

UM APARATO PARA MONITORAR REAÇÕES RÁPIDAS: UM “STOPPED-FLOW” ARTESANAL DE BAIXO CUSTO

Vagner Roberto Batistela, André Luiz Tessaro, Rafael R. da S. Soares, Vagner Roberto de Souza e Noboru Hioka*
Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá - PR

Recebido em 24/5/05; aceito em 5/10/05; publicado na web em 31/3/06

A SIMPLE APPARATUS TO FOLLOW RAPID REACTIONS: A LOW-COST STOPPED-FLOW. The modern stopped-flow reaction analyzer has shown high efficiency and flexibility, which provides outstanding sample economy with a dead-time of less than 1 ms. However the cost of the equipment imposes a serious restriction to many Brazilian scientists and teachers. In this work we describe the construction of a low-cost stopped-flow system coupled to a UV-Vis spectrophotometer. The performance of the system was checked by monitoring the kinetics of two reactions: the fading of phenolphthalein in aqueous alkaline solution and the chlorophyll a demetallation in acid medium. The apparatus showed reasonable efficiency with a dead-time of 0.3 to 0.5 s. The very good results obtained in these two illustrative processes show that the system is satisfactory for determining rate constants with mean reaction times ranging from seconds to minutes.

Keywords: stopped-flow; kinetics; fast reactions.

INTRODUÇÃO

A técnica de mistura rápida com fluxo interrompido usada no monitoramento de reações velozes em solução líquida, conhecida por “stopped-flow”, é bem estabelecida e são encontrados no mercado aparelhos comerciais para esta finalidade. Tradicionalmente, um “stopped-flow” é composto por seringas contendo os reagentes e um sistema injetor, no qual um acessório pneumático (ar comprimido) impulsiona os êmbolos das seringas, promovendo uma adição rápida de reagentes para o interior do misturador. Na seqüência, a mistura de reagentes é imediatamente levada à câmara do detector, na qual está conectada uma seringa frenadora (seringa posicionada em sentido oposto, ou seja, em contra-fluxo às seringas de reagentes). Quando os reagentes são injetados, a mistura preenche a seringa frenadora deslocando o êmbolo que, por sua vez, ativa a detecção (“trigger”). Na constituição do detector, antigamente, era comum ter-se um osciloscópio, devido à boa resolução temporal. Parte considerável da eficiência do equipamento é mensurada pelo tempo morto, que engloba majoritariamente o tempo de mistura. Apesar do método de fluxo contínuo poder ser utilizado em reações ligeiramente mais rápidas (escala de tempo de 10^{-4} s) que o de fluxo interrompido (escala de 10^{-3} s), este último consome menor quantidade de reagentes¹.

No Brasil, os equipamentos da Applied Photophysics Limited, sede na Grã-Bretanha, são os mais utilizados. O aparelho mais recente deste fabricante é o SX 18MV-R, o qual vem acoplado a um espectrofotômetro com tempo morto² de 0,5 a 1 ms. Existem também os da Bio-Logic Science Instruments, companhia francesa³, equipamentos com tempo de mistura de 1,5 ms e, quando estes são confeccionados com sistemas de cubetas e seringas especiais, o tempo cai para 0,25 ms. Deste modo, podem-se monitorar reações da ordem de mili segundos. Observe que neste trabalho não iremos questionar as informações fornecidas pelos fabricantes.

Apesar da alta eficiência dos equipamentos comerciais, existem duas restrições que dificultam sua aquisição: a importação e, principalmente, o custo elevado. Um aparelho muito interessante foi de-

envolvido por Tubino e colaboradores^{4,5} seguindo a constituição tradicional de um “stopped-flow”. No caso, o sistema era constituído com um espectrofotômetro de absorção UV-Vis desenvolvido pelos autores. O tempo morto desse equipamento (7 ms) indica que o aparelho é eficiente. Apesar de seu custo muito menor que os aparelhos comerciais, nem sempre é possível dispor dos acessórios utilizados e a questão financeira ainda deve ser considerada.

