

Uma proposta metodológica empregando a eletroforese capilar de zona para explicar conceitos químicos

J.S. Teles, R.M. Santos e A.P.G. Gervasio

Departamento de Química – Campus Prof. Alberto Carvalho - Universidade Federal de Sergipe, 49500-000, Itabaiana-SE, Brasil

jei_se@hotmail.com

(Recebido em 10 de dezembro de 2012; aceito em 25 de março de 2013)

O estudo da separação de espécies vem sendo abordado por várias técnicas, dentre elas, pode-se destacar a Eletroforese Capilar, ferramenta analítica que emprega a diferença de potencial e a corrente elétrica gerada para promover o deslocamento de partículas ou moléculas ionizadas sob o efeito do campo elétrico. Este processo de separação ocorre no interior de um capilar de sílica fundida com diâmetro interno de aproximadamente 75µm. Neste trabalho, a eletroforese capilar de zona fora utilizada para descrever uma metodologia, bem como a teoria envolvida, em relação à técnica. A metodologia fora aplicada aos alunos do Curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal de Sergipe, Campus Prof. Alberto Carvalho através da disciplina Tópicos Especiais em Química Analítica III. Os aspectos teóricos e práticos foram discutidos visando melhorias tanto na abordagem quanto no conhecimento dos alunos sobre soluções, mobilidade de íon e metodologias analíticas.

Palavras-chave: eletroforese capilar de zona, mobilidade iônica, graduação em química.

A Methodological Proposal employing zone capillary electrophoresis to explained chemistry concepts

The study of separating species has been approached by several techniques, among which we can highlight capillary electrophoresis, analytical tool that employs the potential difference and electric current generated for promoting the displacement of ionised particles or molecules. This separation process occurs within a fused silica capillary with an internal diameter of approximately 75µm. In this work, capillary zone electrophoresis was used to describe a methodology and the theory involved, regarding the technique. The methodology was applied to the undergraduate students of chemistry, at the Federal University of Sergipe, Campus Prof. Alberto Carvalho. The theoretical and practical aspects were discussed for improvements in both approach and the students' knowledge of solutions, ion mobility and analytical methodologies.

Keywords: capillary zone electrophoresis, ion mobility, undergraduate education in Chemistry.

1. INTRODUÇÃO

Um professor de graduação parte do pressuposto de que os alunos concluem o ensino médio com pouca base sobre o comportamento dos íons em solução, além de não conseguirem relacioná-lo ao conteúdo do curso de química. Um dos motivos para que isso ocorra deve-se ao trabalho de abstração que o curso exige. O estudo sobre íons em solução tem sua continuidade na graduação.

Usar soluções para demonstrar uma reação química é de suma importância em laboratórios de química. Além disso, é preciso levar em consideração alguns pontos chaves, como: as propriedades químicas dos reagentes, o cálculo matemático envolvido para preparar uma solução de concentração conhecida, definição de volume e a forma de preparar as soluções. Sem esquecer as regras de segurança que estão envolvidos nos processos que envolvem experimentos. O preparo de uma solução envolve a dissolução de um ou mais solutos em um determinado solvente. A partir disso, pode-se explicar aos alunos que as soluções estão diretamente relacionadas com a dispersão homogênea de moléculas ou íons. Pensar que um pacote de açúcar não se dissolve em um copo d'água (±250ml) é um argumento razoável para mostrar aos alunos o quanto a dissolução não é um processo aleatório. Mas é importante enfatizar que se adicionado aos poucos, observar-se-á o ponto exato que a quantidade de açúcar

deixa de ser solúvel e passa para o fundo do copo. Partindo desse princípio é possível entender a classificação das soluções como insaturada, saturada e supersaturada. A homogeneidade de uma solução mantém uma relação muito importante em química, mas existe um limite para que isso ocorra, pois é necessária a dissolução de uma quantidade fixa de soluto dissolvida em uma quantidade fixa de solvente a uma dada temperatura. A temperatura também tem significativa influência sobre a solubilidade dos compostos, como pode ser comprovado na dissolução do chocolate em leite quente e frio, o processo de dissolução acontece mais rapidamente em leite quente.

A dissolução de um soluto em um dado solvente implica na preparação de uma solução, ou seja, o tipo de solvente pode variar no valor do coeficiente de solubilidade dos compostos, o que pode ser visto com os valores de solubilidade do sal em água (359g L^{-1}) e em metanol ($14,9\text{g L}^{-1}$), ambos a 25°C .² Nessa solução têm-se partículas denominadas íons ou moléculas, que estão associadas ao soluto e/ou ao solvente, por meio da interação de forças eletrostáticas (interatômicas e intermoleculares), devido à existência de cargas elétricas, dando origem à passagem de corrente elétrica através da solução.³ O estudo desse conceito é bastante trabalhado nos vários ramos da Química, dentre eles pode-se destacar a Eletroquímica.

A Eletroquímica consiste na produção de corrente elétrica por meio da transferência de elétrons em uma dada reação química. Para uma reação acontecer em meio aquoso, os átomos presentes em uma solução interagem através de ligações iônicas e covalentes. Em uma ligação iônica existem elementos os quais um cede e o outro recebe elétrons e a existência dessa troca de elétrons faz com que haja formação de íons e suas respectivas cargas, determinando assim o número de oxidação (NOX).⁴

Os processos de óxido-redução que ocorrem nas reações químicas definem o quanto uma reação é espontânea. Em um processo espontâneo, a energia química que está armazenada em algumas substâncias pode ser transformada em energia elétrica, esse processo é conhecido como pilha. Já em um processo não espontâneo, a utilização de corrente elétrica, através de uma fonte externa na produção da reação, faz com que os elétrons sejam transferidos de um elemento a outro, gerando uma reação química, esse processo é conhecido como eletrólise.⁵

