BIBLIOTECA

INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

L. 19.745

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

EM CONDIÇÕES ESTACIONÁRIA E EM FLUXO PARA

DETERMINAÇÃO DE ZINCO EM AMOSTRAS

BIOLÓGICAS E FARMACÊUTICAS

Ivanise Gaubeur

Tese de Doutorado

Profa. Dra. Maria Encarnación Vázquez Suárez Iha

Orientadora

São Paulo

2001

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004048

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Gaubeur, Ivanise
G264de Desenvolvimento de métodos espectrofotométricos em
condições estacionária e em fluxo para determinação de zinco em
amostras biológicas e farmacêuticas / Ivanise Gaubeur. -- São
Paulo, 2001.
201p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Iha, Maria Encarnación Vázquez Suárez

1. Espectrofotometria 2. Formulações farmacêuticas I. T. II.
Iha, Maria Encarnación Vázquez Suárez, orientador.

543.0852 CDD

**“Desenvolvimento de Métodos
Espectrofotométricos em Condições
Estacionária e em Fluxo para Determinação
de Zinco em Amostras Biológicas e
Farmacêuticas”**

IVANISE GAUBEUR

*Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Química Analítica.*

Aprovado por:

Profa. Dra. MARIA ENCARNACIÓN VÁZQUEZ SUÁREZ IHA
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. NINA COICHEV
IQ - USP

Prof. Dr. JORGE CESAR MASINI
IQ - USP

Profa. Dra. LÚCIA HELENA SILVEIRA ÁVILA TERRA
EFOA

Profa. Dra. MADALENA CARNEIRO DA CUNHA AREIAS
UFPe

SÃO PAULO
29 DE JUNHO 2001.

À minha querida mãe Erina

Ser mãe, palavra única, é fácil basta deixar acontecer. Ser mãe, várias palavras, aquela que apoia, critica, incentiva... deve ser difícil pois às vezes é sinônimo de privações. Mãe, várias palavras, aMável, Atenciosa e inEstimável. Dedico este trabalho e muitas outras realizações a você.

Aos meus queridos Irmãos e Sobrinhos

Meus companheiros constantes que sempre estiveram presentes em minha vida dando apoio, carinho e amizade. Compartilho este trabalho com vocês.

À Profa. Dra. Maria Encarnación Vázquez Suárez Iha

pelo incessante estímulo rumo aos novos caminhos na vida, pelo inestimável apoio, transmissão de conhecimento e empenho desde o início da minha vida científica. Por mostrar acima de tudo como conquistar os espaços com dignidade e respeito ao próximo.

À Profa. Dra. Márcia Guekezian

pelas inúmeras oportunidades,
por ensinar a Química Analítica
de uma forma tão interessante
a ponto de iniciar minha vida
científica nessa área.

Grande amiga que contribuiu de
forma inestimável para a
elaboração deste trabalho.

Às minhas grandes amigas do LABEQ

“Enfim, depois de tanto erro passado.

Tantas retaliações, tanto perigo.

Eis que ressurge noutro o velho amigo.

Nunca perdido, sempre reencontrado.”

(Vinícius de Moraes)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maura Vincenza Rossi pela oportunidade de iniciar na pesquisa científica.

Ao Prof. Dr Koshun Iha pelas valiosas sugestões, ensinamentos, incentivo e comentários sempre relevantes.

Ao Prof. Dr. Jorge Massini pela colaboração e sugestões para adaptar o sistema em fluxo com resina de troca iônica.

A Gilberto S. Henriques por conceder as amostras biológicas, discussões sobre o zinco e acima de tudo por mostrar que ainda existem pessoas solidárias.

Ao Laboratório de Nutrição Mineral da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP por fornecer o espaço para abertura das amostras biológicas e utilização do equipamento de absorção atômica.

À Profa. Dra. Leila Figueiredo de Miranda pelas oportunidades e por confiar na minha capacidade profissional. Além de tudo uma grande amiga.

Às colegas do LABEQ: Giseli, Patricia e Roberta, pelo alegre convívio.

Ao Prof. Dr. Milton Rocha por toda ajuda nos computadores.

À todos Professores, Pós-Graduandos e Funcionários do Instituto de Química da USP que de alguma forma ajudaram neste trabalho.

Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

GLOSSÁRIO	i
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
I – INTRODUÇÃO	1
II – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DO ZINCO E MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINAÇÃO	
II.1 – Aspectos Gerais	5
II.2 – Propriedades Químicas	7
II.3 – Funções Biológicas	10
II.4 – Absorção e Eliminação	14
II.5 – Dose Recomendada e Sintomas de Deficiência no Corpo Humano	17
II.6 – Toxicidade	19
II.7 – Compostos de Zinco	21
II.8 – Métodos para Determinação de Zinco	22
II.8.1 – <i>Desenvolvimento de Métodos Utilizando a Espectrofotometria no UV-Vis e Fluorimetria</i>	25
II.8.2 – <i>Desenvolvimento de Métodos Utilizando a Análise por Injeção em Fluxo (FIA)</i>	28

<i>II.8.2.1 – Desenvolvimento de Métodos FIA Utilizando Pré-Concentração da Amostra</i>	32
III – DI-2-PIRIDIL CETONA SALICILOILHIDRAZONA (DPKSH)	
III.1 – Aspectos Gerais das Hidrazonas	34
III.2 – Aplicações Analíticas das Hidrazonas	35
III.3 – Outras Aplicações das Hidrazonas	39
III.4 – Di-2-Piridil Cetona Saliciloilhidrazona	40
IV – PARTE EXPERIMENTAL	
IV.1 – Aparelhagem e Acessórios	46
IV.2 – Reagentes e Soluções	47
IV.3 – Obtenção do DPKSH	48
IV.4 – Síntese do Complexo Zn(II)/DPKSH	49
IV.5 – Abertura das Preparações Farmacêuticas	50
IV.6 – Abertura das Amostras Biológicas	52
V – RESULTADOS E DISCUSSÕES	
V.1 – Caracterização do DPKSH e Complexo Zn(II)/DPKSH	56
<i>V.1.1 – Espectrofotometria no UV-Visível</i>	56
<i>V.1.2 – Espectrofotometria no Infravermelho (IV)</i>	58
<i>V.1.3 – Espectrometria de Massas</i>	62

<i>V.1.3.1 – Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray</i>	65
<i>V.1.4 – Análise Térmica</i>	69
<i>V.1.5 – Análise Elementar</i>	74
<i>V.1.6 – Estequiometria do Complexo Zn(II)/DPKSH</i>	76
<i>V.1.6.1 – Método das Variações Contínuas</i>	76
<i>V.1.6.1.1 – Determinação de $\bar{n}$ para o sistema Zn(II)/DPKSH</i>	78
<i>V.1.6.2 – Método das Soluções Correspondentes</i>	80
<i>V.1.7 – Diagrama de Distribuição das Espécies Presentes no Sistema Zn(II)/DPKSH</i>	86
<i>V.1.8- Estudo da Solubilidade do DPKSH em Etanol</i>	87
V.2 – Desenvolvimento do Método Espectrofotométrico em Condição Estacionária para Determinação de Zn(II) Utilizando o DPKSH	90
<i>V.2.1 – Característica Espectral do Complexo Zn(II)/DPKSH em diferentes porcentagens de etanol</i>	90
<i>V.2.2 – Característica Espectral da di-2-piridil cetona saliciloilhidrazona (DPKSH) em função da acidez do meio</i>	92
<i>V.2.3 – Característica Espectral do Complexo Zn(II)/DPKSH em diferentes em função da acidez do meio</i>	95

<i>V.2.4 – Influência da Concentração do Ligante (DPKSH) na Formação do Complexo</i>	97
<i>V.2.5 – Influência da Ordem de Adição dos Reagentes</i>	99
<i>V.2.6 – Construção da Curva Analítica</i>	103
<i>V.2.7 – Influência de Diversos Íons sobre as Medidas Espectrofotométricas do Complexo Zn(II)/DPKSH</i>	106
<i>V.2.7.1 – Eliminação da Interferência dos Íons Fe (III) e Cu(II)</i>	110
<i>V.2.8 – Preparo das Soluções Amostra</i>	114
<i>V.2.9 – Aplicação do Método Estacionário Desenvolvido em Preparações Farmacêuticas</i>	115
<i>V.2.9.1 – Determinação de Zinco nas Preparações Farmacêuticas Utilizando a Técnica de Espectrometria de Absorção Atômica(EAA)</i>	120
<i>V.2.10 – Determinação da Concentração de Zn(II) em Amostras Biológicas Utilizando o Método Espectrofotométrico em Condição Estacionária</i>	123
<i>V.2.10.1 – Determinação de Zinco, Cobre, Ferro e Cálcio nas Amostras Biológicas, Utilizando a Técnica de Espectrometria de Absorção Atômica (EAA) e Fotometria de Chama (FC)</i>	129

V.3 – Desenvolvimento do Método Espectrofotométrico em Condição de Fluxo para Determinação de Zn(II) Utilizando o DPKSH	132
<i>V.3.1 – Velocidade de Rotação da bomba (fluxo) e Diâmetro Interno (d.i) dos Tubos da Solução Transportadora e Percurso Analítico</i>	136
<i>V.3.2 – Influência do Volume de Amostra Injetado</i>	138
<i>V.3.3 – Influência do Comprimento da Bobina de Mistura</i>	140
<i>V.3.4 – Influência do Comprimento da Bobina de Reação</i>	142
<i>V.3.5 – Coeficiente de Dispersão para o Sistema em Fluxo</i>	142
<i>V.3.6 – Influência da Concentração do Reagente (DPKSH)</i>	145
<i>V.3.7 – Construção da Curva Analítica do Sistema em Fluxo desenvolvido</i>	146
<i>V.3.8 – Tempo Médio de Residência da Amostra e Frequência de Amostragem</i>	149
<i>V.3.9 – Aplicação do Método em Fluxo Desenvolvido em Preparações Farmacêuticas</i>	150
V.4 – Desenvolvimento do Método Espectrofotométrico em Condição de Fluxo Utilizando Resina de Troca Iônica	157
<i>V.4.1 – Tempo de Lavagem da Resina de Troca Aniônica</i>	160
<i>V.4.2 – Influência da Concentração da Solução Eluente (E)</i>	163

<i>V.4.3 – Influência do Tempo de Injeção da Amostra</i>	164
<i>V.4.4 – Construção da Curva Analítica do Sistema em Fluxo Desenvolvido</i>	166
<i>V.4.5 – Avaliação da Interferência dos Íons Ca(II)</i>	168
<i>V.4.6 – Aplicação do Método Desenvolvido em Condição de Fluxo com Resina de Troca Aniônica em Amostras Biológicas</i>	171
VI – CONCLUSÕES	176
VII – PERSPECTIVAS FUTURAS	183
VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	184
<i>CURRICULUM VITAE</i>	195

Glossário

ICP	Plasma Indutivamente Acoplado
DPKSH	di-2-piridil cetona saliciloilhidrazona
E.A.A.	Espectrofotometria de absorção atômica
tg	Trato gastrointestinal
RDA	Dose diária recomendada
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
AOAC	“Association Official of Analytical Chemists”
DPST	1-[di-(2-piridil)metileno] -5-salicilidenotiocarbonohidrazida
p-NIAZOXs	Ácido 7-(4-nitrofenilazo)-8-hidroxiquinolina-sulfônico
PPST	1-(fenil-2-piridil) carbilideno-5-salicilidenotiocarbohidrazona
SACH	Salicilaldeído carbohidrazona
FIA	Análise por injeção em fluxo
DCMQ	5,7-dicloro-2-metil quinolin-8-ol
PAPHY	Piridina-2-aldeído 2-piridilhidrazona
BPPH	2,2'-bipiridil 2-piridildidrazona
DPKBH	Di-2-piridil cetona benzoilhidrazona
RNH ⁺	Forma protonada do DPKSH

RN	Forma neutra do DPKSH
RO ⁻	Forma aniônica do DPKSH
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
RC	Ração não suplementada
RCS	Ração suplementada
S	Suplementada
NS	Não suplementada
m/z	Massa carga
+HV	“high voltage”
DSC	Calorimetria diferencial exploratória
TG	Análise termogravimétrica
DTG	Análise termogravimétrica diferencial
TCD	Detector de condutividade térmica
C _L	Concentração do ligante
C _M	Concentração do metal
$\bar{n}$	Número médio de ligantes
X	Fração molar
X _L	Fração molar do ligante
X _M	Fração molar do metal
C _{Total}	Concentração total
C _{DPKSH}	Concentração do DPKSH

$C_{Zn(II)}$	Concentração de zinco (II)
X_{DPKSH}	Fração molar do DPKSH
[L]	Concentração do ligante livre
$\bar{\epsilon}$	Absortividade molar média
K_n	Constantes de estabilidade individuais sucessivas
β_n	Constantes de estabilidade globais
ϵ_n	Absortividades molares
A^{376}	Absorbância em 376 nm
Gluc.	Gluconato
Ác. Asc.	Ácido ascórbico
Prop.	Propionato
Ac^-	Acetato
$D_s^{máx.}$	Dispersão no ponto máximo
A_s^o	Absorbância da amostra pura
$A_s^{máx.}$	Absorbância da amostra no ponto máximo
F.A.	Frequência de amostragem
F.E.	Fator de enriquecimento

RESUMO

Métodos espectrofotométricos em condições estacionária e em fluxo para determinação de Zn(II) foram desenvolvidos com base na formação do complexo de Zn(II) com di-2-piridil cetona saliciloilhidrazona (DPKSH), em meio de etanol-água 50% (V/V) e *pH* 4,5.

Os complexos de Zn(II) com DPKSH foram caracterizados utilizando diferentes técnicas e as respectivas constantes de formação (β_1 $1,07 \times 10^5$ e β_2 $1,05 \times 10^{10}$) e absorptividades molares, em 376 nm, (ϵ_1 $1,1 \times 10^4$ e ϵ_2 $4,5 \times 10^4$) determinadas.

Os parâmetros para o método em condição estacionária foram otimizados e, a seguir, construiu-se a respectiva curva analítica. Obteve-se uma faixa de linearidade (lei de Beer) de $(0,0293$ a $2,01) \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, absorptividade molar média (em 376 nm, em meio de etanol-água 50% (V/V) e *pH* 4,5) de $4,83 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ e limite de detecção igual a $1,24 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ ($8,11 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Avaliou-se a interferência de 43 íons. Alguns destes que apresentaram interferência positiva são comuns em preparações farmacêuticas e amostras biológicas, porém tal interferência pode ser facilmente eliminada.

Aplicou-se o método desenvolvido à preparações farmacêuticas e amostras biológicas. Comparando-se os resultados com a técnica de absorção atômica com chama, obteve-se grande concordância.

O método espectrofotométrico em fluxo foi desenvolvido a partir de alguns parâmetros previamente estudados e estabelecidos. Construiu-se a curva analítica e obteve-se uma faixa de linearidade de $(0,332 \text{ a } 7,04) \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e limite de detecção $7,46 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ ($48,8 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$). Aplicou-se o método em preparações farmacêuticas e comparando-se os resultados com a técnica de absorção atômica com chama observou-se grande concordância.

Com a finalidade de aplicar o método em fluxo a amostras biológicas, foi acoplada ao sistema uma coluna com resina de troca iônica no lugar da alça de amostragem. Após avaliar alguns parâmetros, construiu-se a curva analítica que apresentou uma faixa de linearidade de $(0,126 \text{ a } 3,15) \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e limite de detecção $2,12 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ ($13,9 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$).

ABSTRACT

Spectrophotometric methods in stationary and flow conditions were developed for Zn(II) determination based on the complex formation of Zn(II) with di-2-pyridyl ketone salicyloylhydrazona (DPKSH), in ethanol-water 50% (V/V) medium and *pH* 4.5.

The complexes Zn(II)/DPKSH were characterized by several methods and the respective formation constants (β_1 1.07×10^5 and β_2 1.05×10^{10}) and molar absorptivities, in 376 nm, (ϵ_1 1.1×10^4 and ϵ_2 4.5×10^4) were determined.

Parameters for the stationary method were optimized and, the analytical curve was obtained. A linear behavior (Beer's law) was verified in the range $(0.0293 \text{ and } 2.01) \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, the medium molar absorptivity (in 376 nm, ethanol-water 50% (V/V) medium and *pH* 4.5) and the detection limit are $4.83 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ and $1.24 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ (8.11 ppb), respectively.

The interference of 43 ions was evaluated. Some of them that showed present a positive interference are common in pharmaceutical formulations and biological samples, but such interference could be easily eliminated.

The developed method was applied to pharmaceutical formulations and biological samples. The results complied well with atomic absorption (flame atomization) technique.

A spectrophotometric method in flow was developed upon some previously established parameters. The analytical curve was determined and a linear range was verified between $(0.332 \text{ to } 7.04) \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, and the detection limit $7.46 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ ($48.8 \mu\text{g.L}^{-1}$). This method was applied to pharmaceutical formulations and the results showed a good agreement with atomic absorption (flame atomization) technique.

Aiming at employing the flow method to biological samples an ion-exchange resin column was adapted substituting the sampling handle. After evaluating some parameters the analytical curve was determined and it displayed a linear range of $(0.126 \text{ to } 3.15) \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, and detection limit $2.12 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ ($13.9 \mu\text{g.L}^{-1}$).

I - INTRODUÇÃO

I - Introdução

Zinco é um metal de grande importância em diversos setores relacionados à atividade humana. Por exemplo, como anodo de sacrifício e na proteção de ferro e aço, como componente de ligas. É o vigésimo quinto elemento em abundância, constituindo 0,0005 a 0,02% da crosta terrestre.

Sob outro aspecto, o zinco é de vital importância em processos bioquímicos. Essencial em hormônios, tais como timulina, testosterona, prolactina e somatostatina, e em cerca de 200 metaloenzimas incluindo dihidrogenases (lactato desidrogenase, melonase, álcool e glutamato).

A verificação da presença de zinco em determinadas moléculas e a elucidação de sua ação bioquímica foi possível devido à contribuição de diversas áreas como nutrição, fisiologia, medicina e patologia, permitindo o conhecimento acerca do metabolismo do Zn. Esse desenvolvimento só foi possível devido ao avanço concomitante da precisão e sensibilidade dos métodos analíticos para a análise do metal.

Com relação aos métodos existentes na literatura, observa-se, de maneira geral, um considerável número de etapas devido às reações envolvidas ou ao problema da presença de interferentes. Por outro lado, encontram-se métodos em que estas dificuldades podem ser em

alguns casos ultrapassadas, entretanto encontram-se outras como custo de aquisição e manutenção de instrumentos, tais como absorção atômica ou ICP (Plasma Indutivamente Acoplado). Torna-se interessante, então, dispor de outros métodos que permitam determinações diretas (poucas etapas) ou cujas etapas de eliminação de interferentes sejam adequadas e rápidas, além disso, que se apliquem a técnicas de baixo custo com instrumentos que inclusive pudessem ser levados a campo para a determinação em, por exemplo, águas naturais.

Desta forma resolveu-se, então, desenvolver um método espectrofotométrico em condições estacionária e em fluxo utilizando a di-2-piridil cetona saliciloilhidrazona (DPKSH), para a determinação de zinco em amostras farmacêuticas e biológicas.

Na primeira parte deste trabalho foram feitas algumas considerações sobre o zinco, bem como, uma breve apresentação de alguns dos métodos analíticos usados para a quantificação deste elemento, além disso algumas considerações sobre as hidrazonas e suas aplicações analíticas, e principalmente sobre o DPKSH.

A segunda parte relaciona-se à síntese e caracterização do ligante e do complexo Zn(II)/DPKSH, utilizando diversas técnicas analíticas.

Apresentam-se, também, todas as etapas desenvolvidas para o estabelecimento do método espectrofotométrico em condição

estacionária, ou seja, otimização dos parâmetros analíticos tais como porcentagem de etanol, influência do pH, razão ligante/metál e ordem de adição dos reagentes. Estudou-se o efeito de vários íons interferentes e avaliou-se a estabilidade do complexo. Construiu-se a curva analítica e aplicou-se o método desenvolvido em amostras farmacêuticas e biológicas.

Na última etapa deste trabalho desenvolveu-se o método espectrofotométrico em condição de fluxo utilizando também o DPKSH. Para isso avaliaram-se parâmetros tais como velocidade da rotação da bomba (fluxo), diâmetro interno (d.i.) dos tubos, volume de amostra injetado, comprimento das bobinas de mistura e reação. Com os parâmetros ajustados, construiu-se a curva analítica e avaliou-se a dispersão do sistema, tempo médio de residência e frequência de amostragem. O método desenvolvido foi aplicado a amostras farmacêuticas.

Visando uma melhoria na sensibilidade do método em fluxo, bem como eliminação de íons interferentes, alterou-se o sistema em fluxo anteriormente estabelecido com o acoplamento de uma coluna com resina de troca iônica no lugar da alça de amostragem. Avaliaram-se alguns parâmetros como tempo de injeção da amostra, tempo de lavagem da coluna e concentração do eluente.

Todos os resultados, em ambos os métodos, foram comparados com a técnica de espectrofotometria de absorção atômica com chama (E.A.A.).

O último capítulo apresenta as conclusões finais sobre os métodos propostos.

**II – PRINCIPAIS
CARACTERÍSTICAS DO
ZINCO E MÉTODOS
ANALÍTICOS DE
DETERMINAÇÃO**

II.1 – Aspectos Gerais

Zinco foi reconhecido como elemento químico em 1509; a sua essencialidade em plantas foi demonstrada em 1869 e, embora a presença desse em tecidos de animais tenha sido constatada desde o final do século XIX, a sua função biológica em animais só foi reconhecida em 1934 ^(1,2).

Em 1956, a síndrome da deficiência de zinco no corpo humano foi demonstrada e estudos clínicos atuais indicam que manifestações comuns em dietas deficientes de zinco ocasionam redução do crescimento e aparecimento de lesões na pele ^(1,2).

O efeito cicatrizante dos produtos contendo esse metal são reconhecidos desde o tempo de nossos ancestrais (interação entre o Zn^{2+} e a colagenase) e, nas últimas décadas, o zinco tem sido utilizado intensamente em medicamentos para remediar disfunções de crescimento devido à má nutrição (interação entre Zn^{2+} e hormônios de crescimento) ^(3,4).

O zinco é o vigésimo quinto elemento em abundância, sua concentração natural na crosta terrestre é em torno de 70mg.Kg^{-1} , entretanto em alguns locais, tem-se níveis muito maiores devido a processos geológicos e geoquímicos. As concentrações típicas de zinco em rochas calcárias são 20 mg.g^{-1} , no solo 90 mg.kg^{-1} , na água do

mar 0,005 mg.kg⁻¹, no ar 0,03-16000 mg.kg⁻¹, em vegetais comestíveis 1-160 mg.kg⁻¹ e peixes marinhos 9 - 80 mg.kg⁻¹ ⁽⁵⁾.

Está presente em muitas rochas e minerais, sendo a esfalerita (ZnS) o mineral de zinco mais importante. O zinco metálico é obtido a partir de minérios e produtos de zinco reciclados. Estes últimos representam 30% do suprimento mundial e são provenientes, por exemplo, de componentes eletrônicos, galvanização do aço, resíduos (efluentes) de processos de galvanização, entre outros⁽⁶⁾.

Devido a processos de erosão natural em rochas, solos e sedimentos pelo vento e água, uma pequena, mas significativa fração de zinco é transportada no meio ambiente. Erupções vulcânicas, queimadas de florestas e formação de aerossóis marinhos também contribuem para o transporte natural deste metal. Estes processos constituem o ciclo do zinco no meio ambiente mantendo seus níveis no ar, águas superficiais e solo ⁽⁶⁾.

Assim como nos solos, as águas apresentam quantidades de zinco variáveis e dependentes de muitos fatores como as condições biológicas, fisiológicas e variações sazonais. Em águas de rios está ligado à matéria orgânica e depositado nos sedimentos destes, reduzindo assim sua biodisponibilidade ⁽⁶⁾.

Um dos principais usos do zinco metálico é a proteção do ferro contra a corrosão, outros usos incluem as ligas metálicas de latão e como anodos em pilhas secas, ácidas ou alcalinas ⁽⁷⁾.

Os compostos de zinco mais freqüentemente utilizados são o óxido, o sulfeto e o cloreto ^(8,9). O óxido é usado como reforço em tiras de borracha, pigmento branco para tintas, vitrificante de cerâmicas além de base opaca em cosméticos, pomadas, loções, filtros solares, cremes contra erupções para bebês, tratamento de acne, entre outros. O sulfeto, por sua vez, é usado em lâmpadas fluorescentes, tubos de raios catódicos assim como pigmento branco, enquanto o cloreto é normalmente utilizado em processos de solda, como eletrólito em baterias secas e conservante de madeiras.

II.2 - Propriedades Químicas

Dois aspectos importantes do zinco, encontrados nos sistemas biológicos, merecem consideração especial: o primeiro está relacionado a toxidez, mesmo em doses elevadas dificilmente é tóxico, em grande parte devido aos eficientes mecanismos homeostáticos envolvidos em sua regulação metabólica e o segundo está relacionado a versatilidade de suas características físico-químicas, tais como a associação estável com macromoléculas e a flexibilidade na geometria de sua esfera de coordenação ⁽¹⁰⁾.

Em meios biológicos o zinco é considerado mais importante que outros metais, devido a outros fatores tais como ⁽¹¹⁾:

(a) disponibilidade, forma em que está presente o metal no meio ambiente e na dieta: $\text{Zn} > \text{Ni}, \text{Cd}, \text{Fe} \text{ e } \text{Cu}$ e outros;

(b) forte retenção $> \text{Mn}, \text{Fe (II)} \text{ e } \text{Mg}$;

(c) troca rápida de ligante (labilidade) $> \text{Ni}, \text{Mg}$;

(d) ausência de reações de oxi-redução em contraste com Cu, Fe e Mn ;

(e) flexibilidade na geometria da sua esfera de coordenação; as geometrias preferenciais do zinco em compostos de coordenação simples são: tetraédrica $>$ octaédrica;

(f) ácido de Lewis forte (somente o Cu é um íon divalente mais forte).

Do ponto de vista químico, a função biologicamente mais efetiva é esta, exemplificada pela sua habilidade de catalisar a condensação (reversível) e reações de hidrólise em pH's *fisiológicos*, pela polarização dos substratos incluindo a água ($\text{Zn}^{2+} \leftarrow \delta^- \text{substrato}^{\delta+}$). Entre estas reações incluem-se a polimerização do RNA (condensação) ou clivagem de peptídeos, proteínas ou ésteres (hidrólises) ⁽⁶⁾.

A Tabela I apresenta as características gerais de alguns íons presentes em sistemas biológicos ⁽⁴⁾.

Tabela I - Características gerais de alguns íons metálicos presentes em sistemas biológicos ⁽¹¹⁾.

Características	Na, K	Mg, Ca	Zn, Ni	Fe, Cu, Co, Mo, Mn
Estado de oxidação predominante	+ 1	+ 2	+ 2	Mais que um
Estabilidade dos complexos	Muito baixa	Média ou baixa	Alta	Alta; média para Mn^{2+} e Fe^{2+}
Preferência por Ligantes	Oxigênio	Oxigênio	Enxofre e nitrogênio	Nitrogênio ou enxofre e oxigênio em alguns complexos de Fe e Mn
Mobilidade em meio biológico	Alta	Semi-móvel	Estático	Estático; semi-móvel Mn^{2+} e Fe^{2+}

II.3 - Funções Biológicas

A composição percentual das substâncias químicas no organismo humano, relativa ao peso do indivíduo é: 65 % de água, 15 % de proteínas, 14 % de gorduras, 5 % de sais minerais e 1 % de outros compostos orgânicos.

Com relação aos sais minerais esses podem estar dissociados na forma de íons dispersos no citoplasma ou combinados com outras substâncias como as proteínas, lipídeos, glicídeos e outras. Uma pessoa adulta apresenta aproximadamente 2 Kg de metais no seu corpo, sendo mais da metade cálcio, sódio, magnésio e potássio. Com relação aos metais traço, encontra-se aproximadamente 7 g de ferro e 2,5 g de zinco, sendo portanto o zinco o segundo elemento traço mais abundante no organismo dos mamíferos.

