal deve apresentar boa condutividade, produzir o mínimo de calor e ter um longo tempo de vida. Quando a força iônica é muito baixa, a migração é muito lenta, enquanto forças iônicas muito elevadas provocam elevada condutividade elétrica, que gera calor e pode até mesmo liquefazer a matriz de agarose. Mesmo que os tampões utilizados apresentem tempos de vida longo, é adequado a substituição deles quando a corrida demorar muito, para que o tampão não influencie na migração das moléculas. Os tampões mais utilizados por atenderem esses requisitos são o TAE (Tris-Acetato-EDTA, pH 8) e o TBE(Tris-Borato-EDTA, pH 7,5)[6,14].

2.2.6 Tampões de amostra

O tampão de amostra é misturado à amostra que será aplicado no gel e a composição deste tampão deve atender a três propósitos [6,14]:

- 1) ressuspender a amostra a ser aplicada no gel;
- 2) evitar o refluxo de amostra ao ser depositado no gel pela inclusão de um componente com alta densidade;
- 3) acompanhar o carregamento da amostra e da frente de corrida por corantes que se movem em direção ao ânodo/cátodo.

2.2.7 Voltagem aplicada

Em baixas voltagens, as moléculas das amostras migram através do gel de agarose com velocidade diretamente proporcional à voltagem aplicada. Normalmente, a voltagem aplicada está relacionada à distância entre os eletrodos positivos e negativos (Figura 2), na razão 5V/cm. Quando voltagens muito elevadas são aplicadas, a linearidade é perdida, fazendo com que moléculas maiores migrem mais rapidamente que as menores, resultando em perda da resolução. Outro fator que pode influenciar na perda de resolução é realizar a eletroforese em temperaturas muito altas, por isso o mais aconselhável é aplicar a técnica em temperaturas em torno de 4°C [14].

2.2.8 Anomalias de migração mais freqüentes

I. Efeitos de extremidade

É causado pelo aparecimento de bandas eletroforéticas em forma de arco (“sorridentes”), ocasionada por superaquecimento por aplicações de voltagens acima da adequada [14].

II. Efeito de sobrecarga da amostra

Sempre um estudo deve ser realizado para encontrar a quantidade máxima a ser separada por eletroforese em gel, já que em concentrações muito elevadas, as próprias moléculas a serem separadas interferem entre si, tornando moléculas menores com migrações com maior velocidade, em moléculas que apresentam velocidades próximas das moléculas maiores [6,14].

III. Contaminação da amostra

Como em qualquer outra técnica analítica, impurezas influenciam na determinação dos analitos de interesse, assim, em eletroforese em gel a presença de sais e outros compostos tendem a retardar a separação. Desse modo, deve-se tentar encontrar alguma alternativa para que as amostras aplicadas em gel tenham a menor quantidade de contaminantes possível [14].

2.2.9 Protocolo experimental de preparação do gel e aplicação das amostras

Geralmente, na preparação do gel é necessário adicionar quantidade de agarose ao tampão escolhido em erlenmeyer para a concentração que se deseja obter, colocando a mistura em forno micro-ondas até que se forme uma solução transparente e homogênea. Posteriormente, essa solução é vertida no molde do gel, sendo posicionado um pente para a formação de poços de aplicação de amostras, deixando a solução gelificar à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos [6].

Após a polimerização do gel, esse é transferido para a cuba de corrida (Figura 2B), onde é vertida quantidade necessária de tampão para que o gel fique submerso e coberto com pelo menos 1mm de tampão de corrida (Figura 2C). As amostras, previamente preparadas com tampão de amostra, são aplicadas com auxílio de uma micropipeta nos poços de aplicação de amostra (Figura 2C). Posteriormente, é coberta a cuba e conectados os cabos de fonte de tensão (Figura 2D, 2E e 2F), aplicando a voltagem determinada pela distância entre os eletrodos, na proporção de 5V/cm. Desse modo, basta observar a separação, desligar a fonte após a corrida e analisar os deslocamentos expondo o gel a luz UV e fotografar para a documentação [6].

Vale destacar que esses procedimentos normalmente realizados em análises de outros fins, foram adaptados nesse trabalho e expostos mais adiante na secção de 3.Materiais e Métodos.

2.3 Determinações utilizando imagens digitais

O uso de imagens digitais como ferramenta para análises químicas tem sido amplamente utilizado e expandido nos últimos anos como demonstrado no histograma da Figura 4[15]. Instrumentos como espectrofluorímetros ou espectrofotômetros vem sendo substituídos para determinações onde são observadas absorções, reflexões ou emissões no visível por câmeras fotográficas, *scanners*, *webcams*, *smartphones*, que ao registrar as imagens obtidas, permitem a realização de determinações qualitativas e quantitativas com desempenho analítico adequado [16,17]. Utilizando informações simples das imagens obtidas, como os valores de cores usualmente baseadas no sistema RGB (do inglês Red, Blue e Green), é possível obter resultados analíticos similares àqueles adquiridos com instrumentação já bem estabelecida, caracterizando essa estratégia em uma alternativa de menor custo para a realização de determinadas medidas instrumentais [18].

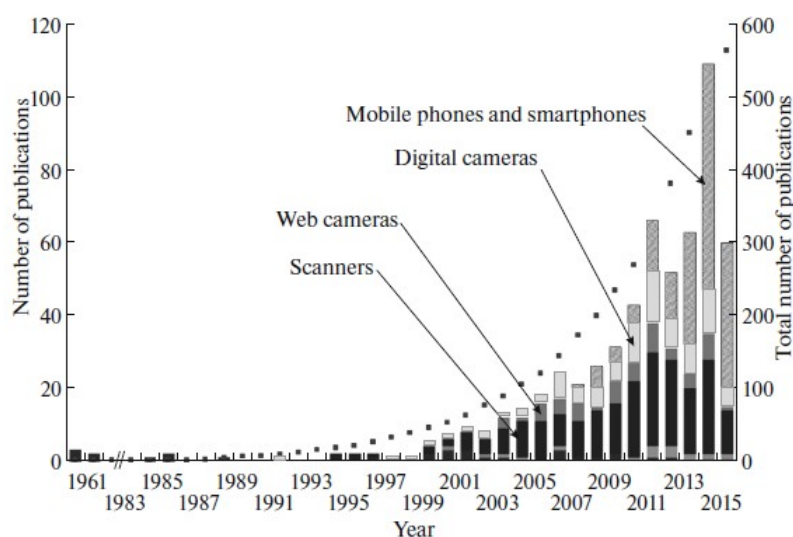


Figura 4. Número de publicações envolvendo o uso de imagens digitais em análises químicas de 1960 a 2015 ($N = 587$). Histograma mostra a distribuição por ano e por dispositivos [15].

Uma imagem digital é composta por pixels e pode ser definida por uma função bidimensional da intensidade da luz refletida ou emitida por um corpo, definida como uma distribuição de energia luminosa, na qual parte dessa energia é absorvida, e outra parte transmitida e refletida, sendo essas duas últimas podendo ser facilmente capturadas por algum dispositivo, como alguns equipamentos eletrônicos como sensores CCD (charge-coupled device) ou CMOS (complementary metal oxide semiconductor)

[19]. Assim como o olho humano é capaz de observar fotografias ou uma cena real e associar os comprimentos de onda refletidos com padrões de cores com a interpretação cerebral, esses dispositivos também apresentam a capacidade de digitalizar as imagens e converter-las em combinação de agrupamentos de valores numéricos pelas cores vermelho (R), verde (G) e azul (B) [20].

Nos últimos anos, diversos grupos de pesquisa utilizaram o recurso de análise por imagens digitais como ferramenta analítica em várias áreas do conhecimento: na ciência de tecnologia de alimentos para a inspeção visual de frutas [21], para o desenvolvimento de um sistema acoplado em iPhone para a quantificação de resíduos de tetracilina (antibiótico) no leite [22], em aplicações forenses com uma câmera de celular para a determinação de metanfetamina [23], para o diagnóstico de insuficiência renal através da averiguação do nível de creatinina em amostras de urina [24], e até mesmo para o desenvolvimento de um método simples, rápido e seguro para identificar a adulteração de leite de vaca com base na construção de histogramas de cores nas escalas RGB [25]. Existem até mesmo dispositivos de aquisição de imagens incorporados a software que permitem aquisição, processamento e apresentação de resultados por meios de técnicas de análise univariada ou multivariada [19].

Um exemplo que demonstra a aplicação da substituição de instrumentos de detecção mais caros, por uma webcam ou câmera de celular, por exemplo, está contida na Figura 4. Neste exemplo, em uma parte homogênea de coloração no balão volumétrico contendo um composto de coloração laranja, foram adquiridos os sinais RGB. A partir desses sinais, utilizando uma faixa de concentração, que nesse caso, foi variado em 5 a 25 ppm, foi observado que a componente B sofre atenuação linear de sinal a medida que a concentração do analito aumenta. Realizando uma correção com o valor máximo de sinal possível (255) é possível obter uma relação entre concentração e sinal analítico como demonstrado na Figura 5, com a curva analítica exposta.

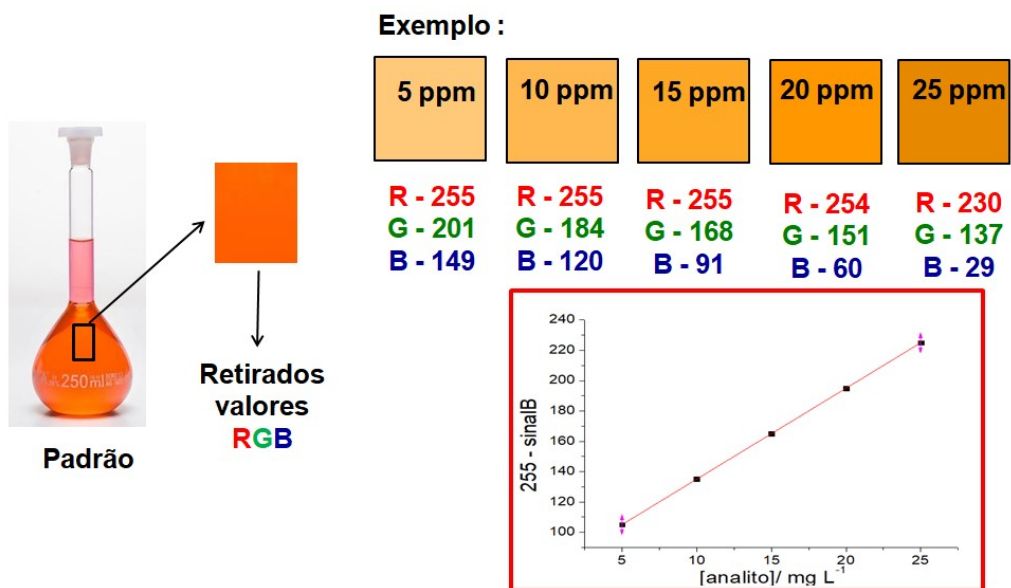


Figura 5. Exemplificação de como ocorre uma possível determinação de algum composto, utilizando os valores RGB das imagens.

Embora esses diversos estudos demonstrem o potencial da análise por imagens digitais como uma ferramenta analítica em diferentes áreas da ciência, até o momento nenhum deles utilizou esse artifício para a determinação em tempo real de moléculas menores separadas pela técnica de eletroforese em gel. Vale destacar que o uso de imagens digitais também já está presente em determinações de análise de interesse biológico, só que são aplicados apenas nas chamadas macromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos, [26].

2.4 Corantes alimentícios

Corantes são aditivos alimentares definidos como toda substância que confere, intensifica ou restaura a cor de um alimento. Segundo o Item 1.2 da Portaria SVS/MS 540/97, aditivo é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos com o objetivo de modificar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante sua fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação, sem o propósito de nutrir [27].

Existem três categorias de corantes permitidas pela legislação para uso em alimentos: os naturais, o caramelo e os artificiais. Considera-se natural aquele proveniente de uma substância vegetal ou animal. O corante caramelo é obtido a partir de açúcares pelo aquecimento em temperaturas superiores ao seu ponto de fusão. Enquanto os corantes artificiais são obtidos a partir de sínteses orgânicas com composição química definida [28].

Os corantes naturais têm sido utilizados há anos, sendo que alguns deles apresentam elevada solubilidade em óleos, proporcionando assim, matizes suaves e conferindo ao produto aspecto natural, o que aumentou consideravelmente a aceitação do consumidor [29].

Os corantes classificados como caramelo ocupam um lugar de destaque nas indústrias de alimentos, sendo um dos mais antigos aditivos utilizados para a coloração do produto final, para se conseguir uma cor que pode variar da amarelo-palha à marrom escuro até quase negro. Seu uso é de aproximadamente 200.000 toneladas/ano, o que representam cerca de 90% do peso de todos os corantes adicionados em alimentos e bebidas consumidos no mundo. No Brasil, seu uso é permitido, entre outras aplicações em molhos, gelados comestíveis, biscoitos, doces, bebidas alcoólicas e refrigerantes, destacando-se principalmente no sabor guaraná e cola [29].

Os corantes artificiais fornecem uma ampla gama de cores, proporcionando qualquer tonalidade do espectro visível, apenas misturando-se diferentes corantes em definidas proporções de acordo com o meio que se pretende colorir. Algumas características marcantes desse grupo de corantes, que os tornam bastante utilizados, é que a maioria apresenta elevada estabilidade (luz, oxigênio, calor e pH), uniformidade na cor conferida, alto poder tintorial, isenção de contaminação microbiológica e custo de produção relativamente baixo. No Brasil, os corantes artificiais permitidos são o

amarelo crepúsculo, azul brilhante, bordeaux S ou amaranto, eritrozina, indigotina, ponceau 4R, tartrazina, vermelho 40, verde rápido, azul patente V e azorrubina. Do ponto de vista da saúde, essa classe de corantes geralmente não são recomendadas, justificando seu uso quase que exclusivamente do ponto de vista comercial e tecnológico. Mesmo assim, esses corantes são amplamente utilizados nos alimentos e bebidas devido à sua grande importância no aumento da aceitação dos produtos [30-32].

Assim como muitos outros aditivos alimentares, o controle analítico dos corantes artificiais é de grande importância na indústria alimentícia, devido ao potencial tóxico e carcinogênico que apresentam. Alguns métodos analíticos já consolidados têm sido descritos para a determinação de misturas de corantes em alimentos, incluindo espectrofotometria sensível [33-35], espectrofotometria utilizando quimiometria [36,37], cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [38-42], HPLC acoplado a espectrofotometria de massa (MS) [43], extração em fase sólida – HPLC [40], e cromatografia gasosa – MS [44].

É importante destacar que, até o momento, não foram descritos na literatura trabalhos que utilizem a separação por eletroforese em gel, com posterior detecção baseada em imagens digitais para a determinação quantitativa de corantes em alimentos. Desta forma, o presente trabalho é pioneiro em demonstrar a sua utilização para este propósito, compondo uma alternativa simples e rápida para a resolução deste problema.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Para o preparo das soluções empregadas no trabalho foram utilizados os reagentes a seguir, com indicação de pureza e marca:

- Agarose, Gibco Brl
- Trizma base ($C_4H_{11}NO_3$), pureza 99,5%, Merck
- Ácido acético glacial (CH_3COOH), pureza 99,0%, Cinética
- Ácido etilenodiamino tetra-acético, EDTA, ($C_{10}H_{16}N_2O_8$), P.A, Synth
- Hidróxido de sódio (NaOH), pureza 97,0%, Reagen
- Negro de eriocromo T ($C_{20}H_{12}N_3O_7SNa$), P.A – ACS, J. T. Baker
- Verde de Metila ($C_{27}H_{35}BrClN_3$), P.A, Merck
- Azul de timol ($C_{27}H_{30}O_5S$), P.A, Dinâmica
- Rodamina B ($C_{28}H_{31}ClN_2O_3$), P.A - ACS, Merk
- Fluoresceína ($C_{20}H_{12}O_5$) , P.A - ACS, Merk
- Azul de bromotimol ($C_{27}H_{28}Br_2O_5S$), P.A, Synth
- Glicose ($C_6H_{12}O_6$), pureza 99,0%, Sigma-Aldrich
- Murexida ($C_8H_8N_6O_6$), P.A - ACS, Merk
- Metanol (CH_3OH), pureza 99,0%, Tedia
- Cloreto de níquel hexahidratado ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$), pureza 97%, Riedel-de Haen
- Cloreto de cobre dihidratado ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$), pureza 98%, Vetec
- Cloreto de cálcio ($CaCl_2$), P.A - ACS, Dinâmica
- Cloreto de ferro III ($FeCl_3$), P.A - ACS, Dinâmica
- Sulfato de alumínio ($Al_2(SO_4)_3 \cdot 14-18H_2O$), P.A, Synth

- Fosfato de sódio monobásico (Na_2HPO_4), pureza 99,0%, Merck
- Alaranjado de xilenol ($\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{Na}_4\text{O}_{13}\text{S}$), P.A - ACS, Dinâmica
- Ácido clorídrico (HCl), 37%, Synth
- Sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), P.A, Isofar
- Ácido nítrico (HNO_3), pureza 65,0%, Quimesc
- Hidróxido de amônia (NH_4OH), 30%, Synth
- Tampão TAE 50X
- Azul brilhante ($\text{C}_{37}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_9\text{S}_2$), 90%
- Amaranço ($\text{C}_{20}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{Na}_3\text{O}_{10}\text{S}_3$), 90%
- Amarelo Tartrazina ($\text{C}_{16}\text{H}_9\text{N}_4\text{Na}_3\text{O}_9\text{S}_2$), 90%
- Amarelo Crepúsculo ($\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_7\text{S}_2$), 90%
- Suco de limão com polpa de fruta (Qualimax Food Services)

3.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados nos estudos estão listados a seguir:

- Caixa de madeira (25 cm largura x 35 cm comprimento x 23 cm altura)
- Fita de Leds brancos
- Lâmpada de coloração variada
- Webcam de alta definição – Logitech HD 1080p- 15MP
- Balança analítica, Shimadzu, precisão de 0,0001g
- pHmetro, HANNA pH 21
- Cuba de eletroforese – Major Science e Fonte de eletroforese 300V - K33- Kasvi
- Forno Microondas – LG Modelo MS2355RA, 220V – 60 Hz – 1000W
- Espectrômetro de absorção atômica em chama – Buck Scientific

3.3 Construção de um ambiente de iluminação controlada

Todas as medidas foram realizadas em um ambiente de luz controlada em uma caixa de madeira (Figura 6A) com dimensões de 25cm x 35cm x 23cm (largura x comprimento x altura). Vale destacar, que durante os estudos foram avaliados duas classes de analitos diferentes, em primeiro momento (PARTE I) foram avaliados a determinação em complexos metálicos e posteriormente (PARTE II) a determinação de corantes alimentícios. Desta maneira, na PARTE I, foi utilizada uma lâmpada de LED (Figura 7) (LLUM, E27, colorida e com intensidade ajustável por controle remoto) fixada na parte lateral da caixa (Figura 6B), em que era possível variar a coloração de iluminação, assim como a sua intensidade de cor. Para a PARTE II dos estudos, sob a tampa da caixa, foi fixada uma fita de LED com 15 emissores brancos genéricos conforme mostra a Figura 6C.

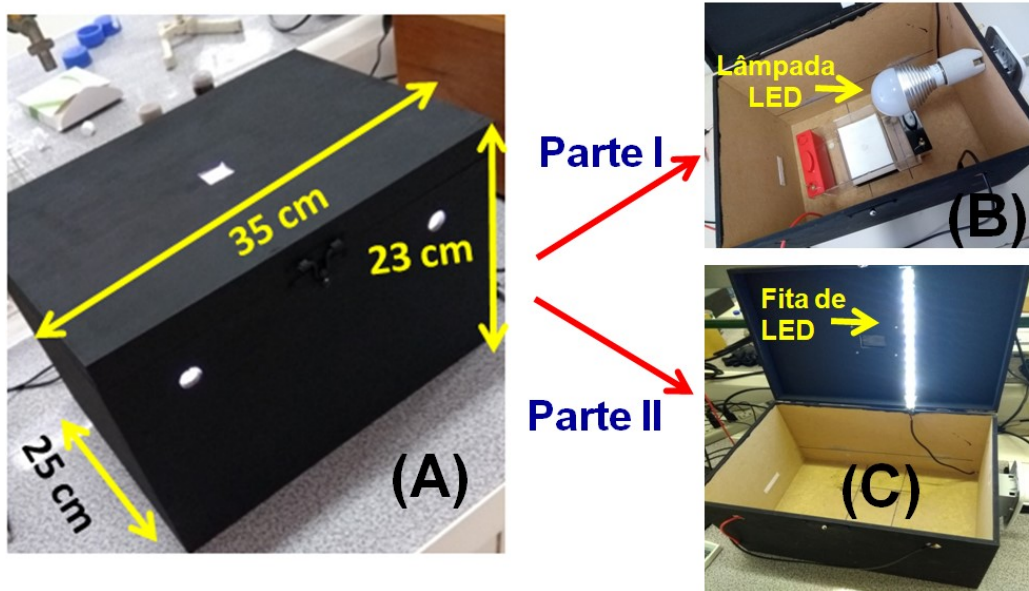


Figura 6. Caixa de madeira (A), lâmpada LED com coloração e intensidade de iluminação variada (B) e fita de LED fixada parte interior da tampa da caixa (C).



Figura 7. Lâmpada LED E27 com controle remoto (cor e intensidade regulável).

Um suporte retangular foi fixado no fundo da caixa (Figura 8A) para posicionamento de uma cuba de eletroforese onde foram realizadas as medidas (Figura 8B). Para a passagem dos cabos dos eletrodos da cuba, foram confeccionados orifícios circulares na parte frontal da caixa (Figura 8C), além de um orifício retangular em sua tampa, com o intuito de acoplar uma Webcam (Figura 8D), utilizada para a aquisição das imagens. Desse modo, a lente da Webcam ficou posicionada a cerca de 15 cm da superfície do gel empregado nas corridas em todos os estudos.

