UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA

RAFAEL DOS SANTOS SOUZA XAVIER

ELETROFORESE EM GEL COM DETECÇÃO POR IMAGEM DIGITAL PARA DETERMINAÇÃO DE CORANTES EM ALIMENTOS DE COR VERDE

BRASÍLIA/DF
2021

RAFAEL DOS SANTOS SOUZA XAVIER

ELETROFORESE EM GEL COM DETECÇÃO POR IMAGEM DIGITAL PARA DETERMINAÇÃO DE CORANTES EM ALIMENTOS DE COR VERDE

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para obtenção de título de Bacharel em Química Tecnológica pelo programa de graduação do Instituto de Química da Universidade de Brasília-UnB.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

BRASÍLIA/DF

2021

RAFAEL DOS SANTOS SOUZA XAVIER

ELETROFORESE EM GEL COM DETECÇÃO POR IMAGEM DIGITAL PARA DETERMINAÇÃO DE CORANTES EM ALIMENTOS DE COR VERDE

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para obtenção de título de Bacharel em Química Tecnológica pelo programa de graduação do Instituto de Química da Universidade de Brasília-UnB.
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

_____

Presidente de Banca (IQ/UnB): Prof. Dr. Alexandre Fonseca

_____

Membro Titular (IQ/UnB): Prof.ª Dr. Fábio Moreira da Silva

_____

Membro Titular (IQ/UnB): Prof. Dr. Cyro Lucas Silva Chagas

_____

Membro Suplente: Eduardo

Brasília, ____ de novembro de 2021.

DEDICATÓRIA

Não vos sobreveio provação que não fosse humana; mas Deus é fiel e não permitirá que sejais provados além das vossas forças. No olho do furacão é impossível entender o porquê dos acontecimentos, mas confie. Nada foge dos planos do Altíssimo!

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar, agradeço ao meu Deus que, independente da minha situação, nunca me abandonou.

Agradeço imensamente minha família que, desde o início, esteve ao meu lado me dando forças. Meus pais, Mariney e Luiz, e meu irmão, Felipe, pelo carinho, amor e compreensão em meio a tantos momentos de batalha. De fato, foram minhas colunas em todo período. Agradeço a minha namorada pela motivação e pelos momentos de estudos juntos, mesmo sendo a mais de 900 Km de distância.

Agradeço o Prof. Dr. Alexandre Fonseca, meu orientador, por comprar a ideia desse trabalho junto comigo, sendo um exemplo de disposição e prestatividade, sempre querendo ajudar.

Aos meus amigos que, tantas vezes, me ouviram falar de mil e um termos químicos sem entender um sequer, mas mesmo assim acenavam com a cabeça. Esse tipo de irmandade não tem preço. É impossível conseguir citar todos, mas deixarei alguns desses registrados, Allex, Marcus, Fernanda, Jonathan, Elisa, Estevão, Rebecca, Giovanna, Sara, Samuel, Michelle, Camila, Sofia, Filipe, Igor, Caíque e Davi.

Aos meus amigos que a UnB me deu por tornarem meus momentos na faculdade mais leves e divertidos. Mesmo que aos trancos e barrancos, olha a gente agora. Shugs, Elo, Isa, Bia, Mari e Lê, estamos juntos em mais essa fase pós faculdade.

Todo fim é um novo começo.

RESUMO

A técnica conhecida como eletroforese em gel (GE) é muito utilizada em análises biológicas (principalmente proteínas e ácidos nucleicos). Contudo, seu emprego possui limitações com relação a obtenção de um sinal analítico que possa ser usado para determinação química quantitativa, dificultando a relação com a concentração. Sabendo disso, esta monografia pretende a combinação entre GE e detecção fundamentada em padrões de cores presentes em imagens digitais para separação e posterior quantificação de compostos. Nos ensaios desempenhados durante a realização desse trabalho foi possível validar a separação e quantificação dos corantes alimentícios (azul brilhante, amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo) de maneira concomitante. Tomando como base os eletroferogramas gerados a partir de um software desenvolvido no laboratório e com auxílio de uma webcam para tomada de dados dos componentes RGB das imagens, obteve-se curvas analíticas com linearidade apropriada ($R > 0,99$) para maior parte dos analitos estudados. Para avaliação quantitativa do método proposto, foi realizado teste de recuperação em refrigerante desgaseificado incolor (Sprite), conseguido alcançar valores de 96% a 99,76%. Demonstrando assim uma exatidão adequada. Precisões próximas a 5% foram estimadas para as medidas. O presente trabalho demonstrou um desempenho analítico adequado da técnica utilizada, abrindo portas para possibilidade de novas aplicações em diferentes amostras e analitos.

Palavras-chaves: Eletroforese em gel, detecção por imagem digital, corantes alimentícios.

ABSTRACT

The technique known as gel electrophoresis (GE) is widely used in biological analysis (mainly proteins and nucleic acids). However, it's use has limitations to obtain an analytical signal that can be used for quantitative chemical determination, making it difficult to relate to concentration. This monography intends to combine EG and detection based present in digital images for separation and subsequent quantification of compounds. In the tests performed during this study, it was possible to validate the separation and quantification of food dyes (bright blue, tartrazine yellow and twilight yellow) at the same time. Based on the electropherograms generated from software developed in the laboratory and with the aid of a webcam to take data from the RGB components of the images, analytical curves were obtained with appropriate linearity (R > 0.99) for most of the analytes studied. For quantitative evaluation of the proposed method, a recovery test was performed on colorless degassed soda (Sprite), achieving value of 96% to 99,76%. Showing an adequate accuracy. Accuracies close to 5% were estimated for the measurements. The present study demonstrated an adequate analytical performance of the technique used, opening doors for new applications in different samples and analytes.

Key words: *Gel electrophoresis, digital imaging detection, food dyes.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS 10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 11
2.1. Introdução eletroforese: 11
2.1.1. Suporte de Acetato de Celulose 14
2.1.2. Suporte de Poliacrilamida 14
2.1.3. Suporte de agarose 15
2.2. Fatores que podem afetar a migração e a resolução do gel 16
2.2.1. Concentração de Agarose 16
2.2.2. Agente intercalantes 19
2.2.3. Tamanho das moléculas 20
2.2.4. Tampão de corrida 20
2.2.5. Voltagem Aplicada 21
2.2.6. Temperatura Envolvida 21
2.2.7. Limite de Resolução 22
2.2.8. Efeito de sobrecarga da amostra 22
2.2.9. Amostra contaminada 22
2.2.10. Protocolo para preparação do gel e aplicação das amostras no suporte 22
2.3. A utilização de imagens digitais para determinação 23
2.4. Corantes alimentícios 25
3. MATERIAIS E MÉTODOS 27
3.1. Reagentes 27
3.2 Aparatos 27
3.3 Ambiente de luz controlada 27
3.4 Programa de computador utilizado para detecção e leitura das imagens digitais 29
3.5 Preparação do gel e aplicação das soluções 31
3.6 Procedimento para as medidas 32
3.7 Estudo realizado com corantes alimentícios da cor verde 33
3.7.1 Preparação e avaliação qualitativa de amostras 33
3.8 Separação e avaliação quantitativa do Azul brilhante, Amarelo Crepúsculo e Amarelo Tartrazina 33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 35
4.2 Avaliação quantitativa para azul brilhante, Amarelo Crepúsculo e Amarelo Tartrazina 38
4.3 Ensaio de precisão 41
4.4 Teste de recuperação 42

4.5 Aplicação do método com produtos comerciais..... 44
5. CONCLUSÕES.....45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....46

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A técnica laboratorial conhecida como eletroforese em gel é bastante utilizada nos dias atuais, devido, principalmente, a sua simplicidade e praticidade. Esta é fundamentada no emprego de uma corrente elétrica, visando a separação de moléculas, baseada nas suas cargas (como é o caso dos ácidos nucleicos e proteínas) e o seu tamanho. Fatores que podem influenciar diretamente a migração dessas moléculas são a diferença de carga elétrica presente no meio observado e também o peso molecular dos analitos. Sendo assim, moléculas que possuam cargas negativas são atraídas pelo eletrodo positivo e vice-versa. Moléculas que possuam um menor peso molecular migrarão com maior facilidade através do gel. Ou seja, a migração dessas acontece de maneira mais acelerada, quando comparadas as de maior peso.

O avanço dos equipamentos eletrônicos nos últimos anos, somado aos estudos e trabalhos realizados com a utilização de imagens digitais, tornaram as determinações químicas ainda mais refinadas. Em grande parte das vezes tais análises são baseadas em elementos simples capturados pela imagem. Como é o caso dos valores referentes as cores do sistema RGB (Red, Green e Blue do inglês).

Dessa forma, esta monografia tem por motivação empregar a eletroforese em gel, aliada as imagens digitais (geradas através de uma webcam de maneira concomitante com a corrida), para determinações químicas de 3 corantes distintos presentes em alimentos da cor verde. Ou seja, o principal objetivo aqui é ampliar e validar o emprego deste método para separação, acoplado a um meio de detecção baseado no sistema RGB, com a finalidade de determinações qualitativas e quantitativas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Introdução eletroforese:

Em meados de 1978, o cientista Kuhne publicou um novo método, o qual foi capaz de separar de forma satisfatória duas frações distintas de proteína. Porém, somente no ano de 1909 os conceitos iniciais de eletroforese vieram à tona. Com estudos realizados por Michaelis, foi possível observar que as proteínas em questão, quando expostas a um campo elétrico, se movimentavam a ponto de serem separadas em frações. Tal descoberta foi marcante para o cenário cientifico da época.[1][2]

Nos anos seguintes diversos cientistas se debruçaram sobre os fundamentos da eletroforese, em busca de aperfeiçoar a técnica descoberta. Dessa forma, no ano de 1937 o cientista sueco Tiselius, lançou fortes fundamentos para técnica. Tamanha foi a solidez de sua contribuição para a ciência, que lhe rendeu a vitória do prêmio Nobel no ano de 1938. O método de eletroforese utilizado até os dias de hoje utiliza fundamentalmente seu método [33].

Essa técnica, tão utilizada nos laboratórios contemporâneos, é empregada, principalmente, com o objetivo de separar compostos. A separação proteica, propriamente dita, é baseada em duas forças, sendo elas a eletroforética e a eletroendosmótica. É criado uma diferença de potencial entre o eletrodo positivo (ânodo) e o eletrodo negativo (cátodo), simplificado na figura 1. Dessa forma, é promovida a migração dos elementos em direção ao eletrodo o qual possui carga compatível. Ou seja, moléculas carregadas com carga negativa serão atraídas pelo polo positivo (e vice-versa). Sendo que o tamanho das moléculas, bem como sua carga, tem relação de forma diretamente proporcional com a velocidade de sua corrida. Dessa forma, quanto menor (ou mais carregada) for a molécula, mais rapidamente ocorrerá a migração.

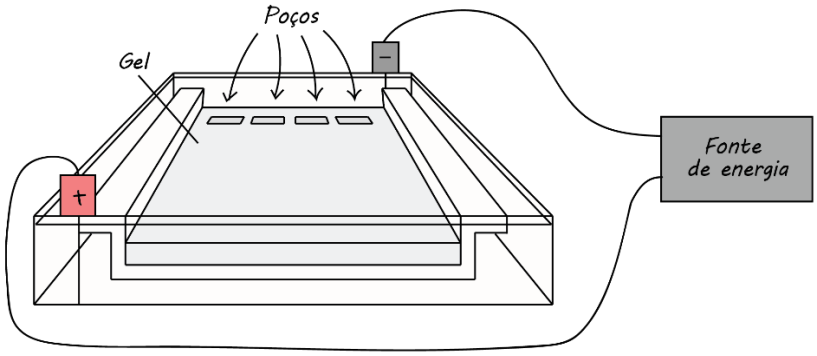

Figura 1. Simplificação da aparelhagem utilizada para eletroforese em gel. Adaptação de [32].

Esses eletrodos se localizam nas extremidades da cuba eletroforética, sendo que entre eles é depositado um gel preparado de agarose. Neste é confeccionado pequenos poços, com auxílio de um

pente, nos quais posteriormente serão injetadas as amostras com auxílio de uma micropipeta (figura2). Então, acrescenta-se a solução tampão até o ponto que se cubra o gel cerca de 0,5 mm. Após essa sequência de fatos, liga-se a fonte, criando assim o campo elétrico ocasionando o início da migração.

