

- ¹⁶ S.W. Louro e M. Tabak — J. Magnetic Resonance (no prelo).
- ¹⁷ J.M. Rifkind — "Copper and the Oxidation of Hemoglobins" in: M. Sigel. Metal Ions in Biological Systems, New York (Editado por M. Deccker) 1981, vol. 12, cap. 6.
- ¹⁸ J.M. Rifkind; L.D. Lauer; S.C Chiang, N.C. Li — Biochem., 15, 5337 (1976).
- ¹⁹ C.C. Winter Bourn; R.W. Carrell — Biochem. Journ., 165, 141 (1977).
- ²⁰ J.S. Leigh — J. Chem. Phys, 52, 2608 (1970).
- ²¹ F.H. Kirpatrick e H.E. Sandberg — Biochem. Biophys. Acta, 298, 209 (1973).
- ²² H.M. McConnell, B.G. McFarland — Quart. Rev. Biophys. 3, 91 (1970).
- ²³ W.L. Hubbell; H.M. McConnell — J. Amer. Soc., 93, 314 (1971).
- ²⁴ P.C. Jost; V.C. Libertini; C. Herbert; O.H. Griffith — J. Mol. Biol. 59, 77 (1971).
- ²⁵ A.C. Ruggiero — "Espectroscopia de RPE com marcador de spin aplicada ao estudo de hemáceas íntegras" — Dissertação de mestrado, IFQSC/USP, São Carlos, 1984.
- ²⁶ D.A. Butterfield; F.E. Ordaz e W.R. Markesbery, J. Geront., 37, 535 (1982).
- ²⁷ T. Shega; N. Malda; T. Suda; K. Kon e Sekiya — Biochem. Biophys. Acta., 553, 84 (1979).
- ²⁸ W.L. Hubbell; J.C. Metcalfe; S.M. Metcalfe e H.M. McConnell, Biochem. Biophys. Acta, 219, 415 (1970).
- ²⁹ D.A. Butterfield — Spin Labelling in Disease. In: Biological Magnetic Resonance, Berliner and Reuben, 1982, V. 4., Cap. 1, p. 1-78.
- ³⁰ G.L. Jones — Proc. West Pharmacol. Soc. 22, 79 (1979).
- ³¹ E. Bentter — "Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency" In: "The Metabolic basis of Interisted Disease" (3rd Edition) McGraw Hill (1972) cap. 60.
- ³² A.H. Ross; H.M. McConnell — Biochem. 14, 2793, (1975).
- ³³ F.S. Axel — Biophys. Strukt Mechanism. 2, 181 (1976).
- ³⁴ J. Ruggiero Neto — "Interação de pequenas moléculas com proteínas: um estudo usando métodos convencionais e transferência de saturação de RPE", tese de doutorado, IFQSC/USP, São Carlos, 1984.

NOTA TÉCNICA

UM "STOPPED-FLOW" DE FÁCIL CONSTRUÇÃO:

Uma Improvisação que dá Certo

Matthieu Tubino

Instituto de Química — Universidade Estadual de Campinas
CP 6154 — 13081 — Campinas — SP

Recebido em 30/08/84

INTRODUÇÃO

É muito comum, ao estudar mecanismos de reações em solução, a limitação experimental imposta pelas altas velocidades dos processos químicos de interesse.

A técnica de fluxo-interrompido, ou "stopped-flow", é a que mais tem sido utilizada para a determinação de constantes de velocidade de reações rápidas. Contudo, os aparelhos comerciais são de alto custo, o que torna, esta técnica, de uso proibitivo. Em face desta situação, resolvemos construir um equipamento de custo aparente baixo, isto é, aproveitando, ao máximo, material disponível na nossa instituição. Chegamos, deste modo, ao sistema descrito neste artigo que, embora seja limitado, principalmente, pelo seu sistema de detecção, representa para nós, um primeiro passo na solução do problema.