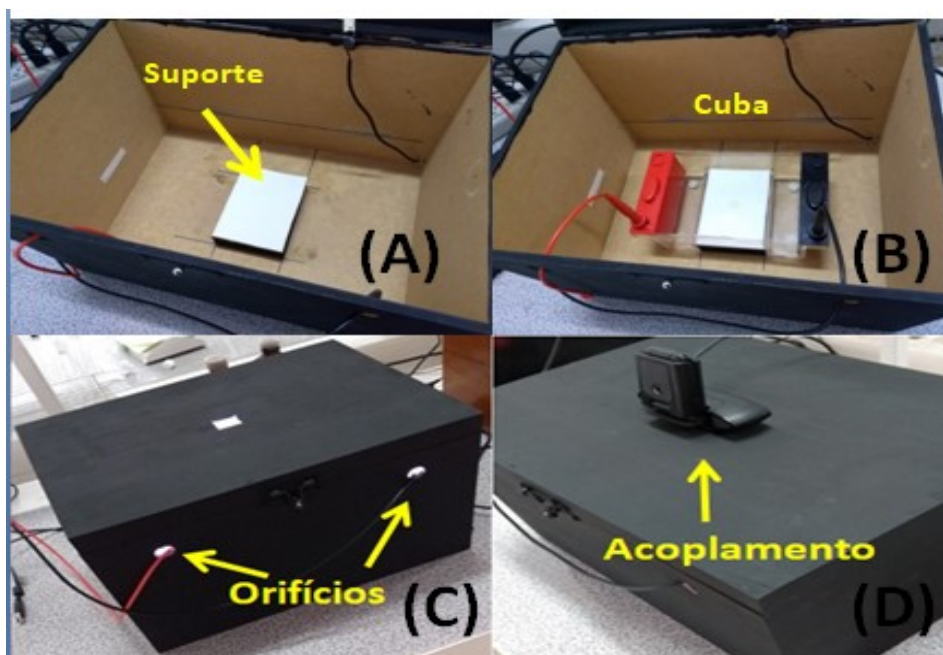


Figura 8. Suporte no fundo da caixa (A), cuba de eletroforese posicionada (B), orifícios na parte frontal e na tampa (C) e acoplamento com Webcam (D).

3.4 Programa de computador para a detecção baseada em imagens digitais

Para a detecção dos analitos separados por eletroforese em gel foi proposta a utilização de medidas colorimétricas baseadas no sistema RGB de imagens digitais a partir de um *software Lab - Made*. Para isso, um programa de computador foi escrito em *VisualStudio 2013* para permitir a aquisição do sinal em tempo real gerando eletroferogramas em função do deslocamento percorrido pela substâncias no gel. Vale destacar que o programa foi desenvolvido pelo Laboratório LIAMA no Instituto de Química na UnB com o objetivo desta aplicação.

A Figura 9 apresenta a interface ao usuário do programa desenvolvido, no qual a imagem obtida por uma Webcam de alta definição é mostrada em tempo real em conjunto com nove amostradores de sinal RGB (Figura 9A), consistindo em retângulos de tamanho variável que definem as regiões das imagens para as quais serão obtidos os sinais digitais médios para o conjunto de pixels contidos em seus interiores. Para a realização das medidas, o usuário define a largura e comprimento dos amostradores (Figura 9C), além do número de pixels que serão lidos e quantas vezes serão lidos (Figura 9D), posicionando-os imediatamente antes da região de aplicação das amostras no gel (poços). Durante a leitura, esses amostradores deslocam-se pixel a pixel no mesmo sentido de fluxo que percorreu as amostras e os valores dos sinais RGB são plotados concomitantemente para as nove regiões amostradas gerando 27 eletroferogramas (sinais para R, G e B para cada um dos amostradores).

Na lateral inferior esquerda da interface do programa (Figura 9C) encontram-se as janelas para seleção das configurações da câmera e as janelas que definem os parâmetros dos amostradores:

Largura: define a largura do retângulo que obterá os sinais digitais.

Altura: define a altura do retângulo que obterá os sinais digitais.

Coordenada X: define o posicionamento dos amostradores no sentido horizontal.

Coordenada Y: define o posicionamento dos amostradores no sentido vertical.

Fator X: define as distâncias no eixo X entre os amostradores.

Fator Y: define as distâncias no eixo Y entre os amostradores.

Vale relatar que após os ajustes desses parâmetros é possível alinhar todos os amostradores e realizar a leitura, durante a separação por eletroforese, em nove canais, simultaneamente. Desse modo é possível realizar medidas para os padrões de calibração e para as amostras simultaneamente na mesma corrida eletroforética. O software permite também a visualização da aquisição dos eletroferogramas em um gráfico localizado na parte superior direita da interface do programa (Figura 9B).

O programa permite ainda o ajuste de outros parâmetros de leituras necessários para as medidas:

Número de leituras: define o deslocamento em número de pixels necessário para realizar as leituras ao longo de todas as linhas de separação.

Replicatas de imagens: define o número de medidas a serem realizadas para o amostrador em determinada posição (para cada posição do amostrador, durante as medidas, são realizadas leituras de R G B dos pixels naquela posição, o que permite a obtenção de uma média dos sinais para cada posição).

De modo geral, o procedimento de leitura, utilizando o programa, consiste em posicionar o gel sob o foco da webcam e ajustar adequadamente os parâmetros de imagem como brilho, contraste, ganho, exposição, equilíbrio de branco, e intensidade de cor de forma que seja possível observar, com elevada nitidez, a separação dos componentes da mistura durante a corrida em gel. De fato, as configurações são ajustadas para fornecer uma imagem na qual seja possível observar a separação dos componentes em eletroforese. Realizado esse ajuste, os amostradores de R G B são devidamente posicionados e, ao clicar no botão iniciar, o usuário é solicitado a inserir um nome de arquivo que conterá, ao final das leituras, os dados da corrida.

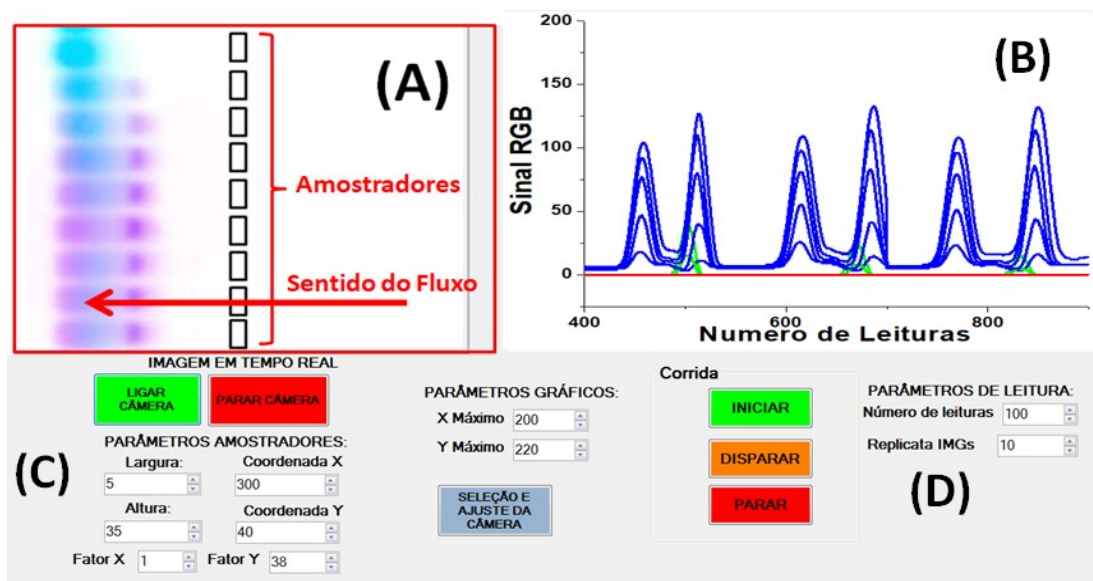


Figura 9. Interface de programa utilizado para a obtenção dos eletroferogramas. Visão do gel (A), eletroferograma obtido pela leitura de pixels do programa (B), regiões de ajuste do tamanho do amostrador (C) e da distância entre os amostradores (D).

3.5 Preparação do gel e aplicação das soluções

Os géis utilizados em todas as corridas foram preparados misturando-se a massa adequada de agarose com 50 mL de solução de corrida (solução tampão) em um erlenmeyer de 250 mL, seguido do aquecimento da mistura até a fervura em forno microondas. Após a retirada do forno, a mistura era agitada manualmente e vertida na placa onde do gel se polimerizava (Figura 10A). No presente trabalho foram avaliados géis com diferentes composições de agarose (0,5 – 3,0% m/v).

Os poços para aplicação das amostras, com volume aproximado de 20 μ L, foram gravados no gel com auxílio de um pente (Figura 10B), o qual era devidamente posicionado no suporte antes do gel sofrer a polimerização (Figura 10C), e retirado após 20 minutos da polimerização se completar (Figura 10D), formando assim 16 poços (Figura 10E). Em todos os estudos, o volume dos poços foi totalmente preenchido pelas soluções depositadas.

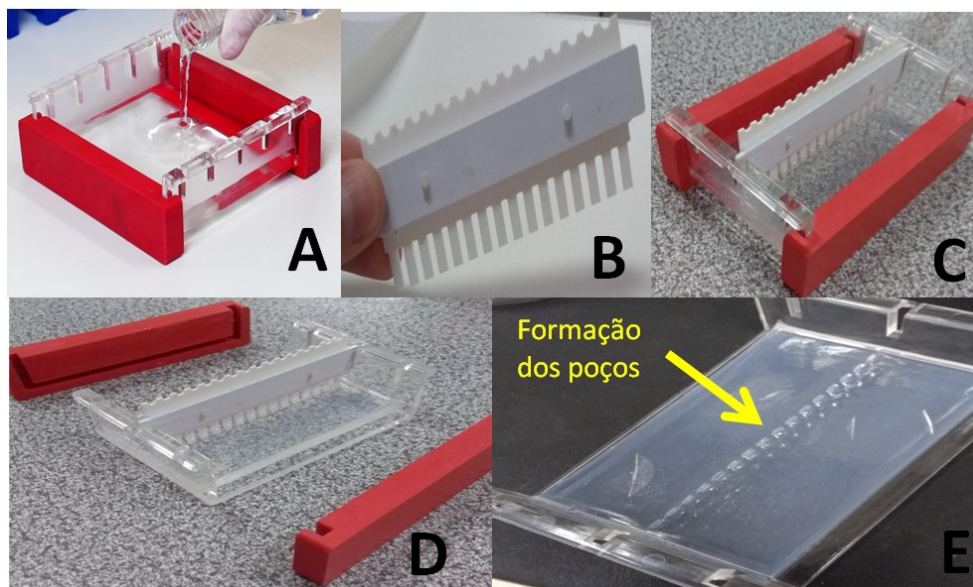


Figura 10. Aplicação da solução de agarose homogeneizada e quente na placa (A), pente para formação de poços (B), gel polimerizado (C), retirada das laterais da placa(D) e formação dos poços (E).

3.6 Procedimento geral para as medidas

De maneira geral, o procedimento para a realização das medidas seguiu as seguintes etapas. A placa contendo o gel polimerizado era transferida para a cuba de eletroforese (Figura 11A), onde era inserida a solução de corrida gelada (5°C) (tampão) e deixado o sistema sob aplicação do potencial de estudo durante 10 minutos, para ambientação do gel. Vale destacar que, o volume de solução de corrida, cerca de 300 mL, era suficiente para imergir todo o gel.

Após essa etapa, 20 μ L das soluções dos padrões/amostras eram aplicadas em seus respectivos poços no gel com auxílio de uma micropipeta (Figura 11B e 11C). É importante relatar que as soluções dos padrões/amostras eram devidamente saturadas com glicose de forma a proporcionar densidades superiores àquela da solução de corrida, permitindo a deposição das soluções ao fundo dos poços.

Posteriormente, o potencial e a corrente a serem aplicados eram ajustados na fonte e realizava-se a corrida eletroforética até que um dos analitos atingisse o final do gel.

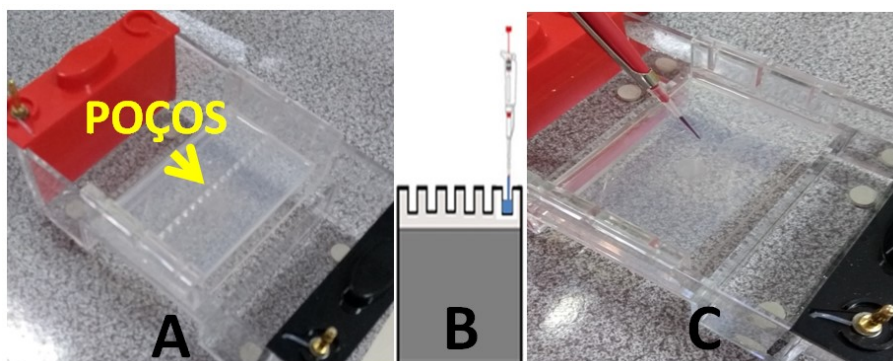


Figura 11. *Inserção do gel a cuba de eletroforese (A), imagem ilustrativa da forma de aplicação das soluções nos poços (B) e aplicação das soluções com solução de corrida na cuba de eletroforese (C).*

Após a interrupção da aplicação do potencial realizavam-se as medidas colorimétricas, as quais foram obtidas com Webcam Gamer C920 Full HD, Logitech 15MP (Figura 12). Vale destacar que para cada medida específica era necessário o ajuste de propriedades da imagem antes da aquisição dos sinais, como brilho, intensidade de branco, contraste, exposição, equilíbrio de branco com o intuito de adquirir imagens mais fidedignas das separações realizadas.



Figura 12. *Webcam Gamer C920 Full HD, Logitech 15MP utilizadas em todos os estudos.*

Parte I - Estudos com complexos metálicos

3.7 Testes iniciais com indicadores cromogênicos

Com o objetivo de se familiarizar com o procedimento de separação por eletroforese em gel, um ensaio preliminar foi conduzido com indicadores de diferentes massas e cargas.

Inicialmente, foram depositados nos poços do gel, em duplicata e em sequência soluções dos indicadores negro de eriocromo T, verde de metila, azul de timol, rodamina B, fluoresceína e azul de bromotimol, aplicando-se uma diferença de potencial de 80 V durante 40 minutos, utilizando como tampão de corrida o “tampão TAE 1,0X” e gel a 1,0%.

Posteriormente, em outro gel foram depositadas soluções de verde de metila, azul de timol, rodamina B, fluoresceína e uma “solução mistura” dos quatro indicadores. Sendo as soluções dos indicadores aplicadas em duplicata e a “solução mistura” em quadriplicata. Foi aplicada uma diferença de potencial de 100 V durante 40 minutos, utilizando o mesmo “tampão TAE 1,0X” e gel a 1,0%.

O preparo de todas as soluções está descritos na seção a seguir.

3.7.1 Soluções

Para a preparação de 1L da solução “tampão TAE 1,0X” foram dissolvidos 4,84 gramas de trizma base, 1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de uma solução EDTA, 0,5 mol L⁻¹ e pH 8, ajustado com NaOH, completando o volume remanescente com água destilada.

As soluções para depósito de todos indicadores 1% (m/v) foram preparadas dissolvendo-se a massa necessária dos indicadores em 10 mL do “tampão TAE”, com posterior adição de glicose até a saturação da solução. A “solução mistura” foi preparada da mesma forma, porém esta continha 1% de cada um dos indicadores verde de metila, azul de timol, rodamina B e fluoresceína, com mesma adição de glicose até a saturação.

3.8 Avaliação de migração de metais com os indicadores Murexida, Negro de eriocromo T e Alaranjado de Xilenol

Com o objetivo de avaliar o potencial de aplicação da estratégia proposta para a determinação quantitativa de analitos, foi estudada inicialmente a separação por eletroforese de complexos metálicos formados com o mesmo ligante. Para isso, foram realizados três testes utilizando complexos dos íons metálicos Ni^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Fe^{+3} e Al^{+3} complexados previamente com os ligantes Murexida, Negro de eriocromo T e Alaranjado de Xilenol, aplicando-se uma diferença de potencial de 90 V – 200 V durante 10 - 40 minutos, utilizando o “tampão TAE sem EDTA” e gel a 1,0%.

Estudos adicionais com o alaranjado de xilenol utilizaram as mesmas condições experimentais descritas acima, com a substituição do íon metálico cálcio pelo zinco, e a inserção de soluções contendo dois ou mais íons metálicos para avaliar possíveis separações. Variou-se também o pH (6,0 e 6,7) da solução de corrida, a concentração do ácido acético (0,1 mol L⁻¹ e 0,3 mol L⁻¹), a concentração do gel utilizada (0,5 e 1,0%), além da própria solução de corrida (tampão acetato e tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 6,7), variando-se também a concentração dos íons metálicos.

3.8.1 Soluções

O preparo da solução “tampão TAE sem EDTA” foi realizado como descrito na seção 3.7.1, porém sem a adição de EDTA.

As soluções dos indicadores, Murexida e Negro de eriocromo T foram preparadas dissolvendo-se a massa adequada para obter 50 mL de solução a 0,5% m/v, completando o volume remanescente com metanol. As soluções estoque de alaranjado de xilenol foram preparadas dissolvendo-se a massa adequada do reagente em solução tampão de cada estudo para obter 10 mL de solução a 0,3 mmol L⁻¹.

Soluções estoque dos metais níquel, cobre, cálcio, ferro, alumínio e zinco foram preparadas dissolvendo-se a massa dos sais NiCl_2 , CuCl_2 , CaCl_2 , FeCl_3 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e ZnSO_4 em água destilada para se obter 50 mL de soluções com concentração dos íons metálicos a 1000 mg L⁻¹.

Para os indicadores murexida e negro de eriocromo T, as soluções dos metais (222 mg L^{-1}) para aplicação nos poços do gel foram preparadas pela mistura de 1,0 mL de “tampão TAE sem EDTA” com 400 μL de solução Murexida (0,5% m/v) mais 400 μL da solução estoque (1000 mg L^{-1}) do respectivo metal, com adição de glicose até a saturação da solução. Os mesmos volumes foram utilizados para preparar a soluções para depósito com o indicador Negro de eriocromo T (0,5% m/v), substituindo apenas o indicador utilizado anteriormente.

As soluções tampões de acetato sempre foram preparadas dissolvendo-se o volume de ácido acético glacial adequado em água destilada para a obtenção da concentração em cada parte do estudo, ajustando o pH da solução final com adições de solução NaOH (3 mol L^{-1}).

A solução tampão fosfato foi preparada dissolvendo a massa de Na_2HPO_4 adequada para obter uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ajustando-se o pH a 6,7 com solução de HCl (3 mol L^{-1}).

Com o indicador alaranjado de xilenol, as soluções dos metais (400 mg L^{-1}) para aplicação nos poços do gel foram preparadas misturando 1,5 mL da solução estoque de alaranjado de xilenol com 1,0 mL da solução estoque (1000 mg L^{-1}) do respectivo metal, com adição de glicose até a saturação da solução. Para a obtenção de soluções menos concentradas dos metais (20 mg L^{-1}) misturou-se 5,0 mL da solução estoque de alaranjado de xilenol com 100 μL da solução estoque (1000 mg L^{-1}) do respectivo metal.

Uma solução contendo níquel, cobre e alumínio (400 mg L^{-1}) foi preparada pela mistura de 1,5 mL da solução estoque de alaranjado de xilenol com 1,0 mL de cada solução estoque (1000 mg L^{-1}) dos íons metálicos, seguido da adição de glicose até a saturação da solução. Uma solução menos concentrada desses íons (20 mg L^{-1}) foi preparada misturando-se 5,0 mL da solução estoque de alaranjado de xilenol com 100 μL da solução estoque (1000 mg L^{-1}) de cada metal.

3.9 Estudos mais aprofundados com o Negro de Eriocromo T

Como dentre todos os indicadores, o negro de eriocromo T apresentou um melhor desempenho para possível separação de íons metálicos e determinação quantitativa dos elementos estudados, foram realizados novos estudos com esse

indicador com o intuito de verificar quais íons metálicos poderiam ser separados de maneira mais eficiente. Para esse estudo foram preparadas de soluções de zinco II (40 mg L⁻¹), ferro III (100 mg L⁻¹), alumínio III (100 mg L⁻¹), cobre II (20 mg L⁻¹) e níquel II (5 mg L⁻¹) diluindo o volume das soluções dos metais (1000mg L⁻¹) adequadas em 1 mL de solução indicador (2,88 g L⁻¹), 1 mL de solução glicose e completando o volume remanescente com solução trizma 1,0X até o volume de 5 mL.

Posteriormente foi realizado um estudo de separação de um mistura binária contendo os íons cobre e níquel previamente complexado ao indicador negro de eriocromo T. A solução binária foi preparada da mesma maneira que as outras soluções, apenas com a adição dos metais cobre e níquel, a solução branco é o próprio indicador livre. Além disso, ainda foi avaliado se a quantidade de indicador proporcionava uma separação mais nítida, utilizado metade do volume de indicador para o preparo de todas as soluções em estudo.

Todas as corridas foram realizadas utilizando a concentração do gel em 2,0%, com solução trizma a 1,0X, sob potencial de 250V.

3.9.1 Soluções

Para a preparação da solução de trizma base 1,0X, foi dissolvido 4,84 g de trizma em 1L de água destilada. A solução estoque de indicador de negro de eriocromo T foi preparada dissolvendo-se a massa necessária em solução de trizma para a obtenção de 50 mL de uma solução 2,88 g L⁻¹. A solução de glicose foi preparada dissolvendo-se 20 g de glicose em 100 mL de água destilada.

Soluções estoque dos metais níquel, cobre, zinco, ferro e alumínio foram preparadas dissolvendo-se a massa dos sais NiCl₂, CuCl₂, ZnSO₄, FeCl₃ e Al₂(SO₄)₃ em água destilada para se obter 50 mL de soluções com concentração dos metais a 1000 mg L⁻¹.

3.10 Estudos quantitativos para determinação de níquel e cobre

Considerando que a separação dos complexos metálicos de Ni⁺² e Cu⁺² com negro de eriocromo T apresentaram uma separação eficiente pelo método proposto, foi então avaliada a possibilidade de realização de medidas quantitativas baseadas na intensidade de coloração das bandas de eletroforese obtidas.