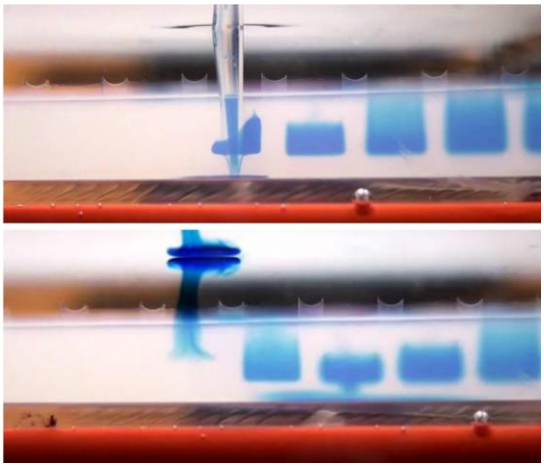

Figura 2. No detalhe, uma injeção exemplificativa de amostra dentro do poço. Adaptação em [35].

Sabe-se que diversos fatores podem influenciar, de maneira direta e indireta, a corrida das substancias. Sendo mais relevantes o peso molecular, constituinte elétrico da amostra, composição do tampão utilizado, resistência do meio suporte (gel confeccionado, sendo os principais com acetato, ágar ou poliacrilamida).

Aqueles fatores que contribuem de forma a retardar o avanço da migração das moléculas recebem são classificadas como forças de resistência friccional. Essa força pode ter origem devido ao formato molecular, ao tamanho do poro do suporte, tamanho da molécula e a viscosidade do tampão utilizado. Dessa forma, pode-se inferir que naquelas situações, nas quais a soma das forças friccionais for maior haverá maior impedimento de avanço, logo a velocidade associada a corrida será menor. Da mesma forma, quanto menor forem as forças friccionais existentes, maior será a velocidade de migração. Tal velocidade pode ser descrita pela Equação 1, sendo f o coeficiente de fricção, oriundo das forças de resistência friccional. [3]

$$V = \frac{Eq}{f} \quad (1)$$

Basicamente, a separação é dada pela mobilidade eletroforética (μ, descrita pela equação 2) associada as moléculas da amostra. [3]

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (2)$$

A corrente que é gerada devido a ddp (diferença de potencial) é mantido devido aos íons livres presentes do sistema. Sendo que os íons presentes no tampão, possuem a maior relevância quanto a corrente e uma pequena parcela é devido aos íons da própria amostra. A relação entre corrente com a voltagem existente é descrita pela lei de Ohm (equação 3). [3]

$$R = \frac{V}{i} \quad (3)$$

Como pode-se observar, com uma pequena manipulação, na equação 3, a corrente existente é diretamente proporcional a voltagem do sistema. Então, seria lógico que aumentando a voltagem, a corrente também aumentaria, gerando assim uma maior eficiência na separação, bem como a diminuição no tempo de análise. No entanto, isso acarretaria no aquecimento do sistema como um todo. Sendo esse, um dos principais problemas associados a eletroforese. A equação 4 descreve essa geração de calor. Sendo W a potência traduzido em forma de calor. [3]

$$W = i^2 * R \quad (3)$$

Esse problema ocasionado gera algumas consequências indesejadas, como o aumento da difusão dos íons contidos no sistema (causando o alargamento das bandas de separação), a formação de correntes convexas (resultando na mistura de amostras já separadas), instabilidade de amostras que sejam sensíveis ao calor (podendo causar depredação da amostra), diminuição da viscosidade do tampão (ocasionando a redução e resistência do meio. [4]

É normal que com a utilização desse método observe-se um aumento gradual e constante no valor da corrente, mesmo com aplicação de voltagem constante. Isso acontece devido a perca de resistência do meio. Devido esse fato, é de notória importância que se utilize fontes de tensão estáveis, que consigam fornecer uma voltagem estável, para que assim possam ser excluídas as flutuações de migração (ocasionadas pelo aquecimento indevido do meio). Em posse dessa informação é normal supor que tomar o caminho contrário, ou seja, fornece uma baixa corrente durante todo o experimento seja a melhor alternativa. Entretanto, isso interfere diretamente na resolução da separação. Afinal, com passar do tempo, o processo de difusão faz com que a separação perca a sua nitidez. [4]

Sabendo disso, as condições ideais para realização da técnica vem a ser intermediárias, de forma que se consiga realizar a separação de maneira satisfatória, sob baixa temperatura e

com um tempo experimental aceitável. Sem esquecer que a condição do suporte é de extrema importância. Principalmente, por conta das forças eletroendosmóticas, as quais surgem por conta de algum conjunto carregado na superfície do suporte que pode interferir diretamente na migração da amostra. Um bom exemplo dessa situação é com os grupos fosfato, que podem se fazer presente no caso da utilização de agarose (tal presença pode acontecer, dependendo do nível de pureza que ela se encontra).[5]

Vale ressaltar que a técnica de eletroforese possui dois principais métodos, são eles o realizado com capilar e o convencional. Esse primeiro é baseado na separação através da passagem da amostra por um fluxo de tubo capilar. E mesmo que este possua altíssima resolução, o valor para sua realização é bastante elevado. Desta maneira, o método convencional, foco e descrito até então neste trabalho, possui um valor mais baixo e acessível, produzindo resultados nítidos e consistentes.[6]

Dentro dos métodos convencionais, foco deste trabalho, é possível classifica-los de acordo com o suporte utilizado. Atualmente, existem 3 principais suportes. Todos eles possuem seus prós e contras. A questão principal aqui é escolher o de melhor custo-benefício.

2.1.1. Suporte de Acetato de Celulose

O pesquisador Kohn, no ano de 1958, desenvolveu este composto a partir de uma reação de celulose com anidrido acético e ácido acético, acrescentando ácido sulfúrico como catalisador da reação. Esse produto soma uma gama de vantagens como possuir microporos homogêneos, ser um material de carga neutra (o que coopera com a diminuição dos efeitos das forças eletroendosmóticas), proporcionar a formação de filmes transparentes (que facilitam a leitura), capacidade de armazenamento por longos períodos e o baixo custo associado à sua produção, o que acaba posicionando-o como meio ideal para utilização laboratorial. Contudo, a característica que o retira das bancadas é a sua baixa capacidade de fracionamento, podendo chegar a apenas 5 grupos proteicos. Ainda mais com os avanços constantes na ciência, bem como os avanços nos métodos, fez este cair em desuso. [7]

2.1.2. Suporte de Poliacrilamida

Um dos primeiros relatos da utilização desse suporte foi no ano de 1959, pelos cientistas Raymond e Weintraub, objetivando a separação de macromoléculas. O processo de formação desse gel envolve a polimerização vinílica de um monômero chamado acrilamida e também da

bisacrilamida. Nessa reação é importante a presença de catalisadores, como o persulfato de amônio ou a riboflavina. [10]

Para que se possa determinar a porosidade desse suporte é avaliado a concentração de acrilamida, ou seja, quanto maior for a sua concentração menor serão os poros do gel, consequentemente favorecendo assim a separação de menores partes da amostra.

Com a utilização do suporte em questão, é possível observar dois sistemas distintos de fracionamento. Sendo o primeiro sistema nativo, o qual realiza a separação levando em consideração apenas as cargas elétricas presentes na amostra. O segundo é chamado de sistema desnaturante, o qual é baseado na solubilização das proteínas em um tampão (contendo o agente desnaturante). Dessa forma, é possível preparar o gel de forma estratégica e particular para cada um dos ensaios necessários. Afinal, com a alteração da quantidade de acrilamida, controla-se a concentração do gel. Logo, é viável que se realize separação das substancias analisadas em diferentes faixas de peso molecular. Sabendo que quanto menores forem os poros, menores serão as proteínas separadas. [9]

Um agente desnaturante comumente utilizado é o dodecil sulfato de sódio, o qual acaba por interagir com as cadeias de peptídeos presentes nas proteínas, fazendo com que as mesmas sejam desnaturadas, resultando em cadeias com carga negativa. Ou seja, a migração ocorrerá com base apenas no peso molecular.

O suporte de poliacrilamida, olhando para os demais suportes, é o que apresenta resultados mais satisfatórios, afinal torna-se possível a observação de baixas concentrações de proteínas, possibilitando a identificação de 15 a 20 proteínas. Contudo, essa técnica não é a mais utilizada no meio laboratorial. Seu emprego é inviável devido à dificuldade que vem associada com a sua execução, tornando sua utilização bem restrita a casos de pesquisas bem específicas. Além de envolver a utilização de monômeros com elevado teor neurotóxico, sendo perigoso devido seu efeito acumulativo.

2.1.3. Suporte de agarose

O suporte proveniente de ágar é composto de um polissacarídeo, que possui como matéria prima uma variedade de algas marinhas. Esse gel possui características não fermentáveis, não absorvível e sem toxicidade. É necessário que se observe a composição da qual a agarose é composta, afinal isso pode interferir diretamente em como ocorrerão as migrações. Substancias, como fibras, sais minerais e proteínas fazem parte, podendo deixar mais evidente o efeito eletroendosmótico. Por conta disso, avaliar a pureza do ágar utilizado é

de imprescindível e determinante para a técnica, uma vez que vai influenciar o sucesso do fracionamento da amostra. [7]

O gel de agarose é de fácil manuseio em laboratório, classificando-o como prático e de baixo custo de preparação. Além de possuir uma fácil variação de concentração, de 0,5% a 2% m/v, tornando assim possível o controle sobre o tamanho dos poros e, consequentemente, do tamanho das moléculas separadas. Ou seja, quanto maior a concentração, maior a densidade do gel, menores os poros, melhor separação de moléculas menores. Dessa forma, a amplitude alcançada no quesito separação é alta, assim como permitir com que moléculas com alto peso molecular possam se movimentar, de acordo com sua carga (tornando assim esse gel melhor que o de celulose anteriormente citado). Porém, uma das principais desvantagens é que, dependendo da concentração do gel, o filme formado pode apresentar alta fragilidade, aumentando a possibilidade de dano durante a aplicação da amostra ou na própria corrida eletroforética. [8]

2.2. Fatores que podem afetar a migração e a resolução do gel

É de extrema importância que se apresente os fatores que podem influenciar na velocidade de fracionamento e também na resolução do gel. Sendo esses fatores essenciais para obtenção de bons resultados após corrida eletroforética. Os principais são citados na sequência. [5]

2.2.1. Concentração de Agarose

A substancia conhecida como agarose é classificado como um heteropolímero linear, o qual contem em sua composição D e L-galactose, como observado na figura 3.

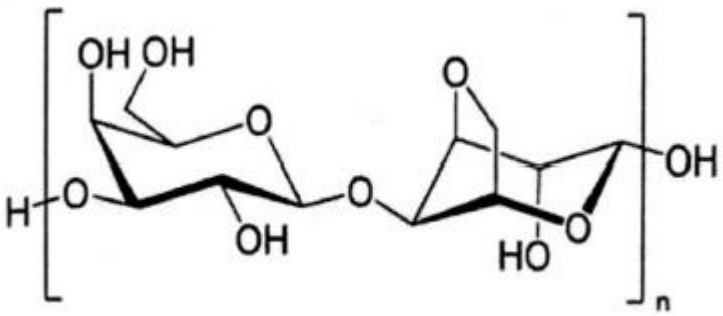

Figura 3. Formula estrutural da agarose. Adaptação de [5].

Esses componentes são encontrados nas paredes celulares de determinadas algas vermelhas. Uma vez que se tenha a agarose separada e tratada, deve-se solubilizar em solução tampão (não em água) a altas temperaturas, chegando a um produto como uma rede polimérica complexa transparente e homogênea. É sabido, através de estudos passados, que a solubilização de agarose em água interfere de maneira direta nos resultados finais da separação, como pode ser visto na figura 4.

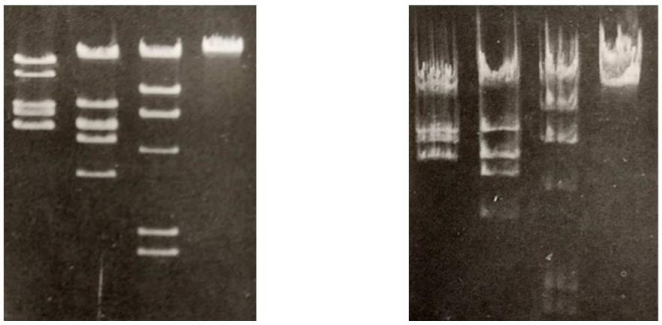

Figura 4. Resultados vistos em um gel com ágar solubilizado em tampão (à esquerda) e solubilizado em água (à direita).

Uma vez solubilizado e homogêneo o conteúdo é vertido para dentro do molde, aonde ocorrerá a polimerização e, com auxílio do pente (Figura 5) serão formados os poços, aonde mais a frente serão colocadas as amostras.

