IQSC

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Janete Rodrigues Gonçalves

Estudo da viabilidade da fotometria em fase sólida empregando multicomutação em fluxo, cela de fluxo com caminho óptico de 3 mm e fotômetro de LED.

São Carlos – São Paulo

2010

Janete Rodrigues Gonçalves

Estudo da viabilidade da fotometria em fase sólida empregando multicomutação em fluxo, cela de fluxo com caminho óptico de 3 mm e fotômetro de LED.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: **Química Analítica.**

Orientador: Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis

São Carlos – São Paulo

2010

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, ____/____/____

Janete Rodrigues Gonçalves

Dedico...

...este trabalho aos meus pais, **Gonçalves** e **Elienete**, que sempre estiveram ao meu lado, trilhando comigo os caminhos da vida e buscando comigo realizar os meus sonhos.

...à minha querida irmã **Janaína Maria**, que mesmo tão geograficamente distante se mostrou tão próxima nas horas mais difíceis.

...Àquele que me permitiu em meio a tantas atribulações tornar esse sonho realidade.

...Ao **Deus do Impossível** e a todas as pessoas presentes em minha vida.

Ao professor Dr. Boaventura Freire dos Reis, por sua orientação profissional, mas, sobretudo por sua amizade, compreensão, paciência e por acreditar em mim durante a realização desse trabalho;

Meu agradecimento e reconhecimento incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo e ao programa de Pós-Graduação pelo apoio concedido durante a realização deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante a realização do curso de pós-graduação;

À Seção de Química Analítica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP;

Ao laboratório de Química Analítica "Henrique Bergamin Filho", por disponibilizar a infra-estrutura e equipamentos para o desenvolvimento da parte experimental do programa de pós-graduação;

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Química Analítica do IQSC - USP;

À Professora Eny Maria Vieira (IQSC – USP) por me acolher na USP e por entender as minhas escolhas profissionais;

A profª. Drª. Selma Elaine Mazzetto, ex-orientadora e amiga, por me incentivar a dar continuidade aos meus estudos;

Aos professores Krug, Zagatto, Fernanda e Zé Santista, pela agradável convivência ao longo dos cafés;

À amiga Lylian Buona Wagner por seu apoio, amor e amizade incondicional e por acreditar na realização deste trabalho;

Aos amigos Ana Paula Vitorino e Nio José Vieira por me incentivarem na busca da realização desse projeto profissional e dos demais projetos pessoais;

Às amigas do grupo de Bioinorgânica da Universidade Federal do Ceará, Érica Juliana e Milena Esmeraldo, por trilharem comigo o longo e árduo caminho da graduação e iniciação científica, e por permanecerem na minha vida após a conclusão dessa etapa;

Ao casal de amigos Avelardo e Raquel Urano por sua amizade, carinho, afeto, acolhida, amor e tudo mais, sem eles eu também não teria seguido;

Ao Diego, amigo querido e companheiro de aventuras, por me fazer rir e por seu incentivo para que eu concluísse esse projeto de vida;

À minha querida Polly Gonçalves (*In memoriam*), por ter me dado imensas alegrias e carinho sem limites;

As queridas Andréia (CENA), Evania (Grupo de Inorgânica - IQSC) e Sabrina (Grupo de Eletroquímica - IQSC), por me ensinar cada uma com sua história de vida que posso ser e tentar ser uma pessoa melhor sempre;

A todos os amigos de São Carlos: Analine, Allen, Ana Paula Garcia, Dani Toma, Dila Soler, Joel Palomino, Júnior, Letícia, Melina, Míriam Kossuga, Luciana Sá, Flávio, Pedro Paulo Gamballe, e Jorge Amin;

Aos amigos do CENA/USP: Alfredo, Alessandra, Alexssandra Luiza, Carla Cripa, Dário, Douglas, Evandro Alves, Gláucia, Marcos, Marcelo, Mário, Milton, Priscila, Rejane, Tuanne e Viviane, por ser minha família nessa caminhada e pela amizade dispensada;

Às amigas Sheila Wenzel (minha “tata” de coração) e Fátima Patreze, por sua amizade, compreensão, companheirismo e por facilitarem minha vida no laboratório durante a execução da parte experimental desse trabalho. Obrigada pelos mastigáveis, os cafés e as orações;

Aos amigos e amigas da Companhia de Água e Esgoto do Ceará pela acolhida e apoio sempre constantes;

Às funcionárias da Pós-Graduação do Instituto de Química de São Carlos, Silvia de Guzzi Plepis e Andréia Pereira pelo apoio incondicional sempre que necessário;

Às funcionárias da biblioteca do Instituto de Química de São Carlos, pela gentileza e presteza no atendimento a mim concedido, em especial a Bernadete por ser sua amizade, gentileza e solicitude sempre;

Ao João Geraldo pela elaboração dos desenhos utilizados nesse trabalho;

Ao Dr. Rogério Carvalho Vieira Chachá e ao Dr. Fábio Luiz Prado, por me ajudarem a superar as adversidades da vida e seguir na caminhada;

Aos pequeninos e não menos importante Felipe, Sofia, Lucas, João Pedro e Giovane por alegrar nossas vidas e nossos churrascos;

Ao Luigi, por ser nossa alegria, ser humano amado e querido mesmo antes de nascer.

Über unsere Freundschaft kann ich nur sagen, dass meine Seele an deiner Seele vollständig ist.

Ich habe dich Liebe

...Credi in te, ascolta il tuo cuore, fai quel che dice anche se fa soffrire, chiudi gli occhi e poi tu lasciati andare prova a volare oltre questo dolore

Non ti ingannerai se ascolta il tuo cuore, apri le braccia quase fino a toccare, ogni mano, ogni speranza, ogni sogno che vuoi perché poi ti porterá fino al cuore di ognuno di noi.

Ogni volta, che non sai cosa fare, prova a volare, dentro il pianeta del cuore...

RESUMO

GONÇALVES, J. R. **Estudo da viabilidade da fotometria em fase sólida empregando multicomutação em fluxo, cela de fluxo com caminho óptico de 3 mm e fotômetro de LED.** 2010. 70 f. Dissertação (mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010

No presente trabalho foi estudada a viabilidade da fotometria em fase sólida usando cela de fluxo com caminho óptico de 3 mm e fotômetro de LED, para determinação de cobalto em suplementos vitamínicos digeridos em meio ácido. O método automatizado foi baseado na formação de um composto de cobalto(II) com o reagente cromogênico 1-(2'-tiazolilazo)-2-naftol (TAN) retido em suporte sólido quimicamente modificado (C_{18}) monitorado em 580 nm. O módulo de análise foi baseado no processo de multicomutação em fluxo. Após a definição das variáveis de controle, as amostras digeridas em meio ácido foram processadas. O procedimento permitiu a determinação de cobalto na faixa linear de 0,05 a 2,0 mg L^{-1}. A precisão analítica, expressa como DPR, foi de 4,2% (n = 9) e freqüência de amostragem de 17 determinações por hora foram observadas. Os limites de detecção e quantificação foram estimados em 0,0166 e 0,055 mg L^{-1}, respectivamente.

ABSTRACT

In the present work the viability of the solid phase photometry using a flow cell with optical pathway of 3 mm and a LED photometer for the determination o cobalt vitamin supplements digested in acidic medium was studied. The method automated was based on the compound formation of cobalt and the chromomeric reagent 1-(2'-tiazolilazo)-2-naftol (TAN), which was immobilized on a solid support (C_{18}) and monitored at 580 nm. The analysis module was based on the multicommutation flow analysis process. After definition of the variables control, samples digested in acid medium ware analyzed. The procedure allowed cobalt determination within the linear range 0.0 up to 2.0 mg L^{-1}. The analytical precision, expressed as DPR, was 4.2 %, and the analytical frequency was 17 determinations per hour. Limit of detection and limit of determination were 0.0166 and 0.055 mg L^{-1}, respectively.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da vitamina B_{12}..... 18

Figura 2. Diagrama de blocos do processo de multicomutação..... 27

Figura 3. Estrutura do reagente cromogênico 1-(2'-tiazolilazo)-2-naftol (TAN)..... 33

Figura 4. Circuito de alimentação do LED. Transistor BC547..... 39

Figura 5. Vista em corte da cela de fluxo com a fase sólida..... 40

Figura 6. Diagrama do sistema em fluxo do módulo de análise..... 42

Figura 7. Registros obtidos variando o volume de amostra inserido no sistema..... 46

Figura 8. Registros dos sinais analíticos obtidos em função do tempo de retenção..... 47

Figura 9. Curva referente ao efeito da imobilização do TAN no suporte sólido de forma *off-line* e *on-line*..... 48

Figura 10. Registros dos sinais analíticos obtidos em função da variação dos comprimentos de onda (λ)..... 50

Figura 11. Registros dos sinais analíticos obtidos em função da variação do volume de amostra..... 51

Figura 12. Registros obtidos variando a vazão de bombeamento..... 53

Figura13. Registros obtidos variando o pH das amostra inseridas no sistema..... 55