Inicialmente realizaram-se medidas independentes para cada metal, não sendo utilizadas misturas dos íons. Nos poços do gel foram aplicados, em sequência, alíquotas de solução do indicador negro de eriocromo T livre (branco) e soluções de níquel/ligante em variadas concentrações até que se chegasse no intervalo de 1 a 5 mg L⁻¹ em íons níquel. Para o cobre, empregou-se o mesmo procedimento, chegando a concentração de íons cobre na faixa de 12 a 20 mg L⁻¹.

Posteriormente verificou-se a possibilidade da construção de curvas analíticas a partir de soluções binárias, contendo íons níquel e cobre. Para isso, foram aplicadas ao gel, alíquotas de solução do indicador negro de eriocromo T livre (branco) e soluções contendo níquel (1-5 mg L⁻¹) e cobre (12-20 mg L⁻¹) previamente complexados.

As soluções padrões para aplicação foram preparadas misturando-se volumes adequados da solução estoque de cada metal (1000 mg L⁻¹) para atingir a concentração desejada para cada padrão, com 1 mL de solução estoque de indicador (2,88 g L⁻¹), 1mL de solução glicose (20% m/v), completando o volume com solução trizma base até o volume de 5 mL. A solução do branco (solução do indicador negro de eriocromo T) foi preparada da mesma maneira, porém sem adição dos íons metálicos.

Em todas as corridas dessa seção, aplicou-se diferença de potencial 200 V durante 5 minutos, sendo trizma base 1,0X (na temperatura de 4°C) utilizada com solução de corrida com gel a 1,5%.

3.10.1 Soluções

Todas as soluções foram preparadas da mesma forma como descrita na seção 3.9.1

3.11 Otimização das condições para a realização de análises quantitativas

Procurando estabelecer as melhores condições para a determinação de níquel e cobre em eventuais amostras, foram otimizadas as condições de quantidade de indicador utilizado no preparo das soluções padrões de mistura níquel/cobre, o potencial aplicado durante as análises, a concentração do gel, e a concentração da solução de corrida (tampão), sempre na temperatura de 4° C. Para a otimização da quantidade de indicador utilizada nas análises, foi utilizada a faixa de concentração de 1-5 mg L⁻¹ para o níquel e 12-20 mg L⁻¹ para o cobre. Para as demais otimizações foram utilizados apenas as

concentrações máximas (5mg L^{-1} para níquel e 20 mg L^{-1} para o cobre) e mínimas (1mg L^{-1} para níquel e 12 mg L^{-1} para o cobre) em triplicata, pois o principal objetivo desta parte foi avaliar uma melhor separação entre os complexos metálicos e não a obtenção da curva analítica.

Para a avaliação da influência da quantidade de indicador empregada, as soluções padrões foram preparadas como descrito na seção 3.10, variando a quantidade de indicador utilizada de $0,5\text{ mL}$ a 2 mL ($2,88\text{ g L}^{-1}$). As corridas foram realizadas com potencial a 250 V , utilizando solução trizma base $1,0\text{X}$ com gel a $2,0\%$. Para as demais otimizações, a quantidade de indicador utilizada no instante do preparo das soluções padrões de mistura níquel/cobre foi de $1,0\text{ mL}$ ($2,88\text{ g L}^{-1}$).

Para a otimização do potencial, variou-se este de 50 a 300 V , utilizando solução trizma base $1,0\text{X}$, com gel a $2,0\%$. Para a otimização do gel, foi variado sua concentração de $0,5$ a $3,0\%$ m/v, mantendo-se potencial a 250 V e solução trizma base $1,0\text{X}$. Para a otimização da concentração da solução de corrida (tampão), esta foi variada em $1,0\text{X}$ a $4,0\text{X}$, fixando-se o potencial a 250 V e gel a $2,0\%$. É importante relatar que a concentração $1,0\text{X}$ de trizma é equivalente a $4,84\text{g/L}$.

Um estudo para avaliar a precisão das medidas foi realizado com nove replicas de soluções padrões com concentrações máximas, intermediárias e mínimas para cada um dos metais estudados. Para cada faixa de concentração foi obtido um valor de coeficiente de variação.

Estudos sobre a influência da resposta do níquel na presença do cobre, foi realizado fixando-se a concentração de níquel em 3 mg L^{-1} variando a concentração de cobre de 12 a 20 mg L^{-1} . Para avaliar a influência da resposta do cobre na presença do níquel, fixou-se a concentração do cobre em 16 mg L^{-1} e variou-se a concentração de níquel de 1 a 5 mg L^{-1} , com condições otimizadas.

3.11.1 Soluções

O preparo de todas as soluções utilizadas estão descritas em 3.10, apenas com o incremento de $0,5\text{ mL}$ de ácido clorídrico (12 mol L^{-1}) no preparo das soluções estoque (1000 mg L^{-1}) de níquel e cobre.

3.12 Determinação de Níquel em Arame de Alpaca, e de Níquel e Cobre em moedas

Com os principais parâmetros otimizados, foram selecionadas amostras de ligas metálicas que continham os metais níquel e cobre, mas que não apresentassem íons metálicos zinco e ferro III, já que estes poderiam interferir na resposta das medidas, pois seus complexos metálicos respondem de maneira semelhante ao complexo de cobre. Vale destacar que, embora as amostras selecionadas sejam relativamente simples, seu uso permite realizar a chamada prova de conceito do método.

Desta maneira, em triplicata, pequenas massas (aproximadamente 0,2 g) de um arame de alpaca e de moedas de cuproníquel (Figura 13) foram digeridas em 3,0 mL de ácido clorídrico e 1,0 mL de ácido nítrico concentrados em chapa de aquecimento à 50 °C durante 20 minutos. Após a digestão, a solução resultante foi transferida a um balão volumétrico de 50,00 mL, sendo o volume completado com água destilada.



Figura 13. Arame de alpaca (A), moeda de 1 cruzeiro (B), 10 centavos (C), 20 centavos (D) e 50 centavos (E) utilizadas nos estudos.

As soluções padrões para aplicação de níquel e cobre foram obtidas misturando-se volumes adequados da solução estoque (1000 mg L^{-1}) para atingir a concentração desejada para cada íon, 200 μL de amônia concentrada, 1,0 mL de solução estoque de indicador ($2,88 \text{ g L}^{-1}$), 1 mL de solução glicose (20% m/v), completando o volume com solução trizma base até o volume de 5 mL. As amostras foram diluídas da mesma forma que os padrões procurando-se manter a concentração dos íons dentro da faixa de calibração. A solução do branco (solução do indicador negro de eriocromo T livre) foi preparada da mesma maneira, porém sem adição dos íons metálicos.

Foram aplicadas, em sequência no gel, as soluções padrões, seguida da solução amostra em triplicata. Todas as corridas foram realizadas sob potencial de 250 V, com solução trizma base 1,0X, gel a 2,0%, níquel na faixa de 1 a 5 mg L^{-1} e cobre na faixa de 12 a 20 mg L^{-1} .

Para fins de comparação, realizou-se a determinação dos íons metálicos nas ligas através da espectrometria de absorção atômica em chama. Para isso, utilizou-se a faixa de concentração de 2 a 10 mg L⁻¹ para o níquel e de 1 a 5 mg L⁻¹ para o cobre. As soluções padrões das misturas de níquel e cobre foram preparadas dissolvendo-se, em água destilada, os volumes das soluções estoque (1000 mg L⁻¹) adequados para a obtenção destas concentrações.

Parte II - Estudos com corantes alimentícios

3.13 Avaliações qualitativas para alimentos contendo corantes

A princípio, foi avaliada a possibilidade de separação e detecção de diferentes corantes alimentícios em sucos em pó, refrigerantes e corantes líquidos concentrados para confeitaria. As soluções dos sucos foram preparadas dissolvendo aproximadamente 2 g de cada suco em 10 mL de água. Para os refrigerantes a solução aplicada foi a do próprio refrigerante. Para os corantes líquidos de confeitaria, a solução contida na embalagem foi aplicada diretamente sem nenhuma diluição. Os corantes alimentícios foram identificados após a separação com base nas cores das bandas e no rótulo de cada uma das embalagens.

Para todos os estudos com corantes alimentícios foram utilizadas as mesmas condições de corrida: tampão TAE 1,0X, gel a 2,0% e potencial de 250 V.

3.14 Avaliação quantitativa para corantes alimentícios

3.14.1 Separação e quantificação de Amarantho e Azul brilhante

Dentre os corantes avaliados nos alimentos previamente analisados, buscou-se realizar a separação e quantificação do corante vermelho amarantho (também conhecido como bordeaux S) e do corante azul brilhante usualmente presentes em produtos de coloração roxa, como em sucos ou refrigerantes sabor uva.

Para isso foram preparadas soluções misturas com padrões desses corantes em diferentes concentrações com o objetivo de avaliar as faixas de concentração de aplicação do método proposto. Para o preparo destas soluções foram utilizados os corantes em pó gentilmente fornecidos pela empresa Novo Aroma [45], a qual disponibilizou certificados de análise atestando os níveis de pureza dos produtos (da

ordem de 90%). Baseado nessa informação a massa adequada de cada corante foi dissolvida em água destilada para compor soluções estoques individuais dos corantes com concentração da ordem de 1,0% m/v.

A partir dos estoques foram preparadas as misturas padrões contendo amaranço de 40-120 mg L⁻¹ e azul brilhante de 4-20 mg L⁻¹. Todas as soluções dos padrões foram preparadas diluindo-se alíquotas das soluções estoque em solução de glicose (20% m/v).

Para testes de repetibilidade utilizou-se misturas binárias em triplicata com concentrações de 4, 12 e 20 mg L⁻¹ para o azul brilhante e de 40, 80 e 120 mg L⁻¹ para o amaranço, respectivamente, obedecendo os critérios precisão da ANVISA [46].

Para a avaliação da exatidão do método foram conduzidos testes de recuperação empregando-se uma formulação de refresco em pó comercial. Para isso massas adequadas e conhecidas dos padrões de amaranço e azul brilhante foram misturadas a um preparo em pó de suco limão (Qualimax Food Service), o qual não apresenta em sua formulação os corantes avaliados. Os testes de recuperação foram realizados com as concentrações de 4,349 mg/g, 2,655 mg/g e 0,833 mg/g para o amaranço e de 0,248mg/g, 0,166mg/g e 0,052mg/g para o azul brilhante. Estes valores foram estabelecidos com base em avaliações preliminares para estimativa dos teores médios destes corantes em refrescos em pó comercializados no país (Frisco, Fructus, Tang e Clight de uva), além de teores que situam-se acima e abaixo desses valores médios.

Para a análise os preparos em pó com os corantes foram apropriadamente dissolvidos em água de forma a se adequarem as concentrações das curvas analíticas.

3.14.2 Separação e quantificação de Amarelo Tartrazina e Amarelo Crepúsculo

Outros dois corantes avaliados nos alimentos previamente analisados, buscou-se realizar a separação e quantificação do corante amarelo tartrazina do corante amarelo crepúsculo usualmente presentes em produtos de coloração amarela/laranja, como em sucos ou refrigerantes sabor laranja, maracujá e abacaxi.

Para isso, também foram preparadas soluções misturas com padrões desses corantes em diferentes concentrações com o objetivo de avaliar as faixas de concentração de aplicação do método proposto. Da mesma maneira, para o preparo

destas soluções foram utilizados os corantes em pó gentilmente fornecidos pela empresa Novo Aroma [45], a qual disponibilizou certificados de análise atestando os níveis de pureza dos produtos (da ordem de 90%). Baseado nessa informação a massa adequada de cada corante foi dissolvida em água destilada para compor soluções estoques individuais dos corantes com concentração da ordem de 1,0% m/v.

A partir dos estoques foram preparadas as misturas padrões contendo amarelo tartrazina de 50-250 mg L⁻¹ e amarelo crepúsculo de 34-170 mg L⁻¹. Todas as soluções dos padrões foram preparadas diluindo-se alíquotas das soluções estoque em solução de glicose (20% m/v).

Para testes de repetibilidade utilizou-se misturas binárias em triplicata com concentrações de 50, 150 e 250 mg L⁻¹ para o amarelo tartrazina e de 34, 102 e 170 mg L⁻¹ para o amarelo crepúsculo, respectivamente, obedecendo os critérios precisão da ANVISA [46].

Para a avaliação da exatidão do método foram conduzidos testes de recuperação empregando-se uma formulação de refresco em pó comercial. Para isso massas adequadas e conhecidas dos padrões de amaranço e azul brilhante foram misturadas a um preparo em pó de suco limão (Qualimax Food Service), o qual não apresenta em sua formulação os corantes avaliados. Os testes de recuperação foram realizados com as concentrações de 1,057 mg/g, 0,676 mg/g e 0,300 mg/g para o amarelo tartrazina e de 0,352 mg/g, 0,226 mg/g e 0,100 mg/g para o amarelo crepúsculo. Estes valores foram estabelecidos com base em avaliações preliminares para estimativa dos teores médios destes corantes em refrescos em pó comercializados no país (Frisco, Fructus, Tang e Mid de laranja), além de teores que situam-se acima e abaixo desses valores médios.

Para a análise os preparos em pó com os corantes foram apropriadamente dissolvidos em água de forma a se adequarem as concentrações das curvas analíticas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO PARTE I – ESTUDO COM COMPLEXOS METÁLICOS

4.1 Testes iniciais com indicadores cromogênicos

Como mostra a Figura 14, nota-se uma nítida tendência de migração dos indicadores aos pólos existentes após o potencial aplicado (Figura 14B). Indicadores como negro de eriocromo T, azul de timol, fluoresceína e azul de bromotimol, que apresentaram carga negativa (Tabela 2) no meio de estudo (pH 8,5), migraram para o pólo positivo, enquanto o verde de metila, que apresenta carga positiva nesse pH, migrou para o pólo negativo. Também foi possível observar que o indicador rodamina B não migrou para nenhum dos pólos, o que é explicado pela neutralidade do composto no meio de estudo.

De posse das massas molares dos indicadores (Tabela 2) e observando a migração apenas dos indicadores com carga negativa (Figura 14B), nota-se que a fluoresceína(e), composto de menor massa, apresentou uma migração com deslocamento maior, como já era esperado. Porém, quando comparamos a migração do azul de timol (c) com a do azul de bromotimol (f), nota-se que o composto de maior massa obteve uma migração mais acentuada, mostrando que a massa não é o fator exclusivo que explica tal deslocamento, mas sim, existe um conjunto de fatores como massa, carga, geometria da molécula [2] que influenciam a separação das substâncias. Ao longo dos demais estudos, a separação de outros componentes será um pouco mais detalhada.

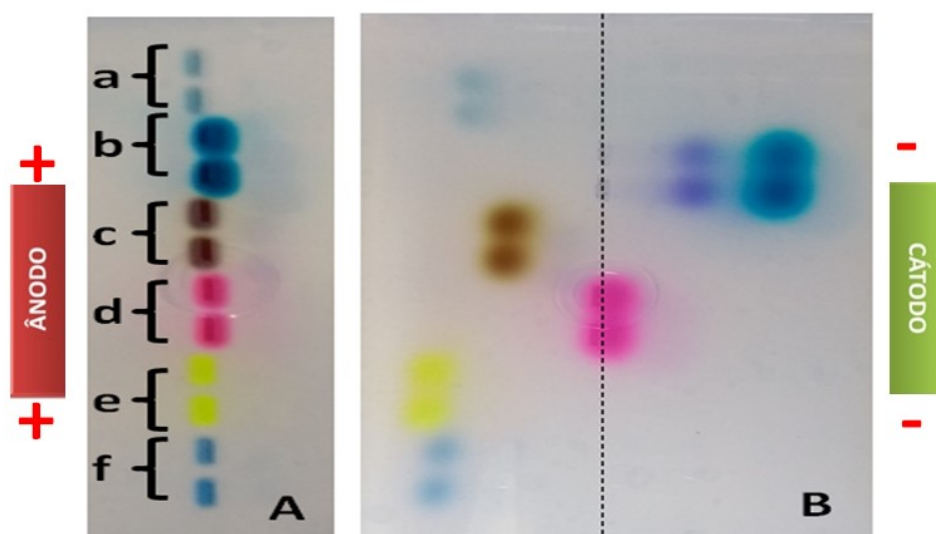


Figura 14. Imagens dos géis utilizados nos estudos. Imediatamente após a aplicação do indicador negro de eriocromo T (a), verde de metila (b), azul de timol(c), rodamina B(d), fluoresceína (e) e azul de bromotimol (f) no gel (A) e a migração dos indicadores após os 40 minutos sob potencial de 80 V (B). Utilização do “tampão TAE”, com gel a 1,0% e pH 8,5.

Tabela 2. Estrutura, massa molar e avaliação da carga dos indicadores em pH 8,5.

Indicador	Estrutura	Massa Molar (g mol^{-1})	Carga em pH 8,5
Negro de eriocromo T		461,38	-3
Verde de metila		653,24	+2
Azul de timol		466,59	-2
Rodamina B		479,02	0
Fluoresceína		332,30	-2
Azul de bromotimol		624,35	-2

A partir do conhecimento de como tais indicadores migram em presença de um campo elétrico, foi simulada uma “solução mistura” que continha 4 dos 6 indicadores estudados (Figura 15). Os indicadores negro de eriocromo T e azul de bromotimol foram excluídos desta análise, pois migram para o ânodo (+), já possuindo uma quantidade grande de indicadores que migram a este eletrodo. Verificou-se que após a aplicação do potencial elétrico e corrida houve uma separação eficiente dos indicadores da “solução mistura” (representado em “c” na Figura 15A), comprovado pela identificação das colorações e deslocamentos dos 4 indicadores após o tempo transcorrido, como ilustra a Figura 15C.

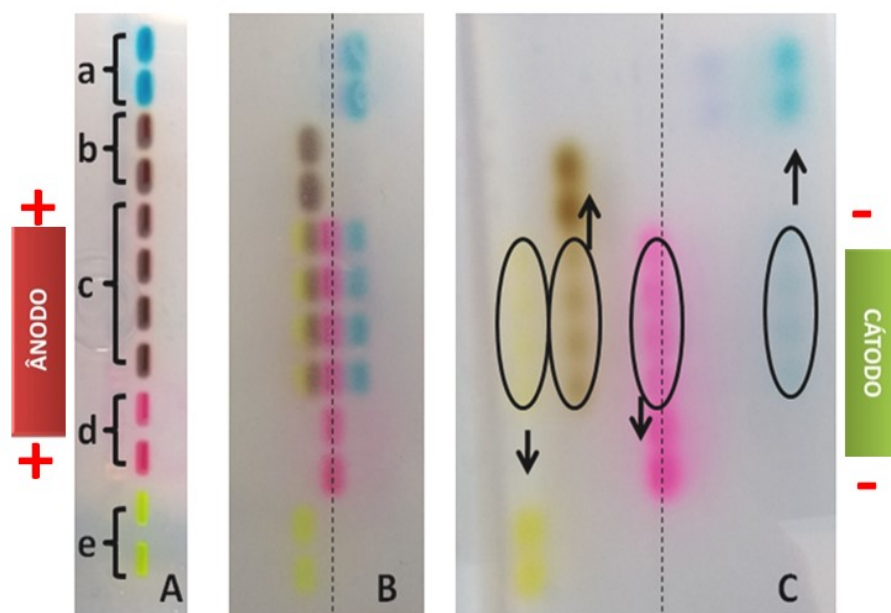


Figura 15. Imagens dos géis utilizados nos estudos. Imediatamente após a aplicação dos indicadores verde de metila (a), azul de timol(b), “solução mistura”(c), rodamina B(d), fluoresceína(e) em (A), o início da separação da “solução mistura” (B) e a separação completa após 40 minutos sob potencial de 100 V (C). Utilização do “tampão TAE”, com gel a 1,0% e pH 8,5.

Esses resultados indicam que moléculas relativamente pequenas, que não são consideradas macromoléculas, podem ser separadas a partir da eletroforese em gel com resolução satisfatória. Assim, mesmo sem demonstrar alguma importância ou possível aplicação, o estudo foi de suma importância para o aprimoramento da preparação do gel e aplicação de amostras nos poços.

4.2 Avaliação de migração de metais com os indicadores Murexida, Alaranjado de Xilenol e Negro de eriocromo T

Diversos estudos foram realizados com os indicadores murexida, alaranjado de xilenol e negro de ericoromo T previamente complexado aos metais cobre, níquel, alumínio, cálcio, zinco e ferro, variando-se de maneira univariada: o potencial aplicado durante as corridas, a concentração dos metais, a concentração dos tampões, o pH dos tampões, a composição dos tampões, a quantidade de indicador utilizada no preparado das soluções dos metais e até mesmo a concentração do gel, onde ocorre a separação.

Como ilustrado na Figura 16, após a corrida eletroforética utilizando o indicador Murexida, foram observados que as migrações dos complexos formados (Figura 16B) pelos diferentes íons apresentaram coloração e deslocamento similares, não sendo observadas diferenças significativas que indicassem a separação eficiente dos analitos, o que inviabiliza a sua aplicação nas condições propostas. Vale destacar que foram realizados estudos em outras condições experimentais, porém sem algum ganho no quesito separação.

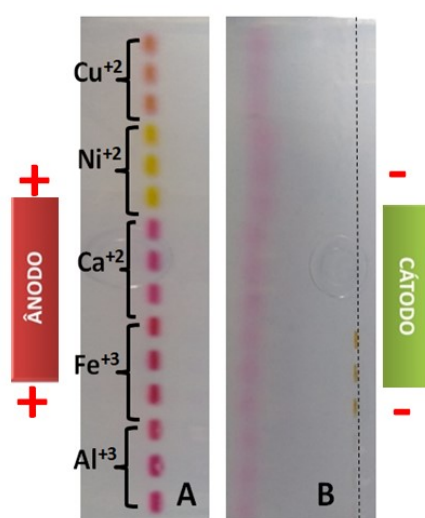


Figura 16. *Imagens dos géis utilizados no estudo imediatamente após a aplicação dos metais complexados com Murexida (A), após a corrida eletroforética (B), com duração de 40 minutos, sob potencial de 90 V, solução acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 4,8 e gel a 1,0%.*

A Figura 17 demonstra que tanto a migração quanto a coloração para soluções do branco (indicador) e para soluções dos complexos de alaranjado de xilenol com íons Ca^{+2} foram idênticas, indicando que possivelmente não houve a complexação dos íons cálcio nas condições utilizadas, o que impossibilita a visualização da separação deste

íon. Dos demais íons, os complexos de Cu^{+2} e Ni^{+2} migraram para a esquerda (pólo positivo), com pequena diferenciação na coloração, para o cobre (marrom claro) e para o níquel (cor roxa), e deslocamento com íons de níquel complexados um pouco mais a frente dos de cobre, porém com diferenças no deslocamento muito sutis. Os complexos de Fe^{+3} e Al^{+3} não migraram para nenhum dos pólos, porém apresentaram coloração diferenciada (preto para íons de ferro e rosa para íons de alumínio) – Figura 17C. Com a migração de cada íon com o indicador alaranjado de xilenol, ficou evidenciada uma grande dificuldade de separação destes metais com tal indicador.