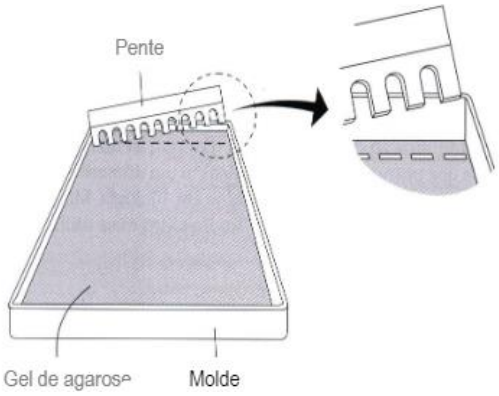

Figura 5. Exemplificando a confecção dos poços com o pente. Adaptação de [34].

Como citado anteriormente, a gelificação do suporte dá origem a um gel com poros, nos quais passa a amostra e ocorre o fracionamento. Então, pode-se salientar que a concentração da agarose é uma grandeza diretamente proporcional ao diâmetro que os poros assumem. Com

esse pensamento, é sabido que a cada faixa de concentração de agarose, uma determinada zona de amostra (proteína) consegue ser fracionada, assim como mostrado na Tabela 1.

Tabela1. Relação de concentração de agarose com a resolução (em fragmentos de DNA). Adaptação de [5].

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)

A concentração usual para o gel de agarose, para uso laboratorial varia de 0,3 a 2,0%. Sendo que quanto mais concentrado o gel, mais rígido ele fica e dessa forma mais quebradiço e irregular. Da mesma maneira, um gel com baixa concentração acarreta em um difícil manuseio. Sabendo desses fatores, ensaios devem ser realizados objetivando encontrar a concentração adequada que permita um fracionamento eficiente com um tempo razoável. De forma exemplificativa, é possível comparar as figuras de número 6a e 7a. Sendo que a 6a simula um suporte feito com uma maior concentração de agarose e por isso menores são os poros. Enquanto, que a 7a demostra um suporte com menor concentração. [5][11]

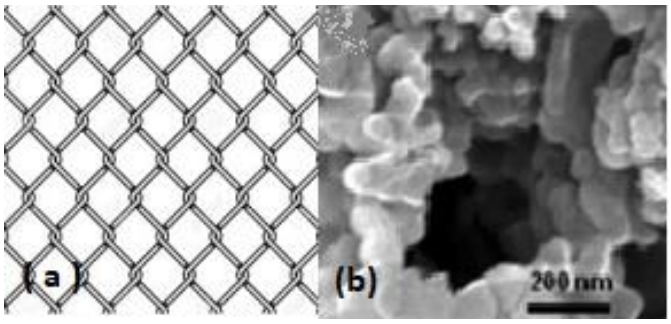

Figura 6. À esquerda, uma imagem ilustrativa da visualização dos poros de um gel mais concentrado. À direita, uma imagem real feita com microscópio digital de um desses poros. Adaptação de [25].

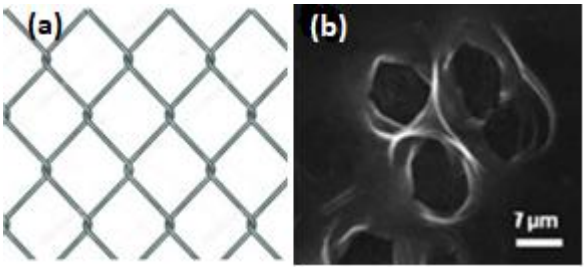

Figura 7. À esquerda, uma imagem ilustrativa da visualização dos poros de um gel menos concentrado. À direita, uma imagem real feita com microscópio digital de um desses poros. Adaptação de [25].

Outro fator que vale ser ressaltado é o fato desse suporte poder ser reutilizado em eletroforese analítica. Para isso deve-se descontaminar o gel de todo resíduo (geralmente, brometo de etídeo utilizado como colorífico) da corrida anterior, equilibrá-lo em água e então desidrata-lo para fazer com que volte ao estado em pó.

2.2.2. **Agente intercalantes**

Na maioria das análises (em sua maioria, biológicas) realizadas utilizando essa técnica as moléculas presentes nas amostras não possuem uma coloração própria, bem como o gel, se faz necessário que se adicione um elemento externo capaz de colorir as partes fracionadas, facilitando assim suas visualizações. Com tal finalidade, o brometo de etídeo (figura 8) é bastante utilizado, pois ele se parece com as bases presentes no DNA. Dessa forma, o agente intercalante se intercalam no meio das bases que são o foco de estudo. Após a corrida eletroforética, o suporte é exposta a luz UV, utilizando um comprimento de onda aproximado de 254nm, os quais são absorvidos pelas moléculas presentes de DNA, transferidas para as moléculas de intercalante, que por sua vez emitem na zona do visível (entorno de 590nm) [5][12], resultando em uma luz vermelha puxado para o alaranjado.

Portanto, por conta desse agente se unir às moléculas da amostra, retardará de maneira direta a velocidade de migração das mesmas [12]. Afinal, sua presença causa mudanças significativas na conformação, flexibilidade e volume da molécula de DNA, logo maior será a dificuldade de passar pelos poros do gel.

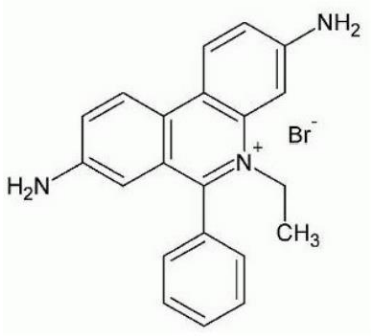

Figura 8. Fórmula estrutural do Brometo de Etídeo

2.2.3. **Tamanho das moléculas**

Tomando as moléculas de DNA, uma das mais utilizadas, sabe-se que sua migração segue inversamente proporcional ao $\log_{10}$ no número de pares de bases presentes na molécula em análise. Moléculas com maior volume migram com uma velocidade mais reduzida, devido ao maior valor do efeito friccional de arraste. Da mesma forma, a velocidade de moléculas que possuem um menor volume, é maior. [5]

2.2.4. **Tampão de corrida**

Em meio a migração das moléculas, a principal função do tampão é minimizar a variação de pH que possa acontecer. Afinal, pode acontecer de as moléculas em análise dependerem do pH, que pode variar de acordo com que a corrida eletroforética acontece. Sendo que a corrida conta com a polarização dos polos, gerando uma ddp no sistema, fazendo assim com que as moléculas que possuam carga negativa sigam para o polo positivo (anodo). De igual forma, as moléculas de carga positiva migram em direção ao cátodo (polo negativo), como simplificado na figura 9. [5]

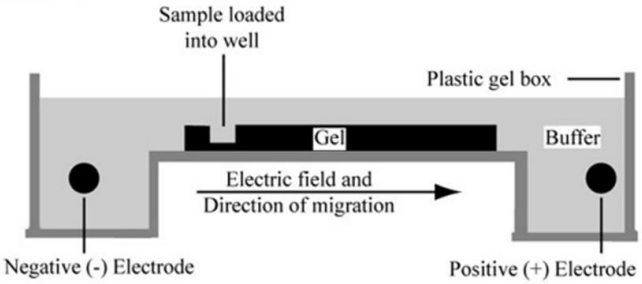

Figura 9. Exemplificação da cuba de eletroforese, demonstrando a direção de migração de moléculas presentes com carga negativa. Adaptação de [25].

O tampão ideal a ser usado em experimento deve produzir o mínimo de calor, possuir uma vida longa e uma boa condutividade. Afinal, tanto a força iônica como a composição influem diretamente com relação a migração e a qualidade da resolução de uma eletroforese.
A velocidade de migração pode ser associada à força iônica existente no sistema de forma proporcional e direta, ou seja, quanto menor for a força, mais lenta a migração ocorrerá. Ao passo que quanto maior a força iônica, maior será a condutividade elétrica [5]. Sendo que esse fato acarreta em um aumento de temperatura, o que pode ser prejudicial para o suporte, uma vez que ele pode se liquefazer. Dessa forma, é preciso observar e ficar atento para encontrar o ponto correto de força.

Mesmo conhecendo o tempo de vida útil dos tampões, é aconselhável que se troque o conteúdo da cuba quando a corrida se mostrar muito extensa. Para que dessa forma o tampão não tenha nenhuma influência nas migrações moleculares. Os tampões mais comumente utilizados com esses fins, pois cumprem os requisitos, são o TAE (Tris-Acetato-EDTA, pH=8) e o TAE (Tris-Borato-EDTA, pH=7,5). [5][13]

2.2.5. **Voltagem Aplicada**

O valor a ser empregado no sistema é determinado pela distância que os eletrodos se encontram, seguindo uma razão de 5 V/cm. Ou seja, supondo que houvesse uma distância de 10 cm entre o polo positivo e o polo negativo, a voltagem teórica ideal a ser utilizada seria de 50 V [10].

A intensidade da voltagem empregada é um fator determinante. Afinal, em um cenário de baixa voltagem, as moléculas da amostra iram migrar de forma diretamente proporcional com a voltagem aplicada. No entanto, em um cenário com altas voltagens a linearidade que existia, desaparece. Resultando em uma corrida na qual as moléculas mais volumosas consigam migrar de forma mais acelerada do que aquelas menores, ocasionado em uma grande perda de resolução [13].

Outro efeito que o emprego de uma alta voltagem causa é o superaquecimento do sistema, resultando no aparecimento de bandas em formato de arco. Ou seja, as amostras não migram de maneira homogênea através do gel.

2.2.6. **Temperatura Envolvida**

A temperatura que o sistema se encontra é muito importante, pois pode influir na corrida. Até mesmo por conta da alta e constante voltagem aplicada a temperatura associada ao tampão

e ao suporte aumentam, **a**fetando assim a resistência, tanto do gel como do tampão, e interferindo na migração. Dessa forma, a temperatura que se aconselha para realizar o emprego da técnica é entorno de 4°C [13].

2.2.7. **Limite de Resolução**

Um dos usos mais frequentes dessa técnica é para separação de compostos orgânicos, principalmente DNA. Tomando-o como exemplo, sabe-se que o Limite de Detecção (LD) é algo entorno de 10 ng/banda. Porém, quando ocorre um cenário no qual existem uma alta concentração, resulta em migrações mais aceleradas e bandas de menores tamanhos do que realmente deveria ser [10].

2.2.8. **Efeito de sobrecarga da amostra**

Em toda corrida de eletroforese em gel é de extrema importância que se estude a máxima quantidade que se consegue realizar a separação. Afinal, com uma concentração muito elevada, as grandes moléculas presentes na análise sofrem interação entre si, fazendo com que as moléculas de menor tamanho, que geralmente possuem uma velocidade mais elevada, acabem migrando com uma velocidade diferente [10].

2.2.9. **Amostra contaminada**

Vale ressaltar que, assim como em experimentos analíticos no geral, interferentes presentes na amostra podem influenciar de forma prejudicial a determinação dos analitos. Ou seja, a presença desses podem retardar o fracionamento.

2.2.10. Protocolo para preparação do gel e aplicação das amostras no suporte.

Para a preparação do suporte é pesado uma determinada quantidade de agarose, o suficiente para se alcançar a concentração de gel desejada, e misturado em um Erlenmeyer com volume de tampão previamente medido. Então, coloca-se a vidraria dentro de um forno micro-ondas até que a solução se torne homogênea e transparente, sendo que para isso o aquecimento deve ser observado até que a mesma atinja um princípio de ebulição. Na sequência, essa solução é transferida para dentro de um molde, que dá a forma do gel. Vale ressaltar que a forma do gel é um fator chave, afinal ele influencia o comprimento, a largura e a altura do mesmo. Para formação dos poços, local de aplicação das amostras, é utilizado um pente o qual é depositado

no gel durante o período de gelificação, que acontece dentro de aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente [5].

Posterior a polimerização do gel, esse é transferido para dentro da cuba de eletroforese, conforme a figura 9, aonde deve ser vertida a quantidade de tampão suficiente para que o gel fique submerso.

As amostras, previamente preparadas, devem ser aplicadas dentro dos poços estruturados pelo pente. A aplicação desta é feita com uma micropipeta, para que a aplicação seja mais precisa. Posteriormente, os cabos de tensão são conectados e então aplica-se a voltagem determinada, referente a distância entre os eletrodos fixos. Após isso, basta observar o fracionamento ocorrendo, pausar a corrida quando a separação estiver com boa resolução e avaliar as migrações. No caso de análise de DNA, expõe-se o gel a luz UV, afim de possibilitar sua visualização. Seguida de documentação das observações.