Basicamente, o equipamento é constituído por: um espectrofotômetro Carl Zeiss modelo PM2 D, ligeiramente modificado na parte óptica; um osciloscópio Hewlett-Packard 181 A; um registrador Servogor RE 511; uma unidade de fluxo que será descrita em detalhes. Não nos preocupamos com a descrição das modificações realizadas

no espectrofotômetro, pois estas são específicas para o modelo utilizado (1).

DESCRIÇÃO GERAL

A utilização de um espectrofotômetro convencional, para a construção do "stopped-flow", foi no intuito de aproveitar os sistemas óptico e de detecção nele existentes. Sabemos, entretanto, que num aparelho deste tipo, a parte eletrônica é construída de modo a filtrar os ruídos e diminuir a flutuação do sinal. Isto implica, necessariamente, num aumento do tempo de resposta. Se num trabalho convencional tal fato não traz nenhum problema, em monitoração de mudanças rápidas de absorbância (ou transmitância) a situação pode se tornar crítica a ponto de não ser permitida a medida. Por motivos diversos não nos preocupamos em resolver imediatamente tal problema. Uma solução interessante e simples, embora parcial, é dada por Gray e Workman (2).

Na fotografia 1, tem-se uma visão geral do equipamento. O sistema de termostatização não foi incluído, para fins de