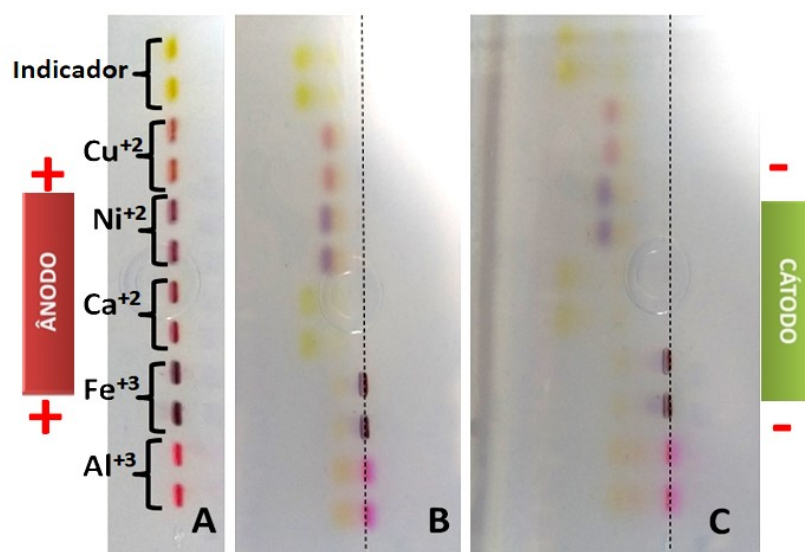


Figura 17. *Imagens dos géis utilizados nos estudos imediatamente após a aplicação do indicador e dos metais complexados com Alaranjado de Xilenol (A), migração completa após o início da corrida eletroforética (B) e migração completa ao final da corrida eletroforética (C), com duração de 40 minutos, sob potencial de 90 V, solução acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e com gel a 1,0%.*

Dentre os indicadores estudados, o que demonstrou melhor eficiência de separação em termos de coloração e migração foi o indicador negro de eriocromo T. Desta maneira, na próxima seção será abordado com mais detalhes suas separações com diferentes íons metálicos.

4.3 Estudos mais aprofundados com o Negro de Eriocromo T

Observando-se a corrida com os metais complexados ao negro de eriocromo T (Figura 18) é possível inferir que os íons de cobre e níquel apresentaram notória diferença de deslocamento entre si, com colorações semelhantes (violeta claro). Vale destacar, que foram observadas duas bandas após a separação dos complexos: uma azul,

referente ao indicador livre, e outra violeta, referente aos complexos dos metais zinco ferro, alumínio, cobre e zinco. De fato, a coloração violeta não era esperada para os complexos, mas sim uma coloração vermelha, característica dos complexos com negro de eriocromo T [44]. Entretanto, as configurações de imagem utilizadas durante a captação com a webcam não favoreceram a visualização da cor vermelha dos complexos que foram registrados por bandas de cor violeta.

Nota-se também que as bandas referentes ao indicador livre ficam posicionadas de maneira similar àquelas referentes aos complexos de níquel II e zinco II, o que pode dificultar a obtenção de um sinal analítico baseado em imagens digitais para os analitos. Já para os íons de ferro III e alumínio III o deslocamento foi bastante similar àquele apresentado pelos íons de cobre II.

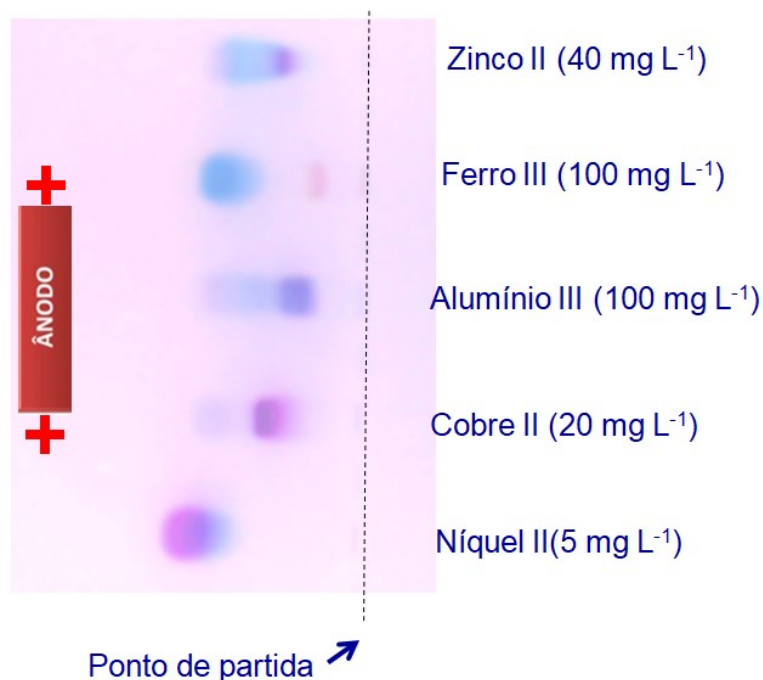


Figura 18. Imagem do gel utilizado no estudo imediatamente após a corrida eletroforética com duração de 10 minutos, sob potencial de 250 V, solução trizma 1,0X com gel a 2,0%. O sentido de migração é da direita para a esquerda.

Considerando esses resultados, buscou-se realizar estudos para a separação dos íons cobre e níquel em misturas com o intuito de verificar a possibilidade de quantificação desses elementos em amostras, estabelecendo a prova do conceito proposta. É importante relatar que todos os cinco metais submetidos ao estudo tem potencial de separação, porém alguns parâmetros, como o próprio pH do meio, ainda devem ser modificados para propiciar uma separação de melhor qualidade. Como não

era o objetivo do trabalho realizar a separação de inúmeros metais, optou-se por utilizar apenas os metais cobre e níquel, pois estes já apresentavam boas separações nas condições já estabelecidas, proporcionando possivelmente uma aplicação da técnica proposta.

Realizando um novo teste com os íons metálicos de cobre, níquel e com uma solução mistura dos dois metais (Figura 19A), nota-se que, após a corrida, ocorreu uma satisfatória separação dos componentes da mistura (Figura 19B), comprovado pelos deslocamentos das bandas e pelas colorações apresentadas para os complexos metálicos isolados.

Como pode ser visto na Figura 19B, entre as bandas dos complexos metálicos separados há a presença da banda do ligante livre (cor azul) que pode, eventualmente, dificultar a aquisição do sinal RGB dos analitos (complexos metálicos). Considerando esse aspecto, foi realizado um estudo complementar com uma menor quantidade de ligante a fim de verificar o efeito no gel de corrida. De fato, foi necessário considerar que a quantidade de indicador a ser utilizada deveria ser suficiente para complexar todos os íons metálicos da mistura, evitando-se excessos que poderiam dificultar a visualização das bandas dos complexos.

Comparando-se a corrida da Figura 19B, em que a solução aplicada apresenta uma maior quantidade de indicador, com a corrida da Figura 19D, em que a quantidade de indicador foi menor, nota-se que para o primeiro caso as bandas dos complexos de níquel e cobre são bem nítidas, permitindo distinção entre elas, enquanto utilizando uma quantidade menor de indicador, observou-se certo clareamento da coloração dos complexos metálicos tanto independentes quanto na mistura, pois a quantidade de indicador inserida no preparo dessas soluções não foi suficiente para que todos os íons metálicos fossem totalmente complexados. Assim, observa-se que a banda referente ao níquel para a separação da mistura (Figura 19D) é significativamente menos intensa do que aquela apresentada para a solução de níquel na ausência de cobre. Dessa forma, para estudos posteriores, a quantidade de indicador utilizada foi definida empiricamente de forma a garantir que todos os íons metálicos estejam complexados, além de minimizar a intensidade da banda referente ao indicador livre. Além disso, o restante da coloração azulada do indicador livre foi eliminado posteriormente através ajustes na câmera.

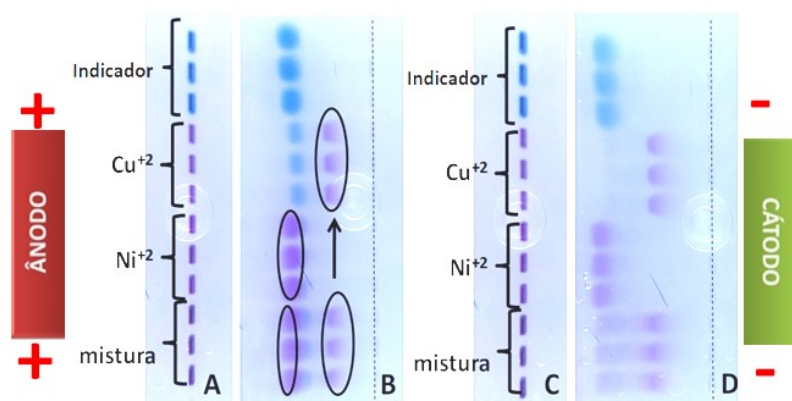
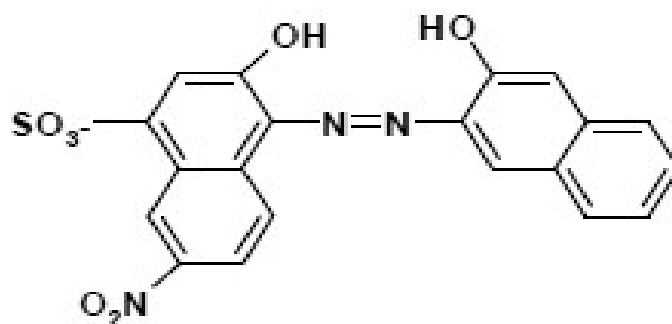


Figura 19. *Imagens dos géis utilizados nos estudos. Imediatamente após a aplicação do indicador, metais complexados ao negro de eriocromo T e mistura com mais indicador (A), separação completa dos componentes após corrida eletroforética (B). Imediatamente após a aplicação do indicador, metais complexados com negro de eriocromo T e mistura com metade de indicador utilizado em A e B (C), separação completa dos componentes após corrida eletroforética (D), com duração de 10 minutos, sob potencial de 250 V, solução trizma 1,0X com gel a 2,0%. O sentido de migração é da direita para a esquerda.*

Através destes estudos, nota-se uma possibilidade de separação dos metais níquel e cobre em possíveis amostras que contenham estes metais. É importante destacar que, em todos os estudos, os complexos metálicos do indicador complexado ao níquel apresentaram uma migração maior no mesmo intervalo de tempo do que o complexo do indicador com cobre e do próprio indicador livre. Este fato pode ser explicado em relação ao número de coordenação de cada um destes metais, sendo o do níquel 6 e do cobre de 4 [47]. Como o ligante negro de eriocromo T (Figura 20) é bidentado (L^{-2}) e os metais se complexam pelos oxigênios das hidroxilas, a estequiometria de complexação com o níquel é de 1:3 (Equação 7) enquanto para o cobre a estequiometria é de 1:2 (Equação 8), o que acarreta em diferenças de massas e cargas dos complexos.



Negro de Eriocromo T

Figura 20. Estrutura do negro de eriocromo T, representado a seguir na forma desprotonada (L^{-2})



Se fosse levado em consideração apenas o fator massa, era de se esperar que o complexo de cobre II apresentasse uma velocidade de migração maior que a do complexo de níquel II, já que o complexo de cobre apresenta uma massa menor devido ao fato de ter um ligante a menos, porém isso não é observado na prática. O que é observado é que o complexo de níquel, mesmo com maior massa, é mais atraído ao ânodo (+) pelo simples fato de apresentar uma carga líquida em maior (-4) que aquela apresentada pelo complexo de cobre (-2) no meio de estudo.

A explicação para que o indicador sempre ficasse entre os dois metais é que este apresenta uma carga líquida de -2, assim como o complexo de cobre, então ambos são atraídos da mesma forma. No entanto, o indicador livre apresenta massa menor, por isso sua velocidade de migração é ligeiramente maior. Ao se comparar a migração do indicador livre com aquela do indicador complexado ao níquel, é possível afirmar que o complexo de níquel apresenta maior velocidade migração por ser mais fortemente atraído ao ânodo (+) pelo valor de carga líquida maior.

4.4 Estudos quantitativos para a determinação de níquel e cobre

Finalizados os estudos iniciais para a separação e identificação das bandas eletroforéticas para os complexos de níquel e cobre com negro de eriocromo T, realizaram-se estudos com o objetivo de possibilitar a quantificação dos íons metálicos através do processo proposto.

4.4.1 Avaliação da configuração da imagem

Conforme mencionado na seção anterior, na separação das bandas dos complexos metálicos de níquel e cobre (coloração violeta), visualiza-se também a presença do indicador livre (coloração azulada) no gel, que é fundamental para garantir que todos os íons metálicos estejam complexados, porém esta banda azul pode limitar a detecção por imagens dos complexos, fazendo com que seja preferível a eliminação desta banda indesejável no instante de aquisição dos sinais RGB sem mudar a composição das soluções a serem separadas. Desta maneira, para todos os sinais obtidos a partir desta seção em diante foi realizado um ajuste prévio das configurações da webcam, conforme ilustrado na Figura 21. A Figura 22A mostra que, empregando-se a configuração default da câmera, não é possível visualizar com nitidez as bandas referentes aos complexos de níquel devido à grande sobreposição com as bandas do ligante livre. Já utilizando a imagem com ajustes prévios na configuração da webcam, Figura 22B, foi possível observar bandas mais nítidas tanto para o níquel quanto para o cobre. Vale destacar, que para concentrações menores de íons metálicos não foi possível a eliminação total da cor do indicador livre por ajuste da câmera, porém, nessas concentrações as bandas dos complexos metálicos de níquel são menores e se separam mais eficientemente da banda do indicador livre que bandas maiores, não causando sobreposição de bandas, não sendo assim um eventual problema para aquisições dos sinais RGB. Estes estudos utilizaram separação dos complexos metálicos na faixa de 1-7 mg L⁻¹ para o níquel e 10-22 mg L⁻¹ para o cobre.



Figura 21. Configurações da webcam com ajustes prévios.

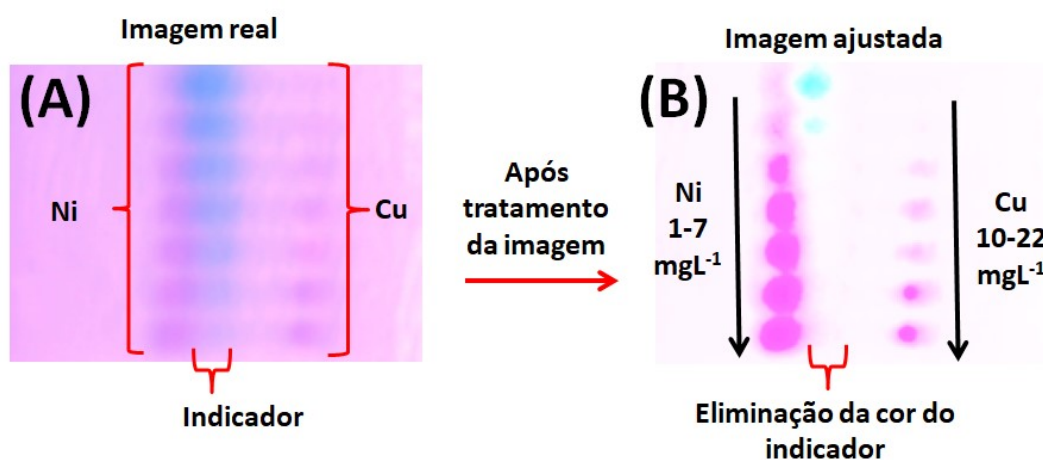


Figura 22. Imagem do gel obtida com configuração default da webcam (A) e imagem do mesmo gel após configuração ilustrada na Figura 19 (B). Utilizando 7 padrões para níquel ($1-7 \text{ mg L}^{-1}$) e 7 padrões para cobre ($10-22 \text{ mg L}^{-1}$). Corrida sob potencial de 250 V , gel a $1,0\% \text{ m/v}$ com solução trizma $1,0 \times$.

4.4.2 Faixa linear para calibração

Como podem ser observadas na Figura 22B, as bandas de níquel e cobre ficam maiores à medida que a concentração destes metais aumentam. Para o níquel em concentrações menores (1 e 2 mg L^{-1}) observa-se ainda certo aparecimento da cor azul, referente ao indicador livre, porém a distância entre a banda do níquel com a banda do indicador são significativamente elevadas para a aquisição dos sinais RGB sem uma banda interferir no sinal da outra. Já em concentrações maiores de níquel (6 e 7 mg L^{-1}) é observado que o tamanho e intensidade de coloração das bandas são muito semelhantes, sendo uma dificuldade de diferenciá-las até mesmo pela webcam. Por esses motivos a faixa de concentração escolhida para o níquel ficou entre 1 e 5 mg L^{-1} .

Para o cobre, foi possível identificar uma banda apenas a partir do segundo padrão (12 mg L^{-1}), não sendo observado nada para o primeiro de concentração 10 mg L^{-1} . Em concentrações maiores (20 - 22 mg L^{-1}) observa-se que os padrões apresentam bandas de tamanho e coloração muito similares, sendo difícil diferenciá-las. Deste modo, a faixa de concentração escolhida para o metal cobre foi de 10 a 20 mg L^{-1} .

A Figura 23A mostra o eletroferograma obtido a partir da corrida eletroforética mostrada na Figura 23B para soluções padrões de uma mistura binária contendo níquel (1 - 5 mg L^{-1}) e cobre (12 - 20 mg L^{-1}) complexados ao indicador negro de eriocromo T. Como pode ser visto, há um aumento linear da componente G do sistema RGB com o aumento da concentração dos metais, que possibilita estabelecer uma relação linear entre o sinal e a concentração. Utilizando a altura dos sinais corrigidos com o valor do branco como, por exemplo, o da Figura 24, foi possível adquirir curvas analíticas (Figura 25) com adequada linearidade para ambos os metais ($R > 0,99$), o que comprova ser possível a quantificação destes em amostras, realizando o que chamamos de prova de conceito. Os sinais corrigidos foram obtidos subtraindo o valor de cada padrão pelo valor do sinal do branco.

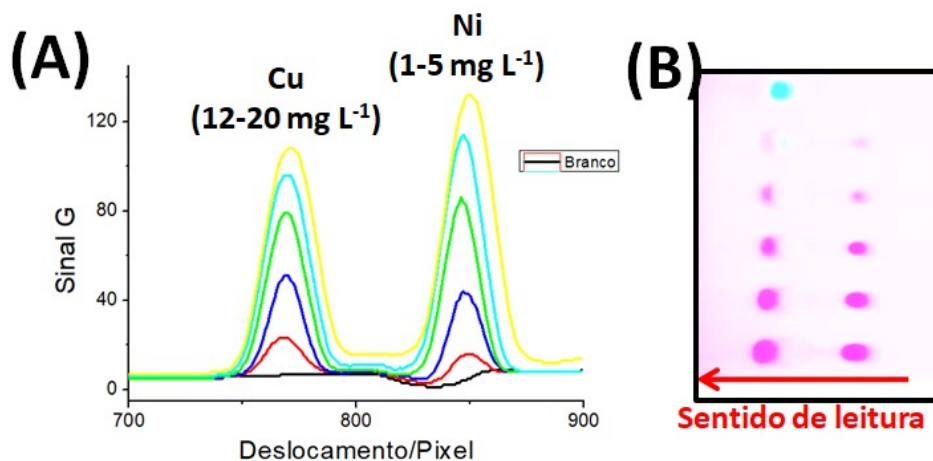


Figura 23. Eletroferograma obtido após a migração dos padrões de níquel e cobre complexados ao negro de eriocromo T(A) e imagem obtida pela Webcam após término da corrida (B). Com gel a 1,5% e potencial de 200V.

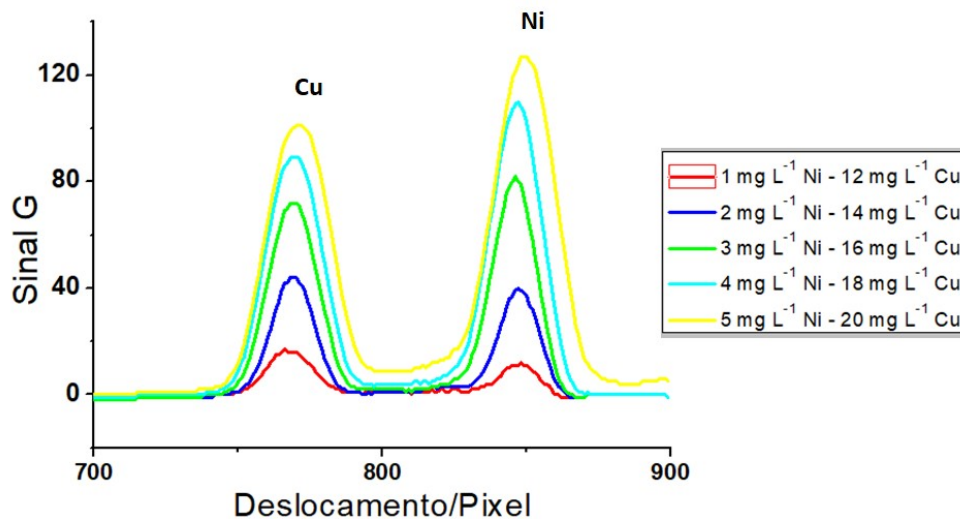


Figura 24. Eletroferograma com sinal corrigido do branco.