A aplicação da diferença de potencial é utilizada em algumas técnicas para a identificação e separação de espécies químicas. Na química analítica suas contribuições vão desde identificação até quantificação de diversas espécies químicas e seus respectivos compostos. Dentre as técnicas analíticas de separação destaca-se a Eletroforese. A Eletroforese promove a separação das espécies carregadas através do efeito de campo elétrico empregando uma solução eletrolítica. Em meio às modalidades de Eletroforese existentes, tem-se a Eletroforese Capilar de Zona (ECZ), que é a mais utilizada, pois mostra um grande desempenho para a separação de solutos iônicos, sejam eles, ânions ou cátions inorgânicos, como também moléculas de alto peso molecular, podendo ser analisados mesmo possuindo cargas semelhantes, mas com raios iônicos diferentes.⁶

A Eletroforese Capilar é uma técnica analítica que pode ser ressaltada como um modelo para explicar o comportamento dos íons em solução. Relativamente, é uma técnica de fácil manuseio, que requer instrumentação de custo moderado. A eletroforese capilar de zona emprega solução aquosa, e é claro que a concentração dessa solução é importante no processo eletroforético. Essa solução é denominada de solução eletrolítica e através dela ocorre a migração de espécies carregadas quando um campo elétrico é gerado. A migração pela coluna pode ser empregada para explicar a mobilidade dos íons e das moléculas neutras em uma solução, bem como suas distintas velocidades de migração. Essa maneira de visualizar movimentação de íon facilita a compreensão dos conteúdos envolvidos pelos alunos, além de ser poderosa ferramenta analítica. A disciplina de química analítica instrumental discute metodologias analíticas empregando as técnicas instrumentais. Até pouco tempo, a eletroforese não participava do elenco de conteúdos, em nível de graduação, mas às técnicas cromatográficas, mais tradicionais, são amplamente discutidas.⁷

1.1 A eletroforese capilar de zona em química analítica

A ECZ é uma ferramenta analítica que emprega a diferença de potencial e a corrente elétrica gerada por uma fonte para promover o deslocamento de partículas ou moléculas ionizadas sob o efeito do campo elétrico, e a partir desse fenômeno, podem ser feitas medidas quantitativas através de suas diferentes mobilidades eletroforéticas em um meio condutor geralmente aquoso. Este processo de separação ocorre no interior de um capilar de sílica fundida com diâmetro interno de aproximadamente 75µm.

A coluna de sílica é formada por grupos silanóis que possuem caráter ácido. Sua dissociação ocorre quando é passada solução de pH maior que 2,00. A dissociação desses grupos forma uma camada de carga negativa na superfície da coluna de sílica⁸. Essas cargas negativas atraem íons de carga positiva da solução eletrolítica, tornando a superfície neutra. Isso faz com que haja um movimento dos íons dentro do capilar quando uma fonte de alta tensão é acionada, movimento este gerado pela migração dos íons positivos em direção ao polo oposto ao de sua carga, ou seja, os íons de carga positiva migrarão em direção ao polo negativo. Essa migração é denominada de fluxo eletroosmótico (EOF), que nesse sentido de migração é considerado normal. Para tornar o sistema quantitativo, a injeção é feita em um dos polos e a detecção em outro.

A eletroforese capilar permite a análise de ânions e cátions simultaneamente, mas pode-se optar por analisar apenas uma classe de espécies. O sistema discutido no parágrafo anterior mostra o delineamento para a determinação de cátions. A determinação de ânions pode ser possível naquele sistema desde que a velocidade do fluxo eletroosmótico seja bem maior que a velocidade eletroforética do ânion. Caso contrário, o ânion não migrará em direção ao polo negativo.

A adição de agentes surfactantes ao eletrólito de separação é uma estratégia muito utilizada quando se pretende realizar determinações quantitativas de espécies aniônicas. Os agentes surfactantes fazem com que haja formação de uma camada de micelas na superfície interior do capilar, na qual sua molécula possui uma carga positiva em uma das extremidades e a cadeia carbônica forma a cauda. As interações hidrofóbicas permitem que duas moléculas formem uma micela. Uma das extremidades é atraída para a superfície do capilar enquanto a outra interage com os íons negativos da solução tampão. Como a sílica ao se dissociar forma uma carga negativa, então a extremidade positiva da molécula se liga a sua superfície, e fica com sua cauda em direção oposta, a qual outra camada do surfactante se direciona opostamente, fazendo com que haja uma bicamada de surfactante catiônico, formando uma camada hidrocarbônica apolar, logo outra extremidade positiva é gerada. Ao entrar em contato com os ânions da solução tampão, o fluxo eletroosmótico ocorrerá do polo negativo para o polo positivo em presença do campo elétrico⁸.

O EOF é o responsável pela eficiência da técnica, acarretando em grandes contribuições, como por exemplo, a determinação de ânions e cátions em uma mesma análise. E os compostos neutros, sem o EOF, não iriam mover-se no capilar. Um dos parâmetros que também influencia o EOF, sendo um dos fatores determinantes em análises por ECZ, é o pH da solução tampão, pois a dependência deste acarreta na boa seletividade da separação dos analitos. Outros fatores muito importantes são: concentração do tampão e a força iônica. É de suma relevância a escolha do eletrólito a ser utilizado, uma vez que não só a velocidade eletroosmótica será afetada, mas também a resolução dos componentes. É importante também que os alunos compreendam o Efeito Joule, o qual acarreta no superaquecimento da solução no interior do capilar.

A separação das espécies ocorre devido à mobilidade eletroforética de cada espécie, ou seja, cada espécie irá migrar em tempo diferente devido a sua velocidade também ser distinta⁶. Quando presentes em solução, estes íons movimentam-se aleatoriamente, e a velocidade que cada íon possui é independente de cada espécie. Se esses íons forem submetidos a um maior potencial, maior também será a corrente, logo, mais rápido será a mobilidade desse íon. Os movimentos das partículas de um solvente também interferem na mobilidade dos íons, pois ao entrar em contato com um potencial elétrico, ocasionará um retardamento da velocidade desses íons, devido à força de atrito, proveniente da viscosidade do meio. As duas forças que entram em equilíbrio ao atuarem em direções opostas adquirem uma velocidade terminal, sendo proporcionalmente relacionada à força de um campo elétrico quando aplicado, denominando assim, a velocidade de migração. Esta velocidade é dominante da mobilidade com que estes íons atuam em uma solução bem como sua carga e a quantidade de íons presentes, gerando assim a

condutância dos íons, ou seja, quanto maior a carga do íon, maior será sua mobilidade^{5,9}. Estas mobilidades são distintas devido à sua razão carga/massa em determinado pH, e podem ser medidas por ECZ.

