

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Desenvolvimento de Estratégias para a Determinação  
Espectrofotométrica Sequencial em Fluxo de Co (II) e Mn (II)**

Juliana Aparecida Ferreira\*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

**Orientador:** Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho

\*bolsista CAPES

**São Carlos – SP**

**Julho de 2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

F383de

Ferreira, Juliana Aparecida.

Desenvolvimento de estratégias para a determinação espectrofotométrica sequencial em fluxo de Co (II) e Mn (II) / Juliana Aparecida Ferreira. -- São Carlos : UFSCar, 2009. 83 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Métodos óticos. 2. Determinação de metais. 3. Análise por injeção de fluxo. 4. Espectrofotometria. 5. Cobalto. 6. Manganês. I. Título.

CDD: 543.085 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
Curso de Mestrado

---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado da candidata **Juliana Aparecida Ferreira**, realizada em 24 de julho de 2009:*

  
Prof. Dr. Edénir Rodrigues Pereira Filho



Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria



Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Junior

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais  
Aparecida e Valdir,  
por toda a luta, dedicação, apoio e amor.  
Ao meu amor Vagner,  
Pelo constante incentivo, companheirismo e amor.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, e pela vida uma segunda vez.

Aos meus pais pela sólida estrutura familiar, dedicação, sacrifícios, apoio e amor incondicional.

Ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho pela excelente receptividade, orientação, apoio e amizade. Pelas valiosas sugestões e por ter contribuído para meu crescimento profissional e pessoal durante esses dois anos de convivência e trabalho.

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega e à Prof. Dra. Ana Rita pelas importantes sugestões no trabalho.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, pela orientação no trabalho de iniciação científica, amizade e gentileza ao permitir que parte desse trabalho fosse realizado nas dependências do seu laboratório de pesquisa.

Ao Vagner, pela agradável companhia, eterna preocupação com meu bem estar, incentivo contínuo, risadas, e amor demonstrado na nossa convivência diária.

A todos os companheiros de trabalho e amigos do Grupo de Análise Instrumental Aplicada (GAIA): Amália, Bia, Caio, Carlinha, Catarina, Daniela, Edivaldo, Eveline, Fernanda, Kelber, Larissa, Luana, Mário, Marcelo, Paulinha, Poliana, Renata, Rodolfo, Rodrigo, Silmara, Sílvia, Tiago e Wladiana pela convivência agradável, sugestões, apoio e conhecimentos compartilhados. Aos ex-gaia: Adriana, Andrea, Guto, Marquinho, Silvéria e Simone, pela amizade, caronas, conversas, risadas e conhecimentos trocados.

Em especial ao Marcelo e ao Kelber pela ajuda nas análises no FS-FAAS.

Aos colegas do LABIE pela companhia nas horas e horas de trabalho, pelas conversas e momentos agradáveis.

Às eternas e queridas amigas da graduação Maiara, Luciana e Renata por todos os momentos compartilhados, sejam eles de alegria, tristeza ou de aprendizado.

A todos os familiares e amigos que sempre acreditaram e torceram por mim.

A todos os professores do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos que contribuíram para minha formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade.

Aos funcionários do Departamento de Química, em especial às secretárias da Pós-Graduação: Ariane, Cristina, Luciani e Caroline pela gentileza no atendimento e colaboração, e à técnica Doraí pela gentileza de ceder um equipamento para realização de parte do trabalho.

A todos aqueles que não foram nomeados, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AAS</b>	Espectrometria de absorção atômica
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>ETAAS</b>	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica
<b>FA</b>	Análise em fluxo
<b>FAAS</b>	Espectrometria de absorção atômica com chama
<b>FIA</b>	Análise por injeção em fluxo
<b>FS-FAAS</b>	Espectrometria de absorção atômica com chama - modo sequencial rápido
<b>GFAAS</b>	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
<b>IUPAC</b>	União Internacional de Química Pura e Aplicada
<b>LOD</b>	Limite de detecção
<b>LOQ</b>	Limite de quantificação
<b>PLS</b>	Método dos mínimos quadrados parciais
<b>RSD</b>	Desvio padrão relativo
<b>PRESS</b>	Soma dos quadrados dos erros de previsão
<b>SAM</b>	Método de adições de padrão
<b>SEV</b>	Soma dos quadrados dos erros de validação
<b>SRM</b>	Material de referência certificada
<b>UV-Vis</b>	Espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta-visível

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 4.4.1</b> - Amostras e suas respectivas descrições.....	23
<b>TABELA 4.6.1</b> - Planejamento fatorial $2^{9-5}$ efetuado no estudo preliminar na triagem de variáveis do sistema.....	24
<b>TABELA 4.6.2</b> - Planejamento fatorial $2^3$ efetuado na triagem de variáveis do sistema.....	25
<b>TABELA 4.6.3</b> - Níveis das variáveis do planejamento fatorial empregado na triagem das variáveis do sistema em fluxo.....	25
<b>TABELA 4.6.4</b> - Concentrações das soluções-padrão utilizadas na curva analítica.....	25
<b>TABELA 4.6.2.1</b> - Planejamento composto central efetuado para a otimização das variáveis do sistema.....	28
<b>TABELA 4.6.2.2</b> - Níveis das variáveis do planejamento composto central empregado na otimização das variáveis do sistema em fluxo.....	29
<b>TABELA 4.6.2.3</b> - Concentrações das soluções-padrão utilizadas na curva analítica.....	29
<b>TABELA 4.8.1.1</b> – Planejamento fatorial fracionário $2^{7-2}$ efetuado na triagem dos possíveis interferentes no sinal do Co.....	31
<b>TABELA 4.8.1.2</b> - Níveis das variáveis do planejamento $2^{7-2}$ empregado na triagem de possíveis interferentes no sinal do Co.....	31
<b>TABELA 4.8.1.3</b> – Planejamento fatorial fracionário $2^{7-2}$ efetuado na triagem dos possíveis interferentes no sinal do Mn.....	32
<b>TABELA 4.8.1.4</b> - Níveis das variáveis do planejamento $2^{7-2}$ empregado na triagem de possíveis interferentes no sinal do Mn.....	32
<b>TABELA 4.8.2.1</b> - Planejamento composto central efetuado para a modelagem dos interferentes no sinal do Co.....	33
<b>TABELA 4.8.2.2</b> - Níveis das variáveis do planejamento composto central efetuado para a modelagem dos interferentes no sinal do Co.....	33
<b>TABELA 4.8.2.3</b> - Planejamento composto central efetuado para a modelagem dos interferentes no sinal do Mn.....	34

<b>TABELA 4.8.2.4</b> - Níveis das variáveis do planejamento composto central efetuado para a modelagem dos interferentes no sinal do Mn.....	35
<b>TABELA 5.3.1.1</b> - Resumo dos resultados obtidos na análise dos efeitos do planejamento fatorial $2^3$ realizado na triagem das variáveis.....	50
<b>TABELA 5.5.1.1</b> - Valores de efeitos significativos, da variância e de erro, experimental e do efeito, para o planejamento fatorial $2^3$ em quadruplicata, realizado no estudo de concomitantes para o analito Co.....	59
<b>TABELA 5.5.1.2</b> - Valores de efeitos significativos, da variância e de erro, experimental e do efeito, para o planejamento fatorial $2^4$ em duplicata, realizado no estudo de concomitantes para o analito Mn.....	61
<b>TABELA 5.6.1</b> - Teores médios de Co e Mn e desvios-padrão (n=3) nas amostras de medicamentos B e D obtidos por FS-AAS.....	66
<b>TABELA 5.6.2</b> - Teores médios e desvios-padrão (n=3) de Co no medicamento B e de Mn no D obtidos pelo método desenvolvido.....	70

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 3.1.1</b> - Configuração geral de um sistema em fluxo. C: solução transportadora; B: bomba peristáltica; I: Injetor; S: amostra; B <sub>1</sub> : reator; D: detector; e W: descarte. Esta figura foi adaptada da referência [9].....	7
<b>FIGURA 3.2.1</b> - Representação da formação de gradiente de pH em FA. Os seguimentos pH <sub>1</sub> e pH <sub>2</sub> representam soluções com diferentes valores de pH.....	9
<b>FIGURA 3.3.2.1</b> - Reação de oxidação do Tiron catalisada por íons metálicos (M) de valência 2+ [46].....	16
<b>FIGURA 4.6.1</b> - Representação esquemática do sistema em fluxo empregado, onde R <sub>1</sub> : Tiron; R <sub>2</sub> : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; R <sub>3</sub> : NaOH; C: solução transportadora (HNO <sub>3</sub> 0,01 mol L <sup>-1</sup> + etanol 10% v/v); P: bomba peristáltica; I: Injetor; S: amostra; B: 2,2-bipiridina; C <sub>1</sub> e C <sub>2</sub> : reatores de 100 e 150 cm respectivamente; I: espectrofotômetro ( $\lambda = 426$ nm); e W: descarte. Em (A): posição de amostragem; em (B): posição de injeção da amostra.....	27
<b>FIGURA 5.1.1</b> - Espectro de absorção do Tiron oxidado em meio básico pela catálise de Co (a – linha tracejada), e pela catálise de Mn ativada por 2,2-bipiridina (b – linha sólida).....	41
<b>FIGURA 5.2.1</b> - Representação esquemática da sequencia das alças de amostragem que passa pelo detector, onde C é a solução carregadora, L <sub>1</sub> e L <sub>3</sub> são as alças de amostragem contendo a amostra ou branco ou soluções padrões, e L <sub>2</sub> é a alça do reagente 2,2-bipiridina. Em (A) está representada a sequencia teórica (sem o efeito de dispersão) e em (B) a simulação da situação real de acordo com o efeito de dispersão no sistema em fluxo.....	43
<b>FIGURA 5.2.2</b> - Sinal transiente obtido na determinação sequencial de Co e Mn, através da injeção de soluções-padrão 21 e 360 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, respectivamente, no sistema em fluxo desenvolvido.....	44
<b>FIGURA 5.3.1.1</b> -Fiagrama obtido no experimento 7 do planejamento fatorial realizado na triagem das variáveis do sistema.....	47
<b>FIGURA 5.3.1.2</b> - Curva analítica obtida no experimento 7 do planejamento fatorial realizado na triagem das variáveis, para Co (a) e Mn (b).....	48

- FIGURA 5.3.1.3** - Gráficos de probabilidade. Em (a) e (b) os gráficos referem-se, respectivamente, às respostas absorvância da solução “3” e coeficiente angular (a) da curva analítica para o analito Co. Em (c) e (d) os gráficos referem-se, respectivamente, às respostas absorvância da solução 3 e coeficiente angular (a) da curva analítica para o analito Mn. ....49
- FIGURA 5.3.2.1** - (a) Superfície quadrática descrita pela Equação 5.1. (b) Suas curvas de nível.....52
- FIGURA 5.4.1** – Estudo do perfil catalítico do Co na reação de oxidação de Tiron por  $H_2O_2$  em meio básico. A linha contínua representa o sinal obtido em fluxo e a linha tracejada refere-se ao sinal obtido com a interrupção do fluxo no máximo do sinal analítico do Co.....53
- FIGURA 5.4.2** – Estudo do perfil catalítico do Mn na reação de oxidação de Tiron por  $H_2O_2$  em meio básico. A linha contínua representa o sinal obtido em fluxo e a linha tracejada refere-se ao sinal obtido com a interrupção do fluxo no máximo do sinal analítico do Mn.....54
- FIGURA 5.4.3** – Estudo comparativo do comprimento do reator  $C_2$  com base no perfil catalítico do Co e Mn na reação de oxidação do Tiron por  $H_2O_2$  em meio básico.....55
- FIGURA 5.4.4** – Representação esquemática do sistema em fluxo otimizado, onde P é a bomba peristáltica, I: injetor; S: amostra; B: 2,2-bipiridina;  $C_1$  e  $C_2$ : reatores; I: espectrofotômetro ( $\lambda = 426$  nm); e W: descarte.....56
- FIGURA 5.5.1.1** - Gráficos de probabilidade para o resultado obtido no planejamento experimental do estudo de interferentes na reação de oxidação do Tiron catalisada por Co. Em (a) o gráfico refere-se, ao resultado obtido para o planejamento fatorial fracionário  $2^{7-2}$ , e em (b), ao planejamento  $2^3$  resultante da exclusão de 4 variáveis do planejamento anterior.....58
- FIGURA 5.5.1.2** - Gráficos de probabilidade para o resultado obtido no planejamento experimental do estudo de interferentes na reação de oxidação do Tiron catalisada por Mn. Em (a) o gráfico refere-se, ao resultado obtido para o planejamento fatorial fracionário  $2^{7-2}$ , e em (b), ao planejamento  $2^4$  resultante da exclusão de 3 variáveis do planejamento anterior.....60
- FIGURA 5.5.2.1** – (a) Superfície quadrática descrita pela Equação 5.5.2.1. (b) Suas curvas de nível.....62

<b>FIGURA 5.5.2.2</b> - Porcentagem de interferência <i>versus</i> concentração normalizada de Co, segundo a Equação 5.5.2.2.....	63
<b>FIGURA 5.6.1</b> - Fiagrama obtido na análise das amostras de medicamentos B e D, utilizando-se curvas analíticas individuais (proposta 1).....	68
<b>FIGURA 5.6.2</b> - Fiagrama obtido na análise das amostras de medicamentos B e D (proposta 2).....	69

## RESUMO

### DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS PARA A DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA SEQUENCIAL EM FLUXO DE Co E Mn

Neste trabalho desenvolveu-se um método cinético-espectrofotométrico visando a determinação sequencial de Co e Mn em amostras farmacêuticas. O método foi baseado no efeito catalítico dos analitos na reação de oxidação do Tiron (3,5 dihidroxi-1,3-ácido benzenossulfônico-sal dissódico monohidratado  $[(HO)_2C_6H_2(SO_3Na)_2 \cdot H_2O]$ ) pelo  $H_2O_2$  em meio básico. No caso do Mn foi empregado o reagente ativador 2,2-bipiridina para a efetiva catálise. O sistema FIA foi elaborado com base nas propriedades catalíticas de cada analito na reação indicadora. Foram realizados dois planejamentos fatoriais, inicialmente um fracionário  $2^{9-5}$  e depois um  $2^3$ , para triagem das variáveis, seguido de um  $2^2$  + ponto central + estrela para a devida otimização das mesmas no sistema em fluxo. Planejamentos fatoriais fracionários  $2^{7-2}$  foram realizados para o estudo de possíveis interferentes para Co e Mn; e posteriormente, a porcentagem de interferência foi descrita através de modelos matemáticos construídos a partir de planejamentos do tipo fatorial + ponto central + estrela. As amostras farmacêuticas foram digeridas com  $HNO_3$  concentrado em bloco digestor. Para avaliar a exatidão do método desenvolvido, as amostras ( $n=3$ ) foram analisadas por FS-FAAS e a partir das concentrações obtidas, estas foram diluídas para posterior análise no método desenvolvido. Os limites de detecção e quantificação para FS-FAAS foram 3,9 e 13,2  $\mu g L^{-1}$  para Co, 110,0 e 366,0  $\mu g L^{-1}$  para Mn, respectivamente. No caso do método desenvolvido, os limites de detecção e quantificação foram 0,055 e 0,18  $\mu g L^{-1}$  para Co, 9,76 e 32,5  $\mu g L^{-1}$  para Mn, respectivamente. A comparação entre os dois métodos foi realizada através do teste- $t$  pareado. No caso do Co, ao nível de confiança 99% os valores não diferiram estatisticamente. Já para o Mn os valores de concentração obtidos também foram concordantes entre si, apesar deste fato não poder ser comprovado estatisticamente devido à diferença de desvios-padrão dos dois métodos. A repetibilidade foi de 3,2% para Co e 8,0% para Mn. A frequência de amostragem foi de 25 amostras  $h^{-1}$ .

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF FLOW ANALYSIS SPECTROPHOTOMETRIC STRATEGIES FOR SEQUENTIAL DETERMINATION OF Co AND Mn

In this study a kinetic-spectrophotometric method was developed for sequential determination of Co and Mn in pharmaceutical samples. The method was based on the catalytic effect of the analytes in the oxidation reaction of Tiron by  $\text{H}_2\text{O}_2$  in basic medium. In the case of Mn it was employed the activator reagent 2,2-bipyridine to effective catalysis. The FIA system was projected taking into account the catalytic properties of each analyte in the indicator reaction. Two factorial designs were applied, initially, a fractionary factorial design  $2^{9-5}$  followed by a complete factorial design  $2^3$  to select the important variables, and then a factorial design  $2^2$  + central point + star for optimizing of FIA system. Fractionary factorial designs  $2^{7-2}$  were applied in the study of possible interferences for Co and Mn. The main interferences were mathematically described using factorial + central point + star designs. The pharmaceutical samples were digested by concentrated  $\text{HNO}_3$  in digester block. To evaluate the accuracy of the developed method, samples ( $n=3$ ) were analyzed by FS-FAAS and based on the determination concentrations, these were diluted to posterior analysis applying by the developed method. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for FS-FAAS were 3.9 and 13.2  $\mu\text{g L}^{-1}$  for Co; 110.0 and 366.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  for Mn, respectively. To developed method the LOD and LOQ were 0.055 and 0.18  $\mu\text{g L}^{-1}$  for Co, 9.76 and 32.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  for Mn, respectively. Comparison between the two methods was evaluated by paired  $t$ -test. At 99% confidence level, the values did not differ statistically for Co. However, for Mn, the concentration values agreed but this data cannot be statistically confirmed due to differences of standard deviations of the two methods. The repeatability was 3.2% for Co and 8.0% for Mn. The sampling frequency was 25 samples  $\text{h}^{-1}$ .

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>6</b>
3.1	ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO E SUA UTILIZAÇÃO NO ESTUDO DE ASPECTOS CINÉTICOS	
6		
3.2	ANÁLISE MULTICOMPONENTE SIMULTÂNEA OU SEQUENCIAL POR ESPECTROFOTOMETRIA	
DE ABSORÇÃO MOLECULAR UV-VIS.....		<b>7</b>
3.3	MÉTODOS CINÉTICO-ESPECTROFOTOMÉTRICOS .....	<b>10</b>
3.3.1	<i>Reação indicadora</i> .....	<b>15</b>
3.4	CO E MN .....	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>21</b>
4.1	MATERIAL E EQUIPAMENTOS.....	<b>21</b>
4.2	REAGENTES.....	<b>21</b>
4.3	PROGRAMAS COMPUTACIONAIS.....	<b>22</b>
4.4	AMOSTRAS .....	<b>22</b>
4.5	DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA ÓTIMO PARA AS DETERMINAÇÕES	
ESPECTROFOTOMÉTRICAS.....		<b>23</b>
4.6	TRIAGEM DE VARIÁVEIS E OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA FIA .....	<b>24</b>
4.6.1	<i>Triagem das Variáveis</i> .....	<b>24</b>
4.6.2	<i>Otimização do sistema FIA</i> .....	<b>28</b>
4.7	ESTUDO DO PERFIL CATALÍTICO DOS ANALITOS .....	<b>29</b>
4.8	AValiação DE INTERFERENTES .....	<b>30</b>

4.8.1	<i>Triagem de interferentes</i> .....	30
4.8.2	<i>Modelagem de superfície para os interferentes</i> .....	32
4.9	PREPARO DAS AMOSTRAS .....	35
4.9.1	<i>Extração com ácido diluído</i> .....	35
4.9.2	<i>Digestão em bloco digestor</i> .....	35
4.10	DETERMINAÇÃO DE CO E MN .....	37
4.10.1	<i>Nas amostras de alimentos</i> .....	37
4.10.2	<i>Nas amostras de ligas metálicas e no medicamento C</i> .....	37
4.10.3	<i>Nas amostras de medicamentos B e D</i> .....	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
5.1	DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA ÓTIMO PARA AS DETERMINAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS .....	41
5.2	ELABORAÇÃO DO SISTEMA FIA .....	42
5.3	TRIAGEM DE VARIÁVEIS E OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA FIA .....	44
5.3.1	<i>Triagem das Variáveis</i> .....	44
5.3.2	<i>Otimização do sistema FIA</i> .....	51
5.4	ESTUDO DO PERFIL CATALÍTICO DOS ANALITOS .....	53
5.5	AVALIAÇÃO DOS INTERFERENTES .....	57
5.5.1	<i>Triagem de interferentes</i> .....	57
5.5.2	<i>Modelagem de superfície para os interferentes</i> .....	61
5.6	DETERMINAÇÃO DE CO E MN .....	64
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>78</b>

# Capítulo 1

---

## INTRODUÇÃO

## 1 Introdução

Os métodos espectrofotométricos apresentam uma boa sensibilidade para a determinação de diversos elementos e compostos [1]. A combinação destes métodos com a análise em fluxo FA (do inglês, *Flow Analysis*) [2] representa uma alternativa simples e atrativa em química analítica. Os sistemas em fluxo configuram-se pela sua simplicidade, onde é requerido apenas um sistema para propulsão (tipicamente uma bomba peristáltica), um injetor comutador para introdução de brancos, padrões e amostras e um detector [3].

As figuras de mérito (por exemplo, limites de detecção e quantificação) com a utilização de FA e espectrofotometria são tão vantajosas quanto aquelas obtidas por técnicas instrumentais mais sofisticadas, tais como, FAAS (do inglês, *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) e GFAAS (do inglês, *Graphite Furnace AAS*) [4]. Entretanto, a combinação FA e espectrofotometria é utilizada para determinações monoelementares com a identificação de muitas aplicações na literatura científica [5 - 7]. Diante deste contexto a aplicação da FA e espectrofotometria para a determinação sequencial de elementos pode representar um ganho substancial em frequência analítica e sensibilidade [8]. Este procedimento pode aproveitar o aspecto de que alguns reagentes apresentam uma baixa seletividade em reações espectrofotométricas. Além das vantagens descritas, os sistemas em fluxo acoplados a espectrofotômetros podem ser de grande valia em estudos de especiação.

Assim, este trabalho trata da proposição de estratégias para a determinação cinético-espectrofotométrica sequencial, em comprimento de onda fixo, de Co e Mn, através de um método catalítico, no qual esses metais catalisam a reação entre o Tiron e o  $H_2O_2$  em meio básico.

# Capítulo 2

---

## OBJETIVO

## 2 Objetivo

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento e aplicação de um método analítico em fluxo para a determinação cinético-espectrofotométrica sequencial de Co e Mn, em amostras farmacêuticas, empregando a reação de oxidação do Tiron pelo  $H_2O_2$  em meio básico.

# Capítulo 3

---

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3 Revisão Bibliográfica

#### 3.1 Análise por injeção em fluxo e sua utilização no estudo de aspectos cinéticos

Uma análise química ideal seria aquela na qual o método utilizado fosse multicomponente, simples, rápido, com baixo custo, sensível, com um reduzido consumo de reagentes e consequente minimização de resíduos. Embora, nem sempre seja possível aliar todas as características descritas anteriormente em um só método analítico, grande parte destas pode ser conseguida quando utiliza-se a FA acoplada a outras técnicas instrumentais.