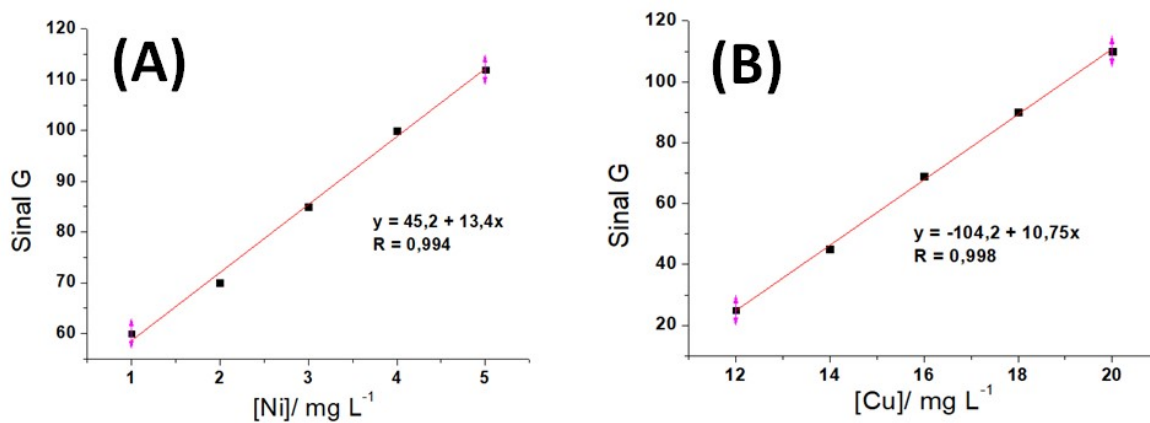


Figura 25. Curva analítica para a determinação de níquel (A) e de cobre (B).

Esses estudos iniciais foram essenciais para demonstrar que é possível determinar níquel e cobre em amostras que contenham esses metais utilizando a estratégia proposta de forma simples, rápida e eficiente. Vale destacar que os eletroferogramas foram satisfatórios já que apresentam elevadas razões sinal/ruído, como exposto na Figura 24. Nas próximas seções são relatados estudos mais aprofundados de alguns aspectos do método que proporcionem um bom desempenho do método para aplicações em amostras de ligas metálicas.

4.5 Otimização das condições para a realização de análises quantitativas

Considerando a possibilidade de quantificação de níquel e cobre pelo método proposto, foram realizados alguns estudos em relação à otimização da separação destes complexos metálicos enfatizando alguns parâmetros que até o momento foram escolhidos empiricamente. Destes parâmetros escolhidos para estudo estão: a quantidade de indicador negro de eriocromo T presente na solução dos metais antes de se iniciar a separação, a voltagem aplicada durante as corridas, a concentração do gel de agarose e a concentração da solução de trizma base. Vale destacar, que estes parâmetros foram escolhidos, pois foram observados, na prática, com a maior possibilidade de modificar a separação dos complexos metálicos.

O primeiro teste realizado para a otimização da resposta analítica no método proposto, foi a de quantidade de indicador utilizado na preparação das soluções dos padrões. Para a efetiva quantificação dos complexos de cobre e níquel é necessário um pequeno excesso de indicador, que garanta que todos os íons metálicos estejam complexados, já que apenas os íons complexados exibem uma determinada coloração. Como já relatado na seção (4.4.1), é possível a eliminação parcial da coloração azulada do indicador livre por ajustes de configuração da webcam, mas é claro que quanto menor for a quantidade de “azul” (indicador livre), mais fácil será a eliminação da coloração indesejada. Nesse sentido, a mesma quantidade de indicador foi utilizada para todos os padrões de uma mesma corrida fixando a concentração de níquel em $1-5 \text{ mg L}^{-1}$ e de cobre em $12-20 \text{ mg L}^{-1}$, alterando-se apenas a quantidade de indicador para corridas diferentes.

A Figura 26 contém as imagens obtidas pela webcam ao final das corridas com diferentes concentrações de indicador nos padrões. As Figura 26A e 26B mostram que a utilização de pouco indicador no preparo das soluções padrões não permite a

identificação dos dois complexos metálicos. Na Figura 26A não é observada coloração dos complexos de níquel e cobre para todos os padrões, apenas para o padrão de maior concentração de cobre (20 mg L^{-1}), onde foi observado uma pequena mancha vermelha, característica do complexo. Na Figura 26B, não é possível identificar a coloração dos padrões de níquel em qualquer concentração, apenas para os de cobre, sugerindo falta de indicador no preparo das soluções binárias dos padrões.

Na Figura 26D, para a qual foi utilizada a maior quantidade de indicador, mesmo com o tratamento da imagem, não foi possível eliminar as bandas referentes ao indicador livre, o que dificulta a detecção eficiente dos complexos metálicos. Entretanto, ao se utilizar uma concentração intermediária (aproximadamente 576 mg L^{-1}) de indicador negro de eriocromo T é possível identificar com clareza todas as bandas dos complexos, com mínima presença das bandas do indicador livre após o ajuste das imagens (Figura 26C). Com base nesse resultado, optou-se por utilizar a concentração de 576 mg L^{-1} no preparo das soluções padrões.

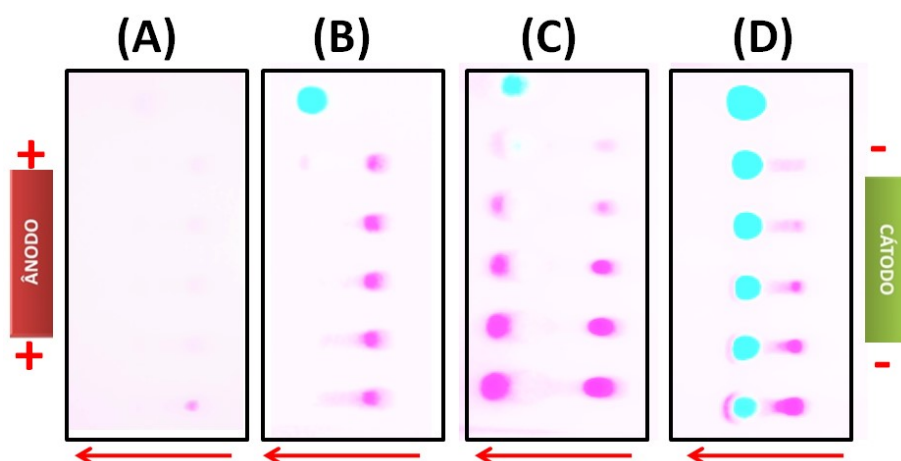


Figura 26. *Imagens final das corridas com Webcam com concentração do indicador em 72 mg L^{-1} (A), 288 mg L^{-1} (B), 576 mg L^{-1} (C) e 864 mg L^{-1} (D). Com branco e padrões em sequência de cima para baixo. Corridas sob potencial de $250V$, gel a $1,0\% \text{ m/v}$ com solução trizma $1,0X$.*

Em relação à otimização da voltagem aplicada, de acordo com a teoria era de se esperar que uma voltagem maior proporcionasse uma separação mais rápida e mais nítida. Com os estudos, variando a voltagem de 50 a 300 Volts, observou-se que em voltagens baixas, como de 50 a 100 volts, a separação é extremamente lenta (30-40 minutos), além de fazer com que os padrões sofressem muita dispersão no gel durante a

corrida. Verificou-se em alguns momentos que a dispersão dos padrões no gel era mais evidente que a própria migração dos complexos metálicos em direção ao ânodo.

Já em voltagens maiores, como de 300 volts, a separação é extremamente rápida (4 minutos) e fornece bandas bem nítidas, porém nesta voltagem existiu a geração excessiva de calor, fazendo que fossem liberado da solução de corrida vapores que deixavam a lente da webcam embaçada, não deixando com que ela registrasse a imagem adequada, além de que o excesso de calor na solução de corrida pode danificar o gel de agarose, fazendo assim com que a separação não acontecesse nas mesmas condições em diferentes padrões, devido a uma parte do gel poder estar danificada. Desta maneira, optou-se por utilizar a voltagem de 250 volts para os demais estudos, pois nesta voltagem a separação é rápida, e não gera tanto calor que poderia atrapalhar na aquisição das medidas e na danificação do gel.

Nestes estudos, não foram coletadas imagens pela webcam da separação final nas voltagens estudadas, pois a escolha da voltagem foi baseada na facilidade de trabalho (menor tempo) e na não interferência desta no resultado final da separação (geração de vapores ou danificação no gel).

Da literatura [6], é possível verificar que a relação da concentração do gel de agarose com o tamanho dos seus poros é inversamente proporcional, devido ao fato de que quanto mais concentrado o gel, mais denso, e com menor quantidade de espaços vazios ele será. Desta maneira, foi realizado um estudo onde se variou a concentração do gel de 0,5% a 3,0% m/v, com o intuito de verificar se existe algum ganho em termos de separação com o aumento ou diminuição da concentração.

As imagens obtidas pela webcam para a otimização da concentração do gel são apresentadas na Figura 27. Vale destacar, que todas as corridas foram realizadas no mesmo tempo de 5 minutos. Observou-se que à medida que a concentração do gel aumenta, da Figura 27A a 27D, a velocidade de migração diminui gradativamente, o que é claramente visto pela menor distância entre as bandas vermelhas dos complexos metálicos submetidos a separação no mesmo intervalo de tempo. Além disso, observou-se que quanto maior a concentração, Figura 27D, mais turvo o gel fica, sendo assim mais difícil adquirir os sinais RGB, pois com o uso deste gel são necessárias alterações mais bruscas na configuração da webcam para se obter os sinais.

Sendo assim, o gel que apresentou melhor desempenho em termos de separação foi o de 0,5% m/v (Figura 27A), porém o escolhido para a realização de estudos futuros foi o de concentração 2,0% m/v (Figura 27C), já que quanto menor a concentração do gel, mais lento é o seu preparo, levando cerca de 30 minutos para se obter o gel polimerizado, e além disso, essa concentração baixa de agarose faz com que ele seja extremamente frágil, sendo facilmente danificado pela simples aplicação de amostras com a pipeta nos poços ou pelo simples aquecimento durante as corridas. Acredita-se que nesta concentração escolhida (2,0% m/v) foi possível aliar velocidade de migração razoável com nitidez de separação e certa robustez do gel.

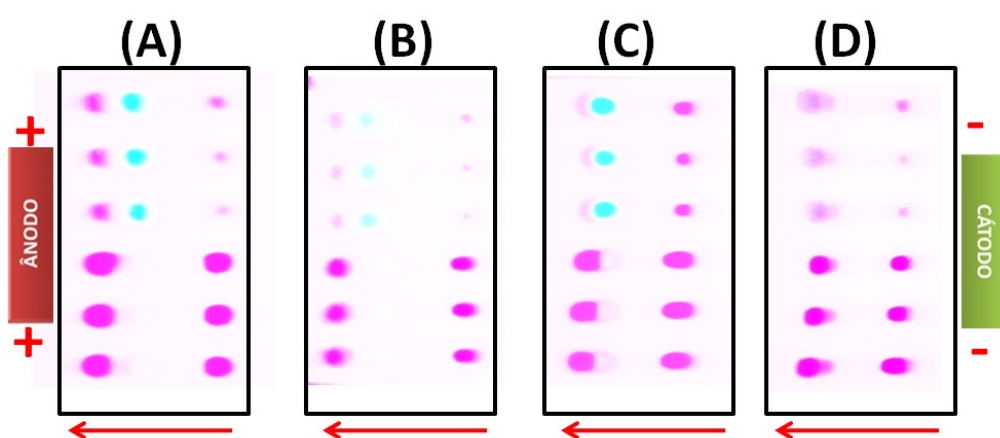


Figura 27. *Imagens finais das corridas com Webcam utilizando gel a 0,5% (A), 1,0% (B), 2,0% (C) e 3,0% (D). Com triplicata em menor e maior concentração para níquel (1 e 5 mg L⁻¹) e cobre (12 e 20 mg L⁻¹). Corrida sob potencial de 250V com solução trizma 1,0X.*

Por fim, foi realizado um estudo de otimização da concentração da solução trizma base, que é a solução tampão do método encarregada de auxiliar na separação dos íons no gel e garantir o pH do meio constante durante todo o processo de migração, sendo assim, muito importante na técnica de eletroforese. Vale destacar, que foram realizados estudos complementares que mostraram que em pH diferentes de 10,5, que foi utilizado ao longo dos estudos, a coloração apresentada pelos complexos é diferente da vermelha. Antes de começar os estudos, era esperado que uma quantidade maior de íons na solução tampão proporcionasse uma separação mais rápida, já que existem mais íons que auxiliem no processo de migração das moléculas que estão contidas no gel [6].

Os resultados para a otimização da concentração de trizma base estão expostos na Figura 28. Nota-se que à medida que a concentração da solução de corrida aumenta,

Figura 28A a 28D, a velocidade de separação diminui drasticamente apenas observando a menor distância entre as bandas referentes aos complexos metálicos, lembrando que todas as corridas desse estudo foram realizados no intervalo de tempo de 5 minutos. Vale destacar que um motivo que explica tal fato se deve a maior concentração da solução tampão no preparado de gel, já que o gel é preparado dissolvendo-se agarose no tampão de corrida. Assim, o espaço entre os poros do gel acabam sendo ocupados pela presença de moléculas de trizma entre o polímero agarose, dificultando a migração do analito a ser separado, e conseqüentemente sua velocidade. Outro fator importante de se comentar foi que à medida que a concentração aumentou, existiu um aumento considerável da temperatura do gel durante as corridas. Deste modo, optou-se pela utilização da concentração de trizma base em 1,0X (Figura 28A), devido à boa e rápida separação observada nesta condição.

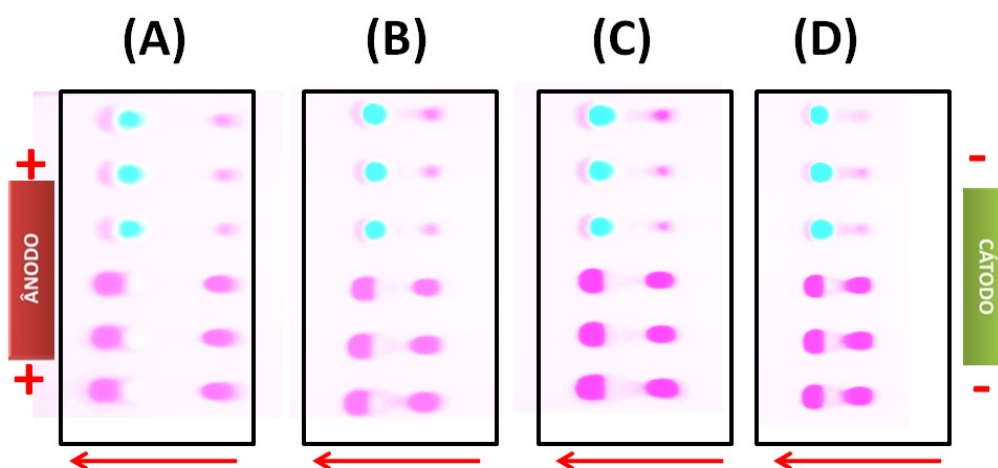


Figura 28. *Imagens final das corridas com Webcam utilizando trizma base a 1,0X (A), 2,0X (B), 3,0X (C) e 4,0X (D). Com triplicata em menor e maior concentração para níquel (1 e 5 mg L⁻¹) e cobre (12 e 20 mg L⁻¹). Corrida sob potencial de 250V e gel a 1,0% m/v.*

Com as principais condições otimizadas, em 576 mg L⁻¹ de indicador nas soluções dos padrões, utilizando voltagem de 250 V, gel a 2,0% m/v e solução trizma base a 1,0X, foram realizados estudos de precisão das medidas antes de se realizar a prova de conceito do método. Foram estudados a precisão das medidas em 3 faixas de concentração, sempre utilizando o valor de concentração máximo, intermediário e mínimo para cada um dos metais. Assim para o níquel foram realizados estudos em 1, 3 e 5 mg L⁻¹ enquanto para o cobre em 12, 16 e 20 mg L⁻¹.

Na Figura 29 é mostrado um exemplo do que foi realizado nas três faixas de concentrações, sendo apresentada a imagem do gel para a separação dos complexos na concentração intermediária, assim como o respectivo eletroferograma obtido. Foi calculado o coeficiente de variação para as medidas em nove replicas para cada faixa de concentração (Tabela 3), sendo descartado qualquer valor de sinal submetido ao teste Q. Assim, verificou-se que em concentrações máximas e intermediárias de cada um dos metais (Tabela 3) se obteve coeficientes de variação das medidas inferiores a 5,0%, mostrando boa precisão nas medidas nessas faixas de concentração.

O valor de coeficiente variação para medidas na faixa de concentração mínima do níquel se mostrou elevada (13,33%), porém isso é explicado pelos baixos sinais registrados em concentrações muito baixas (normalmente nunca passam do valor de 40 no sistema RGB). Um exemplo para explicar tal resultado é: um sinal de 20 com outro de 25 apresentam coeficiente de variação de 15,68% para uma concentração baixa, enquanto um de 120 com outro de 125 apresentam coeficiente de variação de 2,88% para uma concentração intermediária com mesma variação de sinal absoluta. Claramente, em determinações futuras não foram realizadas nenhuma medida quantitativa nas zonas de mínima ou máxima concentração de cada metal.

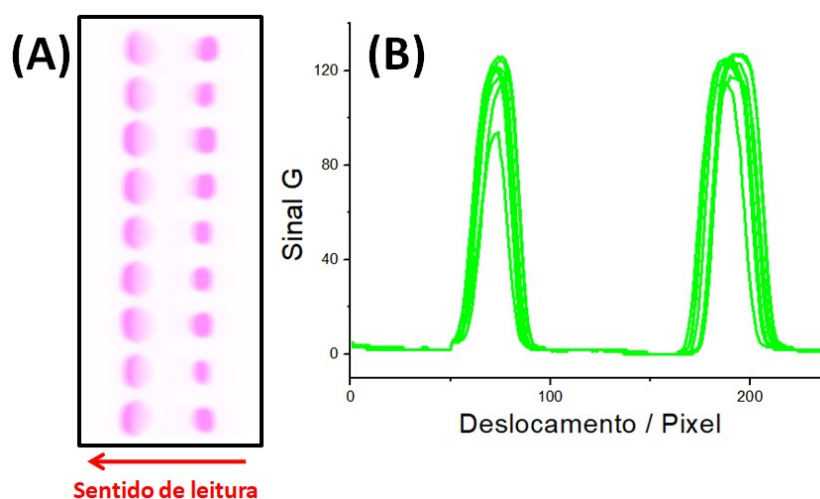


Figura 29. Imagem da webcam após a separação (A) e eletroferograma da separação dos padrões na faixa intermediária para cada metal (B).

Tabela 3. Coeficiente de variação (CV) das medidas nas três faixas de concentração estudadas.

Faixa de concentração	[Níquel] – CV	[Cobre] – CV
Máxima	4,80%	0,61%
Intermediária	3,13%	2,32%
Mínima	13,33%	3,76%

A partir dos baixos valores de coeficiente de variação obtidos, comprova-se que durante a realização das medidas, o ambiente utilizado apresentou adequada homogeneidade de iluminação uma vez que os padrões que estavam posicionados nas partes mais laterais e nas zonas centrais apresentaram valores bastante similares, sendo tal fator muito importante para a aplicação do método proposto.

Antes de aplicar o método proposto para a determinação de cobre e níquel em amostras, foi realizado um estudo para observar se existe algum tipo de incremento ou redução do sinal de um metal na presença do outro durante sua determinação. A Figura 30 mostra as imagens do gel após as corridas em que as concentrações de níquel ou cobre eram mantidas constantes enquanto a concentração do outro íon era variada.

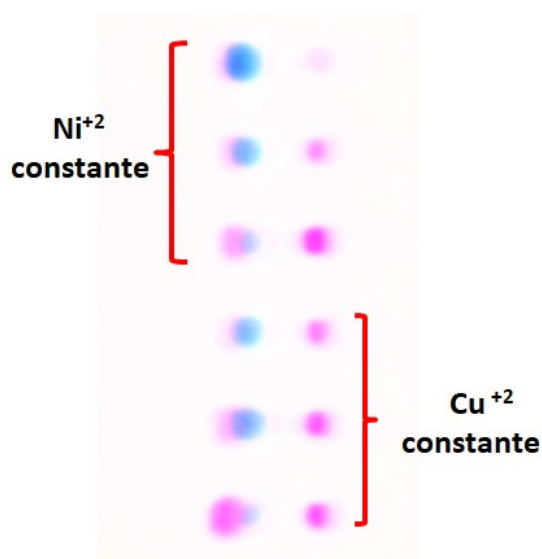


Figura 30. Imagem final da corrida com primeira níquel fixo em 3 mg L^{-1} e cobre fixo em 16 mg L^{-1} .

A primeira triplicata de cima para baixo na Figura 30, foi fixada a concentração de níquel em 3 mg L^{-1} e variou-se a de cobre em 12, 16 e 20 mg L^{-1} , sendo monitorado o sinal de ambos os metais (Figura 31A). Os sinais adquiridos para o níquel

apresentaram coeficiente de variação (4,16%) e estão representados no gráfico de resposta (Figura 31B).

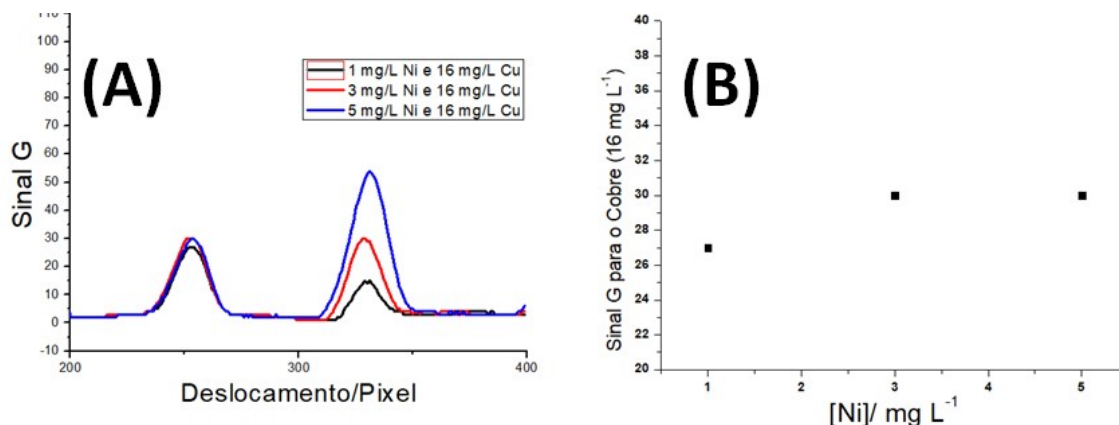


Figura 31. Eletroferograma do padrão de cobre (16 mg L^{-1}), sendo variada a concentração de níquel ($1\text{-}5 \text{ mg L}^{-1}$) em (A) e gráfico da resposta em (B).