Assim, neste trabalho descreve-se um sistema bastante simplificado de mistura rápida de eficiência “apenas razoável”, mas com custos muito reduzidos e que pode auxiliar pequenos grupos de pesquisas que atuam na área, ou a aqueles professores que desejam introduzir a técnica em cursos de graduação ou de pós-graduação nas disciplinas de cinética. Este sistema pode ser acoplado a diversos equipamentos, tais como espectrofotômetros, condutivímetros, pHmetros e fluorímetros, dentre outros. No nosso caso, o sistema foi acoplado a um espectrofotômetro de absorção UV-Vis. Além da descrição do equipamento, determinou-se a constante de velocidade de duas reações para fins de ilustração. Os dois processos escolhidos foram o descoloramento da fenolftaleína⁶ e a desmetilação da clorofila *a*^{7,8}.

PARTE EXPERIMENTAL

Sistema de mistura rápida com fluxo interrompido

O sistema de mistura rápida, mostrado na Figura 1, contém dois componentes básicos: injetor e misturador.

O injetor, conjunto que sustenta as seringas para reagentes e permite acionar seus êmbolos, é construído de tecnil na parte que permanece em contato com as seringas - suporte - e está preso a uma base metálica pesada para estabilização do mesmo (ao invés de tecnil, pode-se utilizar teflon ou madeira).

O suporte é moldado para comportar duas seringas iguais firmemente fixadas para reagentes, as quais estão dispostas em ângulo, com inclinação leve, a fim de não ocorrer fluxo espontâneo indesejável de reagentes por ação gravitacional. Os êmbolos das seringas são simultaneamente acionados através de uma trave presa a um eixo central móvel. Esta trave é chamada de trave móvel e o movimento do conjunto (trave e eixo móveis) é que permite aci-

*e-mail: nhioka@uem.br

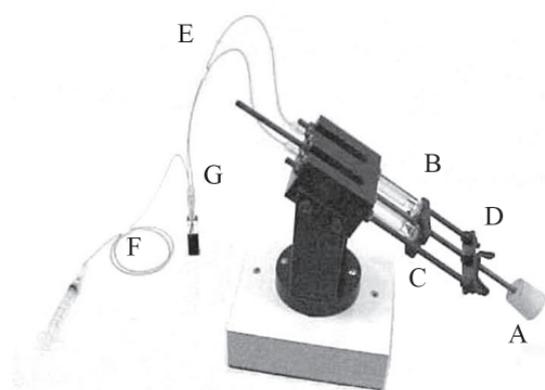


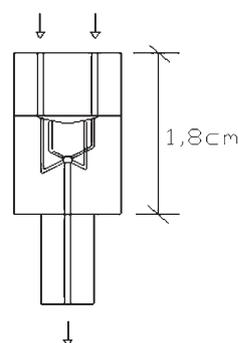
Figura 1. Sistema de mistura rápida com fluxo interrompido: (A) eixo central móvel, com rolha na extremidade para apoio; (B) trave móvel presa ao eixo central; (C) guias fixas (nas laterais); (D) trave fixa presa às guias fixas (a trave tem porcas dos dois lados no eixo central, sendo uma delas borboleta); (E) mangueiras de condução para reagentes; (F) mangueira de saída e (G) misturador

onar os êmbolos. Este eixo central, longo e com rosca, transpassa o suporte de tecnil. Nas laterais, têm-se duas guias fixas firmemente soldadas ao suporte, mantendo nas extremidades uma segunda trave. Esta é a chamada trave fixa, que possui um orifício central por onde o eixo central móvel desliza livremente. A posição do eixo central móvel (isto é, o grau de movimento deste eixo) em relação à trave fixa, é dada por duas porcas no eixo, mantidas de cada lado da trave; recomendamos que uma das porcas seja do tipo borboleta, uma vez que é manuseada com frequência (Figura 1). Como citado anteriormente, a magnitude do deslocamento do eixo central móvel é dada pela posição das porcas, sendo que se tem o acionamento dos êmbolos com controle dos volumes de reagentes que entram no misturador. Salienta-se que a distância/segmento de deslocamento dos dois êmbolos, a cada acionamento, é igual e introduz volumes idênticos de reagentes (seringas iguais).