Figura 14**.** Comparação para os registros dos perfis analíticos obtidos em meio ácido e aquoso..... 56

Figura 15. Curva analítica referente às soluções de referência usadas para a determinação de cobalto nas amostras..... 57

Figura 16. Perfil analítico obtido empregando solução de referência de cobalto e 7 amostras diferentes de fármacos..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seqüência de atividades executadas pelo computador..... 43

Tabela 2. Resultados obtidos na determinação de cobalto em digeridos de fármacos empregando C_{18} modificado com TAN..... 58

Tabela 3. Resumo dos parâmetros experimentais obtidos para o procedimento analítico..... 59

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTAS DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO 15

1.1. Métodos para determinação de cobalto 19

1.2. Determinação de cobalto por espectrofotometria em fase sólida 24

1.3. Análise química por injeção em fluxo (FIA) e multicomutação 25

1.4. Espectrofotometria em fase sólida (EFS) 28

1.5. Reagentes espectrofotométricos e TAN 32

2. OBJETIVOS 36

3. MATERIAS E MÉTODOS 37

3.1. Reagentes e soluções 37

3.2. Equipamentos e acessórios 38

3. Preparo e digestão das amostras 40

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 45

4.1. Imobilização do reagente cromogênico no suporte sólido (C_{18}) 45

4.2. Estudo do comprimento de onda (λ) 49

4.3. Efeito do volume de amostra 50

4.4. Estudo do volume de ácido para remover o analito 52

4.5. Efeito da vazão de bombeamento na retenção do cobalto 52

4.6. Estudo do pH das amostras 54

4.7. Estudo comparativo da curva de calibração em meio ácido e em meio aquoso 55

4.8. Estudo da faixa de resposta linear e aplicação em amostras reais. 56

4.9. Estudo dos íons interferentes. 60

5. CONCLUSÕES 62

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 63

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, a descoberta do elemento químico cobalto (Co) é incerta e fragmentada. Inicialmente, seu uso parece ter sido sob a forma de um óxido impuro de metal, tendo sido utilizado como pigmento para dar cor azul em cerâmicas. Mais tarde, esse óxido de cobalto foi fundido com óxido de potássio e areia. Povos antigos como os egípcios, romanos e gregos também produziram cerâmicas que continham pigmentos feitos a base de cobalto, mas a primeira vez que foi mencionado o uso desse óxido na sua forma impura foi em 1540, por Biringuccio. Em 1556, Agricola também mencionou diferentes tipos de minerais de cobalto e diversas técnicas usadas naquela época para purificar esses minerais. Segundo diversas fontes a data é incerta, mas foi entre 1737 e 1738 que o metal foi isolado por Brandt. Ele foi capaz de demonstrar, que o cobalto era o elemento responsável pela coloração azul do vidro, que anteriormente era atribuida ao bismuto. O nome do elemento foi derivado do alemão *kobelt* ou *kobold*, que significa *duende* ou *demônio*, chamado assim pelos mineiros devido a sua toxicidade (devido à presença de arsênio), e sendo portanto nocivo a saúde. O nome tambem se deve, em parte, ao fato de que sua aparência prateada enganava os mineiros, levando-os a acreditar que um duende roubava a prata do minério, e deixava somente o cobalto em seu lugar (KIRK, 1984).

O Co é um metal de cor branco-acinzentado com propriedades magnéticas similares ao ferro e ao níquel. Seus principais estados de oxidação são +2 e +3, mas na maioria dos compostos disponíveis e em soluções aquosas, seu estado de oxidação é +2 (VOGEL, 1981). O cobalto ocorre em pequenas proporções na crosta

terrestre, na faixa de 0,001 a 0,002% (m/m), onde é encontrado na forma de diversos minérios tais como a cobaltita ($CoS_2.CoAs_2$), linaeita (Co_3S_4), esmaltita ($CoAs_2$) e eritrita ($3CoO.As_2O_5.8H_2O$) (ALVES; ROSA, 2003). Segundo Malavolta (2006) além desses minérios, o Co encontrado no solo pode ser proveniente da aplicação de sais para plantas ou para animais e adubos fosfatados, adicionados com a finalidade de corrigir deficiências em leguminosas e ruminantes. Também foi observado que solos utilizados para cultivo de alimentos para consumo humano e animal, podem ter altos níveis de metais pesados, entre eles o cobalto, onde os valores podem chegar a centenas de mg por litro (WHO, 2006; PAGE e FELLER, 2005). Entretanto, o cobalto é um constituinte essencial em solos férteis e é um micronutriente essencial ao desenvolvimento das plantas (PAGE e FELLER, 2005; CHAUHAN e KOTHARI, 2004).

Além do solo, o cobalto pode ser encontrado em outros meios naturais como o ar, partículas em suspensão no ar atmosférico, águas superficiais, lençóis freáticos e sedimentos, lava de vulcões, incêndios florestais. Podemos citar ainda a presença de cobalto em combustíveis fósseis. Além das minas que extraem o cobalto, as indústrias de processos químicos que utilizam ou produzem compostos de cobalto, são potenciais geradoras de resíduos, que podem ser lançados na atmosfera e nos cursos hídricos (WHO, 2006).

O cobalto é obtido como subproduto da extração de outros metais, principalmente do Ni e do Cu, devido a sua ocorrência natural**.** Mesmo sendo obtido como subproduto de outras extrações, possui alto valor agregado para a indústria produtora de aço, tecnologia aeronáutica e de fabricação de ferramentas de corte. Este elemento confere dureza às ligas metálicas e resistência mecânica, que podem

ser submetidas a altas temperaturas conservando suas principais características, como corte e fio. Ligas metálicas contendo cobalto apresentam a característica de serem mais resistentes a processos corrosivos (QUAGLIANO e VALARINO, 1979). Os sais de cobalto também podem ser utilizados na fabricação de pigmentos para a indústria de cerâmica, produção de vidros e tintas (LEE, 2003). Pode ser utilizado na forma de catalisador para refino de petróleo e em processos químicos diversos, como na indústria de óleos (QUAGLIANO e VALARINO, 1979). O isótopo artificial ^{60}Co também pode ser utilizado como fonte de radiação na cobalto-terapia para substituir o rádio no tratamento de alguns tipos de câncer (ALVES; ROSA, 2003)

O cobalto também faz parte da estrutura química da vitamina B_{12} que pertence a um grupo de compostos chamados de cobalaminas. A vitamina B_{12} é chamada de ciano ou hidroxicobalamina, e é sintetizada exclusivamente por microorganismos, tratando-se de uma vitamina com características muito particulares (PANIZ et al., 2005).

Na dieta humana, os alimentos que contêm vitamina B_{12} são essencialmente os de origem animal, como por exemplo, fígado, mariscos, carnes, ovos e leite (RUCHER et al., 2001). Sua deficiência é muito freqüente entre indivíduos idosos, vegetarianos e que adotam dietas com baixo consumo de proteínas ou apresentam problemas de absorção gastrintestinal. A deficiência dessa vitamina pode causar retardamento no crescimento, perda de apetite e anemia, por isso é importante diagnosticar precocemente a sua carência e com isso evitar danos neurológicos irreversíveis (PANIZ et al., 2005).

A estrutura da vitamina B_{12} é mostrada na Figura 1 abaixo:

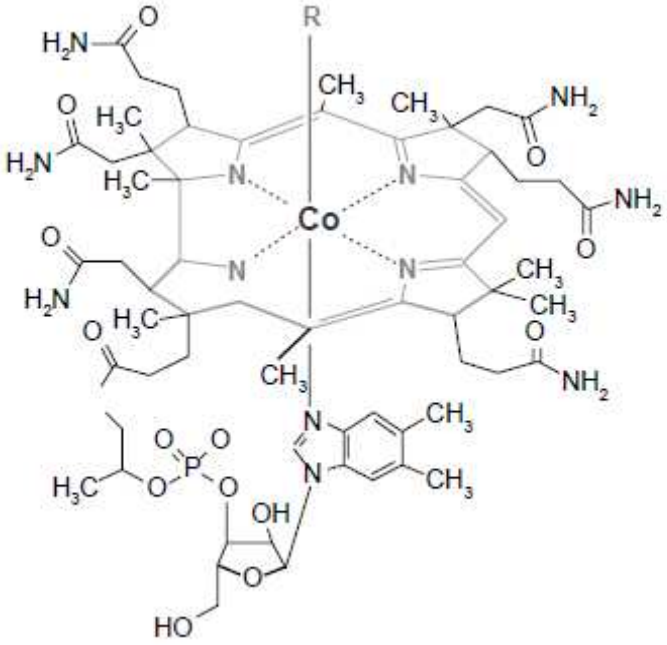

Figura 1. Estrutura química da vitamina B_{12}. (PANIZ et al., 2005)

O interesse pelo cobalto tem se mostrado nos mais diversos campos de pesquisa, como por exemplo, na geoquímica e na química ambiental, e especialmente em áreas onde a bioquímica atua devido ao seu relacionamento com o metabolismo bioquímico humano. Entretanto, o cobalto ocorre em concentrações muito baixas em águas naturais e em organismos vivos, e essa baixa concentração dificulta a compreensão de sua química (MATSUOKA et al., 2006). Com o objetivo de contornar esse inconveniente, diversos métodos analíticos para quantificá-lo têm sido extensivamente estudados ao longo dos anos (YOSHIMURA e WAKI, 1985; FERNANDEZ-DE CORDOVA et al., 1992; SADER, A. P. O., 2002; DANTAS, A. F. et al., 2000).