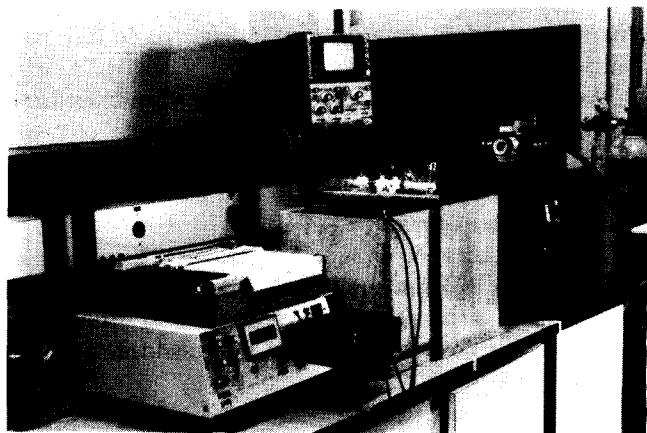


FOTO 1

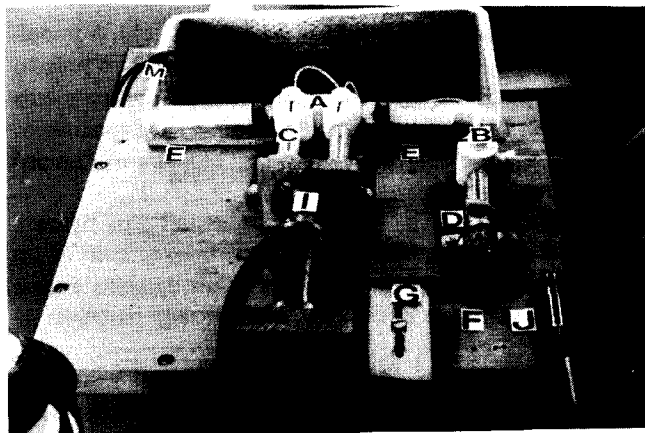


FOTO 5

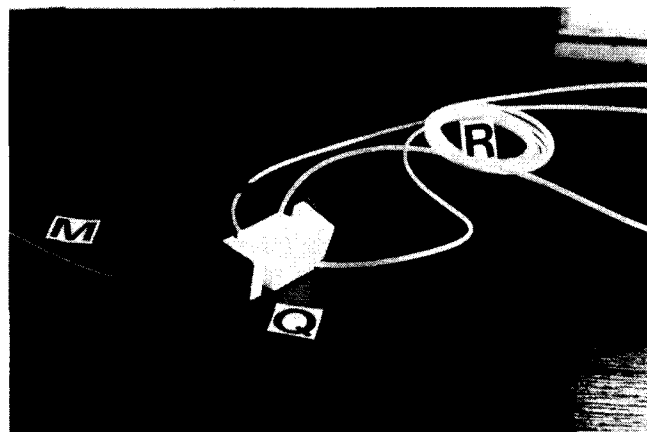


FOTO 2

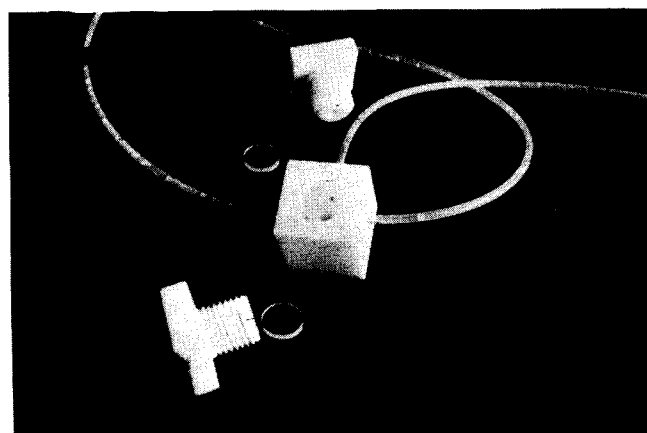


FOTO 3

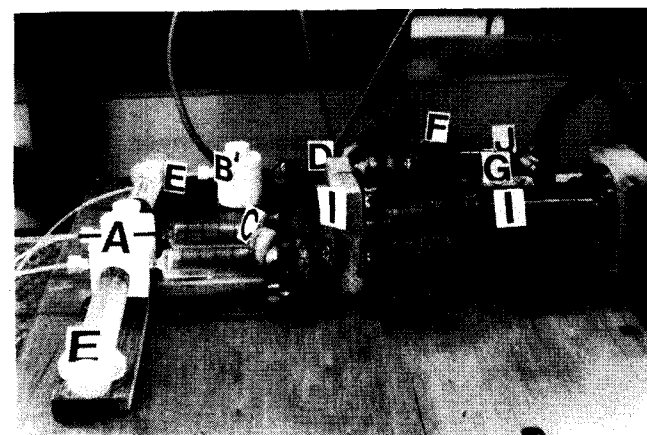


FOTO 4

simplificação visual (1). Apenas a caixa de amianto de 50 litros foi mantida e, sem água.

No espectrofotômetro, em N, pode-se ver o resultado externo das modificações realizadas de modo a permitir a "captura" da luz monocromática, por um feixe de fibras ópticas de vidro (9), e a sua posterior devolução, após passar pela cela de reação, ao fototubo que ali se localiza. Os dois feixes de fibras ópticas (FFO) estão indicados por M na foto.

Na fotografia 2, vê-se a cela de reação (Q) em Teflon, acoplada aos FFO (M) e aos tubos de polietileno que conduzem os reagentes e os produtos da reação. Em R está representada uma serpentina que é necessária para a termotatização prévia, a fim de que os reagentes atinjam a cela na temperatura correta. Para o tubo de polietileno utilizado, cujo diâmetro externo é de 2 mm, 1 metro corresponde a um volume de, aproximadamente 1 ml. Como são dois os tubos condutores de reagentes, isto significa que há cerca de 2 ml de soluções termostatizadas prontas para serem injetadas. Em cada experimento temos utilizado 0,5 ml de cada solução reagente, o que garante que, também, na operação seguinte o reagente estará em equilíbrio térmico.

Na foto de número 3, aparece a cela desmontada onde é fácil perceber todos os seus componentes, inclusive as janelas de vidro.

Nas fotografias 4 e 5 pode-se ver o sistema de injeção dos reagentes. Em A estão as duas torneiras de três vias que recebem os reagentes das seringas plásticas de 10 ml (E), e os transferem para as de vidro, de 5 ml (C). As primeiras (E) funcionam como reservatório, enquanto que, as segundas (C) são de injeção. Em B aparece a torneira final conectada à seringa breque (D) e ao tubo de descarga.