Na extremidade do eixo central móvel é colocada uma rolha de apoio para impulsão manual, ou seja, para efetuar as injeções. Uma vez preenchidas as seringas com os líquidos reagentes, efetua-se a conexão destas com o misturador via mangueiras de condução (de poliestireno), formando os canais aqui denominados de A e B.

O misturador é uma peça cilíndrica pequena construída com pequenos blocos de acrílico colados formando pequenas canaletas e câmaras de mistura no seu interior. Possui dois canais de entrada dos reagentes (A e B) e um de saída (mistura já realizada). O Esquema 1 ilustra o misturador com as duas canaletas de entrada direcionadas a uma primeira câmara (pré-misturador) e, a partir desta, quatro canaletas que transportam a pré-mistura para a extremidade inferior. Em uma segunda câmara, tem-se o líquido das quatro canaletas sofrendo choque frontal 2 a 2. Neste momento, a mistura é completada e o líquido é direcionado à saída. Esta saída do misturador é conectada diretamente a uma cubeta de fluxo (de quartzo, própria para espectrofotometria de absorção UV-Vis com caminho óptico de 1,00 cm) por uma mangueira curta. Por último, a saída da cubeta é conectada, por mangueira, a uma seringa que ajuda no manuseio das soluções; esta não é usada como seringa frenadora para acionamento do sistema de detecção, como é o caso nos aparelhos convencionais. Note que, devido à cola (cola de silicone e cola de secagem rápida) empregada em diversas partes do sistema, não se deve trabalhar com solventes orgânicos puros.

As características aproximadas do sistema são: volume na cubeta de 0,5 mL, as duas seringas farmacêuticas de 5 mL e volume resi-



Esquema 1. Ilustração do misturador

dual em cada canal (mangueira) de 0,5 mL. Uma vez preenchidas as seringas com as soluções reagentes, o sistema permite efetuar, além de uma injeção inicial de volume mínimo de 1,5 mL para retirada de líquido residual (incluindo bolhas de ar), mais 7 ou 8 corridas cinéticas individuais com gasto aproximado de 0,5 mL de cada reagente. As duas seringas levam à injeção de volumes iguais (1:1), ficando as soluções iniciais de reagentes diluídas nesta proporção.

Como o equipamento não possui controle de temperatura, a sala foi ambientada a 30 °C. Com os reagentes preparados e cubeta termostaticada a 30 °C (banho de circulação de água termostaticada), feita a injeção, a reação era monitorada através do espectrofotômetro UV-Vis Varian modelo Cary 50 com fonte de lâmpada de xenônio - varredura rápida. Para cada reação investigada foram feitas mais de 20 corridas cinéticas.

Procedimento de utilização do sistema de “stopped-flow”

Apresenta-se a seguir um procedimento geral para uso do “stopped-flow”. Entretanto, este pode ser adaptado de acordo com a conveniência do operador.

Inicialmente, as seringas são colocadas no suporte de tecnil do sistema injetor. Regula-se a distância da trave móvel com os êmbolos das seringas recuados ao máximo. A trave fixa deve ser presa pelas porcas, limitando o espaço disponível aos êmbolos (evitando seu desprendimento das seringas).

Para efetuar a linha base, imergem-se as mangueiras de condução em um béquer contendo a solução de referência. Esta é introduzida na cubeta por sucção pela mangueira de saída (através da seringa).

É importante ressaltar que na introdução de soluções nas seringas é comum o surgimento de bolhas de ar, as quais devem ser obrigatoriamente retiradas. Para isso, inclina-se o aparato com as seringas na vertical e impulsiona-se levemente o eixo central móvel através da rolha de apoio. Em seguida, a trave móvel é fixada.

Com o aparato injetor próximo ao espectrofotômetro, conectam-se as mangueiras de entrada às seringas (com os reagentes A e B). Para eliminar bolhas de dentro da cubeta, efetua-se uma injeção prévia, reposicionando-se a porca borboleta a cerca de 0,5 cm da trave fixa, seguida por impulsão manual na rolha (Figura 1). Uma vez eliminadas as bolhas, fixa-se novamente a trave móvel com a outra porca. A nova injeção é feita reposicionando a porca borboleta a 0,5 cm da trave fixa e com o espectrofotômetro ativo no modo cinético. Repetem-se os procedimentos sucessivamente.