Além da implantação de um sistema em fluxo exigir baixo investimento financeiro e a técnica possuir instrumentação simples, o seu uso permite um reduzido consumo de reagentes, alta frequência de amostragem, menor manuseio da amostra, possibilidade do uso de diferentes tipos de detectores, alta reprodutibilidade e boa precisão das análises [3, 9-10]. A utilização de técnicas acopladas à FA tem diversas aplicações em análise química quantitativa devido à sua grande versatilidade [3].

Análise em fluxo é um termo geral para todas as análises que se baseiam na introdução e processamento de amostras em um meio fluido. Já a análise por injeção em fluxo FIA (do inglês, *Flow Injection Analysis*) é um tipo de FA que segundo a classificação da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), é uma análise com amostragem intermitente, por meio de injeção da amostra em um fluxo não-segmentado [11]. A técnica de FIA é baseada na injeção de uma amostra líquida em um fluxo carregador contínuo, que é constituído por um fluido adequado a cada sistema. A amostra injetada forma uma zona dispersa que passará por uma célula em fluxo onde um detector medirá continuamente o parâmetro físico ou químico desejado. Geralmente, a propulsão dos líquidos é realizada através de uma bomba peristáltica em tubos de polietileno com diâmetro reduzido [9].

A Figura 3.1.1 mostra um exemplo geral de um sistema FIA, composto por uma bomba (B) para propulsão do carregador, um injetor (I) e um sistema de detecção (D).

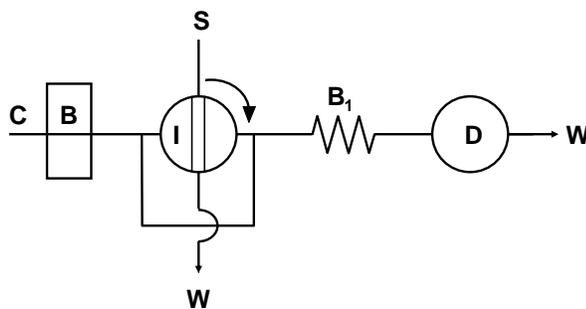


FIGURA 3.1.1 - Configuração geral de um sistema em fluxo. C: solução transportadora; B: bomba peristáltica; I: Injetor; S: amostra; B<sub>1</sub>: reator; D: detector; e W: descarte. Esta figura foi adaptada da referência [9].

Sistemas em fluxo são muito utilizados para estudos cinéticos, pois o processo de mistura e o tempo de reação são facilmente controlados pela temperatura, vazões e volume de amostra; nestes sistemas, amostras e reagentes são misturados numa taxa governada pela dinâmica de transferência radial de massa e dispersão axial. Além disso, sistemas FIA associam dinamicamente processos físicos aos químicos, sendo que esses processos estão em evolução quando as medidas estão sendo realizadas. Portanto, a análise por injeção em fluxo traduz processos cinéticos em forma de sinais [9].

Para o estudo da cinética de algumas reações realizadas em sistemas em fluxo, pode ser necessária a interrupção do fluxo (*stopped-flow*) para que o tempo de residência da amostra seja maior, ou seja, pode ser requerido um tempo maior para que a reação ocorra [12].

O *stopped-flow* aumenta a sensibilidade do método, como descrito em alguns trabalhos na literatura [13-17], além de diminuir a dispersão no sistema e conduzir a um menor consumo de reagentes [9, 17].

### **3.2 Análise multicomponente simultânea ou sequencial por espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis**

A espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta-visível (UV-vis) é uma das técnicas analíticas mais amplamente utilizadas por ser robusta, versátil, possuir instrumentação simples e de baixo custo, além de ter a

vantagem de instrumentos que operam em batelada serem facilmente transformados em instrumentos de operação em fluxo [3,18].

Em um espectrofotômetro de feixe simples, a radiação proveniente de uma fonte passa pelo monocromador, sendo, então, separada em pequenos intervalos de comprimento de onda; em seguida passa pela amostra e segue para o detector, onde a intensidade incidente é medida e comparada com a energia radiante que chega no detector quando a referência (um branco, um solvente, ou ainda um reagente) está na célula [19].

A análise multicomponente por espectrofotometria UV-Vis através de reagentes cromogênicos é geralmente realizada por meio de reagentes seletivos, ou seja, específicos para um determinado componente; ou ainda separando-se os componentes de interesse na amostra dos possíveis interferentes. No entanto, nem sempre é possível a utilização de um reagente seletivo para cada componente de interesse, pois além dos processos de separação serem, normalmente, muito laboriosos, estes consomem um tempo relativamente longo no processo analítico. Por isso, as análises multicomponentes por espectrofotometria UV-Vis limitam-se a dois ou poucos componentes em uma mesma mistura, utilizando para isto, bandas isoladas de absorção características [20]. Portanto, a grande maioria dos trabalhos na literatura que relatam determinações simultâneas de metais com detecção espectrofotométrica utilizam a técnica de espectrofotometria por varredura espectral para a determinação desses componentes, [9, 21-22] sendo que dentro dessa gama de trabalhos, grande parte faz uso da quimiometria (área da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para a resolução de problemas químicos) [23] para o tratamento de dados, que geralmente são extensos e complexos, neste caso.

Por exemplo, GAO e REN [24] realizaram a determinação simultânea de Mn (II), Zn (II) e Co (II) em misturas sintéticas utilizando-se o 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (5-Br-PADAP) e brometo de cetil-piridínio (CPB) como reagentes. Espectros dos complexos formados foram adquiridos e registrados. Devido à sobreposição de bandas nos espectros, os autores utilizaram ferramentas quimiométricas no processamento e tratamento dos dados. Modelos de calibração foram construídos utilizando-se as ferramentas *Partial Least-Squares* (PLS) e *Kernel Partial Least-Squares* (KPLS) e para ambas os resultados foram satisfatórios.

Para a análise multicomponente simultânea ou sequencial utilizando-se espectrofotometria UV-Vis em comprimento de onda fixo é necessário o uso de estratégias que possibilitem alcançar esse objetivo, tais como o uso de reagentes e valores de pH seletivos para determinada espécie de interesse.

A complexação de íons metálicos com muitos reagentes cromogênicos, especialmente aqueles que podem ser protonados, depende não só da natureza e concentração do ligante de interesse, como também do pH do meio reacional [25]. A dependência do pH do meio reacional para a efetividade da complexação de íons metálicos conduz a uma alternativa para a determinação simultânea de metais através da construção de um gradiente de pH. Utilizando-se o mesmo agente complexante é possível determinar diferentes metais devido à formação de regiões de diferentes valores de pH.

O princípio da injeção em fluxo fornece meios simples de produzir o gradiente de pH. Se o sistema não for segmentado por ar, gradientes de pH são formados na interface carregador/amostra quando soluções básicas são injetadas em um carregador ácido, ou vice-versa [25], como representado na Figura 3.2.1.



Figura 3.2.1 - Representação da formação de gradiente de pH em FA. Os segmentos  $\text{pH}_1$  e  $\text{pH}_2$  representam soluções com diferentes valores de pH.

Trabalhos na literatura relatam o emprego do gradiente de pH na determinação simultânea de metais com detecção espectrofotométrica.

Em 1981, BETTERIDGE e FIELDS [25] realizaram a determinação simultânea de Co (II) e Mn (II), Cu (II) e Ni (II) na presença de agente mascarante para Co (II) em misturas binárias, na faixa de concentração em  $\text{mg L}^{-1}$ . O reagente não seletivo 4-(P-piridilazo)resorcinol (PAR) foi utilizado no método desenvolvido, no qual cada íon tem um valor de pH crítico na complexação com o reagente PAR. Um sistema de análise por injeção em fluxo foi desenvolvido para a geração do gradiente de pH. Foram obtidas curvas de pH em função da absorbância para as espécies estudadas.

LIU et al. [26], aplicaram a técnica de gradiente de pH para a determinação de Cu (II) e Zn (II) em amostras de cabelo de crianças utilizando um sistema em fluxo, o reagente cromogênico Zincon e um único espectrofotômetro. Os dois íons formam complexos azuis com Zincon. Então, foi escolhido um comprimento de onda no qual as absorvâncias para os dois complexos fossem equivalentes, sendo este o de 606 nm. Zincon reage com Cu (II) na faixa de pH 5-9,5 e Zn (II) em pH 8-9,5. No sistema elaborado, uma única injeção produziu dois picos, no qual o primeiro refere-se à soma dos dois metais e a altura do segundo pico equivale à concentração de Cu apenas. Portanto, por uma simples subtração do sinal do Cu, daquele equivalente a soma dos dois, tem-se a absorvância referente ao Zn. A faixa linear para Zn (II) foi de  $0,4 - 12 \mu\text{g mL}^{-1}$  e o limite de detecção foi  $0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; já para Cu (II) foi de  $0,1 - 3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  e o limite de detecção foi de  $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

No trabalho publicado por Zhao et al. [27], foi efetuada a determinação simultânea de Fe (III) e Zn (II) em amostras de cabelo humano através do gradiente de pH estabelecido no sistema em fluxo. Os autores utilizaram o 5-Br-PADAP como reagente cromogênico. Em solução com pH igual a 3, apenas o complexo de Fe é formado, enquanto que em valor de pH igual a 7,5 tem-se a formação de ambos complexos; deste modo a absorvância do pico em valor de pH igual a 3 está relacionada à concentração de Fe e a absorvância do sinal em valor de pH igual a 7,5 relaciona-se à soma da concentração de Fe e Zn; o que permitiu quantificá-los através da subtração do sinal que corresponde ao complexo de Fe daquele que corresponde à soma dos dois.

### **3.3 Métodos cinético-espectrofotométricos**

De acordo com GERVASIO et al. [28], “com o advento das análises em fluxo, métodos catalíticos vivenciaram uma rápida prosperidade visto que o tempo preciso é inerente a esse tipo de método”.

A necessidade de baixos limites de detecção (LD) nas análises levou ao estudo e aperfeiçoamento dos métodos catalíticos devido a sua grande sensibilidade [29-30].

Através de uma reação catalítica é possível quantificar o catalisador em nível de traços e até ultra-traços com o aumento da taxa de reação [31]. Por serem muito sensíveis, esses métodos têm sido aplicados para determinação de íons metálicos; no entanto, há o inconveniente problema de espécies com propriedades químicas semelhantes possuírem efeitos catalíticos similares. Então, apesar dos métodos catalíticos apresentarem alta sensibilidade, geralmente são pobres em seletividade. Todavia, esse problema pode ser solucionado com o controle do pH do meio reacional [25] e utilização de ativadores químicos [31], pois a atividade catalítica das espécies depende desses fatores [21].

O primeiro trabalho envolvendo determinação de espécies com base no seu efeito catalítico data de 1876, onde GUYARD [32], citado por MÜLLER [33], descreveu a determinação de V através de seu efeito catalítico na reação de oxidação da anilina por clorato de potássio. Desde então, diversos trabalhos envolvendo métodos cinético-espectrofotométricos na determinação de íons metálicos vêm sendo publicados. Vale ressaltar que esse tipo de método é empregado, não só para determinação de espécies metálicas, mas também para determinação de compostos orgânicos, como no trabalho de SAURINA e HERNÁNDEZ-CASSOU [16], no qual foi desenvolvido um sistema para a determinação espectrofotométrica sequencial de anilina e ciclohexilamina via *stopped-flow*; e também ânions inorgânicos, como no caso dos trabalhos de ENSAFI e KAZEMZADEH [34], e de ZHI-QI et al. [35] nos quais foram realizadas determinações de nitrito e nitrato utilizando as propriedades catalíticas desses ânions em determinadas reações, além do trabalho de URAISIN et al. [36], onde os autores desenvolveram um sistema em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de quantidades- traço de brometo em água do mar.

Em 1991, YAMANE e ISHIMIZU [37] propuseram um método cinético utilizando "*stopped-flow*" para a determinação simultânea de Co (II) e Ni (II) em misturas na faixa de concentração de sub-ppm. Neste método, Co e Ni tem efeito cinético diferencial na reação de substituição de ligante nos complexos metálicos de 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(N-propil-N-sulfopropilamino)anilina (PSAA) quando estes encontram-se com ácido nitrilotriacético no sistema em fluxo, a taxa de reação do complexo Ni-PSAA é cerca de 100 vezes maior que a do Co-PSAA. A mudança na absorvância devido à substituição do ligante foi monitorada em 580 nm em função do

tempo. O método apresentou uma frequência de amostragem de  $20 \text{ h}^{-1}$  e foi aplicado somente às misturas sintéticas contendo Co e Ni nas proporções de 1:12 até 10:1.

WANG e HE [38] propuseram um método cinético-espectrofotométrico para a determinação de Hg (II) e Ag (I) baseado no efeito catalítico dos metais na taxa de reação de substituição do ligante entre hexacianoferrato (II),  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  e  $\alpha, \alpha'$ -bipiridina, em meio ácido a  $90^\circ\text{C}$ . A reação foi monitorada espectrofotometricamente a  $536 \text{ nm}$  via “*stopped-flow*” após 100 e 200 s da injeção da amostra. Foi realizado o estudo da influência de íons concomitantes e constatado que Fe (III), Co (II) e Zn (II) apresentaram pequena interferência. As curvas analíticas foram lineares entre  $0\text{-}75 \text{ ng mL}^{-1}$  para Hg (II) e entre  $0\text{-}64 \text{ ng mL}^{-1}$  para Ag (I) segundo os autores. No entanto esta designação é errônea, pois levando-se em conta que os limites de detecção foram  $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$  para Hg (II) e  $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$  para Ag (I), não se pode afirmar que a curva analítica começa em zero. O método desenvolvido foi aplicado na determinação de Hg (II) e Ag (I) em água de abastecimento, águas residuais e misturas sintéticas; e validado por comparação com valores obtidos por espectrometria de absorção atômica AAS.

YE et al. [39] determinaram espectrofotometricamente Fe (III), Ag (I) e Mn (II) utilizando um sistema de análise em fluxo. O método aplicado teve como base o efeito catalítico diferencial desses íons metálicos na oxidação de Rodamina B (RB) pelo periodato de potássio na presença do reagente ativador 1,10-fenantrolina. Os três íons metálicos foram determinados simultaneamente devido ao comportamento cinético diferencial dos analitos frente à reação utilizada. As análises foram desenvolvidas via *stopped-flow* e realizadas através do registro da diminuição da absorbância em  $555 \text{ nm}$ . Os autores utilizaram o filtro Kalman para o processamento dos dados cinéticos. O método foi aplicado a amostras certificadas de ligas metálicas, e os valores encontrados foram concordantes com os valores certificados.

TAVALLALI e MASSOUMI [40] fizeram a determinação simultânea de V (V) e Fe (III) sem prévia separação dos analitos empregando um método baseado no efeito catalítico dos metais na reação de oxidação do *indigo carmine* por bromato. Essa reação tem um período de indução, onde a absorbância diminui em  $\lambda=612\text{nm}$  devido à descoloração da substância *indigo carmine*. A taxa de descoloração é dependente da concentração de V e independente da de Fe, já a duração do período de indução é proporcional à concentração de Fe e independente da de V. O método foi aplicado em

amostras de *vic alloy* e petróleo não refinado além de diversas misturas de soluções-padrão. Os resultados obtidos foram comparados com dados de AAS, com satisfatória concordância entre os mesmos.

Em 1998, FUJIMOTO et al. [31] relataram o desenvolvimento de um método cinético-espectrofotométrico para determinação de Co (II) em concentrações na faixa de sub-nanogramas baseado no efeito catalítico deste íon na reação de acoplamento oxidativo de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona com *N*-etil-*N*-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (DAOS) na presença de peróxido de hidrogênio e Tiron, sendo este último o reagente ativador para a catálise de Co (II). As determinações foram realizadas a 525 nm. O método foi otimizado manualmente e depois adaptado ao sistema em fluxo. O limite de detecção foi de  $5 \text{ pg mL}^{-1}$  (sinal/ruído,  $s/n=3$ ) e a frequência de amostragem de  $30 \text{ h}^{-1}$ . A exatidão do método foi avaliada através da determinação de Co em amostra de pimenteira como material de referência.

Em 2004, SU et al. [17] determinaram Mn (II) em águas naturais, empregando um método espectrofotométrico baseado no efeito catalítico desse íon na reação redox entre periodato de sódio e 4,4-bis(dimetilamino)-difenilmetano através de um sistema de análise por injeção em fluxo. Um intermediário instável de coloração azul foi monitorado a 602 nm. O “stopped-flow” foi empregado para melhorar a sensibilidade do método. O limite de detecção foi de  $0,073 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  com uma frequência de amostragem de  $60 \text{ h}^{-1}$ . O RSD para a determinação de  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de Mn foi 0,5% ( $n=11$ ). A exatidão do método foi realizada através da análise do material de referência certificado (SLEW-2) e o mesmo foi aplicado em amostras de águas naturais.

Em 2006, TESHIMA et al. [41] propuseram um método para determinação espectrofotométrica simultânea de Cu (II), Fe (II) e Zn (II) em soro sanguíneo de animais. Para isso, utilizaram um espectrofotômetro de duplo feixe e uma célula em fluxo multicompartimentada, a qual permitiu a determinação dos três metais com uma única injeção. Os metais foram complexados com 2-(5-nitro-2-piridilazo)-5-[*N*-propil-*N*-(3-sulfopropil)amino]fenol (nitro-PAPS), onde em pH 3,8 na presença de pirofosfato como agente mascarante para Fe, apenas o complexo de Cu é formado, os complexos de Cu e Fe (II) foram formados na presença do agente redutor ácido ascórbico no mesmo pH e finalmente os três complexos são formados com o nitro-PAPS em pH=8,6. O sistema desenvolvido propiciou uma determinação seletiva e sensível para cada

metal determinado. O estudo de íons concomitantes mostrou que para a maioria dos cátions e ânions analisados não houve interferência significativa nos níveis de 2 a 2000 mg L<sup>-1</sup> na determinação de 0,2 mg L<sup>-1</sup> de Cu, Fe e Zn; no entanto para V (V), Co (II) e Ni (II) essas concentrações foram menores. Os limites de detecção calculados foram 3,9 µg L<sup>-1</sup>; 4,1 µg L<sup>-1</sup> e 4,0 µg L<sup>-1</sup> para Cu, Fe e Zn, respectivamente. O método apresentou-se linear de 0,01-1,0 mg L<sup>-1</sup> para os três metais. A frequência de amostragem foi de 20 amostras h<sup>-1</sup>.

Em 2006, GERVASIO et al. [28] determinaram, simultaneamente, Mo (VI) e W (VI) em ligas de aço utilizando um procedimento em fluxo com detecção espectrofotométrica. O método empregado teve como base o efeito catalítico desses íons na reação de oxidação do iodeto por peróxido de hidrogênio em meio ácido. A amostra foi duplamente injetada, formando duas regiões, onde em uma delas foi adicionado citrato como supressor da atividade catalítica do W (VI), gerando uma discriminação cinética entre os analitos em questão. Os autores empregaram uma minicoluna de resina catiônica (AG50W-X8) como estratégia para eliminar espécies potencialmente interferentes. O sistema permitiu a análise de 70 amostras h<sup>-1</sup>. O método foi validado por comparação com a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente ICP OES (do inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*).

Em 2007, SPHIGUN [42] et al. desenvolveram um método espectrofotométrico para a análise de misturas binárias de Cu (II) e Zn (II) baseado na separação cinética dos analitos no sistema em fluxo proposto. O método utilizou dois princípios de FIA: monitorar a reação indicadora via *stopped-flow* e adquirir sinais individuais através de duas zonas reacionais que chegam ao detector em tempos diferentes. Nele, as medidas foram baseadas no diferente comportamento cinético na reação de troca do ligante que ocorre entre complexos desses metais com o mesmo reagente cromogênico (4-(2-piridilazo)-resorcinol ou zincon e ácidos aminopolicarboxílicos). A razão dos metais estudados na mistura não foi maior do que 1:5, e as determinações tiveram erro relativo menores que 5% e boa precisão (RSD- do inglês, *Relative Standard Deviation* < 10%, n= 6, P= 0.95), além de alta frequência de amostragem (90 h<sup>-1</sup>). O método foi aplicado na determinação de Cu e Zn em amostras de vitaminas e complexos minerais.

NI et al. [43] descreveram a determinação simultânea de Fe (III) e Al (III) por um método espectrofotométrico baseada na cinética diferencial dos analitos com o reagente *Chrome Azurol S* (CAS) em solução-tampão etilenodiamina/ácido clorídrico (pH 6,3) a 25°C. Os resultados foram interpretados com o auxílio da quimiometria devido à sobreposição de bandas nos espectros. Os autores estudaram o espectro do complexo formado entre 540-750 nm, e curvas cinéticas foram adquiridas para a reação de complexação entre 15 e 285 segundos no comprimento de onda de absorção máxima. Modelos de calibração foram construídos com um conjunto de misturas sintéticas com diferentes concentrações dos analitos, e estes foram baseados nos dados cinéticos e espectrais obtidos. Fez-se a comparação entre modelos construídos a partir de diferentes ferramentas quimiométricas como *N-way Partial Least Squares* (NPLS), *Parallel Factor Analysis* (PARAFAC), *Back Propagation artificial Neural Network* (BP-ANN), *Single Radial Basis Function-artificial Neural Network* (SRBF-ANN), and *Principal Component Neural Network* (PC-RBF-ANN), no entanto, estes não apresentaram diferença significativa. O método foi aplicado na determinação de Fe e Al em chá, arroz e macarrão.

### 3.3.1 Reação indicadora

A reação catalisada pelo analito é denominada reação indicadora e esta é sempre termodinamicamente favorável, o catalisador apenas facilita a conversão dos reagentes em produtos. Segundo MÜLLER [33] há mais de 300 reações indicadoras documentadas para a determinação de mais de 50 elementos e compostos.

O Co (II) e o Mn (II) exercem atividade catalítica em inúmeras reações e estas vêm sendo utilizadas como ferramenta analítica para a determinação dos respectivos metais [17, 31, 44]. Para a determinação de Co, diversos reagentes são utilizados, como catecol, quinizarina, ácido cromotrópico e seus derivados, galocianina e pirocatecol violeta [29]. Já o Mn tem atividade catalítica nas seguintes reações redox: dioxima succinamida e oxigênio dissolvido, N,N-dimetil-p-fenilenodiamina, m-fenilenodiamina e peróxido de hidrogênio, difenilcarbazona e oxigênio dissolvido, entre outras [17].

Neste trabalho de mestrado, a reação indicadora escolhida para o desenvolvimento do método analítico é a reação de oxidação do Tiron, a qual é altamente sensível e pode ser utilizada para a determinação de quantidades traço desses metais [14]. Esta reação foi proposta por BOGNÁR [45] em 1961, no qual o autor monitorou a reação a 440 nm para a determinação de Co.

A oxidação do Tiron por um agente oxidante em meio básico é catalisada por íons metálicos divalentes e produz um composto instável de coloração amarela, conforme a reação demonstrada na Figura 3.3.1.1.