Em F está o interruptor que, pressionado pela seringa D, dispara o gatilho do osciloscópio, por estar ligado a este e ao terminal positivo de uma pilha alcalina de 1,5 volts (J). O polo negativo desta está ligado à terra.

G é um bloco de madeira, onde está preso o interruptor F, que permite a regulação da sua posição de modo a controlar o deslocamento do pistão da seringa D. Isto implica na possibilidade de variar o volume de reagentes injetados por C. Originalmente, este bloco G, estava localizado exatamente atrás de D e ao papel de interruptor era desempenhada por duas pequenas lâminas de cobre.

O martelo pneumático está indicado por I (1). A impulsão é feita por ar proveniente de um compressor. A pressão é regulada por um sistema de filtro de ar para pintura marca DEVILBISS (3), indicado por H na foto 1. O acionamento ocorre quando se aperta o gatilho da "biqueira de comprimido" (L na foto 1).

As torneiras A e B, vistas nas fotografias e na figura 1 apresentam uma pequena diferença na conexão com os tubos de polietileno. O modo indicado no desenho é mais simples e igualmente eficiente e, é o utilizado na célula de reação.

Na figura 1 estão descritas as três torneiras utilizadas. Correspondem a A e B nas fotografias. Neste desenho não é mostrada a manopla, a qual pode ser vista claramente na foto 4. Ela é feita com um pequeno bastão de aço.

Na figura 2 está representada, em corte, a cela de reação. Observações consideradas mais importantes ou esclarecedoras foram colocadas no próprio desenho.

Em todos os casos a escala é de 1:1.

Para a conexão do FFO utiliza-se furos de 3 mm de diâmetro. Esta medida se relaciona com o terminal das fibras usadas.

É importante observar que os furôs, tanto na cela como nas torneiras, devem permitir um ajustamento perfeito dos tubos ou das seringas de modo a evitar que estes se soltem ou que haja vazamentos. O bico de uma seringa tem, normalmente, forma de tronco de cone, com o menor diâ-

tro na extremidade. Este deve ser o diâmetro do furo para um perfeito acoplamento.

As seringas de vidro podem ser fixadas com braçadeiras de 1/2", tomando-se o cuidado de protegê-las com um pouco de espuma plástica ou outro material. De modo geral, a fixação das peças é muito fácil pelo fato da superfície suporte ser de madeira.

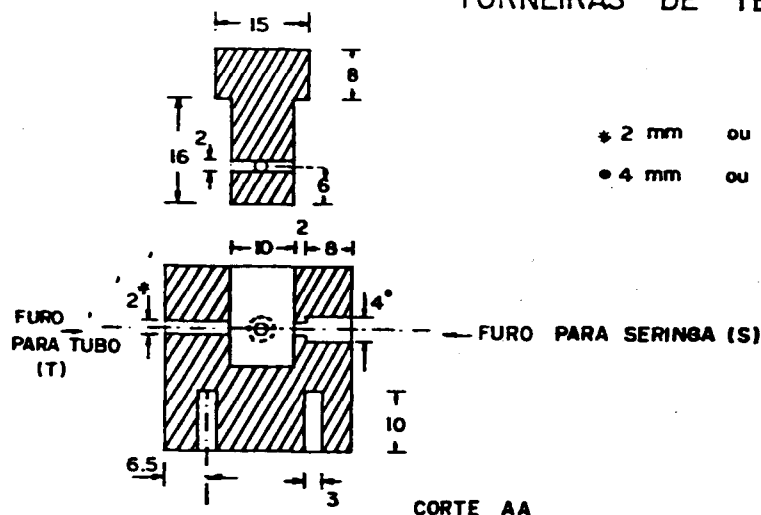
Entre as marcas de seringas de vidro testadas a que mais aprovou foi a B-D. Embora os êmbolos não sejam intercambiáveis, por especificação, na prática isto se mostrou possível na maioria dos casos. Também, a regularidade do material é bastante boa.