1.1. Métodos para determinação de cobalto

Cobalto em diferentes matrizes tem sido determinado empregando diferentes técnicas, como espectrometria de absorção atômica de chama (LEMOS et al., 2007), espectrometria emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AOS) (KHORRAMI et al., 2006), plasma acoplado indutivamente associado à espectrometria de massa (ICP-MS) (SASMAZ e YAMAN, 2006), espectrofotometria de absorção no UV-Vis (TEIXEIRA et al., 2001; PASCUAL-REGUERA et al., 2002) entre outras.

Cadore et al. (2005) determinaram cobalto através da formação de um complexo com o reagente morfolinaditiocarbamato de amônio. O metal foi quantitativamente retido em uma coluna de vidro contendo 1,30 g da resina modificada com 6% (m/m) de reagente quelante em pH 5,5. O complexo colorido formado foi eluído com etanol e posteriormente analisado por espectrometria de absorção atômica com chama em 240,7 nm. Este sistema permitiu um fator de pré-concentração igual a 25, devido ao pequeno volume de etanol utilizado (10 mL). Outra característica importante deste trabalho foi a possível re-utilização de uma mesma coluna. O estudo de concomitantes mostrou que somente Cd(II) e Ni(II) interferiam no sistema em questão. Este procedimento, com limite de quantificação de 2,0 µg L^{-1} e com desvio padrão relativo de 2,9%, foi usado para determinação de cobalto em águas naturais. Contudo para utilizar a técnica de FAAS é necessária uma etapa de pré-concentração.

Segundo Mitic et al. (2009) cobalto(II) pode ser determinado cineticamente baseado no seu efeito fortemente catalítico na reação de oxidação do ácido

disodico-6-hidroxi-5-[(4-sulfofenil)azo]-2-naftalenosulfônico (corante artificial) por H_2O_2 em solução tampão de borato pH 9,5. A reação é monitorada espectrofotometricamente pelo desaparecimento do corante, que apresenta um máximo de absorção em 478,4 nm. As curvas analíticas se apresentaram lineares nas faixas de concentração de 1,18 – 17,67 ng mL^{-1} e 17,67 – 58,90 ng mL^{-1} de Co(II). Para eliminar os efeitos dos principais íons interferentes (Fe^{3+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}) solução de F^- e ácido salicílico foram adicionadas à amostra previamente à determinação do Co(II). O limite de detecção e quantificação foi de 0,15 e 0,5 ng mL^{-1}, respectivamente. O método desenvolvido foi aplicado na determinação de Co(II) em amostras farmacêuticas e urina. Os resultados foram confirmados por ICP-OES.

Uma característica importante deste método é que o cobalto pode ser determinado à temperatura ambiente, além da sua possível aplicação para outras amostras de fluídos biológicos, como sangue, alimentos e água potável.

Um método fotométrico usado para quantificar cobalto e zinco de forma direta e simultânea, presentes em baixas concentrações em metaloproteínas foi desenvolvido por Säbel et al. (2009). O procedimento explora as diferenças existentes no espectro de absorção visível do reagente quelante e cromóforo 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR), resultantes da reação de complexação com íons de Zn^{2+} e/ou íons Co^{2+}. O método apresenta a vantagem de eliminar uma possível etapa de separação prévia ou o mascaramento do Co(II) e/ou Zn(II) antes da sua quantificação.

Li et al. (2008) propuseram um método para determinação espectrofluorimétrica de traços de cobalto usando fluorimetria de fase polimérica (fase sólida) e tiamina como reagente. O método foi baseado no fato de que o

cobalto reage com tiamina para formar um composto fortemente fluorescente em solução de NaOH a 0,65% (m/v). A intensidade da fluorescência mostrou uma boa linearidade com a concentração de Co(II) na faixa de 2 – 56 µg L^{-1}. A intensidade da fluorescência foi monitorada em célula de quartzo de 5 mm. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram em 375 e 438 nm, respectivamente. O limite de detecção alcançado foi de 0,61 µg L^{-1} e o RSD igual a 1,70%. A sensibilidade do método foi quatro vezes maior em fase sólida do que a medida espectrofluorimétrica convencional em solução. Além disso, a vida fluorescente da tiamina é maior no polímero (suporte sólido) do que em solução. Íons coexistentes de forma geral não interferiram na reação de cobalto e tiamina, exceto Cu^{2+} e Fe^{3+}. O método proposto foi aplicado na determinação de traços de cobalto em amostras de alimentos, apresentando resultados satisfatórios.

Um procedimento de extração em ponto de nuvem (CPE) foi desenvolvido para a separação e pré-concentração de baixas concentrações de cobalto, visando à determinação por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Baghban et al. (2009) desenvolveram o procedimento baseado na reação de formação do complexo de Co(II) com 2-[(2-mercaptofenilimino)metil]fenol (MPMP), seguido pela extração em surfactante Triton X-114. Sob condições ótimas, a pré-concentração de um volume de 25 mL da amostra resultou em um limite de detecção de 0,21 µg L^{-1}, fator de enriquecimento de 97 e desvio padrão relativo de 1,2% (n = 8, 60 µg L^{-1}) para a determinação de Co(II) por FI-FAAS. O método foi aplicado com sucesso para amostras de água e vitamina B_{12}. A exatidão do método foi comprovada por experimentos de adição-recuperação, análise independente por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e determinação de Co em material de referência certificado.

Vitamina B_{12} proveniente de amostras farmacêuticas foi determinada usando como técnica plasma acoplado indutivamente associado à espectrometria de massa (ICP-MS). As melhores condições mostraram uma curva de calibração com cinco concentrações de vitamina B_{12} com coeficiente de regressão linear de 0,9994 e limite de detecção de 0,05 ng mL^{-1}. Um ciclo de análise (lavagem e amostragem) podia ser feito em 30 s com desvio padrões relativos de 4.2% (0.25 ng mL^{-1}), 3.5% (2.5 ng mL^{-1}), e 2.6%(25 ng mL^{-1}) (ZHANG et al., 2008).

Di-2-piridil cetona tiosemicarbazona (DPKT) foi usado como reagente quelante de pré-coluna em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a determinação dos íons de Co(II), Cu(II), Ni(II) e Fe(II), usando C-18 como fase estacionária da coluna. Foi usado como fase móvel um gradiente de acetonitrila e tampão ácido acético e acetato de sódio 0,01 mol L^{-1} e pH 6,0. A composição de acetronitrila foi aumentada de 25 a 40% em 18 min e mantido em 40% por 18 min. Um detector UV foi usado em 400 nm. A vazão foi mantida em 1,5 mL por minuto e o limite de detecção foi determinado considerando o critério 3σ (Três vezes o desvio padrão do brando dividindo pelo coeficiente angular da curva analítica linear). Efeitos de interferência de outros íons metálicos também foram investigados, e o método foi aplicado para a determinação de Co(II), Cu(II), Ni(II) e Fe(II) em amostras de água potável e de torneira (AÇ et al., 2008).

Cobalto em baixas concentrações pode ser determinado usando o método de micro extração dispersiva líquido - líquido (Dispersive liquid - liquid micro extraction, DLLME) como uma etapa de pré-concentração, e posterior determinação por espectrofotometria. Neste método, uma pequena quantidade de clorofórmio usado como solvente extrator foi dissolvido em etanol puro, usado como solvente

dispersante. Essa solução binária foi injetada rapidamente na amostra aquosa, com o auxílio de uma seringa, que continha os íons de cobalto complexados com PAN. A turvação da solução era resultado da formação de finas gotículas de clorofórmio, dispersas no interior da solução aquosa. O complexo de Co-PAN foi extraído nas finas gotas de clorofórmio após de 2 minutos de centrifugação a 5000 rpm. As gotículas formadas foram sedimentadas após centrifugação e a fase enriquecida do complexo extraído foi determinada espectrofotometricamente a 577 nm. A extração e formação do complexo normalmente são afetados por parâmetros como tipo e volume de solvente extrator usado, solvente dispersante, pH, efeito salino e concentração de agente quelante que foram otimizados para o método desenvolvido. Em condições ótimas Gharehbaghi et al. (2008) obtiveram um fator de enriquecimento de 125 a partir de 50 mL de amostra de água, e o limite de detecção foi de 50 mg L^{-1} e o desvio padrão relativo (n=5) para 50 mg L^{-1} foi de 2,5%. O método foi aplicado para determinar cobalto em amostras de águas naturais e de torneira.