2.3. A utilização de imagens digitais para determinação

A instrumentação comumente utilizada para análise química laboratorial são os espectrofotômetros e espectrofluorímetros. Contudo, estudos vem mostrando que a busca por métodos alternativos de análise vem se fortalecendo. Dentre essas alternativas, vale ressaltar as imagens digitais, foco desse trabalho. Então, de forma simples as câmeras fotográficas, scanners, webcams, smartphones registram a imagem em questão, conseguindo a partir desta extrair dados qualitativos e quantitativos [14][15]. Essa determinação é realizada baseada em valores de cor, principalmente o RGB (proveniente do inglês Red, Blue e Green). As imagens digitais possuem um resultado bastante preciso, a ponto de se tornar uma boa alternativa (além de possuir menor custo) para algumas medidas [16].

Basicamente, uma imagem é composta por partes menores, as quais são chamados pixels. Tecnicamente, eles podem ser definidos como sendo uma função bidimensional relacionada a intensidade da luz refletida ou emitida por um corpo. Ou seja, enquanto uma parte é absorvida pelo corpo, a outra é transmitida e refletida. Dessa forma, é possível que equipamentos eletrônicos consigam captar tal energia não absorvida.

Exemplo desses equipamentos são os sensores CCD (charge-coupled device), os quais tem a acapacidade de digitalizar a imagem e a partir daí, converter os sinais colorimétricos em combinações de agrupamentos com valores determinados referente a coloração vermelha(R), verde(G) e azul (B)[18].

A utilização desse recurso vem ganhando cada vez mais força nas diversas áreas do conhecimento. Como por exemplo, dentro da tecnologia de alimentos para a inspeção visual de frutas [19], dentro da área forense para determinação de resíduos de metanfetamina através da câmera do celular [20], dentro da medicina para diagnostico de insuficiência renal através da creatinina contida em amostras de urina [21], sendo possível aplicar até mesmo para identificação de adulteração do leite da vaca de forma mais simples e segura [22], através da construção de escalas padrões RGB [17].

De forma exemplificativa, a Figura 10 representa como ocorre uma determinação de um analito X, através dos valores de sinais RGB presentes na imagem. Para isso foi-se adicionado uma concentração crescente de um composto da cor laranja, variando de 5 a 25 mg. L^{-1} contidas em balões volumétricos. Utilizando a câmera digital de um smartphone ou uma webcam registra-se as imagens dois balões sob a mesma condição de iluminação e, através de um software de imagens, obtém -se os valores de R, G e B dos pixels de uma região específica dos balões como mostra a Figura 10.

Pode-se observar que o componente B (Blue) sofre uma influência atenuante conforme o aumento da concentração de analito. Ajustando o valor máximo de sinal, é possível determinar uma relação entre a concentração de analito e o sinal analítico.

Como mostra a Figura 10, para se obter uma curva analítica ascendente, o valor de saturação da componente B (valor decimal máximo para um número de oito bits, 255) é subtraído do valor de B para cada concentração, o que gera uma resposta linear. De fato, a literatura mostra que é possível utilizar não só uma componente para a realização das medidas, mas também combinações dessas componentes e também outros sistemas de cores como CMYK e HSV [23].

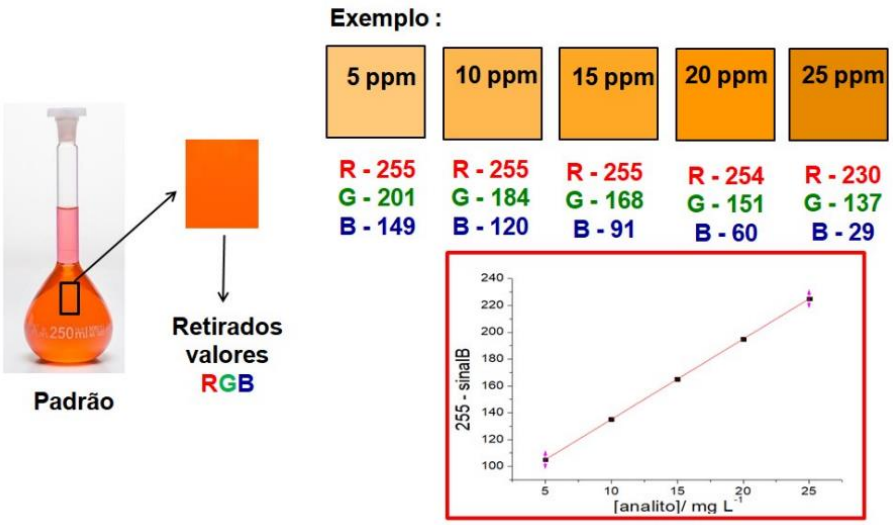

Figura 10. Exemplificação de determinação de analito, através de valores RGB provenientes das imagens. Adaptação de [24].

2.4. Corantes alimentícios

Os corantes são classificados como uma substancias ou mistura de substancias que são adicionados ao alimento (daí vem o nome aditivo alimentar), afim de conferir uma determinada cor ou apenas intensificar a coloração já existente no alimento. A utilização deste aditivo tem sido cada vez mais disseminada dentro das indústrias alimentícias, afinal a aparência dos alimentos estimula a aceitação de muitos produtos pelos consumidores. Contudo, a emprego destes não podem ser feitos de forma descabida. É necessário que se siga uma série de normas. Além de ser obrigatório que o fabricante informe a presença dos corantes utilizados e suas especificações, geralmente feito pelos rótulos do produto. Como exemplo, é o caso da Resolução RDC nº 259/2002 da ANVISA/MS, que determina que os aditivos devem aparecer de forma expressa, nomeando-o ou número de INS (Sistema Internacional de Numeração, Codex Alimentarius FAO/OMS)[24][27].

Atualmente, é permitido dentro do Brasil apenas 3 categorias de corantes, sendo eles os corantes artificiais, corantes naturais e caramelo. Determina-se como natural aqueles que possuem sua origem de substancias vegetais ou animais. O corante caramelo advém de açucares expostos a grandes aquecimentos, sendo necessário atingir uma zona acima do ponto de fusão. Ao passo que os corantes artificiais são produzidos organicamente com uma determinada composição química.

Algumas das principais vantagens na utilização da categoria dos corantes artificiais são a sua elevada estabilidade na presença de agentes externos, como luz, oxigênio e calor. A

uniformidade da cor gerada, efetiva e fácil tintura e um custo de produção baixo. Existem 11 corantes permitidos dentro do território, são eles: amarelo crepúsculo, azul brilhante, amaranto, indigotina, vermelho 40, eritrozina, ponceau 4R, tartrazina, verde rápido, azul patente V e azorrubina.

A utilização dessa categoria, apesar de ser largamente utilizada, vem a ser um desserviço à saúde das pessoas. Estudos mostram que sua larga ingestão pode ser associada a reações como alergias, alterações de comportamento e até carcinogenicidade [26].

Cerca de 90% do peso de todos os corantes que são adicionados nos alimentos e bebidas consumidos em todo mundo são da categoria do caramelo. Sendo um dos mais antigos aditivos alimentares utilizados, atualmente, pode se chegar a 200.000 toneladas/ano [27].

Aja vista o aumento na utilização de aditivos alimentares, o controle sobre o emprego deles em alimentos deve ser realizado com esmero, afinal grande parte desses aditivos possuem um potencial toxico e cancerígeno associado a si. Para tal, existem diversos métodos já testados e validados para determinação de misturas de corantes presentes em alimentos. Como é o caso da espectrofotometria sensível, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o próprio HPLC acoplado a um espectrofotômetro de massa (MS), espectrofotometria utilizando quimiometria, extração em fase sólida e cromatografia gasosa [27].

Recentemente, nosso grupo de pesquisas desenvolveu um método alternativo baseado em eletroforese acoplada a utilização de imagem digital para posterior determinação qualitativa e quantitativa. O qual foi demonstrada a possibilidade de separar e quantificar os corantes em misturas binárias que geram a coloração roxa (combinação de vermelho e azul) e também a coloração laranja, combinação de corantes amarelos (tartrazina e crepúsculo), porém não foi avaliada a possibilidade de utilização desse método para determinação de amostras com 3 componentes de corante, como é o caso de alimentos de cor verde. Sendo assim, este trabalho visa avançar com o método desenvolvido, como uma forma alternativa mais prática e barata para identificação e quantificação de corantes em alimentos. Podendo até ser um método para melhor acompanhamento do emprego de corantes no dia a dia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Para as soluções empregadas neste trabalho, utilizou-se os seguintes reagentes com suas determinadas purezas e marca.

- Agarose, Gibco Brl;
- Glicose ($C_6H_{12}O_6$), pureza 99,0%, Sigma-Aldrich;
- Tampão TAE 50X;
- Tampão TAE 1X;
- Azul brilhante ($C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_2$) 90%;
- Amarelo Tartrazina ($C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$), 90%;
- Amarelo Crepúsculo ($C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$), 90%;
- Refrigerante Sprite.

3.2 Aparatos

Para o desenvolvimento do trabalho, utilizou-se os seguintes APARATOS:

- Caixa de madeira (25 cm largura x 35 cm comprimento x 23 cm altura);
- Fita de Leds brancos;
- Webcam de alta definição – Logitech HD 1080p- 15MP;
- Balança analítica, Shimadzu, precisão de 0,0001g;
- Cuba de eletroforese – Major Science e Fonte de eletroforese 300V - K33- Kasvi;
- Forno Microondas – LG Modelo MS2355RA, 220V – 60 Hz – 1000W.

3.3 Ambiente de luz controlada

O ambiente construído possui as dimensões de 25cm de largura por 35cm de comprimento por 23cm de altura (Figura 11). Na tampa da caixa foi inserido uma fita de LED com 15 emissores brancos, conforme a Figura 12.

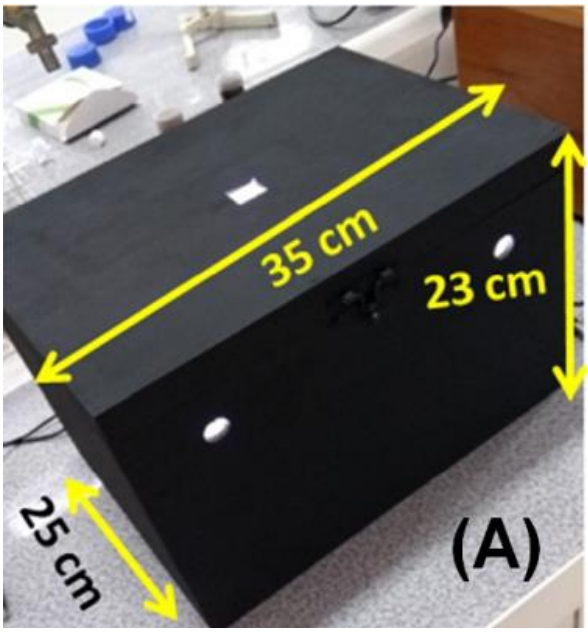

Figura 11. Dimensões da caixa de madeira, objetivando um ambiente de luz controlada . Adaptação de [24].

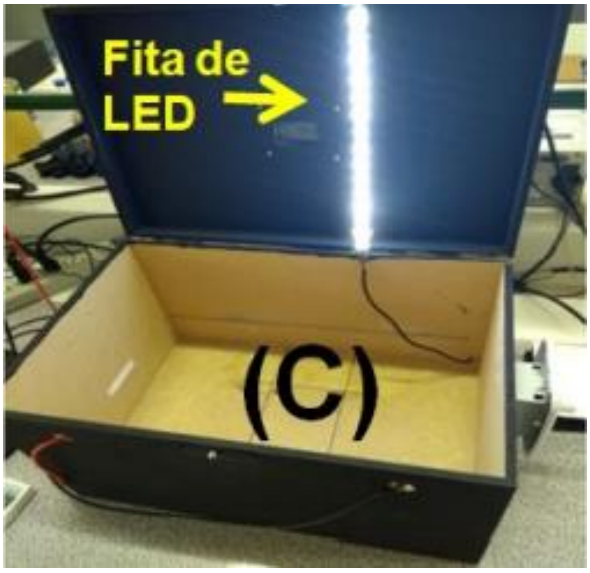

Figura 12. Demonstração da colocação da fita de LED na tampa da caixa. Adaptação de [24].