Sabendo da abrangência dos conceitos químicos para alunos do curso de química, o presente trabalho propõe aulas teóricas e práticas sobre Eletroforese Capilar de Zona para implementar as atividades dos alunos do curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal de Sergipe, Campus Prof. Alberto Carvalho, através da disciplina Tópicos Especiais em Química Analítica III. A metodologia analítica, envolvendo a técnica, é discutida com os alunos para que os mesmos possam associar os conteúdos teóricos e práticos envolvidos.

2. METODOLOGIA

O presente trabalho fora desenvolvido e aplicado pela professora da disciplina com o auxílio dos alunos de iniciação científica envolvidos com as pesquisas em eletroforese capilar de zona aos alunos da disciplina de Tópicos Especiais em Química Analítica III entre 2011 e 2012. Os alunos receberam aulas teóricas e práticas sobre Eletroforese Capilar de Zona.

De acordo com o plano de ensino foram ministradas 15 aulas teóricas e 15 aulas experimentais, estas eram alternadas entre uma aula teórica e outra prática. Também foram estudados os desenvolvimentos relacionados à técnica e as principais aplicações em química analítica. Durante as aulas, os alunos também prepararam seminários sobre metodologias analíticas divulgadas em revistas internacionais sobre as aplicações da eletroforese capilar de zona.

A partir das aulas práticas, pretendeu-se mostrar aos alunos o funcionamento do sistema de eletroforese capilar de zona. As aulas teóricas priorizaram a introdução do conceito sobre eletroforese e algumas estratégias químicas envolvidas para melhor explicar o comportamento dos íons em uma solução. Nesse caso foram utilizadas soluções contendo os flavonóides rutina e quercetina (Fig.1).

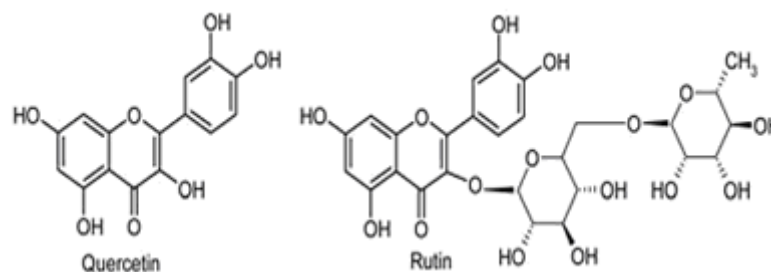


Figura 1: Flavonóides utilizados para estudos sobre mobilidade iônica.

2.1 Sistema eletroforético

O sistema eletroforético utilizado pelos alunos está mostrado na Figura 1. Os parâmetros eletroforéticos foram avaliados durante as práticas e suas influências sobre a migração dos íons puderam ser discutidas. Os experimentos avaliaram a influência da concentração e pH da solução eletrolítica (solução de separação), da adição de um agente surfactante para inverter o fluxo eletroosmótico, do potencial aplicado e da intensidade da corrente, dos modos de injeção, do volume injetado e da altura de injeção (por gravidade), do comprimento do capilar e da concentração dos flavonóides sobre a migração dos íons.

Para a montagem de um sistema eletroforético de zona é necessário que uma fonte de alta voltagem seja ligada a dois eletrodos de platina fechando o circuito a partir do capilar de sílica fundida. O capilar de sílica de 75 μ m de diâmetro interno e 375 μ m de diâmetro externo, 51cm de comprimento total (24cm efetivos) fora utilizado em todas as medidas.

O capilar é preenchido com solução eletrolítica e ambas as extremidades são imersas em reservatórios conectados aos eletrodos. Capilar e reservatórios contêm a mesma solução

eletrolítica para fechar o circuito. O condicionamento do capilar fora feito com o auxílio de uma bomba peristáltica (Figura 1E e 1G).

O detector UV a 214nm com detecção on-column fora utilizado em todas as medidas. A saída analógica do detector está conectada a um computador através de uma interface que permite fazer a aquisição de dados e gerar os eletroferogramas. A Figura 2 mostra o sistema utilizado durante as aulas.

Os frascos contendo o eletrólito (solução tampão) são sempre mantidos a uma mesma altura durante as análises. Mas, durante a injeção, o reservatório do eletrólito é substituído pelo reservatório contendo a amostra a ser analisada, e este é erguido a uma altura que, por sua vez, é definida por suporte de isopor de 2,0 ou de 4,5cm. O frasco é mantido nesta altura por um tempo também pré-definido, nesse caso, 5, 10, 15, 20 e 30s. Após isso, o frasco da amostra é novamente substituído pelo frasco do eletrólito e a fonte é novamente ligada para que ocorra a migração das espécies.

Para mostrar a influência da corrente elétrica em função da voltagem, os alunos precisaram preparar e fazer testes com algumas soluções de separação contendo 10; 20; 30; 40; 50 e 100mmol L⁻¹ de ácido bórico e mantendo-se o pH = 9,00. Para cada solução foram feitas análises variando-se a voltagem de 2 em 2kV até 12kV.

O capilar fora preenchido com solução tampão 50mmol L⁻¹ de ácido bórico pH 9,00 e em seguida foram feitas análises de solução 2,4x10⁻⁴ mol L⁻¹ de rutina, utilizando um tempo de injeção de 15s. A voltagem fora variada em 2; 5; 7; 10 e 15kV.

A análise de solução contendo os flavonóides mostra que as mobilidades das espécies são diferentes. Empregara-se solução contendo 50mmol L⁻¹ e pH 9,00 e injetaram-se soluções de flavonóides por 15s. As soluções empregadas foram: 2,4x10⁻⁴mol L⁻¹ de Rutina; 2,4x10⁻⁴mol L⁻¹ de Quercetina; 2,4x10⁻¹mol L⁻¹ de Rutina e 2,4x10⁻¹mol L⁻¹ de Quercetina.

Os alunos utilizaram os *softwares Excel e Origin* para tabelar os resultados, construir gráfico da curva analítica de calibração, fazer regressões, obter coeficiente linear e de correlação e, por fim, determinar rutina em maçã.