Adaptação de seringas para injeção de volumes diferentes

Inicialmente as duas seringas de reagentes utilizadas eram de 5 mL. Uma modificação interessante foi manter uma dessas seringas no canal A e substituir a outra por uma de volume menor (farma-

cênticas de 3 ou 1 mL) no canal B, que pode ser fixada no injetor através de peças auxiliares de teflon adaptadas ao formato e às dimensões de cada seringa. Uma modificação maior foi a adaptação de micro-seringas de 10, 25 ou 50 μL no canal B. Neste caso, além dos adaptadores auxiliares de teflon, foi necessário utilizar na conexão da micro-seringa ao misturador mangueiras de diâmetro interno menor, apropriadas às micro-seringas. Devido a esta modificação, utilizou-se um misturador único para mangueiras finas, ficando o misturador inicial somente para as mangueiras originais. Assim, a título de exemplo, ao utilizar uma seringa de 5 mL e ao lado, uma micro-seringa de 10 μL , introduz-se a cada vez, volumes finais com mistura proporcional da ordem de 1000:1. Na Figura 2 apresentam-se as peças de teflon auxiliares (adaptadores) com as seringas alternativas.

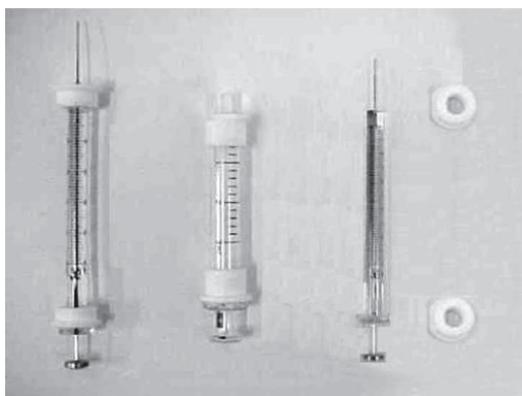


Figura 2. Seringas e micro-seringas alternativas e seus adaptadores de teflon (dianteiro e traseiro). Os adaptadores permitem fixar as seringas no sistema injetor. Na micro-seringa à direita os adaptadores estão mostrados ao lado

Reações investigadas

Descoloramento da fenolftaleína por reação com hidróxido

Preparou-se uma solução estoque de fenolftaleína ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$, Reagen, $\text{MM} = 318,33 \text{ g mol}^{-1}$) com 0,0501 g do sólido em mistura 20% etanol/água (v/v), a 100,0 mL ($C = 1,57 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Do estoque e através de diluições convenientes em água, obteve-se a solução de trabalho a $4,98 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (0,64% de etanol). A solução de hidróxido de sódio foi preparada com cerca de 8 g do sólido e 100 mL de água; esta foi padronizada com ácido oxálico diidratado⁹ ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Ecibra, $\text{MM} = 126,06 \text{ g mol}^{-1}$) $5,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, resultando em $\text{NaOH } 1,96 \text{ mol L}^{-1}$.

Com a solução de NaOH (canal A) e a solução de fenolftaleína (canal B) teve-se ao final na cubeta $[\text{NaOH}] = 0,98 \text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{fenolftaleína}] = 2,49 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A cinética foi monitorada junto ao comprimento de onda de máxima absorção da espécie colorida, 553 nm. O intervalo de leitura foi de 0,1 s.