Dentre estas técnicas de quantificação e detecção, os métodos espectrofotométricos estão entre os mais amplamente utilizados para determinar cobalto, pois podem ser implementados empregando equipamento de menor custo, relativamente a outras técnicas.

1.2. Determinação de cobalto por espectrofotometria em fase sólida

Fernadez-de Cordova et. al (1992) desenvolveram um método para determinar Co(II) em baixas concentrações, baseado na espectrofotometria de fase sólida (EFS). O método foi baseado na fixação do complexo formado entre o Co(II) e PAR em uma resina trocadora de ânion. A medida de absorbância foi feita diretamente na resina, permitindo que o cobalto fosse determinado em uma faixa de 0,4 – 3,8 µg L^{-1} com desvio relativo de 2,4%. O método foi aplicado para determinação de cobalto em diversos tipos de amostras como cervejas, drogas e águas.

O sistema reacional usado no presente trabalho para determinação de cobalto, foi baseado na formação de um composto com o reagente cromogênico 1-(2'-tiazolilazo)-2-naftol (TAN), que pode ser retido (imobilizado) em suporte sólido (C-18). A detecção fotométrica pode ser efetuada na fase sólida, e após eluição com uma solução apropriada, outro ciclo de análise pode ser implementado. Este recurso foi empregado para determinar cobalto em fármacos (TEIXEIRA et al., 2001). A solução da amostra era propelida por meio de uma seringa através da coluna contendo sílica funcionalizada (C-18) onde o reagente TAN havia sido imobilizado. Após a leitura da absorbância na fase sólida, o cobalto era removido passando uma solução de ácido clorídrico através da coluna. Após esta etapa, a coluna era lavada com água e com uma solução de hexamina (pH =7) para recondicionamento. Estas etapas foram realizadas de forma manual.

Reis et al. (2000) construíram uma cela de fluxo simples (maior volume de sólido que as celas comerciais) para FI-EFS e utilizou a reação de cobalto (II) com

TAN imobilizado no suporte sólido (C-18) para medidas diretas de absorbância. Os resultados obtidos foram comparados àqueles da cela comercial (menor volume de suporte sólido) para espectrofotometria em fase sólida e o procedimento análogo feito com espectrofotometria convencional (medida feita em solução). Uma das vantagens observadas foi o aumento da sensibilidade em relação às determinações feitas em solução, devido a uma maior concentração do analito.

Análise em fluxo acoplada a espectrofotometria de fase sólida (FI-EFS) foi usada por Matsuoka et al. (2006) para determinar cobalto(II) em amostras de água. O complexo formado entre cobalto e o 5-Br-PADAB foi protonado *on-line* e concentrado em resina trocadora de cátion do tipo AG 50W-X2 contido na cela de fluxo. O aumento da absorbância causado pelo acumulo do complexo na resina foi continuamente monitorado. A interferência do cobre era eliminada usando EDDP como agente mascarante. O limite de detecção conseguido foi de 40 ng L^{-1} com volume de solução de 4,0 mL.

1.3. Análise química por injeção em fluxo (FIA) e multicomutação

Desenvolver procedimentos analíticos mais rápidos e com menor custo por análise é uma preocupação constante devido ao grande número de amostras a serem analisadas diariamente, seja na área de laboratório clínico ou ambiental, gerando a necessidade de procedimentos analíticos com alta freqüência de amostragem. A análise química por injeção em fluxo satisfaz essa necessidade por procedimentos automatizados (COMITRE, 1998; ZAGATTO et al., 1999).

A primeira vez que o termo análise por injeção em fluxo (FIA) surgiu foi no periódico *Analytica Chimica Acta*, em 1975. (RUZICKA e HANSEN, 1975).

O processo de análise por injeção em fluxo fundamenta-se na introdução de uma alíquota da solução da amostra em um fluido transportador, que desloca a amostra através do percurso analítico até o detector. Durante o percurso ocorre dispersão (mistura) da amostra com os reagentes ou soluções necessárias à reação que são adicionadas ao longo do percurso analítico. O maior ganho observado com a introdução deste tipo de sistema nas análises de rotina foi a substituição dos processos anteriormente executados de forma manual, e conseqüente redução do risco de contaminação, redução de consumo de amostras e reagentes e diminuição do tempo de análise (SKOOG, 2006).

Inicialmente, a injeção da amostra (amostragem) no fluído transportador era feita de forma manual, usando uma seringa hipodérmica e perfurando um septo de borracha (RUZICKA e HANSEN, 1975). Entretanto, essa forma de introdução da amostra no sistema apresentava a incerteza na precisão do volume injetado e causava perturbação no percurso analítico durante injeção da amostra (MARTELLI, 1993). Com o intuito de superar essas dificuldades foi proposto o injetor comutador (BERGAMIN et al., 1978). Outros dispositivos para injeção de amostra também foram propostos ao longo dos anos: válvula rotativa, válvulas de 6 e 8 vias etc (REIS, 1996).

A multicomutação pode ser entendida como uma variante do processo de análise em fluxo, onde o módulo de análise é implementado utilizando um conjunto de válvulas solenóides de 3 vias, sendo uma para cada solução a ser utilizada, e cada válvula é acionada de forma independente, na seqüência e no tempo

estabelecidos pelo software de controle. Esses parâmetros são definidos de acordo com as características do procedimento analítico a ser utilizado. As válvulas são acionadas por um microcomputador. O processo de multicomutação (REIS et al., 1994) pode ser representado pela figura baixo:

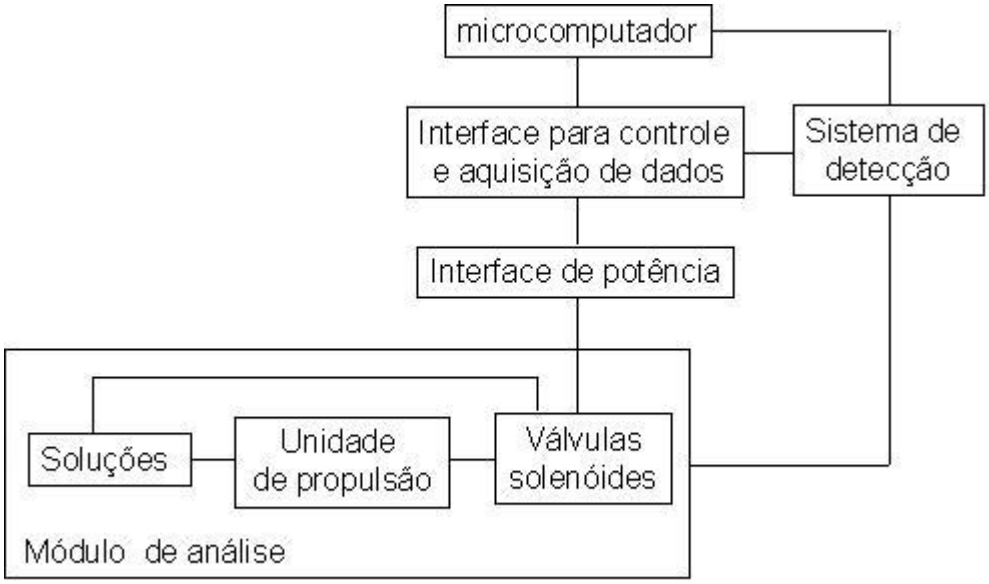

Figura 2. Diagrama de blocos do processo de multicomutação.

Neste modelo, a adição de pequenas alíquotas de reagentes e amostras é feita de forma seqüencial ou alternada no percurso analítico, melhorando assim a mistura entre reagentes e amostra. Um único canal de bombeamento é usado para todas as soluções.

Os sistemas em fluxo baseado no processo de multicomutação apresentam como característica a possibilidade de ter seu funcionamento alterado pelo software, sem necessidade de reconfigurar sua estrutura física, o que torna o sistema versátil e aumentando a possibilidade de automatização, diminuindo o consumo de reagentes e desperdício (ROCHA et al., 2002).

O processo de multicomutação torna mais versátil a manipulação das soluções, permitindo que determinações seqüenciais sejam feitas com um módulo de análise mais simples, onde a amostragem e inserção compreendem uma única etapa (SMIDERLE, 1998).

1.4. Espectrofotometria em fase sólida (EFS)

Muitos dos procedimentos utilizados em química analítica são baseados em medidas espectrofotométricas nas regiões ultravioleta (UV) e visível (Vis) do espectro eletromagnético (185 - 900 nm) devido à constante melhoria instrumental, robustez, baixo custo (ROCHA E TEIXEIRA, 2004). Em geral, nesses procedimentos a espécie química de interesse está em solução, e a quantidade de radiação absorvida é relacionada de forma direta com a concentração através da lei de Lambert-Beer (SKOOG, 2006). Há uma demanda para determinação de espécies cada vez em concentrações mais baixas, então a aplicação direta da espectrofotometria tem se tornado cada vez mais difícil. Para contornar esse inconveniente, o monitoramento da espécie química de interesse tem sido feito diretamente em fase sólida, onde o mesmo foi adsorvido em um suporte sólido apropriado (TEIXEIRA e ROCHA, 2003; FERNÁNDEZ-DE CORDOVA et al., 1992).