Na segunda triplicata de cima para baixo na Figura 30 a concentração de cobre foi fixada em 16 mg L^{-1} e variou-se a de níquel em $1, 3$ e 5 mg L^{-1} , sendo monitorado o sinal de ambos os metais (Figura 32A). Os sinais adquiridos para o cobre apresentaram coeficientes de variação (5,97%) e estão representados no gráfico de resposta (Figura 32B).

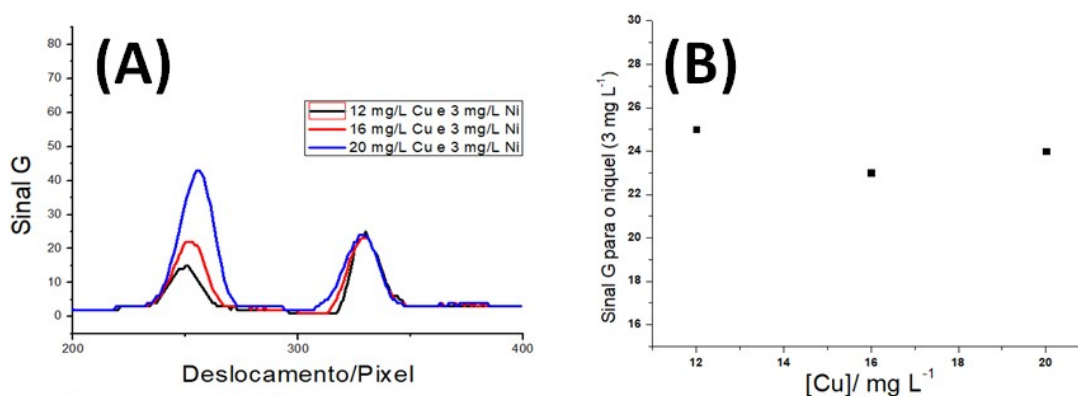


Figura 32. Eletroferograma do padrão de níquel (3 mg L^{-1}), sendo variada a concentração de cobre ($12\text{-}20 \text{ mg L}^{-1}$) em (A) e gráfico da resposta em (B).

Como ambos os coeficientes de variação apresentaram valores similares aqueles obtidos na avaliação da precisão, mostra-se assim que não existe influência de resposta de um metal e presença do outro. Não sendo observado também, um incremento ou atenuação de resposta de um metal em diferentes concentrações do outro. Assim, prova-se que caso exista algum analito em que sua solução quando dissolvido e realizado os

cálculos para que seja utilizada a faixa de calibração, que é possível separá-los e quantificá-los independente da concentração de um metal em referência de outro.

4.6 Determinação de Níquel e Cobre em Ligas metálicas

Para a prova de conceito, foram utilizados 2 tipos de amostra: arame de alpaca e moedas antigas.

Como a liga de alpaca possui um teor médio de 65%(m/m) cobre e 18%(m/m) em níquel, seria uma amostra adequada para demonstrar a prova de conceito proposta. No entanto, esta liga também apresenta um teor médio de 17% (m/m) em zinco [48], e como já estudado na seção 4.4 do presente trabalho, a presença de zinco na amostra poderia interferir na determinação de cobre, ou vice-versa, já que estes dois metais apresentam bandas eletroforéticas bastante similares nas condições de corrida proposta. Desta maneira, para os primeiros estudos de determinação em amostras, optou-se por determinar apenas o teor de níquel no arame de alpaca. Já para a determinação em moedas não existiu esse problema já que a constituição delas é basicamente níquel e cobre.

Como todas as amostras utilizadas para a determinação de níquel e cobre necessitaram da digestão com ácidos, foi necessária a utilização de uma base para a neutralização do ácido presente, já que, o pH da corrida deve ser de 10,5. Dessa forma neutralizou-se as amostras digeridas com solução concentrada de amônia.

Para todas as determinações de níquel e cobre, foram introduzidos nos poços do gel uma solução do branco (indicador), os cinco padrões, uma amostra para determinação de cobre e outra para determinação de níquel, totalizando oito poços de uso. É importante relatar que para a determinação de cobre e níquel foram utilizados valores diferentes de diluição de amostras para que estes metais fossem determinados, não sendo possível determinar a concentração de ambos os metais com apenas uma diluição de amostra. Dessa forma, para cada solução de arame ou moeda preparada, foram realizadas 3 corridas eletroforéticas.

Como já comentado na seção 4.5.2, as primeiras curvas analíticas estudadas que foram obtidas utilizaram o valor da altura de cada pico para o sinal G (verde) em função da concentração de cada padrão. Com as condições otimizadas, observou-se que ao

utilizar a área do pico ao invés da altura, as curvas apresentavam uma melhor linearidade e valores de limites de detecção menores, por isso optou-se por utilizar a área de cada pico para a obtenção de curvas para a determinação dos analitos.

Assim, utilizando as áreas dos picos dos eletroferogramas obtidos, como no exemplo da Figura 33B, foi possível obter curvas analíticas tanto para o cobre (primeiro conjunto de sinais no eletroferograma) quanto para o níquel (segundo conjunto de sinais no eletroferograma), conforme ilustrado na Figura 34, com boas linearidades ($R = 0,999$) e limites de detecção de $1,98 \text{ mg L}^{-1}$ para o cobre e $0,24 \text{ mg L}^{-1}$ para o níquel, que foram estimados com base no valor do intercepto em “y” somado com 3 vezes o desvio padrão para a estimativa do intercepto para cada curva analítica dos metais [49]. Mesmo não sendo limites de detecção tão baixos, como de outras técnicas analíticas, os valores encontrados podem ser considerados satisfatórios para algumas aplicações como na determinação do teor de ligas metálicas. Os limites de quantificação foram estimados a partir da curva de calibração proveniente da análise do primeiro ponto da curva, sendo de 1 mg L^{-1} para o níquel e de 12 mg L^{-1} para o cobre, sendo considerados adequados para esse estudo [50].

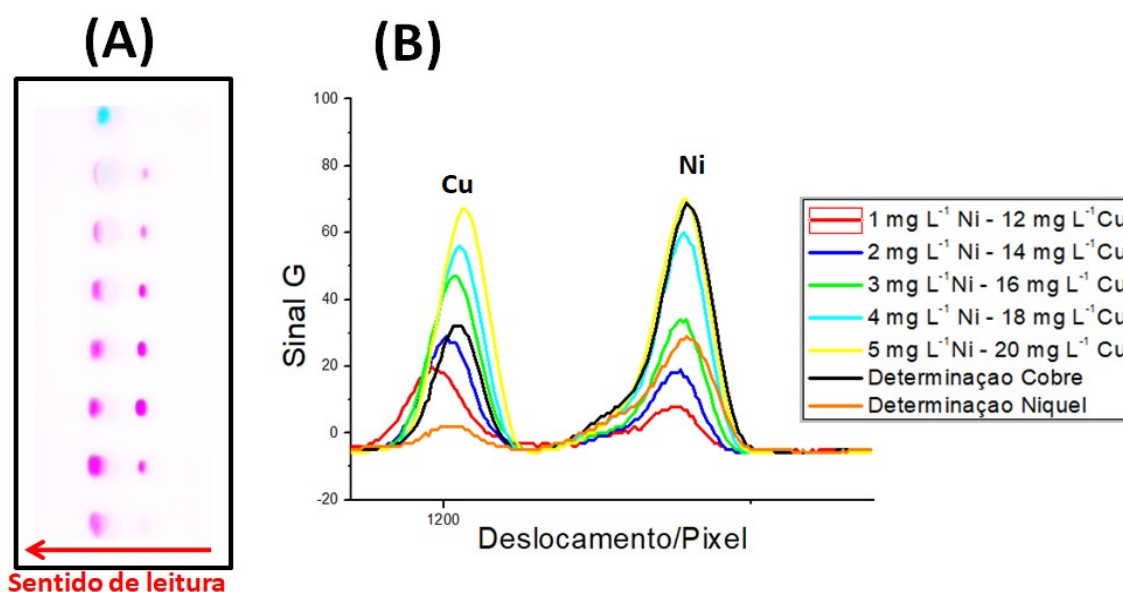


Figura 33. Imagem do branco, padrões de cobre ($12\text{-}20 \text{ mg L}^{-1}$) e níquel ($1\text{-}5 \text{ mg L}^{-1}$) amostra para determinação de cobre e outra de níquel obtidas pela Webcam (A) e eletroferograma obtido (B).

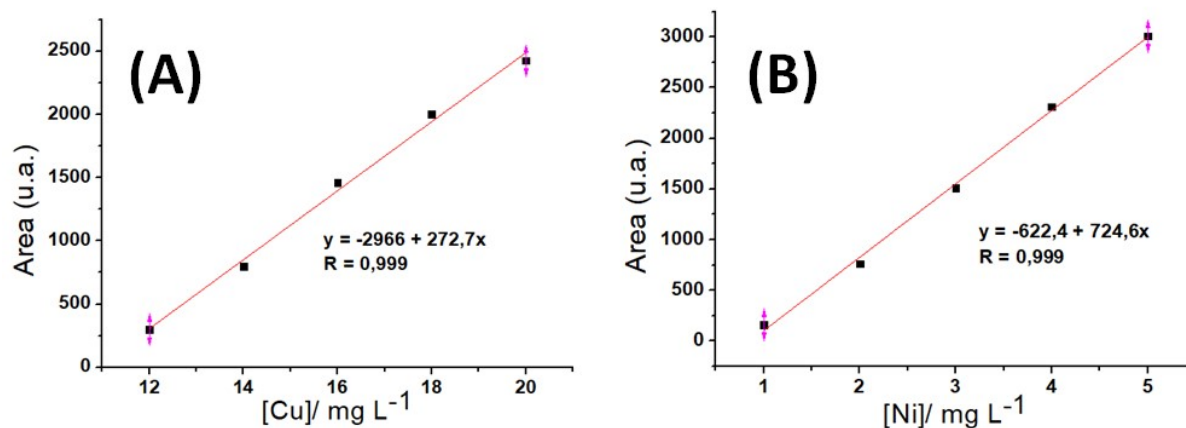


Figura 34. *Curvas simultâneas obtidas de uma corrida para a determinação de cobre (A) e níquel (B) em ligas metálicas.*

Comparando os teores de cobre e níquel obtidos para as ligas metálicas com teores obtidos com absorção atômica em chama (FAAS) (Tabela 4 a Tabela 6), comprova-se que o método proposto apresenta boa exatidão, tendo um erro relativo máximo de 7,02% para o cobre e 4,59% para o níquel. Para cada amostra de liga metálica, os testes t e f foram aplicados aos valores de teores de níquel e cobre com nível de confiança de 95% mostrando não haver diferença significativa entre os valores médios obtidos pelo método proposto e por absorção atômica, além de mostrar que os dois métodos forneceram precisões equivalentes.

Tabela 4. *Teor de níquel obtido por absorção atômica (FAAS) e por eletroforese em gel para o arame de alpaca.*

Amostra	FAAS (%Ni) ± SD	Eletroforese (%Ni) ± SD	Erro %
Arame de Alpaca	18,37 ± 0,11	19,05 ± 0,85	+3,74

Tabela 5. *Teor de cobre obtido por absorção atômica (FAAS) e por eletroforese em gel para moedas.*

Amostra	FAAS (%Cu) ± SD	Eletroforese (%Cu) ± SD	Erro %
1 cruzeiro	74,90 ± 3,06	76,32 ± 0,87	+1,90
10 centavos	72,66 ± 1,48	73,76 ± 3,66	+1,50
20 centavos	68,22 ± 2,03	72,87 ± 1,97	+7,02
50 centavos	72,10 ± 1,71	74,13 ± 1,87	+2,83

Tabela 6. Teor de níquel obtido por absorção atômica (FAAS) e por eletroforese em gel para moedas.

Amostra	FAAS (%Ni) ± SD	Eletroforese (%Ni) ± SD	Erro %
1 cruzeiro	24,59 ± 0,41	25,51 ± 1,33	+3,74
10 centavos	23,65 ± 0,48	22,88 ± 0,14	-3,27
20 centavos	22,29 ± 0,39	21,36 ± 1,09	-4,14
50 centavos	23,45 ± 0,33	22,37 ± 0,54	-4,59

Deve-se considerar também a simplicidade da instrumentação utilizada e a realização de uma separação previamente à detecção. Assim, esses resultados mostram a possibilidade de aplicação da eletroforese em gel com detecção baseada em imagens digitais para a determinação dos íons cobre e níquel em ligas metálicas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO PARTE II – ESTUDO COM CORANTES ALIMENTÍCIOS

5.1 Primeiros estudos com alimentos contendo corantes

Conforme mostra Tabela 7, foram analisados 12 produtos contendo 9 corantes ao total. As Figura 35 e Figura 36 mostram a imagens de géis obtidas após a separação dos corantes presentes em suco em pó e em corantes de confeitaria de diversas colorações. Como pode ser visto, dentre todos os corantes descritos nos rótulos dos produtos comerciais estudados, os únicos que não foram identificados por bandas de coloração característica foram a indigotina (8), azul, e o dióxido de titânio (9), branco. Deve-se destacar que o dióxido de titânio é considerado como carga pigmentadora, ou seja, é um componente que visa intensificar a coloração dos corantes adicionados, não contribuindo com uma cor específica. Assim, pode-se dizer efetivamente que apenas o corante indigotina não foi identificado.

Tabela 7. Produtos estudados com respectiva presença de corantes

Produtos/Corantes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tang Uva	X	X	X						X
Mid Uva	X	X						X	X
Tang Laranja				X	X				X
Verde-hortelã	X				X				
Corante Pink	X		X			X			
Azul Jeans	X				X	X			
Preto Ameixa	X		X		X	X			
Marfim	X			X	X				
Rosa Cereja			X			X			
Violeta	X		X			X			
Mais Uva	X	X					X		
Frisco Uva	X	X	X						

Legenda: azul brilhante (1), vermelho 40 (2), amaranto (3), amarelo crepúsculo (4), amarelo tartrazina (5), eritrozina (6), azorrubina (7), indigotina(8) e dióxido de titânio (9).

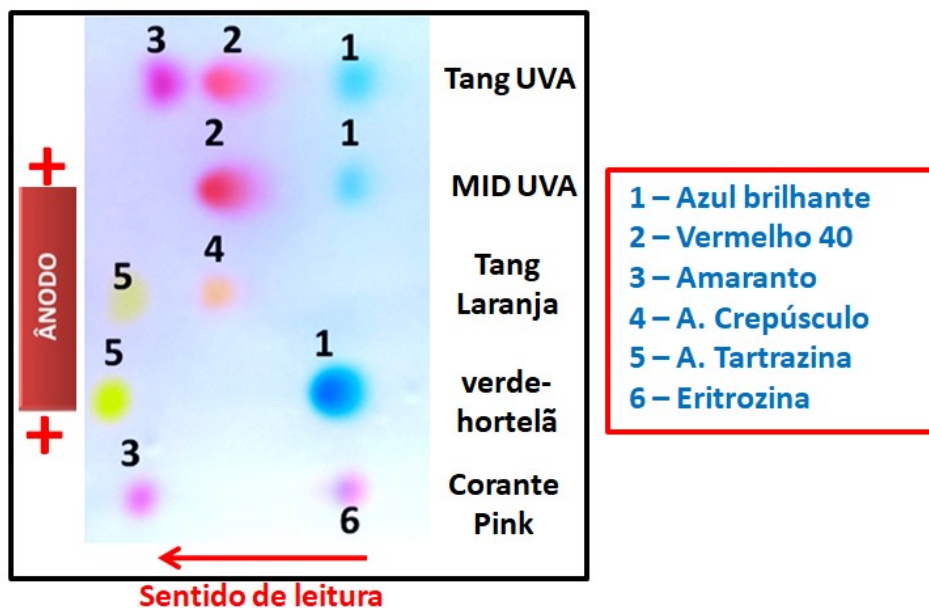


Figura 35. Separação de corantes presentes em produtos comerciais: tang de uva, mid uva, tang laranja e corantes de confeitaria verde-hortelã e pink. Com tampão TAE 1,0X, gel a 2,0% e potencial de 250V.

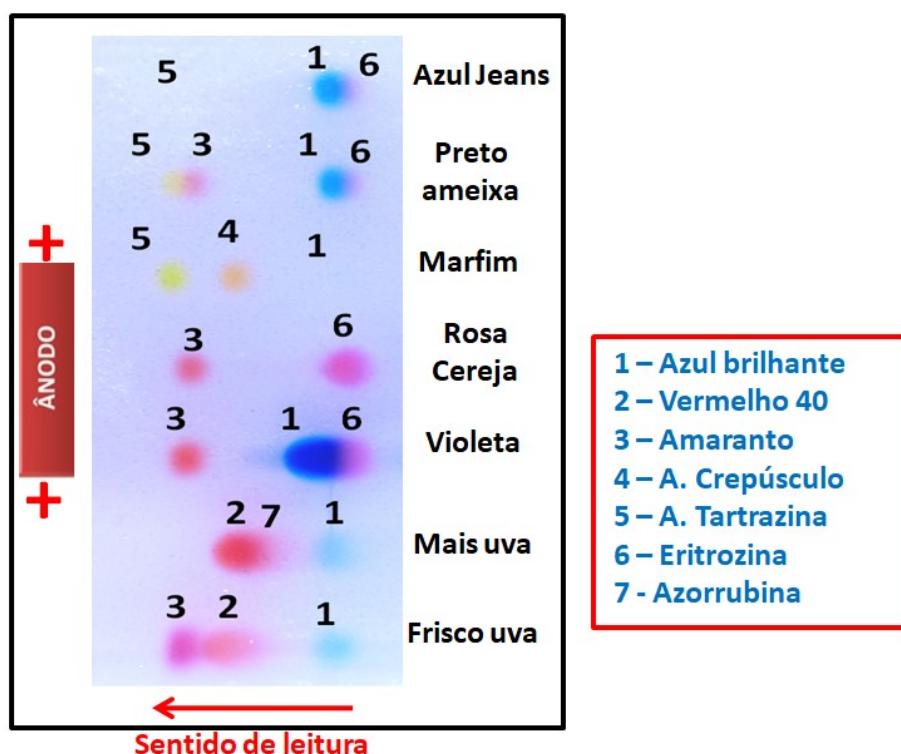


Figura 36. Separação de corantes presentes em produtos comerciais: corantes de confeitaria azul jeans, preto ameixa, marfim, rosa cereja e sucos em pó mais uva e frisco uva. Com tampão TAE 1,0X, gel a 2,0% e potencial de 250V.

Ficou evidenciado (Figura 35) que o corante vermelho 40 (2) e o corante amarelo crepúsculo (4) apresentam migrações praticamente idênticas nessas condições,

não sendo possível uma eventual quantificação destes corantes em amostras que contenham os dois, já que suas bandas se sobrepõem. Porém não foi observada a presença destes dois corantes em um mesmo alimento, não sendo assim um problema para eventuais quantificações nas amostras estudadas.

Da mesma maneira, os corantes azul brilhante (1) e eritrozina (6) respondem de maneira muito similar, sendo identificados de forma independente (o produto tem apenas o azul brilhante ou eritrozina) na Figura 35 nos refrescos tang e mid de uva e nos corantes de confeitaria verde-hortelã e pink. Os mesmos aparecem em conjunto (produtos que apresentam os dois corantes) na Figura 36 para os corantes de confeitaria azul jeans, preto ameixa e violeta. Para esse par de corantes existe o potencial de separação, como visto, porém alguns parâmetros como o próprio pH do meio devem ser modificados, para proporcionar separações com bandas mais distantes umas das outras, permitindo a obtenção de sinais RGB independentes.

Considerando esses estudos iniciais com amostras comerciais, foi possível identificar 7 bandas de coloração e migração distintas referentes aos corantes presentes nos rótulos das embalagens.

Considerando o exposto dos 12 produtos analisados foi possível separar com uma distância apreciável e identificar de forma eficiente os corantes em 6 produtos (tang uva, tang laranja, verde hortelã, marfim, rosa cereja e frisco uva). Para o suco em pó mid uva não foi verificado a presença do corante indigotina enquanto para o corante de confeitaria pink não foi constatado o corante azul brilhante, ou pelo fato desses corantes estarem em concentrações muito baixas ou pela ausência destes nos produtos.

Já para os corantes de confeitaria azul jeans, preto ameixa e violeta as bandas dos corantes azul brilhante (1) e eritrozina (6) aparecem muito próximas uma das outras enquanto para o suco em pó mais uva as bandas dos corante vermelho 40 (2) e azorrubina (7) estão praticamente sobrepostas. De fato, existe um potencial de separação destes corantes em alimentos, se algumas condições fossem otimizadas para proporcionar uma melhor separação, o que não aconteceu no presente trabalho, visto que a presença de todos esses corantes em um mesmo alimento não foi evidenciada ao longo dos estudos.

Ao longo dos estudos de separações e analisando os rótulos dos produtos comerciais estudados foi observado que alimentos de coloração roxa apresentavam em sua composição um corante azul (azul brilhante) e outro corante de cor vermelha/roxo (amaranto ou vermelho 40), enquanto alimentos de cor amarela/laranja têm a tendência de apresentar em sua composição corantes de cor amarela (amarelo tartrazina) e de cor laranja (amarelo crepúsculo). Baseado nessas constatações foi avaliado a separação e a quantificação de corantes presentes em alimentos de coloração roxa e amarela/laranja, já que os corantes presentes nestes alimentos demonstraram separações nítidas, que permitiram a obtenção de eletroferogramas com boa resolução (Figura 37). Estes eletroferogramas demonstram um grande potencial de aplicação da técnica proposta, permitindo a obtenção de sinais analíticos para cinco corantes distintos: azul brilhante (1), vermelho 40 (2), amaranto (3) para o tang de uva (Figura 37A), amarelo crepúsculo (4) e amarelo tartrazina (5) para o tang de laranja (Figura 37B).