Sob condições otimizadas, 50mmol L⁻¹ de ácido bórico pH 9,00, injeção hidrodinâmica 15s, voltagem 10kV (12μA) e comprimento de onda em 214nm foram utilizados.

Para esse estudo, os alunos prepararam soluções contendo: rutina; extrato de maçã; e outra com adição do padrão ao extrato de maçã.

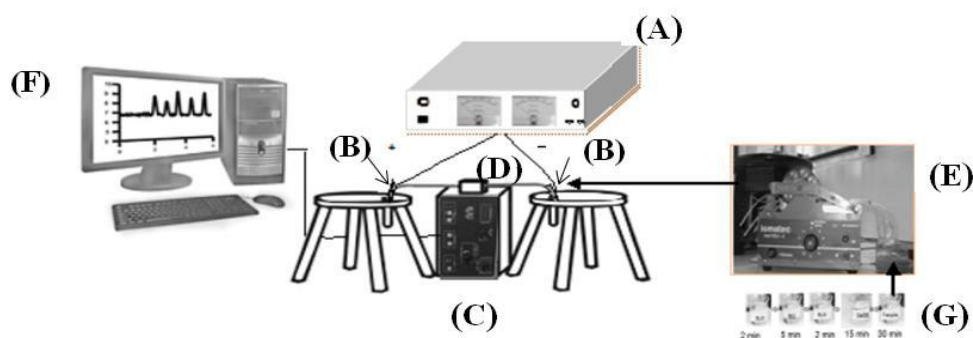


Figura 2. Esquema utilizado para a montagem do equipamento: A- fonte de alta tensão; B- eletrodos de platina; C- detector UV; D- capilar de sílica fundida; E- bomba peristáltica; F- sistema de aquisição de dados; G- soluções utilizadas para o pré-condicionamento do capilar.

2.2 Procedimento para determinar rutina em maçã

Foram empregados os seguintes procedimentos para a determinação da rutina em maçã:

1. Lavar as amostras com água da torneira e água destilada;
2. Pesar aproximadamente 150,00g da amostra de maçã;
3. Adicionar 50,00mL de metanol à maçã;
4. Macerar até obter casca sem coloração;

5. Filtrar diretamente em papel de filtro quantitativo;
6. Medir o volume recuperado e pesar;
7. Preparar as soluções para análise:
 - 1,00mL do extrato obtido da maçã diluído em 5,00mL de metanol.
 - 1,00mL do extrato obtido da maçã, $2,62 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de rutina diluído em 5,00mL de metanol.
8. As amostras preparadas foram analisadas.

Depois de extraído o suco da maçã pelos alunos, procedeu-se a sua análise empregando sistema eletroforético.

As soluções contendo $1,31 \times 10^{-5}$; $2,62 \times 10^{-5}$; $7,86 \times 10^{-5}$; $1,31 \times 10^{-4}$ e $2,62 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina foram utilizadas para obter a curva analítica de calibração.

2.3 Questionário

Ao final do curso os alunos responderam a um questionário contendo questões sobre eletroforese capilar de zona. A partir das respostas, avaliou-se o quanto os alunos compreenderam sobre a mobilidade de íons em solução e, principalmente, sobre os aspectos que podem alterar sua mobilidade. O questionário continha sete questões, sendo uma para o aluno dar sua opinião quanto à disciplina. As questões abordavam uma avaliação sobre a compreensão de íons em solução, a razão carga/tamanho do íon, influência do campo elétrico na migração das espécies, e a influência do tamanho do capilar sobre o tempo de migração.

As questões formuladas foram: (1) Em sua concepção, como os íons comportam-se em uma solução aquosa? (2) A rutina tem massa molar $664,27 \text{ g mol}^{-1}$ e a quercetina $302,20 \text{ g mol}^{-1}$, considerando isso, qual composto migrará primeiro pela coluna eletroforética? (3) A separação de dois compostos, quercetina e rutina, fora suficiente para a compreensão dos fenômenos (diferença entre razão carga/massa) envolvidos em eletroforese? (4) O tempo de migração de uma espécie é diretamente proporcional ao campo elétrico envolvido (V cm^{-1}). O estudo utilizado para mostrar o efeito do campo elétrico foi suficiente para você entender a importância da corrente aplicada nos experimentos? (5) A migração da espécie iônica só ocorre na presença da corrente elétrica? Justifique sua resposta. (6) Ao compararmos duas colunas capilares, uma com 50cm e outra com 80cm, o tempo de migração de um dado composto será o mesmo nas duas colunas? Justifique. (7) Quer dar alguma sugestão? (Parecer do aluno).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, os alunos receberam uma aula teórica para aprender sobre os conceitos envolvidos em eletroforese capilar. Também foram sintonizados com a química analítica instrumental, e a relevância da validação através da otimização do processo. Isso, de fato, colaborou significativamente para a compreensão dos aspectos teóricos envolvidos.

O processo de detecção das espécies *on column* implica em ter-se o detector e janela do capilar alinhado entre si. Aprender a fazer uma janela de detecção para a transmissão da radiação UV é importante para conectá-la ao sistema, como pode ser mostrado na Figura 1D.

As etapas de condicionamento do capilar leva a compreensão dos alunos quanto à dissociação dos grupos silanóis e as cargas existentes na superfície interna do capilar, fazendo com que possa ocorrer a separação de diferentes espécies de acordo com mobilidade existente de cada uma, e mostrar também que a separação ocorre dentro do capilar através da solução tampão.

3.1 Modos e influência do tempo de injeção sob a separação da rutina

Foram necessárias duas aulas práticas e uma teórica para fazer estes estudos. Para inserir amostra no capilar, os alunos fizeram testes empregando dois modos de injeções, o hidrodinâmico e o eletrocínético.

Nesta aula, o aluno precisou treinar a movimentação do capilar para proceder a injeção. Como a etapa de injeção fora realizada de modo manual, a precisão das medidas (repetibilidade) poderia ser comprometida sem a adequada habilidade para proceder a injeção. Também tiveram que aprender a não injetar ar durante o procedimento para garantir condições analíticas.