O monitoramento de mudança de cor em um suporte sólido empregando um espectrofotômetro foi mencionado pela primeira vez em 1976 por Yoshimura e colaboradores. Foi encontrada uma relação linear entre a absorção da luz pelo sólido e a concentração do analito presente na amostra, utilizando uma resina de troca iônica do tipo DOWEX, modificada com difenilcarbanida, 1,10-fenantrolina,

tiocinato de amônio e zincon para determinação de cromo, ferro, cobalto e cobre em águas naturais, respectivamente (YOSHIMURA, 1985; YOSHIMURA et al., 1976). Desde então, diversos autores vem mencionado a espectrofotometria em fase sólida (EFS) como uma técnica que reúne características como alta sensibilidade, simplicidade, facilidade de automação e baixos limites de detecção.

A EFS tem como princípio monitoramento da absorção da radiação em um suporte sólida, no qual a espécie química de interesse (analito) foi retida previamente. A absorbância na fase sólida é diretamente proporcional à concentração do analito na solução da amostra, mas depende também do volume de amostra empregado durante a imobilização. A fotometria em fase sólida oferece uma série de vantagens relacionadas a seguir (BRYKINA et al., 1995):

1. Pré-concentração, separação e preparação de uma espécie analítica na concentração adequada para ser determinada, podem ser feitas ao mesmo tempo;

2. O analito adsorvido na fase sólida é cineticamente mais estável do que no procedimento análogo em solução;

3. O reagente cromogênico tem sua seletividade aumentada devido a um aumento da rigidez das suas moléculas, conseqüência da sua imobilização no suporte sólido.

A espectrofotometria em fase sólida (EFS) também pode ser associada a procedimentos de análise em fluxo (FIA), que é uma técnica automática baseada na injeção da amostra liquida em um fluxo continuo de reagente (MARCZENKO, 1986). A integração dessas duas técnicas também está baseada na retenção e detecção

simultânea do analito em um suporte sólido, colocado dentro de uma cela de fluxo apropriada posicionada diretamente no caminho óptico do espectrofotômetro. A associação dessas duas técnicas fornece um sistema simples e de fácil automação, baixo consumo de reagentes, além da menor participação do analista (ORTEGA-BARRALES et. al, 1999).

Cassella et al. (2000) desenvolveram um método para a determinação de sulfeto em águas naturais baseado em injeção em fluxo e espectrofotometria em fase sólida (FI – EFS). O método é baseado na formação de azul de metileno (MB) por reação entre o sulfeto e cloreto de N, N-dimetil-p-fenilenodiamina na presença de Fe(III) em meio ácido. O MB formado foi adsorvido na sílica quimicamente modificada (C-18), colocado dentro de célula de fluxo fabricada no próprio laboratório, posicionado no caminho óptico do espectrofotômetro. A retenção do analito e a detecção (λ = 666 nm) foram realizadas simultaneamente, seguida da eluição com uma mistura de metanol e ácido clorídrico. Diversas variáveis do sistema, tais como a concentração de aminas, a acidez do meio reacional, o volume da bobina de reação, o volume da amostra e a vazão da solução de limpeza foram estudados, visando alcançar o melhor desempenho do procedimento quando aplicado em amostras reais. Este procedimento forneceu uma alternativa para a determinação de sulfeto na faixa de concentrações de 5 - 50 µg L^{-1}, apresentando desvio padrão relativo de 4,0%. Um limite de detecção de 1,7 g L^{-1}, a um nível de confiança de 99,7% foi conseguido. O sistema apresentou uma freqüência analítica de 12 amostras por hora.

Teixeira e Rocha (2007) também desenvolveram um procedimento analítico, baseado na associação das técnicas de injeção em fluxo e espectrofotometria em

fase sólida (FI – EFS) para determinação de ferro em amostras de água. TAN imobilizado em C-18 retém ferro(II) de forma reversível, formando um complexo marrom. Após e leitura do sinal, o íon ferro(II) é eluído com um pequeno volume de uma solução de ácido diluído, sem remoção do reagente imobilizado que pode ser usado para pelo menos 100 determinações. O procedimento desenvolvido é 10 vezes mais sensível em comparação com os procedimentos análogos com medidas feitas em solução, sendo adequado para a determinação de ferro em amostras de água com boa exatidão e precisão. O limite de detecção (99,7% de confiança), taxa de amostragem e coeficiente de variação (n = 10) foram estimados em 15 µg L^{-1}, 25 medições por hora e 4,0%, respectivamente. O procedimento proposto envolve a redução de geração de efluentes (3.6 mL por determinação) e consome quantidades micro de reagentes.

Existem três formas de desenvolver a formação do composto na fase sólida, que vai depender da natureza do componente da amostra (analito), do suporte sólido utilizado e do reagente cromogênico (YOSHIMURA E WAKI, 1985):

1. A fase sólida é adicionada a solução da amostra juntamente com o reagente cromogênico. Este procedimento pode ser aplicado quando a reação é altamente específica para o analito, e o complexo formado pode ser adsorvido pelo suporte sólido. O sistema ferro-1,10-fenantrolina é um exemplo desse processo.

2. O reagente cromogênico é adsorvido previamente na fase sólida e a partir deste ponto é adicionada a solução da amostra. Este procedimento é aplicado quando o complexo colorido não pode ser retido diretamente da solução da amostra. Neste caso, o reagente cromogênico pode ser

adsorvido no suporte sólido de forma irreversível. Exemplo: sistema níquel-PAR.

3. O analito é adsorvido previamente no suporte sólido e então o reagente cromogênico é adicionado. Este procedimento é aplicado quando o reagente cromogênico tem baixa seletividade, por exemplo, zinco pode ser concentrado em resina de troca iônica e então reagir com Zincon formando um complexo colorido.

A integração das etapas de retenção e detecção da espectrofotometria em fase sólida abre novas perspectivas para a automação de técnicas analíticas, sendo vantajoso em relação ao sistema análogo em solução. Como principal vantagem dos métodos espectrofotométricos pode ser citada a rapidez nas determinações (GUREVA E SAVIN, 2002). O aumento da sensibilidade está relacionado à inserção de um maior volume de amostra no sistema de trabalho e a concentração da espécie de interesse *in situ*. Por outro lado, a seletividade é indiretamente reforçada pela eliminação de efeitos de matriz, geralmente afetada por técnicas de separação prévia do analito de interesse (LUQUE DE CASTRO E VALCÁRCEL, 1991).

1.5. Reagentes espectrofotométricos e TAN

Compostos orgânicos ou inorgânicos quando utilizados em métodos espectrofotométricos e que reagem quimicamente acompanhados de mudança de cor, são chamados de reagentes espectrofotométricos (MARCZENKO, 1986).

A literatura mostra que dentre os reagentes cromogênicos mais freqüentemente empregados em análise espectrofotométrica, estão o 4-(2-tiazolilazo)-resorcinol (TAR) e o 1-(2'-tiazolilazo)-2-naftol (TAN). Outras substâncias também podem ser produzidas e derivadas a partir desses dois reagentes cromogênicos, resultando em compostos com diferentes propriedades e aplicações analíticas (HOVIND, 1975).

Reagentes cromogênicos como TAN (Figura 3) são extensamente utilizados para determinações espectrofotométricas por serem de fácil obtenção, purificação, e apresentar boa sensibilidade e seletividade em uma larga escala de pH, possibilitando a determinação de diversos íons metálicos (TEIXEIRA et al., 2001).

O TAN (Figura 3) possui coloração amarelo-alaranjado, ponto de fusão entre 139 e 141 ºC, sendo levemente solúvel em água, e facilmente solúvel em solvente orgânico. Em solução aquosa a mudança de coloração está associada com a dissociação do próton (UENO et al., 1992).

A estrutura do reagente espectrofotométrico TAN pode ser vista na figura abaixo:

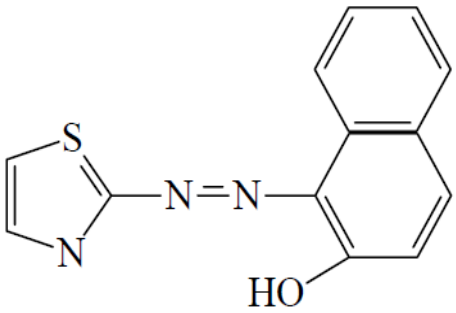

Figura 3. Estrutura do reagente cromogênico 1-(2'-tiazolilazo)-2-naftol (TAN). (Teixeira, 2000)

A literatura descreve a utilização do TAN como reagente espectrofotométrico para determinação de diversos íons, como níquel, vanádio e zinco (HOVIND, 1975; ANDERSON e NICKLESS, 1967). Wada e Nakagawa (1968) descreveram um método para determinação de níquel utilizando TAN e evidenciando sua maior seletividade para metais, pois não reage com cobalto(III) em meio amoniacal com valores de pH entre 9 e 10. Interferentes como cobre(II), zinco(II), cádmio(II) e manganês(II) podem ser eliminados por extração com clorofórmio. O complexo de Ni(II) com TAN teve como máximo de absorção em 595 nm ($\epsilon = 4,6 \times 10^4$ mol $^{-1}$ .cm $^{-1}$).