É constituinte de muitas enzimas envolvidas em processos metabólicos, incluindo a insulina-zinco. As principais enzimas são constituídas pela anidrase carbônica, carboxipeptidase, a desidrogenase láctica e as fosfatases alcalinas ^(12,13).

O zinco desempenha basicamente três funções nas enzimas das quais é parte integrante: catalítica, coativa (co-catalítica) e estrutural ⁽¹⁴⁾. A função catalítica pressupõe que o metal participa diretamente da catálise enzimática e está coordenado com três proteínas de um lado da cadeia e uma molécula de água, a remoção do

zinco nesse caso resulta na inativação da enzima ⁽²⁾. Na função co-catalítica tem-se a presença de dois átomos de Zn, sendo que somente um deles é essencial para a atividade da enzima. Os átomos estruturais de zinco são necessários apenas para a manutenção da estabilidade conformacional das proteínas.

O zinco é um co-fator da enzima carboxipeptidase, que remove o grupo carboxila dos peptídeos para produzir aminoácidos. Ele faz parte da desidrogenase láctica, sendo essencial para interconversão do ácido pirúvico em láctico no processo para a oxidação da glicose ⁽¹³⁾.

Integrante das fosfatases alcalinas, encontrando-se também nos ácidos nucleicos, não estando essa função bem identificada.

No pâncreas, o zinco combina-se com a insulina imediatamente sob a forma de zinco-insulina, servindo esse composto para armazenamento da insulina ⁽¹³⁾.

A participação do zinco em muitas enzimas e sua deficiência ainda não são bem conhecidas, porém a contribuição de diversas áreas como a nutrição, fisiologia, medicina e patologia possibilitam o conhecimento acerca do metabolismo do zinco ⁽¹⁰⁾.

A quantidade de zinco no organismo é uma função da biodisponibilidade (definida como a proporção de qualquer nutriente na alimentação que é absorvido e utilizado) e do total de zinco na dieta. Como a maioria dos minerais, o zinco tipicamente absorvido é

maior que o realmente utilizado, e assim, o excesso é rapidamente eliminado ⁽¹⁾.

Na Tabela II estão apresentados alguns exemplos de alimentos com zinco. O conteúdo desse elemento na carne depende do tipo de animal e do tecido que é consumido; em geral carne vermelha tem uma maior concentração quando comparada à carne branca.

A fonte mais rica de zinco são as ostras as quais, dependendo das condições da água, podem conter mais que 1g de zinco/kg, carne de peixe tem uma quantidade menor que a carne de músculo. Leite e derivados são importantes fontes de zinco para as crianças, sendo encontrado principalmente na fração da caseína e em menor quantidade na gordura, por isso, a quantidade de zinco é conseqüentemente maior no queijo e menor em manteiga ⁽¹⁵⁾.

A quantidade de zinco em alimentos vegetais depende da classe, sub-classe e local do plantio e, devido ao alto conteúdo de água nos vegetais e frutas, estes são considerados uma fonte modesta do mineral 1-8 mg/kg ⁽¹⁵⁾.

A absorção do zinco a partir dos alimentos está relacionada à presença ou ausência de substâncias que alteram a solubilidade ou disponibilidade dos compostos de zinco nos sítios de absorção.

Tabela II - Quantidade de zinco em alimentos crus expressa em peso líquido ⁽¹⁵⁾.

Alimento	mg/kg
Carne Bovina	
Magra	43
Gorda	10
Carne de Porco	
Magra	24
Gorda	4
Carne de Frango	
Branca	7
Escura	16
Peixe	
Bacalhau	4
Leite	3,5
Queijo tipo cheddar	40
Manteiga	1,5
Lentilhas	31
Farinha	
Integral	30
Branca	9
Maisena	12
Arroz	13
Batatas	3
Inhame	4
Côco	5

Carne vermelha e frutos do mar são considerados boas fontes devido à ausência de constituintes químicos inibidores de absorção e devido à presença de aminoácidos, cisteína e histidina, que formam complexos estáveis com zinco e aumentam a solubilidade.

Cereais e proteínas de plantas, como a da soja, apresentam uma menor disponibilidade de zinco devido à presença de ácido fítico ⁽¹⁾.

II.4 - Absorção e Eliminação

A absorção do zinco em animais monogástricos é feita pelo intestino, no jejuno e também no duodeno. Na primeira etapa ocorre a transferência desse do lúmen intestinal para o interior do enterócito, ultrapassando a borda em escova, num processo que envolve difusão, transporte paracelular e mediado por carreadores, neste caso a forma predominante parece ser de quelatos de zinco ⁽¹⁰⁾. Existem alguns fatores que influenciam na absorção intestinal, estes estão apresentados na Tabela III.

Dentro da célula da mucosa o zinco é regulado por proteínas que se ligam a metais como as metalotioneínas e as proteínas intestinais ricas em cisteína.

Na membrana basolateral, ocorre a transferência do metal para o plasma, distribuindo-se em duas grandes frações: cerca de 2/3 do zinco

plasmático liga-se fracamente à albumina e a parcela remanescente permanece ligada à α -2-macroglobulina.

Tabela III - Fatores que influenciam na absorção intestinal e transferência do zinco⁽¹⁶⁾.

Dieta

Forma química do alimento na dieta, presença de:

- a) ligantes que dificultam: fosfato, carbonato, tanatos, polifenóis, oxalato
- b) ligantes que facilitam: ácidos carboxílicos, alguns açúcares (particularmente glucose), aminoácidos
- c) metais competidores (ferro e cobre)

Intestino: luminal

Estado redox e pH

Eficiência da hidrólise da dieta

Fermentação bacteriana

Intestino: mucosa

Influências genéticas

Mudanças na estrutura e função da mucosa

Álcool, drogas e fumo

Fatores sistêmicos (necessidades anabólicas):

Crescimento, gravidez e lactação

Influências endócrinas

Hepatite e função renal

Infecção e "stress"

A ligação lábil à albumina facilita a captação do metal pelos tecidos, principalmente o fígado que recebe de 30 a 40% do zinco absorvido, mas rapidamente libera grande parte para a circulação sistêmica, armazenando apenas aproximadamente 5% do zinco corpóreo total ⁽¹⁰⁾. A Tabela IV apresenta a quantidade de zinco presente em alguns tecidos de um indivíduo adulto normal.

Tabela IV - Quantidade relativa de zinco em um indivíduo adulto normal⁽¹⁶⁾.

Tecido	Quantidade (g)	Distribuição (%)
Músculo	1,5	60
Ossos	0,5-0,8	20-30
Pele e cabelo	0,21	8,0
Fígado	0,0-0,15	4-6
Pâncreas e t.g*	0,03	2,0
Rins	0,02	0,8
Baço	0,003	0,1
Sangue	0,02	0,8
Plasma	0,003	< 0,1

* trato gastrointestinal

Os tecidos extrahepáticos retêm uma quantidade significativa de zinco, o músculo (60% do total corpóreo) os ossos (30%). Nas células

desses tecidos zinco é encontrado predominantemente no citosol (60 à 80%), cerca de 10 a 20% na fração nuclear e pequena quantidade nas frações microssomais e mitocondriais⁽¹⁰⁾.

Os estoques de zinco disponíveis são muito pequenos principalmente nas formas que permitem mobilização rápida a fim de prevenir deficiências. Dietas pobres diminuem drasticamente a concentração plasmática do metal no período de 12 horas.

A principal via de eliminação do zinco endógeno é o trato gastrointestinal e a eliminação final ocorre nas fezes. As perdas fecais do metal constituem-se da adição de zinco não absorvido da dieta às perdas por secreção endógena, que incluem a pancreática, a biliar e a gastroduodenal ⁽¹⁾. Outras fontes de perda são representadas pela descamação da pele, perda de pelos ou cabelos, menstruais e via sêmem.

II.5 - Dose Recomendada e Sintomas de Deficiência no Corpo Humano

A necessidade de nutrientes é, geralmente, baseada no critério de: manter o equilíbrio; repor as perdas endógenas; ou, ainda, manter as funções normais. A dose diária recomendada (RDA) de zinco, via oral, está apresentada na Tabela V.

Tabela V - Dose recomendada de zinco (mg/dia) ^(1,13)

	Idade (anos)	Homens	Mulheres
Lactentes	0,0 - 0,5	5	5
	0,5 - 1	5	5
Crianças	1-10	10	10
Adolescentes	11-18	15	12
Adultos	19-50	15	12
	mais de 50	15	12
Gravidez		-	15
Lactação	(1º semestre)	-	19
	(2º semestre)	-	16

As manifestações clínicas da deficiência severa de zinco são retardamento no crescimento; atraso na maturação sexual e impotência; hipogonadismo e hipospermia; alopecia; deficiências imunológicas; distúrbios de comportamento; cegueira noturna; lenta cicatrização; perda de apetite; lesões nos olhos e outros ^(1,15,17,18). Algumas condições que predispõem a deficiência de zinco no homem estão apresentadas a seguir:

- (a) dieta inadequada de zinco: vegetarianismo, dietas sintéticas, preparações comerciais que substituem a carne e população com baixas condições socioeconômicas;
- (b) má digestão e absorção de zinco;
- (c) aumento na perda de zinco: terapias diuréticas ou com agentes quelantes, diálises, perda crônica de sangue e transpiração excessiva⁽¹⁵⁾.

A Tabela VI apresenta a avaliação simplificada de alguns critérios que podem ser utilizados para diagnosticar a deficiência de zinco. Existem inúmeros relatos de baixos teores de zinco no plasma ou soro associados a doenças infecciosas ou outras condições *stressantes*, sendo assim, um melhor diagnóstico para a deficiência desse se faz necessário ⁽²⁾.

II.6 - Toxicidade

Mesmo que raramente existam casos de intoxicação aguda de zinco no corpo humano, esta pode ocorrer devido à alta ingestão. Existem relatos de contaminação a partir do consumo de alimentos e bebidas contaminadas por utensílios galvanizados ou em trabalhadores que são expostos aos vapores de zinco. Os sinais típicos da intoxicação aguda são: diarreia, náusea e vômito ⁽¹⁾.

Tabela VI - Critério para diagnosticar a deficiência de zinco ⁽²⁾.

Critério	Resposta	Vantagens	Desvantagens
Concentração plasmática de Zn	< 0,5 mg/L indicativo da deficiência	Metodologia simples	Sensível pela diminuição de <i>stresses</i>
Concentração de Zn no leucócito	Diminui por deficiência	Pode refletir melhor as concentrações nos tecidos	Metodologia complexa influenciada por sub-tipos de leucócitos
Concentração de Zn no cabelo	Diminui por deficiência	Amostragem simples	Variabilidade nos resultados
Concentração da timulina no plasma	Diminui por deficiência	Específico para zinco	Complexidade no ensaio
Captação de ⁶⁵ Zn pelo eritrócito	Aumenta por deficiência	Metodologia simples	Necessita de radiosótopos; pode ser afetado pelo <i>stress</i>
Zinco em enzimas	Diminuição na atividade da fosfatase alcalina no plasma	Ensaio simples	Fosfatase alcalina é afetada por outras condições
Concentração da metalotioneína no sangue	Diminui por deficiência	Aumenta por <i>stress</i>	Ensaio complexo interferência do Fe e outros

A maior consequência da intoxicação crônica, que ocorre devido à ingestão excessiva de zinco suplementar, é a deficiência secundária do cobre causada pela competitividade desses elementos na absorção intestinal. Níveis suplementares em torno de 25 mg de Zn/dia já induzem a deficiência de Cu e o consumo prolongado de suplementos que excedem 150 mg de Zn/dia resultam em erosão gástrica e diminuição na função imunológica ⁽²⁾.

II.7 - Compostos de Zinco

São geralmente acetatos, carbonatos, cloretos, gluconatos, óxidos, estearatos, sulfatos e outros. Apresentam atividades biocidas pois precipitam e desnaturam as proteínas das bactérias, e por esta razão, apresentam uso dermatológico pois combatem vários tipos de infecções ^(19, 20). Combinações entre os sulfatos de zinco e cobre têm sido amplamente utilizadas, pois esses atuam como substâncias bactericidas sem provocar alergias, ao contrário de alguns antibióticos e agentes antissépticos que além de causarem alergia acabam desenvolvendo resistência a alguns microorganismos e apresentam alto custo ⁽²⁰⁾. Além disso os compostos de zinco são amplamente utilizados em preparações vitamínicas.

II.8 - Métodos para Determinação de Zinco

Com relação à determinação de zinco, vários métodos são citados na literatura ⁽²¹⁾. A Tabela VII apresenta alguns tipos de amostras onde se determina zinco ⁽²²⁻⁶⁶⁾.

Um dos métodos indicados em algumas literaturas oficiais ⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾ para a determinação de zinco em alimentos e insulina é o da ditizona. Este apresenta, dentre outras desvantagens, várias etapas para a eliminação de interferentes.

Alexander e Taylor ⁽⁷⁰⁾, em 1944, publicaram um artigo onde apresentaram uma revisão do procedimento para a determinação de zinco em alimentos utilizando a difeniltiocarbazona (ditizona). Este método envolve a utilização da técnica de espectrofotometria UV-VIS.

A abertura da amostra é realizada utilizando-se os ácidos nítrico, sulfúrico e perclórico, a eliminação de interferentes inicia na separação dos cátions pertencentes ao grupo do sulfeto em meio ácido, com a adição de ácido clorídrico até valor de pH 1,9-2,1 e borbulhamento de gás sulfídrico até precipitação completa. No filtrado eliminam-se os cátions de Ni e Co adicionando dimetilglioxima e α -nitroso- β -naftol.

Tabela VII - Diferentes tipos de matrizes estudadas para determinação de Zn(II)⁽²²⁻⁶⁶⁾.

Matriz	Amostra	Referências
Alimentos	folhas de citrus	22
	carne	23
	cereais	24
	leite	25-28
	vinho	29
	trigo	30
	maça	30
	da região de Manaus	31
	açúcar	32
	farinha de arroz	33
Águas	Oceano	34-37
	Natural	34-45
	Potável	27, 28, 33, 46-51
Solos	Material de rocha	52
Materiais Biológicos	Músculo	28
	Fígado	53
	Urina	54
	plasma seminal	55
	soro	46, 56-59
	sangue	46, 58-60
Outra Matrizes	material polimérico	61
	ar	53,62
	aerossóis	63
	ligas	64,65
	óleos e lubrificantes	51,66
	madeira	65

Após a eliminação dos interferentes inicia-se a quantificação do Zn adicionando à solução aquosa, onde foram eliminados os interferentes, solução tampão de amônia/citrato de amônio, ditizona em meio de CCl_4 e realiza-se a extração. Uma alíquota da fase orgânica é transferida para uma cubeta e mede-se a absorbância em 530 nm ^(68,70).

Para a determinação de Zn nas preparações farmacêuticas ^(67,69) de insulina, a abertura da amostra é realizada utilizando ácidos clorídrico e tricloroacético, em seguida a solução é tamponada com amônia/citrato de amônio. A extração é realizada adicionando solução de ditizona em meio de clorofórmio. Uma alíquota da fase orgânica é transferida para uma cubeta e mede-se a absorbância em 530 nm ⁽⁶⁷⁾.

A “Association Official of Analytical Chemists” (AOAC) ⁽⁶⁸⁾ indica o método gravimétrico utilizando a 8-hidroxiquinaldina para a determinação de zinco em desodorantes, pois sabe-se que esse é um dos ingredientes “ativos”, além do alumínio. Para isso a uma alíquota da amostra contendo de 20-50 mg de Zn, é adicionado tartarato de amônio, para a eliminação do Al, e solução de 8-hidroxiquinaldina, preparada em meio de ácido acético glacial e água. Realiza-se aquecimento 60-80° C e adiciona-se hidróxido de amônio para eliminar o excesso de ácido e acetato de amônio até obter valor de pH 5,7-5,9. O precipitado é decantado e lavado com água quente e finalmente seco

durante 2h em estufa a 130-140° C, essa etapa deve ser repetida até obter peso constante ^(68,71,72).

II.8.1 – Desenvolvimento de Métodos Utilizando a Espectrofotometria no UV-Vis e Fluorimetria

À busca de métodos alternativos para a determinação de Zn, muitos pesquisadores se baseiam na obtenção de compostos de coordenação com propriedades favoráveis aos métodos espectrofotométricos de absorção molecular, visando na maioria das vezes desenvolver métodos que apresentem maior rapidez na execução.

Dentre outros, as bases de Schiff derivadas da tiocarbonohidrazina têm sido usadas como reagentes analíticos. Morales *et al* ⁽⁷³⁾ desenvolveram método espectrofotométrico utilizando a 1-[di-(2-piridil)metileno]-5-salicilideno tiocarbonohidrazida (DPST) para determinar zinco e aplicaram em água potável e preparações farmacêuticas. Este método baseia-se na formação de um complexo amarelo em uma solução contendo 30% (V/V) de dimetilformamida que apresenta absorvidade molar, em 417nm, de $6,05 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ em valor de pH 5,6. A lei de Beer é obedecida na faixa de 0,0 a 1,0 ppm ($1,53 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$). Os efeitos de vários íons foram estudados e bons resultados foram obtidos na eliminação de Cu(II), Bi(III), Hg(II) e Pb(II) com tiosulfato e Fe(II), Fe(III) e Ni(II) com citrato ⁽⁷³⁾.

A 1 - (fenil - 2 - piridil) carbilideno - 5 - salicilideno tiocarbohidrazona (PPST) foi usada por Lucena *et al* ⁽¹⁹⁾ para determinar zinco em águas naturais e preparações farmacêuticas. O método baseia-se na formação de um complexo amarelo, pH 6,5, em meio de uma solução contendo dimetilformamida 48% (V/V), que exibe um máximo de absorção em 424 nm. O valor de absortividade molar é $6,1 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e a lei de Beer é obedecida na faixa de 0,010 a $1,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($[0,0153 \text{ a } 1,84] \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) de Zn(II). Vários íons foram estudados e Cd(II), Ni(II), Co(II), Bi(III), Fe(II), Fe(III) e Ga(III) apresentaram-se como principais interferentes ⁽¹⁹⁾.

Devido à grande habilidade para formar complexos com metal, 8-hidroxiquinolina e seus derivados tem sido utilizado em muitos estudos analíticos. Korn *et al* ⁽⁷⁴⁾ desenvolveram um método espectrofotométrico para a determinação de zinco em produtos farmacêuticos e ligas de cobre utilizando o ácido 7-(4-nitrofenilazo)-8-hidroxiquinolina-sulfônico (p-NIAZOXS). A reação entre o Zn(II) e este reagente é rápida em valor de pH 9,2 e o complexo formado é estável pelo menos 24 h. O método permite a determinação de zinco na faixa de 0,05 a $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($[0,0765 \text{ a } 1,53] \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) com absortividade molar de $3,75 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e limite de detecção de 15 ng.mL^{-1} ($0,23 \mu\text{mol.L}^{-1}$). O complexo amarelo formado apresenta um máximo de absorção em 430 nm e o reagente em 520 nm, as medidas

foram realizadas em 520 nm devido a este ser mais sensível. Cu(II), Ni(II), Co(II), Cd(II), Fe(II) e Fe(III) interferem seriamente em todas as proporções, no entanto a extração seletiva de zinco a partir de solução de tiocianato em meio de HCl 0,5 mol.L⁻¹ seguido por uma extração de retorno com solução amoniaca eliminou estas interferências. Se Fe(III) está presente na amostra, torna-se necessário adicionar NaF antes da extração de Zn(II) ⁽⁷⁴⁾.

Vários são os métodos fluorimétricos desenvolvidos para a determinação de zinco ^(25,27,29,33,45,49,53,54,61,62). O desenvolvimento de um método fluorimétrico baseado na reação de zinco com salicilaldeído carbohidrazona (SACH) foi desenvolvido por Pozo *et al* ⁽⁵⁴⁾. Neste, a determinação da quantidade de zinco em amostras biológicas e ligas foi realizado em valor de pH 6,5-6,8 em etanol-água 60% (V/V). A fluorescência foi medida em 445 nm usando uma excitação de 362 nm. Observou-se uma relação linear entre a concentração de Zn(II) e a intensidade de fluorescência na faixa de 5 a 90 µg.L⁻¹ (0,0765 a 1,38 µmol.L⁻¹) e limite de detecção de 3 ng.mL⁻¹ (0,0459 µmol.L⁻¹). Dos íons interferentes avaliados, a adição de iodeto possibilitou a eliminação de Bi(III), Sb(III), Hg(I) e Hg(II), do ácido ascórbico para Fe(III), fluoreto para Ga(III) e Co(II) e dimetilglioxima para o Ni(II).

II.8.2 – Desenvolvimento de Métodos Utilizando a Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

Na década de 70, mais precisamente em 1975, Ruzicka e Hansen^(75,76) propuseram a técnica de Análise por Injeção em Fluxo e desde então esta vem sendo amplamente utilizada como uma alternativa aos procedimentos convencionais de manipulação de soluções, apresentando como vantagens a fácil construção, baixo custo de montagem para operação e manutenção, alta versatilidade e exigência de pequeno consumo de amostras, padrões e reagentes ⁽⁷⁷⁾. Tem como conceito básico a inserção da amostra em um fluido transportador que a leva até o detector.

Inicialmente, a injeção da amostra no fluxo do reagente era realizada empregando-se uma seringa hipodérmica, o que deu origem ao nome do processo que ao longo dos anos sofreu grandes evoluções ⁽⁷⁸⁾.

O diagrama de fluxo mais simples é o de linha única, onde o transportador é o reagente e a mistura da amostra com o reagente ocorre exclusivamente por dispersão, enquanto a mesma é transportada em direção ao detector ⁽⁷⁸⁾.

Diversas alterações têm sido propostas em sua configuração básica para melhorar o desempenho do sistema e solucionar problemas analíticos. Neste sentido, introduziram-se conceitos como adição dos

reagentes por confluência, empregando-se como transportador uma solução quimicamente inerte, processos de zonas coalescentes e de fluxo intermitente, entre outros, tendo como objetivo minimizar o consumo de reagente. No primeiro processo o reagente é injetado em sincronismo com a amostra empregando alças de amostragem, evitando o consumo do reagente na ausência da amostra. No fluxo intermitente, economiza-se o reagente durante a etapa de amostragem ⁽⁷⁸⁾.

Vários métodos utilizando análise por injeção em fluxo (FIA) foram descritos para a determinação de zinco utilizando técnicas de detecção como: espectrofotometria de absorção molecular ⁽⁷⁹⁻⁸²⁾, espectrometria de absorção atômica ⁽⁸³⁻⁸⁶⁾, emissão atômica com plasma ^(87,88), amperometria ⁽⁸⁹⁾ e *stripping* potenciométrico ⁽⁹⁰⁾.

Kuroda e Mochizuki ⁽⁹¹⁾ desenvolveram um método espectrofotométrico para a determinação de cobre, níquel e zinco em ligas, à base de cobre, por análise de injeção em fluxo. O sistema para análise de Cu e Ni envolveu uma linha única, solução transportadora (ácido nítrico), numa vazão de 8,0 mL.min⁻¹. A absorbância dos aquo-complexos de Cu(II) e Ni(II) foi medida em 805 e 410 nm, respectivamente, e com o sistema otimizado obteve-se uma frequência de amostragem de 280 amostras.h⁻¹. O sistema FIA para Zn consiste em três canais, sendo o transportador (C) ácido nítrico 2,0 mL.min⁻¹, agente mascarante-solução tampão (tiosulfato de sódio-tampão

acetato) (R_1) 10 mL.min⁻¹ para eliminar Cu(II) e Pb(II) ao mesmo tempo, e alaranjado de xilenol (R_2) 6,0 mL.min⁻¹. A absorbância foi medida em 568 nm. O sistema otimizado permite uma frequência de amostragem de 90 amostras.h⁻¹.

A determinação de cobre e zinco em soro usando zincom como reagente colorimétrico foi desenvolvida por Liu *et al* ⁽⁹²⁾ utilizando o sistema FIA. Para isso, duas amostras são injetadas dentro do mesmo fluxo transportador seqüencialmente, uma para a determinação do Zn e outra para a soma do Cu e Zn. Para a determinação do zinco, o reagente mascarante de cobre, tiouréia, é injetado simultaneamente em um fluxo transportador. Zincom reage com zinco e cobre para formar complexos azuis e a absorbância é medida em 606 nm, na qual seus coeficientes de absorção são equivalentes ($a_{Cu} = a_{Zn} = a$). A absorbância no ponto da determinação de Zn do sistema FIA pode ser descrito como:

$$A = a_{Zn} \cdot b \cdot C_{Zn} = a \cdot b \cdot C_{Zn} \quad (1)$$

A absorbância na determinação da soma Cu e Zn pode ser descrita como:

$$A = a_{Zn} \cdot b \cdot C_{Zn} + a_{Cu} \cdot b \cdot C_{Cu} = a \cdot b \cdot (C_{Zn} + C_{Cu}) \quad (2)$$

Interferem na determinação Fe(III), Mn(II), Ni(II), Co(II), Al(III) e Cd(II). Esses elementos presentes no soro podem ser

eliminados pela adição de reagentes mascarantes: citrato, fosfato de sódio e 1,10-fenantrolina ⁽⁹²⁾.

Compañó *et al* ⁽⁵⁰⁾ desenvolveram um método FIA para a determinação de zinco em preparações farmacêuticas e água superficial, baseado na fluorescência do complexo com 5,7-dicloro-2-metilquinolin-8-ol (DCMQ) em meio micelar Brij-35. Soluções de DCMQ foram preparadas em meio de etanol-água (40 %). Utilizou-se uma solução tampão ácido succínico/succinato de sódio (pH 6,1) e soluções mascarantes de ácido succínico contendo tiosulfato de sódio e/ou pirofosfato de sódio, para eliminar a interferência de íons como Cd(II), Cu(II), Pb(II), Fe(III) e Al(III). O sistema FIA utilizado foi de três canais com uma válvula de injeção automática para volumes variáveis. Tubos de Tygon foram utilizados para soluções aquosas de Brij-35 e tampão e de Solvaflex para soluções de DCMQ. A vazão total do sistema foi 3,3 mL.min⁻¹ sendo razões de fluxo individual 5:5:1 (surfactante:tampão:reagente). A fluorescência foi medida em 534 nm, usando excitação em 397 nm. Em condições otimizadas, a lei de Beer foi obedecida na faixa 10 a 600 µg.L⁻¹ (0,153 a 9,18 µmol.L⁻¹), limite de detecção 4 µg.L⁻¹ (0,0612 µmol.L⁻¹) e a frequência de amostragem foi de 180 amostras.h⁻¹.

II.8.2.1 – Desenvolvimento de Métodos FIA Utilizando Pré-Concentração da Amostra

Com relação à dispersão da amostra no fluido transportador sabe-se que esta, em relação à magnitude do sinal analítico, depende de parâmetros intrínsecos do módulo de análise: diâmetro interno (d.i) do percurso analítico (espaço percorrido pela amostra do ponto de injeção até a cela detecção), tipos de tubo e vazão do transportador.

Dentre os parâmetros, o que apresenta um efeito mais acentuado é a razão entre os comprimentos da alça de amostragem e do percurso analítico ⁽⁹³⁾. Por exemplo, quando pretende-se determinar um analito, cuja concentração é alta, altera-se o comprimento da alça de amostragem ajustando a magnitude do sinal analítico para a faixa operacional do instrumento analítico. Porém o comprimento da alça de amostragem não pode ser diminuído indefinidamente ⁽⁷⁸⁾.

Por outro lado, muitas vezes, a concentração da espécie química de interesse está abaixo dos limites de detecção dos métodos desenvolvidos e assim, para superar esta dificuldade, recorre-se aos processos de pré-concentração em linha, sendo as extrações líquido-líquido ou líquido-sólido as mais empregadas ^(78,94).