Para melhor acomodação da cuba de eletroforese fixou-se um suporte no centro do fundo da caixa, aonde foram realizadas as medições. Para que fosse possível passar os cabos e conectar nos eletrodos da cuba, foram realizados dois orifícios na parte da frente da caixa. Foi confeccionado um outro orifício retangular na tampa da caixa, aonde será encaixada uma webcam, para posterior aquisição de imagens. (Figura 12)

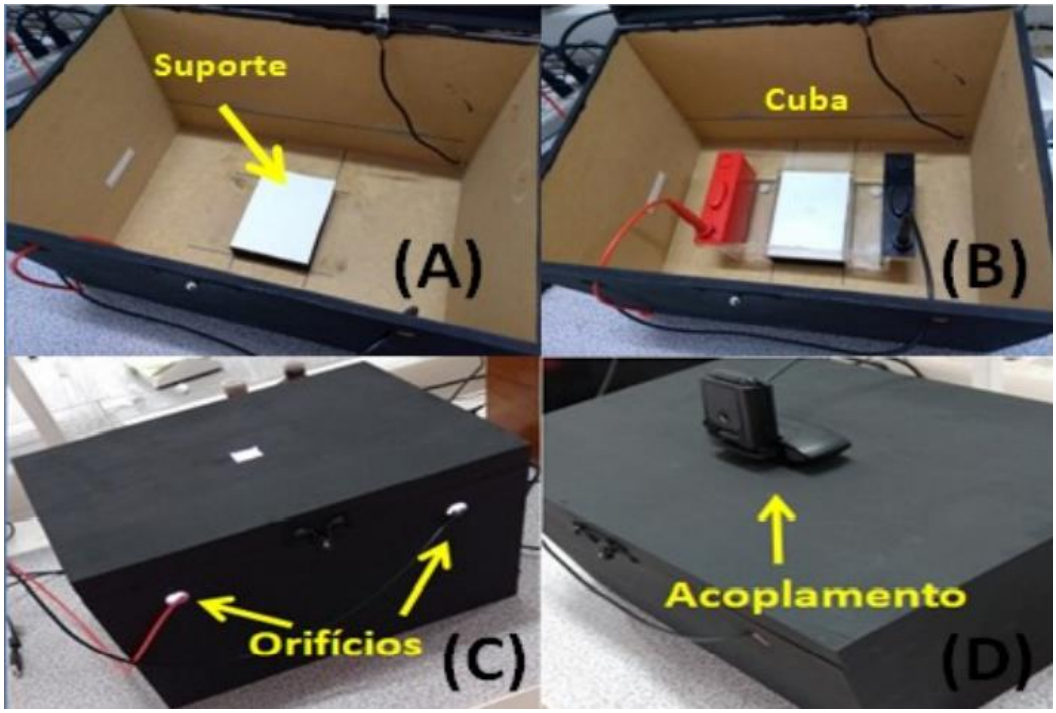

Figura 13. Suporte, cuba, orifícios, webcam. Adaptação de [24].

3.4 Programa de computador utilizado para detecção e leitura das imagens digitais

Para que fosse possível realizar a leitura dos sinais gerados em tempo real pela corrida eletroforética foi desenvolvido um programa de computador em VisualStudio 2013. A detecção dos analitos fracionados pela eletroforese em gel foi baseada no padrão colorimétrico do sistema RGB das imagens geradas.

A imagem gerada pela Webcam de alta definição é transmitida em tempo real durante a corrida eletroforética (Figura 14A) e apresentada no canto superior esquerdo da interface. É possível notar que existem 9 amostradores (pequenos retângulos) localizados sobre a imagem, cujo objetivo é a leitura dos sinais de RGB de posições específicas da imagem. Para cada um desses amostradores é possível que se varie suas dimensões (largura e comprimento), bem como a sua localização sobre a imagem, visando sempre a cobrir as regiões as quais serão tomados os sinais médios para cada amostrador, referente ao conjunto de pixels em seu interior.

O usuário também deve definir o número de leituras (deslocamento, em pixels, dos amostradores ao longo da trilha de separação) necessário para se adquirir os picos para as substâncias separadas e o número de medidas/imagens a ser utilizado para cada posição do amostrador durante a aquisição do sinal (Figura 12C). O analista precisa, ainda, posicionar corretamente o ponto inicial da leitura (posição inicial dos amostradores), devendo ser

imediatamente antes das bandas separadas mais próximas dos pontos de aplicação (poços). Durante o período da corrida, os amostradores percorrem, pixel a pixel, o mesmo sentido do fracionamento adquirindo os valores de sinais RGB, os quais são plotados para cada amostrador. Dando origem a um sinal R, G e B para cada um dos spots.

Com base na interface apresentada na Figura X as alterações possíveis para os amostradores de RGB são resumidas a seguir

- **Altura:** definição da altura do retângulo, com objetivo de obter os sinais digitais.
- **Largura:** definição da largura do retângulo, com objetivo de obter os sinais digitais.
- **Fator X:** definição do distanciamento no eixo X entre amostradores.
- **Fator Y:** definição do distanciamento no eixo Y entre amostradores
- **Coordenada X:** definição do posicionamento dos amostradores no sentido horizontal.
- **Coordenada Y:** definição do posicionamento dos amostradores no sentido vertical.
- **Gap Y:** definição de distanciamento entre amostradores no sentido vertical

Uma vez realizado os devidos ajustes, é possível que sejam lidos 7 amostradores de forma simultânea na mesma corrida. Seria viável ler mais, porém as amostras ficariam aplicadas muito juntas podendo ocasionar uma possível interferência entre si, dificultando assim a leitura dos sinais referentes ao mesmo analito separados em trilhas paralelas. O software também permite a visualização dos eletroferogramas através da janela localizada na parte superior direita da interface (Figura 14D).

De maneira resumida, o processo de leitura, necessita do posicionamento adequado do gel dentro da cuba, de forma que fique bem centralizado e com foco adequado na imagem em tempo real. Após os ajustes descritos anteriormente, pressiona-se o botão start, o que fará com que o usuário escolha um nome e um local para guardar o arquivo final das leituras obtidas na corrida e na sequência pressionar o botão shot para começar a leitura.

Deve-se destacar que o botão “shot” pode ser acionado a qualquer momento da corrida para a obtenção de novos eletroferogramas sob as mesmas condições pré-estabelecidas. Isso permite ao usuário fazer várias medidas durante a separação e escolher, posteriormente, o momento em que houve maior resolução para a separação os picos.

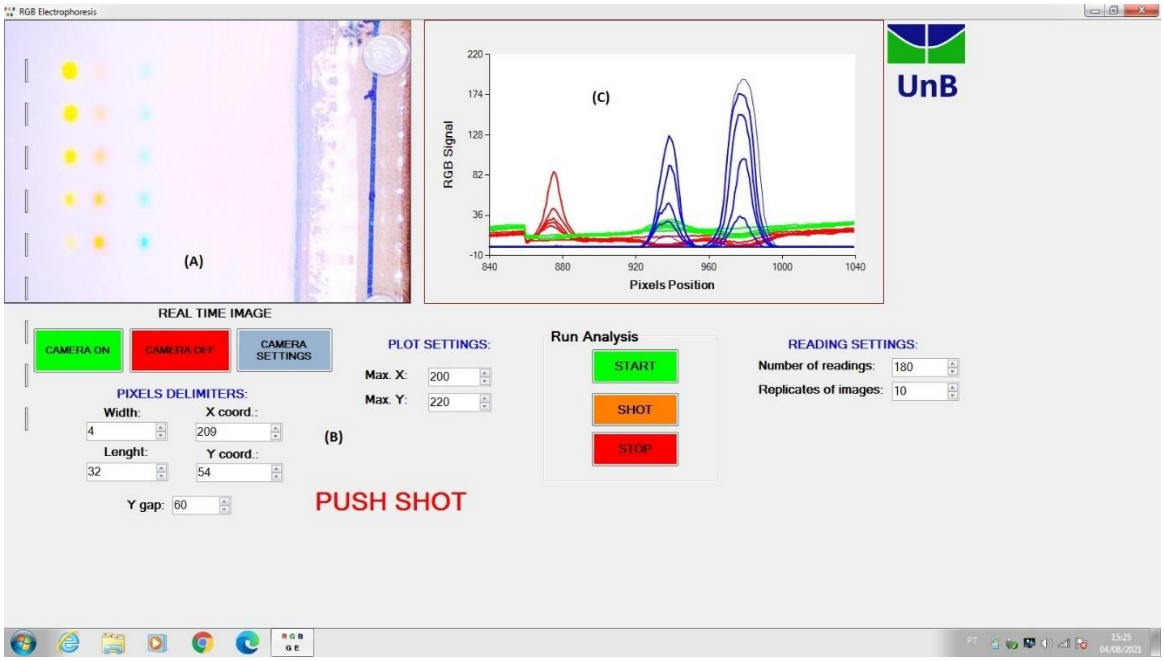

Figura 14. Interface do programa utilizado para obtenção dos eletroferogramas. Visão do gel durante a corrida (A), região de ajustes dos amostradores (B), o número de leituras (C) e eletroferograma adquirido pela leitura, pixel a pixel, pelo programa (D).

3.5 Preparação do gel e aplicação das soluções

Os géis utilizados durante a realização deste trabalho foram todos preparados através da dissolução de 1,0 g de agarose em cerca de 60 mL do tampão de corrida (TBE) dentro de um Erlenmeyer de 250 mL, levando a mistura para aquecimento até o ponto de início de fervura em um forno de micro-ondas. Após o aquecimento, com o auxílio de uma luva térmica, retira-se a solução do forno, agita-se manualmente e então transfere-se a mistura ainda quente para o molde (Figura 15A), onde ocorrerá a polimerização.

Para aplicação das amostras, é necessário que se grave os poços no gel. Para isso, um pente (Figura 15B) com 16 dentes é devidamente posicionado sobre a mistura quente de agarose definindo os poços (Figura 15C). Após, a gelificação (cerca de 25 minutos depois), retira-se as laterais do molde, depois o pente (Figura 13D), conferindo se os poços (16 unidades) estão uniformes. Vale destacar que, nas medidas realizadas nesse estudo, as amostras/padrões foram aplicadas de forma alternada de modo que um poço continha a solução a ser separada e os seus dois vizinhos mais próximos não eram preenchidos com nenhuma solução.

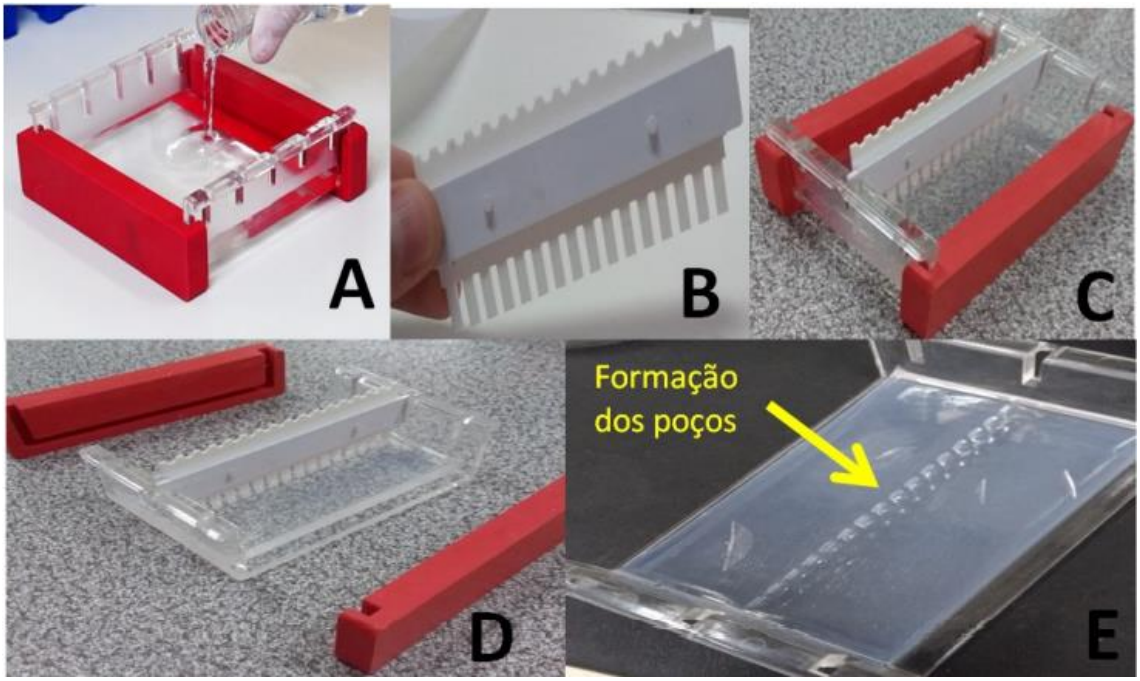

Figura 15. Protocolo de preparação do gel de agarose. Adaptação de [24].