A injeção eletrocínética fora obtida quando um dos eletrodos era submerso em solução de amostra e o outro ficara imerso em solução tampão. A fonte ficara ligada durante 15 e 30s mantendo-se a voltagem em 10kV. Os eletroferogramas podem ser vistos na Figura 3.

A partir dos experimentos, utilizando solução de rotina, percebeu-se que o modo de injeção hidrodinâmico mostra os melhores resultados. A partir dos eletroferogramas, melhor perfil de pico fora obtido quando os alunos empregaram 15s a uma altura de 4,50cm, o que pode ser visto na Figura 3.1.

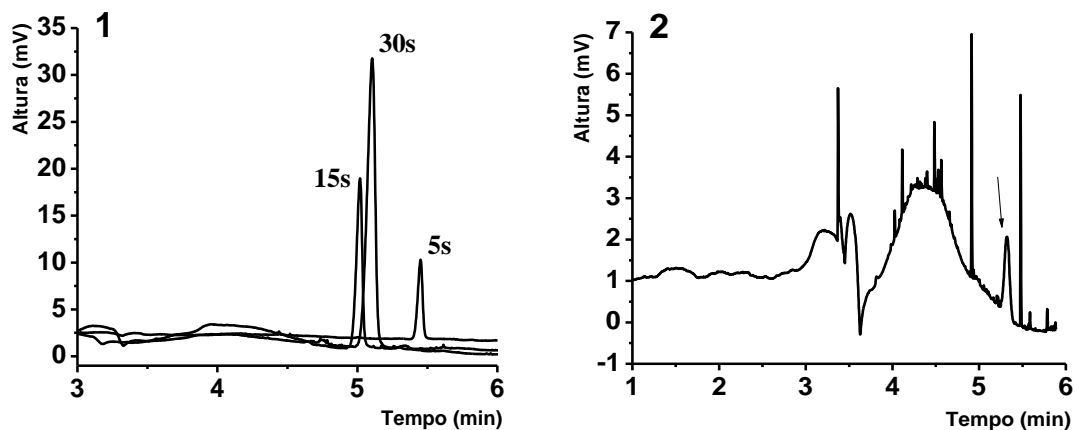


Figura 3: Eletroferogramas obtidos para a análise de rotina em diferentes modos e tempos de injeção: 1- Modo de injeção hidrodinâmica por 5, 7 e 10s. 2- Modo de injeção eletrocínética, por 15s.

Os alunos observaram que o tempo de injeção influencia tanto o perfil do pico quanto o sinal de corrente, pois aumentando-se o tempo de injeção aumenta-se o volume do analito dentro do capilar, o que prejudica o campo elétrico e altera o perfil do pico.

3.2 Influência da voltagem e da corrente elétrica

Nesta aula, os alunos puderam identificar se a Lei de Ohm é respeitada ou não, através dos dados obtidos para a construção do gráfico sobre voltagem *versus* corrente elétrica. Esse gráfico é conhecido como gráfico da lei de Ohm, pois é através dele que os alunos podem visualizar a linearidade da curva. Mas existe um limite para que isso ocorra, pois a linearidade da curva deve ser respeitada, ou seja, se essa linearidade não mais existir, pode ocorrer o aquecimento da solução no interior do capilar, o efeito Joule, prejudicando a análise, além de possibilitar que os mesmos tenham entendimento sobre preparo de soluções tampão contendo concentrações variadas.

3.3 Influência da voltagem sobre o tempo de migração

A variação da voltagem permitiu entender que os íons migram com diferentes velocidades, uma vez que o tempo de migração também variou. A Figura 4 mostra que a velocidade de migração de íons também depende do campo elétrico aplicado, sendo assim, ao aumentar a voltagem, diminuiu-se o tempo de migração das espécies.

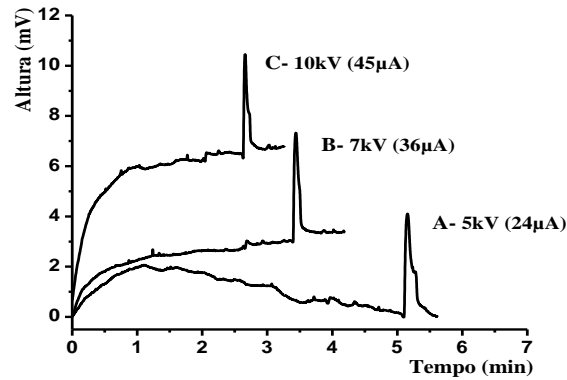


Figura 4: Eletroferogramas obtidos para a análise de rutina variando a voltagem. A- 5kV; B- 7kV e C- 10kV.

3.4 Estudos sobre a concentração e pH da solução de separação, e adição do inversor de fluxo à solução de separação

Em química, concentração e pH são parâmetros que devem ser controlados para que reações químicas possam ocorrer. Sabendo disso, os alunos prepararam soluções contendo 30, 40, 50 e 100mmol L⁻¹ de ácido bórico mantendo-se o pH em 9,00. Os resultados indicaram que a concentração de 50mmol L⁻¹ devia ser mantida. O pH da solução tampão é de grande importância e é um dos fatores predominantes no comportamento dos íons. Para seu estudo, foram feitas soluções de 50mmol L⁻¹ de ácido bórico e variou-se o seu pH em 8,00, 9,00 e 9,50. Para avaliá-los, injetara-se solução contendo 2,4x10⁻⁴mol L⁻¹ de rutina. As características tais como perfil de pico e tempo de migração foram efetivamente avaliadas neste estudo.

Foram obtidos três eletroferogramas que estão mostrados na Figura 5. Pode-se observar que o eletroferograma obtido a partir da análise de rutina empregando solução tampão pH 8,00 apresenta o menor tempo de migração da espécie, aproximadamente 5 minutos, entre todas as soluções avaliadas. O eletroferograma obtido a partir da análise empregando solução tampão pH 9,50 mostra que a rutina migra com tempo de aproximadamente 7 minutos. O tempo de migração é dependente do pH da solução, uma vez que, o aumento do pH promover a dissociação de espécie. Considerando tempo de migração e perfil de pico, manteve-se o pH da solução em 9,00

Deste modo, a solução contendo 50mmol L⁻¹ e pH 9,00 mostrou melhor área e altura e boa resolução dos picos.