TESTE DO EQUIPAMENTO E COMENTÁRIOS

Volumes Relativos das Serginas e Precisão Fotométrica

Inicialmente verificou-se a relação entre os volumes de solução injetados por cada seringa. Para tal foi utilizada uma solução de hidróxido de amônio à 10% (sol I) numa delas e, a mesma solução com fenolftaleína (sol II) na outra. O 100% de transmitância foi ajustado com a sol I. Mediu-se a transmitância da sol II em 550 nm, em vários eventos. Após cada uma destas medidas, injetou-se as soluções I e II, conjuntamente, com o auxílio do martelo pneumático. Os resultados estão na tabela I.

TORNEIRAS DE TEFLON



- * 2 mm ou de acordo com o tubo a fixar
- 4 mm ou de acordo com a seringa a fixar

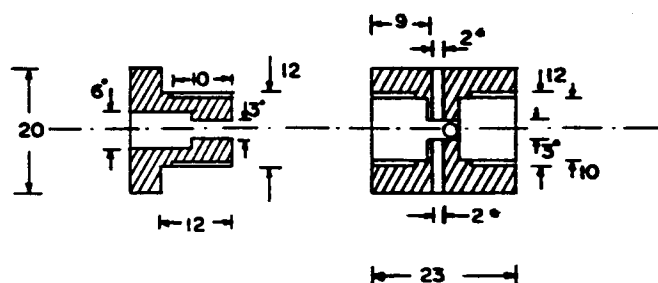
3 TORNEIRAS COM OS SEGUINTE TIPOS DE FUROS LATERAIS

FUROS EM		B	C	D	E
TORNEIRA	ESQUERDA	S	—	T	S
TORNEIRA	DIREITA	S	S	T	—
TORNEIRA	FINAL	S	T	T	—

TORNEIRA DIREITA

Fig. 1

DESENHO EM CORTE DA CELA DE REACÃO DE TEFLON



2 mm OU DE ACORDO COM O TUBO A FIXAR
(3 Furos)

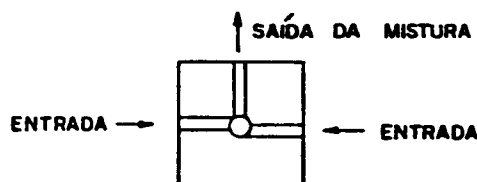
• ESTAS MEDIDAS ESTÃO RIGOROSAMENTE RELACIONADAS COM AS DIMENSÕES DO GUIA ÓPTICO.

OBS. 1. SÓ UMA "TAMPA É REPRESENTADA"

2. PARA MELHOR VEDAÇÃO NO ENCAIXE DA JANELA DE VIDRO NÃO DEVE HAVER ROSCA

3. EVIDENTEMENTE AS DIMENSÕES DA CELA PODEM VARIAR DEPENDENDO DO GUIA ÓPTICO, DO CAMINHO ÓPTICO, DO VOLUME DESEJADO, ETC.

4. O VOLUME DESTA CELA É DE APROXIMADAMENTE 35 μ l.



DISPOSIÇÃO DOS FUROS

Fig. 2

TABELA 1

Verificação do volume de contribuição, de cada seringa, para a cela de reação. Solução I = NH_4OH a 10%.

Solução II = solução I + fenolftalénina.

Leituras de absorbância em 550 nm.

Evento	Absorbância	
	Sol. I	Sol I + Sol. II
1	0,399	0,166
2	0,334	0,171
3	0,329	0,160
4	0,323	0,162
5	0,317	0,156
6	0,312	0,154
7	0,308	0,154
Média	0,323 $\pm$ 0,012*	0,160 $\pm$ 0,016*

* Desvio Padrão. O desvio padrão relativo, é, respectivamente, 3,7% e 3,8%.