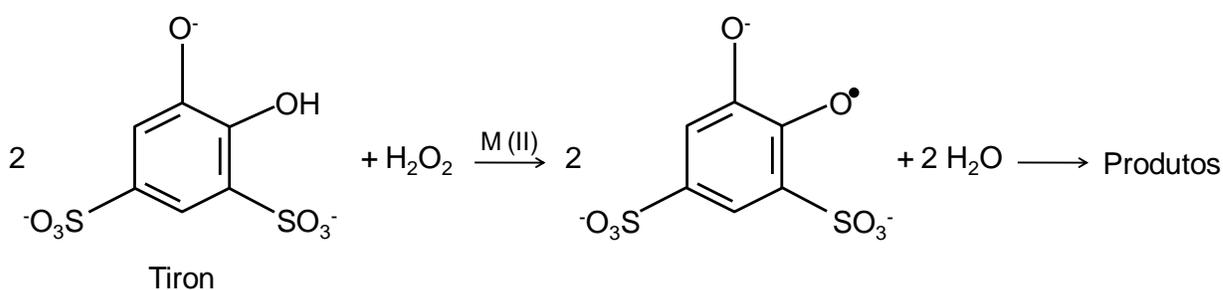


Figura 3.3.1.1 - Reação de oxidação do Tiron catalisada por íons metálicos (M) de valência 2+ [46].

Muitos trabalhos na literatura relataram o emprego dessa reação na determinação de espécies metálicas.

OTTO et al. [47] estudaram o radical de Tiron como substância indicadora em determinações catalíticas de quantidades traço de metais. Neste trabalho, os autores propuseram um mecanismo reacional para a reação de oxidação, onde comprovaram que a substância indicadora é o radical semiquinona do Tiron, e não a o-quinona como relatado anteriormente na literatura.

Em 1983, OTTO et al. [14] otimizaram um sistema para determinação de traços de Co (II) e Mn (II) pela catálise da oxidação do Tiron. O limite de detecção para Co foi de  $0,05 \text{ ng mL}^{-1}$ , e para Mn, na presença de 2,2-bipiridina como ativador, foi de  $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Ainda em 1983, OTTO e WERNER [46] realizaram estudos mecanísticos para a modelagem da reação indicadora Tiron-peróxido de hidrogênio catalisada por íons metálicos.

Em 1987, ISSHIKI e NAKAYAMA [29] determinaram Co (II) em água e água do mar, em quantidade ultra-traço, pela catálise da oxidação de Tiron por peróxido de hidrogênio em meio básico. Os autores adaptaram o método proposto por BOGNÁR [45] a um sistema em fluxo. No sistema proposto, as concentrações de Tiron e peróxido de hidrogênio utilizadas foram 0,01 e 0,005 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. O pH foi determinado pelo uso de tampão carbonato. A frequência de amostragem foi de cerca de 40 h<sup>-1</sup>.

ARRUDA et al. [48] realizaram a determinação catalítica de Co (II) em fígado bovino empregando a reação de oxidação do Tiron e um sistema em fluxo. No sistema utilizado os reagentes foram previamente misturados no sistema em fluxo e, em seguida, com a amostra. A curva analítica mostrou-se linear entre 0,00 e 2,00 µg L<sup>-1</sup>; o limite de detecção foi de 2 ng L<sup>-1</sup> de Co e a frequência de amostragem foi de 40 h<sup>-1</sup>. A exatidão do método foi comprovada por GFAAS.

NOGUEIRA et al. [49] utilizaram um sistema em fluxo com detecção espectrofotométrica, onde a reação de oxidação de Tiron por peróxido de hidrogênio foi empregada para determinação de Co (II) em fezes de bovinos e equinos. Neste trabalho, os autores extraíram o Co da amostra de interesse utilizando-se ácido clorídrico como solução extratora. O procedimento de extração apresentou-se como uma boa alternativa à digestão nitro-perclórica devido a este ser bem mais rápido que a digestão. Os resultados obtidos indicaram que o método foi exato, preciso (RSD<1%) e rápido ( $\pm 65$  determinações h<sup>-1</sup>). O limite de detecção foi 0,2 µg L<sup>-1</sup> (n=3). Por todas as vantagens descritas, o método pôde ser usado em análises de rotina de Co em fezes animais.

Em 1999, PEREIRA-FILHO e ARRUDA [50] desenvolveram um mecanismo de digestão de amostras de alimentos “*online*” utilizando radiação microondas e empregaram a reação de oxidação de Tiron por peróxido de hidrogênio para a determinação de Co (II) em amostras digeridas. As concentrações de Tiron e peróxido de hidrogênio utilizadas foram 1,8 x 10<sup>-3</sup> e 3,0 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. O método proposto utilizou um sistema monossegmentado e apresentou-se linear de 10 a 200 ng L<sup>-1</sup> de Co, com limite de detecção de 1,7 ng L<sup>-1</sup>. A exatidão do método foi confirmada pelo uso de amostras certificadas, além da comparação com ETAAS (do inglês, *Electrothermal AAS*).

Por fim, em 2002, PEREIRA-FILHO et al. [51] desenvolveram um sistema em fluxo monossegmentado utilizando a reação de oxidação de Tiron por peróxido de hidrogênio em meio básico (pH=13), catalisada por Co (II), para a determinação residual de peróxido de hidrogênio em águas de lavagem de garrafas plásticas. O método mostrou-se extremamente sensível, com limite de detecção de  $19 \mu\text{g L}^{-1}$ . O sistema desenvolvido possibilitou cerca de 100 determinações por hora, utilizando apenas 0,53  $\mu\text{g}$  de Tiron por determinação.

Todos os trabalhos apresentados nesta parte efetuaram a determinação de Co e/ou Mn de forma monoelementar.

### 3.4 Co e Mn

Os metais de interesse neste trabalho são o Co (II) e o Mn (II) devido à importância bioquímica desses no corpo humano.

O Co é absorvido pelo corpo humano como cobalto inorgânico ou como Co presente na vitamina B<sub>12</sub>. Este metal é imprescindível na síntese da vitamina B<sub>12</sub>, a qual pode ser descrita como um grupo de corrinóides que contêm Co, conhecidos como cobalamina [53]. Esta vitamina é indispensável ao organismo humano, pois participa na síntese de DNA (*DeoxyriboNucleic Acid*), metabolismo do propionato além de prevenir e controlar a anemia perniciosa [48]. Como já implícito anteriormente, além da deficiência de vitamina B<sub>12</sub> ser a causadora da anemia perniciosa, esta pode causar lesões neurológicas, fadiga crônica, falta de resistência física, perda de sensibilidade e até depressão mental [54]. Já a ingestão em excesso de Co por um longo período de tempo pode causar doenças do coração [48]. Alimentos de origem animal, tais como fígado, ovos, leite e seus derivados são boas fontes de Co [55].

Em bovinos sob condição de pastagem, a deficiência de Co é um problema grave e ocorre com frequência, pois provoca a falta de apetite, perda de peso, pêlos arrepiados, anemia megaloblástica e até mesmo a morte em casos extremos [56].

Portanto, devido aos diversos problemas relacionados à deficiência de Co em humanos e animais, torna-se importante a determinação desse metal em produtos alimentícios, tecidos animais e fármacos que o contenha. Como a composição dos

tecidos do corpo reflete a alimentação de um animal, comumente utiliza-se o fígado para avaliar a concentração de Co [57].

O Mn, bem como o Co, é um metal importante em processos bioquímicos, pois é um constituinte das enzimas superóxido dismutase mitocondrial (SOD, *SuperOxide Dismutase*) que é responsável pela correta metabolização dos radicais livres nas mitocôndrias. O aumento de radicais livres está associado à deficiência de SOD. Além disso, o Mn é importante na síntese do colesterol e de dopamina, a qual é um importante neurotransmissor. Diversos sintomas estão associados à deficiência de Mn, sendo os mais importantes, a perda de peso, falta de resistência física, metabolismo dos ossos e das cartilagens prejudicado, alterações da tolerância à glicose e da síntese de insulina além da redução da fertilidade. A deficiência de Mn parece aumentar a suscetibilidade do organismo às crises convulsivas. Baixa concentração de Mn causa importante diminuição das taxas de colesterol no sangue podendo provocar quadros depressivos. Em gestantes, as malformações fetais foram associadas à deficiência desse metal [54].

Em bovinos o Mn também é importante para o bom funcionamento dos processos reprodutivos, manutenção da estrutura óssea e adequado funcionamento do sistema nervoso central. No entanto, a deficiência de Mn é pouco comum em bovinos sob pastagem. Mas se a deficiência ocorrer, anomalias no esqueleto de animais jovens e recém nascidos podem ser detectadas além do mau funcionamento do sistema reprodutor, acarretando cios tardios e conseqüente diminuição na taxa de concepção [56].

# Capítulo 4

---

PARTE EXPERIMENTAL

## 4 Parte experimental

### 4.1 Material e equipamentos

Neste trabalho foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos:

- Balança analítica, marca Bel engineering, modelo Mark 210A;
- Bomba peristáltica com 8 canais e velocidade variável, marca Ismatec, modelo IPC;
- Bloco digestor, marca Solab;
- Centrífuga, marca Labnet, modelo z 200 A;
- Computador para aquisição de dados;
- Cubeta, de caminho ótico de 1 cm e volume igual a 4 mL;
- Desionizador de água, marca Millipore Milli-Q<sup>®</sup> plus;
- Espectrofotômetro, marca Femto, modelo 600 Plus, equipado com célula de fluxo de 20 mm de caminho ótico e 400 µL de capacidade;
- Espectrofotômetro, marca Hitachi, modelo U-2001
- Espectrômetro de absorção atômica, marca Varian, modelo AA240FS;
- Estufa, marca Qualxtron;
- Injetor comutador confeccionado em acrílico;
- Mesa agitadora, marca Thermolyne Maxi-mix III<sup>™</sup>, modelo 65800;
- Tubos de Tygon de diversos diâmetros e tubos de polietileno com diâmetro interno; igual a 0,75 mm para a configuração do sistema em fluxo;
- Vidraria e outros materiais, comuns a um laboratório analítico.

### 4.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico.

- 2,2-Bipiridina (J. T. Baker);
- Ácido clorídrico concentrado, HCl (Merck);
- Ácido nítrico concentrado, HNO<sub>3</sub> (Merck);
- Etanol P.A., C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (Merck);
- Dimetilglioxima, DMG (Merck);
- Hidróxido de amônio concentrado, NH<sub>4</sub>OH (Merck);
- Hidróxido de sódio, NaOH (Merck);

- Peróxido de hidrogênio 30% v/v, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck);
- Soluções padrão de Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, e Zn<sup>2+</sup>; todas com concentração igual a 1000 mg/L (Merck);
- Tiron [3,5 dihidroxi-1,3-ácido benzenossulfônico-sal dissódico monohidratado] [(HO)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>Na)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O] (Aldrich);

Todas as soluções foram preparadas com H<sub>2</sub>O destilada/desionizada e as soluções de Tiron, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NaOH foram preparadas diariamente e acondicionadas em frascos de polietileno previamente descontaminados.

### 4.3 Programas Computacionais

- WindMill versão 6.0 para aquisição dos sinais transientes;
- Surfer versão 5.0 para visualização das superfícies de resposta e gráficos de contorno;
- Microsoft Office Excel 2007 para o tratamento de dados e cálculos.

### 4.4 Amostras

As amostras empregadas na realização deste trabalho estão relacionadas na Tabela 4.4.1

Tabela 4.4.1 – Amostras e suas respectivas descrições

Amostra	Nome	Descrição
1	Ostra	Tecido de ostra
2	Arroz com legumes*	Merenda escolar
3	<i>Fegatelli</i> *	Merenda escolar (preparado a partir de fígado de aves)
4	Fígado bovino	NIST ( <i>National Institute of Standards &amp; Technology</i> ) <i>Standard Reference Material</i> (SRM) 1577a
5	Tecido de ostra	NIST 1566b
6	Medicamento A	Complexo multivitamínico indicado na reposição de vitaminas e sais minerais (sólido)
7	Medicamento B	Medicamento indicado no tratamento de anemia perniciosa (sólido)
8	Ni 200	Liga metálica de Ni
9	Aço 420	Liga metálica
10	Aço	Liga metálica (prego)
11	Medicamento C	Medicamento indicado para a normalização do metabolismo (associação de aminoácidos e hidroxicoalamina) (sólido)
12	Medicamento D	Medicamento de uso veterinário para reposição de vitamina B <sub>12</sub> com administração por via oral (líquido)

\*amostras liofilizadas e cedidas gentilmente pela professora Dra. Semíramis M. A. Domene da Faculdade de Nutrição da PUC-Campinas (Campinas – SP).

#### 4.5 Determinação do comprimento de onda para as determinações espectrofotométricas

Para estabelecer o comprimento de onda ótimo do método desenvolvido, fez-se a varredura espectral dos produtos formados na reação de oxidação do Tiron, resultantes da catálise por Co e por Mn, separadamente. Nestes experimentos, foi colocado em uma cubeta de caminho ótico de 1 cm, 1 mL de cada uma das seguintes soluções: Tiron  $0,43 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>; NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $25 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e solução

padrão de Co  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  ou Mn  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ; além disso, na catálise por Mn foi utilizado 1 mL de solução de 2,2-bipiridina como reagente ativador. Em ambos experimentos foram colocados todas as soluções de reagentes na cubeta e em seguida realizou-se a adição do catalisador. Após dois minutos desta adição foram realizadas as medidas.

A análise foi realizada em um espectrofotômetro Hitachi, modelo U-2001, e a varredura espectral foi efetuada no intervalo de comprimento de onda de 270 nm a 1100 nm.

## 4.6 Triagem de Variáveis e Otimização do sistema FIA

### 4.6.1 Triagem das Variáveis

No processo de desenvolvimento do método, inicialmente foi efetuado um estudo preliminar para a triagem das variáveis do sistema. Para isso foi realizado um planejamento fatorial fracionário  $2^{9-5}$ , no qual as variáveis e seus respectivos níveis estudados encontram-se descritos na Tabela 4.6.1:

TABELA 4.6.1 - Planejamento fatorial  $2^{9-5}$  efetuado no estudo preliminar da triagem de variáveis do sistema

Nível	Variável								
	NaOH	Tiron	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Bipy	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	Vazão*	Posição das alças
	(mol L <sup>-1</sup> )	(10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> )			(μL)			(mL min <sup>-1</sup> )	
-1	0,1	0,5	0,5	0,5	45	90	120	0,8	L <sub>1</sub> /L <sub>3</sub>
1	1,0	5,0	5,0	5,0	85	180	250	1,6	L <sub>3</sub> /L <sub>1</sub>

\*Para a vazão  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  dos reagentes a da solução carregadora foi  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ , e para a de  $1,6 \text{ mL min}^{-1}$  foi de  $6,0 \text{ mL min}^{-1}$ .

Após a triagem das variáveis, foi realizado um planejamento fatorial  $2^3$ , onde as variáveis estudadas e seus respectivos níveis encontram-se na Tabela 4.6.2 e 4.6.3.

TABELA 4.6.2 - Planejamento fatorial  $2^3$  efetuado na triagem de variáveis do sistema

Experimento	Tiron	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NaOH
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

TABELA 4.6.3 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial empregado na triagem das variáveis do sistema em fluxo.

Nível	Tiron( $10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> )	NaOH (mol L <sup>-1</sup> )
-1	0,5	5,0	0,1
1	2,0	20	0,4

Cada experimento realizado constituiu uma curva analítica, a qual foi construída a partir das seguintes soluções-padrão contendo Co e Mn (Tabela 4.6.4).

TABELA 4.6.4 – Concentrações das soluções-padrão utilizadas na curva analítica

Solução-padrão	[Co] $\mu\text{g L}^{-1}$	[Mn] $\mu\text{g L}^{-1}$
1	7	120
2	14	240
3	21	360
4	28	480
5	35	600

A resposta para cada experimento foi o coeficiente angular da curva analítica ou a absorvância da solução-padrão “3”.

As determinações espectrofotométricas foram efetuadas em um sistema em fluxo, conforme esquematizado na Figura 4.6.1.

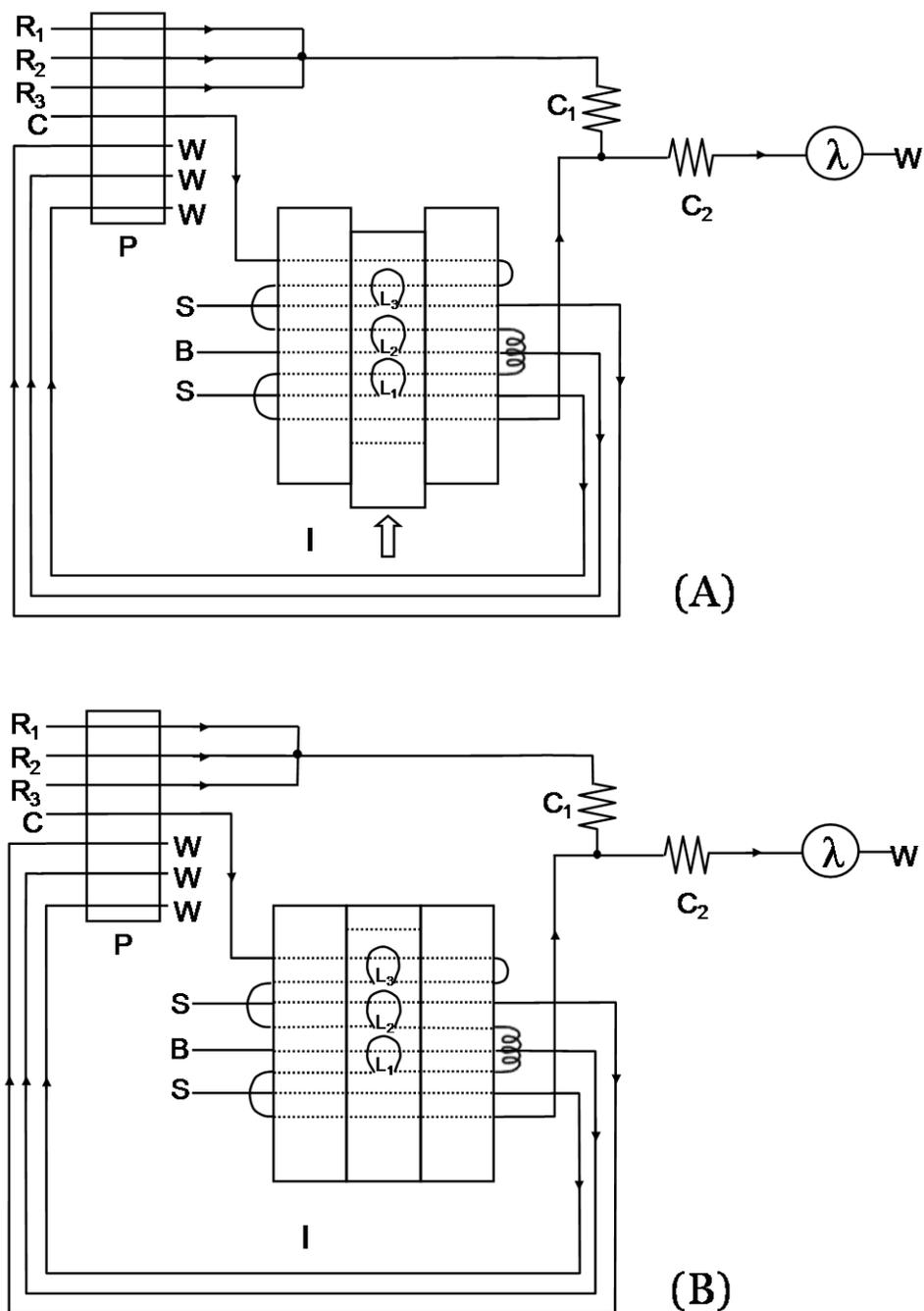


FIGURA 4.6.1 - Representação esquemática do sistema em fluxo empregado, onde  $R_1$ : Tiron;  $R_2$ :  $H_2O_2$ ;  $R_3$ : NaOH;  $C$ : solução transportadora ( $HNO_3$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  + etanol 10% v/v);  $P$ : bomba peristáltica;  $I$ : Injetor;  $S$ : amostra;  $B$ : 2,2-bipiridina;  $C_1$  e  $C_2$ : reatores de 100 e 150 cm respectivamente;  $\lambda$ : espectrofotômetro; e  $W$ : descarte. Em (A): posição de amostragem; em (B): posição de injeção da amostra.

#### 4.6.2 Otimização do sistema FIA

Após a triagem de variáveis do sistema, partiu-se para o processo de otimização das variáveis realmente significativas.

Neste caso, foi realizado um planejamento  $2^2$  + ponto central + estrela, no qual as variáveis estudadas foram as concentrações da solução de Tiron e de NaOH, conforme descrito na Tabela 4.6.2.1. A concentração das soluções de  $H_2O_2$  e 2,2-bipiridina utilizadas neste estudo foram fixadas em  $25 \times 10^{-3}$  e  $5,0 \times 10^{-3}$  mol  $L^{-1}$ , respectivamente.

TABELA 4.6.2.1 - Planejamento composto central efetuado para a otimização das variáveis do sistema

Experimento	Tiron	NaOH
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	-1,41	0
9	1,41	0
10	0	-1,41
11	0	1,41

TABELA 4.6.2.2 - Níveis das variáveis do planejamento composto central empregado na otimização das variáveis do sistema em fluxo.

Nível	Tiron ( $10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> )	NaOH (mol L <sup>-1</sup> )
-1,41	2,0	0,40
-1	2,4	0,49
0	3,5	0,70
1	4,5	0,91
1,41	5,0	1,0

Cada experimento realizado constituiu uma curva analítica, a qual foi construída a partir das seguintes soluções-padrão contendo Co e Mn (Tabela 4.6.2.3).

TABELA 4.6.2.3 – Concentrações das soluções-padrão utilizadas na curva analítica

Solução-padrão	[Co] $\mu\text{g L}^{-1}$	[Mn] $\mu\text{g L}^{-1}$
1	5	150
2	10	300
3	15	450
4	20	600

A resposta para cada experimento foi o coeficiente angular da curva analítica obtida. Os experimentos foram realizados utilizando-se o mesmo sistema em fluxo da Figura 4.6.1.

## 4.7 Estudo do perfil catalítico dos analitos

No estudo do perfil cinético dos analitos foram utilizadas as seguintes soluções: Tiron  $5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $25 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>; NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup>; 2,2-bipiridina  $5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e solução carregadora HNO<sub>3</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup> em etanol 10% v/v. A solução analítica empregada no experimento foi preparada utilizando-se diluições sucessivas de soluções-padrão 1000 mg L<sup>-1</sup> de Co e Mn, sendo que a concentração destes íons na solução foram, respectivamente, 10 e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Neste experimento, foi utilizado o sistema em fluxo com a mesma configuração daquela representada na figura 4.6.1.1, exceto em relação ao comprimento do reator C<sub>2</sub>, que neste caso foi de 18 cm (o menor comprimento possível).