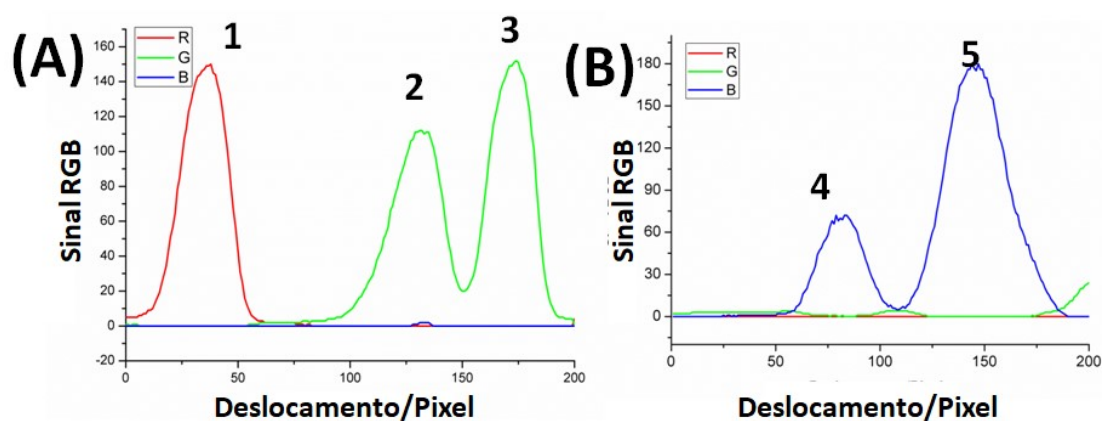


Figura 37. Eletroferogramas para as separações dos corantes presentes em: refresco tang uva (A) e tang laranja (B). Azul brilhante (1), vermelho 40 (2), amaranto (3), amarelo crepúsculo (4) e amarelo tartrazina (5).

5.2 Avaliação quantitativa para corantes alimentícios

5.2.1 Separação e quantificação de Azul brilhante e Amaranto

Para que os corantes azul brilhante e amaranto pudessem ser detectados na mesma corrida eletroforética foi necessário variar as concentrações dos dois analitos nas

diferentes curvas analíticas, além de realizar ajustes nas imagens para que isso fosse possível. De fato, considerando a absorvidade molar de $1637 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ no comprimento de 629 nm (faixa da cor vermelha) para o azul brilhante e $438 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ no comprimento de 523 nm (faixa da cor verde) para o amaranço já era esperado que os corantes apresentassem intensidades de coloração diferentes para diferentes faixas de concentração, o que resultou na necessidade de adequação das concentrações nos padrões para permitir a obtenção das duas curvas analíticas a partir do mesma corrida eletroforética [29]. Desse modo, após algumas tentativas, observou-se que a faixa de concentração de $4\text{-}20 \text{ mg L}^{-1}$ para o azul brilhante e de $40\text{-}120 \text{ mg L}^{-1}$ para o amaranço permitiram a obtenção de resultados analíticos para as duas substâncias na mesma corrida conforme mostra a Figura 38.

A Figura 38A mostra a imagem do gel após a corrida eletroforética nestas faixas de concentração, sendo que o corante amaranço apresenta uma migração mais acentuada que o azul brilhante. É importante destacar que foi aplicada logo acima dos padrões de menor concentração uma solução do branco (apenas glicose), que não gera bandas coloridas na imagem. No eletroferograma obtido (Figura 38B), é nítida a existência de picos distintos para as substâncias e que o corante azul brilhante (primeiro pico) responde para o sinal R enquanto o amaranço (segundo pico) para o sinal G. Esse comportamento já era esperado uma vez que o amaranço absorve fortemente radiação de cor verde (523 nm) e o azul brilhante absorve radiação de cor vermelha (629 nm). Pode-se destacar também que não há resposta significativa da componente vermelha (R) para o corante amaranço e nem da componente verde (G) para o corante azul brilhante, o que pode potencializar a identificação dos analitos caso a separação eletroforética não tenha ocorrida por completa.

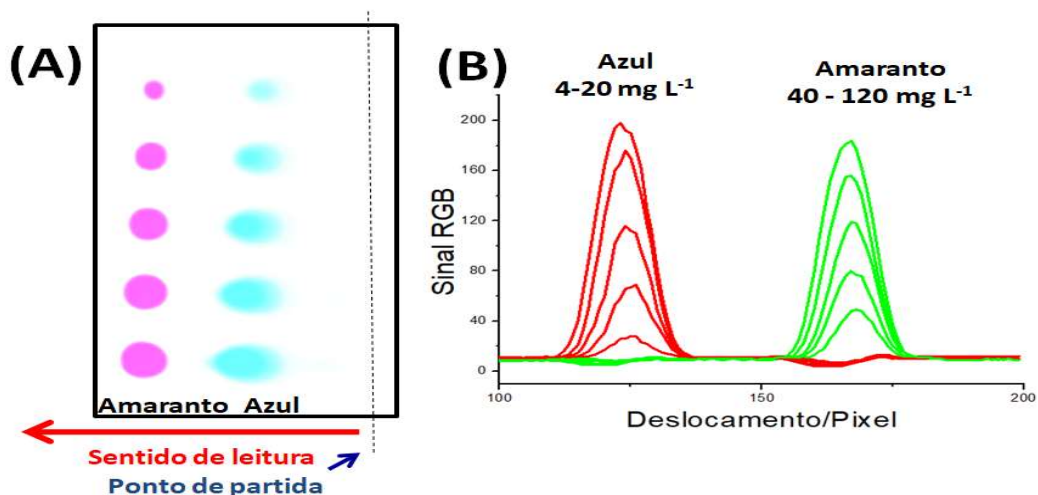


Figura 38. Imagem registrada pela webcam após corrida (A) e eletroferograma da separação (B)

É possível justificar a separação das moléculas dos corantes azul brilhante (Figura 39A) e amarantho (Figura 39B) analisando as propriedades de cada uma delas. A molécula do azul brilhante apresenta massa molar ($792,84 \text{ g mol}^{-1}$) superior a do amarantho ($604,46 \text{ g mol}^{-1}$), o que já justifica uma migração mais lenta do corante azul brilhante por ser uma molécula maior.

Outro fator importante que justifica a separação é a diferença de carga líquida das moléculas no meio de estudo (pH 8,5). Neste meio, a molécula de azul brilhante (Figura 39A) apresenta carga de “-2”, devido ao somatório das 3 cargas negativas dos ácidos sulfônicos com uma carga positiva do íon amônio, já a molécula de amarantho (Figura 39B) apresenta carga de “-3”, devido a presença dos 3 grupos sulfônicos presentes, sem interferência do grupo fenólico, pois seu $pK_a=10$. Assim, como já discutido em seções anteriores, moléculas mais carregadas negativamente apresentam uma migração mais acentuada, pois são mais atraídas pelo ânodo (+), o que explica a migração mais acentuada da molécula de amarantho em relação ao azul brilhante.

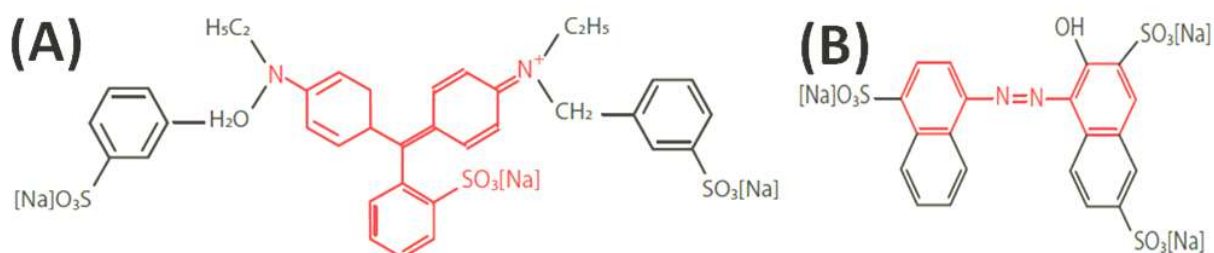


Figura 39. Fórmula estrutural do azul brilhante (A) e amarantho (B)

Utilizando as áreas dos picos dos eletroferogramas obtidos, como no exemplo da Figura 38B, foi possível obter curvas analíticas tanto para o corante azul brilhante (primeiro conjunto de sinais no eletroferograma) quanto para o corante amaranço (segundo conjunto de sinais no eletroferograma), conforme ilustrado na Figura 40, com boas linearidades ($R > 0,99$) e limites de detecção (LD) de $11,25 \text{ mg L}^{-1}$ para o amaranço e $1,99 \text{ mg L}^{-1}$ para o azul brilhante, que foram estimados com base no valor do intercepto em “y” somado com 3 vezes o desvio padrão para a estimativa do intercepto para cada curva analítica dos corantes [49]. Esses valores de LD podem ser considerados satisfatórios uma vez que a concentração desses corantes em alimentos supera, em muitos casos, os valores de LD aqui obtidos. Os limites de quantificação foram estimados a partir da curva de calibração proveniente da análise do primeiro ponto da curva, sendo de 4 mg L^{-1} para o azul brilhante e de 40 mg L^{-1} para o amaranço, sendo considerados satisfatórios ao estudo realizado [50].

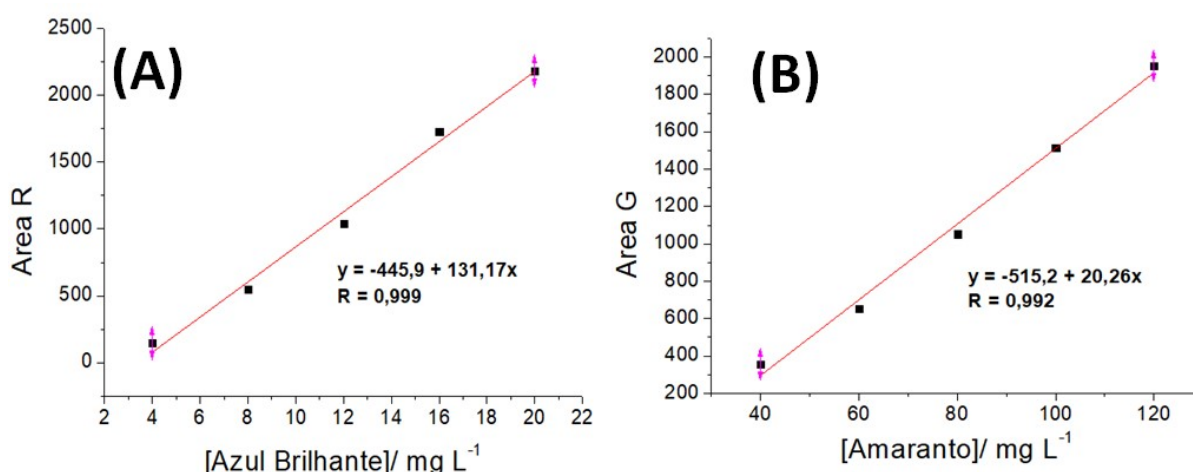


Figura 40. *Curvas analíticas para a determinação de azul brilhante (A) e amaranço (B)*

A precisão das medidas foi avaliada utilizando as faixas mínimas, intermediárias e máximas de concentração para cada um dos padrões dos corantes. Com base na área de cada pico para cada padrão estimou-se os coeficientes de variação nas diferentes concentrações os quais estão destacados em cada conjunto de picos na Figura 41B. Pode-se observar que em todas as faixas de concentrações para ambos os corantes, os coeficientes de variação foram menores que 4%. Deste modo, todos os valores de coeficiente de variação obtidos são considerados satisfatórios para a análise em todas as faixas de concentração estudadas.

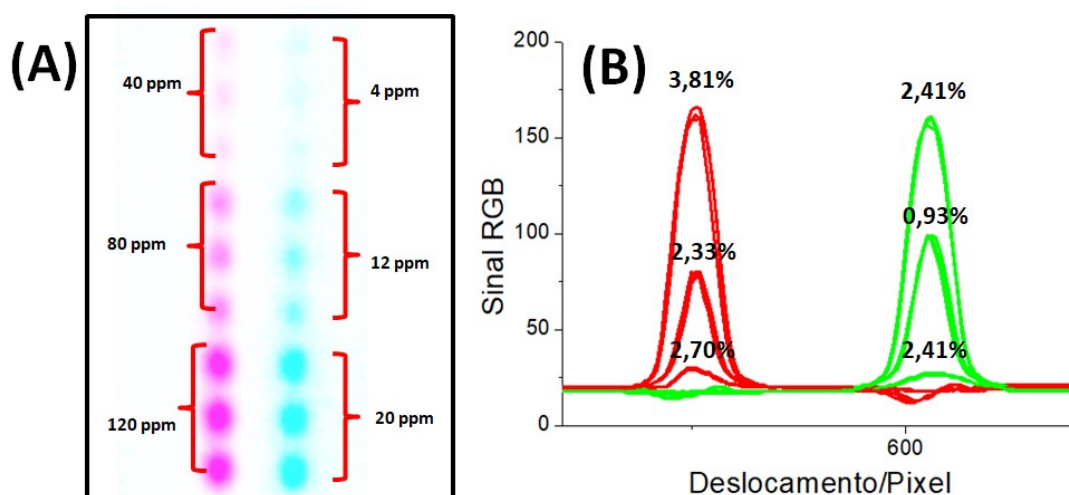


Figura 41. Eletroferograma com precisões nas faixas máxima, intermediária e mínima para azul brilhante (A) e amarantho (B)

Os valores de recuperação para as três faixas de concentração para o azul brilhante e amarantho estão listados nas Tabela 8A e Tabela 9 respectivamente. Como pode ser observado, valores de 94,5% a 107,7% foram encontrados para o azul brilhante enquanto valores de 102,2% a 107,3% foram obtidos para o amarantho, o que indica uma boa exatidão para o método proposto.

Considerando esses resultados, pode-se afirmar que o uso da eletroforese em gel com detecção por imagem digital possibilita a quantificação desses corantes em preparos em pó para sucos de uma maneira simples e eficiente.

Tabela 8. Recuperação de Azul brilhante

Recuperado (mg/g) ± SD	Adicionado (mg/g)	Recuperação %
0,25 ± 0,01	0,248	99,6
0,16 ± 0,01	0,166	94,5
0,06 ± 0,01	0,052	107,7

Tabela 9. Recuperação de Amaranato

Recuperado (mg/g) \pm SD	Adicionado (mg/g)	Recuperação %
4,67 \pm 0,15	4,349	107,3
2,72 \pm 0,04	2,655	102,2
0,85 \pm 0,09	0,833	102,5

Vale destacar que a legislação brasileira não limita a concentração em que os corantes azul brilhante e amaranato podem estar presentes nos alimentos, porém especialistas da FAO (Food and Agriculture Organization) e OMS (Organização Mundial da Saúde) do Comitê de Aditivos Alimentares restringem quanto a segurança de uso fornecendo valores de IDA (ingestão diária aceitável) de 10 e 0,5 mg/kg peso corpóreo para o azul brilhante e amaranato, respectivamente, sendo considerados valores que podem ser ingeridos por uma vida, sem apreciável risco à saúde [29].

Já outros países como os Estados Unidos e Japão proíbem a utilização do amaranato alegando inocuidade carcinogênica. No Canadá e na União Européia (com exceção de Noruega e Suécia) o uso é permitido, mas as quantidades devem aparecer no rótulo dos alimentos, porém sem alguma legislação que limite sua concentração [29].

Em relação ao azul brilhante, seu uso é incondicional nos Estados Unidos, limitado em relação à utilização em alguns alimentos na Inglaterra, e na maior parte da União Européia seu uso é liberado. O Canadá limita seu uso em 100 ppm, equivalente a 100 mg/kg ou 0,1 mg/g de alimento.

Como os valores de amostras transitam entre 0,056 a 0,247 mg/g para o azul brilhante, e o limite permitido no Canadá é de 0,1 mg/g, mostra-se assim que o método poderia ser aplicado na fiscalização da quantidade desse corante em alimentos.

5.2.2 Separação e quantificação de Amarelo Tartrazina e Amarelo Crepúsculo

Do mesmo modo que observado para os corantes estudados na seção anterior, para que o amarelo crepúsculo e o amarelo tartrazina pudessem ser detectados na

mesma corrida eletroforética foi necessário variar as concentrações dos dois analitos nas diferentes curvas analíticas, além de realizar ajustes nas imagens para que isso fosse possível. De fato, considerando a absorvidade molar de $551 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ no comprimento de 480 nm (faixa da cor azul) para o amarelo crepúsculo e $527 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ no comprimento de 426 nm (faixa da cor azul) para o amarelo tartrazina já era esperado que os corantes apresentassem intensidades de coloração diferentes para diferentes faixas de concentração, o que resultou na necessidade de adequação das concentrações nos padrões para permitir a obtenção das duas curvas analíticas a partir do mesma corrida eletroforética [29]. Desse modo, após algumas tentativas, observou-se que a faixa de concentração de $34\text{-}170 \text{ mg L}^{-1}$ para o amarelo crepúsculo e de $50\text{-}250 \text{ mg L}^{-1}$ para o amarelo tartrazina permitiram a obtenção de resultados analíticos para as duas substâncias na mesma corrida conforme mostra a Figura 42.

A Figura 42A mostra a imagem do gel após a corrida eletroforética nestas faixas de concentração, sendo que o corante amarelo tartrazina apresenta uma migração mais acentuada que o amarelo crepúsculo. Nesses estudos também foi aplicada logo acima dos padrões de menor concentração uma solução do branco (apenas glicose), que não gera bandas coloridas na imagem. No eletroferograma obtido (Figura 42B), é nítida a existência de picos distintos para as substâncias e que ambos os corantes, amarelo crepúsculo (primeiro pico) e amarelo tartrazina (segundo pico), respondem para o sinal B. Esse comportamento já era esperado uma vez que o amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo absorvem fortemente radiação de cor azul nos comprimentos de 426 e 480 nm , respectivamente.

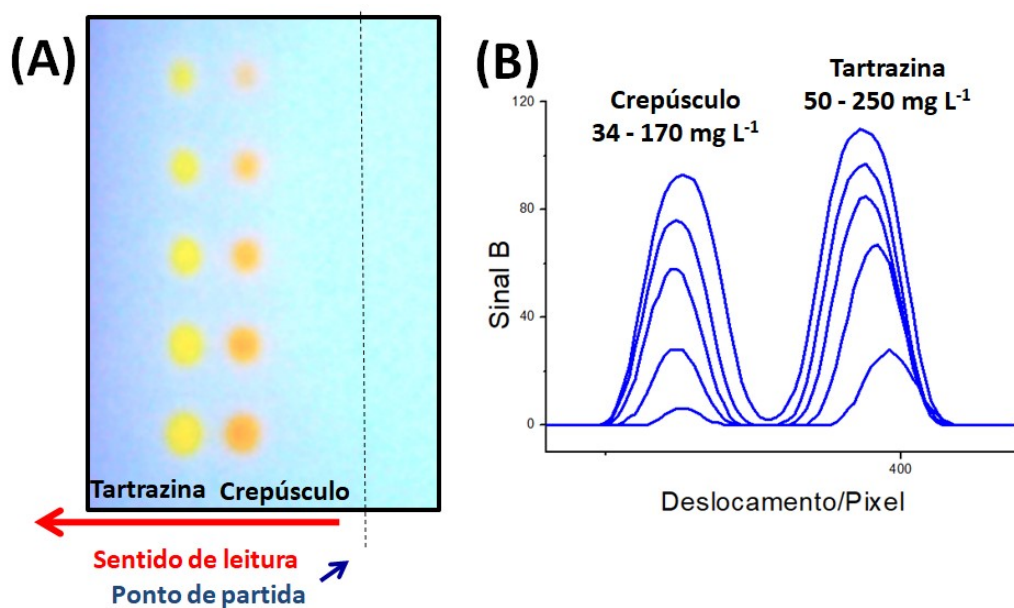


Figura 42. Imagem registrada pela webcam após corrida (A) e eletroferograma da separação (B)

É possível justificar a separação das moléculas dos corantes amarelo crepúsculo (Figura 43A) e amarelo tartrazina (Figura 43B) analisando as propriedades de cada uma delas. A molécula do amarelo crepúsculo apresenta massa molar ($452,36 \text{ g mol}^{-1}$) superior a do amarelo tartrazina ($434,35 \text{ g mol}^{-1}$), o que já explica uma migração mais lenta do corante amarelo crepúsculo por ser uma molécula maior. Porém a diferença de massa entre as duas moléculas é tão pequena que faz com que o fator massa não seja tão relevante nessa separação, pelo fato das moléculas apresentarem quase a mesma massa.

O fator mais importante nesse caso e que justifica a separação é a diferença de carga líquida das moléculas no meio de estudo (pH 8,5). Neste meio, a molécula de amarelo crepúsculo (Figura 43A) apresenta carga de “-2”, devido ao somatório das 2 cargas negativas dos ácidos sulfônicos, já a molécula de amarelo tartrazina (Figura 43B) apresenta carga de “-3”, devido a presença dos 3 grupos sulfônicos presentes, sem interferência do grupo fenólico, pois seu $pK_a=10$, em ambos os corantes. Assim, como já discutido em seções anteriores, moléculas mais carregadas negativamente apresentam uma migração mais acentuada, pois são mais atraídas pelo ânodo (+), o que explica a migração mais acentuada da molécula de amarelo tartrazina em relação ao amarelo crepúsculo.