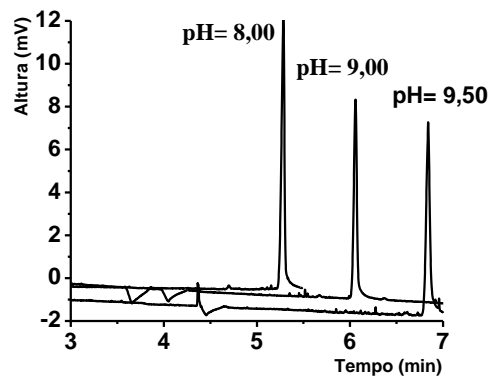


Figura 5: Eletroferogramas obtidos para a análise de rutina. Solução de separação 50mmol L⁻¹ de ácido bórico, variando o pH em 8,50; 9,00 e 9,50.

3.5 Separação da Rutina e Quercetina por eletroforese capilar de zona

A Figura 6 mostra os eletroferogramas obtidos a partir das análises das soluções individuais de flavonóides e também de soluções mistas. Também mostram os picos referentes às duas espécies, podendo-se verificar o tempo de migração, e por sua vez, a importância da razão carga/tamanho de cada espécie. O tempo de migração da Quercetina é maior que o tempo de migração da Rutina.

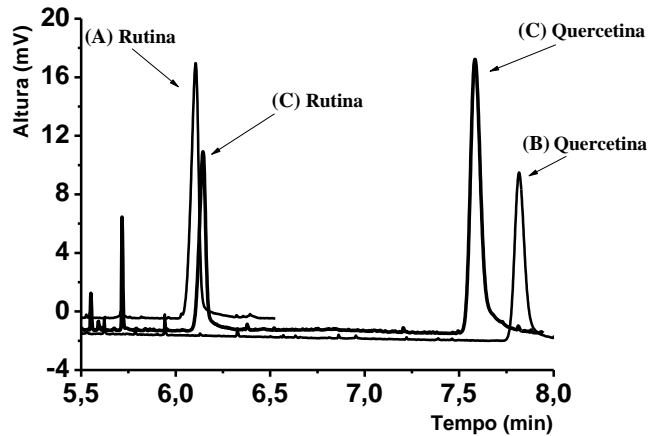
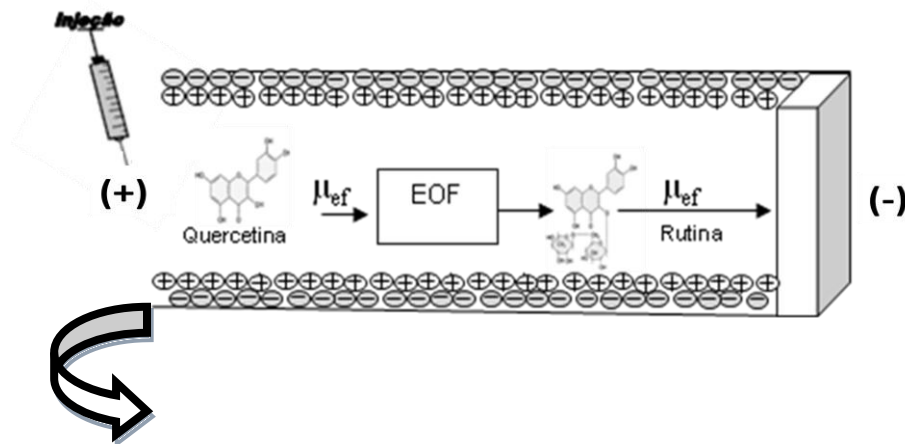


Figura 6: Eletroferogramas obtidos através das análises de soluções: A- rutina; B- Quercetina; C-Mista: Rutina e Quercetina.

Uma representação do comportamento das espécies analisadas para a injeção dos compostos no polo positivo da fonte é mostrado na Figura 7. Percebe-se que a rutina migrará primeiro que a quercetina, e isso ocorre devido à razão carga/tamanho dos analitos. Nesse sentido do fluxo eletrosmótico considerado normal, a quercetina tem mais dificuldade em relação à rutina de ser arrastada pelo fluxo eletrosmótico, pois a quercetina, por sua vez, possui menor tamanho, logo, sua tendência após se dissociar na presença da solução eletrolítica, adquirindo carga negativa, é de se atrair mais fortemente pelo polo positivo. A rutina também sofre dissociação, mas por ser uma molécula maior, o fluxo eletrosmótico consegue arrastá-la mais facilmente e impede que a molécula migre em direção ao polo positivo. Devido à existência do fluxo eletrosmótico todos irão migrar em um mesmo sentido, mas cada composto migrará com diferentes tempos, o que neste aspecto, melhora bastante o entendimento da relação da carga da espécie.



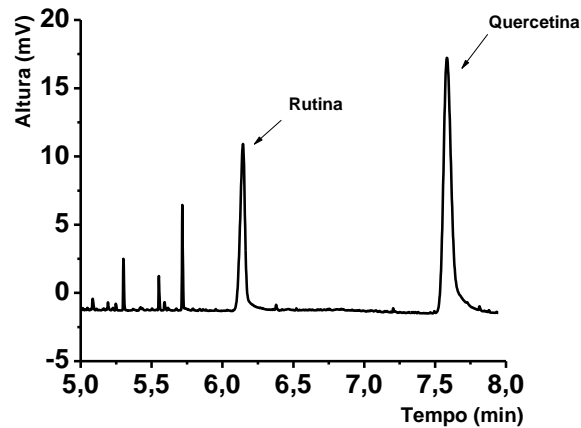


Figura 7: Representação esquemática da mobilidade eletroforética da rutina e quercetina em modo normal fluxo eletroosmótico. Abaixo: eletroferograma obtido a partir da solução contendo rutina e quercetina mantendo-se o modo normal do fluxo eletroosmótico.