A primeira etapa do experimento foi o registro da absorbância da solução analítica sem interrupção do fluxo, para a verificação dos valores máximos obtidos na catálise por Co e Mn, respectivamente. No estudo do perfil catalítico do Co, quando a absorbância chegou ao seu primeiro máximo a bomba peristáltica foi desligada e, conseqüentemente, o fluxo interrompido; sendo que este foi religado novamente, apenas quando cessou-se o aumento no sinal analítico. O mesmo procedimento foi realizado para o estudo catalítico do Mn, no entanto o “*stopped-flow*” foi executado no segundo valor de máximo da absorbância anteriormente registrada.

Em seguida, foram registradas as absorbâncias da solução-padrão variando-se o comprimento do reator C<sub>2</sub>. Foram utilizados reatores de 150 e 300 cm.

## 4.8 Avaliação de interferentes

### 4.8.1 Triagem de interferentes

A investigação de possíveis interferentes no método desenvolvido foi feita com base na concentração de íons metálicos de valência 2+ presentes nas amostras certificadas utilizadas neste trabalho.

Foram tomados como possíveis interferentes os íons Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> (no caso do Mn), Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> (no caso do Co), Ni<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>. Os níveis de concentração empregados neste estudo foram baseados em valores de concentração encontrados em amostras de referência de alimentos.

Primeiramente foi efetuado um planejamento fatorial fracionário 2<sup>7-2</sup> onde as variáveis foram os íons metálicos, como descrito nas Tabelas 4.8.1.1 a 4.8.1.4.

TABELA 4.8.1.1 – Planejamento fatorial fracionário  $2^{7-2}$  efetuado na triagem dos possíveis interferentes no sinal do Co

Experimento	1	2	3	4	5	6 (1234)	7 (12345)
	Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Ni	Zn
1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	-1	-1	-1	1
4	1	1	-1	-1	-1	1	-1
.							
.							
.							
30	1	-1	1	1	1	-1	-1
31	-1	1	1	1	1	-1	-1
32	1	1	1	1	1	1	1

TABELA 4.8.1.2 - Níveis das variáveis do planejamento  $2^{7-2}$  empregado na triagem de possíveis interferentes no sinal do Co

Nível	Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Ni	Zn
	(mg L <sup>-1</sup> )						
-1	2,5	0,05	0,005	12,5	0,2	0,025	0,25
1	850	3,5	4	160	5,5	0,05	19,5

TABELA 4.8.1.3 – Planejamento fatorial fracionário  $2^{7-2}$  efetuado na triagem dos possíveis interferentes no sinal do Mn

Experimento	1	2	3	4	5	6 (1234)	7 (12345)
	Ca	Co	Cu	Fe	Mg	Ni	Zn
1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	-1	-1	-1	1
4	1	1	-1	-1	-1	1	-1
.							
.							
.							
30	1	-1	1	1	1	-1	-1
31	-1	1	1	1	1	-1	-1
32	1	1	1	1	1	1	1

TABELA 4.8.1.4 - Níveis das variáveis do planejamento  $2^{7-2}$  empregado na triagem de possíveis interferentes no sinal do Mn

Nível	Ca	Co	Cu	Fe	Mg	Ni	Zn
	(mg L <sup>-1</sup> )						
-1	2,5	0,05	0,5	0,5	15	0,05	0,5
1	150	0,5	10	10	60	0,5	40

#### 4.8.2 Modelagem de superfície para os interferentes

Após obtenção das variáveis estatisticamente significativas, realizou-se um planejamento  $2^3$  + ponto central + estrela, no estudo de interferentes para Co (Tabelas 4.8.2.1 e 4.8.2.2) e um planejamento  $2^4$  + ponto central + estrela, para os interferentes no sinal do Mn (Tabelas 4.8.2.3 e 4.8.2.4). As concentrações dos interferentes foram estipuladas em escala logarítmica para englobar uma ampla faixa de concentração.

TABELA 4.8.2.1 - Planejamento composto central efetuado para a modelagem dos interferentes no sinal do Co

Experimento	Ca	Mg	Mn
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	-1,68	0	0
11	1,68	0	0
12	0	-1,68	0
13	0	1,68	0
14	0	0	-1,68
15	0	0	1,68

TABELA 4.8.2.2 - Níveis das variáveis do planejamento composto central efetuado para a modelagem dos interferentes no sinal do Co

Nível	Ca	Mg	Mn
	(µg L <sup>-1</sup> )		
-1,68	5	5	5
-1	100	70	30
0	2090	890	170
1	42600	12000	950
1,68	850000	160000	5500

TABELA 4.8.2.3 - Planejamento composto central efetuado para a modelagem dos interferentes no sinal do Mn

Experimento	Ca	Co	Fe	Mg
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	0	0	0	0
18	-2	0	0	0
19	2	0	0	0
20	0	-2	0	0
21	0	2	0	0
22	0	0	-2	0
23	0	0	2	0
24	0	0	0	-2
25	0	0	0	2

TABELA 4.8.2.4 - Níveis das variáveis do planejamento composto central efetuado para a modelagem dos interferentes no sinal do Mn

Nível	Ca	Co	Fe	Mg
	(µg L <sup>-1</sup> )			
-2	500	5	500	500
-1	2100	15	1050	1650
0	8700	50	2250	5600
1	36200	150	4700	18800
2	150000	500	10000	60000

## 4.9 Preparo das amostras

### 4.9.1 Extração com ácido diluído

Para a extração dos analitos de interesse nas amostras estudadas (ostra, arroz com legumes, Fegatelli, amostra certificada de fígado bovino e medicamento A) foi realizada uma extração com ácido diluído, conforme proposto por DONATI et al. [52].

Inicialmente foram pesadas 0,250 g de amostra e esta massa foi transferida a um tubo de ensaio de volume 15 mL, onde foram adicionados 10 mL de HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida, aqueceram-se os tubos a 65 °C durante 15 min em uma estufa. Após o aquecimento, fez-se a agitação dos tubos em mesa agitadora por 30 min e posterior centrifugação a 3500 rpm por 10 min. Então, foram transferidos 9 mL para um outro tubo e 600 µL de NH<sub>4</sub>OH concentrado foram adicionados para ajuste de pH. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 4.9.2 Digestão em bloco digestor

#### (a) Amostras de alimentos e medicamento B

Para a digestão das amostras foram pesados 0,100 g do medicamento B e 0,200 g das amostras certificadas de fígado bovino e de tecido de ostra.

Essas massas foram transferidas a tubos de digestão e a estes foram adicionados 3,0 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado. Em seguida, os tubos foram aquecidos a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  e mantidos nesta temperatura por 60 min. Após resfriamento, foram adicionados 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% v/v e então, os tubos foram aquecidos vagarosamente até  $180\text{ }^\circ\text{C}$ , permanecendo nesta temperatura até obtenção de cerca de 0,5 mL do digerido. Após resfriamento, o digerido da amostra de medicamento B foi quantitativamente transferido a um frasco volumétrico e o volume completado para 50 mL; em seguida a amostra foi diluída pipetando-se 200  $\mu\text{L}$  desta e o volume completado para 5 mL com água deionizada. As amostras certificadas também foram transferidas quantitativamente para frascos volumétricos e o volume completado para 10 mL. Todas as digestões foram realizadas em triplicata

*(b) Amostras de ligas metálicas e medicamento C*

Para a digestão das amostras foram pesados 0,250 g de cada liga metálica e 0,180 g do medicamento C.

As massas foram transferidas a tubos de digestão e às ligas Ni 200 e aço (prego) foram adicionados 10 mL de  $\text{HNO}_3$  50% (v/v); já ao aço 420 foram adicionados 4,0 mL de água régia ( $\text{HCl}:\text{HNO}_3$  na proporção 3:1). Em seguida, os tubos foram aquecidos a  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , durante 80 minutos. Após resfriamento, os digeridos foram quantitativamente transferidos a frascos volumétricos e o volume completado para: 25 mL no caso das amostras Ni 200 e medicamento C, 200 mL para a amostra de aço 420 e 50 mL para a amostra de aço (prego), com água deionizada. Todas as digestões foram realizadas em triplicata.

Primeiramente, as amostras foram analisadas utilizando-se FS-FAAS para obter as concentrações de referência de Co e Mn, no entanto, para isto a amostra de medicamento foi diluída tomando-se uma alíquota de 10 mL e o volume foi completado para 25 mL com solução de  $\text{HNO}_3$   $0,01\text{ mol L}^{-1}$ . Já para a análise no sistema FIA desenvolvido, as amostras foram novamente diluídas. As alíquotas tomadas para as amostras de Ni 200, aço 420, aço (prego) e medicamento C foram respectivamente 35, 400, 250 e 150  $\mu\text{L}$  das soluções já diluídas, e o volume foi completado para 15 mL com solução de  $\text{HNO}_3$   $0,01\text{ mol L}^{-1}$ .

*(c) Amostras de medicamentos B e D*

Para a digestão das amostras foram pipetados 2,5 mL do medicamento D e pesado 0,050 g do medicamento B.

Os volumes pipetados e a massa pesada foram transferidos a tubos de digestão. À amostra líquida foi adicionado 1,0 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e ao medicamento B sólido foram adicionados 3 mL deste mesmo ácido. Os tubos foram aquecidos a 120 °C por 30 minutos, a 150 °C por mais 30 minutos, e em seguida, a temperatura foi elevada a 180 °C para a eliminação do excesso de ácido. As digestões foram realizadas em triplicata. Após resfriamento, os digeridos foram quantitativamente transferidos a frascos volumétricos e o volume completado para 14 mL no caso da amostra sintética e de medicamento D, e 50 mL no caso da amostra de medicamento B.

Inicialmente, as amostras foram analisadas utilizando-se FS-FAAS e em seguida foram diluídas para posterior análise utilizando-se o sistema FIA desenvolvido. As alíquotas tomadas foram 840 µL para o medicamento D e 100 µL para o medicamento B. O volume final foi completado para 15 mL com solução de HNO<sub>3</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>.

## **4.10 Determinação de Co e Mn**

### **4.10.1 Amostras de alimentos**

As determinações foram realizadas espectrofotometricamente utilizando-se o sistema em fluxo da Figura 4.6.1, o qual foi completamente otimizado.

A curva analítica foi preparada com os dois padrões juntos e em meio de HNO<sub>3</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>. As concentrações de Co e Mn nas soluções analíticas de calibração foram 2,5; 5; 10; 20 e 30 µg L<sup>-1</sup> para Co e 50; 100; 200; 400 e 600 µg L<sup>-1</sup> para Mn.

### **4.10.2 Amostras de ligas metálicas e no medicamento C**

Inicialmente as amostras foram analisadas por FS-FAAS. A curva analítica foi preparada com os dois padrões juntos e em meio de HNO<sub>3</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>. As concentrações de Co e Mn nas soluções analíticas de calibração foram 0,25; 1,0; 2,0;

4,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup> para Co e 0,50; 2,5; 5,0; 10; e 20 mg L<sup>-1</sup> para Mn. Os comprimentos de onda utilizados nas análises foram 240,7 nm para Co e 403,1 nm para Mn.

Em seguida, após diluição das amostras de acordo com a faixa de concentração dos analitos obtida por FS-FAAS, fez-se a determinação espectrofotométrica de Co e Mn utilizando-se o sistema em fluxo da Figura 4.6.1.

Para a quantificação de Co e Mn na amostra Ni 200 também adotou-se o método de calibração por adições de padrão (SAM). Nesse método quantidades conhecidas do analito são adicionadas à amostra, obtendo assim uma curva analítica na qual o meio é a própria amostra e a concentração do analito é obtida a partir da extrapolação da curva analítica. O método das adições de padrão é recomendado em casos nos quais a amostra é complexa e, conseqüentemente, a probabilidade de ocorrência de efeitos de matriz é alta [19]. Neste estudo, foram tomadas 4 alíquotas de 5 mL da solução resultante da digestão da liga Ni 200 e a cada alíquota foram adicionadas concentrações crescentes de Co (2, 4 e 6 µg L<sup>-1</sup>) e de Mn (50, 100 e 150 µg L<sup>-1</sup>), sendo que estes não foram adicionados na primeira alíquota (adição zero). Após a adição dos analitos o volume foi completado para 7 mL com solução de HNO<sub>3</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>.

Outra alternativa testada para a quantificação de Co e Mn na amostra de Ni 200 foi a compatibilização de matriz, devido a amostra ser constituída majoritariamente por Ni metálico (99,70%). Neste experimento foi adicionada solução padrão de Ni às soluções da curva analítica para que a concentração final de Ni fosse 37 mg L<sup>-1</sup>. As concentrações de Co e Mn nas soluções da curva analítica foram 6; 7; 8; 9 e 10 µg L<sup>-1</sup> e 40; 80; 120; 160 e 200 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Ainda na tentativa de eliminar a interferência causada pela alta concentração de Ni na amostra da liga metálica Ni 200 tentou-se precipitar o Ni utilizando-se um reagente específico: a dimetilglioxima (DMG). Para isto, tomou-se uma alíquota de 50 µL da solução resultante da digestão da liga Ni 200 e o volume foi completado para 10 mL. Aqueceu-se a amostra a 70-80 °C e em seguida adicionaram-se 850 µL de solução de DMG 1%. Em seguida, gotejou-se solução de NH<sub>4</sub>OH 6 mol L<sup>-1</sup> até a precipitação e aqueceu-se a solução novamente por mais 20 minutos. Após resfriamento, fez-se a centrifugação e separou-se 9 mL do sobrenadante. A este volume foram adicionados mais 100 µL de DMG 1% para confirmar que todo Ni havia

precipitado. Então, foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  concentrado para ajuste de pH e por fim o volume foi completado para 15 mL com solução de  $\text{HNO}_3$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$ . A amostra foi analisada espectrofotometricamente no sistema FIA desenvolvido.

#### 4.10.3 Amostras de medicamentos B e D

Primeiramente as amostras foram analisadas por FS-FAAS. A curva analítica foi preparada com os dois padrões juntos e em meio de  $\text{HNO}_3$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$ . As concentrações de Co e Mn nas soluções analíticas de calibração foram 30; 60; 120; 240; 480 e 960  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Co e 10; 20; 30; e 40 mg  $\text{L}^{-1}$  para Mn. Os comprimentos de onda utilizados para Co e Mn foram, respectivamente, 240,7 e 403,1 nm.

Em seguida, após diluição das amostras de acordo com a faixa de concentração dos analitos obtida por FS-FAAS, fez-se a determinação espectrofotométrica de Co e Mn utilizando-se o sistema em fluxo da Figura 4.6.1. Foram utilizados dois tipos de curva analítica: uma contendo os dois padrões (Co: 1; 3; 5; 7 e 9  $\mu\text{g L}^{-1}$  e Mn: 333; 1000; 1667; 2333; 3000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e outra na qual os padrões de Co (1; 3; 5; 7 e 9  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ou Mn (300; 600; 900; 1200 e 1500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) estavam presentes individualmente. Além disso, as curvas também foram obtidas de maneiras diferentes: individualmente e no modo sequencial.

Na tentativa de quantificar Co e Mn na amostra de medicamento D também foi utilizado o método de calibração por adições de padrão. No entanto, neste caso foram realizados experimentos onde as adições de Co e Mn foram efetuadas separadamente. Para a determinação de Co foram tomadas 5 alíquotas de 560  $\mu\text{L}$  da amostra digerida e a estas, com exceção da primeira, foram adicionadas concentrações crescentes de Co (7, 14, 21 e 28  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Para a determinação de Mn, também foram tomadas 5 alíquotas de 560  $\mu\text{L}$  da amostra digerida e a estas, com exceção da primeira, foram adicionadas concentrações crescentes de Mn (300, 600, 900 e 1200  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

# Capítulo 5

---

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5 Resultados e discussão

### 5.1 Determinação do comprimento de onda ótimo para as determinações espectrofotométricas

Na literatura, a maioria dos trabalhos que apresentam determinações espectrofotométricas simultâneas ou sequenciais utilizam espectrofotômetros que operam no modo de varredura espectral.

Para estabelecer o comprimento de onda para as análises realizou-se uma varredura espectral para o produto formado na reação de oxidação do Tiron pelo  $H_2O_2$  em meio básico, tanto na catálise por Co, quanto na catálise por Mn ativada por 2,2-bipiridina. O espectro de varredura obtido em ambos casos estão apresentados na Figura 5.1.1 Analisando-se os espectros obtidos é possível verificar que o produto formado tem sua absorção máxima em  $\lambda = 426$  nm; desta maneira, a determinação espectrofotométrica sequencial de Co e Mn foi realizada neste comprimento de onda.

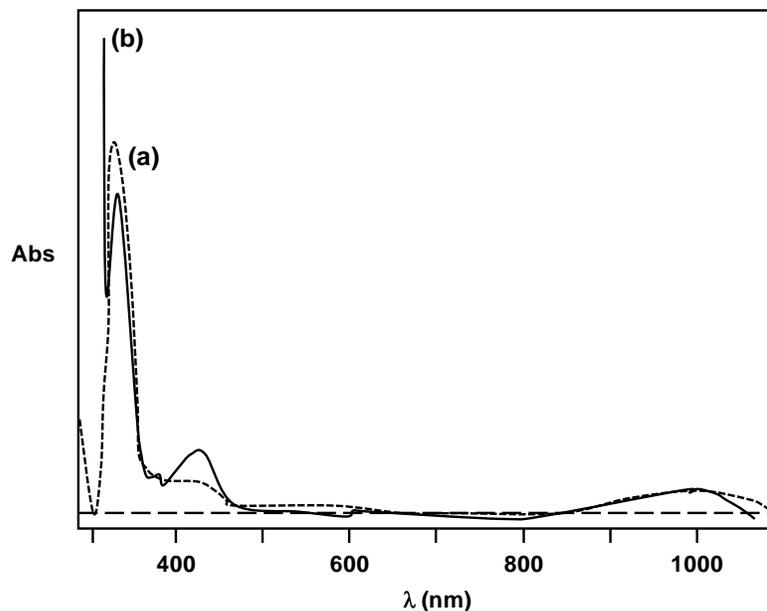


FIGURA 5.1.1 - Espectro de absorção do Tiron oxidado em meio básico pela catálise de Co (a – linha tracejada), e pela catálise de Mn ativada por 2,2-bipiridina (b – linha sólida).

## 5.2 Elaboração do sistema FIA

Com base no trabalho de OTTO e WERNER [46], inicialmente, foram realizados alguns experimentos preliminares nos quais elaborou-se um sistema em fluxo visando a formação de um gradiente de pH, pois de acordo com este trabalho, a catálise por Co da reação de oxidação do Tiron por  $H_2O_2$ , tem sua taxa máxima em valores de pH maiores que 12 e a catálise por Mn em pH por volta de 9,8. Foram avaliadas diversas configurações para o sistema em fluxo, assim como soluções de NaOH em diferentes concentrações e soluções-tampão carbonato de sódio e de ácido bórico-cloreto de potássio para estabelecer o gradiente de pH. No entanto, não foi obtido sinal analítico quando se utilizou o Mn como catalisador da reação. De acordo com este fato, a estratégia da utilização de gradientes de pH no sistema em fluxo foi descartada e partiu-se, então, para a utilização de um reagente ativador no caso da catálise por Mn, pois de acordo com o trabalho de OTTO et al. [14], esta catálise é ativada por 1,10-fenantrolina e por 2,2-bipiridina. Foram testados os dois reagentes ativadores citados, no entanto somente com o ativador 2,2-bipiridina foi obtido um sinal analítico para o Mn.

Em vista dos resultados obtidos nos experimentos preliminares o sistema em fluxo foi desenvolvido com o objetivo de obter-se o sinal analítico do Co e do Mn sequencialmente e com separação física entre os mesmos. Deste modo, o sistema em fluxo foi proposto de modo que o injetor comutador possuísse três alças de amostragem, onde duas dessas alças ( $L_1$  e  $L_3$ ) são utilizadas para amostra, e uma alça ( $L_2$ ) para o reagente ativador 2,2-bipiridina. Neste sistema  $L_1$  tem menor volume que  $L_3$ , já que em  $L_1$  será obtido o sinal para o Co e a reação é mais sensível para este analito do que para o Mn. A posição das alças no sistema FIA foi elaborada com base no perfil catalítico dos analitos. Primeiramente passa pelo detector o volume da alça de amostragem  $L_1$ , na qual será obtido o sinal analítico referente ao Co, pois a taxa de catálise é maior no caso deste catalisador. Na sequência do sistema em fluxo foi inserida a alça para a 2,2-bipiridina ( $L_2$ ), mas entre  $L_1$  e  $L_2$  há um reator, que foi otimizado para que não houvesse sobreposição dos sinais analíticos do Co e do Mn; este reator possui 200 cm de comprimento e o mesmo separa as duas alças através do volume de solução carregadora presente dentro do mesmo. Na sequência está  $L_3$ , que

encontra-se separada de  $L_2$  por um pequeno volume de solução carregadora, que está presente dentro de um reator de 5 cm de comprimento; essas duas alças foram separadas pelo menor volume possível pois os volumes de  $L_2$  e  $L_3$  devem misturar-se pelo efeito de dispersão no sistema em fluxo, havendo assim a ativação da catálise por Mn através do contato com a 2,2-bipiridina. Então, através do sistema em fluxo desenvolvido tem-se a seguinte sequência sendo transportada ao detector, como mostra a Figura 5.2.1.

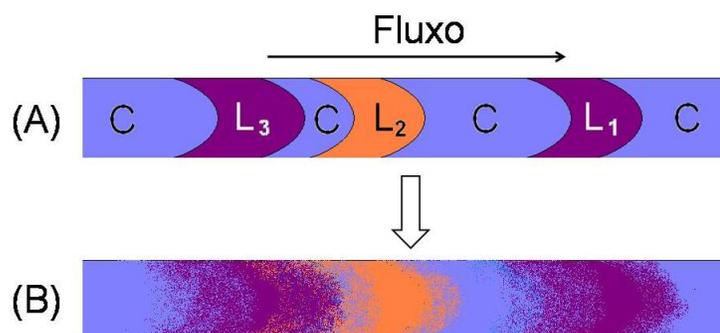


FIGURA 5.2.1 - Representação esquemática da sequência das alças de amostragem que passa pelo detector, onde C é a solução carregadora,  $L_1$  e  $L_3$  são as alças de amostragem contendo a amostra ou branco ou soluções, e  $L_2$  é a alça do reagente 2,2-bipiridina. Em (A) está representada a sequência teórica (sem o efeito de dispersão) e em (B) a simulação da situação real de acordo com o efeito de dispersão no sistema em fluxo.

De acordo com o sistema em fluxo desenvolvido para a determinação sequencial de Co e Mn o sinal analítico obtido tem o perfil ilustrado na Figura 5.2.2.