O primeiro sistema FIA com pré concentração em linha utilizando resina de troca iônica foi desenvolvido por

Bergamin *et al*, ⁽⁹⁵⁾, em 1980, para a determinação espectrofotométrica de amônio em águas naturais.

Na pré-concentração em fase líquida-sólida, o meio mais empregado tem sido com resinas de troca iônica. Estes sistemas podem ser classificados da seguinte forma: os utilizados estritamente para separação de interferentes a fim de garantir aumento da seletividade, para efetuar separação e pré-concentração, e aqueles onde pré-concentração e a detecção é feita *in situ*, na coluna ⁽⁷⁸⁾.

A maioria das publicações abrange a eliminação de interferentes e pré-concentração. Ferreira *et al* ⁽⁷⁹⁾ desenvolveram um sistema de injeção em fluxo para a determinação espectrofotométrica de Zn em plantas. As amostras dissolvidas em HCl são injetadas no fluxo transportador de HCl/NaCl até atravessar uma coluna com resina de troca aniônica (Dowex 1-X8, 100-200 mesh), onde os cloro complexos de zinco são retidos e posteriormente eluidos com uma solução diluída de NaOH. A absorbância é medida após a reação com zincom. O sistema proposto permite a análise de 45 amostras.h⁻¹ na concentração de 0,00-2,00 mg.L⁻¹ ($3,06 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹). Os resultados são precisos e concordantes com os dados obtidos pela técnica de absorção atômica. Com exceção do Cd, que também forma cloro complexos com alta estabilidade, os demais interferentes foram eliminados⁽⁷⁹⁾.

III - DI-2-PIRIDIL CETONA
SALICILOILHIDRAZONA
(DPKSH)

III.1 - Aspectos Gerais das Hidrazonas

As hidrazonas são azometinas caracterizadas pela presença do grupo triatômico $=C=N-N=$ ⁽⁹⁶⁾. São diferenciadas dos outros membros desta classe (iminas, oximas e outras) devido à presença de dois átomos de nitrogênio interligados. O grupo hidrazona ocorre em compostos orgânicos do tipo (I):

(I)

onde R, R', X e Y podem ser iguais a H, alcanos, RCO, grupos heterocíclicos. O nome geral “hidrazonas” é usado para todos os compostos que apresentam a estrutura geral (I) ⁽⁹⁷⁾.

As hidrazonas podem ser consideradas azometinas carbonílicas e, em geral, são sintetizadas fazendo-se refluxo de quantidades estequiométricas da hidrazida apropriada misturada a um aldeído ou cetona, dissolvido em um solvente adequado. O composto é cristalizado em soluções resfriadas e recristalizado a partir de solvente adequado. Muitas hidrazonas são comercialmente disponíveis ⁽⁹⁶⁾.

Algumas hidrazonas podem apresentar-se em equilíbrio tautomérico envolvendo as formas cetônica (II) e enólica (III), conforme se observa-se a seguir :

As hidrazonas que apresentam características semelhantes às estruturas II e III podem formar compostos de coordenação através do átomo de oxigênio do grupo carbonila ou enólico. Complexos neutros de metais são formados em muitos casos, quando o ligante se coordena na forma de ânion. Hidrazonas podem ainda atuar como ligantes tri, tetra ou pentadentados quando R_1 , R_2 e/ou R_3 apresentam um átomo doador em posição apropriada ⁽⁹⁸⁾.

Hidrazonas são usualmente denominadas a partir do composto carbonílico do qual são derivadas. Por exemplo, o composto sintetizado a partir da reação da di-2-piridil cetona e da benzoilhidrazida é denominado di-2-piridil cetona benzoilhidrazona.

III.2 - Aplicações Analíticas das Hidrazonas

Diversas são as aplicações analíticas das hidrazonas. Além de uma revisão datada de 1975 ⁽⁹⁶⁾ contendo 82 citações, tem-se disponível uma revisão mais completa de 1982 ⁽⁹⁷⁾, contendo 198 referências. Para as décadas de 60 e 70 são citadas 62 e 103

referências, respectivamente, o que demonstra a crescente utilização das hidrazonas em relação à década de 50, com apenas 8 citações. Na década de 80 são 277 citações e nos anos de 1991 a 1997 têm-se aproximadamente 103 citações.

Em Química Analítica hidrazonas encontram aplicação na detecção, determinação e isolamento de compostos contendo o grupo carbonila ^(99,100). Terent'ev e Andreeva ⁽¹⁰⁰⁾ utilizaram a 2,4-dinitrofenilhidrazina em meio aquoso e não aquoso em soluções ácidas, alcalinas e neutras para determinação total dos compostos carbonilas. Relacionaram a quantidade do composto carbonila com a diminuição de absorbância em um comprimento de onda de 320 nm, onde a hidrazona apresenta um máximo de absorção.

As hidrazonas têm sido intensamente utilizadas na detecção e determinação de muitos metais (principalmente do grupo de transição) formando complexos coloridos ^(96,97) e entre os métodos utilizados destacam-se os colorimétricos ou fluorimétricos. A potencialidade das hidrazonas como agentes de pré-concentração em processos de extração líquido-líquido para vários íons metálicos a nível de traços tem sido estudada ⁽⁹⁸⁾.

Algumas hidrazonas, bem como suas principais aplicações⁽¹⁰¹⁻¹²⁶⁾ estão apresentadas na Tabela VIII, onde a maioria das interações metal/ligante é estudada pelo método espectrofotométrico.

Tabela VIII - Principais aplicações analíticas de algumas hidrazonas^(96,97).

<i>Aroilhidrazonas</i>	<i>Aplicações</i>
Bisciclohexanona oxalilhidrazona	Cu(II) em polpa de papel, soro humano, plantas, metais, ligas não ferrosas e sulfeto de cádmio ⁽¹⁰¹⁻¹⁰⁶⁾
Piridina-2-aldeído 2-piridilhidrazona (PAPHY)	Indicador ácido-base ^(107,108) Cu(II) em alimentos ⁽¹⁰⁹⁾
2,2'-bipiridil 2-piridilhidrazona (BPPH)	Co (II) em água do mar e salmoura ⁽¹¹⁰⁾
2-benzoilpiridina 2-piridilhidrazona	Fe(II), Co(II), Ni(II) e Zn(II) ⁽¹¹¹⁾
2,2'-dipiridil cetona hidrazona	Hg(II) e Cu(II) ⁽¹¹²⁾
di-2-piridil cetona 2-tiofenoilhidrazona	Co(II) ⁽¹¹³⁾
di-2-piridil cetona benzoilhidrazona (DPKBH)	Fe(II) ⁽¹¹⁹⁾ e (III) ⁽¹¹⁴⁻¹¹⁸⁾ , Co(II) ^(113,120,121) , Ni(II) ^(122,123) e Cu(II) ⁽¹²⁴⁾
di-2-piridil cetona saliciloilhidrazona (DPKSH)	Fe (II) e Fe (III) ⁽¹²⁵⁾ e Zn ⁽¹²⁶⁾

Entre outras potencialidades das hidrazonas tem-se sua utilização como indicadores ácido-base. Hirsch⁽¹²⁷⁾, baseando-se na reação entre

a ditizona e o chumbo, utilizou como indicador o complexo vermelho formado. O ponto final foi então determinado em titulações ácido-base. Cameron e Gibson ^(107,108) propuseram a utilização de certos complexos entre ligantes tridentados como a piridina-2-aldeído 2-piridilhidrazona (PAPHY) e íons metálicos como Cu(II), Fe(II), Ni(II), Cd(II) e Zn(II) como indicadores em titulações ácido-base para, por exemplo, ácido clorídrico com hidróxido de sódio.

Compostos catiônicos, tais como $[\text{Ni}(\text{PAPHY})_2]^{2+}$, podem ser desprotonados no grupo imino com adição de álcalis provocando o aparecimento de intensa coloração pela formação de complexos neutros $[\text{Ni}(\text{PAPHY})_2]$. As faixas de transição dos indicadores variam de acordo com o metal, sendo 4,4-6,8 para o Cu(II) (amarelo pálido para amarelo), 5,6-8,2 para o Fe(II) (rosa para amarelo), 6,4-9,5 para o Ni(II) (incolor para amarelo), 6,7-9,8 para o Zn(II) (incolor para amarelo) e 7,8-10,4 para o Cd(II) (incolor para amarelo) ^(96,97).

Libergott *et al* ⁽¹²⁸⁾ exploraram a utilização das hidrazonas como reagentes de “spot-test”, utilizando, por exemplo, a piruvilidina-2-hidrazina-benzotiazol para a determinação de cádmio em ligas metálicas. Em meio alcalino na presença de cádmio desenvolve-se uma coloração laranja na fase orgânica, com alta sensibilidade e seletividade, pois metais como Al, Sb e Cr, entre outros, não interferem.

Devido ao grande número de complexos formados entre as hidrazonas e os metais, as respectivas constantes de estabilidade têm sido determinadas, como é o caso dos complexos formados por piridina-2-aldeído-2-piridilhidrazona (PAPHY) com Cu(II), Zn(II), Cd(II), Mn(II), Fe(II) e Ni(II)^(129,130).

Há publicações também sobre análises gravimétricas envolvendo hidrazonas, por exemplo uma solução etanólica de salicilaldeído fenilhidrazona precipita Cu(II). Quantidades de 25 a 60mg podem ser determinadas com um erro menor que 0,1% na presença de 100mg de Cd(II)⁽¹³¹⁾, freqüente interferente em amostras de cobre.

III.3 – Outras Aplicações das Hidrazonas

Algumas hidrazonas têm sido aplicadas no tratamento de várias doenças como tuberculose, leprose, leucemia, sarcomas e outros neoplasmas malignos, apresentando assim muitas atividades terapêuticas. Isto é atribuído ao fato de formarem complexos estáveis com metais de transição presentes nas células e assim inviabilizarem algumas reações enzimáticas vitais catalisadas por estes metais^(96,97,132).

Atuam também como herbicidas, inseticidas, nematocidas, rodenticidas e reguladoras do crescimento de plantas⁽¹³³⁾. Hidrazonas de 2-metilftalazona são eficientes esterelizantes para uso

doméstico⁽¹³³⁾. São usadas como plastificantes e estabilizantes para polímeros, inibidores de polimerização e antioxidantes, entre outros⁽⁹⁷⁾.

III.4 - Di-2-Piridil Cetona Saliciloilhidrazona

A di-2-piridil cetona saliciloilhidrazona (DPKSH) pertence ao grupo das hidrazonas, foi sintetizada por Garcia -Vargas *et al* em 1986⁽⁹⁸⁾ através da interação da di-2-piridil cetona e da saliciloilhidrazida, conforme Figura 1.

Figura 1 - Reação de síntese do DPKSH

Este composto sintetizado apresenta fórmula molecular $C_{18}H_{14}N_4O_2$, massa molar $318,33 \text{ g.mol}^{-1}$ e ponto de fusão $172-174 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Em solução, DPKSH apresenta equilíbrio (1) tautomérico entre as formas cetônica e enólica, conforme representado na Figura 2.

Figura 2 - Equilíbrio tautomérico do DPKSH

Em um valor de pH baixo, um dos nitrogênios da piridina é protonado, se dissociando em DPKSH neutro, como representado na Figura 3.

Figura 3 - Equilíbrio de dissociação do DPKSH

O equilíbrio 2 está relacionado com a constante de dissociação do DPKSH, representada por K_1 .

Em valor de pH alto, tem-se a saída de um átomo de hidrogênio do grupo fenólico. O equilíbrio entre o DPKSH neutro e aniônico é representado na Figura 4.

ou

Figura 4 - Equilíbrio de ionização do DPKSH, indicando as formas cetônica e enólica.

O equilíbrio 3 está relacionado com a constante de ionização do DPKSH, representada por K_2 .

Garcia-Vargas *et al* ⁽⁹⁸⁾ e Bragil *et al* ⁽¹³⁴⁾ determinaram as constantes de dissociação deste ligante em 3% e 50% de etanol respectivamente, utilizando a técnica espectrofotométrica. Os valores de pK_1 e pK_2 são iguais a $(3,05 \pm 0,1)$ e $(2,68 \pm 0,01)$; $(6,85 \pm 0,05)$ e $(8,05 \pm 0,03)$ em 3% e em 50% de etanol, respectivamente e representam a protonação do nitrogênio da piridina e deprotonação do grupo fenólico .

A Figura 5 apresenta o diagrama de distribuição α *versus* pH para diferentes espécies de DPKSH. Este diagrama foi construído a partir dos valores de K_1 e K_2 obtidos por Bragil *et al* ⁽¹³⁴⁾ em 50 % de etanol. Observa-se na Figura 5 que em valor de pH aproximadamente 5,0 encontra-se a predominância da forma neutra (RN). Em valor de pH 1,0 tem-se a total predominância da forma protonada (RNH^+) e acima de pH 13,0 a total predominância da forma aniônica (RO^-).

Como outras hidrazonas o DPKSH pode comportar-se como um ligante bi ou tridentado. Garcia-Vargas *et al* ⁽⁹⁸⁾ estudaram a reatividade do DPKSH frente a vários íons metálicos em meio de água e benzeno e em diferentes valores de pH, utilizando tampões como cloroacetato e acetato.

Figura 5 - Diagrama de distribuição do DPKSH em função do pH, em 50% de etanol ⁽¹³⁴⁾.

A Tabela IX apresenta, a partir de dados espectrofotométricos, o comprimento de onda de máxima absorbância e absorvidade molar dos complexos de vários íons metálicos com DPKSH. Nesta Tabela observa-se a grande variedade de íons metálicos que formam compostos de coordenação com este ligante, mostrando assim a vasta aplicação analítica do DPKSH para o estudo de especiação.

Tabela IX - Comprimento de onda de máxima absorbância (nm) e absortividade molar, entre parênteses, ($10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) dos complexos de vários íons metálicos com DPKSH em meio de água e benzeno e diferentes valores de pH ⁽⁹⁸⁾.

Metal	Cloroacetato		Acetato	
	Água	Benzeno	Água	Benzeno
Fe(II)	380 (8,1)	385 (9,2)	360(22,3)	390 (18,6)
Fe(III)	385 (10,9)	380 (11,4)	360 (19,6)	*
Cu(II)	390 (19,5)	395 (28,8)	380 (35,6)	390 (45,8)
Co(II)	390 (30,3)	420 (20,4)	375 (43,2)	390 (19,6)
Ni(II)	390 (30,8)	400 (52,8)	375 (49,3)	390 (82,2)
Zn(II)	390 (1,6)	405 (4,6)	360 (53,2)	390 (56,7)
Cd(II)	*	*	370 (12,4)	390 (11,5)
Hg(II)	*	*	375 (62,7)	390 (80,2)
Pb(II)	390 (1,3)	400 (0,2)	375 (16,0)	395 (6,5)
Bi(III)	395 (23,8)	400 (29,6)	380 (27,2)	*
Au(III)	400 (1,2)	*	*	*
Ga(III)	395 (22,9)	395 (19,5)	360 (7,0)	395 (6,1)
V(V)	400 (22,7)	415 (26,0)	355 (8,3)	*
U(VI)	380 (3,5)	395 (9,8)	355 (7,9)	385 (21,0)

*valores não determinados

IV - PARTE EXPERIMENTAL

IV.1 - Aparelhagem e Acessórios

- Espectrofotômetro Hitachi, modelo U-3000
- Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier, Perkin Elmer, modelo 1750 (500-4000 cm^{-1}) e pastilhas de KBr
- Espectrofotômetro de absorção atômica Varian e Perkin Elmer, modelos AA 1275 e Z 5000, respectivamente
- Espectrômetro de massas, Hewlett Packard, modelo HP 5988 A
- Espectrômetro de massas por ionização em “electrospray” Platform II da Micromass
- Fotômetro de chama Janway Clinical
- Cubetas de quartzo com 1,00 cm de caminho óptico da Hellma
- Termoanalizador Shimatzu DSC-50 e TGA-50
- Elemental analyser CHN, modelo 2400 da Perkin Elmer
- Microondas em sistema fechado CEM incorp.
- Bomba peristáltica Ismatec IPC-8
- Bomba Peristáltica Minipuls 3 da Gilson
- Injetor comutador construído em acrílico
- Tubos de polietileno e Viton®
- Cubetas de fluxo de quartzo com caminho óptico de 1,00 cm da Hellma
- Medidor de pH modelo 654 da Metrohm

- Eletrodo de vidro combinado da Metrohm
- Micro pipetas de volumes variáveis

IV.2 - Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e suas soluções foram preparadas com água desionizada ou etanol absoluto.

O etanol absoluto utilizado foi de procedência Merck. As soluções de Zn(II) foram preparadas a partir de nitrato de zinco de procedência Merck e padronizadas utilizando-se EDTA e o indicador Negro de Eriocromo T em pH = 10 utilizando-se tampão de amônio/hidróxido de amônio ⁽¹³⁵⁾. A solução estoque foi mantida em valor de pH 2,5 com adição ácido sulfúrico.

Para a etapa de pré-concentração do Zn(II) como cloro complexos de Zn(II) utilizou-se resina de troca aniônica IRA-400.

As soluções de DPKSH foram preparadas por dissolução em etanol absoluto.

Para o preparo das soluções tampão utilizaram-se ácidos cloroacético, acético e clorídrico P.A., hidróxido de potássio e tris(hidroximetil) aminometano, todos de procedência Merck.

Gaubeur *et al* ⁽¹³⁶⁾ verificaram ao determinar as constantes de dissociação/ionização da di-2-piridil cetona benzoilhidrazona (DPKBH) em diferentes porcentagens de etanol que os valores de pH sofrem alteração com o aumento da fração de etanol. Assim para apresentar os valores de pH dos tampões utilizados e do complexo Zn(II)/DPKSH como “valores verdadeiros” seria necessária efetuar a calibração do eletrodo de vidro com uma solução tampão, por exemplo hidrogenoftalato de potássio (pH = 4,0), preparada em meio de 50% de etanol. Porém isso não foi realizado, assim todos os valores de pH apresentados durante esse trabalho serão colocados em itálico (*pH*) por serem considerados aparentes.

Para a abertura das amostras, quando necessário, utilizaram-se ácidos nítrico 65%, sulfúrico e clorídrico e peróxido de hidrogênio 30% da Merck.

Além disso utilizou-se tiouréia, fluoreto e tartarato como reagentes mascarantes de Cu(II) e Fe(III), respectivamente, ambos P.A de procedência Merck.

IV.3 - Obtenção do DPKSH

Obteve-se o DPKSH seguindo o procedimento descrito por Garcia-Vargas *et al* ⁽⁹⁸⁾. Este reagente foi obtido a partir da mistura

equimolar do di-2-piridil cetona e saliciloilhidrazida em etanol e algumas gotas de ácido clorídrico concentrado. A mistura foi mantida em refluxo por uma hora e, após o resfriamento, adicionou-se água desionizada na proporção 1:3 (orgânico/água). A seguir, gotas de solução de hidróxido de sódio foram adicionadas até obter-se valor de pH~5.

A mistura foi mantida em repouso por 24 horas para a formação lenta do precipitado. O precipitado formado foi, então, filtrado a vácuo, sendo recolhido em funil de Büchner e recristalizado em média três vezes, em solução de etanol-água. Para a recristalização adicionou-se uma quantidade mínima de etanol, a quente e sob agitação, para dissolução do precipitado formado. Após resfriamento, algumas gotas de água desionizada foram adicionadas para iniciar a precipitação.

IV.4 - Síntese do Complexo Zn(II)/DPKSH

Sintetizou-se o complexo a partir da mistura de soluções etanólica de DPKSH $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ e Zn(II) $2,39 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ na forma de nitrato de zinco hexahidratado. Estas soluções foram misturadas e deixadas em repouso até evaporação total do solvente. Os

cristais obtidos apresentaram coloração amarela intensa e foram lavados com etanol e secos em dessecador.

Assim, para o DPKSH e o Zn(II)/DPKSH, utilizando algumas técnicas como espectrometria de infravermelho, de massas e de massas por ionização em “electrospray”, análises elementar e térmica, foi possível obter algumas características importantes que serão apresentadas neste trabalho.

IV.5 - Abertura das Preparações Farmacêuticas

As amostras selecionadas foram de: Colírios que apresentam em 1 mL de formulação, 1,0 mg de fenosulfonato de zinco, 0,5 mg de cloridrato de nafazolina, 0,025 mg de sulfato de berberina e preservativos clorobutanol e tiomersal (A); ZnSO₄.7H₂O 0,3mg, ácido bórico 15 mg, bórax 0,7 mg e cloridrato de nafazolina 0,15 mg (B). Talco Anti-séptico que apresenta, em 100 g de formulação, ácido ortoxibenzóico 0,352 g, enxofre 17,602 g; ácido ortobórico 11,735 g, óxido de zinco 11,735 g e amido 23,470 g (C). Solução Adstringente composição óxido de zinco, álcool etílico, cloreto de benzetônio, sorbitol, fragrância e água desmineralizada (D). Pomada para Assaduras que apresenta, em 1 g de formulação, óleo (que contém 5.000 U.I. de vitamina A e 900 U.I. de vitamina D) 100 mg, ácido

bórico 20 mg; óxido de zinco 150 mg, vaselina líquida, talco, lanolina anidra, vaselina sólida branca, parafina, vanilina, essência de lavanda, laurilsulfato de sódio e água (E). Solução Injetável e Sublingual de Gluconato de Zn que apresenta, em 2 mL, gluconato de zinco 0,470 mg, zinco metálico 0,0674 mg, glicose 100 mg e água destilada q.s.p. 2 mL (F). Solução Injetável e Sublingual de Gluconato de Zn e Cu que apresenta, em 2 mL, gluconato de zinco 0,470 mg, zinco metálico 0,0674 mg, gluconato de cobre 0,518 mg, cobre metálico 0,0726 mg, glicose 100 mg e água destilada q.s.p. 2 mL (G). Comprimido de Gluconato de Zinco 100 mg (H).

Para efetuar as determinações de zinco nas amostras de Colírios, Solução injetável e sublingual de Gluconato de Zn e de Gluconato de Zn e Cu não foi necessário fazer abertura. Para o Talco Anti-séptico pesou-se, em cadinho de porcelana, 25,2 mg da amostra, adicionou-se ácido clorídrico concentrado e, após alguns minutos, filtrou-se para remover o resíduo restante transferiu-se para um balão de 50 mL e completou-se o volume com água desionizada.

No caso da solução adstringente, após agitação, pesou-se 1,0303 g, adicionou-se ácido clorídrico concentrado e peróxido de hidrogênio 30%. Manteve-se aquecimento até eliminar o excesso do peróxido, transferiu-se para um balão de 25 mL e finalmente completou-se o volume com água desionizada.

Em um cadinho de porcelana pesou-se 0,2000 g de Pomada para assaduras e aqueceu-se em chama do bico de Bunsen por aproximadamente 40 minutos, adicionou-se ácido clorídrico concentrado, filtrou-se, transferiu-se para um balão de 100 mL e completou-se o volume com água desionizada.

Para a amostra de Comprimido de Gluconato de Zinco triturou-se um comprimido e retirou-se 0,1010g. A esta massa adicionou-se 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% e 0,2 mL de ácido sulfúrico concentrado, em um balão de fundo redondo. Após ebulição, adicionaram-se alíquotas de 2 mL de peróxido de hidrogênio (5 vezes), sempre após o resfriamento da amostra. Transferiu-se para um balão de 100 mL e completou-se o volume com água desionizada.

IV.6 - Abertura das amostras biológicas

Com a finalidade de aplicar os métodos desenvolvidos em amostras biológicas, selecionaram-se algumas amostras provenientes de ratos (fezes, rim, tíbia e fêmur). Essas amostras foram obtidas no Laboratório de Nutrição-Mineral da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os ratos foram submetidos a dietas com dois tipos de rações: RC (não suplementada) e RCS (suplementada). É importante mencionar que essas rações foram preparadas e na RCS foi adicionada uma quantidade 2 a 2,5 vezes

maior de zinco utilizando $3\text{Zn}(\text{OH})_2 \cdot 2\text{ZnCO}_3$ da Carlo Erba, por isso é chamada de suplementada⁽¹⁰⁾.

As amostras provenientes de ratos foram previamente preparados, pesados e as respectivas massas estão apresentadas na Tabela X.

A abertura das amostras de fezes, rins, tíbia e fêmur foi realizada utilizando-se a emissão de microondas em sistema fechado. As programações para a abertura das amostras de fezes e rins estão representadas nas Tabelas XI e XII, respectivamente.

Tabela X - Massa das amostras de fezes, rins, tíbia e fêmur. Onde S e NS estão relacionados com as amostras provenientes de ratos alimentados a partir de rações com e sem suplementação, respectivamente.

Amostras	Massa (g)
Fezes A (S)	0,1143
Fezes B (S)	0,1215
Rim (S)	0,3841
Rim (NS)	0,3157
Tíbia (NS)	0,4610
Fêmur (S)	0,5820

(S) suplementada, (NS) não suplementado, A e B amostras do mesmo rato.

Tabela XI - Programação do microondas para a digestão das amostras de fezes.

Estágios	1	2	3	4
Pressão (psi)	50	100	150	20
Tempo (min.)	15	25	20	15
Potência (W)	80	90	90	00

Tabela XII - Programação do microondas para a digestão das amostras de rins.

Estágios	1	2	3	4
Pressão (psi)	50	100	150	20
Tempo (min.)	10	20	20	15
Potência (W)	80	80	80	00

Nas amostras de fezes e rins, após a digestão no microondas, adicionaram-se algumas gotas de peróxido de hidrogênio 30% para eliminar possíveis traços de matéria orgânica, o que foi observado pelo

clareamento da amostra (verde para incolor). As amostras de fezes foram diluídas para um volume de 1000mL. As amostras de rins, não suplementada e suplementada, foram diluídas para um volume de 25 e 50 mL, respectivamente.

As amostras de tíbia e fêmur, antes da digestão foram deixadas aproximadamente 12 h em contato com ácido nítrico concentrado, ataque parcial do colágeno e da matriz mineral. Depois da digestão, apresentada na Tabela XIII, adicionaram-se algumas gotas de peróxido de hidrogênio e efetuaram-se novamente os estágios apresentados. Finalmente as amostras de tíbia não suplementada e fêmur suplementada, foram diluídas para um volume de 100mL.

Tabela XIII - Programação do microondas para a digestão das amostras de tíbia e fêmur.

Estágios	1	2	3	4
Pressão (psi)	50	100	150	20
Tempo (min.)	20	20	15	15
Potência (W)	100	100	100	00

V - RESULTADOS E DISCUSSÕES

V.1 - Caracterização do DPKSH e Complexo Zn(II)/DPKSH

Para a caracterização do DPKSH e do complexo Zn(II)/DPKSH as seguintes técnicas analíticas foram utilizadas: Espectrofotometria no UV-Visível, Espectrometria no Infravermelho, Massas e de Massas com Ionização por “Electrospray”, Análise Térmica e Elementar. Para avaliar a estequiometria do complexo utilizaram-se os métodos de Job e Bjerrum.

V.1.1 - Espectrofotometria no UV-Visível

Avaliou-se o comportamento espectral do ligante e do complexo. Para isso prepararam-se soluções de DPKSH $2,39 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e de Zn(II) $2,10 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, DPKSH $2,39 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ambas em meio de tampão ácido acético/acetato $pH = 4,0$ e etanol-água 50% (V/V). Os respectivos espectros foram obtidos em um espectrofotômetro Hitachi U-3000 e estão representados na Figura 6.

Como pode-se observar preparou-se a solução do complexo numa razão ligante/metálico igual a 10, a fim de garantir a completa complexação do metal. As soluções de referência foram preparadas a partir das soluções de tampão ácido acético/acetato e etanol-água 50% (V/V) e DPKSH $2,39 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, tampão ácido acético/acetato e em meio de etanol-água 50% (V/V) para obtenção dos espectros do ligante e complexo, respectivamente.