Desmetalização da clorofila a em meio ácido

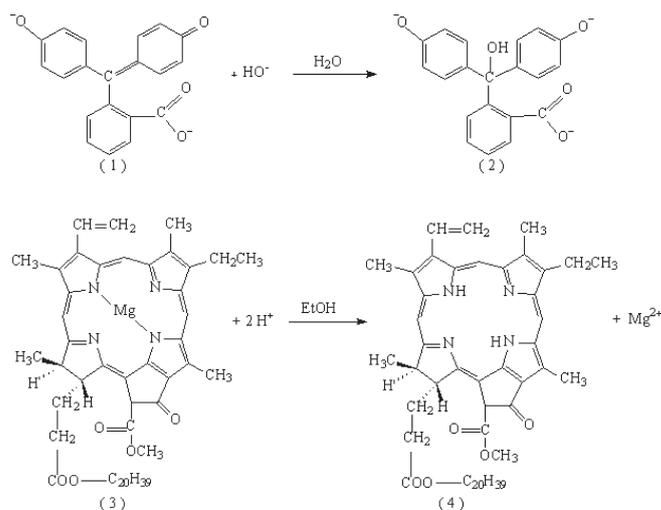
A clorofila a foi extraída a partir de folhas de espinafre e purificada através de técnicas convencionais de cromatografia⁸. A solução estoque foi preparada dissolvendo-se uma pequena quantidade do composto sólido em aproximadamente 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A padronização da solução foi feita por espectrofotometria em acetona ($\epsilon_{663 \text{ nm}} = 92.600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) resultando em $5,12 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A partir de diluição da solução estoque, preparou-se 25,0 mL de uma solução de clorofila a ($C = 1,28 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em etanol (Nuclear, P.A.). Paralelamente, a partir de 6,4 mL de uma solução aquosa de $\text{HCl } 0,20 \text{ mol L}^{-1}$, preparou-se 100,0 mL de uma solução de ácido clorídrico ($C = 1,28 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em etanol.

Com as soluções de ácido clorídrico (canal A) e de clorofila a (canal B) obteve-se ao final, na cubeta, as concentrações de $6,4 \times 10^{-6}$ e $6,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para a clorofila a e o ácido clorídrico, respectivamente, sendo o solvente constituído de 3,2% de água em etanol (v/v). A cinética foi monitorada junto a 665 nm e o intervalo de leitura foi de 2,4 s.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as cinéticas monitoradas, o tempo de mistura no aparato foi menor ou igual a 0,5 s. Dependendo da necessidade esse tempo pode ser diminuído em até 0,3 s, através do aumento da força/velocidade de impulsão aplicada ao eixo central móvel (via rolha). Para redução de custos, faz-se a impulsão manual, porém o sistema pneumático pode ser adaptado. Quanto ao uso da seringa frenadora, esta é desnecessária, uma vez que basta deixar o espectrofotômetro previamente ativado no modo temporal (cinético). Atualmente, têm-se espectrofotômetros que efetuam leituras em curtíssimos intervalos de tempo sem saturação das foto-celulas de detecção por uso prolongado.

As duas reações que ilustram o uso do equipamento de mistura rápida aqui apresentado têm suas estruturas mostradas no Esquema 2 para reagentes e seus produtos.



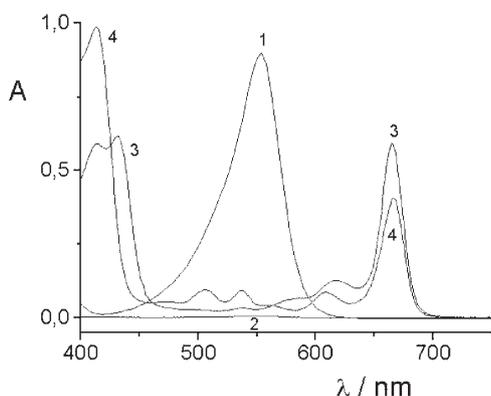


Figura 3. Espectros de absorção da: (1) fenolftaleína quinóide e (2) fenolftaleína carbinólica; (3) clorofila a e (4) feofitina a

se nova injeção, sendo que a cinética apresentou boa reprodutibilidade. Em média, a absorbância inicial foi de 0,901 (desvio padrão, DP= 0,014) atingindo o infinito em 150 s, com absorbância final de 0,019 (DP= 0,001). A alta concentração de NaOH, comparada à de fenolftaleína, impõe condições cinéticas de pseudo ordem¹. Na Figura 5 apresenta-se o gráfico resultante do tratamento dos dados como cinética de primeira ordem.