Se o fluxo eletroosmótico fosse invertido, facilitando a análise de ânions, o tempo de migração das espécies seria diferente. De acordo com a Figura 8, a ordem de migração é alterada, facilitando a análise das espécies com menor tamanho, que neste caso, a prioridade de migração será da espécie que tem maior mobilidade em um campo elétrico que é a quercetina. Essa relação faz com que os alunos melhor compreendam a razão do tamanho e carga das espécies.

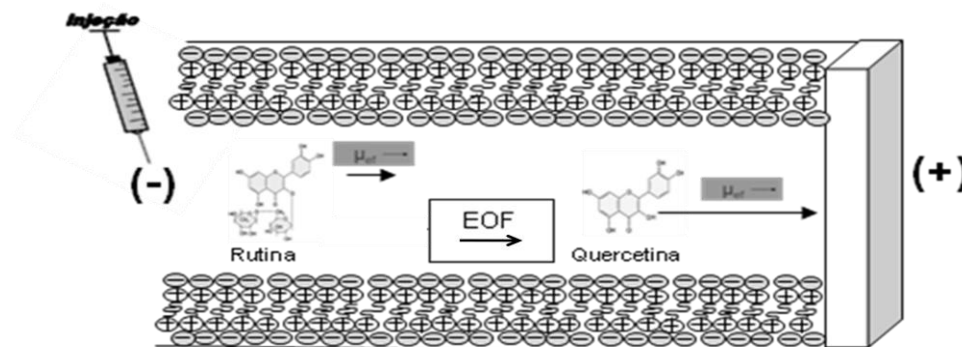


Figura 8: Representação esquemática da mobilidade eletroforética da rutina e quercetina em modo invertido de fluxo eletroosmótico

3.6 Como obter curva analítica de calibração e usá-la para quantificação?

Métodos quantitativos são importantes para determinação de compostos orgânicos ou inorgânicos em amostras diversas. Compreender todas as etapas demanda um pouco de tempo, mas são obtidos resultados positivos.

Primeiro, discutiu-se o preparo das soluções necessárias para obter curva analítica. Concluiu-se que soluções $1,31 \times 10^{-5}$; $2,62 \times 10^{-5}$; $7,86 \times 10^{-5}$; $1,31 \times 10^{-4}$ e $2,62 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina seriam adequadas para este propósito. Essas soluções foram injetadas em triplicata para que se pudesse calcular desvio padrão relativo em função de tempo de migração e altura de sinal.

O estudo de amostras reais, neste caso a maçã, visa contribuir para melhor interpretação das mobilidades dos íons de cada espécie, e relacioná-la com o que já tinham visto. Daí pôde-se verificar que o tempo de migração da rutina é o mesmo, havendo poucas alterações devido ao sistema ser manual. Entenderam também a importância de utilizar o método de adição de padrão

para a identificação das espécies. A Figura 9 mostra os dois eletroferogramas obtidos a partir do estudo para identificar rutina.

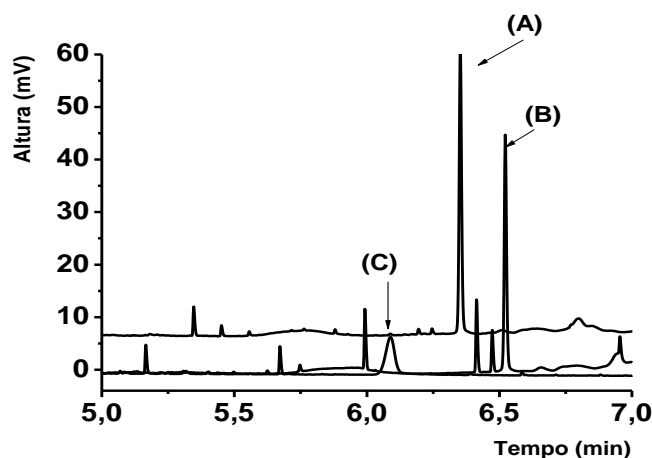


Figura 9. Eletroferogramas obtidos para a separação das seguintes espécies: A- $2,62 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina; B- 1,00mL do extrato obtido da maçã diluído em 5,00mL de metanol; C- 1,00mL do extrato obtido da maçã + $2,62 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina diluído em 5,00mL de metanol.

4. RESPOSTAS DADAS AO QUESTIONÁRIO

O questionário fora aplicado aos treze alunos do curso, a fim de obter informações quanto a seu aprendizado no decorrer na disciplina sobre a ECZ.

De acordo com as respostas dos alunos, 16% responderam que os íons presentes em soluções encontram-se livres em solução, dissociados e possuindo cargas elétricas, 8% responderam que estão em constante movimento gerado pelas interações iônicas das espécies envolvidas (soluto-soluto) (soluto-solvente), 24% responderam que estão livres em solução, 24% responderam que possuem cargas e se atraem ou separam para a formação de um novo composto. Os outros 24% responderam respostas mais aleatórias.

A segunda questão perguntava a ordem de migração das espécies estudadas (rutina e quercetina) em uma coluna eletroforética, e mostrava os dados de massa molar dos compostos. Diante as respostas, 16% responderam que a rutina migra primeiro, mas não justificaram. 84% mostraram que a quercetina migra primeiro, devido à massa molar ser inferior a da rutina, logo sua mobilidade será maior. Desses 84% somente um especificou a razão carga/tamanho do analito, mas mesmo assim não especificou a carga do composto. De acordo com as respostas, deve-se levar em conta o comportamento dos compostos na presença de um fluxo eletrosmótico normal e invertido (Figuras 7 e 8). Uma vez que ambas as espécies possuem cargas negativas, os alunos tiveram suas considerações e explicações aceitáveis dentro do fenômeno ocorrido para o fluxo eletrosmótico invertido, pois o questionário não argumentou quanto ao fluxo eletrosmótico. Logo, as respostas obtidas mostraram-se satisfatórias, mas percebeu-se que esse tipo de análise (razão carga/tamanho) do analito deve ser mais cuidadosamente abordado durante as aulas.

A terceira questão tinha pretensão em avaliar se a separação de dois flavonóides fora suficiente para a compreensão de alguns fenômenos entre a diferença da razão carga/massa. 92% responderam que fora suficiente, e destacaram que a observação do tempo de migração das espécies serem diferentes devido ao tamanho da molécula. Somente 8% responderam que não fora suficiente.