Figura 6 - Espectros do DPKSH $2,39 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e Zn(II) $2,10 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, DPKSH $2,39 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, ambos em meio de tampão ácido acético/acetato $pH = 4,0$ e de etanol-água 50% (V/V) e caminho óptico de 1,00cm.

Pode-se observar na Figura 6 que o complexo apresenta um máximo de absorvância em 376 nm enquanto o DPKSH apresenta um máximo em 320 nm.

V.1.2 - Espectrofotometria no Infravermelho (IV)

A radiação no IV corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e microondas, sendo a porção de maior utilidade a que está situada entre 4000 e 666 cm^{-1} .

Mesmo moléculas simples podem produzir espectros extremamente complexos e certos grupos de átomos originam bandas que ocorrem em frequências aproximadas possibilitando a obtenção, através de avaliação do espectro e consulta a tabelas ⁽¹³⁷⁾, de informações estruturais úteis para a identificação de substâncias. Essa técnica em conjunto com outras possibilita dados importantes para determinar as estruturas das moléculas ⁽⁷⁷⁾.

Esta técnica foi empregada nesse trabalho com a finalidade de avaliar também os possíveis átomos onde o Zn(II) pode estar coordenado ao DPKSH, porém o espectro obtido, muitas vezes, não permite elucidar totalmente as regiões espectrais características devido à sobreposição de bandas.

Para isso compararam-se os espectros de infravermelho do DPKSH e do complexo Zn(II)/DPKSH representados nas Figuras 7 e 8, respectivamente. A Tabela XIV apresenta os principais números de onda dos grupos característicos do ligante e do complexo.

Figura 7 - Espectro de infravermelho do ligante DPKSH

Figura 8 - Espectro de infravermelho do complexo Zn(II)/DPKSH

Tabela XIV – Número de onda (cm^{-1}) de grupos característicos do ligante DPKSH e do complexo Zn(II)/DPKSH ⁽¹³⁷⁾.

DPKSH	Zn(II)/DPKSH	Grupos Característicos
3365 F	3432 F	ν O-H (fenólico)
3059 F	-	ν N-H (livre); ν C-H (aromático)
1636 F	-	ν C=O (amida I)
1583 M	1593 F	δ N-H (amida II); ν C-C e ν C-N (piridínicos)
1506 f	1513 F	ν C-C; ν C-N (piridínico)
1467 F	1459 F	ν C-C; ν C-N (piridínico)
-	1399 F	ν C-C; ν C-N (piridínico)
1329 f	1323 F	δ O-H (fenólico); ν C-C e ν C-N (piridínicos)
1244 M	1249 M	ν C-O (fenólico)
1155 f	1151 F	ν C-O (fenólico)
1133 F	-	ν C-O (fenólico)
1108 f	1118 f	ν C-O (fenólico)
1086 f	1095 M	ν C-O (fenólico)
905 F	-	δ C-H (fora do plano)
805 F	797 M	δ C-H (fora do plano)
757 M	751 F	δ C-H (fora do plano)
742 F	-	δ C-H (fora do plano)
694 M	697 F	δ C-H (fora do plano)
653 F	655 M	δ C-H (fora do plano)
626 f	621 M	δ C-H (fora do plano)

Comparando-se os espectros e observando-se a Tabela XIV, notam-se diferenças significativas entre o ligante e o complexo de Zn(II). As bandas de alta intensidade devido ao estiramento N-H em 3059 cm^{-1} , deformação do grupo C=O em 1636 cm^{-1} , mais conhecida como banda de amida I, deformação do grupo fenólico C-O em 1133 cm^{-1} , observadas para o ligante, não aparecem para o complexo. A banda em 1583 cm^{-1} para o ligante, denominada amida II, de intensidade média sofre um deslocamento para frequências maiores (1593 cm^{-1}), além de um aumento de intensidade (médio para forte) para o complexo de Zn(II)/DPKSH.

Considerando-se tais observações pode-se sugerir que provavelmente o DPKSH coordena-se ao Zn(II) pelo oxigênio do grupo enólico (banda amida I que não apareceu no complexo) ou do grupo fenólico (C-O, 1133 cm^{-1} , que não apareceu no complexo) e dos nitrogênios de uma das piridinas e da cadeia principal (amida II).

V.1.3 – Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas tem sido utilizada para a caracterização de compostos orgânicos. Nesta técnica faz-se incidir sobre a molécula do composto em estado de vapor um feixe de elétrons com energia de 70 eV provocando a remoção de um elétron e formação de íon molecular ⁽¹³⁷⁾.

Fragmentos iônicos com carga positiva são formados podendo posteriormente clivar produzindo fragmentos menores.

O espectro de massas apresenta as concentrações relativas (abundância) dos fragmentos com carga positiva (incluindo o íon molecular) *versus* as respectivas razões massa/carga.

O pico mais intenso no espectro é chamado de íon base e a este pico atribui-se um valor de 100%. Os outros picos do espectro, inclusive o pico do íon molecular, são registrados como porcentagem do pico do íon base ⁽¹³⁷⁾.

Os espectros de massas do DPKSH e do Zn(II)/DPKSH estão representados nas Figuras 9 e 10, respectivamente e apresentam a abundância em função da razão massa/carga. Além disso os principais fragmentos obtidos estão apresentados na Tabela XV.

Quando comparam-se os principais resultados obtidos nos espectros de massas do complexo e do ligante, e reunidos na Tabela XV, notam-se pequenas diferenças. Em ambos o pico do íon base é referente à razão massa/carga (m/z) = 169 e o pico devido ao íon molecular do ligante em ambos os espectros são praticamente iguais, abundância 5 e 4, respectivamente. Na Figura 10, observa-se a presença do pico m/z = 350, provavelmente, referente ao íon molecular onde z = 2 ($\text{Zn}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2)_2$, 700 g/mol). Além disso, pode-se observar o surgimento do pico m/z = 120, e o desaparecimento de

$m/z = 121$, no complexo, podendo estes estarem relacionados com o fato de o $Zn(II)$ ligar-se ao oxigênio do grupo fenólico (C-O).

Figura 9 – Espectro de massas do ligante DPKSH

Figura 10 – Espectro de massas do complexo Zn(II)/DPKSH

V.1.3.1 - Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray

A espectrometria de massas com ionização por “electrospray” possibilita a análise direta dos íons presentes em uma solução e assim apresenta algumas vantagens, pois muitos analitos de importância biológica não são suficientemente voláteis ou são termicamente instáveis impossibilitando a volatilização antes da ionização, além

disso a amostragem direta na solução proporciona desde o monitoramento de uma reação química até a determinação de um componente traço em fluidos biológicos ⁽¹³⁸⁾.

Tabela XV - Principais fragmentações do DPKSH e seus complexos Zn(II)/DPKSH após serem submetidos a bombardeamento de elétrons.

m/z	DPKSH	[Fragmento] ⁺ (%)	Zn(II)/DPKSH	(%)
318		5		4
197		76		77
169		100		100
156	-	-		2
137		2	-	-
121		11	-	-
120	-	-		14
104		2		1
92		2		4
78		10		16

O processo de ionização por “electrospray” é convenientemente dividido em três etapas: formação das gotas, diminuição da gota e formação do íon gasoso, conforme apresentado na Figura 11 ⁽¹³⁸⁾.

Figura 11 - Produção de gotas na interface “electrospray”. +HV indica “High Voltage”, ou seja, capilar mantido em potencial elevado.

Nessas etapas, inicialmente a solução do analito passa através de um capilar, mantido em um alto potencial; o efeito do campo elétrico na solução produz gotas altamente carregadas e durante essa etapa, ocorre uma diminuição no tamanho das gotas, devido à evaporação do solvente ou explosão de Coulomb (subdivisão de gotas resultante da alta densidade de carga). A contínua diminuição no tamanho da gota (por evaporação ou fissão) pode resultar eventualmente na formação de gotas contendo um íon simples que é então detectado, Figura 11 ⁽¹³⁸⁾.

Com uma solução do complexo, preparada a partir do sal sintetizado, em 40% de etanol e 60% de metanol absolutos obteve-se um espectro no equipamento Platform II da Micromass em altas tensões do capilar e do cone (2,90 e 53 kV, respectivamente), a fim de se obter uma melhor resolução nos picos. No espectro, Figura 12, observam-se vários picos sendo que a razão massa/carga 701u indica a presença do complexo protonado $[\text{Zn}(\text{DPKSH})_2\text{H}]^+$ e, além disso, confirma a composição do complexo Zn(II)/DPKSH com a razão igual a 1:2. A razão massa/carga 723u indica a presença do complexo solvatado, de ocorrência comum na técnica “electronspray”, $\text{Zn}(\text{DPKSH})_1(\text{AcOH})_4(\text{MetOH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ ou $[\text{Zn}(\text{DPKSH})_1(\text{AcOH})_2(\text{MetOH})_5]^+$ pelos solventes (etanol e metanol) e acetato (utilizado como tampão na síntese do complexo). A razão massa/carga 739 u indica a presença da espécie $[\text{Zn}(\text{DPKSH})_2\text{K}]^+$.

Figura 12 - Espectro de massas por *electrospray* do complexo de Zn(II) com DPKSH.

V.1.4 – Análise Térmica

A análise térmica é um grupo de técnicas nas quais as propriedades físicas de uma substância e/ou seus produtos de reação são medidas em função da temperatura.

A fim de avaliar a estabilidade térmica do ligante e do complexo, foram utilizadas a calorimetria diferencial exploratória (DSC) e a análise termogravimétrica (TG).

As curvas DSC do ligante e do complexo foram obtidas em atmosfera de N₂ e estão representadas na Figura 13. A curva DSC do ligante apresenta um pico endotérmico em 179°C correspondendo ao ponto de fusão, com intervalo de fusão (ΔT) de 10°C (169 a 189°C) e uma variação de entalpia (ΔH_f) de 113 J/g. A partir de 297°C onde observam-se os picos exotérmicos sugere-se o início da decomposição do ligante. Com relação à curva de DSC do complexo Zn(II)/DPKSH observa-se um pico endotérmico em 336°C, evidenciando o ponto de fusão do complexo. Como pode-se observar, ocorre um aumento na temperatura de fusão, comparando-se ao ligante, demonstrando um aumento na estabilidade térmica do complexo, com um $\Delta H_f = 60$ J/g. A partir de 391°C observam-se picos exotérmicos sugerindo-se o início da decomposição do complexo.

Figura 13 – Curvas DSC do ligante DPKSH e do complexo Zn(II)/DPKSH em atmosfera de N₂ com vazão de 50,0 mL.min⁻¹, razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, em cápsula de alumínio. Massa do ligante e do complexo igual a 1,365 e 0,9220 mg, respectivamente.

As curvas TG/DTG do ligante e do complexo estão representadas nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

Figura 14 - Curvas TG e DTG do ligante DPKSH em atmosfera de ar com vazão de $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, razão de aquecimento de $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, em cadinho de platina. Massa de DPKSH = 3,134 mg.

Observa-se na Figura 14 que no intervalo de 70 a 160°C houve uma perda de massa atribuída à perda da água na molécula. A decomposição do ligante ocorre em duas etapas consecutivas sendo a primeira rápida no intervalo de temperatura entre 200 e 360°C e a segunda etapa mais lenta iniciando em torno de 360°C . Após isso,

pode-se observar um patamar final com a formação de um resíduo correspondente a 0,29% da massa inicial. O pico da curva DTG encontra-se em 304°C.

Figura 15 - Curvas TG e DTG do complexo Zn(II)/DPKSH em atmosfera de ar com vazão de 50 mL.min⁻¹, razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, em cadinho de platina. Massa do DPKSH = 3,271 mg.

Na Figura 15 a curva TG/DTG do complexo apresenta uma perda de massa pequena no intervalo de 30 a 200°C atribuída à perda de água da molécula. A decomposição do complexo ocorre em duas etapas consecutivas, sendo a primeira no intervalo de temperatura entre 350 a 430°C e o pico da DTG em 383°C. A segunda etapa ocorre de 430 a 730°C, e o pico da DTG em 515°C, seguido pelo estabelecimento de um patamar final com a formação de um resíduo correspondente a 11,1% da massa inicial. A massa residual corresponde ao ZnO e cálculos estequiométricos efetuados considerando-se a proporção metal-ligante 1:2 demonstram que o valor esperado de 11,6% é bastante concordante ao obtido experimentalmente.

V.1.5 – Análise Elementar

Na análise elementar a amostra é colocada numa cápsula de estanho e introduzida num tubo de combustão, na temperatura de 925°C, sob atmosfera de O₂. Durante a combustão formam-se CO₂, H₂O e óxidos de nitrogênio (N_xO_y), que são voláteis, e são arrastados por um fluxo contínuo de He para um tubo de redução de quartzo, preenchido com Cu, que tem a função de reduzir N_xO_y para N₂. O tubo de combustão contém sais de Ag, V e W, que tem a finalidade de reter as outras substâncias formadas durante a combustão ⁽¹³⁹⁾.

Os voláteis CO_2 , H_2O e N_2 passam por uma coluna cromatográfica empacotada com sílica, e são separados por ordem de polaridade $\text{N}_2 < \text{CO}_2 < \text{H}_2\text{O}$, sendo detectados por um detector de condutividade térmica (TCD). A exatidão do método pode ser comprometida caso o carbono não seja totalmente convertido a CO_2 , isto pode ocorrer se houver a formação de algum composto termoestável na temperatura de 925°C , como por exemplo, carbonatos de metal alcalino ⁽¹³⁹⁾.

A fim de obter-se maiores informações sobre a composição dos complexos Zn(II)/DPKSH realizou-se a análise elementar do ligante e do complexo. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela XVI. Para o cálculo teórico considerou-se a massa molar do DPKSH igual a 318,2 g/mol e admitindo razão 1:2 Zn(II)/DPKSH , com massa molar igual a 700,0 g/mol, ou seja fórmula molecular $\text{Zn}(\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2)_2$.

Comparando-se as porcentagens teóricas e experimentais dos elementos do ligante e do complexo na Tabela XVI, verificam-se erros relativamente pequenos. Com relação ao complexo os valores experimentais e teóricos são bastante concordantes, exceto para o hidrogênio, e isto confirma a estequiometria metal:ligante considerada.

Tabela XVI – Análise Elementar do DPKSH e do complexo Zn(II)/DPKSH

DPKSH				Zn(II)/DPKSH		
%	Teórico	Experimental	Erro %	Teórico	Experimental	Erro %
C	67,9	67,7	-0,3	61,7	60,3	-2,3
H	4,34	4,54	3,18	3,71	3,99	-7,55
N	17,6	17,6	-	16,0	15,6	-2,5
O	10,2*	10,1*	-0,6	9,14*	-	-
Zn(II)	-	-	-	9,34*	-	-

* Cálculo por diferença.

V.1.6 – Estequiometria do complexo Zn(II)/DPKSH

Com o intuito de determinar a estequiometria dos complexos utilizaram-se os métodos das variações contínuas e das soluções correspondentes.

V.1.6.1 – Método das variações contínuas

Este método foi desenvolvido por Job ⁽¹⁴⁰⁻¹⁴²⁾ e consiste na medida da absorbância de soluções preparadas de modo que a soma das concentrações (variáveis) do ligante, C_L , e do metal, C_M , é mantida constante. A diferença entre as absorbâncias da solução contendo o íon

metálico e o ligante e a absorbância da solução contendo apenas o ligante é máxima quando:

$$\bar{n} = \frac{X}{1-X} \quad (3)$$

onde, $\bar{n}$ é o número médio de ligantes envolvidos na complexação e X corresponde às frações molares do ligante, X_L , ou do metal, X_M , representadas pelas equações 4 e 5:

$$X_L = \frac{C_L}{C_M + C_L} \quad (4)$$

$$X_M = \frac{C_M}{C_M + C_L} \quad (5)$$

onde C_M e C_L são as concentrações analíticas, respectivamente, do íon metálico e do ligante.

Quando constrói-se uma curva de absorbância em função da fração molar do ligante ou do íon metálico, obtêm-se uma hipérbole de várias ordens, a qual é dependente da estabilidade, estequiometria do complexo formado e das concentrações dos reagentes. Elas podem degenerar em um par de retas e a intersecção do prolongamento destas fornece a fração molar, X , que se relaciona com o número médio de ligantes, $\bar{n}$.

V.1.6.1.1 Determinação de $\bar{n}$ para o sistema Zn(II)/DPKSH

Para isso prepararam-se soluções de Zn(II)/DPKSH em meio de etanol-água 50% (V/V) e *pH* 4,5. Manteve-se constante a soma das concentrações de Zn(II) e DPKSH em $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L. Mediram-se os valores de absorbância em 376 nm com caminho óptico de 1,00 cm.

A Tabela XVII apresenta as proporções das concentrações de Zn(II) e DPKSH utilizadas e as frações molares do ligante.

Tabela XVII – Fração molar de DPKSH e as diferentes concentrações (mol/L) das soluções de Zn(II) e DPKSH.

$$C_{\text{Total}} = C_{\text{DPKSH}} + C_{\text{Zn(II)}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/L.}$$

X_{DPKSH}	$C_{\text{DPKSH}} \times 10^{-5}$	$C_{\text{Zn(II)}} \times 10^{-5}$
0,9	9,0	1,0
0,8	8,0	2,0
0,7	7,0	3,0
0,6	6,0	4,0
0,5	5,0	5,0
0,4	4,0	6,0
0,3	3,0	7,0
0,2	2,0	8,0
0,1	1,0	9,0

A Figura 16 apresenta o gráfico de absorbância *versus* a fração molar do DPKSH.

Figura 16 – Absorbância *versus* fração molar do DPKSH. Caminho óptico 1,00 cm, *pH* 4,5 e comprimento de onda 376 nm.

$$C_{\text{DPKSH}} + C_{\text{Zn(II)}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}. X_{\text{DPKSH}} = C_L / (C_L + C_M)$$

Efetuando-se a regressão linear para as retas designadas 1 e 2, (Figura 16), utilizando-se o “software” Sigma Plot versão 3.0, obtém-se os valores dos coeficientes linear e angular, respectivamente, a_1 e b_1 que são iguais a 0,0274 e 2,08, para a reta 1, e os valores a_2 e b_2 iguais a 4,07 e -3,98, para a reta 2. Estes valores estão relacionados na equação 6:

$$X = \frac{a_2 - a_1}{b_1 - b_2} \quad (6)$$

e possibilitam o cálculo de X no ponto de intersecção das duas retas.

O valor de X é igual a 0,67, e a partir da equação 3 tem-se um $\bar{n}$ igual a 2,03. Este valor indica que a forma predominante do complexo é 1:2 para Zn(II)/DPKSH.

V.1.6.2 – Método das soluções correspondentes

O método das soluções correspondentes foi desenvolvido por Bjerrum e fornece diretamente o número médio de ligantes, $\bar{n}$, e a concentração de ligante livre, [L], sem que se conheça o número de espécies complexas nem as suas absortividades. Na verdade o que se conhece é a absortividade molar média, $\bar{\epsilon}$ ⁽¹⁴³⁾.

Diz-se que as soluções são correspondentes porque apresentam concentrações analíticas do metal, C_M , e do ligante, C_L , diferentes, mas a concentração de ligante livre, $[L]$, e o número médio de ligantes, $\bar{n}$, são iguais para cada absorvidade molar média, $\bar{\epsilon}$ ⁽¹⁴³⁾.

O método de Bjerrum, além de fornecer uma idéia da estequiometria dos complexos, permite também conhecer os valores das constantes de estabilidade individuais sucessivas, K_n , e globais, β_n , além de calcular os valores das absorvidades molares, ϵ_n , das espécies existentes no sistema estudado ⁽¹⁴³⁾.

Para determinar a estequiometria do complexo Zn(II)/DPKSH pelo método das soluções correspondentes, foram preparadas três séries das soluções fixando a concentração das soluções de Zn(II) em $(1,10; 1,52 \text{ e } 2,01) \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, variou-se a concentração das soluções de DPKSH entre $(0,170 \text{ e } 5,00) \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Todas as soluções de medida foram preparadas em meio de etanol-água 50% (V/V) e pH 4,5 (ácido acético/acetato).

Mediram-se os valores de absorvância em 376 nm utilizando um caminho óptico de 1,00 cm. Os valores de absorvância foram utilizados para o cálculo das absorvidades molares médias, $\bar{\epsilon}$, utilizando a equação (7):

$$\bar{\epsilon} = \frac{A^{376\text{nm}}}{C_M} \quad (7)$$

Este processo foi efetuado para as três soluções de Zn(II) e com os valores obtidos, construíram-se as curvas $\bar{\epsilon}$ versus C_{DPKSH} que estão apresentadas na Figura 17.

Figura 17 – Absortividade molar média $\bar{\epsilon}$, em 376 nm, versus concentração analítica do DPKSH ($0,170$ a $5,00 \times 10^{-5}$ mol/L) em meio de 50% de etanol e pH 4,5 de soluções contendo; (1,10; 1,52 e 2,01) $\times 10^{-5}$ mol/L de Zn(II). Caminho óptico de 1,00 cm.

As curvas obtidas foram ajustadas no intervalo de concentração da solução de DPKSH de $(0,330 \text{ a } 3,30) \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ seguindo equações de terceira ordem para as soluções de Zn(II) $1,10$ e $2,01 \times 10^{-5}$ e quarta ordem para Zn(II) $1,52 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

A partir dessas equações geraram-se os valores de C_{DPKSH} em intervalos pequenos, relativos aos valores de $\bar{\epsilon}$ muito próximos. Assim, escolheram-se 34 pontos de $\bar{\epsilon}$ e, para cada um deles, os valores de C_{DPKSH} relativos às três concentrações de Zn(II) utilizadas definem uma reta (C_{DPKSH} versus $C_{\text{Zn(II)}}$). Os coeficientes angular e linear de cada reta fornecem, respectivamente, os valores de $\bar{n}$ e $[\text{DPKSH}]$, de acordo com a equação (8), onde $[L]$ representa a concentração de ligante livre.

$$\bar{n} = \frac{C_L - [L]}{C_M} = \frac{[L]_{\text{coordenado}}}{C_M} \quad (8)$$

Nestas curvas os valores dos coeficientes de correlação variaram de 0,9872 a 1,000.

Construiu-se uma curva de $1/\bar{n}$ versus $[\text{DPKSH}]$ que está representada na Figura 18 e corresponde à curva de formação das espécies.

Figura 18 – Curva de formação do complexo Zn(II)/DPKSH em meio de etanol-água 50% (V/V) e pH 4,5. Os valores de $\bar{n}$ experimentais estão representados por ▲ e a linha contínua os valores de $\bar{n}$ calculados.

A partir das características estruturais do ligante e com base em outras técnicas analíticas que foram utilizadas para a caracterização do complexo Zn(II)/DPKSH (TG e massas por “electrospray”), considerou-se que o número de coordenação é no máximo igual a 2 para o complexo Zn(II)/DPKSH. Desta maneira, a relação entre os valores $1/\bar{n}$ e as respectivas $[DPKSH]$, deve ser restrita a β_1 e β_2 . Os

equilíbrios (4) e (5), onde para simplificação foram omitidas as cargas, representam a formação das duas espécies.

$$\beta_1 = K_1 = [\text{ZnDPKSH}]/[\text{Zn}] [\text{DPKSH}]$$

$$\beta_2 = K_1.K_2 = [\text{ZnDPKSH}_2]/[\text{Zn}] [\text{DPKSH}]^2$$

Assim utilizando o *Software Sigma Plot* e a equação (9):

$$\frac{1}{n} = \frac{1 + \beta_1[\text{L}] + 2\beta_2[\text{L}]^2}{\beta_1[\text{L}] + 2\beta_2[\text{L}]^2} \quad (9)$$

calcularam-se os valores de β_1 e β_2 $(1,07 \pm 0,02) \times 10^5$ e $(1,0500 \pm 0,0003) \times 10^{10}$, respectivamente.

A partir da equação 10 e considerando-se os dados da absorvidade molar média, concentração de ligante livre e as constantes globais de formação dos complexos Zn(II)/DPKSH, pode-se calcular os valores de absorvidades molares individuais dos complexos.

$$\frac{\epsilon}{\epsilon_0} = \frac{\epsilon_0 + \epsilon_1\beta_1[\text{L}] + \epsilon_2\beta_2[\text{L}]^2}{1 + \beta_1[\text{L}] + \beta_2[\text{L}]^2} \quad (10)$$

Encontraram-se os valores de ϵ_1 e ϵ_2 iguais a $(1,1 \pm 0,3) \times 10^4$ e $(4,5 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, respectivamente. O valor de ϵ_0 foi

considerado igual a zero, pois corresponde à absorvidade molar em 376nm do Zn(II) em meio de 50% de etanol e pH 4,5.

V.1.7 – Diagrama de distribuição das espécies presentes no sistema Zn(II)/DPKSH.

Utilizando os valores de β_1 e β_2 construiu-se um diagrama de distribuição das espécies Zn(II), Zn(II)DPKSH e Zn(II)(DPKSH)₂, que está representado na Figura 19.

Figura 19 – Diagrama de distribuição das espécies Zn(II), Zn(II)DPKSH e Zn(II)(DPKSH)₂ no sistema Zn(II)/DPKSH.

V.1.8 - Estudo da Solubilidade do DPKSH em Etanol

Como citado inicialmente, o DPKSH é pouco solúvel em água, porém apresenta maior solubilidade em solventes orgânicos como por exemplo etanol, clorofórmio, benzeno e outros, sendo assim resolveu-se estudar a relação existente entre a concentração de DPKSH e sua solubilidade, utilizando-se como solvente o etanol, devido à menor toxidez e volatilidade. Para isso prepararam-se soluções de DPKSH em diferentes concentrações (g.L^{-1}) em 100% de etanol e um branco contendo 100% de etanol. Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro Hitachi U-3000 e estão representados na Figura 20.

As leituras de absorbância foram realizadas em 320 nm, pois este comprimento de onda corresponde ao máximo de absorbância da solução de DPKSH. Pode-se observar na Figura 20 que com o aumento da concentração ocorre um aumento de absorbância.

Figura 20 - Espectros das soluções de DPKSH em diferentes concentrações em 100 % de etanol e caminho óptico de 1,00 cm. (a) 4,28; (b) 7,60; (c) 10,9; (d) 12,7; (e) 16,3 e (f) 22,7 g.L⁻¹.

A relação existente entre a absorbância de cada solução de DPKSH em 320nm e a respectiva concentração está representada na Figura 21. Observa-se, nesta figura, uma mudança de comportamento a partir da concentração 12,7g.L⁻¹. Este comportamento está relacionado à incompleta dissolução do DPKSH que foi observada no preparo das

soluções. O aumento de absorbância neste caso deve-se ao fato de não existir mais uma solução verdadeira.

Figura 21 - Absorbância em 320 nm *versus* concentração das soluções de DPKSH em 100% de etanol e caminho óptico de 1,00cm.

A intersecção das duas retas representadas na Figura 21 mostra um valor correspondente a concentração de DPKSH igual a 11,0 g.L⁻¹. Considerando-se, então, que este valor corresponde a uma estimativa da solubilidade do DPKSH em etanol absoluto, que também pode ser expressa como 0,0346 mol.L⁻¹.

V.2 – Desenvolvimento do Método Espectrofotométrico em Condição Estacionária para Determinação de Zn(II) Utilizando o DPKSH

Para o desenvolvimento do método em condição estacionária algumas etapas experimentais foram efetuadas com o objetivo de estabelecer condições ótimas de trabalho. Parâmetros analíticos como porcentagem de etanol, influência do pH (ligante e complexo), razão ligante/metálico e ordem de adição dos reagentes foram estudados ⁽¹⁴⁴⁾. Construiu-se a curva analítica com todos esses parâmetros ajustados e aplicou-se o método desenvolvido em amostras reais.