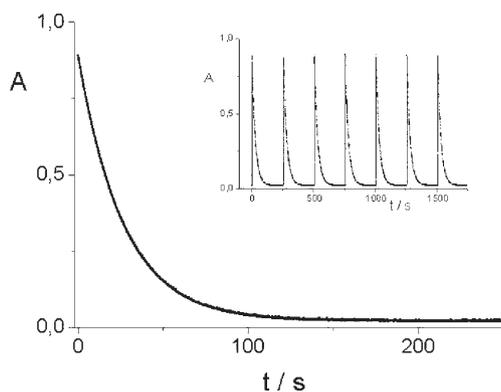


Figura 4. Cinética da reação de descoloramento da fenolftaleína em meio aquoso alcalino, a 30 °C. A inserção mostra uma seqüência de corridas

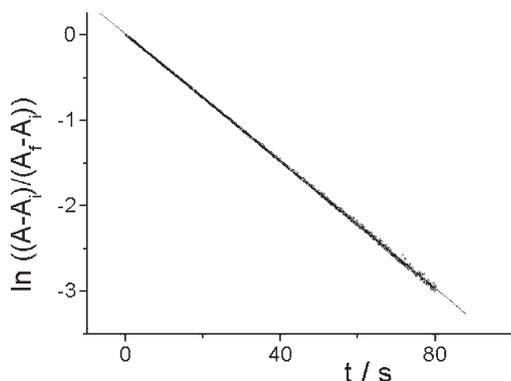


Figura 5. Ilustração do tratamento cinético de primeira ordem aplicado à reação da fenolftaleína. A: absorbância a um tempo t; A_i: absorbância inicial e A_f: absorbância final (no infinito)

Com o tratamento cinético de primeira ordem, obteve-se a constante de velocidade observada de $3,82 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (DP= $4,8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), correspondente a $t_{1/2}$ aproximado de 18 s, com um coeficiente de correlação de 0,9998. Segundo a literatura^{10,14}, trata-se de reação

cuja cinética tem ordem total dois e, sendo a $[\text{OH}^-] = 0,98 \text{ mol L}^{-1}$, a constante de velocidade de segunda ordem é $3,90 \times 10^{-2} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (30 °C). Tentativas de comparar essas constantes com a literatura foram dificultadas, por falhas nas informações ou condições experimentais diferentes, por ex., (a)¹⁰ $1,83 \times 10^{-2} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 23 °C e na presença de NaCl 0,30 mol L⁻¹, o valor de constante de velocidade menor faz sentido dada a menor temperatura e a presença do sal; (b)⁶ $2,76 \times 10^{-2} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ à temperatura ambiente sem precisar o valor desta. É de se supor que a temperatura seja menor que 30 °C, o que seria coerente com a constante maior obtida neste trabalho; (c)¹⁵ $6,24 \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ sem precisar a temperatura. O valor obtido guarda coerência com os citados, apesar das dificuldades de comparação.

Cinética da reação de desmetalização da clorofila

A reação de desmetalização da clorofila a em meio ácido etanólico completou-se em menos de 1 min. A Figura 6 ilustra a variação da absorbância (665 nm) em função do tempo para a reação. Dado o ácido clorídrico estar em excesso (1000:1) perante a clorofila a, tem-se condições cinéticas de pseudo-ordem. O tratamento cinético de primeira ordem, média de 20 corridas cinéticas, resultou em um bom ajuste com constante de velocidade observada de $1,11 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ (DP= $6,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Segundo dados da literatura¹⁶, a lei cinética total é de segunda ordem. Assim, diante da $[\text{H}^+]$ empregada neste trabalho ($6,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), o valor da constante de velocidade de segunda ordem foi de $1,73 \times 10^1 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A comparação deste valor com os da literatura é impossibilitada pelas diferentes condições reacionais empregadas nos trabalhos (e.g. diferentes solventes).