Vanádio(V) em concentração inferior a 2 µg mL^{-1} de solução foi determinado utilizando TAN a 0,1% em pH 2.3 na presença de tiocianato de potássio a 10% e o complexo formado apresenta máximo de absorção em 610 nm ($\epsilon = 1,50 \times 10^4$ mol $^{-1}$ cm $^{-1}$). O coeficiente de variação estimado em ± 0,82% (n = 10) e o menor erro relativo em ± 0,68%. Dentre todos os íons estudados somente Ni(II), Sc(II), V(IV) e EDTA são interferentes no método proposto (ESHWAR e SHARMA, 1987).

Teixeira et al. (2000) determinaram níquel e zinco espectrofotometricamente utilizando como reagente cromogênico 1-(2'-tiazolilazo)-2-naftol (TAN) imobilizado em sílica quimicamente ligada (C-18). Os experimentos foram feitos empregando diferentes vazões (0,85 e 1,9 mL.m^{-1}), em pH 6,2 e com máximo de absorção em 595 nm para os dois íons. O volume de amostra utilizado foi de 625 µL. O intervalo de confiança foi estimado em 95% e o coeficiente de regressão linear nos dois casos

foi de 0,999. Os coeficientes de variação foram estimados (n=10) como 1,1 e 1.7% (a 1.9 mL min^{-1}) e 1,2 e 2,1 (a 0,85 mL min^{-1}) para o zinco e níquel, respectivamente. Segundo Teixeira et al. (2000), enquanto a retenção de zinco é praticamente independente da vazão, a retenção de níquel é consideravelmente afetada em vazões maiores.

2. OBJETIVOS

Os procedimentos analíticos baseados em fotometria em fase sólida, desenvolvido com equipamentos de detecção comerciais, empregam cela de fluxo com caminho óptico de 1,5 mm. Neste trabalho foi investigada a viabilidade da fotometria em fase sólida empregando o processo de multicomutação em fluxo e cela de fluxo com caminho óptico de 3 mm. Foi empregado 1-(2'-tiazolilazo)-2-naftol (TAN) como reagente cromogênico. Para obtenção de um sistema de baixo custo foi usado um fotômetro construído com um LED como fonte de radiação e um fotodiodo como detector.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água purificada, com condutividade elétrica menor que 0,1 μS cm^{-1} e foram usados reagentes de grau analítico. Soluções dos reagentes foram estocadas em frascos de vidro âmbar.

Solução tampão de hexamina ($C_6H_{12}N_4$) 0,5 mol L^{-1} foi preparada por dissolução de 70,0950 g de hexamina e o pH foi ajustado para pH 7,0 com solução de ácido clorídrico (HCl) 5,0 mol L^{-1}.

Solução de cloridrato de hidroxilamina ($NH_2OH.HCl$) 1 % (m/v) foi preparada por dissolução de 1,0 g de cloridrato de hidroxilamina em 100 mL de água purificada.

Solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L^{-1} foi preparada pela diluição de 8,3 mL de HCl 12 mol L^{-1} em 1000 mL de água deionisada. A solução foi armazenada em frasco de polietileno.

Solução de 1-(2'-tiazolilazo)-2-naftol (TAN) ($C_{13}H_9N_3OS$) foi preparada por dissolução de 0,025 g de TAN em 1 mL de etanol. Essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL. O volume completado e aferido com solução de tensoativo Triton X-100 5% (m/v). Esta solução foi armazenada em frascos de vidro âmbar e guardada sob refrigeração.

Solução estoque de 1000 mg L^{-1} Co^{2+} foi preparada por dissolução de 4,0300 g de cloreto de cobalto ($CoCl_2.6H_2O$) em 1000 mL de água. Essa solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar.

Soluções padrão de cobalto nas concentrações de 0,0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mg L^{-1} foram preparadas a partir de uma solução de trabalho na concentração de 10 mg L^{-1}, preparada por diluição da solução estoque 1000 mg L^{-1} Co^{2+}. As soluções foram mantidas sob refrigeração quando não estavam em uso.

A fase sólida empregada para imobilizar o reagente cromogênico (TAN), sílica quimicamente modificada com o grupo octadecilsilano (C_{18}), foi obtida a partir do cartucho Sep-Pak (Waters Co.), e segundo o fabricante, o diâmetro das partículas de sílica estava na faixa entre 55 e 105 µm.

3.2. Equipamentos e acessórios

O módulo de análise foi construído conjunto por cinco válvulas solenóides (NResearch, HP225T031), tubos de polietileno (diâmetro interno 0,8 mm) e confluências feitas de acrílico. Um microcomputador equipado com interface analogical/digital PCL-711S (Advantech Corp.). utilizada para controlar o módulo de análise e efetuar aquisição de dados. Uma interface de potência de 12 V para acionamento das válvulas solenóides. Uma bomba peristáltica (ISMATEC, modelo IPC - 8) equipada com tubos de Tygon, (0,8 mm, d. i.) foi empregada para a propulsão dos fluidos.

O fotômetro foi construído usando como fonte de radiação um LED (Light Imitting Diode) de alta intensidade luminosa (λ = 580 nm, 10.000 mc) e um fotodiodo (IPL 10530 DAL; RS Eletronic Components) como detector. Este fotodiodo tem um circuito de amplificação de sinal integrado, que dispensa o uso de uma malha de amplificação externa.

O esquema eletrônico de alimentação do LED é o mesmo mostrado na Figura 4. Nessa configuração era possível ajustar a intensidade de emissão do LED, través do resistor acoplado à base do transistor.

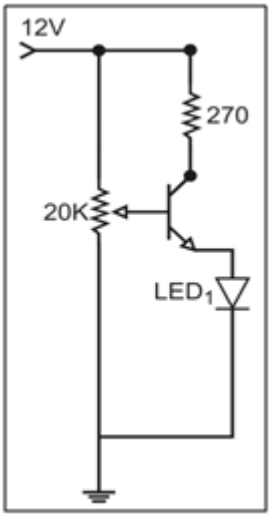

Figura 4. Circuito de alimentação do LED. Transistor BC547.

Para determinação do cobalto foi utilizada uma cela de fluxo construída em acrílico com caminho óptico de 3 mm e diâmetro interno de 2,0 mm, preenchida com sílica funcionalizada (C_{18}), montada sobre um suporte feito de acrílico. Como mostrado na Figura 5, o LED foi posicionado alinhado com o guia de onda no sentido longitudinal. Nesta configuração, a radiação emitida pelo LED atravessava todo o caminho ótico da cela de fluxo contendo a sílica funcionalizada (C_{18}) e insidia sobre o detector.

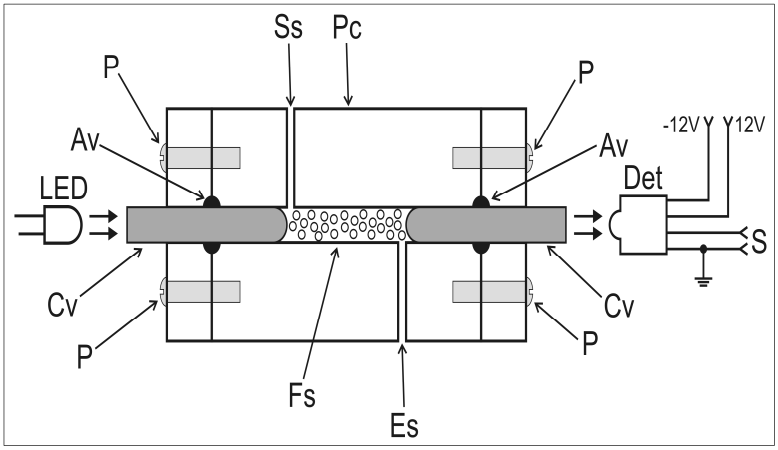

Figura 5. Vista em corte da cela de fluxo com a fase sólida. Av = anéis de vedação; Cv = cilindros de vidro de 2,0 mm de diâmetro; DET = fotodiodo, IPL 10530 DAL; Fs. = fase sólida (C-18); LED = diodo emissor de Luz (λ = 580 nm); P = parafusos; Pc = corpo da cela, placa de acrílico; S = sinal de saída em mV; Ss e Es = saída e entrada de soluções, respectivamente; tela de 400 mesh para retenção da fase sólida (não mostrada na figura).