A quarta pergunta priorizava se os alunos estavam satisfeitos com estudo utilizado para mostrar o efeito do campo elétrico para compreender a importância da corrente aplicada aos experimentos já que o tempo de migração de uma espécie é diretamente proporcional ao campo elétrico envolvido ($\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$). 92% responderam estar satisfeitos e justificaram que este afetará no tempo de migração das espécies e acarretará na mobilidade dos íons e no Efeito Joule. Já 8% responderam estar insatisfeitos.

A migração das espécies iônicas na presença da corrente elétrica também fora discutida no questionário. A quinta questão, fez com que os alunos discutissem se a migração de uma espécie iônica só iria ocorrer na presença da corrente elétrica. 54% responderam que a corrente elétrica é o responsável pela diferenciação das substâncias, 15% disseram que a partir da fonte de alta tensão que os íons iriam se dissociar sendo responsável também pelas interações das cargas. 31% mostraram as melhores respostas, onde justificaram que a corrente elétrica só acarretaria numa maior mobilidade dos íons, migrando assim com um tempo menor.

Quando questionados sobre a análise empregando colunas de 50 e 80cm, 69% responderam que o capilar de 50cm possui um percurso menor, pois o comprimento do capilar afeta no tempo de migração. Sendo o capilar de 80cm, maior é o tempo de migração. 23% escreveram que o tamanho não irá influenciar no tempo de migração. 8% mencionaram que o capilar com espessura menor a migração seria mais lenta.

A pretensão da última questão era que os alunos dessem seu parecer sobre as aulas e também sugestões sobre a importância da eletroforese no curso de graduação em química. 8% mostraram a importância da EC no curso de química, e que o conteúdo envolve muitos conceitos químicos. 8% responderam que é possível entender o processo da eletroforese, mas este deve ser mais claro para os alunos conseguirem enxergar o processo por um todo. 8% mencionaram que deveria haver mais aula para que houvesse melhorias no aprendizado. 8% mostraram a importância da eletroforese capilar e que as mesmas poderiam ser utilizadas para a análise de várias outras substâncias, e que esta abre portas para muitos estudos tanto em pesquisa quanto na área de ensino. 61% não deram parecer.

5. CONCLUSÃO

De acordo com as aulas ofertadas, a disciplina atingiu suas metas, a sua introdução no curso de graduação em química foi viável e pertinente. Partindo do pressuposto de que o conceito envolvido sobre a mobilidade dos íons não seja muito claro para diversos alunos, percebeu-se que a metodologia proposta caracterizou uma investigação do estudo de mobilidade iônica, já que este é um fator de suma importância, visando melhor compreensão para o entendimento do que seja uma solução. Sendo assim, foram escolhidas duas espécies, rutina e quercetina, para a separação por ECZ, a qual mostrou-se eficiente para entender o comportamento dos íons em solução caracterizando a importância da razão carga/tamanho das espécies, tornando nítido que os procedimentos adotados para as aulas foram eficientes e suficientes para o entendimento de vários conceitos que estão associados à eletroforese capilar.

A introdução das aulas práticas adotadas para as aulas relacionadas à ECZ garantiu melhorias no entendimento da teoria e contribuiu para o aperfeiçoamento da prática laboratorial, possibilitando que os alunos pudessem preparar soluções analíticas com concentrações conhecidas. Os alunos também puderam empregar softwares para a análise dos resultados e compreender sobre o coeficiente de correlação, além de determinar o teor de rutina presente em amostra real. A utilização da amostra faz com que o aluno possa avaliar o comportamento da espécie em solução avaliando assim o tempo de migração da espécie padrão e comparando-a com a amostra, bem como sua concentração.

O auxílio dos seminários permitiu que os alunos interagissem para sanar dúvidas sobre a técnica. No entanto, ficou claro a dificuldade em tratar os textos em inglês e, também levou-os a compreender a técnica para determinar diferentes espécies em diferentes matrizes. Além, de discutir a importância da minimização dos efluentes gerados que contribuem para a química verde.

Ainda, através dos seminários pode-se observar que os alunos tornaram-se mais familiarizados com a técnica, pois vários modos de separação e diferentes problemas foram discutidos durante as aulas. O seminário levou-os a compreender a utilização da técnica aplicada para determinação de diferentes espécies em diferentes matrizes.

6. AGRADECIMENTOS

A UFS, CNPq e FAPITEC. Trabalho de conclusão de curso desenvolvido para obtenção do título de Licenciada em Química.

-
1. Tavares MFM, Eletroforese Capilar: conceitos básicos. *Quím. Nova* 1996; 19(2): 173-181.
 2. Coeficiente de solubilidade. In: Wikipedia: a enciclopédia livre [online]. [acesso em: 2012 nov. 27] Disponível em: http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Sodium_chloride&oldid=519833892
 3. Carmo MP, Marcondes MER. Abordando soluções em sala de aula – uma experiência de ensino a partir das idéias dos alunos. *Quím. Nova na Escola*. 2008 maio; 28: 37-41.
 4. Wartha EJ, Reis MS, Silveira MF, Filho NJG, Jesus RMA, Maresia no ensino de química, *Quím. Nova na Escola* 2007 nov; 26: 17-20.
 5. Harris DC, *Análise Química Quantitativa*. 6ª Ed, Rio de Janeiro, LTC 2005.
 6. Gervasio APG, Lavorante AF, Moraes MCB, Guiné MF, Miranda CES, Carrilho E. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especiação, *Quím. Nova* 2003; 26: 65-74.
 7. Sánchez JM, Salvadó V. Capillary electrophoresis of water-soluble vitamins: Na undergraduate experimente, *Chem. Educator* 2002; 7: 23-26.
 8. 14.07. Colombara R, Tavares MFM, Massaro S, Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações, *Quím. Nova* 1997; 20 (5): 512-518.
 9. 16.08. Atkins P, Paula J. *Físico- Química*, 8ª ed (2), Rio de Janeiro, LTC 2008.
 10. Tavares MFM, Jager AV. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: Fundamentos e aplicações. *Quím. Nova* 2001; 24: 363-373.