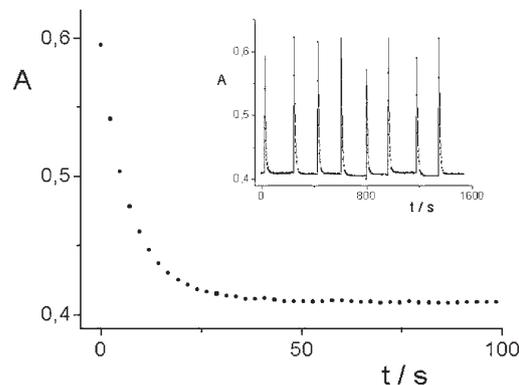


Figura 6. Cinética da reação da clorofila a em meio ácido etanólico, a 30 °C. A inserção mostra uma seqüência de corridas

No tocante às alternativas de adaptações com seringas/microseringas de volumes diferentes (embora não utilizadas nestes experimentos com fenolftaleína e clorofila), estas permitem obter um número maior de possibilidades de composição da solução final dentro da cubeta (v/v), o que permite investigar sistemas específicos, por ex., aqueles em que os reagentes necessitam serem preparados em solventes diferentes. Em geral ocorre considerável variação de temperatura ao se misturar solventes diferentes, portanto, deve-se minimizar a quantidade de um deles na solução final. Adicionalmente, nos procedimentos com reações monitoradas por espectrofotometria, é comum manter uma das soluções reagentes em cubeta (termostatizada) e, por último, adicionar pequena quantidade do outro substrato reagente (micro-seringa). A adaptação realizada permite reproduzir esses procedimentos com a vantagem de efetuar-se uma mistura rápida.

CONCLUSÃO

Nosso sistema apresenta boa reprodutibilidade de resultados como demonstrado para a reação envolvendo fenolftaleína e clorofila. O tempo de mistura, de 0,3 a 0,5 s, permite usar o sistema satisfatoriamente no monitoramento de uma vasta gama de reações. As adaptações de seringas/micro-seringas permitem efetuar interessantes modificações em relação às proporções de volumes introduzidos de reagentes. Aproximadamente a despesa com material para o sistema é de R\$ 80,00, sem considerar as seringas, micro-seringas, cubeta de fluxo e a mão-de-obra para confecção das peças. Apesar da eficiência limitada em termos de tempo de mistura, o baixo custo do equipamento desenvolvido é uma grande vantagem.

AGRADECIMENTOS

Ao físico M. H. Babata pela confecção das peças torneadas. A. L. Tessaro e R. R. S. Soares agradecem ao CNPq pelas bolsas de mestrado. À Fundação Araucária/Paraná pelo suporte financeiro na execução dos projetos do grupo.

REFERÊNCIAS

1. Espenson, J. H.; *Chemical Kinetics and Reactions Mechanism*, McGraw-Hill: New York, 1981.
2. <http://www.photophysics.com>, acessada em Março 2005.
3. <http://www.bio-logic.info/rapid-kinetics>, acessada em Abril 2005.
4. Tubino, M.; *Quim. Nova* **1985**, 8, 324.
5. Tubino, M.; Rossi, A. V.; *Quim. Nova* **1991**, 14, 109.
6. http://www.uniregensburg.de/Fakultaeten/nat_Fak_IV/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/chembox_pheno-e.htm, acessada em Março 2005.
7. Dujardin, E.; Laszlo, P.; Sacks, D.; *J. Chem. Educ.* **1975**, 52, 742.
8. Dolphin, D.; *The Porphyrins*, Academic Press Inc.: New York, 1978, part C, vol. V.
9. Morita, T.; Assumpção, R. M. V.; *Manual de Soluções, reagentes & solventes*, 2ª ed., Edgard Blücher: São Paulo, 1972.
10. Nicholson, L.; *J. Chem. Educ.* **1989**, 66, 725.
11. Hile, L.; *J. Chem. Educ.* **1991**, 68, 446.
12. Barnes, M. D.; LaMer, V. K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, 64, 2312.
13. Kober, P. A.; Marshall, T.; *J. Am. Chem. Soc.* **1911**, 33, 59.
14. <http://www.princeton.edu/~che346/labs/phenol.pdf>, acessada em Março 2005.
15. Lalanne, J. R.; *J. Chem. Educ.* **1971**, 48, 266.
16. Levanon, H.; Neta, P.; *Chem. Phys. Lett.* **1980**, 70, 100.