3. Preparo e digestão das amostras

As amostras de complexos vitamínicos foram adquiridas em farmácias do comércio local. Seguindo a literatura (TEIXEIRA el al., 2001) um comprimido foi triturado e 1,0000 (± 0,0003) g da amostra foi pesado e transferido para um cadinho e calcinado por 3 horas a 400ºC.

As amostras foram retomadas com solução de HCl 0,24 mol L^{-1}. A solução era transferida para o cadinho contendo a amostra calcinada, agitada e filtrada em papel de filtro, sendo recolhida diretamente em balão volumétrico de 25,0 mL. Após transferência quantitativa da amostra, o volume era completado com a própria

solução de HCl 0,24 mol L^{-1}. A solução das amostras foi mantida sob refrigeração para posterior utilização.

Segundo Teixeira et al. (2001) o método de preparo da amostra para as determinações analíticas consiste em tomar uma alíquota da solução da amostra, transferir para um balão volumétrico de 25,0 mL, e adicionar de 10,0 mL de solução de solução tampão de hexamina 0,5 mol L^{-1} e 2,0 mL de solução de cloridrato de hidroxilamina 1%.

3.4. Descrição do módulo de análise e procedimento experimental

No presente trabalho, o módulo de análise do sistema proposto é mostrado na Figura 6. Foi desenvolvido baseado no processo de multicomutação, considerando-se as características necessárias para implementar o procedimento analítico proposto. O programa computacional de controle e aquisição de dados foi escrito em linguagem Quick BASIC 4.5, permitindo que o computador controlasse o funcionamento do módulo de análise. O módulo de análise era gerenciado de acordo com a seqüência de acionamento das válvulas solenóides, e o volume de solução inserido era função do tempo de acionamento de cada válvula e da vazão de bombeamento.

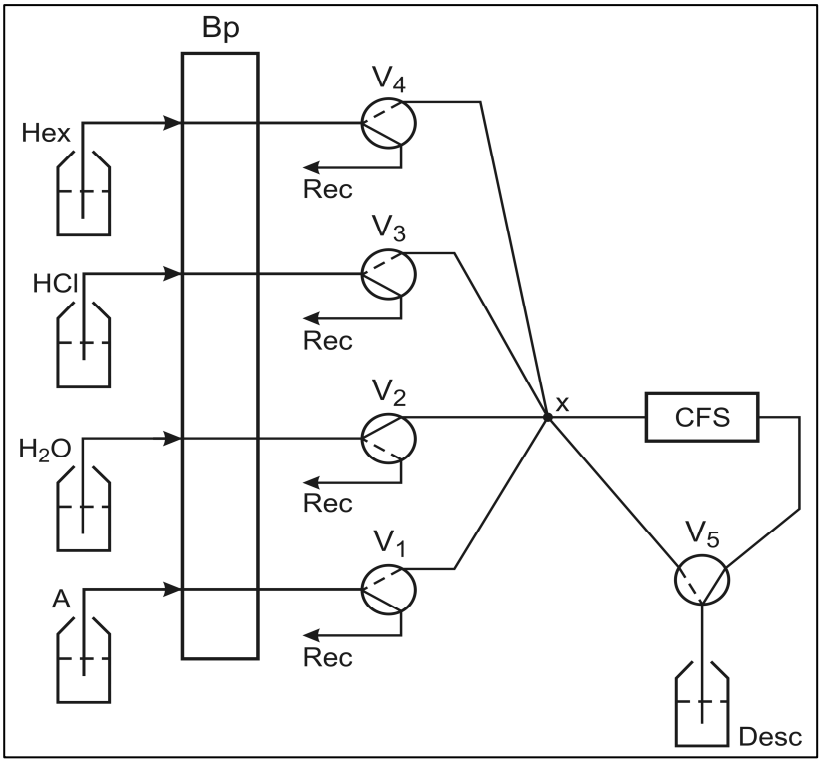

Figura 6. Diagrama do sistema em fluxo do módulo de análise. Bp = bomba peristáltica; V_1, V_2, V_3, V_4 e V_5 = válvulas solenóide de três vias; Rec. = recuperação das soluções; Desc. = descarte de soluções; A = amostra ou solução padrão contendo cobalto; H_2O = água; HCl = ácido clorídrico, 0,1 mol L^{-1}; Hex = solução tampão de hexamina, 0,5 mol L^{-1}, pH 7,0 ; X = confluência, CFS = cela de fluxo com a fase sólida. As flechas indicam a direção de deslocamento das soluções. A linha contínua no interior dos símbolos das válvulas indica a passagem da solução com a válvula desligada e a linha tracejada indica o caminho seguido pela solução quando a respectiva válvula estiver ligada.

Na configuração mostrada inicialmente, todas as válvulas solenóides estão desligadas e somente água (H_2O) está passando continuamente através do percurso analítico em direção a cela de fluxo/detector (CFS/Det), rumo ao descarte (Desc).

Quando o programa de controle era colocado em funcionamento, ocorria o acionamento simultâneo da V_1 e V_2, interrompendo o fluxo da água e a solução da amostra (A) era bombeada em direção à cela de fluxo. O analito era então adsorvido

no suporte sólido contendo o reagente cromogênico (TAN) previamente imobilizado. O fotodetector acoplado à cela de fluxo gerava um sinal (mV) proporcional à concentração do Co(II) presente na solução. Em seguida, acionando-se as válvulas V_1 e V_3 simultaneamente, o fluxo da solução da amostra era interrompido e a solução do eluente (HCl) era bombeada através da cela de fluxo, para remover o analito. Em seguida, todas as válvulas eram desligadas e somente a água era bombeada para lavar a fase sólida. Na seqüência do procedimento, as válvulas V_2 e V_4 eram acionadas para inserir solução tampão de hexamina, e assim preparar o suporte sólido para um novo ciclo de trabalho. Após o tempo programado e a aquisição dos dados, o procedimento analítico era reiniciado. Quando um novo ciclo do programa iniciava e a solução da amostra era trocada, as válvulas V_2, V_1 e V_5 eram acionadas para que o fluxo da água fosse interrompido e a nova solução da amostra lavasse o canal por onde a solução da amostra passou anteriormente. Nesta etapa a válvula V_5 era mantida ligada para desviar o fluxo para o descarte sem passar por dentro da cela de fluxo. Na Tabela 1 está mostrada a seqüência de eventos executados pelo computador, empregando o software de controle e aquisição de dado desenvolvido. Os tempos aqui mostrados já estão nas condições ótimas de trabalho.

Tabela 1 - Seqüência de atividades executadas pelo computador.

Atividade	V_1	V_2	V_3	V_4	V_5	Tempo (s)
Lavagem	0	0	0	0	0	60
Amostragem	1	1	0	0	0	40

Leitura	0	0	0	0	0	20
Eluição	0	1	1	0	0	40
Condicionamento	0	1	0	1	0	20

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ítens seguintes serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no presente trabalho, e compreende os estudos das seguintes variáveis: imobilização do reagente cromogênico no suporte sólido (C_{18}); estudo do comprimento de onda (λ); efeito do volume de amostra; eluição com ácido para remover o analito; efeito da vazão de bombeamento na retenção do cobalto; estudo do pH das amostras; estudo comparativo da curva de analítica em meio ácido e em meio aquoso; estudo das amostras reais e curva analítica de calibração e estudo dos íons interferentes.

4.1. Imobilização do reagente cromogênico no suporte sólido (C_{18})

Segundo Teixeira (2001), a solução do reagente cromogênico (TAN) deveria ser bombeado através do suporte sólido (C_{18}) já contido no interior da cela de detecção fotométrica. Nos experimentos iniciais foram seguidas as condições citadas na literatura usada como referência nesse trabalho (TEIXEIRA et. al, 2001). Então, o suporte sólido foi colocado na cela de fluxo previamente à imobilização. A vazão de bombeamento da solução de TAN 0,025 % foi mantida em 1,5 mL min^{-1}. Após a imobilização, o C_{18} já modificado com TAN foi exaustivamente lavado com água ultrapura. Após esse procedimento, o suporte sólido estava pronto para ser utilizado na determinação do analito.

Nos estudos preliminares feitos para verificar a eficiência da imobilização do reagente cromogênico (TAN), foi usada uma solução de referência de cobalto com concentração de 0,75 mgL^{-1}. Os resultados foram obtidos passando-se

aproximadamente 367 μL de solução de referência no sistema em fluxo. Observou-se que ocorria retenção do analito, mas não havia repetibilidade. Com a finalidade de mostrar a eficiência da imobilização do TAN no C_{18}, nova solução referência de cobalto 0,25 mg L^{-1} foi passada através do sistema contendo o mesmo C_{18}. O tempo decorrido entre a realização do primeiro experimento e o segundo foi de 12 h. O volume de amostra inserido no sistema variou de 367 a 1.830 μL, enquanto o volume das soluções de tampão hexamina, eluente (HCl) e água inserido no sistema foram mantidos constantes. Os resultados mostraram uma melhor resposta após 12 h decorridas da imobilização, ou seja, melhor repetibilidade dos sinais analíticos, indicando que o tempo de contato entre o TAN e a superfície do suporte sólido (C_{18}) era fator de grande importância para o procedimento analítico. Os resultados obtidos são mostrados na figura abaixo.