3.6 Procedimento para as medidas

Para realizar as medições, seguiu-se o processo a seguir. Primeiro o gel era depositado dentro da cuba de eletroforese, e na sequencia era inserido a solução de corrida (solução tampão) até o ponto de imergir completamente o gel, cerca de 0,5 cm acima de sua superfície (aproximando-se de 200 mL de solução tampão).

Na sequência, aplicam-se as amostras/padrões. De acordo com ensaios realizados, o volume adequado de amostra a ser empregado é de 20 µL. Sendo que para a aplicação é mais conveniente fracionar em duas vezes, utilizando uma micropipeta de 10 µL, de forma a evitar o transbordamento de amostra do poço (mesmo podendo aumentar o erro associado a múltiplas aplicações). Além disso, é de extrema importância ressaltar que as amostras foram devidamente saturadas com glicose 20%, objetivando um aumento de densidade à solução, impedindo que a mesma flutue do fundo dos poços.

Posteriormente, ajusta-se a corrente de 700 mA e o potencial de 250 V, na fonte, e realiza-se a corrida eletroforética até o momento que houver uma separação nítida entre os analitos.

É importante destacar que as configurações realizadas na câmera para determinada medida, pode não se aplicar a outra. Dessa forma, é necessário que que se ajuste as propriedades da

imagem antes da aquisição de todos os sinais, a fim de adquirir imagens fidedignas com as separações reais.

3.7 Estudo realizado com corantes alimentícios da cor verde

Inicialmente, foi necessário avaliar se era possível realizar separação do corante verde, bem como sua quantificação por imagem digital.

3.7.1 Preparação e avaliação qualitativa de amostras

Para essa parte do trabalho preparou-se soluções de algumas amostras, como chicletes, confeitos de chocolate coloridos, balas de menta e algodão doce industrializado. As amostras de chiclete e bala de menta foram preparadas dissolvendo o 1 espécime em cerca de 2,0 mL de glicose 20 %. Para os confeitos de chocolate foram separados 6 espécimes, sendo os invólucros dissolvidos em cerca de 2,0 mL de glicose 20 %. Para o algodão doce, apenas dissolveu-se uma porção de 1,0 g do produto em um pequeno volume de água destilada.

Vale ressaltar que todas as corridas realizadas com os corantes foram submetidas as mesmas condições experimentais.

3.8 Separação e avaliação quantitativa do Azul brilhante, Amarelo Crepúsculo e Amarelo Tartrazina

Buscou-se verificar a possibilidade de separação eletroforética, bem como a quantificação dos corantes azul brilhante, amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo (mesmo que em menor quantidade), comumente utilizados em produtos da cor verde, como balas, chicletes, etc.

Para alcançar tal objetivo foram preparadas soluções padrões contendo a mistura desses corantes em diferentes concentrações, para que assim fossem determinadas as faixas de concentração de calibração para o método proposto. No preparo, propriamente dito, utilizou-se corantes em pó que foram fornecidos pela empresa Novo Aroma (os quais vieram acompanhados com atestado de pureza, sabendo que esse é um fator importante para desenvolvimento do trabalho). Considerando o nível de pureza definiu-se a massa adequada de cada corante para dissolução em água destilada, de forma a se obter as soluções estoques com concentração exata de 1,0 % (m/v) de cada corante (ou seja, dissolveu-se 1,0000 g de corante em 100 mL de água).

O próximo passo foi preparar as soluções ternárias padrões com os corantes de estudo. Para isso, alíquotas adequadas das soluções estoque foram diluídas em solução de glicose 20 % de modo a se compor as cinco soluções apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Composição das soluções ternárias dos padrões.

SOLUÇÃO PADRÃO	AZUL BRILHANTE (mg L^{-1})	AMARELO CREPÚSCULO (mg L^{-1})	AMARELO TARTRAZINA (mg L^{-1})
I	12	100	300
II	16	150	250
III	20	200	200
IV	24	250	150
V	28	300	100

Para que se pudesse avaliar a exatidão do método, foram realizados testes de recuperação utilizando como matriz um refrigerante de limão incolor. Então, alíquotas adequadas dos estoques dos três padrões de corantes foram adicionadas à matriz, simulando uma bebida açucarada e colorida artificialmente. Os testes foram realizados utilizando concentrações idênticas dos corantes contidos na solução III da Tabela 2. Escolheu-se tais concentrações para que fosse possível avaliar a resposta do sistema para uma amostra com concentrações na região central da curva de calibração.

Vale destacar que todas as amostras receberam adições de glicose (até a concentração de 20 % (m/V)) objetivando aumentar a densidade das mesmas para que não houvesse dispersão durante a aplicação nos poços do gel, e sem afetar a concentração dos corantes presentes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Separação e avaliação da faixa linear de calibração

Durante a realização desse trabalho, utilizou-se produtos comerciais coloridos artificialmente em verde. Tal tonalidade é resultado da mistura de outros corantes conhecidos pela indústria alimentícia chamados azul brilhante (AB) e Amarelo Tartrazina (AT). Sendo que, em alguns casos, pode existir a adição de um terceiro corante chamado de Amarelo Crepúsculo (AC). Sabendo dessa informação, partiu-se para o passo de avaliar como se comportavam esses corantes durante a aplicação de um campo elétrico através do gel e, posteriormente avaliar a possibilidade de sua quantificação.

Conforme indicam as Figuras 16 e 17, as separações dos três corantes ocorreram de forma satisfatória, permitindo a obtenção de eletroferogramas cujos picos aumentam com o aumento da concentração. Vale destacar que, diferente de um método cromatográfico em coluna, todas as bandas, para todas as concentrações, são detectadas ao mesmo tempo, o que torna a medida bastante rápida. Como pode ser visto na Figura 16 os primeiros picos referem-se a componente R de RGB, a qual responde ao azul brilhante. O segundo e terceiro picos, respondem ao sinal B de RGB, sendo que, devido às suas características, o amarelo tartrazina (3) migra mais rapidamente que o amarelo crepúsculo (2) durante a separação eletroforética.

O fato de o azul brilhante responder à componente vermelha de RGB e os corantes amarelos responderem à componente azul de RGB pode ser explicada pelo conceito de cores complementares [28] em que a luz vermelha é absorvida por compostos de cor vermelho/laranja e a luz azul é absorvida por compostos de cor amarela/laranja. De fato, os sinais apresentados na Figura 16 advém da subtração do valor 255 (máxima intensidade de cor para R, G e B) do sinal obtido para cada componente (i. e. 255-R ou 255-B). Isso é necessário para manter os picos crescentes com o aumento das concentrações, uma vez que os sinais de R e B puros diminuem com o aumento da intensidade das cores azul e vermelho, respectivamente. Para reforçar, sabe-se que a absortividade molar máxima do AB é 1637 $L.mol^{-1}$ no comprimento de onda de 629 nm (zona de cor referente ao vermelho), a absortividade do AC é 551 $L.mol^{-1}$ no comprimento de 480 nm (zona de cor referente ao azul) e a absortividade do AT é 527 $L.mol^{-1}$ no comprimento de onda de 426 (zona de cor referente ao azul), o que corrobora para a interpretação das respostas em cada componente de RGB [28].

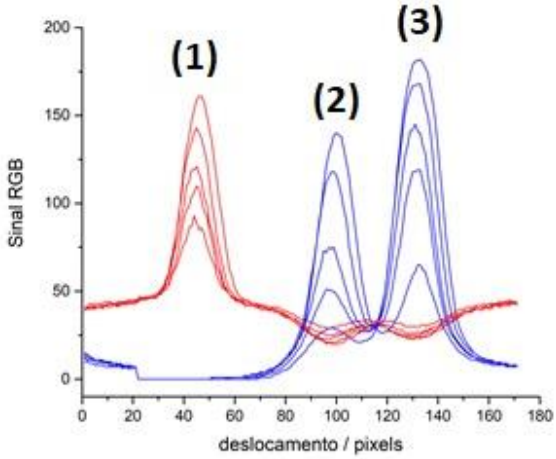

Figura 16. Resposta do sinal RGB no eletroferograma aos corantes Azul Brilhante (1), Amarelo Crepúsculo (2) e Amarelo Tartrazina (3).

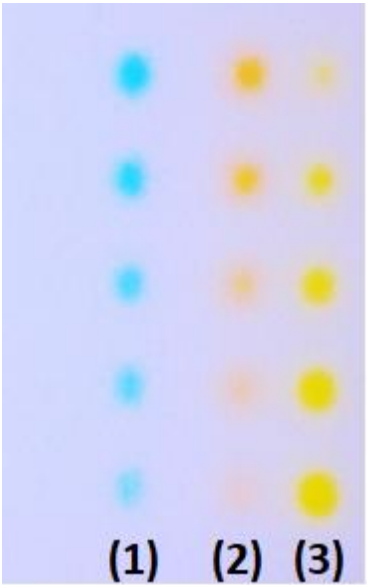

Figura 17. Demonstração da separação da amostra nos 3 corantes. Sendo Azul Brilhante (1), Amarelo Crepúsculo (2) e Amarelo Tartrazina (3).

É de extrema importância que se leve em consideração a forma como os analitos se comportam dentro do suporte durante e após a corrida. Afinal, é sabido que conforme o tempo de corrida se estende e o fracionamento é interrompido após a corrida, os analitos começam a se dispersar no gel, diminuindo a resolução pelo aumento das bandas e picos e diminuição da intensidade dos sinais, o que acaba por prejudicar a leitura e quantificação.

Para minimizar esse problema, as concentrações de AC e AT nos padrões foram determinadas de forma que o padrão mais concentrado em AT fosse a menos concentrada em

AC, conforme mostra a Tabela 2. Observa-se, porém, que, mesmo com essa estratégia não foi possível retornar ao sinal da linha de base entre os picos para os corantes AT e AC (Figura 16).

A Figura 17 mostra o suporte após a corrida eletroforética. É nítido que o azul brilhante é o que menos avança no gel. Isso acontece devido as moléculas dele apresentarem maior massa molar (792,84 g.mol^{-1}) comparado aos demais corantes, justificando assim a sua migração mais lenta, devido seu tamanho.

Outra propriedade que justifica a diferença na migração é a carga liquida das moléculas presentes no meio de estudo. Nesse meio (cujo pH é 8,5), as moléculas de AB (Figura 18) assumem carga de "-2", por conta das 3 cargas negativas presentes nos ácidos sulfônicos, com uma carga positiva presente no íon amônio. Dessa forma, como discutido anteriormente, há uma relação proporcional entre a carga negativa da molécula com sua velocidade de migração. Afinal, esta é atraída de forma mais acentuada pelo ânodo (eletrodo positivo).

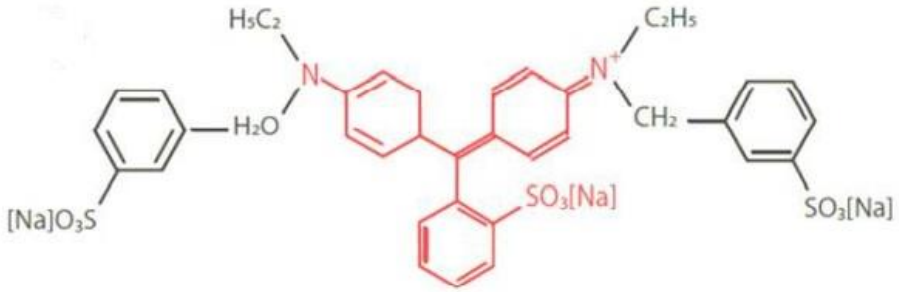

Figura 18. Fórmula estrutural do azul brilhante.

Já o amarelo tartrazina possui uma migração mais acelerada no gel, quando comparada ao amarelo crepúsculo. Na Figura 16 é perceptível a existência de 2 picos distintos referente aos corantes amarelos. Parte desse comportamento se deve as moléculas do AC apresentarem maior massa molar (452,36 g.mol^{-1}) quando comparadas as moléculas de AT (434,35 g.mol^{-1}). Contudo, essa diferença de massa é bastante pequena de modo que o principal fator que interfere na migração é possivelmente a diferença de carga liquida nas moléculas. Nesse meio (cujo pH é 8,5), as moléculas de AC (Figura 19A) assumem carga de "-2", devido as 2 cargas negativas presentes nos ácidos sulfônicos. Enquanto que a molécula de AT (Figura 19B) assume carga de "-3", por conta dos 3 grupos sulfônicos presentes (sem interferência do grupo fenólico em ambos os corantes, devido seu pka ser 10). Dessa forma, como discutido anteriormente, a velocidade de migração é maior para as moléculas mais negativas de AT. Afinal, esta é atraída de forma mais acentuada pelo ânodo (eletrodo positivo).