V.2.1 - Característica espectral do complexo Zn(II)/DPKSH em diferentes porcentagens de etanol

Devido à baixa solubilidade do DPKSH em água utiliza-se como solvente o etanol, sendo assim foi necessário estudar qual o comportamento do complexo Zn(II)/DPKSH em diferentes porcentagens desse solvente. Prepararam-se soluções na respectiva ordem de adição Zn(II) $2,10 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, DPKSH $2,39 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, tampão ácido acético/acetato ($\text{pH}=4,0$) em etanol-água na proporção de 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 % (V/V). Esta ordem de adição foi baseada em trabalho desenvolvido por Suárez-Iba *et al* ⁽¹¹⁹⁾ e este parâmetro

será posteriormente apresentado. As soluções de referência foram preparadas a partir do DPKSH $2,39 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, tampão ácido acético/acetato ($pH=4,0$) em etanol-água na proporção de 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 % (V/V). Os espectros obtidos estão representados na Figura 22.

Figura 22 - Espectros de absorbância *versus* comprimento de onda das soluções de $Zn(II)$ $2,10 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e DPKSH $2,39 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em $pH=4,0$ em diferentes porcentagens de etanol: (a) 10; (b) 20; (c) 30; (d) 40; (e) 50; (f) 60 e (g) 70 % de etanol-água (V/V). Caminho óptico de 1,00 cm.

Na Figura 22 observa-se que com o aumento da porcentagem de etanol ocorre um aumento na absorbância e também um deslocamento da banda de absorção para comprimentos de onda maiores, provocado provavelmente pela mudança na esfera de solvatação do complexo devido ao aumento da fração de etanol.

Os valores de absorbância foram obtidos em 376nm, pois conforme observa-se na Figura 6, apresentada anteriormente, este corresponde ao comprimento de onda de máxima absorbância do complexo Zn/DPKSH.

Considerando-se que a partir de 40% não se observa variação tão significativa, resolveu-se utilizar 50% de etanol para evitar prováveis perdas por evaporação e considerando-se que outros estudos que envolvem o DPKSH e outras hidrazonas vêm utilizando esta porcentagem de etanol, facilitando assim futuras comparações ⁽¹¹⁶⁻¹²⁷⁾.

V.2.2 – Características espectrais da di-2-piridil cetona saliciloilhidrazona (DPKSH) em função da acidez do meio

A investigação das características do ligante frente a diferentes valores de *pH* torna-se de grande importância pois posteriormente foi efetuado um estudo do efeito desse na formação do complexo Zn(II)/DPKSH.

Para isso, prepararam-se soluções de DPKSH $2,38 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e adicionou-se 1 mL de diferentes tampões. Os tampões utilizados foram: ácido cloroacético/cloroacetato (para valores de *pH* 2,2; 3,1 e 3,4), ácido acético/acetato (para valores de *pH* 4,2; 4,5 e 4,9), acetato de amônio (para valores de *pH* 6,5) e Tris/HTris⁺ (para valores de *pH* 8,0 e 9,0) em meio de etanol-água 50% (V/V). As soluções de referência foram preparadas a partir dos tampões ácido cloroacético/cloroacetato, ácido acético/acetato, acetato de amônio e Tris/HTris⁺ em meio de etanol-água 50% (V/V). Os espectros obtidos estão representados na Figura 23.

Pode-se observar na Figura 23 que em valor de *pH* 2,2 o espectro do DPKSH apresenta características espectrais diferentes daqueles com valores de *pH* entre 3,1 e 4,9. Observa-se em valores de *pH* a partir de 6,5 novamente uma mudança espectral. Deve-se considerar que em valores de *pH* na faixa alcalina ocorre um aumento da banda entre 350 e 400 nm, fato que deve ser considerado pois o complexo Zn(II)/DPKSH apresenta máximo de absorbância em 376 nm.

Figura 23 - Espectros das soluções de DPKSH $2,38 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ em etanol-água 50% (V/V), caminho óptico de 1,00cm e diferentes valores de *pH* (a) 2,2; (b) 3,1; (c) 3,4; (d) 4,2; (e) 4,5; (f) 4,9; (g) 6,5, (h) 8,0 e (i) 9,0.

V.2.3 - Característica Espectral do Complexo Zn(II)/DPKSH em função da acidez do meio

O efeito do *pH* sobre o complexo Zn(II)/DPKSH é um parâmetro muito importante para o desenvolvimento do método analítico, pois indica a melhor faixa de *pH* para a formação do complexo.

Prepararam-se soluções com a seguinte ordem de adição Zn(II) $2,36 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹, DPKSH $2,38 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹, tampões ácido cloroacético/cloroacetato (*pH* 2,2; 3,1 e 3,4), ácido acético/acetato (*pH* 4,0; 4,5 e 4,9), acetato de amônio (*pH* 5,5 e 6,0) e em meio de etanol-água 50% (V/V). As soluções de referência foram preparadas a partir de DPKSH $2,38 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹, tampões ácido cloroacético/cloroacetato, ácido acético/acetato, acetato de amônio e em meio de etanol-água 50% (V/V). Os espectros obtidos estão representados na Figura 24.

Na Figura 24 observa-se que em valor de *pH* 2,2 a formação do complexo é desfavorável, acredita-se que isto seja devido à protonação de uma das piridinas presentes na molécula do ligante, um dos pontos de coordenação; já em valores de *pH* a partir de 3,1 observa-se um aumento significativo nos valores de absorbância, porém a partir de valores de *pH* 5,5 ocorre uma diminuição.

Figura 24 - Espectros dos complexos Zn (II) $2,36 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, DPKSH $2,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em 50% de etanol, caminho óptico de 1,00cm e em diferentes valores de pH (a) 2,2; (b) 3,1; (c) 3,4; (d) 4,0; (e) 4,5; (f) 4,9; (g) 5,5 e (h) 6,0

A relação existente entre esses parâmetros está melhor representada na Figura 25. A partir dessas observações resolveu-se ajustar o valor de pH em 4,5 com tampão de ácido acético/acetato.

Figura 25 - Absorbância em 376 nm da solução de Zn (II) $2,36 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, DPKSH $2,38 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V) *versus* pH. Caminho óptico de 1,00 cm.

V.2.4 - Influência da Concentração do Ligante (DPKSH) na Formação do Complexo

Com a finalidade de avaliar a influência da concentração do ligante realizou-se um estudo do valor de absorbância em função da razão das concentrações de DPKSH/Zn(II).

Prepararam-se soluções na respectiva ordem de adição Zn(II) $2,06 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, DPKSH em diferentes concentrações, tampão ácido

acético/acetato (*pH* 4,5) e 50% de etanol. As soluções de referência foram preparadas a partir de DPKSH (em diferentes concentrações), tampão ácido acético/acetato e em meio de etanol-água 50% (V/V). Os espectros obtidos estão representados na Figura 26.

Figura 26 - Espectros das soluções de $\text{Zn(II)} \ 2,06 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e DPKSH em *pH* 4,5 (ácido acético/acetato), em meio de etanol-água 50% (V/V), caminho óptico de 1,00 cm e diferentes concentrações de DPKSH (a) $2,06 \times 10^{-5}$; (b) $4,06 \times 10^{-5}$; (c) $6,21 \times 10^{-5}$; (d) $1,03 \times 10^{-4}$; (e) $2,06 \times 10^{-4}$ e (f) $3,11 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

Observa-se na Figura 26 que os valores de absorbância em 376nm variam significativamente até uma razão DPKSH/Zn(II) igual a 10 e que acima desta não se observam grandes alterações.

V.2.5 - Influência da Ordem de Adição dos Reagentes

Nesta etapa realizou-se o estudo da estabilidade do complexo Zn(II)/DPKSH em função do tempo em relação à ordem de adição dos reagentes.

Prepararam-se soluções do complexo em diferentes ordens de adição, sendo que as concentrações de Zn(II) e DPKSH foram mantidas constantes como $1,77 \times 10^{-5}$ e $1,77 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, respectivamente, pH 4,5 (ácido acético/acetato) em meio de etanol-água 50% (V/V).

Foram utilizadas oito diferentes ordens de adição e estudou-se o comportamento do complexo por um período de 2 horas. As diferentes ordens e a variação nos valores de absorbância estão representadas na Figura 27.

Figura 27 - Absorbância em 376 nm *versus* para diferentes ordens de adição dos reagentes:

- (a) Zn(II)/DPKSH/etanol/tampão/água; (b) Zn(II)/DPKSH/tampão/etanol/água;
(c) Zn(II)/tampão/DPKSH/etanol/água; (d) DPKSH/tampão/Zn(II)/etanol/água;
(e) tampão/etanol/DPKSH/Zn(II)/água; (f) Zn(II)/etanol/tampão/DPKSH/água;
(g) DPKSH/etanol/tampão/Zn(II)/água; (h) Zn(II)/tampão/água/DPKSH/etanol.

Na ordem de adição (a) observou-se uma variação significativa nos valores de absorbância, (b) os valores de absorbância apresentaram-se menores, porém boa estabilidade; (c) observou-se um aumento de absorbância até um período de 35 minutos e então diminuição no período de 35 a 120 minutos; (d) diminuição nos valores de absorbância após 50 minutos; (e) valores de absorbância bastante estáveis; (f) e (g) aumento dos valores de absorbância a partir de 55 minutos e (h) os valores de absorbância tornaram-se estáveis somente após 25 minutos, representando um tempo relativamente grande. Em função dos resultados obtidos pode-se adotar as ordens de adição (b) ou (e), pois as duas apresentaram absorbâncias bastante estáveis, porém a ordem de adição (b) Zn(II), DPKSH, tampão e etanol foi escolhida por estar sendo utilizada desde o começo dos estudos.

Considerando a melhor ordem de adição dos reagentes preparou-se uma solução de Zn(II) $1,60 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, DPKSH $1,77 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, tampão *pH* 4,5 em 50% de etanol e fez-se um estudo da estabilidade do complexo em um período de 12 horas. A Tabela XVIII apresenta os valores de absorbância em 376 nm com intervalos de 1 em 1 hora.

Tabela XVIII - Valores de absorbância, em 376 nm, em função do tempo, seguindo a ordem de adição: Zn(II) $1,60 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, DPKSH $1,77 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, tampão ácido acético/acetato (pH 4,5) e em meio de etanol-água 50% (V/V).

Tempo (horas)	Absorbância
1	0,754
2	0,754
3	0,750
4	0,750
5	0,750
6	0,750
7	0,750
8	0,751
9	0,752
10	0,752
11	0,753
12	0,754

Observa-se na Tabela XVIII a grande estabilidade do complexo, pois no período de 12 horas a maior variação de absorbância corresponde a 0,26 %.

V.2.6 - Construção da Curva Analítica

A curva analítica foi construída considerando-se todos os parâmetros, ou seja, em meio de etanol-água 50% (V/V), valor de *pH* 4,5 (ácido acético/acetato), razão mínima de ligante/metálico igual a 10 e ordem de adição de reagentes: Zn(II), DPKSH, tampão, etanol e água. Para isso prepararam-se soluções com diferentes concentrações de Zn(II), solução estoque $1,18 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, adicionou-se um volume fixo da solução de DPKSH $2,45 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, mantendo-se a concentração deste em $2,08 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, adicionou-se solução tampão para manter o valor de *pH* em 4,5 e em meio de etanol-água 50% (V/V). As soluções de referência foram preparadas a partir do mesmo volume de DPKSH, tampão e em meio de etanol-água 50% (V/V). As medidas espectrofotométricas foram realizadas em 376 nm utilizando-se caminho óptico de 1,00 cm. A Figura 28 representa a curva analítica do sistema Zn(II)/DPKSH.

Na Figura 28, observa-se através dos resultados obtidos que tem-se uma faixa de linearidade (lei de Beer), para a absorbância em função da concentração de Zn(II), variando-se de $(0,0293 \text{ a } 2,01) \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. O coeficiente linear da reta é $(1,71 \pm 1,16) \times 10^{-3}$, o coeficiente angular, que corresponde à absorvidade molar do complexo é $(4,83 \pm 0,01) \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e o coeficiente de

correlação igual a 0,9999. A equação (11) representa a equação da reta para a curva analítica, Figura 28.

Figura 28 - Curva analítica de Zn(II) em tampão ácido acético/acetato, pH 4,5, em meio de etanol-água 50% (V/V). $C_{DPKSH} = 2,08 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, caminho óptico de 1,00 cm, comprimento de onda de 376 nm.

$$A = 1,71 \times 10^{-3} + 4,83 \times 10^4 \times C_{Zn(II)} \quad (11)$$

Para a determinação do limite de detecção do método, foram preparadas soluções com DPKSH, mantendo-se a concentração igual a $2,08 \times 10^{-4}$ mol/L, tampão ácido acético/acetato e em meio de etanol-água 50% (V/V). As soluções de referência foram preparadas da mesma forma. Efetuou-se este procedimento por dez vezes e mediu-se a absorbância destas soluções, branco contra branco, em 376 nm e os valores de absorbância estão apresentadas na Tabela XIX.

Tabela XIX - Valores de absorbância em 376 nm das soluções contendo DPKSH, tampão ($pH = 4,5$), etanol absoluto e água desionizada.

Solução	Absorbância
1	0,004
2	-0,001
3	-0,001
4	-0,001
5	-0,002
6	-0,001
7	0,001
8	-0,005
9	0,000
10	-0,004
	média = 0,002
	desvio padrão = 0,002

Multiplicando-se o valor do desvio padrão por três e dividindo-se pelo coeficiente angular da curva analítica ($4,83 \times 10^4$) obteve-se um limite de detecção igual a $1,24 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ ^(145,146).

V.2.7 - Influência de Diversos Íons sobre as Medidas Espectrofotométricas do Complexo Zn(II)/DPKSH

Para o estudo de interferência na determinação de Zn(II), nas mesmas condições de obtenção da curva analítica, foram avaliados 43 íons. Porém, previamente, realizou-se o estudo da repetibilidade e para isso selecionou-se um ponto na curva analítica, Figura 28. Prepararam-se soluções com Zn(II) mantendo a concentração igual a $9,28 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, DPKSH com concentração igual a $2,08 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, tampão ácido acético/acetato *pH* 4,5, e em meio de etanol-água 50 % (V/V). As soluções de referência foram preparadas a partir do DPKSH, tampão e em meio de etanol-água 50% (V/V).

O procedimento acima descrito foi efetuado nove vezes e a absorbância foi medida em 376 nm. A média e o desvio padrão igual desses valores resultaram em $0,449 \pm 0,003$. Para a avaliação dos interferentes o desvio padrão apresentado foi multiplicado por 3⁽¹⁴⁶⁾, sendo igual a 0,009 (2%). A partir disso concluiu-se que valores de absorbância com diferença (positiva ou negativa) superior a 2,0%, após a adição do íon em estudo, representavam interferência.

Iniciou-se assim o estudo dos interferentes e para isso diversos cátions na forma de nitratos, cloretos e sulfatos e ânions de sais de sódio ou potássio foram adicionados individualmente. As soluções foram preparadas mantendo-se as concentrações de Zn(II) $9,28 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e DPKSH $2,08 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, adicionando-se tampão ácido acético/acetato, o interferente e em meio de etanol-água 50 % (V/V). As soluções de referência foram preparadas mantendo-se a concentração de DPKSH $2,08 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, adicionando-se tampão e em meio de etanol-água 50 % (V/V). A Tabela XX e a Figura 29 apresentam o limite de tolerância dos íons estudados, bem como a porcentagem de interferência sobre o sistema Zn(II)/DPKSH, respectivamente.

Como pode-se observar na Figura 29 alguns cátions, como Cu^{2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$, Ni^{2+} , entre outros, interferem em baixas concentrações nas proporções de 83, 41, 11 e 360%, respectivamente. Estes devem estar ausentes ou serem eliminados para aplicação do método proposto em amostra reais. Outros como Hg^{2+} e Pb^{2+} também interferem em baixas concentrações, nas proporções de 81 e 26%, respectivamente, porém não observa-se a presença destes em preparações farmacêuticas e amostras biológicas ou suas ordens de grandeza em relação ao íon Zn^{2+} são muito menores. A interferência destes cátions é atribuída à

formação de complexos coloridos com o DPKSH na mesma região espectral de estudo.

Tabela XX - Limite de Tolerância dos íons estudados sobre o complexo Zn(II)/DPKSH. Concentrações de Zn(II) $9,28 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹, DPKSH $2,08 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, tampão ácido acético/acetato pH 4,5 e em meio de etanol-água 50 % (V/V).

Limite de Tolerância (íon/Zn(II))	Interferentes
10.000	I ⁻ , Br ⁻ , F ⁻ , Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , SCN ⁻ , Propionato, Acetato e Tiouréia
1000	Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Ba ²⁺ , AsO ₃ ⁻ , Gluconato, HCO ₃ ⁻⁽¹⁾ , NH ₄ ⁺ , HPO ₄ ²⁻⁽²⁾ , SO ₃ ²⁻⁽³⁾ , BO ₃ ³⁻⁽⁴⁾ e B ₄ O ₇ ²⁻
100	SO ₄ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , Tartarato, Ácido Ascórbico, PO ₄ ³⁻⁽⁵⁾ e CO ₃ ²⁻⁽⁶⁾
10	Cr ³⁺
1	Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Hg ²⁺ , Ni ²⁺ , Mn ²⁺ , Al ³⁺ , Pb ²⁺ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Sn ²⁺ e C ₂ O ₄ ²⁻

As espécies predominantes, em função do pH, são: (1 e 6) CO₂ aquoso; 2 e 5) H₂PO₄⁻; (3) HSO₃⁻ e (4) H₃BO₃

Com relação aos ânions como, por exemplo, oxalato observa-se que este interfere na razão interferente/Zn(II) 1:1, isto é atribuído ao fato de ocorrer uma concorrência entre o DPKSH e o oxalato para complexar o Zn(II).

Figura 29 - Porcentagem de interferência do íons estudados *versus* a razão interferente/Zn(II). Sendo Gluc. (gluconato), ác asc. (ácido ascórbico), prop. (propionato) e Ac⁻ (acetato). Seta vermelha indica o eixo da ordenada da esquerda e a preta a da direita.

Outros íons de bastante importância não apresentam interferência até um limite de tolerância de 10.000 vezes em relação à concentração de Zn(II), porém devem ser sempre considerados. Os cátions Na^+ e K^+ não apresentaram interferência, assim como o ânion formiato.

V.2.7.1 – Eliminação da Interferência dos Íons Fe(III) e Cu(II)

A interferência dos íons Cu(II) e Fe(II) e (III) apresentaram-se significativas, Tabela XX, na proporção 1:1 (íon/Zn(II)). Devido ao fato desses serem encontrados em preparações farmacêuticas e em amostras biológicas, por apresentarem funções vitais em sistemas biológicos, devem ser previamente eliminados para a aplicação dos métodos espectrofotométricos em condições estacionária e em fluxo.

Para a eliminação do Fe um dos reagentes mascarantes mais utilizados é o fluoreto, pois forma complexos muito estáveis com o Fe(III) $[\text{FeF}_6]^{3-}$ sendo β_6 igual a $1,26 \times 10^{16}$ ⁽¹⁴⁷⁾.

Além do fluoreto pode-se utilizar também o tartarato, principalmente quando a amostra apresenta em sua composição íons como o Ca^{2+} que precipitam como fluoreto de cálcio. A constante do complexo de Fe(III) com tartarato é β_1 igual a $3,09 \times 10^7$ ⁽¹⁴⁷⁾.

Encontrou-se em literatura⁽⁹²⁾ a utilização da tiouréia como reagente mascarante de Cu(II) na determinação de Zn(II).

O comportamento da tiouréia (TU) em presença de soluções aquosas acidificadas resulta na formação de complexos do tipo Cu(I)/TU. O potencial redox do sistema Cu(II)/Cu(I),TU, em equilíbrio obedece a equação (12) ⁽¹⁴⁸⁾:

$$E = E^{\circ}_{\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}} + 0,05916 \log \frac{[\text{Cu}^{2+}]}{[\text{Cu}^{+}]} = E^{\circ}_{\text{dsf}^{2+}/\text{TU}} + 0,05916 \log \frac{[\text{dsf}^{2+}]^{1/2}}{[\text{TU}]} \quad (12)$$

onde dsf^{2+} é o dissulfeto de formamida, produto da oxidação de TU.

As semi-reações de redução em meio de ácido perclórico 1 mol/L são:

A comparação desses potenciais indica que a redução de Cu(II) a Cu(I) ocorre somente porque a tiouréia forma complexos muito estáveis com Cu(I) sendo as constantes $\beta_1 = 1,6 \times 10^{10}$, $\beta_2 = 1 \times 10^{13}$, $\beta_3 = 7,9 \times 10^{15}$ e $\beta_4 = 1,3 \times 10^{18}$ ⁽¹⁴⁸⁾.

Considerando-se esses aspectos, foram realizados estudos para a eliminação da interferência do Cu(II) utilizando a tiouréia. Assim, foi avaliada a razão mínima de tiouréia/Zn(II) que pode ser adicionada para mascarar a presença do Cu(II). A Figura 30 apresenta os valores de absorbância em 376 nm para soluções preparadas a partir Zn(II), Cu(II), tiouréia 5%, DPKSH $2,40 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, tampão ácido acético/acetato ($pH = 4,5$) em meio de etanol-água 50% (V/V).

Na Figura 30 o símbolo em vermelho indica o valor de absorbância em 376 nm da solução preparada com Zn(II) $4,44 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹; os símbolos em preto representam as soluções preparadas na proporção 1:1 Zn(II)/Cu(II) $4,44 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ e o símbolo em azul a solução preparada na proporção 1:2 Zn(II)/Cu(II) $4,44 \times 10^{-6}/8,88 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹.

Pode-se concluir que para eliminar a interferência do Cu(II) em uma amostra contendo uma razão de Cu(II)/Zn(II) igual a 2 deve-se adicionar no mínimo uma razão Tiuréia/Zn(II) de 4000 vezes, o que se torna bastante conveniente, pois como observa-se na Tabela XX a tiouréia apresentou interferência na formação do complexo Zn(II)/DPKSH na proporção de 10.000 vezes.

Figura 30 - Absorbância, em 376 nm, *versus* a razão Tiouréia/Zn(II), Zn(II) $4,44 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹, Cu(II) ($4,44$ e $8,88 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹), tiouréia 5%, DPKSH $2,40 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, tampão ácido acético/acetato ($pH = 4,5$) e em 50% de etanol. Caminho óptico de 1,00 cm. Os símbolos preto Zn/Cu; vermelho Zn e azul Zn/Cu (1:2).

V.2.8 – Preparo das Soluções Amostra

Com a finalidade de determinar Zn(II) em diferentes tipos de amostra (líquida originalmente ou após abertura) deve-se considerar inicialmente a alíquota desta, que será dependente da concentração de Zn(II), ou seja deve-se obedecer a faixa de linearidade da curva analítica, $(0,0293 \text{ a } 2,01) \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (Figura 28).

Retira-se uma alíquota da amostra, adiciona-se solução de DPKSH para resultar $2,01 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ (razão L/M = 10, no mínimo) e tampão ácido acético/ acetato até valor de pH = 4,5. Em alguns casos torna-se necessário um ajuste parcial prévio de pH (próximo ao valor desejado) com soluções de HCl ou NaOH, de forma a evitar grande excesso de íons acetato, presentes no tampão. Finalmente, adiciona-se volume de etanol absoluto e água desionizada suficiente para manter o meio em etanol-água 50% (V/V).

A solução de referência deve ser preparada adicionando-se todos os reagentes com exceção da amostra.

Quando a amostra apresentar uma concentração de Zn(II) menor que $2,93 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ é possível utilizar a técnica da adição de padrão, considerando-se a razão ligante/metálico; valor de pH = 4,5 e o meio etanol-água 50% (V/V).

No caso da presença de íons ou espécies interferentes ao método, os mesmos devem ser mascarados.

V.2.9 - Aplicação do Método Estacionário Desenvolvido em Preparações Farmacêuticas

A fim de avaliar o método proposto realizou-se a análise de oito preparações farmacêuticas que apresentam composições diferentes: Colírios (A) e (B), Talco Anti-séptico (C), Solução Adstringente (D), Pomada para Assaduras (E), Solução Injetável e Sublingual de Gluconato de Zn (F), e de Gluconato de Zn e Cu (G) e Comprimido de Gluconato de Zn (H). A abertura das amostras, quando necessária, foi efetuada conforme apresentado no Capítulo IV - Parte Experimental.

Com a finalidade de exemplificar o preparo das soluções amostra, para efetuar as medidas de absorbância em 376 nm, apresenta-se na Tabela XXI os volumes de todas as soluções dos reagentes adicionados: DPKSH $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, tampão ácido acético/acetato, etanol absoluto e também das respectivas preparações farmacêuticas.

As soluções de referência foram preparadas adicionando-se todos os reagentes com exceção das alíquotas das preparações.

Para todas as amostras, as medidas de absorbância foram realizadas para três soluções, preparadas da mesma forma, em 376 nm e o cálculo das concentrações foi realizado utilizando-se a equação 11 (pág. 104).

Tabela XXI - Volumes das soluções dos reagentes adicionados para o preparo das soluções amostra. Em todas completou-se o volume com água desionizada para um balão volumétrico de 10 mL. P.F. preparação farmacêutica e [HAc] e [Ac⁻] são as concentrações do tampão ácido acético/acetato nas soluções amostra.

P.F	Amostra	DPKSH	Tampão	[HAc]	[Ac ⁻]	Etanol
	(μL)	(mL)	(μL)	(mol.L ⁻¹)		(mL)
(A)	70	0,5	300	0,06	0,03	4,5
(B)	90	0,8	50	0,01	0,005	4,2
(C)	74	0,5	500	0,1	0,05	4,5
(D)	20	1,0	500	0,1	0,05	4,0
(E)	40	1,0	500	0,1	0,05	4,0
(F)	100	0,8	10	0,002	0,001	4,2
(G)*	100	0,8	10	0,002	0,001	4,2
(H)	61	0,8	50	0,01	0,005	4,2

* adicionou-se uma alíquota de 260 μL da solução de Tiouréia 5%, para eliminar a interferência do Cu(II) presente na preparação farmacêutica.

Os valores da concentração de Zn(II) para todas as amostras, bem como os valores do desvio padrão estão apresentados na Tabela XXII.

Tabela XXII - Concentração de Zinco* em Preparações Farmacêuticas a partir do método espectrofotométrico em condição estacionária e erro relativo (E.R.) a formulação.

Preparação Farmacêutica	Concentração Zn(II) (mg)	Estimativa do Desvio Padrão ($\pm$)	E.R. (%)
(A)			
Zn[C ₆ H ₄ (OH)SO ₃] ₂ . 8 H ₂ O	1,01	0,01	-
(B) ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,28	0,02	-
(C) ZnO**	10,6	0,1	-10
(D) ZnO***	436	2	-
(E) ZnO	157,1	0,2	4,7
(F) Zn(II)	0,0645	0,0005	-4,3
(G) Zn(II)	0,0654	0,0002	-3,0
(H) Zn(II)	95,8	0,2	-4,2

* triplicata, ** g, *** mg.L⁻¹

Pode-se observar na Tabela XXII que, com exceção da amostra (C) os erros relativos ao indicado nas preparações farmacêuticas ficaram abaixo de 5%, ou seja considera-se o método espectrofotométrico estacionário desenvolvido qualificado para a determinação de Zn(II) nestes tipos de amostras.

Para a amostra (C) resolveu-se eliminar qualquer dúvida com relação ao resultado obtido, assim realizou-se o método de adição de padrão. Para isso foram adicionados a 74 μL da amostra da preparação farmacêutica os mesmos volumes das soluções de DPKSH, tampão e etanol absoluto indicados anteriormente, Tabela XXI, porém volumes crescentes (300, 500 e 740 μL) da solução padrão de Zn(II) $2,04 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

A curva de adição de padrão está representada na Figura 31. O primeiro ponto desta curva representa à absorbância da amostra, sem a adição de padrão. Os coeficientes angular e linear são $(4,50 \pm 0,01) \times 10^4$ e $0,249 \pm 0,001$, respectivamente. Realizando-se os devidos cálculos obtém-se a quantidade de óxido de zinco igual a $12,1 \pm 0,1 \text{ g}$. Com este resultado observa-se que utilizando o método de adição de padrão obteve-se um erro relativo de 2,7%, bem menor daquele apresentado na Tabela XXII.