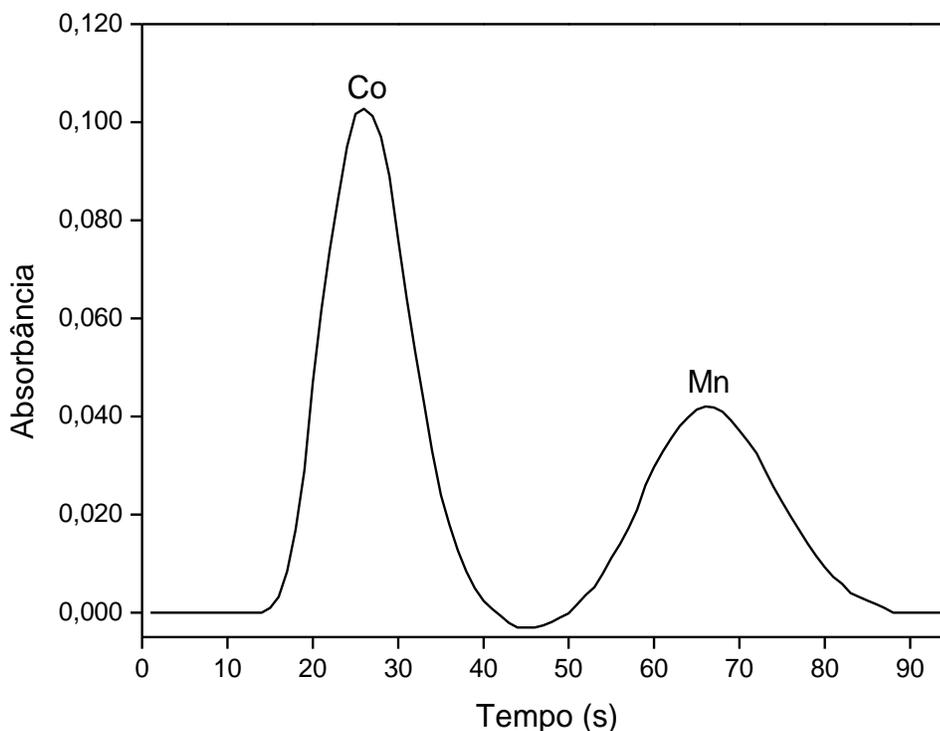


FIGURA 5.2.2 - Sinal transiente obtido na determinação sequencial de Co e Mn, através da injeção de soluções-padrão 21 e 360  $\mu\text{g L}^{-1}$  dos analitos, respectivamente, no sistema em fluxo desenvolvido.

### 5.3 Triagem de Variáveis e Otimização do sistema FIA

#### 5.3.1 Triagem das Variáveis

Ao desenvolver-se um método analítico que utiliza sistemas em fluxo, deve-se considerar que os mesmos possuem diversas variáveis a serem avaliadas e otimizadas, tais como a concentração e vazão dos reagentes, vazão da solução carregadora, volume de amostragem, tamanho dos reatores, entre outras.

Embora o método univariado seja mais conhecido e amplamente utilizado para avaliar e otimizar as variáveis de um sistema, este não é adequado e prático, principalmente quando se trata de um sistema complexo, ou seja, com diversas variáveis, pois quando se faz este tipo de estudo, apenas um parâmetro do sistema é variado enquanto os outros permanecem inalterados, o que leva à realização de um grande número de experimentos, além destes não considerarem o efeito de interação entre as variáveis avaliadas. Além disso, não é possível efetuar previsões em condições

não testadas. Portanto, torna-se mais conveniente, prático e efetivo o emprego de planejamentos fatoriais no estudo de sistemas com muitas variáveis. Para triar variáveis em um sistema complexo utilizam-se planejamentos fatoriais fracionários, onde apenas uma parte da totalidade dos experimentos é realizada; ou seja, com um número relativamente reduzido de experimentos obtêm-se as variáveis realmente significativas na resposta do sistema.

Diversas variáveis estão englobadas na construção do método analítico proposto, no entanto, nem todas estas variáveis podem ser significativamente importantes na obtenção do sinal analítico. Deste modo, após a identificação das variáveis a serem estudadas foi necessário efetuar-se a triagem das mesmas. Em um estudo inicial do sistema foi realizado um planejamento fatorial fracionário  $2^{9-5}$ , totalizando 16 experimentos (veja detalhes na Tabela 4.6.1), os quais foram realizados de forma aleatória. As nove variáveis estudadas foram as seguintes: concentração das soluções de NaOH, Tiron,  $H_2O_2$ , e 2,2-bipiridina, volume das alças de amostragem ( $L_1$  e  $L_3$ ) e da alça de 2,2-bipiridina ( $L_2$ ), além da vazão e a posição das alças de amostragem no sistema FIA.

A partir dos resultados obtidos em cada experimento construiu-se um modelo de calibração multivariada para Co e Mn utilizando-se a ferramenta quimiométrica PLS (*Partial Least Squares*). Um modelo de calibração multivariada deve ser avaliado através de seus parâmetros, tais como o PRESS (*Prediction Errors Sum of Squares*) que é a soma dos quadrados dos erros de previsão, o SEV (*Standard Errors of Validation*) que representa a soma dos quadrados dos erros de validação e o  $r$  (coeficiente de regressão linear), dentre outros.

Através de uma análise comparativa dos parâmetros dos modelos construídos, observou-se que as variáveis de maior influência nestes foram as concentrações de Tiron, NaOH,  $H_2O_2$  e 2,2-bipiridina. Devido às variáveis restantes (vazão, além da posição e volume das alças de amostragem e de 2,2-bipiridina) não serem significativas nas respostas, estas foram desconsideradas no processo de otimização.

No entanto, no decorrer do trabalho notou-se que não havia boa repetibilidade para o sinal referente ao Co em injeções consecutivas do mesmo volume e concentração de solução-padrão. Através de um experimento no qual a solução de

2,2-bipiridina foi substituída por solução carregadora, confirmou-se que resíduos do reagente ativador estavam permanecendo no sistema, pois quando o carregador estava presente obteve-se boa repetibilidade para os sinais, o que levou à conclusão de que resíduos de 2,2-bipiridina afetavam o sinal analítico do Co.

Com o intuito de eliminar a bipiridina residual do sistema foram realizados experimentos com as seguintes estratégias: redução da concentração e volume da solução de bipiridina, adição de várias concentrações de surfactante Triton X-100 à solução carregadora e também à solução de bipiridina para auxiliar na limpeza do sistema, aumento da vazão do carregador para que o reagente ativador fosse eliminado de forma mais rápida do sistema em fluxo, adição de etanol ao carregador para que este dissolvesse possíveis partículas sólidas do reagente, já que a bipiridina é uma molécula orgânica ligeiramente solúvel em água, além de um tempo maior entre as injeções. As alternativas que resolveram o problema encontrado foram a utilização de soluções com reduzida concentração do reagente bipiridina, a adição de etanol à solução carregadora e um tempo maior e fixo (150 s) entre as injeções no sistema em fluxo.

Portanto, mesmo a concentração de 2,2-bipiridina ter se mostrado uma variável significativa para otimização no planejamento anterior, esta foi fixada a uma concentração que não interferisse drasticamente na repetibilidade do sinal analítico do Co.

Diante deste fato, as variáveis foram triadas novamente, e para isto foi realizado um novo planejamento fatorial  $2^3$ , totalizando oito experimentos, onde as variáveis avaliadas desta vez foram a concentração das soluções de Tiron,  $H_2O_2$  e NaOH (ver detalhes na Tabelas 4.6.2 e 4.6.3), já que as outras seis variáveis analisadas anteriormente não foram significativas estatisticamente. Incluindo-se a variável NaOH, estamos estudando, na verdade, o pH ótimo para a determinação sequencial de Co e Mn.

Neste planejamento, cada experimento realizado corresponde a uma curva analítica onde as respostas analisadas foram os coeficientes angular (a), linear (b) e de correlação (r) dessa curva ou a absorbância da “solução 3” (descrita na Tabela 4.6.4). No entanto, as respostas com magnitudes diferentes entre si em um mesmo experimento foram apenas o coeficiente angular e a absorbância da solução 3, sendo

estas as respostas que foram utilizadas na análise dos efeitos do planejamento fatorial executado. As respostas utilizadas foram normalizadas para uma análise mais efetiva dos dados.

A Figura 5.3.1.1 ilustra a curva analítica obtida para o experimento 7 do planejamento fatorial realizado.

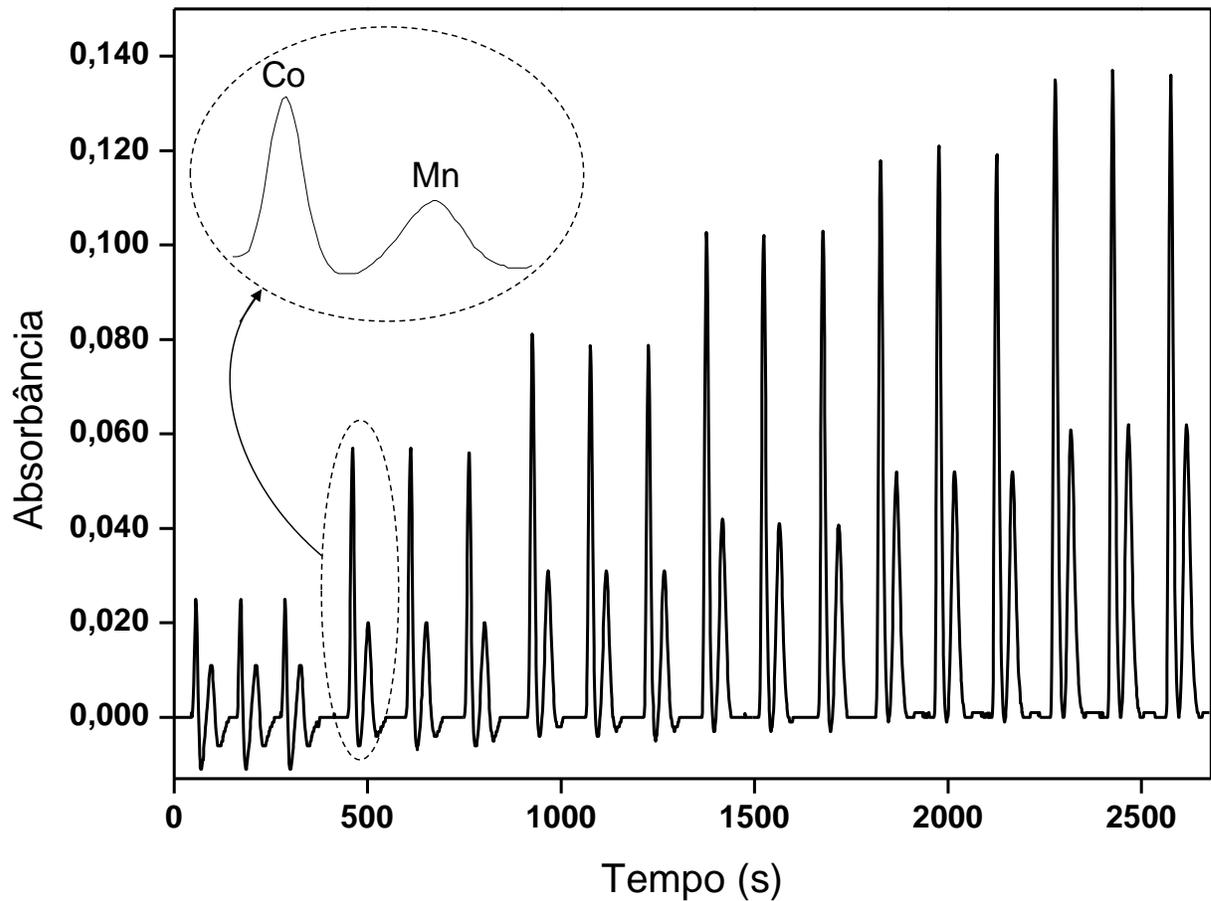


FIGURA 5.3.1.1 - Diagrama obtido no experimento 7 do planejamento fatorial realizado na triagem das variáveis do sistema.

Analisando-se a Figura 5.3.1.1, observa-se um duplo sinal para cada injeção realizada, sendo o primeiro sinal transiente referente ao sinal do Co e o segundo sinal referente ao Mn. Os três primeiros sinais duplos referem-se à triplicata do branco analítico e os demais sinais em triplicata correspondem aos cinco pontos da curva analítica. A curva analítica para Co abrangeu concentrações de 7 a 35  $\mu\text{g L}^{-1}$  e a

do Mn, de 120 à 600  $\mu\text{g L}^{-1}$  (ver detalhes na Tabela 4.6.4), e estas encontram-se representadas na Figura 5.3.1.2 (a) e 5.3.1.2 (b), respectivamente.

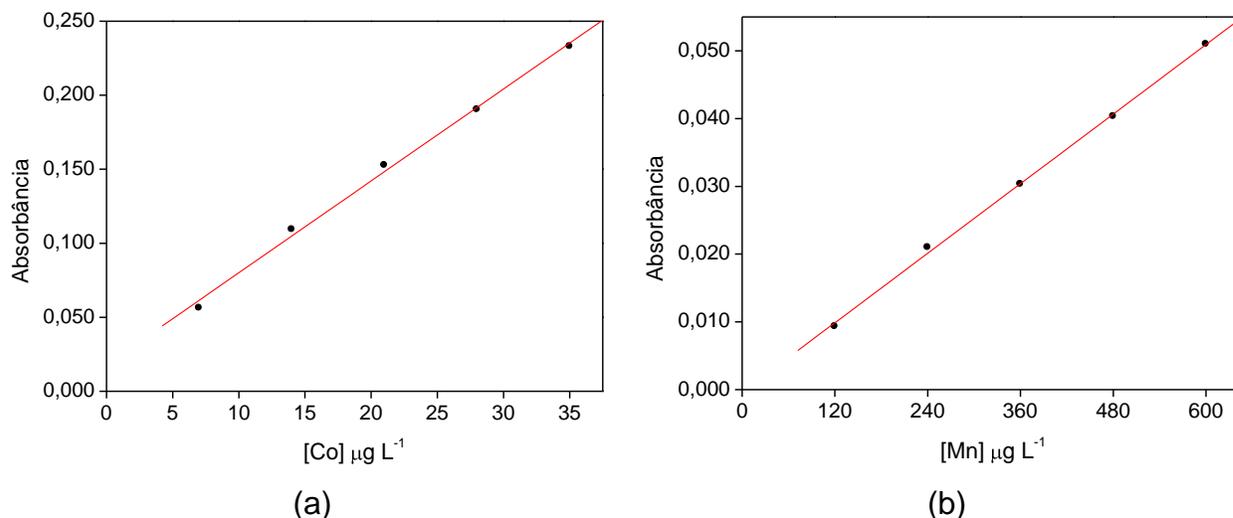


FIGURA 5.3.1.2 - Curva analítica obtida no experimento 7 do planejamento fatorial realizado na triagem das variáveis, para Co (a) e Mn (b).

Para cada um dos oito experimentos realizados, obtiveram-se duas (uma para o Co e outra para o Mn) curvas analíticas semelhantes àquelas ilustradas na Figura 5.3.1.2.

Finalizados os experimentos, foram calculados todos os efeitos para a construção do gráfico de probabilidade para cada resposta analisada.

Os gráficos de probabilidade obtidos para as respostas coeficiente angular da curva analítica e absorbância da solução “3” de cada analito estão apresentados na Figura 5.3.1.3.

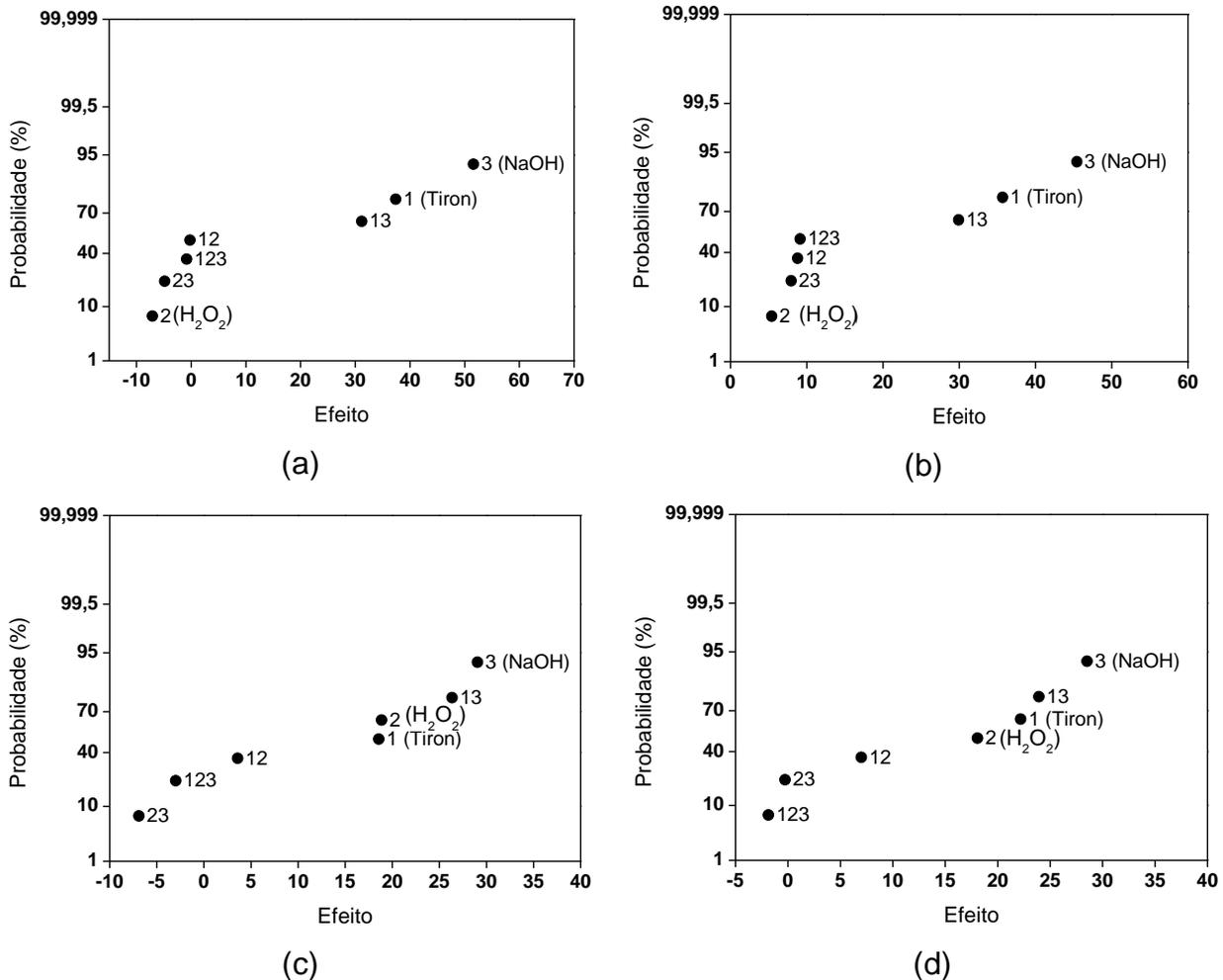


FIGURA 5.3.1.3 - Gráficos de probabilidade. Em (a) e (b) os gráficos referem-se, respectivamente, às respostas absorbância da solução "3" e coeficiente angular, *a*, da curva analítica para o analito Co. Em (c) e (d) os gráficos referem-se, respectivamente, às respostas absorbância da solução 3 e coeficiente angular (a) da curva analítica para o analito Mn.

Analisando-se o gráfico (a) da Figura 5.3.1.3, observa-se que as variáveis Tiron (1), NaOH (3) e a sua interação (13) são estatisticamente significativas e que essas duas variáveis têm efeito positivo sobre a absorbância da solução-padrão de Co, ou seja, se aumentarmos a concentração dessas soluções a absorbância tende a aumentar. Já a variável H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e as interações (12) (23) e (123) das variáveis encontram-se na região de até 10% de influência no sinal analítico e, portanto, não são estatisticamente significativas neste caso. Já no gráfico (b) da mesma figura, tem-se o

mesmo comportamento para as variáveis Tiron, NaOH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando a resposta utilizada é o coeficiente angular da curva analítica. Vale ressaltar que quanto maior o coeficiente angular maior sensibilidade o método terá. Então, no caso do analito Co, tem-se que, se aumentarmos a concentração das soluções de Tiron e de NaOH aumentaremos a absorvância e o coeficiente angular da curva analítica, resultando assim num método mais sensível.

Nos gráficos (c) e (d) da figura 5.3.1.3, observa-se que as três variáveis tem efeito positivo tanto na absorvância da solução-padrão de Mn quanto no coeficiente angular da curva analítica para este mesmo analito, o que leva a conclusão de que se aumentarmos a concentração dessas soluções tenderemos a aumentar a absorvância e também o coeficiente angular.

Os resultados para Mn indicam que a concentração das três soluções deve ser aumentada, no entanto para Co, a variável H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não tem valor significativo, então, optou-se por fazer um ligeiro aumento na concentração desta solução, fixando um valor e não otimizar esta variável, visto que ela tem valor significativo apenas para um dos analitos em questão e o método desenvolvido visou a determinação sequencial destes. O resumo dos resultados obtidos encontra-se na Tabela 5.3.1.1.

TABELA 5.3.1.1 - Resumo dos resultados obtidos na análise dos efeitos do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> realizado na triagem das variáveis

Variável	Analito	Resposta		Conclusão/sugestão
		Absorvância	Coeficiente angular	
Tiron	Co	aumentar	aumentar	aumentar
	Mn	aumentar	aumentar	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Co	indiferente	indiferente	aumentar, no entanto, fixar num valor um pouco acima do que o nível mais alto utilizado no planejamento
	Mn	aumentar	aumentar	
NaOH	Co	aumentar	aumentar	aumentar
	Mn	aumentar	aumentar	

### 5.3.2 Otimização do sistema FIA

Após a triagem das variáveis, partiu-se para o processo de otimização das variáveis realmente significativas para ambos analitos (Co e Mn), que foram a concentração das soluções de Tiron e NaOH.

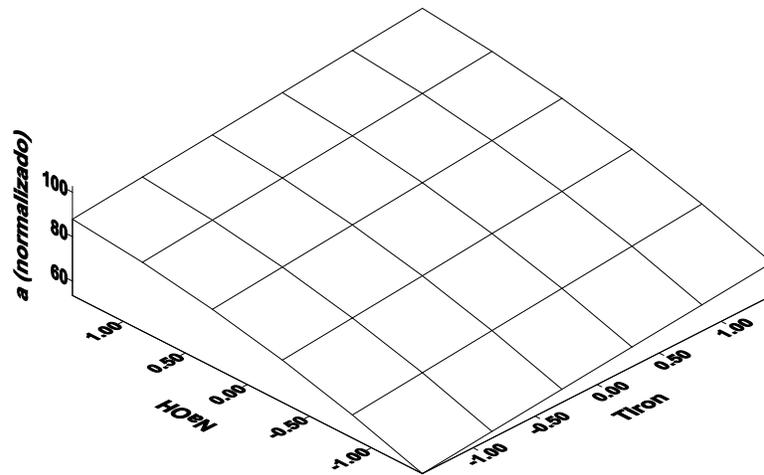
Com o intuito de se obter uma região ótima de trabalho, realizou-se a modelagem de superfície para as duas variáveis estudadas. Um planejamento  $2^2$  + ponto central + estrela (veja detalhes na Tabela 4.6.2.1) foi construído e executado.

Para o analito Co, não se obteve um modelo matemático, ou seja, os coeficientes não foram significativos estatisticamente. Isso mostra que o intervalo de concentrações estudado para as variáveis já apresentava os melhores resultados.