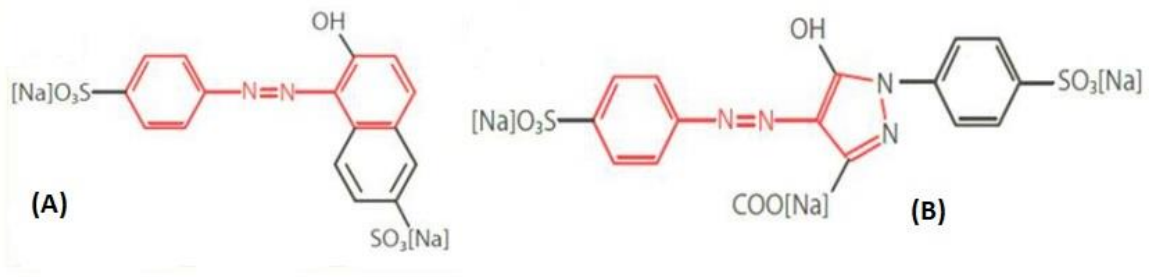

Figura 19. Fórmula estrutural do amarelo crepúsculo (A) e amarelo tartrazina (B).

.

4.2 Avaliação quantitativa para azul brilhante, Amarelo Crepúsculo e Amarelo Tartrazina

Com base nas alturas dos picos do eletroferograma da Figura 16 construiu-se as curvas analíticas mostradas nas Figuras 20 a 23. A calibração com a faixa escolhida para o AB se mostrou adequada com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,991 ao se utilizar os cinco pontos propostos. Para o amarelo crepúsculo obteve-se um R^2 de 0,984 (R = 0,991) que indica uma linearidade menor, mas que ainda pode ser considerada satisfatória considerando o uso da altura do pico como sinal analítico e a simplicidade do sistema de detecção. Já para o amarelo tartrazina (Figura 22), houve um achatamento da curva que impediu a calibração linear com os cinco pontos, de modo que uma readequação das concentrações para esse analito é necessária de modo a permitir uma calibração linear. Mesmo assim, ao se desconsiderar o ponto de menor concentração (Figura 23) obteve-se um coeficiente de determinação de 0,983 (R=0,991), indicando a possibilidade de calibração linear com os devidos ajustes. Infelizmente, não foi possível realizar esses ajustes devido ao tempo exíguo e às restrições impostas pela pandemia que restringiram o acesso ao laboratório.

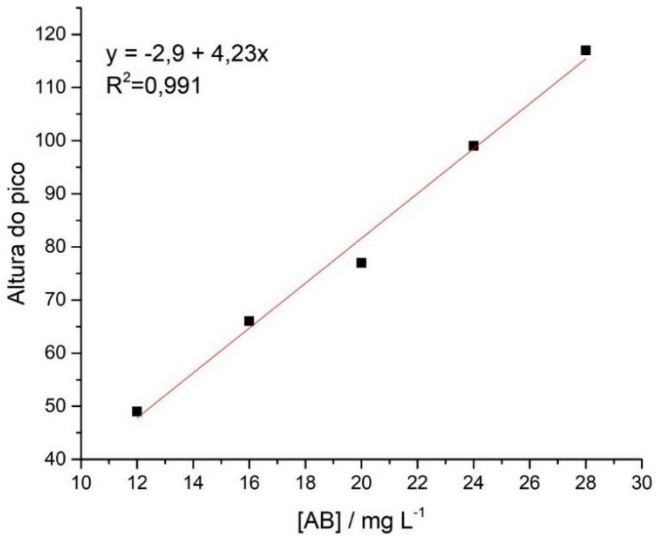

Figura 20. Curva analítica para o corante Amarelo Tartrazina.

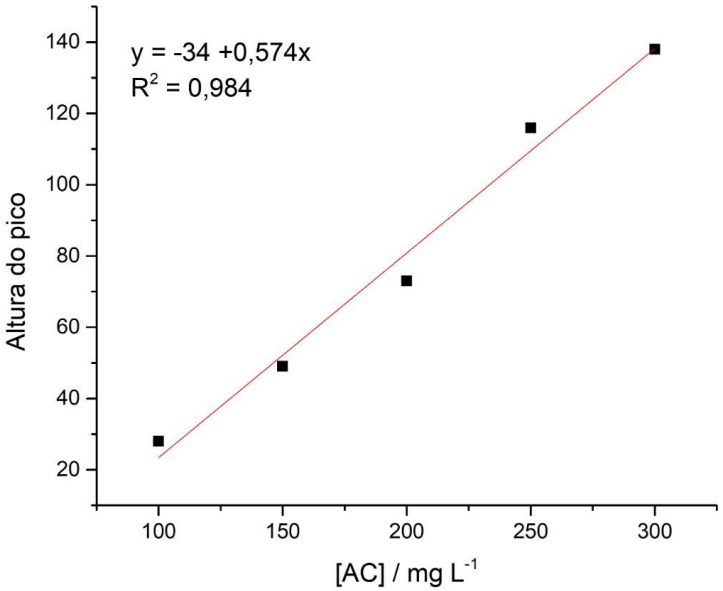

Figura 21. Curva analítica para o corante Amarelo Crepúsculo.

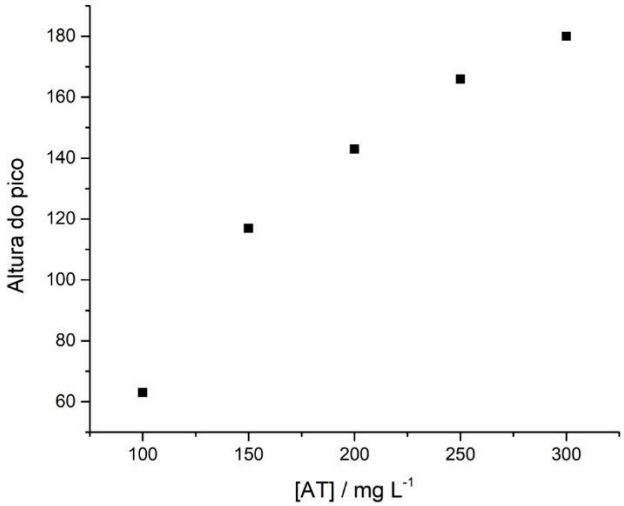

Figura 22. Curva analítica para o corante Amarelo Tartrazina.

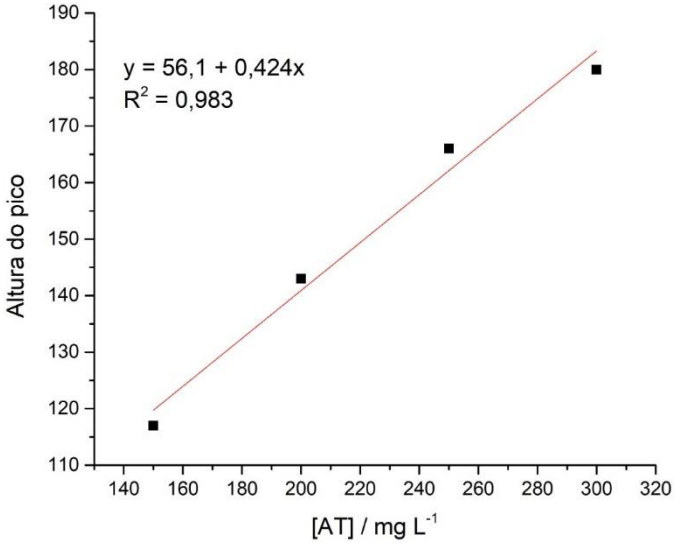

Figura 22. Curva analítica para o corante Amarelo Tartrazina com 4 pontos.

Os limites de detecção para os três analitos foram calculados com base em uma resposta hipotética com razão sinal/ruído igual a 3 [31], sendo estimados os valores de 1,5 mg L^{-1} para o AB; 28,3 mg L^{-1} para o AC e 10,7 mg L^{-1} para o AT. Acredita-se que esses valores atendam às necessidades para a determinações em alimentos industrializados, mas investigações complementares precisam ser realizadas para a sua confirmação.

4.3 Ensaio de precisão

As Figuras 24 e 25 mostram o eletroferograma e a fotografia do gel ao fim das medidas para o ensaio de precisão, respectivamente. Adicionalmente, a Tabela 3 lista os valores médios das alturas dos picos acompanhados dos respectivos desvios padrão e coeficientes de variação.

Tabela 3. Repetibilidade do método

Corante	Altura média	DP	C.V. %
AB	64	3	4,5
AC	90	2	2,4
AT	125	4	3,4

Como pode ser visto, coeficientes de variação abaixo de 5 % foram observados para as 6 aplicações, mostrando uma boa precisão das medidas. De fato, deve-se considerar que houve um bom controle das variáveis que podem afetar a altura dos picos, como a uniformidade do gel em toda a sua extensão, a aplicação das amostras com a micropipeta e a uniformidade da iluminação ao longo das trilhas de detecção.

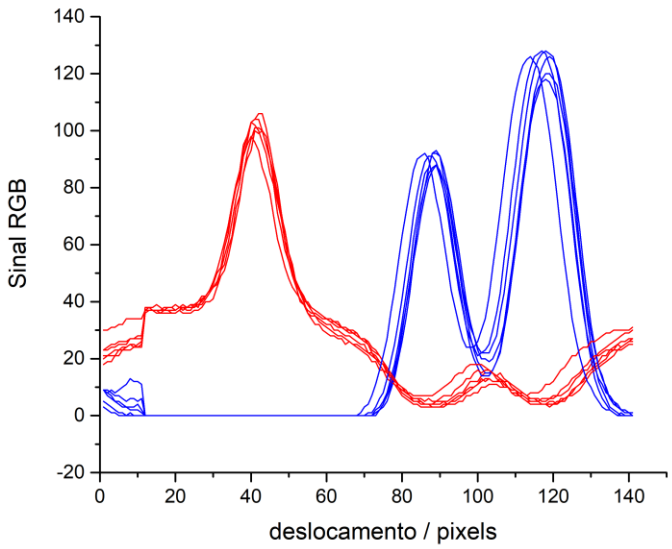

Figura 24. Resposta RGB no eletroferograma referente a repetibilidade do método.

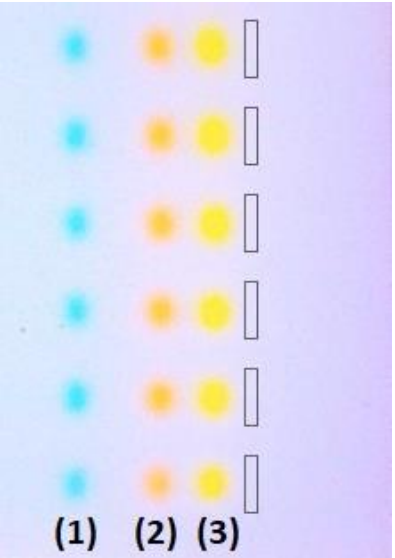

Figura 25. Ensaio de repetibilidade.

4.4 Teste de recuperação

Uma corrida foi realizada utilizando 7 spots do gel. Sendo que 3 deles foram utilizados para injeção da amostra (refrigerante com padrão) e os outros 4 spots foram utilizados para injeção dos padrões I, II, III e IV para a construção das curvas analíticas. Conforme apresentado no eletroferograma da Figura 26, nota-se que existe um acumulo de 4 linhas na região do padrão III referente às 3 amostras e a solução padrão de calibração nesse ponto.

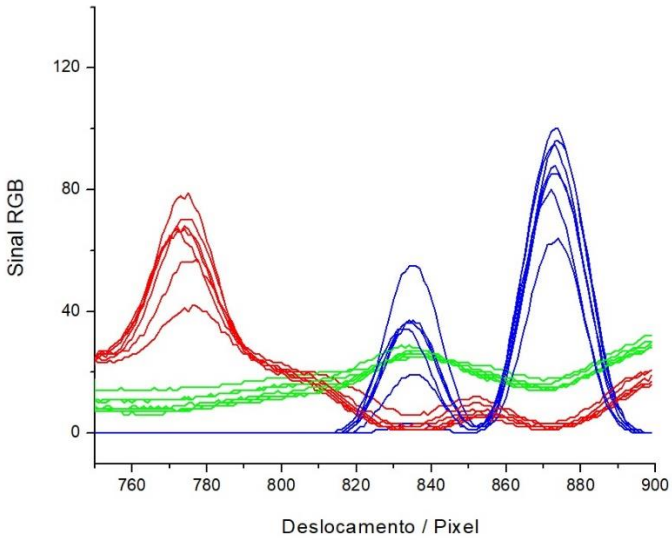

Figura 26. Eletroferograma referente a corrida de recuperação.