Figura 31 - Curva de absorvância, 376nm, *versus* concentração de Zn(II) 0,621, 1,02 e 1,51x10⁻⁵ mol.L⁻¹, DPKSH 2,40x10⁻³ mol.L⁻¹, pH 4,5 (ácido acético/acetato), em meio de etanol-água 50% (V/V) e caminho óptico de 1,00 cm.

V.2.9.1 - Determinação de Zinco, nas Preparações Farmacêuticas, Utilizando a Técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (EAA)

Com a finalidade de comparar os resultados do método espectrofotométrico em condição estacionária na determinação da concentração de zinco, nas preparações farmacêuticas, utilizou-se a técnica de absorção atômica com chama, amplamente utilizada nos laboratórios de controle de qualidade.

Para isso prepararam-se cinco soluções padrão de Zn(II), com as respectivas concentrações 0,500, 0,750, 1,00, 1,25 e 1,75 mg.L⁻¹, a partir de uma solução estoque de Zn(NO₃)₂ 772 mg.L⁻¹.

Na Figura 32 apresenta-se a curva analítica do Zn(II), sendo os coeficientes angular, linear e de correlação iguais a 0,110, $-2,80 \times 10^{-3}$ e 0,9993, respectivamente.

A Tabela XXIII apresenta os resultados obtidos para as oito preparações farmacêuticas utilizando essa técnica e o método espectrofotométrico em condição estacionária, bem como os devidos erros relativos.

Figura 32 - Curva de absorvância *versus* concentração de Zn(II), 0,500, 0,750, 1,00, 1,25 e 1,75 mg/L. Parâmetros instrumentais: comprimento de onda 214 nm, fenda de 4 nm, chama de ar-acetileno e a corrente da lâmpada de cátodo ôco de 15 a 20 mA.

Pode-se observar na Tabela XXIII, com exceção de três amostras, que os erros relativos são menores que 4,0 % demonstrando uma grande concordância entre esses. Com relação aos erros iguais ou maiores que 12 % pode-se atribuir à presença de espécies químicas, como fenosulfonato e sulfato que podem ocasionar um aumento de

absorbância na técnica de absorção atômica devido ao efeito de matriz, que parece ser mais pronunciado na amostra (A). A amostra (G) apresentou um erro relativo de 12% que pode ser atribuído à presença de uma maior quantidade de gluconato, pois em literatura não é apresentada a interferência espectral de cobre na linha de emissão do zinco ⁽¹⁴³⁾.

Tabela XXIII – Comparação das concentrações de Zinco determinadas nas amostras pelo método espectrofotométrico em condição estacionária (1) e absorção atômica (2).

Preparação Farmacêutica	(1)	(2)	Erro
Composição relativa Zn	mg	mg	Relativo (%)
(A)			
Zn[C ₆ H ₄ (OH)SO ₃] ₂ . 8 H ₂ O	1,0	1,2	-17
(B) ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,3	0,3	-
(C) ZnO*	12,1	12,2	-1,4
(D) ZnO**	436	437	-0,2
(E) ZnO	157	155	1,3
(F) Zn(II)	0,0645	0,0668	-3,4
(G) Zn(II)	0,0654	0,0747	-12
(H) Zn(II)	95,8	109	-12

* g, **mg/L

A partir dos resultados pode-se concluir que o método proposto é altamente qualificado para a determinação de zinco em amostras de medicamento, frente a outros propostos em literatura. Pode ser utilizado como método alternativo, eliminando um número considerável de etapas (extração) e alto custo (absorção atômica).

V.2.10 - Determinação da Concentração de Zn(II) em Amostras Biológicas Utilizando o Método Espectrofotométrico em Condição Estacionária.

Para isso selecionaram-se as amostras de fezes suplementada A (S), tibia e rim não suplementados (NS), Tabela X (pág. 53).

Para a amostra de fezes utilizou-se o método de adição de padrão e a curva foi construída preparando-se soluções a partir de: 1 mL da amostra de fezes, 44,6; 74,4 e 124 μL da solução padrão de Zn (II) $6,37 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, 190 μL da solução de tiouréia 5% para eliminar a interferência do Cu(II), 240 μL da solução de fluoreto de sódio $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ para eliminar a interferência dos íons Fe(III), 1 mL da solução de DPKSH $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 1 mL do tampão ácido acético/acetato ($pH = 4,5$), 4mL de etanol absoluto e completou-se o volume para um balão volumétrico de 10 mL com água desionizada. As soluções de referência foram preparadas a partir da adição de todos os reagentes com exceção das soluções da amostra e do padrão de Zn(II).

A Figura 33 apresenta a curva de adição de padrão, sendo que o primeiro ponto corresponde à absorbância sem adição de padrão.

Figura 33 - Curva de absorbância, 376nm, *versus* concentração de Zn(II) $(2,84, 4,74 \text{ e } 7,90) \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, tiouréia $0,013 \text{ mol.L}^{-1}$, fluoreto de sódio $0,024 \text{ mol.L}^{-1}$, DPKSH $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, *pH* 4,5 (ácido acético/acetato) e em meio de etanol-água 50% (V/V). Caminho óptico de 1,00 cm.

A partir da curva de adição de padrão, Figura 33, utilizando-se a regressão linear (método dos mínimos quadrados) obteve-se coeficientes angular, linear e de correlação $(3,71 \pm 0,01) \times 10^4$, $(0,029 \pm 0,001)$ e 1,000, respectivamente. A partir desses valores a concentração de Zn(II) na amostra de fezes A (S), utilizando esse método, é $4.451 \pm 20 \mu\text{g.g}^{-1}$.

Para a amostra de tibia utilizou-se o método de adição de padrão e a curva foi construída preparando-se soluções a partir de: 1 mL da amostra de tibia, 60; 140, 200 e 260 μL da solução padrão de Zn (II) $5,04 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, 20 μL da solução de tartarato $0,17 \text{ mol.L}^{-1}$ para eliminar a interferência de Fe(III), 180 μL da solução de tiouréia 5% para eliminar a interferência do Cu(II), 0,7 mL da solução de DPKSH $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 1 mL do tampão ácido acético/acetato ($\text{pH} = 4,5$), 4,3 mL de etanol absoluto e completou-se o volume para um balão volumétrico de 10 mL com água desionizada. As soluções de referência foram preparadas a partir da adição de todos os reagentes com exceção das soluções da amostra e do padrão de Zn(II).

A Figura 34 apresenta a curva de adição de padrão, sendo que o primeiro ponto corresponde à absorbância sem adição de padrão. A partir da curva de adição de padrão, Figura 34, utilizando-se a regressão linear (método dos mínimos quadrados) obteve-se

coeficientes angular, linear e de correlação $(3,00 \pm 0,01) \times 10^4$, $(0,048 \pm 0,003)$ e 0,9993, respectivamente. A partir desses valores a concentração de Zn(II) na amostra de tibia não suplementada, utilizando esse método, é $228 \pm 16 \mu\text{g.g}^{-1}$.

Figura 34 - Curva de absorbância, 376nm, *versus* concentração de Zn(II) $(0,302, 0,706, 1,01 \text{ e } 1,31) \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, tartarato $3,4 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, tiouréia $0,012 \text{ mol.L}^{-1}$, DPKSH $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,5 (ácido acético/acetato) e em meio de etanol-água 50% (V/V). Caminho óptico de 1,00 cm.

Para a amostra de rim utilizou-se o método de adição de padrão e a curva foi construída a partir de: 1 mL da amostra, 60, 140, 200 e 260 μL da solução padrão de Zn (II) $5,04 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, 250 μL de uma solução de fluoreto de sódio $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ para eliminar a interferência do Fe(III), 180 μL da solução de tiouréia 5% para eliminar a interferência do Cu(II), 1 mL da solução de DPKSH $2,40 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 1 mL do tampão ácido acético/acetato, 4,0 mL de etanol absoluto e completou-se o volume para um balão volumétrico de 10 mL com água desionizada. As soluções de referência foram preparadas a partir da adição de todos os reagentes com exceção das soluções da amostra e do padrão de Zn(II).

A Figura 35 apresenta a curva de adição de padrão, sendo que o primeiro ponto corresponde à absorbância sem adição de padrão. A partir da curva de adição de padrão, Figura 35, utilizando-se a regressão linear (método dos mínimos quadrados) obteve-se coeficientes angular, linear e de correlação $(3,04 \pm 0,03) \times 10^4$, $(0,018 \pm 0,001)$ e 0,9996, respectivamente. A partir desses valores a concentração de Zn(II) na amostra de rim não suplementado, utilizando esse método, é $30 \pm 2 \mu\text{g.g}^{-1}$.

Figura 35 - Curva de absorvância, 376nm, *versus* concentração de Zn(II) ($0,302$, $0,706$, $1,01$ e $1,31$) $\times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, fluoreto de sódio $0,025$ mol.L⁻¹, tiouréia $0,012$ mol.L⁻¹, DPKSH $2,50 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, pH 4,5 (ácido acético/acetato) e em meio de etanol-água 50% (V/V). Caminho óptico de 1,00 cm.

V.2.10.1 - Determinação de Zinco, Cobre, Ferro e Cálcio nas Amostras Biológicas, Utilizando as Técnicas de Absorção Atômica com Chama e Fotometria de Chama

Nas amostras biológicas, as concentrações de Fe, Cu e Zn foram determinadas por absorção atômica e Ca por fotometria de chama. Os resultados para o Zn foram comparados com os obtidos utilizando o método proposto.

Construíram-se as curvas analíticas utilizando a técnica de absorção atômica para Zn/Cu (0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹) e Fe (0,3; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹).

Para o Ca construiu-se a curva analítica (30; 70 e 100mg.L⁻¹) utilizando a técnica de fotometria de chama.

A Tabela XXIV apresenta as concentrações dos metais nos diferentes tipos de amostras biológicas.

A Tabela XXV apresenta os resultados obtidos para as três amostras biológicas utilizando o método espectrofotométrico em condição estacionária e a técnica de absorção atômica, bem como os devidos erros relativos quando se compara o método proposto com a absorção atômica.

Tabela XXIV - Concentração ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de Zn, Cu e Fe nas amostras biológicas a partir da técnica de absorção atômica e Ca por fotometria de chama. S e NS referem-se a amostras provenientes de ratos alimentados com rações Suplementadas e Não Suplementadas, respectivamente.

Amostras	Zn	Cu	Fe	Ca
Fezes A (S)	4.461	120	n.d	n.d
Rim (NS)	30,3	12,1	97,5	n.d
Tíbia (NS)	210	n.d	62	20.260

n.d. não detectado

Tabela XXV – Comparação das concentrações de Zinco em $\mu\text{g.g}^{-1}$ determinadas nas amostras biológicas suplementada (S) e não suplementadas (NS) pelo método espectrofotométrico em condição estacionária (1) e absorção atômica (2).

Amostra Biológica	(1)	(2)	Erro Relativo (%)
Fezes A (S)	4.451	4.461	-0,2
Tíbia (NS)	228	210	8,6
Rim (NS)	30,1	30,3	-0,7

Comparando-se os resultados apresentados na Tabela XXV, observam-se erros relativos pequenos. Assim pode-se concluir que o método desenvolvido é altamente qualificado para a determinação de zinco em amostras biológicas.

V.3 – Desenvolvimento do Método Espectrofotométrico em Condição de Fluxo para Determinação de Zn(II) Utilizando o DPKSH

Com a finalidade de dar continuidade ao desenvolvimento do método para a determinação de Zn(II), iniciou-se o estudo da análise por injeção em fluxo utilizando o DPKSH, com alguns parâmetros anteriormente definidos como 50% de etanol como solvente, devido à baixa solubilidade do DPKSH em água, *pH* 4,5 (tampão ácido acético/acetato) e comprimento de onda 376 nm.

O sistema em fluxo não segmentado com injeção da amostra ⁽¹⁴⁹⁾ utilizado está representado na Figura 36. Utilizaram-se tubos de polietileno no canal da solução transportadora (T) tampão (ácido acético/acetato), no canal do reagente (R) DPKSH, bobina de mistura (BM), bobina de reação (BR) e até o detector. A injeção da amostra foi feita em um injetor comutador (I) construído em acrílico e, para bombeamento dos reagentes uma bomba peristáltica (P) Ismatec IPC-8 com tubos de Viton®, foi utilizada.

As medidas de absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro Hitachi U-3000, com cubetas de fluxo em quartzo com 1,00 cm de caminho óptico.

Figura 36 – Sistema em fluxo não segmentado com injeção da amostra. T solução transportadora (ácido acético/acetato), R reagente (DPKSH), P bomba peristáltica, I injetor, L alça de amostragem, BM bobina de mistura, BR bobina de reação, D detector espectrofotométrico e W descarte.

As soluções transportadora (ácido acético 5,20/acetato 1,99 mM), reagente (DPKSH 2,40 mM) e a amostra de zinco foram preparadas em meio de 50 % de etanol, a fim de minimizar o efeito Schlieren ⁽¹⁵⁰⁻¹⁵⁵⁾.

Avaliou-se o efeito Schlieren previamente à otimização dos parâmetros necessários ao desenvolvimento do método. Testes foram efetuados utilizando-se um sistema em fluxo, Figura 36, com diâmetro interno (d.i) dos tubos nos canais das soluções transportadora (ácido acético 5,20/acetato 1,99 mM) 0,80 mm e reagente (DPKSH 2,40 mM)

0,55 mm. Nas bobinas de mistura (40 cm) e reação (70 cm) também 0,80 mm. Injetou-se inicialmente, em 0 s, 300 μL de um padrão de Zn(II) $7,08 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, seguida de 300 μL de uma mistura de etanol-água 50% (V/V) aos 140, 200 e 260 s e, finalmente, aos 340 s novamente 300 μL da solução padrão de Zn(II) $7,08 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

O diagrama obtido está representado na Figura 37 onde observa-se que no intervalo de 140 a 260 s não houve alteração da linha base. Os dois picos, em 50 e 390 s, são característicos da injeção do padrão de Zn(II) .

Sendo assim, conclui-se que os índices de refração das alíquotas são aproximadamente os mesmos para os fluxos do transportador e do reagente e que quando preparam-se as soluções em meio de etanol-água 50% (V/V) não ocorre o efeito Schlieren, que seria observado com uma variação significativa no sinal ao injetar as soluções de etanol-água 50 % (V/V).

Assim, para a otimização do sistema, Figura 36, avaliou-se a influência de alguns parâmetros como a velocidade de rotação da bomba peristáltica e o diâmetro interno (d.i.) do tubo do transportador, simultaneamente, fixando-se o d.i do reagente em 0,55 mm, volume da amostra injetado, comprimento das bobinas de mistura e reação, concentração do reagente e coeficiente de dispersão.

Figura 37 – Fiagrama obtido em 376 nm pela injeção de 300 μL da solução padrão de Zn(II) $7,08 \times 10^{-5}$ mol/L em 0 e 340 s e em 140, 200 e 260 s (3 alíquotas) da mistura etanol-água 50% (V/V). T (ácido acético 5,20 mM/acetato 1,99 mM *pH* 4,5), d.i. 0,80 mm, R (DPKSH 2,40mM), d.i 0,55 mm, BM e BR 40 e 70 cm, respectivamente, caminho óptico de 1,00cm. Todas as soluções foram preparadas em meio de etanol-água 50% (V/V).

V.3.1 – Velocidade de Rotação da Bomba e Diâmetro Interno (d.i.) dos Tubos da Solução Transportadora e Percurso Analítico

O primeiro parâmetro a ser definido foi d.i. dos tubos a serem utilizados no sistema FIA. Simultaneamente, variou-se a velocidade da bomba peristáltica.

Para o sistema em fluxo utilizaram-se bobinas de mistura e reação com comprimento de 40 e 70cm, respectivamente, e alça de amostragem de 100 μ L. As soluções de Zn(II) e DPKSH com concentrações iguais a $9,08 \times 10^{-5}$ e $2,40 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, respectivamente, e tampão ácido acético 5,20/acetato 1,99 mM foram preparadas em meio de etanol-água 50% (V/V).

Fixou-se o d.i. do tubo do reagente (DPKSH) em 0,55 mm e variou-se o d.i. do canal do transportador e percurso analítico em 0,55; 0,80 e 1,0 mm, bem como a rotação da bomba peristáltica (40, 55 e 70 rpm) para cada d.i. avaliado.

Na Figura 38 apresentam-se os valores de altura de pico (absorbância 376 nm) em relação aos diferentes fluxos com a variação dos d.i. dos tubos do transportador e percurso analítico.

Figura 38 – Valores de altura de pico (absorbância), em 376 nm, *versus* fluxo (mL/min.), variando-se o d.i. dos tubos do T (tampão ácido acético 5,20/acetato 1,99 mM *pH* 4,5) e do percurso analítico: (●) 0,55mm; (▲) 0,80 mm e (■) 1,0 mm. Para a injeção de 100 μ L da solução padrão de Zn(II) $9,08 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, R (DPKSH 2,40mM), d.i. 0,55 mm, BM e BR de 40 e 70 cm, respectivamente e caminho óptico 1,00cm. Todas as soluções foram preparadas em meio de etanol-água 50% (V/V).

Pode-se observar na Figura 38, comparando-se os resultados obtidos, que o d.i. de 0,80 mm para o transportador e percurso analítico é o mais adequado, pois apresenta sinal analítico maior com uma vazão de 2,3 mL.min.⁻¹.

V.3.2 – Influência do Volume de Amostra Injetado

Para avaliar a influência do volume da amostra no sinal analítico, utilizou-se um sistema em fluxo, Figura 36, com d.i. dos tubos do transportador (tampão ácido acético 5,20/acetato 1,99 mM) e percurso analítico 0,80 mm e reagente 0,55mm, fluxo 2,3 mL.min.⁻¹, bobinas de mistura e reação de 40 e 70 cm, respectivamente.

Variou-se o volume do padrão de Zn(II) injetado de 100 a 300μL. Utilizaram-se soluções de Zn(II) e DPKSH com concentrações iguais a $7,04 \times 10^{-5}$ e $2,40 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, respectivamente. Preparadas, assim como o transportador, em meio de etanol-água 50% (V/V).

A Figura 39 apresenta a relação entre o sinal analítico e o volume injetado da solução padrão de Zn(II). Pode-se observar um aumento no sinal analítico com o volume da solução padrão de Zn(II) injetado. O maior sinal observado foi o equivalente ao volume da amostra de 300μL, porém decidiu-se utilizar 250μL, que corresponde a apenas 125μL de amostra original contendo íons Zn(II), devido à diluição em meio de etanol-água 50% (V/V).

Figura 39 – Valores de altura de pico (absorbância), em 376 nm, *versus* volume injetado (µL) da solução padrão de Zn(II) $7,04 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. T (tampão ácido acético 5,20/acetato 1,99 mM *pH* 4,5), d.i. 0,80 mm, R (DPKSH 2,40mM) d.i. 0,55mm, BM e BR 40 e 70 cm, respectivamente e caminho óptico de 1,00 cm. Todas as soluções foram preparadas em meio de etanol-água 50% (V/V).

V.3.3 – Influência no Comprimento da Bobina de Mistura

Para avaliar a influência do comprimento da bobina de mistura no sinal analítico, utilizou-se um sistema em fluxo, Figura 36, com d.i. dos tubos do transportador (ácido acético 5,20mM/acetato 1,99mM) e percurso analítico 0,80 mm e reagente 0,55mm (DPKSH 2,40mM), fluxo 2,3 mL.min.⁻¹, volume da solução padrão de Zn(II) $7,04 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ de 250µL e bobina de reação de 70 cm.

Variou-se o comprimento da bobina de mistura em 10, 20 e 30 cm.

A Figura 40 apresenta a relação entre os valores de absorbância e comprimento da bobina de mistura. Observa-se que com o aumento do comprimento da bobina de mistura tem-se uma diminuição no sinal analítico, provavelmente devido a uma maior dispersão da zona de amostragem ocasionando assim uma diminuição na sensibilidade do sistema. Assim resolveu-se utilizar a bobina de mistura com comprimento de 10 cm, por esta apresentar o melhor sinal analítico ^(75,76,93).

Figura 40 - Valores de altura de pico (absorbância), em 376 nm, *versus* comprimento da bobina de mistura (cm). L de 250 μL da solução padrão de Zn(II) $7,04 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. T (tampão ácido acético 5,20/acetato 1,99mM *pH* 4,5) ,d.i. 0,80 mm, R (DPKSH 2,40mM) d.i. 0,55mm, BR 70 cm e caminho óptico de 1,00cm. Todas as soluções foram preparadas em meio de etanol-água 50% (V/V).

V.3.4 – Influência do Comprimento da Bobina de Reação

Para avaliar a influência do comprimento da bobina de reação no sinal analítico, utilizou-se um sistema em fluxo, Figura 36, com d.i. dos tubos do transportador (ácido acético 5,20mM/acetato 1,99mM) e percurso analítico 0,80 mm e reagente (DPKSH 2,40mM) 0,55mm, fluxo 2,3 mL.min.⁻¹, volume da solução padrão de Zn(II) $7,04 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ de 250μL e bobina de mistura de 10 cm.

Variou-se o comprimento da bobina de reação em 30, 50, 70 e 90 cm.

A Figura 41 apresenta a relação entre os valores de absorbância e comprimento da bobina de reação. Observa-se melhor sinal analítico com comprimento da bobina de reação de 30 cm, porém em 70 cm tem-se um sinal analítico bastante próximo, sendo assim resolveu-se avaliar o coeficiente de dispersão ^(75,76,93) para o sistema em fluxo com as bobinas de reação de 30 e 70 cm.

V.3.5 – Coeficiente de Dispersão para o Sistema em Fluxo

Para a determinação do coeficiente de dispersão utilizou-se um sistema em fluxo, 100 μL da solução amostra (azul de bromotimol 0,002 %), o d.i da solução transportadora (tetraborato de sódio 0,01mol.L⁻¹) e percurso analítico 0,80 mm, reagente (azul de

bromotimol 0,002 % ou tetraborato de sódio) d.i. 0,55 mm e bobina de mistura 10 cm.

Figura 41 - Valores de altura de pico (absorbância), em 376 nm, *versus* comprimento da bobina de reação (cm). L de 250 μ L da solução padrão de Zn(II) $7,04 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹. T (tampão ácido acético 5,20mM/acetato 1,99mM *pH* 4,5), d.i. 0,80 mm, R (DPKSH 2,40mM) d.i. 0,55mm, BM 10 cm e caminho óptico de 1,00cm. Todas as soluções foram preparadas em meio de etanol-água 50% (V/V).

Mediu-se o sinal analítico em um comprimento de onda de 620 nm e a equação 13 foi utilizada para o cálculo do coeficiente de dispersão.

$$D_s^{\text{max.}} = \frac{A_s^0}{A_s^{\text{max.}}} \quad (13)$$

onde: $D_s^{\text{máx.}}$ = dispersão no ponto máximo; A_s^0 = absorbância da amostra pura, obtida quando utiliza-se a solução de azul de bromotimol como reagente e transportador e $A_s^{\text{máx.}}$ = absorbância da amostra no ponto máximo, sendo T e R tetraborato de sódio e a amostra a solução de azul de bromotimol, respectivamente.

Os valores de coeficiente de dispersão calculados, variando-se o comprimento da bobina de reação, estão apresentados na Tabela XXVI.

Tabela XXVI – Valores de coeficiente de dispersão em diferentes comprimentos de bobina de reação.

Bobina de Reação (cm)	Coeficiente de Dispersão
30	2,5
70	2,8

Observa-se na Tabela XXVI que os valores de coeficiente de dispersão são bastante próximos, sendo assim, escolheu-se a bobina de reação com comprimento de 70 cm, que apresenta um comprimento 7 vezes maior que o da bobina de mistura. Além disso, acredita-se que esta seja a mais adequada para se obter uma mistura completa da amostra com o tampão e o reagente, durante o percurso analítico.

O coeficiente de dispersão no sistema em fluxo avaliado indica uma dispersão limitada ^(75,76,93), pois sabe-se que quando $1 < D < 3$ tem-se um máximo de preservação da identidade da amostra, da zona de amostra injetada até o detector.

V.3.6 – Influência da Concentração do Reagente (DPKSH)

Para avaliar a influência da concentração do reagente no sinal analítico, utilizou-se um sistema em fluxo, Figura 36, com d.i. dos tubos do transportador (ácido acético 5,20mM/acetato 1,99mM) e percurso analítico 0,80 mm e reagente (DPKSH) 0,55mm, fluxo 2,3 mL.min.⁻¹, volume da solução padrão de Zn(II) $7,04 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ de 250µL e bobinas de mistura e reação de 10 e 70 cm, respectivamente.

Variou-se a concentração da solução de DPKSH em 0,700 e 2,40mM. Observou-se que para a primeira concentração o sinal analítico foi maior porém não apresentou repetibilidade, sendo assim

manteve-se a concentração de 2,40mM utilizada desde o início dos estudos.

V.3.7 – Construção da Curva Analítica do Sistema em Fluxo Desenvolvido

Utilizando o sistema em fluxo, Figura 36, e com os parâmetros ajustados, ou seja, com d.i. dos tubos do transportador (ácido acético 5,20mM/acetato 1,99mM) e percurso analítico 0,80 mm, reagente (DPKSH 2,40mM) 0,55mm, fluxo 2,3mL.min.⁻¹, volume injetado da solução padrão de Zn(II) de 250μL e bobinas de mistura e reação de 10 e 70 cm, respectivamente. Construiu-se a curva analítica a partir da injeção de quatro alíquotas de 250 μL para cada solução padrão de Zn(II). As Figuras 42 e 43 apresentam o fiograma e a curva analítica, respectivamente.

Na Figura 43, observa-se através dos resultados obtidos que tem-se uma faixa de linearidade (lei de Beer), para a absorbância em função da concentração de Zn(II) que varia de (0,332 a 7,04)x10⁻⁵ mol.L⁻¹. O coeficiente linear da reta é -(3,33 ± 0,36)x10⁻³, o coeficiente angular é (1,34 ± 0,01)x10⁴ L.mol⁻¹.cm⁻¹ e o coeficiente de correlação igual a 0,9990. A equação da reta é:

$$A = -3,33 \times 10^{-3} + 1,34 \times 10^4 \times C_{\text{Zn(II)}} \quad (14)$$

Figura 42 – Fiograma obtido em 376 nm a partir da injeção de oito soluções padrão de Zn(II). T (tampão ácido acético 5,20mM/acetato 1,99mM *pH* 4,5), d.i. 0,80mm, R (DPKSH 2,40mM), d.i. 0,55mm, BM e BR 10 e 70cm, respectivamente e caminho óptico de 1,00 mm. Todas as soluções foram preparadas em meio de etanol-água 50% (V/V).

Figura 43 – Curva analítica em 376 nm para o sistema em fluxo desenvolvido. T (tampão ácido acético 5,20mM/acetato 1,99mM *pH* 4,5) e percurso analítico com d.i. 0,80mm, R (DPKSH 2,40mM) d.i. 0,55mm, BM e BR 10 e 70cm, respectivamente, caminho óptico de 1,00 cm. Todas as soluções foram preparadas em meio de etanol-água 50% (V/V).

O método desenvolvido apresenta um limite de detecção igual a $7,46 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$.

V.3.8 – Tempo Médio de Residência da Amostra e Frequência de Amostragem

Para calcular o tempo médio de residência (T) de cada amostra injetada, utilizou-se a equação:

$$T = \pi \left(\frac{d}{2} \right)^2 \frac{L}{Q} \quad (15)$$

onde: d = d.i. dos tubos (cm); L = percurso analítico (cm) e Q = vazão do fluxo do sistema (mL.min.^{-1}).

Obteve-se assim um tempo médio de residência igual a 0,18 min..