Observando-se esta tabela, percebe-se que do evento 1 ao 7 há uma tendência de diminuição dos valores de absorbância. Isto pode ser explicado, em parte, pela instabilidade fotométrica do espectrofotômetro que trabalha no máximo de sua sensibilidade. Ainda, considerando-se que o caminho óptico é de apenas 5 mm e que o volume da cela é de 0,035 ml, percebe-se que pequenos fatores como, microbolhas, partículas em suspensão, etc., poderão afetar significativamente a leitura final. De qualquer modo, podemos considerar a precisão fotométrica relativa como igual a 3,7% pelas leituras da solução I. Como, ao misturar as duas

soluções, se obtém uma precisão de 3,8%, conclui-se que, dentro destes limites, os volumes injetados por cada seringa são iguais.

Tempo de Enchimento de Cella

O tempo necessário para deslocar as duas seringas, pelo martelo pneumático, sob uma pressão de ar de 1,5 kgf/cm^2 foi de 0,20 s, sendo o volume total injetado igual a 1 ml. Como o volume da cela é de 0,035 ml, o tempo necessário para o enchimento (ou substituição da solução) é de, aproximadamente 7 ms. O uso de 1 ml de solução permite encher a cela cerca de 28 vezes.

A medida do tempo de deslocamento das seringas foi feita através de um circuito elétrico externo, com o auxílio do osciloscópio já citado (1).

Aumentando-se a pressão do ar é possível obter tempos menores. Por exemplo, com 2,0 kgf/cm^2 de pressão, o tempo de deslocamento é de 0,10 s, ou seja, a solução da cela é substituída em 3,5 ms. Nos experimentos descritos adiante utilizou-se sempre 1,5 kgf/cm^2 .

A injeção dos reagentes pode ser feita manualmente para reações de velocidade mais baixa. Contudo, é difícil executar manualmente um impulso homogêneo e, isto pode afetar o sinal detectado. Mesmo quando se utiliza o martelo pneumático é importante manter a pressão até que toda reação ocorra, a fim de evitar refluxo na cela.

Tempo de Resposta do Detector

Consideramos como detector todo o conjunto constituído pelo fototubo e pela eletrônica do espectrofotômetro.

Testes feitos com soluções coloridas, injetadas na cela e, por interrupção mecânica do feixe luminoso, indicaram um tempo de resposta de 0,15 s, para uma variação de 100% à 0% de transmitância. Isto limita a medição de constantes de velocidade até 3 s^{-1} no máximo, aproximadamente.

Termostatização

Foi utilizado um termostato KUTESZ modelo 607. Como fonte fria e para a reação à $5,4^\circ\text{C}$ utilizou-se uma refresqueira REUBLI dupla (5).

Para garantir que os reagentes atinjam a cela de reação na temperatura adequada foi feita, como discutido anteriormente, uma serpentina com os tubos de polietileno.

Registro dos Eventos

As reações foram monitoradas, como já dito, por um osciloscópio Hewlett-Packard 181 A, com memória. Para reações mais lentas foi utilizado um registrador SERVOGOR modelo RE 511. Um exemplo deste último caso é o da dissociação do complexo $\text{Fe}(\text{bipy})_3^{2+}$ em meio ácido à $46,7^\circ\text{C}$ onde obtivemos, para a constante de velocidade o valor de $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ contra $(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ calculado a partir dos dados de Basolo (6) e Krumholz (7).

Consideramos que um registrador X-Y seria de extrema utilidade podendo substituir o osciloscópio, até certo limite, fornecendo, outrossim resultados mais preciosos.

Determinação das Constantes de Velocidade

Os decaimentos ou acréscimos na transmitância foram medidos diretamente na tela do osciloscópio, num fundo de escala adequado. No caso do $\text{Fe}(\text{bipy})_3^{2+}$, as leituras foram realizadas, obviamente, no gráfico do registrador. Todos os dados foram tratados por um programa de mínimos quadrados, numa calculadora de mesa.