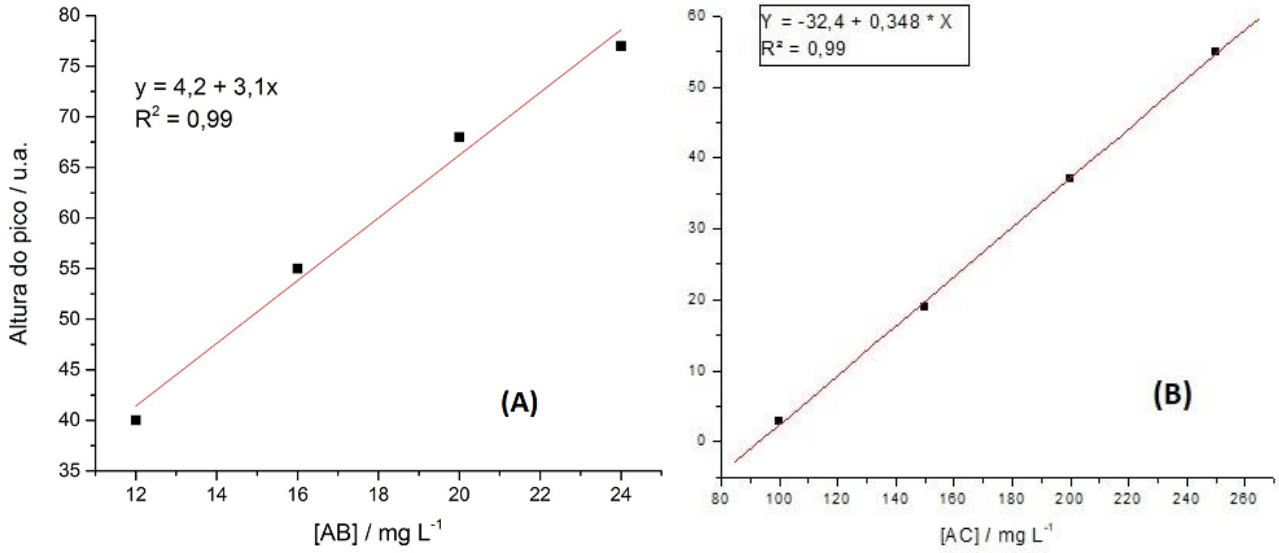

Figura 27. Curvas analíticas para a determinar recuperação de Azul Brilhante (A) e Amarelo Crepúsculo (B).

Com as alturas dos picos e a equação da reta gerada pelas curvas analíticas encontrou-se os valores referentes a concentração dos corantes, como listado na Tabela 4, nota-se que a taxa de recuperação média para o AB foi de 98,1% e para o AC de 97,8%.

Tabela 4. Valores de recuperação de Azul Brilhante (AB) e Amarelo Crepúsculo (AC)

Corante	Recuperado (mg/L) ± SD	Adicionado (mg/L)	Recuperação %
AB	19,61 ± 0,32	20	98,1 ± 2
AC	195,6 ± 4	200	97,8 ± 2

O eletroferograma mostrou através das curvas analíticas de recuperação do corante amarelo tartrazina que houve um possível descuido durante o procedimento, ocasionando assim em valores pouco lineares e, por consequência, gerando uma equação da reta com $R^2 = 0,84$. Dessa forma, os valores obtidos dessa corrida não puderam ser utilizados para quantificação e devido a situação que enfrentamos de pandemia não houve tempo hábil para repetição da corrida para esse corante.

Segundo estudos realizados por especialistas da Food and Agriculture Organization (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) existe uma quantidade diária de aditivos alimentares que se pode ser ingerido sem apresentar considerável risco a saúde. Esse valor varia de 0,5 a 10 mg/kg de peso corporal para o AB [28].

Quando se observa a aplicação desse corante em solo estadunidense, sabe-se que é estritamente proibido sua utilização. Ao passo que na maior parte da União Europeia o uso é liberado, porém as quantidades devem estar de maneira expressa no rótulo dos alimentos [28].

Com relação ao amarelo tartrazina, este tem gerado uma grande atenção por parte da sua utilização, pois sua toxicidade e possibilidade alergista podem estar ligadas com casos de reações adversas, causando desde urticária até bronquite asmática. Atualmente, sua utilização em diversos países está limitada a um IDA (ingestão diária aceitável) de 7,5 mg/kg de peso corporal. Com relação ao amarelo crepúsculo o IDA é entorno de 2,5 mg/kg peso corpóreo [28]

4.5 Aplicação do método com produtos comerciais.

Aplicou-se o método proposto para determinação qualitativa dos corantes presentes em produtos comerciais da cor verde. Foram selecionados chicletes, gelatina e algodão-doce. Estes foram preparados e injetados em 3 spots do gel para realizar a corrida eletroforética juntamente com mais 3 spots de solução padrão III, resultando na Figura 28.

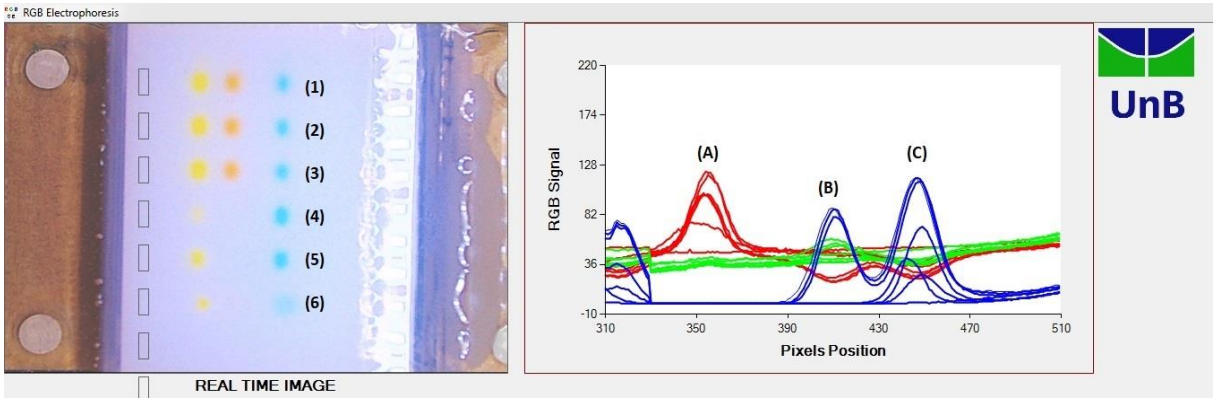

Figura 28. Corrida eletroforética realizada com solução padrão (spots 1, 2 e 3) e com os produtos comerciais algodão doce (4), chiclete (5) e gelatina (6), gerando um eletroferograma, o qual responde a presença de AB(A), AC (B) e AT(C).

Como pode ser avaliado na Figura 28, houve uma resposta considerável por parte dos produtos testados, mostrando que é possível gerar sinais analíticos das amostras e que possivelmente seria possível a quantificação dos corantes presentes nos produtos de cor verde. Além de fortalecer a real aplicabilidade o método em testes laboratoriais com produtos comercializáveis. Infelizmente, não houve tempo hábil para quantificação. Porém, a partir dos picos e imagens gerados é animador e cabível avaliar como válida a aplicação do método.

5. CONCLUSÕES

Através dos conceitos e dados que foram expostos, pode-se concluir que o método que foi proposto com fundamentação na separação concomitante de 3 componentes de uma mistura após uma corrida eletroforética com utilização de imagem digital para detecção colorimétrica (baseada no sistema RGB), o qual permitiu-se obtenção de curvas analíticas viáveis, possibilitando determinações qualitativas e quantitativas dos compostos analisados.

Dessa forma, os ensaios realizados com os corantes artificiais utilizando o refrigerante como suporte, demostraram que o método possui uma aplicação de grande relevância, uma vez que possível identificar corantes, é útil para verificar a presença de um possível corante proibido ou mesmo se existe uma quantidade que exceda o limite permitido pela legislação do país. Ainda vale ressaltar que atualmente essa determinação de corantes já é realizada, porém com a utilização de cromatografia liquida de alta frequência (HPLC), a qual possui um alto valor associado, possuindo uma média de exemplares com preço de R$ 350.000. Da forma que foi proposto e validado, através desse trabalho, é válido a sua aplicação, uma vez que pode ser realizado de forma mais rápida, simples e com baixo custo.

Colocando os custos associados de todos os equipamentos envolvidos para realização do método proposto, chega-se a um valor próximo a R$ 9.540 (considerando a cotação do dólar no momento da escrita desse trabalho). O que vem a ser um custo bastante reduzido quando comparado ao que ele pode proporcionar. Até porque sua aplicação pode ser adaptada procurando aplicação para outros analitos, facilitando e simplificando processos laboratoriais, como é o caso de materiais orgânicos marcados com material fluorescente (como a fluoresceína).

6. 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] Halliday, D.; Resnick, R.; Walker, J.**; Fundamentos de Física 3 "Eletromagnetismo"**, 4ª edição, p. 113-129, 2012.

[5] Souza, M. T.; Brígido, M. M.; Maranhão, A. Q.; **Técnicas básicas em biologia molecular**, Editora Unb, 2ª edição, p.189-214, 2016. – tabela 1

[6] Torres Filho, H. M. Eletroforese de proteínas. **Richet Nouvelles**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p. 1-8, set. 2008.

[7] Naoum, P. C. Eletroforese: Hemoglobinopatias, Proteínas Séricas, Lipoproteínas e DNA. São Paulo: Editora Santos, p. 301, 2012.

[8] 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.

[9] Radkte, J. Proteins. In: Anderson, S. C.; Cockayne, S. editors. **Clinical Chemistry: Concepts and Applications**. New York: McGraw Hill. p.203-221, 2003.

[10] ARQUIVO NA PASTA

[11] O'connell, T.; Horita, T.; Kasravi, B. Understanding and Interpreting Serum Protein Electrophoresis. **Americal Family Physician**. v.71, p. 105–112, 2005.

[12] Atkins & Jones, **Princípios de Química**, Questionando a vida moderna e o meio ambiente, 5ª Edição, 2011.

[13] Naoum, P. C.; **Eletroforeses**, Livraria Santos, Editora Ltda., São Paulo, 2010.

[14] 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.

[15] 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.
[16] 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.

[17] 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.

[18] 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.

[19] 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.

[20] 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. 87

[21] 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.

[22] Santos, P. M.; Pereira-Filho, E. R.; **Digital image analysis – an alternative tool for monitoring milk authenticity**, Anal. Methods, 5, 3669, 2013.

[23] Bertolini, C.; **Sistema para medição de cores utilizando espectrofotômetro**. Centro de ciências exatas e naturais, Blumenau. 2010.

[24] Francisco, G.; **Avaliação de uso de imagens digitais para determinações quantitativas em eletroforese em gel**. Instituto de Química, Brasília. 2019.

[25] Matos, G.; Conceição, N.; **Eletroforese de DNA.** Departamento de biologia. 2017. Disponível em: http://www.liaaq.ccb.ufsc.br/files/2013/10/Aula-Eletroforese-de-DNA.pdf

[26] Polônio, M. L.; Peres, F.; **Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira.** URL: https://www.scielosp.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/csp/v25n8/02.pdf. Rio de Janeiro, Ago/2009.

[27] Moreth, R.; **Corantes naturais alimentícios e seus benefícios à saúde.** Departamento de farmácia, Rio de Janeiro. 2012.

[28] Os corantes alimentícios, Aditivos e ingredientes <http://insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/119.pdf> acessado em 29/09/2021.

[29] BRASIL. ANVISA. **Portaria no 540/97, de 27 de outubro de 1997.**

[30] BRASIL. ANVISA. **Decreto no 55.871/65 de 26 de março de 1965.**

[31] Shrivastava, A.; Gupta, V.; **Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods.** Departamento de Análises farmacêuticas. 2021

[32] Eletroforese em Gel. Disponível em: https://pt.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/gel-electrophoresis acessado em 10/10/2021.

[33] Oliveira, E.; Trentin, T.; Camargo, F.; Pereira, Y.; Brolo, D.; Eletroforese: conceitos e aplicações. Disponível em: Definição e princípios Eletroforese.pdf acessado em 15/09/2021

[34] Eletroforese aplicada à análise de DNA. Disponível em: https://docplayer.com.br/6079511-Eletroforese-aplicada-a-analise-de-dna.html. Acessado em 15/09/2021

[35] Eletroforese para separa, identificar e purificar fragmentos de DNA. Disponível em: https://biologia.ifsc.usp.br/biomolcel1/roteiros/eletroforese.pdf. Acessado em 10/10/2021