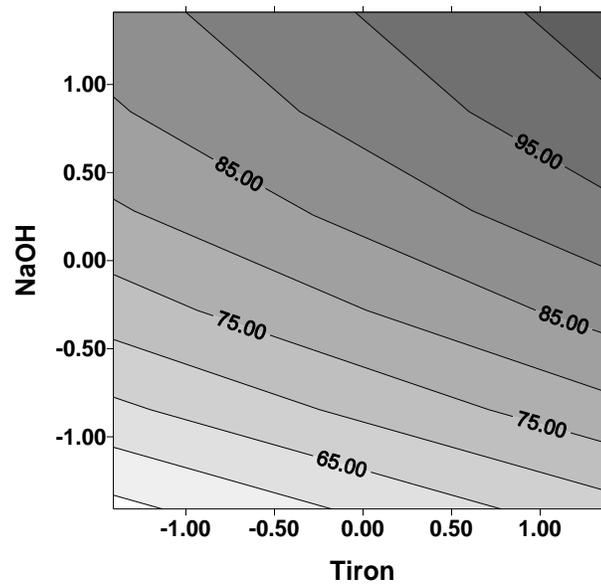
Já para o Mn, o modelo que descreve a inclinação da curva analítica em função das variáveis concentração de Tiron e de NaOH é dado pela equação 5.3.2.1.

$$a = \underset{\pm 1,45}{86,6} + \underset{\pm 0,89}{5,9} \times (\text{Tiron}) + \underset{\pm 0,89}{12,6} \times (\text{NaOH}) - \underset{\pm 1,1}{3,5} \times (\text{NaOH})^2 \quad (\text{equação 5.3.2.1})$$

A superfície de resposta e as curvas de nível, geradas por esta equação podem ser visualizadas, respectivamente na Figura 5.3.2.1 (a) e (b).



(a)



(b)

FIGURA 5.3.2.1 - (a) Superfície quadrática descrita pela equação 5.3.2.1. (b) Suas curvas de nível.

Analisando-se a Figura 5.3.2.1, pode-se afirmar que a inclinação da curva analítica para o Mn tende a aumentar quando se utilizam concentrações elevadas de Tiron e de NaOH. Portanto, optou-se por utilizar a concentração empregada no nível mais alto para as duas variáveis estudadas.

## 5.4 Estudo do perfil catalítico dos analitos

Finalizando o processo de otimização das variáveis do sistema FIA, fez-se o estudo do perfil catalítico do Co e Mn para que o reator C<sub>2</sub> fosse otimizado de acordo com o tempo de reação para cada analito.

Primeiramente, obteve-se um sinal transiente sem interrupção do fluxo utilizando-se um reator C<sub>2</sub> com o menor comprimento possível (no caso, 18 cm). Na injeção seguinte, fez-se a interrupção do fluxo exatamente quando o sinal analítico chegou ao máximo estabelecido no sinal em fluxo, e então esperou-se até que a reação se efetivasse quase que na sua totalidade para que o fluxo fosse religado novamente. O resultado obtido pode ser observado nas figuras 5.4.1 e 5.4.2, para Co e Mn, respectivamente.

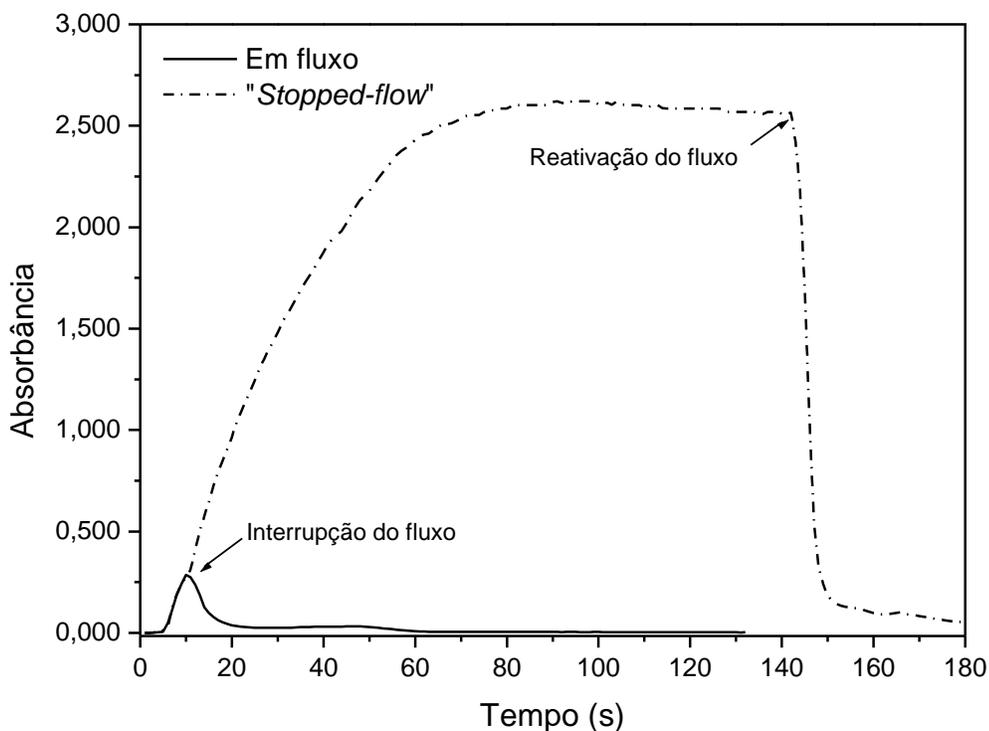


FIGURA 5.4.1 – Estudo do perfil catalítico do Co na reação de oxidação de Tiron por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em meio básico. A linha contínua representa o sinal obtido em fluxo e a linha tracejada refere-se ao sinal obtido com a interrupção do fluxo no máximo do sinal analítico do Co.

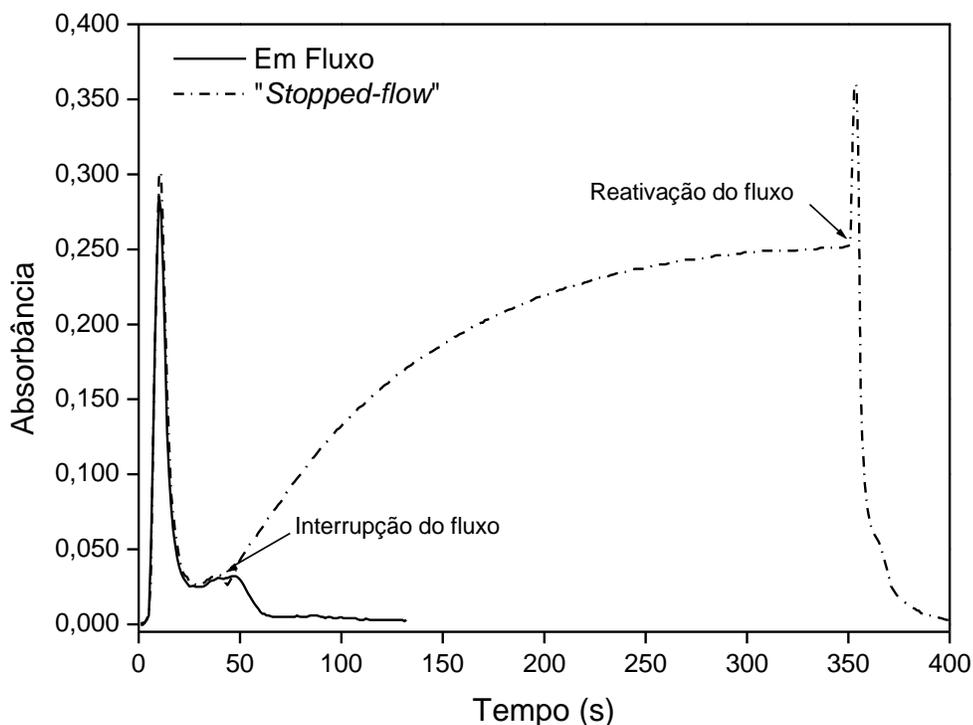


FIGURA 5.4.2 – Estudo do perfil catalítico do Mn na reação de oxidação de Tiron por  $\text{H}_2\text{O}_2$  em meio básico. A linha contínua representa o sinal obtido em fluxo e a linha tracejada refere-se ao sinal obtido com a interrupção do fluxo no máximo do sinal analítico do Mn.

Analisando-se a Figura 5.4.1, pode-se observar que após a interrupção do fluxo, o sinal analítico aumenta rapidamente até por volta de 70 s e depois permanece estável, o que indica que a reação se processou por completo. Então, quando o fluxo é ligado novamente ocorre o processo de lavagem da tubulação do sistema e o sinal retorna à linha de base.

O mesmo comportamento para o sinal do Mn pode ser observado na Figura 5.4.2, mas neste caso, a taxa com que o sinal analítico aumenta após a interrupção do fluxo é bem menor quando comparado ao do Co, o que indica que a catálise se processa mais lentamente quando esta é realizada pelo Mn com ativação por 2,2-bipiridina. Este fato justifica a configuração do sistema FIA proposta, a qual proporciona a aquisição do sinal do Mn após o sinal do Co, ou seja, obtendo-se o sinal do Mn após o do Co, tem-se um tempo maior para que a catálise ocorra.

Diante do fato de que a reação catalisada por ambos analitos leva um certo tempo para ocorrer por completo, e que os sistemas em fluxo caracterizam-se por análises rápidas, optou-se por utilizar um reator que proporcionasse uma análise relativamente rápida, com um ganho no sinal analítico, embora esse não fosse o máximo possível. Para isso foram testados dois comprimentos de reatores, 150 e 300 cm. Além dos fatos já mencionados, pode-se inferir que reatores ainda maiores neste estudo não foram utilizados para evitar grande dispersão da amostra no sistema em fluxo e redução da frequência analítica.

O resultado para os experimentos onde foram avaliados os diferentes comprimentos de  $C_2$ , pode ser observado na figura 5.4.3. O tempo zero é o momento no qual a amostra foi injetada no sistema.

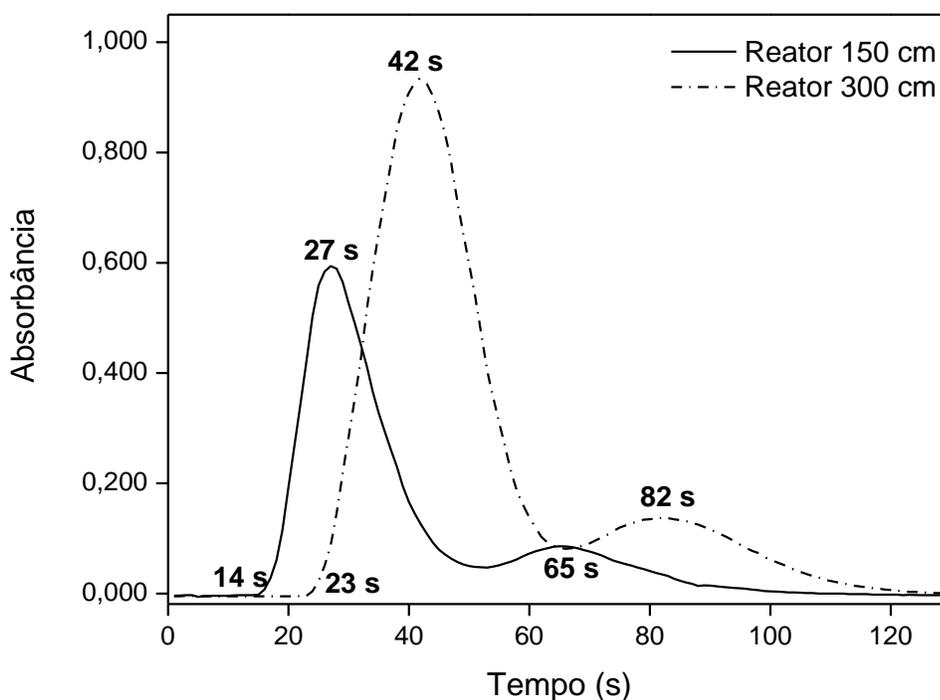


FIGURA 5.4.3 – Estudo comparativo do comprimento do reator  $C_2$  com base no perfil catalítico do Co e Mn na reação de oxidação do Tiron por  $H_2O_2$  em meio básico.

A partir da análise da figura 5.4.3, pode-se observar que quando o reator de 150 cm foi utilizado, o sinal referente ao Co tem início após 14 s da injeção da amostra e alcança seu máximo após 27 s da mesma. Já para o reator de 300 cm, o

sinal tem início após 23 s da injeção e alcança seu máximo após 42 s da mesma. Nota-se que o sinal obtido com o reator de maior comprimento é mais largo que o outro sinal, este fato ocorre devido à maior dispersão da amostra no sistema em fluxo quando comparada àquela resultante da utilização do reator menor, devido ao maior espaço percorrido pela amostra no sistema em fluxo. Em relação à absorbância alcançada, há um aumento relativo de 63,4% quando o reator de 300 cm é utilizado apesar de haver uma maior diluição com o emprego de um reator maior.

Ainda na mesma figura, pode-se observar que o sinal do Mn alcançou seu máximo após 65 s da injeção quando se utilizou o reator de 150 cm, e após 82 s, para o reator de 300 cm. A mesma explicação a respeito da largura dos sinais pode ser dada com relação aos sinais referentes ao Mn. Já com relação à absorbância atingida nos dois sinais pode-se afirmar que houve um aumento relativo de 62,8% quando o reator de 300 cm é utilizado.

Após os processos de otimização realizados, o sistema em fluxo desenvolvido pode ser descrito de acordo com a representação esquemática da Figura 5.4.4.

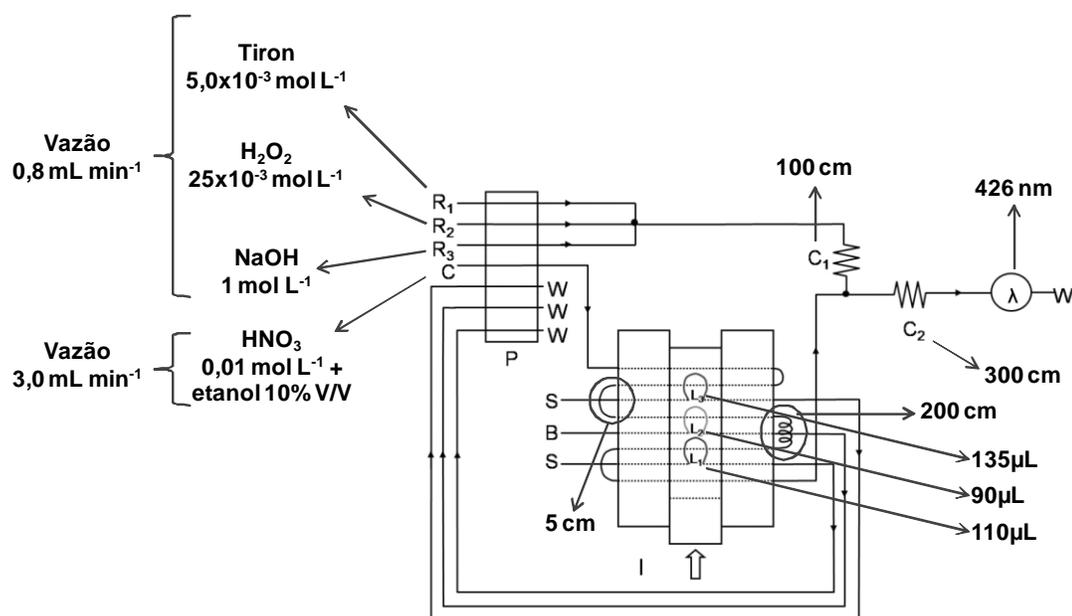


FIGURA 5.4.4 – Representação esquemática do sistema em fluxo otimizado, onde P é a bomba peristáltica, I: injetor; S: amostra; B: 2,2-bipiridina; C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>: reatores; λ: espectrofotômetro (λ= 426 nm); e W: descarte.

## 5.5 Avaliação dos interferentes

### 5.5.1 Triagem de interferentes

Para a avaliação de concomitantes que pudessem interferir no método desenvolvido, avaliaram-se íons metálicos de valência 2+, pois de acordo com OTTO e WERNER [46], esta reação é catalisada por alguns desses íons. Os cátions avaliados foram  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  (no caso do Mn),  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  (no caso do Co),  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . (veja mais detalhes no item 4.8.1).

Inicialmente foi realizado um planejamento fatorial fracionário  $2^{7-2}$  para cada um dos analitos (Co e Mn), com o objetivo de triar os concomitantes que fossem realmente interferentes no método desenvolvido. Portanto, foram avaliadas sete variáveis em dois níveis, sendo cada variável um íon metálico; totalizando 32 experimentos; onde cada um dos experimentos correspondeu a uma solução contendo todos os íons avaliados em diferentes concentrações (veja as Tabelas 4.8.1.1 à 4.8.1.4.) mais o analito (Co ou Mn). As concentrações dos íons avaliadas neste estudo tiveram como base os valores certificados presentes em algumas amostras de alimentos. A resposta para cada experimento foi a porcentagem de interferência em relação a uma solução contendo somente o analito de interesse (Co ou Mn, dependendo do planejamento) na mesma concentração daquela presente na solução contendo os concomitantes.

Finalizados os experimentos, foram calculados todos os contrastes para a construção do gráfico de probabilidade para cada planejamento efetuado.

O gráfico de probabilidade obtido para a resposta porcentagem de interferência em relação a uma solução-padrão de Co está apresentado na Figura 5.5.1.1.

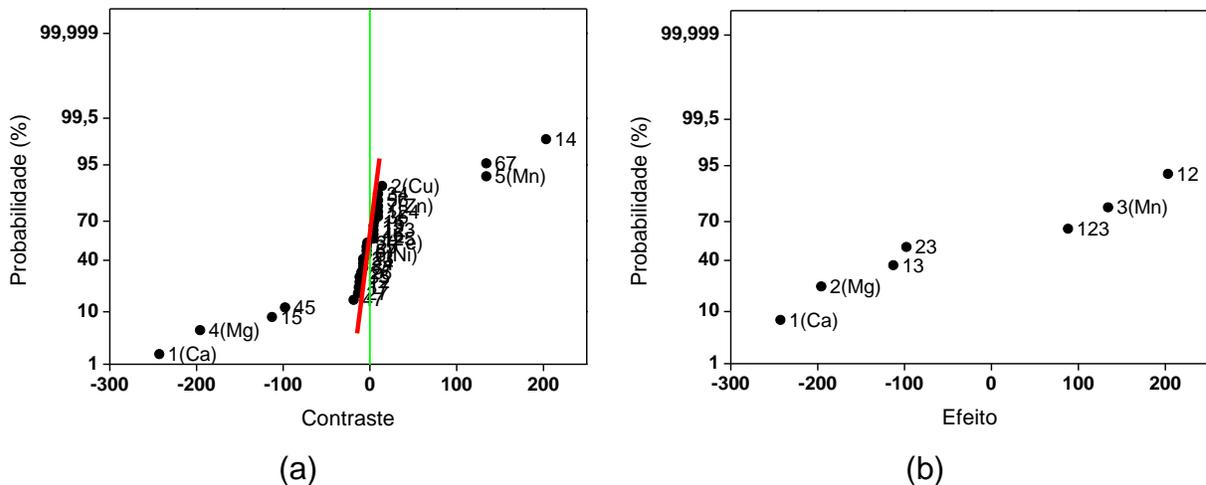


FIGURA 5.5.1.1 - Gráficos de probabilidade para o resultado obtido no planejamento experimental do estudo de interferentes na reação de oxidação do Tiron catalisada por Co. Em (a) o gráfico refere-se, ao resultado obtido para o planejamento fatorial fracionário  $2^{7-2}$ , e em (b), ao planejamento  $2^3$  resultante da exclusão de 4 variáveis do planejamento anterior.

Para a exclusão de íons metálicos não interferentes tomou-se como padrão o limite aceitável de 15% de interferência, ou seja, variáveis que apresentaram contrastes menores ou igual a 15% foram consideradas não significativas em ambos planejamentos.

Então, analisando-se o gráfico (a) da Figura 5.5.1.1, observa-se que as variáveis realmente significativas, ou seja, os íons que interferiram na catálise da reação de oxidação do Tiron pelo Co, neste estudo, foram  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , apresentando grande interferência negativa, e  $\text{Mn}^{2+}$ , apresentando interferência positiva. Portanto, podem ser eliminadas quatro das sete variáveis estudadas (Cu, Fe, Ni e Zn). Essa eliminação das variáveis faz com que o planejamento se torne um fatorial completo  $2^3$  com quadruplicatas para cada experimento. Como o planejamento tornou-se um fatorial completo, são calculados efeitos e não mais contrastes para a construção do gráfico de probabilidade, e este pode ser observado na Figura 5.5.1.1 (b).

Agora, com replicatas para cada experimento, foi possível calcular a variância e o erro experimental além da variância e erro do efeito. Esses valores encontram-se descritos na Tabela 5.5.1.1. Todos os efeitos foram significativos ao nível

de 95% de confiança, ou seja maiores que  $t_{\text{crítico}}(24, 95\%) = 19,41$ . O valor de  $t_{\text{crítico}}$  é calculado através da multiplicação do valor de  $t(24, 95\%)$  pelo valor do erro do efeito.

TABELA 5.5.1.1 - Valores de efeitos significativos, da variância e de erro, experimental e do efeito, para o planejamento fatorial  $2^3$  em quadruplicata realizado no estudo de concomitantes para o analito Co.

Efeito	Valor	Experimental	do efeito
1 (Ca)	-242		
2 (Mg)	-195		
13	-112		
23	-97		
123	89		
3 (Mn)	135		
12	204		
Variância		707	88,4
Erro		27	9,40

Já o gráfico de probabilidade obtido para a resposta porcentagem de interferência em relação a uma solução-padrão de Mn encontra-se na Figura 5.5.1.2.

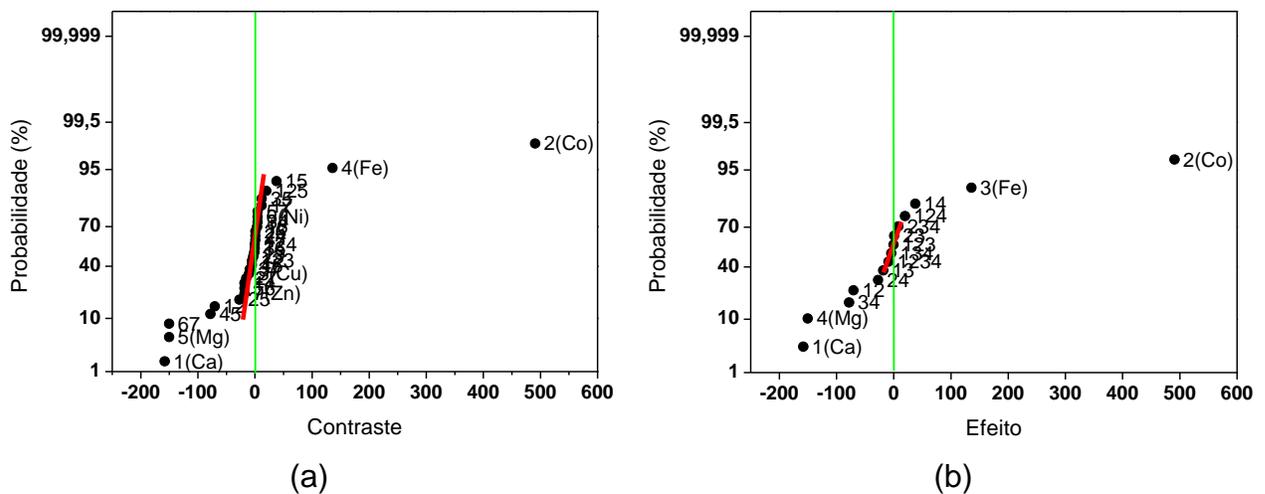


FIGURA 5.5.1.2 - Gráficos de probabilidade para o resultado obtido no planejamento experimental do estudo de interferentes na reação de oxidação do Tiron catalisada por Mn. Em (a) o gráfico refere-se, ao resultado obtido para o planejamento fatorial fracionário  $2^{7-2}$ , e em (b), ao planejamento  $2^4$  resultante da exclusão de 3 variáveis do planejamento anterior.