A frequência de amostragem (F.A.) foi calculada a partir da equação :

$$\text{F.A.} = \frac{60}{T} \quad (16)$$

Com a equação (16) obteve-se um resultado de 333 análises/hora, valor um tanto quanto elevado. Sendo assim, para obtenção da frequência de amostragem utilizou-se o diagrama que está representado na Figura 42.

Para isso mede-se o tempo (s) necessário para o início da linha base até esta ser atingida novamente, seleciona-se um pico para cada padrão. O valor calculado assim é de 42 análises/hora, que apresenta-se mais adequado.

V.3.9 – Aplicação do Método em Fluxo Desenvolvido em Preparações Farmacêuticas

Aplicou-se o método espectrofotométrico em condição de fluxo em amostras reais e para isso selecionaram-se sete preparações farmacêuticas: Colírio (A), Talco Anti-séptico (B), Solução Adstringente (C), Pomada para Assaduras (D), Solução Injetável e Sublingual de Gluconato de Zn (E), e de Guloconado de Zn e Cu (F) e Comprimido de Gluconato de Zinco (G). A abertura da amostra, quando necessária, foi efetuada conforme apresentado no Capítulo IV- Parte Experimental. A alíquota de cada preparação farmacêutica está representada na Tabela XXVII. Para as amostras (A), (E), (F) e (G) completou-se o volume com água desionizada para um balão volumétrico de 10 mL e para as amostras (B), (C) e (D) para um balão volumétrico de 25 mL.

Tabela XXVII – Alíquotas das preparações farmacêuticas para o preparo das soluções amostra.

Preparação Farmacêutica	Alíquota (μL)
(A)	150
(B)	188
(C)	188
(D)	188
(E)	1000
(F)	1000
(G)	310

Na preparação farmacêutica (F), devido à presença dos íons cobre foi necessário adicionar no preparo da amostra solução de tiouréia 5%, mantendo a razão Tiouréia/ Zn(II) de 4000 vezes previamente estabelecida, a fim de mascarar esse íon.

A Figura 44 representa um fiograma obtido após a injeção de três alíquotas de $250\mu\text{L}$ de cada uma das soluções padrão de Zn(II) ($6,56$ e $3,56$) $\times 10^{-5}\text{mol.L}^{-1}$ e das amostras de (A) a (D).

Figura 44 – Fiograma obtido em 376 nm a partir da injeção de dois padrões de Zn(II) e quatro amostras em meio de etanol-água 50% (V/V). Onde P₁ e P₂ são padrões de Zn(II) $(6,56 \text{ e } 3,53) \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente, (A) Colírio; (B) Talco Anti-séptico; (C) Solução Adstringente e (D) Pomada para Assaduras. Caminho óptico de 1,00 cm.

A Figura 45 apresenta o fiagrama obtido após a injeção de três alíquotas de 250 μL para cada solução padrão de Zn(II) $7,04 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e das amostras (E) a (G).

Figura 45 – Fiagrama obtido em 376 nm a partir da injeção de um padrão de Zn(II) e três amostras em meio de etanol-água 50% (V/V). Onde P é padrão de Zn(II) $7,04 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, Solução Injetável e Sublingual de Gluconato de Zn (E); e de Gluconato de Zn e Cu (F) e Comprimido de Gluconato de Zn. Caminho óptico de 1,00 cm.

O cálculo da concentração foi realizado utilizando-se a equação 14. Os valores das concentrações de Zn(II) para todas as amostras, bem como os desvios padrão e os erros relativos a formulação estão representados na Tabela XXVIII.

Tabela XXVIII – Determinação da concentração de Zinco em Preparações Farmacêuticas utilizando o método desenvolvido em condição de fluxo. Erro relativo (E.R.) a formulação.

Preparações Farmacêuticas	Zn(II) (mg)	Estimativa do Desvio Padrão ($\pm$)	E.R (%)
A	1,08	0,02	-10
Zn[C ₆ H ₄ (OH)SO ₃] ₂ .8H ₂ O			
B* ZnO	12,31	0,01	-5,8
C** ZnO	491	2	-
D ZnO	141	2	6,0
E Zn(II)	0,0602	0,0001	10
F Zn(II)	0,0687	0,0001	2,0
G Zn(II)	109	1	-9,0

* g e ** mg/L

Pode-se observar na Tabela XXVIII que os erros relativos ao indicado nas preparações farmacêuticas é de no máximo 10%. Pode-se

então considerar o método espectrofotométrico, desenvolvido em condição de fluxo qualificado para a determinação de Zn(II) nestes tipos de amostras.

Com a finalidade de comparações a Tabela XXIX apresenta os resultados obtidos para as sete preparações farmacêuticas utilizando a técnica de absorção atômica com chama e o método espectrofotométrico em condição de fluxo.

Tabela XXIX – Comparação dos resultados encontrados pelo método em condição de fluxo (1) e a técnica de absorção atômica (2).

Preparações	(1)	(2)	Erro Relativo
Farmacêuticas			(%)
A	1,1	1,2	-8,3
Zn[C ₆ H ₄ (OH)SO ₃] ₂ .8H ₂ O			
B* ZnO	12,3	12,2	0,6
C** ZnO	491	437	12
D ZnO	141	155	-9,0
E Zn(II)	0,0602	0,0668	-9,9
F Zn(II)	0,0687	0,0747	-8,0
G Zn(II)	109	109	0,0

* g e ** mg/L

Pode-se observar na Tabela XXIX que os valores estão bastante concordantes e que os erros relativos à técnica de absorção atômica são de no máximo 12 %. Sendo assim pode-se concluir que o método espectrofotométrico em condição de fluxo é altamente qualificado para a determinação de Zn(II) nesse tipo de amostras, podendo ser utilizado como método alternativo frente a outros propostos em literatura.

V.4 – Desenvolvimento do Método Espectrofotométrico em Condição de Fluxo Utilizando Resina de Troca Iônica

Com a finalidade de pré-concentrar Zn(II) e eliminar possíveis interferências possibilitando a aplicação do método espectrofotométrico em condição de fluxo a amostras biológicas, desenvolveu-se um sistema utilizando uma coluna com resina de troca iônica alterando o proposto na Figura 36 (pág. 133).

Essas resinas de troca iônica consistem de estruturas orgânicas (M-R-X) complexas, usualmente insolúveis, ligadas a grupos ou átomos ionizáveis (X). São classificadas em trocadores catiônicos ou aniônicos. Com relação aos trocadores aniônicos podem ser do tipo base forte, média ou fraca (de acordo com os grupos funcionais)^(94,156).

Um exemplo desse tipo de resina é a Amberlite IRA-400 (utilizada nesse trabalho), formada por grupos funcionais que trocam íons negativos em sua superfície.

Após um tratamento prévio com solução de NaOH, a resina encontra-se ativada na forma (M-R-OH)⁽⁷⁹⁾. Quando exposta a uma solução contendo o íon metálico, na forma de cloro complexos de Zn(II) ($[\text{ZnCl}_n]^{2-n}$), participa da seguinte reação, apresentada simplificada:

Os cloro complexos de Zn(II) retidos na resina são rapidamente eluídos por meio de uma solução de NaOH que também recondiciona a mesma.

Em seguida, promove-se a formação do complexo Zn(II)/DPKSH em meio de etanol-água 50% (V/V) e *pH* 4,5 e mede-se a absorbância em 376nm.

Este princípio foi utilizado no sistema em fluxo não segmentado com injeção da amostra⁽¹⁴⁶⁾, representado na Figura 46. Utilizaram-se tubos de polietileno no canal da solução de ácido clorídrico/cloreto de sódio (**R**₁), ácido clorídrico (**R**₂), amostra (**S**), tampão ácido acético/acetato (**R**₃), hidróxido de sódio (**E**), DPKSH (**R**₄), bobinas de mistura (**BM**₁ e **BM**₂) e bobina de reação (**BR**) até o detector. A injeção da amostra foi em um injetor comutador (**I**) construído em acrílico. No lugar da alça de amostragem foi colocada uma coluna em polietileno (5cmx3mm) preenchida com resina de troca aniônica Amberlit IRA-400 (**C**) e, para bombeamento das soluções utilizaram-se bombas peristálticas Minipuls 3 da Gilson (**P**₁) e Ismatec IPC-8 (**P**₂).

As medidas de absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro Hitachi U-3000, com cubetas de fluxo de quartzo com 1,00 cm de caminho óptico.

Figura 46 – Sistema de injeção em fluxo não segmentado com injeção da amostra. **S** amostra, **R₁** ácido clorídrico/cloreto de sódio, **R₂** ácido clorídrico, **R₃** tampão ácido acético/acetato, **E** eluente hidróxido de sódio, **R₄** DPKSH, **BM₁** e **BM₂** bobinas de mistura, **BR** bobina de reação, **I** injetor, **C** coluna (5cmx3mm) preenchida com resina de troca aniônica Amberlit IRA-400, **P₁** e **P₂** bombas peristálticas, **D** detector espectrofotométrico e **W** descartes.

Alguns parâmetros anteriormente definidos, como 50% de etanol como solvente, devido à baixa solubilidade do DPKSH em água, *pH* 4,5 (tampão ácido acético/acetato), comprimento de onda 376 nm, bobinas de mistura (**BM₂**) e reação (**BR**) 10 e 70 cm, respectivamente,

foram mantidos. O d.i dos tubos de R₁, R₂ e S adotados foram de 1,0 mm (fluxos de 4,0 mL.min⁻¹), E 0,8 mm (fluxo de 1,6 mL.min⁻¹), R₃ e R₄ 0,55 mm (fluxos de 0,7 mL.min⁻¹).

As soluções R₂ e S, ácido clorídrico 2 mol.L⁻¹ e amostra, respectivamente, foram preparadas somente em meio de água desionizada. As soluções R₁, R₃, R₄ e E, ácido clorídrico 0,01/cloreto de sódio 1,0 mol.L⁻¹, tampão de ácido acético 1,0/acetato 0,5 mol.L⁻¹, DPKSH 2,40 mM e hidróxido de sódio, respectivamente, foram preparadas em meio de etanol-água 50 % (V/V), a fim de minimizar o efeito Schlieren⁽¹⁵⁰⁻¹⁵⁵⁾, pois como observa-se na Figura 46 a mistura desses atinge o detector.

Para a otimização do sistema, Figura 46, avaliou-se a influência de alguns parâmetros tais como tempo de lavagem da coluna, tempo de injeção da amostra e concentração do eluente (E), hidróxido de sódio⁽⁷⁹⁾.

V.4.1 – Tempo de Lavagem da Resina de Troca Aniônica

O primeiro parâmetro a ser definido, foi o tempo de lavagem da resina de troca aniônica.

A solução padrão de Zn(II) (S) foi preparada em meio de água desionizada e, assim, antes de passar pela resina, foi necessário

previamente fazer a mistura com meio de ácido clorídrico, para a formação dos respectivos cloro complexos de zinco, que ficarão retidos na resina. Sendo assim foi colocado no sistema, Figura 46, um canal com solução de ácido clorídrico 2 mol.L^{-1} , que entra em confluência com a solução padrão de Zn(II) passando por uma bobina de mistura (BM_1) e por fim pela resina onde ocorre a troca.

Antes da eluição, a resina foi lavada com uma solução de ácido clorídrico 0,01/cloreto de sódio $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (R_1) que foi injetada nos canais da solução padrão (S) de Zn(II) e (R_2) do ácido clorídrico $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$, Figura 46, com o propósito de eliminar os possíveis íons interferentes ao método, que não formam cloro complexos, mas que podem ficar retidos nos interstícios da resina; e para minimizar o efeito Schlieren que pode ocorrer devido à alta concentração do ácido clorídrico $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ além da influência do meio de etanol-água 50% (V/V).

Para avaliar a influência do tempo de lavagem da resina utilizando-se solução de ácido clorídrico 0,01/cloreto de sódio $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V) variou-se o tempo em 30, 60 e 90 s (fluxos de 2, 4 e 6 mL.min^{-1}). A influência no sinal analítico foi estudada injetando-se solução padrão de Zn(II) $3,15 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e ácido clorídrico $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ durante 60 s com fluxo de $4,0 \text{ mL.min}^{-1}$.

A eluição foi realizada em fluxo reverso, Figura 46, com uma solução de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V), fluxo $1,6 \text{ mL.min}^{-1}$. Em seguida, a mistura entrou em confluência com R_3 (ácido acético/acetato pH 4,5), passou por uma bobina de mistura (BM_2), entrou em confluência com R_4 (DPKSH $2,40 \text{ mM}$) e passou pela bobina de reação (BR) atingindo assim o detector.

A Tabela XXX apresenta o valor de altura do pico máximo (absorbância), média de três medidas, obtido para cada tempo de lavagem da resina.

Tabela XXX – Valores de altura do pico máximo (média de 3 picos) em diferentes tempos de lavagem da coluna com HCl $0,01/NaCl$ $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V).

Tempo de Lavagem (s)	Altura de Pico (A^{376})
30	0,376
60	0,539
90	0,523

Pode-se observar na Tabela XXX, comparando-se os resultados obtidos, que o tempo de lavagem mais adequado é o de 60 segundos,

pois apresenta sinal analítico maior. A partir de 90 segundos pode ocorrer a perda de Zn(II) que estava adsorvido na resina⁽⁷⁹⁾.

V.4.2 – Influência da Concentração da Solução Eluente (E)

Para avaliar a concentração do eluente, hidróxido de sódio, no sinal analítico, utilizou-se um sistema em fluxo, Figura 46 e solução padrão de Zn(II) $3,15 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (fluxo de $4,0 \text{ mL.min}^{-1}$). As outras condições foram: $R_1 = \text{HCl } 0,01/\text{NaCl } 1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V), fluxo de $4,0 \text{ mL.min}^{-1}$, $R_2 = \text{HCl } 2,0 \text{ mol.L}^{-1}$, fluxo de $4,0 \text{ mL.min}^{-1}$, $R_3 = \text{tampão ácido acético } 1,0/\text{acetato } 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V), fluxo de $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$ e $R_4 = \text{DPKSH } 2,40 \text{ mM}$ em meio de etanol-água 50% (V/V), fluxo de $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$, BM_1 , BM_2 e $\text{BR} = 10, 10$ e 70 cm , respectivamente.

Variou-se a concentração das soluções do eluente (E, fluxo de $1,6 \text{ mL.min}^{-1}$) hidróxido de sódio em $0,1$ e $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, ambas preparadas em meio de etanol-água 50% (V/V).

A Tabela XXXI apresenta os valores de altura de pico (absorbância 376 nm) para as diferentes concentrações da solução eluente.

Tabela XXXI – Altura de pico (média de 3 picos) em diferentes concentrações da solução de NaOH em meio de etanol-água 50% (V/V), após a injeção da solução padrão de Zn(II) $3,15 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Concentração da Solução do Eluente (mol.L^{-1})	Altura de Pico (A^{376})
0,1	0,539
0,2	0,688

Na Tabela XXXI pode-se observar um aumento no sinal analítico com a concentração da solução do eluente NaOH, além disso observou-se que a resposta do detector retorna à linha base mais rapidamente.

V.4.3 – Influência do Tempo de Injeção da Amostra

Para avaliar o tempo de injeção da amostra no sinal analítico, utilizou-se um sistema em fluxo, Figura 46 com $R_1 = \text{HCl } 0,01/\text{NaCl } 1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V), fluxo de $4,0 \text{ mL.min}^{-1}$, $R_2 = \text{HCl } 2,0 \text{ mol.L}^{-1}$, $E = \text{NaOH } 0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V), fluxo de $1,6 \text{ mL.min}^{-1}$, $R_3 =$ tampão ácido acético $1,0/\text{acetato } 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V), fluxo de $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$ e $R_4 = \text{DPKSH } 2,40 \text{ mM}$ em meio de etanol-água 50%

(V/V), fluxo de $0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, BM_1 , BM_2 e $\text{BR} = 10, 10$ e 70 cm , respectivamente.

Variou-se o tempo de injeção da solução padrão de Zn(II) $1,58 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em 30, 60 e 120 s e consequentemente os fluxos de R_2 e S para os diferentes tempos em $2,0; 4,0$ e $8,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

A Tabela XXXII apresenta os valores de altura de pico (absorbância 376 nm) para os diferentes tempos de injeção da solução padrão de Zn(II) . Além disso apresenta os desvios padrão para a média de cada três picos.

Tabela XXXII – Valores de altura de pico máximo (média de 3 picos) e desvios padrão para os diferentes tempos de injeção da solução padrão de Zn(II) $1,58 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Tempo de Injeção da Solução Padrão (s)	Altura de Pico (A^{376}) e Desvio Padrão
30	$0,258 \pm 0,009$
60	$0,34 \pm 0,02$
120	$0,52 \pm 0,04$

Na Tabela XXXII pode-se observar um aumento significativo no sinal analítico com o tempo de injeção da solução padrão de Zn(II) .

Porém como observa-se na Tabela XXXII o desvio padrão para o tempo de 120 s é bastante elevado, quando comparado aos demais, além disso o volume da amostra injetado é de $8,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, enquanto em 60 s é menor. Sendo assim decidiu-se utilizar o tempo de injeção de 60 s ($4,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) por apresentar um sinal analítico adequado com menor consumo da solução amostra, que as vezes é escassa.

V.4.4 – Construção da Curva Analítica do Sistema em Fluxo Desenvolvido

Utilizando o sistema em fluxo, Figura 46, e com os parâmetros ajustados, ou seja, $R_1 = \text{HCl } 0,01/\text{NaCl } 1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V), fluxo de $4,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $R_2 = \text{HCl } 2,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $E = \text{NaOH } 0,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50%, fluxo de $1,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $R_3 = \text{tampão ácido acético } 1,0/\text{acetato } 0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V), fluxo de $0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e $R_4 = \text{DPKSH } 2,40 \text{ mM}$ em meio de etanol-água 50% (V/V), fluxo de $0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, BM_1 , BM_2 e $\text{BR} = 10, 10$ e 70 cm , respectivamente, e tempo de lavagem da resina com a solução de HCl/NaCl de 60 s, construiu-se a curva analítica.

Para isso partiu-se da injeção de três alíquotas de $4,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ para cada solução padrão de Zn(II) . A Figura 47 apresenta o fiagrama obtido.

Figura 47 – Fiagrama obtido em 376 nm a partir da injeção de cinco soluções padrão de Zn(II) ($4,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). $R_2 = \text{HCl } 2,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, lavagem da resina durante 60 s com solução de $\text{HCl } 0,01/\text{NaCl } 1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V) (R_1), $E = \text{NaOH } 0,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V), $R_3 =$ tampão ácido acético 1,0/acetato 0,5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V) e $R_4 = \text{DPKSH } 2,40 \text{ mM}$ em meio de etanol-água 50% (V/V), BM_1 , BM_2 e $\text{BR} = 10, 10$ e 70 cm , respectivamente, e caminho óptico de $1,00 \text{ cm}$.

Construiu-se uma curva analítica, apresentada na Figura 48, onde se observa linearidade (lei de Beer), para a absorbância em função da concentração de Zn(II) que varia de $(0,126 \text{ a } 3,15) \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. O coeficiente linear da reta é $(1,92 \pm 1,18) \times 10^{-3}$, o coeficiente angular é $(2,72 \pm 0,36) \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e o coeficiente de correlação igual a 0,9980.

A equação da reta que representa a curva analítica é:

$$A = 1,92 \times 10^{-3} + 2,72 \times 10^4 \times C_{\text{Zn(II)}} \quad (18)$$

O método desenvolvido apresenta um limite de detecção igual a $2,12 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$.

V.4.5 – Avaliação da Interferência dos Íons Ca(II)

Como apresentado anteriormente os íons Cu(II) e Fe(III) apresentam interferência na determinação de Zn(II), devido à formação também de complexos com DPKSH que absorvem na mesma região que o Zn(II). Estas interferências foram eliminadas, quando necessário, adicionando-se reagentes mascarantes. Sabe-se que com exceção do Cd(II), que também forma cloro complexos com alta estabilidade, os demais íons não devem interferir na determinação de Zn(II) nas amostras biológicas utilizando a resina de troca aniônica.

Figura 48 – Curva analítica em 376 nm para o sistema em fluxo desenvolvido. $R_2 = \text{HCl } 2,0 \text{ mol.L}^{-1}$, lavagem da resina durante 60 s com solução de $\text{HCl } 0,01/\text{NaCl } 1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (R_1), $E = \text{NaOH } 0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V), $R_3 = \text{tampão ácido acético } 1,0/\text{acetato } 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V) e $R_4 = \text{DPKSH } 2,40 \text{ mM}$ em 50% de etanol, BM_1 , BM_2 e $\text{BR} = 10, 10$ e 70 cm , respectivamente, e caminho óptico de $1,00 \text{ cm}$.

Porém, resolveu-se avaliar o comportamento dos íons cálcio, presentes em grande quantidade em amostras biológicas de fêmur. Para isso prepararam-se soluções contendo Zn(II) e Ca(II) nas proporções 1:1; 1:10; 1:100; 1:1000; 1:5000 e 1:10.000 (Zn:Ca).

Utilizou-se o sistema em fluxo, Figura 46, e com os parâmetros ajustados, ou seja, $R_1 = \text{HCl } 0,01/\text{NaCl } 1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V), fluxo de $4,0 \text{ mL.min}^{-1}$, $R_2 = \text{HCl } 2,0 \text{ mol.L}^{-1}$, $E = \text{NaOH } 0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V), fluxo de $1,6 \text{ mL.min}^{-1}$, $R_3 = \text{tampão ácido acético } 1,0/\text{acetato } 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de etanol-água 50% (V/V), fluxo de $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$ e $R_4 = \text{DPKSH } 2,40 \text{ mM}$ em meio de etanol-água 50% (V/V), fluxo de $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$, BM_1 , BM_2 e $\text{BR} = 10, 10$ e 70 cm , respectivamente, e tempo de lavagem da resina com a solução de HCl/NaCl de 60 s. Injetaram-se três alíquotas de $4,0 \text{ mL.min}^{-1}$ para cada solução contendo as diferentes proporções Zn:Ca.

A Tabela XXXIII apresenta os valores de absorbância em 376nm (média de 3 picos) para as soluções contendo Zn(II) $1,58 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e Ca(II) nas proporções 1:1; 10:1; 100:1; 1000:1; 5000:1 e 10.000:1.

Pode-se observar na Tabela XXXIII que uma variação mais significativa nos valores de absorbância foi verificada na proporção 1:10.000 (Zn:Ca).

Tabela XXXIII – Valores de altura de pico máximo (média de 3 picos) para as diferentes proporções de Ca:Zn ($1,58 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹). Absorbância de referência = 0,457.

Proporção Ca:Zn	Altura de Pico (A^{376})
1:1	0,422
10:1	0,425
100:1	0,432
1000:1	0,422
5000:1	0,410
10.000:1	0,358

V.4.6 – Aplicação do Método Desenvolvido em Condição de Fluxo com Resina de Troca Aniônica em Amostras Biológicas

Aplicou-se o método espectrofotométrico em condição de fluxo com resina em amostras biológicas e para isso selecionaram-se : fêmur, fezes B e rim suplementados (S). A abertura das amostras foi apresentada no Capítulo IV-Parte Experimental. Não foi necessário preparar as soluções amostra, pois o método possibilitou a injeção direta das mesmas. Desta forma, as amostras foram injetadas ($4,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) e entraram em confluência com a solução de ácido

clorídrico $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ para prévia formação dos cloro complexos de Zn(II) antes de passar pela coluna de troca aniônica.

A Figura 49 apresenta um fiagrama obtido após a injeção das amostras de fêmur, fezes B e rim suplementados.

Figura 49 – Fiagrama obtido em 376 nm a partir da injeção de três amostras biológicas fêmur, fezes B e rim suplementados. Caminho óptico de 1,00 cm.

O cálculo da concentração foi realizado utilizando-se a equação 18 (pág. 168). Os valores das concentrações de Zn(II) encontradas para as amostras utilizando o método espectrofotométrico em condição de fluxo com resina foram de 184 ± 4 ; 4.942 ± 33 e $26 \pm 2 \mu\text{g.g}^{-1}$ para as amostras de fêmur, fezes B e rim suplementadas, respectivamente.

Para comparação dos resultados obtidos utilizou-se a técnica de absorção atômica com chama, onde os valores encontrados foram de 205, 4.963 e $29 \mu\text{g.g}^{-1}$ para as amostras de fêmur, fezes B e rim, respectivamente.

A Tabela XXXIV apresenta as concentrações de zinco encontradas nas amostras de fêmur, fezes B e rim pelo método espectrofotométrico em condição de fluxo com resina e pela técnica de absorção atômica, bem como os desvios padrão e os erros relativos a técnica de absorção atômica.

Como pode-se observar na Tabela XXXIV o método em condição de fluxo com resina utilizado para a determinação de Zn(II) nas amostras biológicas quando comparado a técnica de absorção atômica apresentou valores bastantes concordantes, e que o erro entre estes é de até 10 %.

Nas amostras biológicas, as concentrações de Fe e Cu foram determinadas por absorção atômica com chama e Ca por fotometria de chama. A Tabela XXXV apresenta esses resultados.

Tabela XXXIV – Comparação dos resultados das concentrações de zinco ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) em amostras biológicas suplementadas (S) encontrados pelo método em fluxo com resina (1) e a técnica de absorção atômica (2).

Amostras Biológicas	(1)	(2)	Erro Relativo
	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	(%)
Fêmur (S)	184 ± 4	205	10
Fezes B (S)	4.942 ± 33	4.963	-0,4
Rim (S)	26 ± 2	29	10

Tabela XXXV – Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) de Fe e Cu nas amostras biológicas por absorção atômica e Ca por fotometria de chama. (S) amostra suplementada.

Amostra	Fe	Cu	Ca
Fêmur (S)	87,4	n.d.	14.564
Fezes B (S)	n.d.	116	n.d.
Rim (S)	95,1	12,1	n.d.
n.d. não detectado			

Na Tabela XXXV observa-se a presença de Fe e Ca na amostra de fêmur, razão Ca/Zn(II) 71 vezes e na amostra de rim tem-se a presença de Fe e Cu. A partir dessas observações pode-se considerar que além da pré-concentração é possível eliminar interferentes como Fe(III), Cu(II), Ca(II) e outros sem a adição de reagentes mascarantes, pois os resultados apresentados na Tabela XXXIV mostram uma boa concordância entre as técnicas utilizadas para determinar a concentração de Zn(II).

VI - CONCLUSÕES

Desenvolveram-se os métodos espectrofotométricos em condições estacionária e em fluxo, baseando-se na formação de um complexo, amarelo, entre o Zn(II) e o DPKSH.

Foi possível desenvolver esses métodos, utilizando a técnica de espectrofotometria no UV-VIS, pois observou-se que o ligante (DPKSH) apresenta um comportamento espectral diferente do complexo, ou seja o ligante apresenta o máximo de absorbância em 320nm enquanto o complexo apresenta um máximo em 376nm.

As bandas observadas nos espectros de infravermelho do ligante e complexo demonstram que provavelmente o DPKSH coordena-se ao Zn(II) na forma aniônica, através do oxigênio do grupo enólico ou do grupo fenólico e a um dos nitrogênios de uma das piridinas e da cadeia principal.

Infelizmente a espectrometria de massas apresentou fragmentos bastante semelhantes nos espectros de massas do DPKSH e do complexo, porém quando efetuou-se massas utilizando a ionização por *electrospray* obteve-se a razão massa/carga 701 u equivalente à formação do complexo protonado na proporção 1:2 $[Zn(DPKSH)_2H]^+$.

A análise térmica demonstrou, através do DSC, a maior estabilidade térmica do complexo que apresentou pico endotérmico em 336°C diferente do ligante 179 °C. A curva TG/DTG do complexo foi de grande relevância para concluir a proporção metal-ligante 1:2, pois

nessa obteve-se o estabelecimento de um patamar final com a formação de um resíduo, ZnO, correspondente a 11,1 % da massa inicial, bastante concordante com o teórico 11,6 %.

Os resultados da análise elementar contribuíram com essas conclusões, que foram confirmadas determinando o número médio de ligantes, método das variações contínuas, igual a 2,03.