Estudo da Formação do FeSCN^{2+}

Escolheu-se, para o teste do equipamento, a reação de Fe^{3+} com SCN^- , dando FeSCN^{2+} , por ser este um sistema bem conhecido. Em virtude das limitações já discutidas, foi necessário trabalhar em temperaturas abaixo da ambiente para limitar os valores das constantes de velocidade.

Os resultados encontrados encontram-se descritos na tabela 2. Observa-se um desvio padrão médio relativo de aproximadamente 4,4% o que é excelente para o método de fluxo interrompido, ainda mais quando as leituras foram feitas diretamente na tela do osciloscópio.

Considerando-se como valor correto da constante de velocidade observada, à 25°C , $4,52 \text{ s}^{-1}$ (8) e calculando-se para esta temperatura, o valor a partir dos nossos dados, chegamos à $4,95 \text{ s}^{-1}$ ($E_a = 50,0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$). Este resultado é um pouco alto mas justifica-se com certa facilidade se considerarmos um erro de $\pm 0,01$ no valor da transmitância infinita, o que é muito fácil de ocorrer nas condições operadas.

É sempre bom lembrar que a reação de formação de FeSCN^{2+} é um processo de primeira ordem. A constante de velocidade foi obtida, portanto, como se faz usualmente, pela equação

$$\ln(A_\infty - A) = -kt + \ln(A_\infty - A_0)$$

onde: A_∞ = Absorbância no tempo infinito
 A_0 = Absorbância no tempo zero
 A = Absorbâncias nos diversos tempos t.

A constante k é fornecida pelo coeficiente angular da curva $\ln(A_\infty - A)$ versus t.

TABELA 2

Constantes de velocidade de formação observadas (em s^{-1})
do complexo FeSCN^{2+} . $[\text{Fe}^{3+}] = 2,00 \cdot 10^{-2} \text{ M}$,
 $[\text{SCN}^{-3}] = 1,00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{HClO}_4] = 0,25 \text{ M}$,
 $\mu = 1,00 \text{ M} (\text{NaClO}_4)$.
Reação monitorada em 520 nm.

Evento								
Temperatura /°C	1	2	3	4	5	$\bar{X}$	τ^* / 10^{-2}	σ /%
5,4 ± 0,1	1,30	1,32	1,23	1,21	1,18	1,25	6,0	4,8
11,1 ± 0,1	1,86	1,83	1,80	1,86	1,92	1,85	4,5	2,4
14,4 ± 0,1	2,65	2,40	2,32	2,59	2,37	2,47	14,5	5,9

* Desvio padrão.

NOTAS E REFERÊNCIAS

- 1 Maiores informações poderão ser fornecidas aos interessados.
- 2 E.T. Gray Jr. e H.H.J. Workman, J. Chem. Ed. **57**, 752 (1980).
- 3 Não é necessário na realidade, comprar um filtro como este, bastando adquirir um regulador de pressão para ar. A nossa escolha decorreu da facilidade de compra. Mesmo em se tratando de filtros de ar comprimido para pintura, outras marcas podem ser usadas como, por exemplo, a ARPREX.
- 4 Apesar do máximo de absorção do FeSCN^{2+} estar à 460 nm, trabalhou-se em 520 nm em função das concentrações utilizadas.
- 5 Para os interessados temos à disposição um esquema de termostato de fácil construção.
- 6 F. Basolo, J.H. Hayes e H.M. Newmann, J. Am. Chem. Soc., **76**, 3807 (1954).
- 7 P. Krumholz, An. Acad. Brasil. Cienc. **22**, 263 (1950).
- 8 G.E. Mieling e H.L. Pardue, Anal. Chem. **50**, 1333 (1978).
- 9 ABC XTAL. Rodovia Campinas – Mogi Mirim, km 118 Campinas – Barão Geraldo – CEP 13083 – Fone (0192) 39-4009.