Analisando-se o gráfico (a) da Figura 5.5.1.2, observa-se que as variáveis realmente significativas foram  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , também apresentando grande interferência negativa assim como na catálise por Co; e  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ , apresentando interferência positiva. Portanto, neste caso, podem ser eliminadas três das sete variáveis estudadas (Cu, Ni e Zn). Essa eliminação das variáveis faz com que o planejamento se torne um fatorial completo  $2^4$  com duplicatas para cada experimento. Como já discutido anteriormente, o planejamento tornou-se um fatorial completo e, portanto, são calculados efeitos e não mais contrastes para a construção do gráfico de probabilidade, sendo que este pode ser observado na Figura 5.5.1.2 (b).

Assim como no planejamento anterior, foi possível calcular a variância e o erro experimental além da variância e erro do efeito através das replicatas para cada experimento. Esses valores encontram-se descritos na Tabela 5.5.1.2. Os efeitos não significativos ao nível de 95% de confiança encontram-se sublinhados pela linha vermelha na Figura 5.5.1.2 (b). Os efeitos significativos foram aqueles cujo valor foi maior que  $t_{\text{crítico}}(16, 95\%) = 19,10$ .

TABELA 5.5.1.2 - Valores de efeitos significativos, da variância e de erro, experimental e do efeito, para o planejamento fatorial  $2^4$  em duplicata, realizado no estudo de concomitantes para o analito Mn

Efeito	Valor	Experimental	do efeito
1 (Ca)	-157		
4 (Mg)	-149		
34	-77		
12	-69		
24	-26		
124	21		
14	39		
3 (Fe)	137		
2 (Co)	492		
Variância		649	81,1
Erro		25,5	9,00

### 5.5.2 Modelagem de superfície para os interferentes

A modelagem dos interferentes foi realizada tanto para Co como para Mn.

O intuito de modelar a porcentagem de interferência nos sinais dos analitos foi estabelecer uma condição ótima de trabalho, ou seja, obter uma região onde a determinação de Co e Mn fosse realizada de modo que nenhuma ou pequena interferência pudesse estar presente.

No caso do Co, três concomitantes foram interferentes no método desenvolvido nas condições avaliadas, portanto, o planejamento realizado foi um  $2^3$  + ponto central + estrela. Para o Mn, o planejamento efetuado foi um  $2^4$  + ponto central + estrela já que quatro dos sete concomitantes avaliados foram interferentes no método. (veja detalhes nas Tabelas 4.8.2.1 a 4.8.2.4).

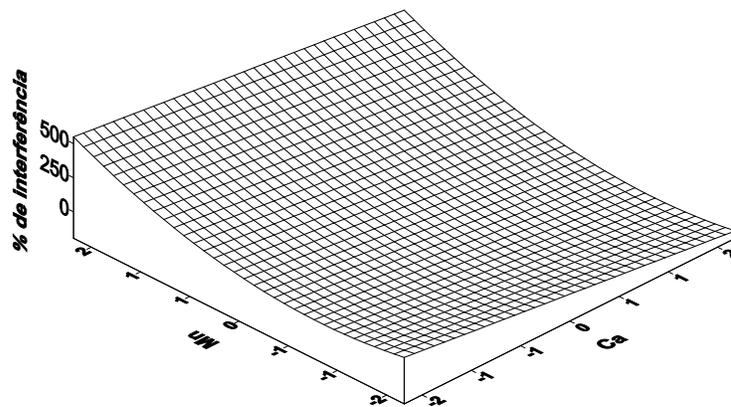
O modelo matemático que descreve a porcentagem de interferência desses concomitantes no sinal do Co é dado pela equação 5.5.2.1.

$$\% \text{ de interferência} = - 83,6 \times (\text{Ca}) + 126,6 \times (\text{Mn}) + 76,0 \times (\text{Mn})^2$$

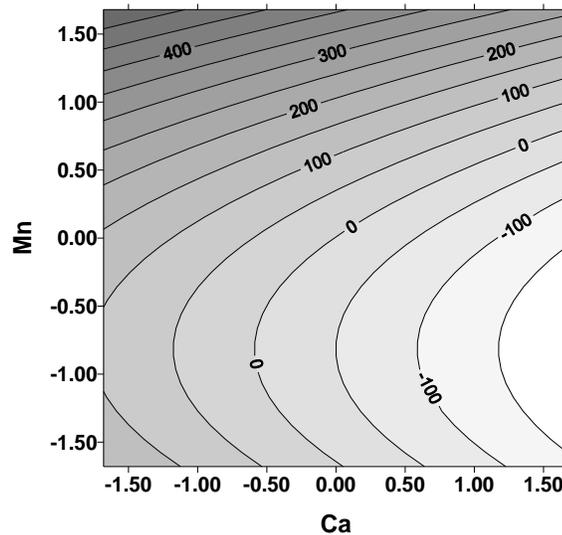
$\pm 29,1$                        $\pm 29,1$                        $\pm 29,1$

(equação 5.5.2.1)

Na equação 5.5.2.1, o coeficiente negativo para Ca representa a interferência negativa desse concomitante, assim como o coeficiente positivo para Mn, representa sua interferência positiva no sinal. A superfície de resposta e as curvas de nível, geradas por esta equação podem ser visualizadas, respectivamente na Figura 5.5.2.1 (a) e (b).



(a)



(b)

FIGURA 5.5.2.1 – (a) Superfície quadrática descrita pela Equação 5.5.2.1. (b) Suas curvas de nível.

Então, analisando-se a Figura 5.5.2.1 pode-se dizer que há, teoricamente, uma região de trabalho livre de interferências, no caso do Co.

Para Mn, a equação que descreve a porcentagem de interferência é dada pela Equação 5.5.2.2:

$$\% \text{ de interferência} = \underset{\pm 32,7}{128} + \underset{\pm 14,9}{161} \times (\text{Co}) + \underset{\pm 14,4}{72,7} \times (\text{Co})^2 \quad (\text{equação 5.5.2.2})$$

A Figura 5.5.2.2 ilustra a % de interferência *versus* concentração normalizada de Co, segundo a Equação 5.5.2.2.

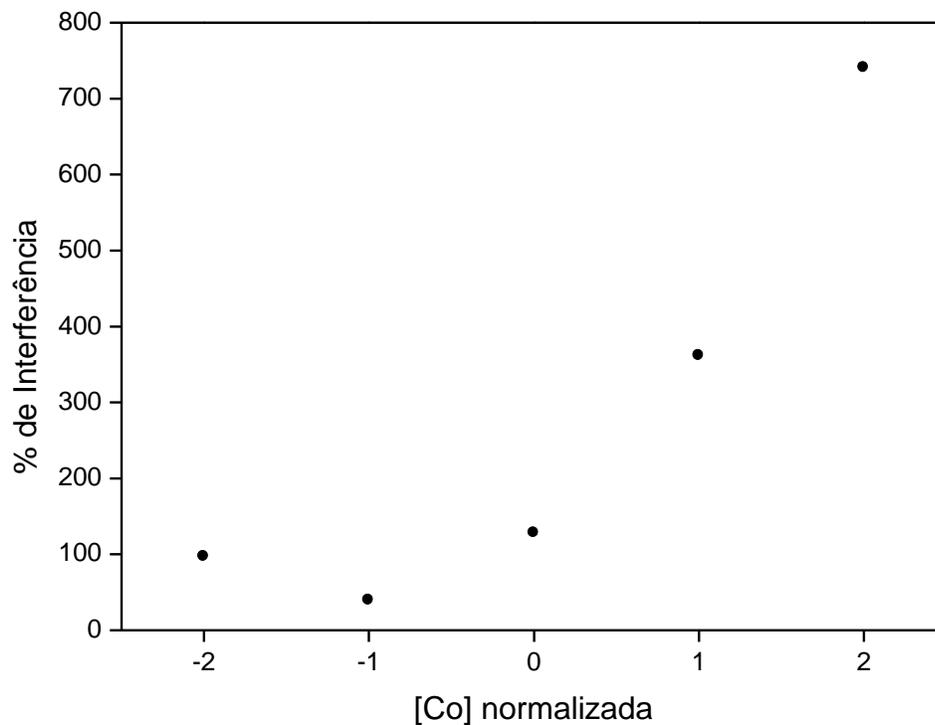


FIGURA 5.5.2.2 - Porcentagem de interferência *versus* concentração normalizada de Co, segundo a Equação 5.5.2.2.

Já no caso do Mn, pode-se observar na Figura 5.5.2.2 que há uma região de trabalho que apresenta um mínimo de interferência. Essa região está localizada onde a relação  $\text{Co}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  é de 0,03.

## 5.6 Determinação de Co e Mn

Após o desenvolvimento e otimização do método proposto, o mesmo foi empregado inicialmente na determinação de Co e Mn em amostras de alimentos e nos medicamentos A e B.

Como preparo de amostras, foi avaliado um processo de extração com ácido diluído para amostras de tecido de ostra, arroz com legumes, *Fegatelli*, complexo multivitamínico e amostras certificadas de tecido de ostra e fígado bovino; além da extração, avaliou-se a digestão em bloco digestor para as amostras certificadas de tecido de ostra e fígado bovino e para a amostra do medicamento B.

No entanto, não se obteve êxito nas análises realizadas. Provavelmente, o insucesso está ligado a alguns problemas que surgiram no processo analítico, como por exemplo, a coloração final das soluções das amostras. A coloração amarelada que as soluções das amostras apresentaram interferiu no resultado obtido, pois estas apresentaram altos valores de absorvância no comprimento de onda utilizado nas análises (426 nm), o que representa uma limitação da técnica utilizada. Outro fator limitante é que essa coloração resultante não pôde ser eliminada através do uso de  $H_2O_2$  visto que este é um reagente utilizado na reação indicadora, e qualquer resíduo desse reagente influenciaria na mesma. Além desse empecilho, os digeridos das amostras não puderam ser muito diluídos devido à faixa de concentração em que os analitos estavam presentes nas mesmas.

Outro fator que pode ter contribuído para o insucesso das análises é a possível presença de interferentes, pois amostras biológicas são extremamente complexas e ricas em Ca e Mg (os dois principais interferentes para Co e Mn).

Diante das limitações citadas partiu-se para a análise de amostras de ligas metálicas, pois nas amostras deste tipo as concentrações de Co e Mn são maiores que nas amostras de alimentos, o que implica uma diluição maior para que as amostras pudessem ser analisadas espectrofotometricamente no sistema FIA desenvolvido e, conseqüentemente, o problema de coloração fosse eliminado. Além disso, as amostras não contém Ca e Mg que são interferentes no método desenvolvido.

Como esperado, após a diluição dos digeridos das ligas metálicas não se observou coloração nas soluções a serem analisadas.

No entanto, durante as análises das amostras de aço foi visível a formação de um produto de coloração vermelha, o que evidencia uma provável interferência do  $\text{Fe}^{2+}$ , pois este íon forma um complexo de mesma coloração com a 2,2-bipiridina. No estudo da avaliação de interferentes o Fe não se apresentou como potencial interferente pois os níveis de concentração estudados foram baseados naqueles presentes nas amostras de alimentos e a amostra de aço é constituída em sua maioria por Fe o que resulta numa concentração extremamente alta e interferente no sistema, tornando inviável a análise de amostras deste tipo.

Já na análise da liga de Ni não se observou formação de produto com coloração diferente do produto de oxidação do Tiron, mas as concentrações encontradas ficaram extremamente acima daquelas obtidos por FS-FAAS. Este resultado pode ser explicado pela interferência positiva do Ni, pois assim como no caso do Fe, os níveis de concentração de Ni estudados na avaliação dos interferentes foi muito inferior àquela presente na amostra da liga de Ni. Na tentativa de eliminar esta interferência, realizou-se a precipitação do Ni com o reagente específico DMG. No entanto, na análise da solução resultante após a precipitação do  $\text{Ni}^{2+}$  não foi possível quantificar os íons Co e Mn, pois estes podem ter ficado adsorvidos no precipitado já que os mesmos encontravam-se em quantidade muito inferior quando comparados ao Ni.

Outra estratégia testada para quantificar Co e Mn na amostra Ni 200 foi o método de compatibilização de matriz, o qual é utilizado apenas quando se conhece a composição total da amostra. Considerando-se que a interferência estaria sendo causada pela alta concentração de Ni devido a este ser o componente majoritário da liga, este íon foi adicionado às soluções da curva analítica na mesma concentração da amostra. No entanto, não se obteve sucesso na quantificação dos analitos de interesse, possivelmente pela presença de alguns outros constituintes da amostra, tais como Cu, Cr e Si que não foram adicionados às soluções da curva analítica.

Devido aos fatos ocorridos com as amostras analisadas até esta etapa, foram avaliadas mais duas amostras (7 e 12, ver detalhes na Tabela 4.4.1) na tentativa de quantificar Co e Mn.

Inicialmente as amostras foram analisadas por FS-FAAS e os limites de detecção (LOD) ( $n = 10$ ) e quantificação (LOQ) ( $n = 10$ ) calculados foram

respectivamente 3,9 e 13,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Co e 110 e 366  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Mn. Os teores médios de Co e Mn nas amostras analisadas encontram-se na Tabela 5.6.1.

TABELA 5.6.1 - Teores médios de Co e Mn e desvios-padrão (n=3) nas amostras de medicamentos B e D obtidos por FS-FAAS.

Amostra	Co	Mn
Medicamento B	358* $\pm$ 7	
Medicamento D	0,37** $\pm$ 0,01	104** $\pm$ 1

\*mg Kg<sup>-1</sup>

\*\*mg L<sup>-1</sup>

A partir dos resultados obtidos por FS-FAAS fez-se a diluição das amostras (conforme descrito no item 4.10.3) para que estas fossem analisadas utilizando-se o método desenvolvido.

Inicialmente construiu-se uma curva utilizando os dois analitos simultaneamente, e os teores médios de Co e Mn encontrados nas amostras de medicamentos B e D não foram concordantes com aqueles encontrados utilizando-se a técnica FS-FAAS.

Então, empregou-se o método da adição de padrão para Co e Mn separadamente na amostra do medicamento D (ver mais detalhes no item 4.10.3). O teor de Co encontrado através deste método (2,78 mg L<sup>-1</sup>) foi muito diferente daquele obtido por FS-AAS (0,37 mg L<sup>-1</sup>), no entanto, o teor de Mn (90,1 mg L<sup>-1</sup>) foi próximo ao valor obtido por FS-AAS (104 mg L<sup>-1</sup>).

Visto que nos estudos de interferentes o Co apresentou-se como interferente do Mn e vice-versa, propôs-se o emprego de curvas analíticas elaboradas com os padrões de Co e Mn individualmente na determinação destes analitos nas amostras dos medicamentos B e D. As curvas foram construídas separadamente (proposta 1: alças L<sub>1</sub> e L<sub>3</sub> sendo preenchidas pela mesma solução-padrão, ou Co ou Mn) e também de modo sequencial (proposta 2: a solução de Co preenchendo a alça de amostragem L<sub>1</sub> e a solução de Mn preenchendo L<sub>3</sub>).

A Figura 5.6.1 ilustra os sinais analíticos obtidos na determinação de Co e Mn nas amostras de medicamentos B e D pela proposta 1 e a Figura 5.6.2 a determinação realizada através da proposta 2 nas mesmas amostras.

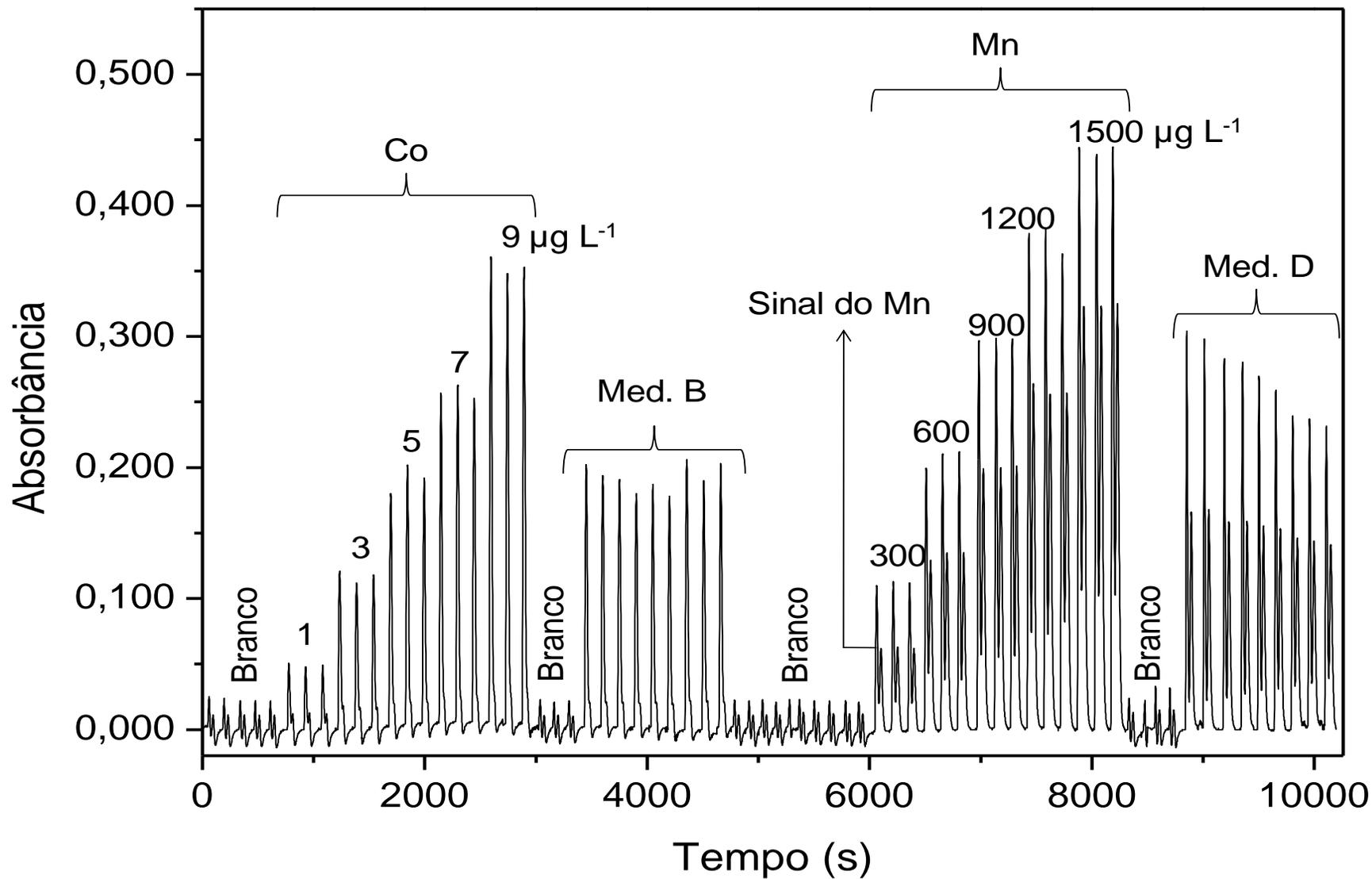


FIGURA 5.6.1 - Fiagrama obtido na análise das amostras de medicamentos B e D, utilizando-se curvas analíticas individuais (proposta 1).

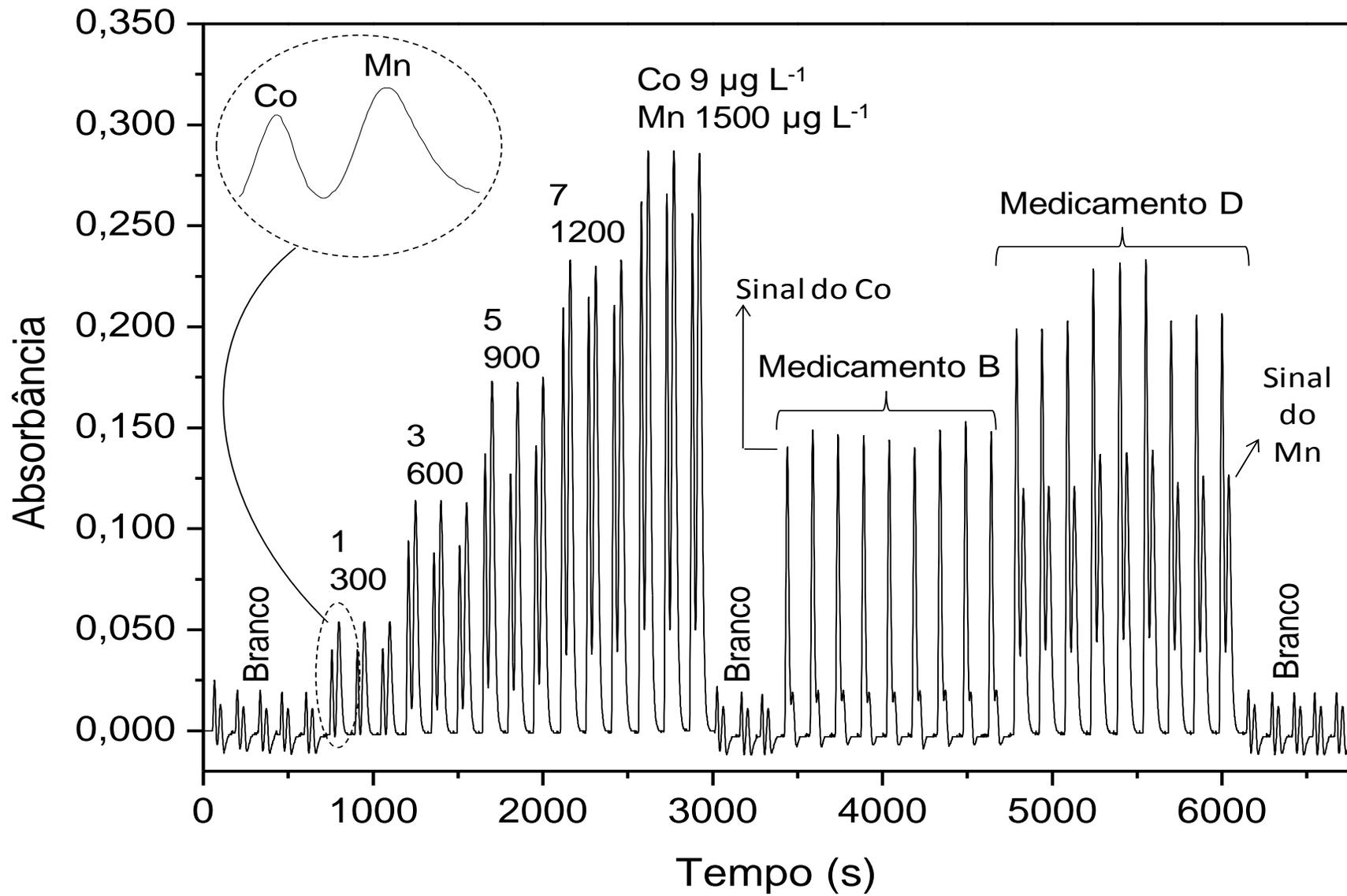


FIGURA 5.6.2 – Fiograma obtido na análise das amostras de medicamentos B e D (proposta 2).