O método de Bjerrum, soluções correspondentes, possibilitou a determinação dos valores das constantes de estabilidade dos complexos, bem como os respectivos valores das absorptividades molares. Os valores das absorptividades molares encontram-se na Tabela XXXVI que, para efeito de comparação, apresenta os valores obtidos a partir da curva analítica do método espectrofotométrico em condição estacionária. Pode-se observar que o coeficiente angular da curva analítica (excesso de DPKSH) é bastante concordante com a absorptividade molar do complexo $\text{Zn}(\text{DPKSH})_2$.

Para a obtenção da curva analítica no método espectrofotométrico em condição estacionária utilizou-se um grande excesso de ligante, sendo assim acredita-se que ocorre a predominância da espécie com o maior número de ligantes.

Tabela XXXVI – Valores das absorptividades molares ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), em 376 nm, dos complexos Zn(II)/DPKSH obtidos pelo método de Bjerrum e curva analítica do método espectrofotométrico em condição estacionária.

Complexo	Absortividade Molar ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	
	Bjerrum	Curva Analítica
ZnDPKSH	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^4$	-
Zn(DPKSH) ₂	$(4,5 \pm 0,1) \times 10^4$	$(4,83 \pm 0,01) \times 10^4$

Como o ligante é pouco solúvel em água utilizou-se em todo o trabalho o etanol absoluto. Inicialmente determinou-se a solubilidade do DPKSH nesse solvente, obtendo-se o valor de $11,0\text{g.L}^{-1}$.

Para o método espectrofotométrico em condição estacionária o estudo de otimização dos parâmetros mostrou que as melhores condições que devem ser consideradas são: de preparar as soluções do complexo em meio de etanol-água 50% (V/V), valor de *pH* igual a 4,5 (tampão ácido acético/acetato), razão ligante/metálica mínima igual a 10, ordem de adição dos reagentes Zn(II)/DPKSH/tampão/etanol absoluto/água desionizada.

Construiu-se a curva analítica e os valores dos coeficientes linear, angular e de correlação, bem como o limite de detecção estão apresentados na Tabela XXXVII.

A avaliação da interferência de 43 íons ao complexo mostrou que os cátions Cu^{2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$, Ni^{2+} , dentre outros, apresentam interferência na proporção 1:1 e foram eliminados quando necessário. Na amostra de solução injetável e sublingual de gluconato de zinco e cobre (G) a eliminação de Cu(II) foi realizada com facilidade adicionando-se solução de tiouréia.

Nas amostras biológicas de fezes e rim adicionaram-se soluções de tiouréia e fluoreto de sódio para eliminar a interferência de Cu(II) e Fe(III) , respectivamente. Devido à possível presença, que foi confirmada utilizando a técnica de fotometria de chama, de íons Ca^{2+} na amostra de tibia, adicionou-se tartarato ao invés de fluoreto para mascarar o Fe(III) , além da solução de tiouréia.

A aplicação desse método em preparações farmacêuticas e amostras biológicas, foi um grande sucesso, pois obtiveram-se erros relativos de até $\pm 10\%$ quando comparado ao indicado na preparação farmacêutica, ou ao obtido com a técnica de absorção atômica com chama, no caso das amostras biológicas.

Para o desenvolvimento do método espectrofotométrico em condição de fluxo foi utilizado um sistema de fluxo simples com uma confluência. Os reagentes e amostra foram preparados em meio de etanol-água 50% (V/V) para evitar o efeito Schlieren. Otimizaram-se alguns parâmetros e as melhores condições foram d.i. dos tubos do

transportados (tampão ácido acético/acetato) e percurso analítico 0,80 mm e reagente (DPKSH) 0,55 mm, fluxo de $2,3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, volume da amostra de 250 μL e bobina de mistura e reação de comprimento 10 e 70 cm, respectivamente. Construiu-se a curva analítica obtendo-se valores de coeficientes linear, angular e de correlação, bem como limite de detecção que estão apresentados na Tabela XXXVII. Aplicou-se o método em preparações farmacêuticas obtendo erros relativos, comparados aos da técnica de absorção atômica com chama, menores que 15%.

Para aplicação do método em fluxo nas amostras biológicas o sistema em fluxo original foi modificado, com a colocação de uma coluna contendo resina de troca aniônica para reter os cloro complexos de Zn(II) .

A lavagem da resina foi efetuada durante 60 s com uma solução de ácido clorídrico/cloreto de sódio em meio de etanol-água 50% (V/V). A resina foi eluída utilizando solução de hidróxido de sódio $0,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (etanol-água 50% (V/V)). Construiu-se a curva analítica e os valores dos coeficientes linear, angular e de correlação, bem como limite de detecção estão apresentados na Tabela XXXVII. Ao aplicar esse método nas amostras biológicas obteve-se erros de até 10% quando comparado à técnica de absorção atômica com chama.

Dos três métodos o mais sensível é o estacionário, o método em fluxo também apresentou vantagens pois sabe-se que com esse o consumo de reagente é bem menor que o estacionário, além disso o número de análises é de 42 amostras/hora.

Tabela XXXVII - Valores dos coeficientes linear (1), angular (2) e de correlação (3), limites de detecção, mol.L^{-1} , (4) dos métodos espectrofotométricos em condições estacionária, em fluxo e em fluxo com resina de troca aniônica.

Métodos	(1)/ 10^{-3}	(2)/ 10^4	(3)	(4)/ 10^{-7}
Espectrofotométricos				
Estacionário	1,71	4,83	0,9999	1,24
Fluxo	-3,33	1,34	0,9990	7,46
Fluxo com coluna	1,92	2,72	0,9980	2,12

Quando colocou-se no método em fluxo a coluna contendo a resina de troca iônica foi possível a aplicação em amostras biológicas, ou seja obteve-se um aumento de sensibilidade atingindo um fator de enriquecimento (F.E. razão entre o coeficiente angular da curva analítica depois e antes da pré-concentração) de 2,0 vezes, em relação

ao fluxo sem a resina. Porém a maior vantagem do método em fluxo com a resina foi a de possibilitar a eliminação de íons interferentes (Ca, Fe e Cu) nas amostras sem adicionar reagentes mascarantes.

No método espectrofotométrico em fluxo com resina a amostra foi injetada sem a necessidade de um condicionamento prévio em meio de etanol-água 50% (V/V).

Pode-se concluir finalmente que o desenvolvimento desses métodos espectrofotométricos possibilitam a aplicação desses nos mais diversos tipos de amostras, em substituição a alguns métodos existentes, que apresentam várias etapas, como o da ditizona, ou que tenham alto custo como os que utilizam a técnica de absorção atômica com chama.

VII - PERSPECTIVAS FUTURAS

- Automação do método em fluxo com resina, para aumentar a repetibilidade dos sinais, que são influenciados pela injeção manual da amostra;
- Avaliar outros tipos de resinas para aumentar a sensibilidade e facilitar a eliminação de outros íons que interferem no método;
- Aplicar o método de fluxo com resina em amostras ambientais como águas naturais e até mesmo em campo.
- Análise simultânea de zinco e outros cátions presentes em amostras naturais, biológicas e preparações farmacêuticas.

VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. J. C. King e C. L. Keen, "Zinc - In Modern Nutrition in Health and Disease", Lea & Febiger, 8ª ed., vol. 1, cap. 10, London, 214-230, 1994.
2. J. K. Chesters, "Zinc - In Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements", B. L. O'Dell e R. A. Sundaes editores, Marcel Dekker, New York, 185-230, 1997.
3. B. C. Cunningham, M. G. Mulkerrin e J.A. Wells, *Science*, 253, 545 (1991).
4. W. Kaim e B. Schwederski, "Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life - *An Introduction and Guide*", John Wiley and Sons, New York, 242-266, 1994.
5. W. F. Smyth, "Analytical Chemistry of Complex Matrices", John Wiley Sons, New York (1996).
6. F. Van Asshe e M. Martin, "International Zinc Association (IZA)", Belgium (1996).
7. B. M. Mahan e R. J. Mayers, "Química - Um curso universitário", 4ª ed., Edgard Blücher (1993).
8. A. Huheey - "*Inorganic Chemistry - Principles of Structure and reactivity*"
Harper & Row Publishers, New York (1975).
9. F.A. Cotton e G. Wilkinson - "*Química Inorgânica*" - Livros Técnicos e Científicos Ed., São Paulo (1978).
10. G. S. Henriques, "Indução de metalotioneínas por meio de suplementação com zinco (Zn). Quantificação em tecidos de animais jovens", dissertação de mestrado orientado por Profa. Dra. Sílvia M. F. Cozzolino, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

11. J.J.R. Fraústo da Silva e R.J.P. Willians, "The Biological Chemistry of the Elements - *The Inorganic Chemistry of Life*", Clarendon Press, cap. 11, Oxford, 299-318, 1994.
12. B.L. Valle e K. H. Falchuk, *Physiol. Rev.*, 73(1), 79 (1993).
13. G. Franco, "Tabela de Composição Química dos Alimentos", Editora Atheneu, 9^a ed., São Paulo, 1999.
14. B.L. Valle e D. S. Auld, *Biochemistry*, 29(4), 5647 (1990).
15. B. Sandström, "Dietary Pattern and Zinc Supply - In Zinc in Human Biology", C. F. Mills editor, Springer-Verlag, cap. 22, London, 351-363, 1988.
16. P.J. Aggett e J.G. Comerford, *Nutrition Reviews*, 53(9), S16 (1995).
17. P. J. Aggett, "Severe Zinc Deficiency - In Zinc in Human Biology", C. F. Mills editor, Springer-Verlag, cap. 17, London, 259-279, 1988.
18. A. S. Prasad, "Trace Metals in Growth and Sexual Maturation - In Metabolism of Trace Metals in Man", O. M. Rennert e W.Y. Chan editores, CRC Press, vol 1 cap. 5, Florida, 80-97, 1984.
19. R. B. Lucena, E. Morales e J. L. Gomez-Ariza, *Il Farmaco*, 49(4), 297-300 (1994).
20. P. Richter, M. I. Toral, A. E. Tapia e E. Fuenzalida, *Analyst*, 122, 1045-1048 (1997).
21. R. Lobinski e Z. Marczenko, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 23(1), 55-111 (1992).
22. J.O. Cazatta, J. Zuanon Netto, *J.Ecl.Quim.* 19, 75-80 (1994).
23. H.D. Narres, P. Valente e H.W. Nuernberg, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 317 (3-4), 484-85 (1984).
24. M. Lugowska, E. Strywska e S. Rubel, *J. Electroanal. Chem., Interfacial Eletrochem.* 226 (1-2), 263-65 (1987).

25. A.M. Afonso, J.J. Santana e F. Garcia-Montelongo, *Analyst* (London) 111 (3), 327-29 (1986).
26. N.Q. Jie, J.H. Yang, X.R. Huang e Y. Maw, *Anal. Proc.* 32 (10), 427-29 (1995).
27. P. Fernandez, C. Perez-Londe, A. M. Gutierrez e C. Camara, *Talanta* 36 (9), 960-962 (1989).
28. P. Fernandez, M.C. Perez, A. Gutierrez e C. Camara, *Fresenius J. Anal. Chem.* 342 (7), 597-600 (1992).
29. J.M. Cano-Pavon, M.E. Urena-Pozo e A. Garcia-de-Torres, *Anal. Chem.* 58 (7), 1449-51 (1986).
30. M.K. Deb, S. Chokravartys e R.K. Mishra, *J. Indian Chem. Soc.* 73 (10), 551-552 (1996).
31. L.K.O. Yuyama e S.M.F. Cozzolino, *Rer. Inst. Adolfo Lutz* 55 (1), 45-50 (1995).
32. T.M. Karadakhli, F.M. Najib, F.A. Mohammed, *Talanta* 34(12), 995-999 (1987).
33. R. Compano, A. Grima , A. Izquierdo, M.D. Prat, *Anal. Chim. Acta*, 227 (1), 219-226 (1989).
34. C. Samara, T.A. Kowimtziz, *Anal. Chim. Acta.* 174, 305-311 (1985).
35. J.L. Nowicki, K.S. Johnson, K.H. Coale, V. A. Elroad e S.H. Liebeman, *Anal. Chem.* 66 (17), 2732-38 (1994).
36. J. Golimowski e T. Szczepanska, *Fresenius J. Anal. Chem.* 354 (5-6), 735-737 (1996).
37. O. Aboelino, M. Aceto, G. Sacchero, C. Sarzanini e E. Mentasti, *Anal. Chim. Acta* 305 (1-3), 200-206 (1995).
38. I. Scancara, M. Huizdalova, K. Vytras e K. Kalcher, *Electroanalysis* 6 (8), 663-671, (1994).

39. M.G. Paneli e A. N. Vougaropoulus, *Fresenius J. Anal. Chem.* 348 (12), 837-839 (1994).
40. W. Martinotti, G. Queirazza, F. Reolini e G. Ciceri, *Anal. Chim. Acta.* 261 (1-2), 323-334 (1992).
41. B. Suensmark e J. Larsen, *Talanta* 35 (12), 953-957 (1988).
42. S.B. Adeloju, A.M. Bond, M.H. Briggs, *Anal. Chem.* 57 (7), 1386-1389 (1985).
43. H.W. Nurnberg e B. Raspos, *Environ. Technol. Lett.* 2 (10), 457-483 (1982).
44. M. Bouzanne, *Analusis*, 9 (10), 461-467 (1981).
45. M.E. Urena-Pozo, A. Garcia de Torres, J.M. Cano-Pavon, *Anal. Chem.* 59 (8), 1129-1133 (1987).
46. R. Maties, F. Jimenez, M. Roman e J.J. Arias, *Anal. Lett.* 27 (1), 131-143 (1994).
47. N. Ganon-Gutierrez, F. Sanchez-Rojas e J.M. Cano-Pavon, *Fresenius J. Anal. Chem.* 355 (1), 88-91 (1996).
48. N. Porter, B.T. Hart, R. Morrison e I.C. Hamilton, *Anal. Chim. Acta.* 308 (1-3), 313-328 (1995).
49. S. Igarashi e T. Yotsuyanogi, *Anal. Chim. Acta.* 281 (2), 347-351 (1993).
50. R. Campano, S. Hernandez-Canou, M.D. Prat e L. Garcia-Beltran, *Anal. Chim. Acta.* 255, 325-328 (1991).
51. A. M. Afonso, M. Gonzales-Davila, J.J. Santana e F. Garcia-Montelongo, *Anal. Chim. Acta.* 202, 207-213 (1987).
52. A.A. Adenuji, *Environ. Int.* 22 (2), 259-262 (1996).
53. F. Garcia-Sanchez e M. Hernandez-Lopes, *Talanta* 33 (10), 785-789 (1986).
54. M.E. Urena-Pozo, A. Garcia-de-Torres e J.M. Cano-Pavon, *Analyst (London)* 113 (4), 547-549 (1988).

55. Te-Hsien Lin e Su-Ya Cheng, *Biol. Trace Elem. Res.* 51 (3), 267-76 (1996).
56. O. Hernandez; F. Jimenez; A. I. Jimenez e J.J Arias, *Analyst* 121 (2), 169-72 (1996).
57. A. K. Yatsimirsky, M.I. Nelen A.P. Savitsky e G.V. Ponamarev, *Talanta* 41 (10), 1699-1706 (1994).
58. N. Konoyama, T. Yamazaki, H. Naruse, K. Sumimoto, K. Horiuchi e T. Teras, *Clin. Chem.* 38 (4), 526-529 (1992).
59. D.F. Swaile, M.J. Sepaniak, *Anal. Chem.* 63 (2), 179-184 (1991).
60. J.W. Ho, *J. Liq. Chromatogr.* 13 (11), 2179-2192 (1990).
61. R. Compano, R. Ferrer, J. Guiteras, M. Dolors-Prat, *Analyst* (London) 119 (6), 1225-1228 (1994).
62. M.R. Martinez-de-la-Barrera, J.J. Laserna e F. Garcia-Sanchez, *Anal. Chim. Acta.* 147, 303-309 (1983).
63. R.N. Khondekas, R.G. Dhaneshwar, M.M. Palrecha e L.R. Zarapkar, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 307 (5), 365-368 (1981).
64. M.M. Palrecha, A.V. Kulkarni e R.G. Dhaneshar, *Analyst* (London) 111 (3), 375-377 (1986).
65. J. Opydo e W. Zembrzuski, *Chem. Anal.* 38(6), 823-827 (1993).
66. A.P. Udah, *Talanta* 42 (12), 1827-1831 (1995).
67. "The United States Pharmacopeia" USP 24 NF 19, National Publishing, p. 1894, Filadélfia, EUA (2000).
68. "Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists (AOAC)", 16^a ed., Publicado por Association of Official Analytical Chemists, Inc., Virginia, EUA (1995).
69. "Farmacopéia Brasileira", 4^a ed., Editora Atheneu, São Paulo, 1988.
70. O. R. Alexander e L. V. Taylor, *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 27 (2), 325-331 (1944).

71. H. Kramer, *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 33 (2), 371-374 (1950).
72. L. L. Merritt Jr. E J. K. Walker, *Industrial and Engineering Chemistry*, 16 (6), 387-389 (1944).
73. M. T. Morales, M. T. Montaña e G. Galán, *Analyst*, 112, 467 (1987).
74. M. G. A. Korn, A. C. Ferreira, L. S. G. Teixeira e A. C. S. Costa, *J. Braz. Chem. Soc.*, 10(1), 46 (1999).
75. J. Ruzicka e E. H. Hansen, *Analytica Chimica Acta*, 99, 37-76 (1978).
76. J. Huzicka e E. H. Hansen, "Flow Injection Analysis", 2^a ed., Wilkey-Interscience, New York (1988).
77. F. Cienfuegos e D. Vaitsman, "Análise Instrumental", Editora Interciência, Rio de Janeiro (2000).
78. B. F. dos Reis, *Química Nova*, 19 (1), 51-58 (1995).
79. J.R. Ferreira, E.A.G Zagatto, M.A. Zezzi e S. M. Boscolo, *Analyst*, 115, 779 (1990).
80. M. Trojanowics e J. Szpurna-Lobinska, *Anal. Chim. Acta.*, 230, 125 (1990).
81. M. H. Memom e P.J. Worsfold, *Analyst*, 113, 769 (1988).
82. M. A. Kouparis e P.I. Anagnospoulou, *Analyst*, 111, 1311 (1986).
83. J.C. de Andrade, F. C. Strong e N. J. Martin, *Talanta*, 37, 711 (1990).
84. A. S. Attiyat, *Can. J. Spectrosc.*, 32, 118 (1987).
85. M. Burguera, J.L. Burguera e O. M. Alarcón, *Anal. Chim. Acta.*, 179, 351 (1986).
86. R. A. Sherwood, B. F. Rocks e C. Riley, *Analyst*, 110, 493 (1985).

87. M. C. Brennan e G. Svehla, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 335, 893 (1985).
88. E. A. Zagatto, A. O. Jacinto, F. J. Krug, R. E. Bruns e M. C. V. Araújo, *Anal. Chim. Acta.*, 145, 169 (1983).
89. T. P. Tougas e C. Y. Yuan, *Anal. Chim. Acta.*, 192, 327 (1987).
90. W. Frenzel e G. Schulze, *Analyst*, 112, 133 (1987).
91. R. Kuroda e T. Mochizuki, *Talanta*, 28, 389 (1981).
92. R. M. Liu, D. J. Liu e A.L. Sun, *Talanta*, 40(4), 511 (1993).
93. Bo Karlberg e G. E. Pacey, "Flow Injection Analysis - A practical guide", vol. 10, Elsevier (1989).
94. B. F dos Reis, C. E. S. Miranda e N. Baccan, *Química Nova*, 19 (6), 623-635 (1996).
95. H. Bergamin F^o, B. F. Reis, A. O. Jacintho e E. A. E. Zagatto, *Anal. Chim. Acta.*, 117, 81 (1980).
96. M. Katyal e Y. Dutt, *Talanta* 22, 151 (1975).
97. R.B. Singh, P. Join e R.P. Singh, *Talanta* 29, 77 (1982).
98. M. Garcia-Vargas, M. Belizón, M.P. Hernández-Artiga, C. Martinez e J.A. Pérez- Bustamante, *Applied Spectroscopy* 40(7), 1058 (1986).
99. B. Budesinsky, *Chem. Listy*, 54, 916 (1960).
100. V.A. Terentév e R.K. Andreeva, *Zh. Anal. Khim.* 23, 1089 (1968).
101. R.E. Peterson e M.E. Bollier, *Anal. Chem.* 27, 1195 (1955).
102. E. Somers e J.L. Garraway, *Chem. Ind.* 395, 1957.
103. K.R. Middleton, *Analyst* 90, 234 (1965).
104. L.J.A. Haywood e P. Sutcliff, *Analyst* 81, 651 (1956).
105. G. Brown e R.K. Rohde, *Anal. Chem.* 38, 911 (1966).
106. F.C. Frouty, *Anal. Chim. Acta* 47, 511 (1969).
107. A.J. Comeron e N.A. Gibson, *Anal. Chim. Acta* 51, 249 (1970).

108. idem, ibidem 51, 257 (1970).
109. K.T. Lee, Y.F. Chang e S.F. Tan, *Mikrochimica Acta* 2, 505 (1976).
110. T.H. Kowimtzis, C. Apostolopoulos e I. Staphilakis, *Anal. Chim. Acta* 113, 185 (1980).
111. J.E. Going e R.T. Pflaum, *Anal. Chem.* 42, 1098 (1970).
112. F. Grases e F. Garcia-Sanchez, *Anal. Chim. Acta* 119, 359 (1980).
113. M.A. Al-Nuri, M. Abu-Eid, N.A. Zatar, S. Khalofi e M. Hannoun, *Anal. Chim. Acta* 259, 175 (1992).
114. N. Nakanishi e M. Otomo, *Microchemical Journal* 33, 172 (1986).
115. S.O. Pehkonen, Y. Erel e M.R. Hoffmann, *Environm. Eng. Science* 26, 1731 (1992).
116. Y.Erel, S.O. Pehkonen e M.R. Hoffmann, *J. Geophys. Res.* 98D, 18423 (1993).
117. M.E.V. Suárez-Iha, S.O. Pehkonen e M.R. Hoffmann, *Environ. Scien. Technol.* 28, 2080 (1994).
118. N.A. Zatar, A.Z. Abu-Zuhri, M.A. Al-Nuri, F.M. Mahmoud e A.A. Abu-Obaid, *Spectroscopy Letters* 22, 1203 (1989).
119. T. Nakanishi e M. Otomo, *Analytical Sciences* 1, 161(1985).
120. N.A. Zatar, M.A. Al-Nuri, M. Abu-Eid, M. Hannoun, A.Z. Abu-Zuhri, S. Khalaf e M. Khamis, *Spectroscopy Letters* 24, 1145 (1991).
121. M.V.Rossi, M.E.V. Suárez-Iha e M.R.Hoffmann, *Spectroscopy Letters* 28, 1153 (1995).
122. L.H.S.A. Terra e M.E.V. Suárez-Iha, *Spectroscopy Letters*, 30(2), 625 (1997).

123. L.H.S.A. Terra, M.C.C. Areias, I. Gaubeur e M.E.V. Suárez-Iha, *Spectroscopy Letters*, 30(4), 257 (1999).
124. M.M Kamal, A.Z. Abu Zuhri e M.M. Hannoun, *Fresenius J. Anal Chem.* 344, 275 (1992).
125. M. C. da C. Areias, L.H.S.A. Terra e M.E.V. Suárez-Iha, *Spectroscopy Letters*, 34 (5), (2001).
126. I. Gaubeur, L.H.S.A. Terra, M.C. da C. Areias e M.E.V. Suárez-Iha, *Spectroscopy Letters*, submetido a publicação, Agosto de 2000.
127. W. Hirsch, *Analyst*, 73, 160 (1948).
128. E.K. Libergott, C.L.S. Roquette-Pinto e P.L.A. Aguiar Neto, *Anal. Chim. Acta.*, 101, 229 (1978).
129. R.W. Green, P.S. Hallman e F. Lions, *Inorg. Chem.*, 3, 1541 (1964).
130. idem, *Inorg. Chem.*, 3, 376 (1967).
131. P. Upamathy e N. A. Roju, *Indian J. Chem.*, 2, 248 (1964).
132. M. Moham., M.P. Gupta, L. Chang e N.K. JHA, *Inorg. Chim. Acta.*, 61, 151 (1988).
133. Zh.V. Molodykh, B.I. Buzykin, N.N. Bystrykh e Yu.P. Kitaev, *Khim. Farm. Zh.* 11, 37. Apud: Chem. Abstr. 88, 989280y (1978).
134. L. Bragil, I. Gaubeur e M. E. V. Suárez-Iha, "Determinação das Constantes de Equilíbrio do DPKSH em 50% de etanol", QO 137, 22^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 25 a 28 de Maio de 1999, Poços de Caldas – MG.
135. F.J. Welcher, "The Analytical Uses of Ethylenediamine Tetracetic Acid" 1st ed., Van Nostrand Company, INC, New York (1965).
136. I. Gaubeur, M.V. Rossi, K. Iha e M.E.V.S. Iha, *Ecl. Quím.*, 25, 63-76 (2000).

137. R.M. Silverstein, T. C. Morrill e G. C. Brassler, "Spectrometric Identification of Organic Compounds", 5^a ed., John Wiley & Sons Inc., New York (1991).
138. S. J. Gaskell, *J. Mass Spectrometry*, 32, 677-688 (1997).
139. M. H. Miyano, L. E. S. Narimatsu, M. N. Wandermurem e J. R. Matos, *Anais da Assoc. Bras. Química.*, 45 (4), 185 (1996).
140. P. Job, *Ann. Chim.*, 9, 113 (1938).
141. F. Woldbye, *Acta Chem. Scand.*, 9, 299 (1955).
142. L. Sommer e M. Langova, *Anal. Chem.*, 19, 225 (1988).
143. M. C. da C. Areias, "Estudos sobre a formação de complexos de Fe(II) e Fe(III) com Di-2-piridil cetona saliciloilhidrazona (DPKSH) e sua aplicação no desenvolvimento de métodos analíticos", tese de doutorado orientado pela Profa. Dra. Maria Encarnación Vázquez Suárez-Iha, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
144. G. F. Kirkbright, *Talanta*, 13, 1-14 (1966).
145. G.D. Christian e J. E. O'Reilly, "Instrumental Analysis", 2^a ed., Prentice Hall, New Jersey (1986).
146. J.C. Miller e J. N. Miller "Estadística para Química Analítica", 2^a ed., Addison-Wesley Iberoamericana, S.A. Wilmington, Delaware (1993).
147. Ju. Lurie, "Handbook of Analytical Chemistry", 2^a ed., Mir Publishers, Moscow (1978).
148. S. H. P. Serrano, "Construção e Avaliação de Eletrodos de Membrana Sólida Cristalina Seletivos a Cobre e Prata", Tese de Doutorado, Orientada pelo Prof. Dra. G. O. Neto, Instituto de Química, USP, São Paulo (1988).
149. E.A.G. Zagatto, C.C. Oliveira e C. H. Collins, *Química Nova*, 22(1), 143 (1999).

150. F.R.P. Rocha e J. A. Nobrega, *Química Nova*, 19(6), 225 (1988).
151. C.J. Patton e S.R. Crouch, *Anal. Chim. Acta*, 179, 189 (1986).
152. J.F. Tyson e A.B. Marsden, *Anal. Chim. Acta.*, 214, 447 (1988).
153. A.O. Jacinto, I.A. Rufini e R.F. Antônio, *Química Nova*, 12, 5 (1989).
154. C. Silferbrand-Lindh, L. Nord, L.C. Danielsson e F. Ingman, *Anal. Chim. Acta*, 160, 11 (1984).
155. G. Ham, *Anal. Proc.*, 18, 69 (1981).
156. M. G. Riley e T. R. Sweet, *J. Chem. Education*, 28 (7), 389 (1951).