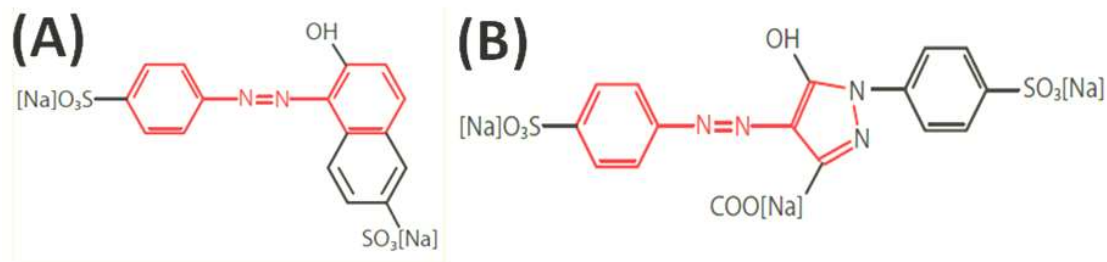


Figura 43. Fórmula estrutural do amarelo crepúsculo (A) e amarelo tartrazina (B)

Utilizando as áreas dos picos dos eletroferogramas obtidos, como no exemplo da Figura 42B, foi possível obter curvas analíticas tanto para o corante amarelo crepúsculo (primeiro conjunto de sinais no eletroferograma) quanto para o corante amarelo tartrazina (segundo conjunto de sinais no eletroferograma), conforme ilustrado na Figura 44, com boas linearidades ($R > 0,99$) e limites de detecção (LD) de $14,28 \text{ mg L}^{-1}$ para o amarelo crepúsculo e $27,10 \text{ mg L}^{-1}$ para o amarelo tartrazina, que foram estimados da mesma forma para o conjunto de corantes estudado na seção anterior [49]. Esses valores de LD também são considerados satisfatórios uma vez que a concentração desses corantes em alimentos supera, em muitos casos, os valores de LD aqui obtidos. Os limites de quantificação foram estimados a partir da curva de calibração proveniente da análise do primeiro ponto da curva, sendo de 34 mg L^{-1} para o amarelo crepúsculo e de 50 mg L^{-1} para o amarelo tartrazina, sendo considerados satisfatórios ao estudo realizado [50].

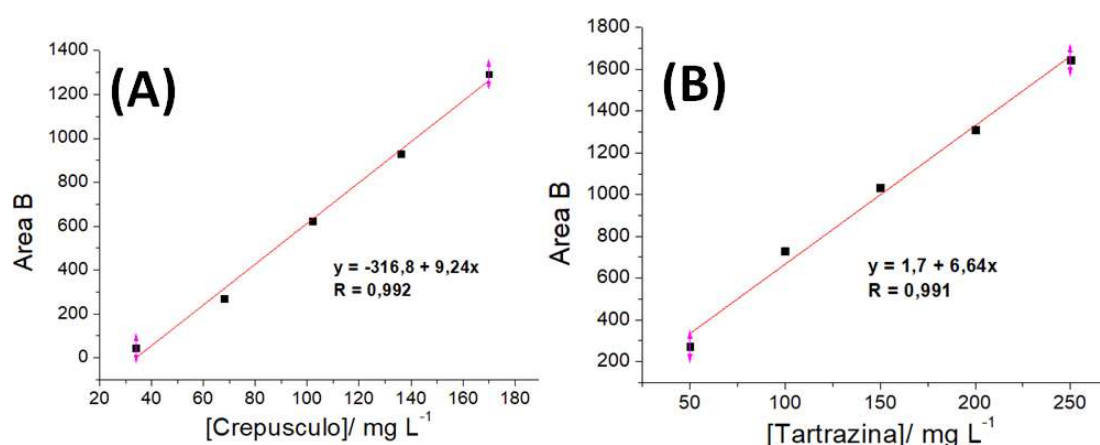


Figura 44. Curvas analíticas para a determinação de amarelo crepúsculo (A) e do amarelo tartrazina (B)

A precisão das medidas foi avaliada utilizando as faixas mínimas, intermediárias e máximas de concentração para cada um dos padrões dos corantes. Com base na área de cada pico para cada padrão estimou-se os coeficientes de variação nas diferentes concentrações os quais estão destacados em cada conjunto de picos na Figura 43B. Pode-se observar que em concentrações intermediárias e máximas, ambos os corantes apresentaram ótimos valores coeficientes de variação, com valores inferiores a 2%. Para valores mínimos de concentração foi obtido o coeficiente de variação inferior a 4% para o amarelo crepúsculo e para amarelo tartrazina coeficiente 16,9%, que é elevado, mas que é justificado pelo baixo sinal adquirido nas medidas nas faixas de concentrações mínimas. Deste modo, todos os valores de coeficiente de variação obtidos são considerados satisfatórios para a análise em todas as faixas de concentração estudadas.

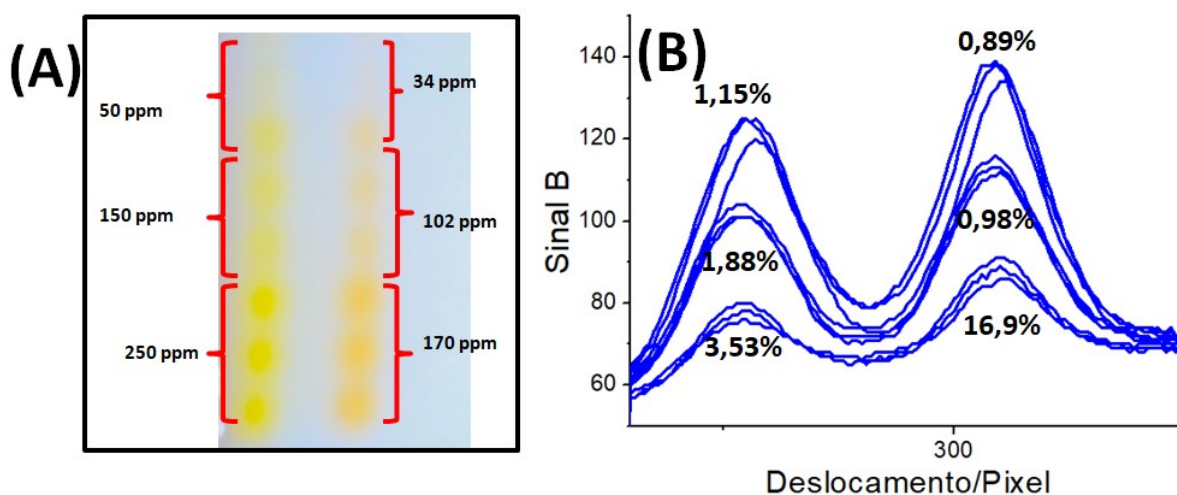


Figura 45. Eletroferograma com precisões nas faixas máxima, intermediária e mínima para amarelo crepúsculo (A) e amarelo tartrazina (B)

Os valores de recuperação para as três faixas de concentração para o amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina estão listados nas Tabela 10 e Tabela 11 respectivamente. Como pode ser observado, valores de 96,9% a 133,3% foram encontrados para o amarelo crepúsculo. Os valores da faixa superior e intermediária para esse corante ficaram entre 96,8% a 107,1%, o que indica boa exatidão no método nessas concentrações. O valor de 133,3% de recuperação, registrado na faixa de concentração inferior, pode ser considerado insatisfatório. Entretanto, vale destacar, que durante o preparo da amostra era necessária a dissolução de aproximadamente 40 gramas de refresco em um balão de 50 mL com água, o que inviabilizava a obtenção de uma solução. De fato, foi aplicado ao gel apenas o sobrenadante da suspensão obtida

após centrifugação, porém como mostra a Figura 46, a corrida para a solução da amostra se torna significativamente diferente daquela observada para os padrões, inviabilizando a quantificação nesse nível de concentração.

Para o amarelo tartrazina foram obtidas recuperações de 93,4% a 98,5%, o que indica uma boa exatidão para o método proposto.

Considerando esses resultados, pode-se afirmar que o uso da eletroforese em gel com detecção por imagem digital possibilita a quantificação desses corantes em preparos em pó para sucos de uma maneira simples e eficiente.

Tabela 10. Recuperação de Amarelo crepúsculo

Recuperado (mg/g) ± SD	Adicionado (mg/g)	Recuperação %
0,38 ± 0,02	0,352	107,1
0,22 ± 0,02	0,226	96,9
0,14 ± 0,01	0,100	133,4

Tabela 11. Recuperação de Amarelo tartrazina

Recuperado (mg/g) ± SD	Adicionado (mg/g)	Recuperação %
1,04 ± 0,07	1,057	98,5
0,64 ± 0,06	0,676	93,6
0,28 ± 0,02	0,300	93,4

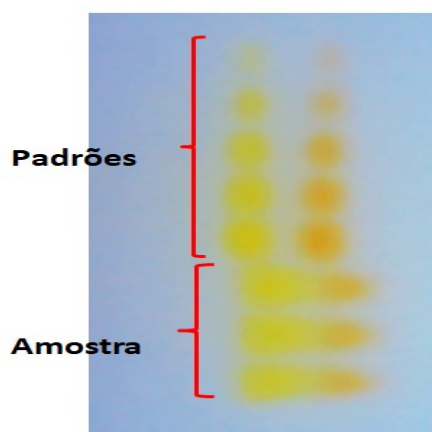


Figura 46. Imagem obtida pela webcam após a corrida eletroforética para a determinação de amarelo crepúsculo.

Assim como os corantes submetidos à separação na seção anterior, não existe regulamentação na legislação brasileira que restringe o limite máximo para os corantes amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo.

Dentre os corantes permitidos no Brasil, o que tem despertado uma maior atenção dos toxicologistas e alergistas, sendo apontado como responsável por várias reações adversas, causando desde urticária até asma é o corante amarelo tartrazina. Estima-se que uma a cada 10 mil pessoas apresentam reações alérgicas a esse corante, porém é um dos corantes mais empregados em alimentos sendo permitido em muitos países como Estados Unidos, Canadá e muitos outros da União Européia, com valor de ingestão diária aceitáveis (IDA) em 7,5 mg/kg peso corpóreo [29].

Já os valores de IDA para o corante amarelo crepúsculo se encontram na faixa de 2,5 mg/kg peso corpóreo. Seu uso é permitido nos Estados Unidos, Japão e na maioria dos países da União Européia. No Canadá é permitido seu uso em alguns produtos específicos com concentração máxima de 300 ppm, equivalente a 0,3mg/g de produto.

Desta maneira, como comprovado pelos valores de recuperação na faixa de 0,219 a 377 mg/g para o corante amarelo crepúsculo, mostra-se que uma possível aplicação do método seria na fiscalização da quantidade deste corante em alimentos no Canadá, já que o valor registrado na legislação deste país se encontra na faixa de concentração estudada.

6. CONCLUSÕES

Através dos dados apresentados, pode-se inferir que o método proposto, fundamentado na separação de componentes de uma mistura após corrida eletroforética com detecção colorimétrica em tempo real baseada no sistema RGB, permite a obtenção de curvas analíticas adequadas e determinações quantitativas dos compostos submetidos à separação.

A determinação de cobre e níquel em ligas metálicas mostra que a estratégia utilizada é eficiente, pois apresentou boa precisão e erros relativos admissíveis em todas as amostras, sendo os valores estatisticamente aceitáveis com nível de confiança de 95%.

Os estudos com corantes artificiais em refrescos em pó demonstraram uma aplicação bastante relevante, já que alguns desses corantes são proibidos ou tem sua quantidade de utilização limitada em alguns países. Além disso, deve-se destacar que esses corantes são usualmente determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), de modo que a estratégia proposta se torna bastante atraente para esta aplicação devido ao fato de ser realizada de forma mais rápida (cerca de 5 minutos), simples e barata.

Ao se considerar o custo de todos os instrumentos necessários para a realização das medidas (cerca de US\$ 1.700), pode-se afirmar que a técnica apresenta custo bastante reduzido tendo em vista o que ela proporciona. Além disso, espera-se que a sua aplicação seja estendida para outros analitos. Como por exemplo, aqueles que exibem fluorescência sob radiação UV.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Oliveira, E.; Tretin, T. C.; Camargo, F.; Pinto, Y. D. P.; Martins, D. B.; **Eletroforese: conceitos e aplicações**, Enciclopédia Bioesfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v.11 n.22; p.1129, 2015.
- [2] Eckersall, P. D. Proteins, proteomics and the dysproteinemias. In: Kaneko J. J.; Harvey, J. W.; Bruss, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed. Burlington: Academic Press. p.117-155, 2008.
- [3] Wilson & Walker. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**, 7ed. p. 399-405, 2010.
- [4] Mcpherson, R. A. Specific Proteins. In: Mcpherson, R. A.; Pincus, M. R. **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 22. ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders. p. 259- 272, 2011.
- [5] Halliday, D.; Resnick, R.; Walker, J.; **Fundamentos de Física 3 “Eletromagnetismo”**, 4ª edição, p. 113-129, 2012.
- [6] Souza, M. T.; Brígido, M. M.; Maranhão, A. Q.; **Técnicas básicas em biologia molecular**, Editora Unb, 2ª edição, p.189-214, 2016.
- [7] Micke, G. A. **Otimização e simulação em eletroforese capilar** [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Química; 2004.
- [8] Torres Filho, H. M. Eletroforese de proteínas. **Richet Nouvelles**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p. 1-8, set. 2008.
- [9] Naoum, P. C. **Eletroforese: Hemoglobinopatias, Proteínas Séricas, Lipoproteínas e DNA**. São Paulo: Editora Santos, p. 301, 2012.
- [10] Cerón, J. J.; Caldin, M.; Martinez-Subiela, S. Electrophoresis and acute phase protein measurement In: Weiss, D. J.; Wardrop, K. J. editors. **Schalm’s veterinary hematology**, 6th ed. Iowa: Blackwell Publishing. p.1157-61. 2010.
- [11] Radkte, J. Proteins. In: Anderson, S. C.; Cockayne, S. editors. **Clinical Chemistry: Concepts and Applications**. New York: McGraw Hill. p.203-221, 2003.
- [12] O'connell, T.; Horita, T.; Kasravi, B. Understanding and Interpreting Serum Protein Electrophoresis. **Americal Family Physician**. v.71, p. 105–112, 2005.

- [13] Atkins & Jones, **Princípios de Química**, Questionando a vida moderna e o meio ambiente, 5ª Edição, 2011.
- [14] Naoum, P. C.; **Eletroforeses**, Livraria Santos, Editora Ltda., São Paulo, 2010.
- [15] Apyari, V. V.; Gorbunova, M. V., Isachenko, A. I. Dmitrienko, S. G. and Zolotov, Yu. A.; **Use of Household Color-Recording Devices in Quantitative Chemical Analysis**, Journal of Analytical Chemistry, Vol. 72, No. 11, pp. 1127–1137, 2017.
- [16] Lin, H.; Man, Z.; Guan, B.; Chen, Q.; Jina, H.; Xue, Z.; **In situ quantification of volatile ethanol in complex components based on colorimetric sensor array**, Anal. Methods, 9, 5873–5879, 2017.
- [17] Soares, S.; Lima, M. J. A.; Rocha, F. R. P.; **A spot test for iodine value determination in biodiesel based on digital images exploiting a smartphone**, Microchemical Journal 133, 195–199, 2017.
- [18] Neto, G. F. S.; Fonseca, A.; Braga, J. W. B.; **Classificação de águas minerais baseada em imagens digitais obtidas por smartphones**, Química Nova, Vol. 39, No. 876-881, 2016.
- [19] Helfer, G. A.; Magnus, V. S; Böck, F. C.; Teichmann, A.; Ferrão, M. F., and Costa, A. B.; **PhotoMetrix: An Application for Univariate Calibration and Principal Components Analysis Using Colorimetry on Mobile Devices**; J. Braz. Chem. Soc., Vol. 28, No. 2, 328-335, 2017.
- [20] Gomes, M. S.; Trevizan, L. C.; Nóbrega, J. A.; Kamogawa, M. Y.; **Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico**. *Quim. Nova*, 31 (6), 1577–1581, 2008.
- [21] Butz, P.; Hofmann, C.; Tauscher, B.; **Recent Developments in Noninvasive Techniques for Fresh Fruit and Vegetable Internal Quality Analysis**, J. Food Sci. 70, 131, 2005.
- [22] Masawat, P.; Harfield, A.; Namwong, A.; **An iPhone-based digital image colorimeter for detecting tetracycline in milk**, Food Chem, 184, 23, 2015.
- [23] Choodum, A.; Parabun, K.; Klawach, N.; Daeid, N. N.; Kanatharana, P.; Wongniramaikul, W.; **Real time quantitative colourimetric test for methamphetamine detection using digital and mobile phone technology**, Forensic Sci. Int. 235, 8, 2014.

- [24] Debus, B.; Kirsanov, D.; Yaroshenko, I.; Sidorova, A.; Piven, A.; Legin, A.; **Two low-cost digital camera-based platforms for quantitative creatinine analysis in urine**, Anal. Chim. Acta. 895, 71, 2015.
- [25] Santos, P. M.; Pereira-Filho, E. R.; **Digital image analysis – an alternative tool for monitoring milk authenticity**, Anal. Methods, 5, 3669, 2013.
- [26] Antiabong, J. F.; Ngoepe, M. G.; Abechi, A. S.; **Semi-quantitative digital analysis of polymerase chain reaction-electrophoresis gel: potencial applications in low-income veterinary laboratories**, Veterinary World, Eissn: 2231-0916, pg 935-939.
- [27] BRASIL. ANVISA. **Portaria no 540/97, de 27 de outubro de 1997.**
- [28] BRASIL. ANVISA. **Decreto no 55.871/65 de 26 de março de 1965.**
- [29] Os corantes alimentícios, Aditivos e ingredientes <http://insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/119.pdf> acessado em 3/12/2018.
- [30] Godoy, H. T.; Prado, M. A.; **Determinação de corantes artificiais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em pó para gelatina**, Química Nova, Vol. 27, No.1, 22-26, 2004.
- [31] O uso dos corantes artificiais em alimentos: legislação brasileira <http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201604/2016040360969001461681111.pdf> acessado em 3/12/18
- [32] Rollemberg, M. C. E.; Vidotti, E. C.; **Espectrofotometria derivativa: uma estratégia simples para a determinação simultânea de corantes em alimentos**, Química Nova, Vol. 29, No.2, 230-233, 2006.
- [33] Sahraei, R.; Farmany, A.; Mortazavi, S.S.; **A nanosilver-based spectrophotometry method for sensitive determination of tartrazine in food samples**, Food Chem, 138 (2013), pp. 1239-1242
- [34] Komissarchik, S.; Nyanikova, G.; **Test systems and a method for express detection of synthetic food dyes in drinks** LWT Food Sci Technol, 58 (2014), pp. 315-320

- [35] Altınöz, S.; Toptan, S.; **Simultaneous determination of indigotin and Ponceau-4R in food samples by using Vierordt's method, ratio spectra first order derivative and derivative UV spectrophotometry**, J Food Compos Anal, 16 (2003), pp. 517-530
- [36] Al-Degs, Y.S.; El-Sheikh, A.H.; **Spectrophotometric determination of food dyes in soft drinks by second order multivariate calibration of the absorbance spectra-pH data matrices**, Dyes Pigm, 97 (2013), pp. 330-339
- [37] Schenone, A.V.; Culzoni, M. J.; Marsili, N. R.; Goicoechea, H. C.; **Determination of tartrazine in beverage samples by stopped-flow analysis and three-way multivariate calibration of non-linear kinetic-spectrophotometric data** Food Chem, 138 (2013), pp. 1928-1935
- [38] Andrade, F. I.; Guedes, M. I. F.; Vieira, Í. G. P.; Mendes, F. N. P.; Rodrigues, P. A. S.; Maia, C. S. C.; Ávila, M. M. M.; Ribeiro, L. M.; **Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by TLC and ion-pair HPLC**, Food Chem, 157 (2014), pp. 193-198
- [39] Long, C.; Mai, Z.; Yang, Y. ; Zhu, B.; Xu, X.; Lu, L.; Zou, X.; **Synthesis and characterization of a novel molecularly imprinted polymer for simultaneous extraction and determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in chilli products by solid phase extraction and high performance liquid chromatography**, J Chromatogr A, 1216 (2009), pp. 8379-8385
- [40] Shen, Y.; Zhang, X.; Prinyawiwatkul, W.; Xu, Z.; **Simultaneous determination of red and yellow artificial food colourants and carotenoid pigments in food products**, Food Chem, 157 (2014), pp. 553-558
- [41] Bonan, S.; Fedrizzi, G.; Menotta, S.; Elisabetta, C.; **Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector**, Dyes Pigm, 99 (2013), pp. 36-40
- [42] Murty, M. R. V. S.; Chary, N. S.; Prabhakar, S.; Raju, N. P.; Vairamani, M.; **Simultaneous quantitative determination of Sudan dyes using liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry**, Food Chem, 115 (2009), pp. 1556-1562

- [43] Zou, T.; He, P.; Yasen, A.; Li, Z.; **Determination of seven synthetic dyes in animal feeds and meat by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors**, Food Chem, 138 (2013), pp. 1742-1748
- [44] He, L.; Su, Y.; Fang, B.; Shen, X.; Zeng, Z.; Liu, Y.; **Determination of Sudan dye residues in eggs by liquid chromatography and gas chromatography–mass spectrometry**, Anal Chim Acta, 594 (2007), pp. 139-146
- [45] Empresa Nova aroma, corantes <<http://novoaroma.com.br/>> acessado em 12/12/2018.
- [46] ANVISA; Resolução da diretoria colegiada – nº 166, de 24 de julho de 2017.
- [47] Vogel, A. I.; **Química Analítica Quantitativa**. 5ª Edição renovada, Ed. Mestre Jou, 1981.
- [48] Composição do arame de alpaca <<http://www.aramessantarita.com.br/cobre.htm>> acessado em 29/03/2018.
- [49] Limite de Detecção < <http://www.portalaction.com.br/validacao-de-metodologia-analitica/115-limite-de-deteccao> > acessado em 25 de fevereiro de 2019.
- [50] Limite de Quantificação < <http://www.portalaction.com.br/validacao-de-metodologia-analitica/116-limite-de-quantificacao> > acessado em 25 de fevereiro de 2019.
- [51] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F.; Stanley, R. C.; **Fundamentos da Química Analítica**, Tradução da 8ª edição norte americana. São Paulo, Ed. Thomsn, 2008.
- [52] Hepp, D.; Nonohay, J. S.; **A importância de técnicas e análises de DNA**, Scientia Tec: Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS – Campus Porto Alegre, v.3, n.2, p. 114-124, jun/dez 2016.