Na Figura 5.6.1, pode-se observar que os brancos analíticos apresentaram pequenos valores de absorvância. Isso se deve, provavelmente, à diferença no índice de refração da solução quando comparada à solução carregadora. Então, para a correta quantificação dos analitos, o valor da absorvância referente ao branco foi subtraído dos valores de absorvância encontrados para os sinais transientes referentes ao Co e ao Mn. Os limites de detecção (LOD) ( $n = 10$ ) e de quantificação (LOQ) ( $n = 10$ ) calculados foram respectivamente 0,083 e 0,28  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Co e 7,18 e 23,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Mn.

A mesma observação da Figura 5.6.1 quanto ao branco analítico pode ser feita para a Figura 5.6.2. Neste caso, os LOD ( $n = 10$ ) e LOQ ( $n = 10$ ) calculados foram respectivamente 0,055 e 0,18  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Co e 9,76 e 32,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Mn.

Os teores médios de Co e Mn obtidos através das propostas 1 e 2 encontram-se na Tabela 5.6.2.

TABELA 5.6.2. Teores médios e desvios-padrão ( $n=3$ ) de Co no medicamento B e de Mn no D obtidos pelo método desenvolvido.

Amostra	[Co] $\pm$ SD		[Mn] $\pm$ SD	
	Proposta 1	Proposta 2	Proposta 1	Proposta 2
Medicamento B	349* $\pm$ 17	336* $\pm$ 11		
Medicamento D			106** $\pm$ 9	105** $\pm$ 9

\* $\text{mg kg}^{-1}$

\*\* $\text{mg L}^{-1}$

O medicamento D contém os dois analitos, mas o teor médio para Co foi discordante do obtido por FS-FAAS provavelmente devido à interferência do Mn e outros possíveis interferentes que estivessem presentes na amostra. Já para Mn, o valor encontrado foi concordante com aquele obtido por FS-FAAS.

No caso do medicamento B, o teor médio obtido foi concordante com aquele obtido por FS-FAAS, pois esta contém apenas Co, ficando livre de possíveis interferências químicas.

Então, fica evidente através da análise da Figura 5.6.1 que o Co não interfere de modo significativo no sinal do Mn, visto que na curva analítica do Co não há o segundo sinal que seria referente à alça de amostragem utilizada na determinação de Mn, isto se deve ao bloqueio da catálise do Co pela 2,2-bipiridina. Mas a mesma afirmação não pode ser feita para o Mn, pois pode ser observado na curva analítica deste analito que mesmo que a solução analítica não contenha Co, é gerado um sinal transiente referente à alça de amostragem onde seria determinado o Co, o que indica a interferência desse analito no sinal do mesmo.

A exatidão do método, portanto, foi avaliada através da comparação dos dois métodos de análise: o método desenvolvido e o método de FS-FAAS. Quando o objetivo é comparar dois métodos, aplica-se o teste-*t* pareado. Se este teste é aplicado para amostras iguais, efetua-se inicialmente o teste F para avaliar se os desvios padrões dos dois métodos são comparáveis e, caso sejam, parte-se para o teste-*t* propriamente dito [58].

Primeiramente foram realizados testes F para a amostra de medicamento D analisada pelas duas propostas. O teste F foi realizado empregando-se a equação 5.6.1. Se o valor de F calculado for menor do que 1, deve-se inverter os fatores para que esse valor seja sempre maior do que 1.

$$F = \frac{\sum (x_{i1} - \bar{x}_1)^2 / gl_1}{\sum (x_{i2} - \bar{x}_2)^2 / gl_2} \quad (\text{equação 5.6.1})$$

gl= graus de liberdade

Proposta 1:  $F_{\text{calculado}} = 103,7$

Proposta 2:  $F_{\text{calculado}} = 96,2$

$F_{\text{tabelado}(2,2,95\%)} = 19$

Como em ambas propostas o valor de  $F_{\text{calculado}}$  é maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ , significa que os métodos empregados (FS-FAAS e proposto) não possuem desvios padrão comparáveis, portanto, não se pode realizar o teste-*t* pareado nestes casos. Embora não possamos expressar estatisticamente que os teores de Mn na amostra 12 não diferem ao nível de confiança 95%, pode-se observar que a faixa de concentração

obtida pelos métodos proposto 1 (97-115 mg L<sup>-1</sup>), proposto 2 (96-114 mg L<sup>-1</sup>) e FS-FAAS (103-105 mg L<sup>-1</sup>) são extremamente próximas e que portanto, os valores são concordantes entre si.

Da mesma maneira que para a amostra do medicamento D, inicialmente foi realizado o teste F para a amostra do medicamento B com o objetivo de avaliar se os desvios padrão obtidos nos dois métodos são comparáveis.

O teste F foi calculado utilizando-se a equação 5.6.1.

Proposta 1:  $F_{\text{calculado}} = 5,93$

Proposta 2:  $F_{\text{calculado}} = 2,37$

$F_{\text{tabelado}(2,2,95\%)} = 19$

Como o valor de  $F_{\text{calculado}}$  é menor que o  $F_{\text{tabelado}}$  para as propostas 1 e 2 então, pode-se dizer que os métodos (proposto 1 e FS-FAAS; proposto 2 e FS-FAAS) possuem desvios padrão comparáveis e os dados podem ser combinados para obter-se um desvio padrão geral (equação 5.6.2).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_{i1} - \bar{x}_1)^2 + \sum (x_{i2} - \bar{x}_2)^2}{N_1 + N_2 - 2}} \quad (\text{equação 5.6.2})$$

N= número de réplicas

O desvio padrão geral calculado foi de 13,2 para a proposta 1 e FS-FAAS; e de 9,17 para a proposta 2 e FS-FAAS. Estes valores foram utilizados na determinação de t segundo a equação 5.6.3.

$$\pm t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{SD} \times \sqrt{\frac{(N_1 \times N_2)}{(N_1 + N_2)}} \quad (\text{equação 5.6.3})$$

Proposta 1:  $t_{\text{calculado}} = 0,86$

Proposta 2:  $t_{\text{calculado}} = 3,00$

$t_{\text{tabelado}(4, 95\%)} = 2,776$

$t_{\text{tabelado}(4, 99\%)} = 4,604$

Para a proposta 1 o valor de  $t_{\text{calculado}}$  foi igual a 0,86 e o valor de  $t_{\text{tabelado}}_{(4,95\%)}$  é de 2,776. Como o valor de  $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ , pode-se afirmar que os teores de Co obtidos pelo método proposto 1 e por FS-FAAS não diferem estatisticamente ao nível de confiança 95%. Já para a proposta 2, o valor de  $t_{\text{calculado}}$  foi igual a 3,00 e o valor de  $t_{\text{tabelado}}_{(4,99\%)}$  é de 4,604. Como o valor de  $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ , pode-se afirmar que os teores de Co obtidos pelo método proposto 2 e por FS-FAAS não diferem estatisticamente ao nível de confiança 99%.

# Capítulo 6

---

## CONCLUSÕES

## 6 Conclusões

A partir da cinética diferencial dos analitos na reação indicadora foi possível o desenvolvimento de um sistema FIA com detecção espectrofotométrica para determinação sequencial de Co e Mn. Neste sistema, a determinação sequencial foi realizada em comprimento de onda fixo, pois os produtos resultantes da catálise tem absorvância máxima na mesma região de comprimento de onda.

As concentrações ótimas dos reagentes encontradas após a execução dos planejamentos experimentais foram: Tiron =  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> =  $25 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e NaOH = 1,0 mol L<sup>-1</sup>.

O reator de C<sub>2</sub> de 300 cm aumentou a sensibilidade analítica para ambos analitos quando comparado ao reator de 150 cm.

A utilização de planejamentos fatoriais no estudo de interferentes permitiu uma rápida e ampla avaliação de possíveis interferentes além de possibilitar a avaliação de possíveis interações entre os concomitantes presentes nas soluções de estudo. Os interferentes estatisticamente significativos para o Co foram o Ca e o Mn. Já para Mn, o Co foi o único interferente estatisticamente significativo de acordo com as razões concomitante/analito estudadas. No entanto, apesar de estatisticamente não serem significativos, Ca e Mg também são interferentes; apresentando altos valores de interferência negativa.

O método desenvolvido não pode ser aplicado a amostras de alimentos e ligas metálicas devido a problemas de interferência; sendo que estes não puderam ser eliminados com a utilização do método de adições de padrão a algumas dessas amostras.

A exatidão do método foi avaliada por comparação com a técnica de FS-FAAS.

Para o método desenvolvido, os LOD e LOQ calculados foram, respectivamente 0,055 e 0,18 µg L<sup>-1</sup> para Co, 9,76 e 32,5 µg L<sup>-1</sup> para Mn; e a frequência de amostragem foi de 25 amostras h<sup>-1</sup>.

Dentro das limitações do método e problemas surgidos, o método mostrou-se com boa repetibilidade, rápido e com baixo custo para determinações de Co e Mn em amostras farmacêuticas.

# Capítulo 7

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 7 Referências Bibliográficas

1. FIFIELD, F. W. & KEALEY, D. *Principles and Practice of Analytical Chemistry*. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2000.
2. CHRISTIAN, G. D. "Flow analysis and its role and importance in the analytical sciences". *Anal. Chim. Acta*, **499** (1), 5, 2003.
3. TZANAVARAS, P. D. & THEMELIS, D. "Review of recent applications of flow injection spectrophotometry to pharmaceutical analysis". *Anal. Chim. Acta*, **588** (1), 1, 2007.
4. EBDON, L.; EVANS, E. H.; FISHER, A. & HILL, S. J. "An introduction to analytical atomic spectrometry". Chichester: John Wiley & Sons, 1998.
5. PEREIRA-FILHO, E. R.; ARRUDA, M. A. Z.; ZAGATTO, E. A. G.; MANIASSO, N. "Exploiting a micellar medium in flow injection analysis: spectrophotometric determination of copper in fungicides and fertilizers". *J. Flow Injection Anal.*, **18** (2), 150, 2001.
6. SOMBRA, L.; LUCONI, M.; SILVA, M. F.; OLSINA, R. A.; FERNANDEZ, L. "Spectrophotometric determination of trace aluminium content in parenteral solutions by combined cloud point preconcentration–flow injection analysis". *Analyst*, **126** (7), 1172, 2001.
7. VIEIRA, J. A.; RAIMUNDO Jr, I. M.; ROHWEDDER, J. J. R.; REIS, B. F. "A versatile set up for implementing different flow analysis approaches: Spectrophotometric determination of nickel in steel alloys". *Microchem. J.*, **82** (1), 56, 2006.
8. FERES, M. A. & REIS, B. F. "A downsized flow set up based on multicommutation for the sequential photometric determination of iron (II)/iron (III) and nitrite/nitrate in surface water". *Talanta*, **68** (2), 422, 2005.
9. RUZICKA, J. & HANSEN, E. H. "Flow Injection Analysis". 1<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons, 1979.
10. FONTENELE, R. S.; HIDALGO, P.; GUTZ, I. G. R. & PEDROTTI, J. J. "Flow injection analysis of ethyl xanthate by in-line dialysis and UV spectrophotometric detection". *Talanta*, **72** (3), 1017, 2007.

11. WILLEM, E. & van der LINDEN. Classification and definition of analytical methods based on flowing media". *Pure & Appl. Chem.*, **66** (12), 2493, 1994.
12. MALAHOFF, A.; KOLOTYRKINA, I. Y. & SHPIGUN, L. K. "Shipboard determination of dissolved cobalt in sea-water using flow injection with catalytic spectrophotometric detection". *Analyst*, **121** (8), 1037, 1996.
13. KIKA, F. S. & THEMELIS, D. G. "Selective stopped-flow sequential injection method for the spectrophotometric determination of titanium in dental implant and natural Moroccan phosphate rock". *Talanta*, **71** (3), 1405, 2007.
14. OTTO, M.; RENTSCH, J. & WERNER, G. "Optimized spectrophotometric determination of trace cobalt and manganese by their catalysis of the Tiron-Hydrogen peroxide reaction". *Anal. Chim. Acta*, **147**, 267, 1983.
15. WANG, J. & HE, R. "Stopped-flow injection kinetic determination of multicomponent samples: Simultaneous determination of mercury (II) and silver (I)". *Anal. Chim. Acta*, **294** (2), 195, 1994.
16. SAURINA, J. & HERNÁNDEZ-CASSOU, S. "Flow-injection and stopped-flow completely continuous flow spectrophotometric determinations of aniline and cyclohexylamine". *Anal. Chim. Acta*, **396** (2), 151, 1999.
17. SU, L.; LI, J.; MA, H. & TAO, G. "Determination of trace amounts of manganese in natural waters by flow injection stopped-flow catalytic kinetic spectrophotometry". *Anal. Chim. Acta*, **522** (2), 281, 2004.
18. ROCHA, F. R. P. & TEIXEIRA, L. S. G. "Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-vis". *Quim. Nova*, **27** (5), 807, 2004.
19. HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. 7a ed. Rio de Janeiro, LTC, 2008, cap. 20., p 97.
20. SALDANHA, T. C. B.; ARAÚJO, M. C. U. & NETO, B. B. "Análise multicomponente simultânea por espectrofotometria de absorção molecular UV-vis". *Quim. Nova*, **22** (6), 847, 1999.
21. AZUBEL, M.; FERNÁNDEZ, F. M.; TUDINO, M. B.; TROCCOLI, O. E.; "Novel Application and comparison of multivariate calibration for the simultaneous determination of Cu, Zn and Mn at trace levels using flow injection diode array spectrophotometry". *Anal. Chim. Acta*, 1999, **398** (1), 93–102.

22. OGUMA, K.; YOSHIOKA, O.; "Flow-injection simultaneous determination of iron(III) and copper(II) and of iron(III) and palladium(II) based on photochemical reactions of thiocyanato-complexes". *Talanta*, 2002, **58** (6), 1077-1087
23. FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S. & VOLPE, P. L. O. "Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial" *Quim. Nova*, **22** (5), 724, 1999.
24. GAO, L. & REN, S. "Simultaneous spectrophotometric determination of manganese, zinc and cobalt by kernel partial least-squares method". *J. Autom. Chem.*, **20** (6), 179, 1998.
25. BETTERIDGE, D. & FIELDS, B. "The application of pH gradients in flow-injection analysis: A method for simultaneous determination of binary mixtures of metal ions in solution". *Anal. Chim. Acta*, **132**, 139, 1981.
26. LIU, R.; LIU, D.; SUN, A. & LIU, G. "Simultaneous determination of copper and zinc in the hair of children by pH gradient construction in a flow-injection system". *Analyst*, **120** (2), 569, 1995.
27. ZHAO, S.; XIA, X.; YU, G. & YANG, B. "Simultaneous determination of iron and zinc by pH gradient construction in a flow-injection system". *Talanta*, **46** (5), 845, 1998.
28. GERVASIO, A. P. G.; FORTES, P. R.; MENESES, S. R. P.; MIRANDA, C. E. S. & ZAGATTO, E. A. G. "An improved flow-injection system for spectrophotometric determination of molybdenum and tungsten in tool steels". *Talanta*, **69** (4), 927, 2006.
29. ISSHIKI, K. & NAKAYAMA, E. "Determination of ultratrace amounts of cobalt by catalysis of the Tiron-Hydrogen peroxide reaction with an improved continuous-flow analysis system". *Talanta*, **34** (2), 277, 1987.
30. WANG, J. & HE, R. "Studies on the synergistic effects of metal cations on kinetic reactions and their analytical applications". *Microchem. J.*, **53** (3), 376, 1996.
31. FUJIMOTO, T.; TESHIMA, N.; KURIHARA, M.; NAKANO, S. & KAWASHIMA, T. "Catalytic determination of cobalt at sub-nanogram levels using the oxidative coupling of 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone with *N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline by manual and flow-injection methods". *Talanta*,

- 49** (5), 1091, 1999.
32. GUYARD, M. A. "The la formation du noir d'aniline, an moyen des seis de vanadium, et de la théorie de la formation Du noir d'aniline". *Bull. Soc. Chim. Paris*, **25**, 58, 1876.
  33. MÜLLER, H. "Catalytic methods of analysis: characterization, classification and methodology". *Pure & Appl. Chem.*, **67** (4), 601, 1995.
  34. ENSAFI, A. A. & KAZEMZADEH, A. "Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow injection with spectrophotometric detection". *Anal. Chim. Acta*, **382** (1), 15, 1999.
  35. ZHI-QI, Z.; LOU-JUN, G.; HAN-YING, Z. & QIAN-GUANG, L. "Catalytic simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate with a flow injection system". *Anal. Chim. Acta*, **370** (1), 59, 1998.
  36. URAISIN, K.; TAKAYANAGI, T.; OSHIMA, M.; NACAPRICHA, D. & MOTOMIZU, S. "Kinetic-spectrophotometric method for the determination of trace amounts of bromide in seawater". *Talanta*, **68** (3), 951, 2006.
  37. YAMANE, T. & ISHIMIZU, C. "Simultaneous differential kinetic determination of cobalt and nickel based on on-Line complex formation and ligand substitution reaction using a stopped-flow FIA system". *Microchim. Acta*, **103** (3), 121, 1991.
  38. WANG, J. & HE, R. "Stopped-flow injection kinetic determination of multicomponent samples: simultaneous determination of mercury (II) and silver (I)". *Anal. Chim. Acta*, **294** (2), 195, 1994.
  39. YE, Y.; MAO, H. & CHEN, Y. "Catalytic kinetic simultaneous determination of iron, silver and manganese with the Kalman filter by using flow injection analysis stopped-flow spectrophotometry". *Talanta*, **45** (6), 1123, 1998.
  40. TAVALLALI, H. & MASSOUMI, A. "Simultaneous kinetic spectrophotometric determination of vanadium(V) and iron(III)". *Talanta*, **47** (2), 479, 1998.
  41. TESHIMA, N.; GOTOH, S.; IDA, K. & SAKAI, T. "One-shot flow injection spectrophotometric simultaneous determination of copper, iron and zinc in patients' sera with newly developed multi-compartment flow cell". *Anal. Chim. Acta*, **557** (1), 387, 2006.
  42. SHPIGUN, L. K.; SHUSHENACHEV, Y. V. & KAMILOVA, P. M. "Simultaneous

- Spectrophotometric Determination of Copper(II) and Zinc(II) Based on Their Kinetic Separation in Flow-Injection Systems". *J. Anal. Chem.*, **62** (7), 623, 2007.
43. NI, Y.; HUANG, C. & KOKOT, S. "Simultaneous determination of iron and aluminium by differential kinetic spectrophotometric method and chemometrics". *Anal. Chim. Acta*, **599** (2), 209, 2007.
  44. ANGELOVA, M. G. & ALEXIEV, A. A. "Kinetic spectrophotometric method for the determination of urinary cobalt based on its catalytic effect on the oxidation of L-adrenaline hydrochloride by hydrogen peroxide". *Anal. Chim. Acta*, **290** (3), 363, 1994.
  45. BOGNÁR, J. "Die katalytischen Reaktionen bei der Spurenanalyse und die Untersuchung ihrer Mechanismen. I". *Mikrochim. Acta*, **49** (6) 903, 1961.
  46. OTTO, M. & WERNER, G. "Mechanistic studies for modelling the metal ion-catalyzed tiron-hydrogen peroxide indicator reaction". *Anal. Chim. Acta*, **147**, 255, 1983.
  47. OTTO, M.; STACH, J.; KIRMSE, R. & WERNER, G. "The tiron radical as indicator substance in catalytic determination of trace metals". *Talanta*, **28**, 345, 1980.
  48. ARRUDA, M. A. Z.; ZAGATTO, E. A. G., JACINTHO, A. O. & BRIENZA, S. M. B. "Catalytic determination of cobalt in liver by flow-injection spectrophotometry". *J. Braz. Chem. Soc*, **2**, 47, 1991.
  49. NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B.; BATISTA, L. A. R.; ARRUDA, M. A. Z. & MIYAZAWA, M. "Catalytic determination of cobalt by flow injection spectrophotometry: application in animal faeces analysis using hydrochloric acid as extracting solution". *Anim. Feed Sci. and Technol.*, **74** (1), 79, 1998.
  50. PEREIRA-FILHO, E. R. & ARRUDA, M. A. Z. "Mechanised flow system for on-line microwave digestion of food samples with off-line catalytic spectrophotometric determination of cobalt at ng L<sup>-1</sup> levels". *Analyst*, **124** (12), 1873, 1999.
  51. PEREIRA-FILHO, E. R.; ARRUDA, M. A. Z.; PETRUS, R. R. & FARIA, J. A. F. "Automated monosegmented system for hydrogen peroxide determination at low levels". *J. Flow Injection Anal.*, **19** (2), 125, 2002.
  52. DONATI, G. L.; NASCENTES, C. C.; NOGUEIRA, A.R.A.; ARRUDA, M.A.Z. & NÓBREGA, J. A. "Acid extraction and cloud point preconcentration as sample

- preparation strategies for cobalt determination in biological materials by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Microchem. J.*, **82** (2), 189, 2006.
53. KATZUNG, B. G., "A large medical books: basic clinical pharmacology", Stamford: Appleton Lange, 1998.
54. <http://www.medicinacomplementar.com.br/bibliotecadenutrientes.asp#manganes> (acessado em 10/10/2007)
55. UNDERWOOD, E. J., "Trace elements in human and animal nutrition", New York: Academic Press, 1977.
56. CONRAD, J. H.; MCDOWELL, L. R.; ELLIS, G. L.; LOOSLI, J. K., "Minerais para ruminantes em pastejo em regiões tropicais", Campo Grande: Boletim Embrapa, 1985.
57. WEBB, E. C.; RYSSEN, J. B. J. V.; ERASMUSA, M. E. A.; MCCRINDLE, C. M. E.; "Copper, manganese, cobalt and selenium concentrations in liver samples from African buffalo (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park". *J. Environ. Monit.*, 2001, **3** (6), 583–585
58. CHRISTIAN, G. D. *Analytical Chemistry*. 5<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 1994. 38 p.