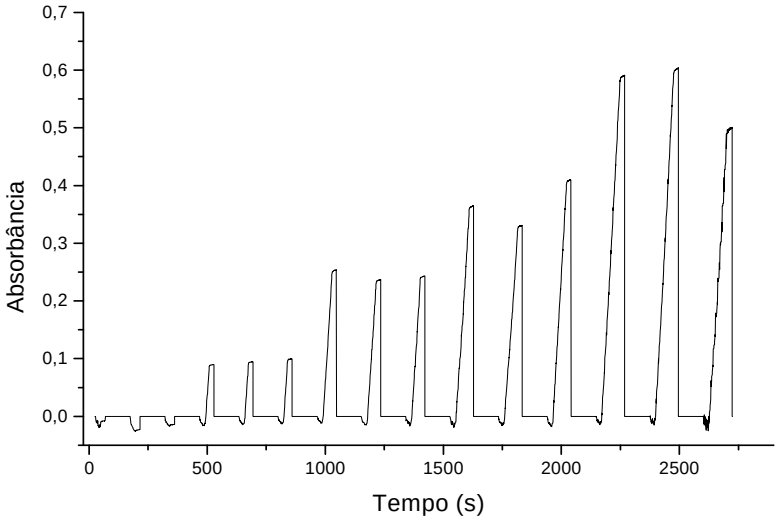

Figura 7. Registros obtidos variando o volume de amostra inserido no sistema. Condições operacionais: solução de referência de Co(II) 0,25 mgL^{-1}; reagentes HCl (0,1 mol L^{-1}), solução tampão de hexamina (0,5 mol L^{-1}) e água ultra-pura. Vazão de bombeamento da água = 1,0 mL min^{-1}. Imobilização *on-line*.

Visando obter sinais analíticos com melhor repetibilidade, foi experimentada a imobilização do TAN no C_{18} feita externamente à cela de fluxo (*off-line*). O conteúdo de um cartucho de C_{18} Sep-Pak (Waters Co.) foi lavado uma vez com 2,0 mL metanol, depois com 2,0 ml de solução de metanol e água 1:1 e finalmente com 2,0 mL de água ultra pura. Aproximadamente 0,50 mg de C_{18} foi colocado em 2,0 mL da solução de TAN 0,025 % e deixado em repouso por 6 h. Após este período, o C_{18} com TAN imobilizado foi colocado na cela de fluxo até encher a caminho óptico (3 mm). Experimento foi realizado empregando as mesmas condições operacionais descritas no parágrafo anterior, e os resultados obtidos são mostrados na Figura 8.

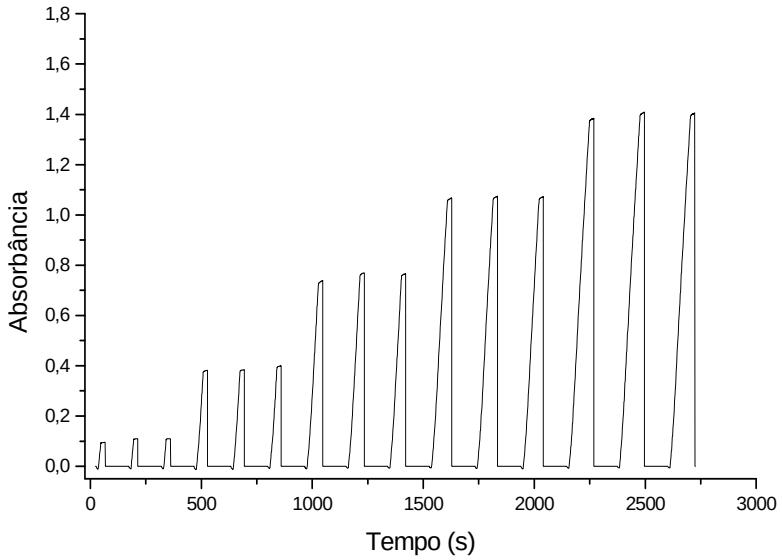

Figura 8. Registros dos sinais analíticos obtidos em função do tempo de retenção. Condições operacionais: solução de referência de Co(II) 0,25 mgL^{-1}; reagentes HCl (0,1 $molL^{-1}$), solução tampão de hexamina (0,5 $molL^{-1}$) e água ultra-pura. Vazão de bombeamento da água = 1,0 mL min^{-1}. Imobilização *off-line*.

Neste experimento, a vazão de bombeamento da solução de referência foi mantida em 1,0 mL min^{-1} (17 µL s^{-1}), os tempos de bombeamento variaram de 20 a 100 s, portanto o volume de solução bombeado através da fase sólida variou de 340 a 1.700 µL. Observa-se, nesta figura, que o sinal analítico aumenta em função do volume da solução de referência de forma mais acentuada do que o observado na Figura 7. Além disso, observa-se uma significativa melhoria na repetibilidade dos registros. A partir desse experimento, foi decidido que volume de amostra a ser usado seria de 733 µL. Então, o intervalo de tempo de bombeamento da solução foi estabelecido em 40 s.

Na Figura 9 são mostradas as curvas analíticas referentes aos dois experimentos, onde se observa que além da melhor sensibilidade, o comportamento da curva do segundo caso tem uma melhor resposta, considerando-se a linearidade como parâmetro.

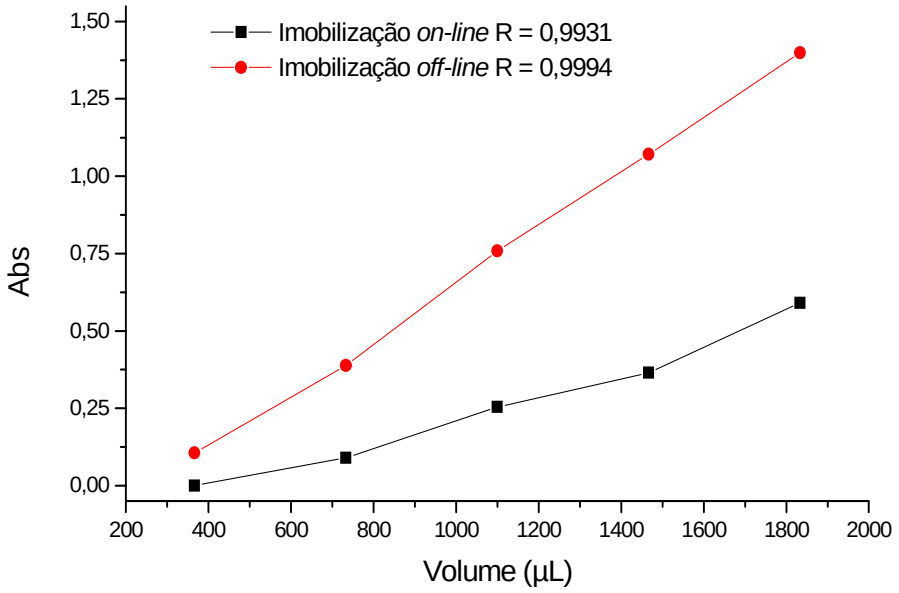

Figura 9. Curva referente ao efeito da imobilização do TAN no suporte sólido de forma *off-line* e *on-line*. Esta curva foi traçada a partir dos valores máximos dos registros das Figuras 7 e 8.

4.2. Estudo do comprimento de onda (λ)

O complexo formado a partir da reação do Co(II) com o TAN apresenta coloração lilás, havendo a necessidade de obtenção dos respectivos espectros das espécies que participam da reação, na região do visível com o intuito de caracterização. A literatura cita que o complexo de Co e TAN absorve em 619 nm. Segundo Teixeira (1999) quando o TAN é previamente adsorvido no C_{18} e reage com o Co(II), ocorre o deslocamento do máximo de absorção para 572 nm.

Com a finalidade de confirmar o máximo de absorção do composto formado, foi feito um estudo do comprimento de onda para escolher o LED que seria utilizado nesse trabalho, e para tanto foram usados LEDs de 580 e 590 nm. Para este ensaio, o volume de amostra usado foi de 733 μL, e as soluções de referencia previamente preparadas estavam na faixa de concentração de Co (II) 0,05 a 1,0 mg L^{-1}. A partir dos resultados obtidos foram traçadas as curvas mostradas na Figura 10.

A literatura cita que o composto formado entre o cobalto e o TAN imobilizado no C_{18} absorve em 572 nm, contudo não foi possível usar um LED com esse comprimento de onda específico. Considerando-se que o LED tem largura de banda de emissão de ± 25 nm, e que o composto a ser monitorado também tem uma banda de absorção relativamente larga (talvez da mesma ordem), então poderíamos empregar o LED de 580 nm. Os resultados mostrados nesta figura confirmam essa esta possibilidade.

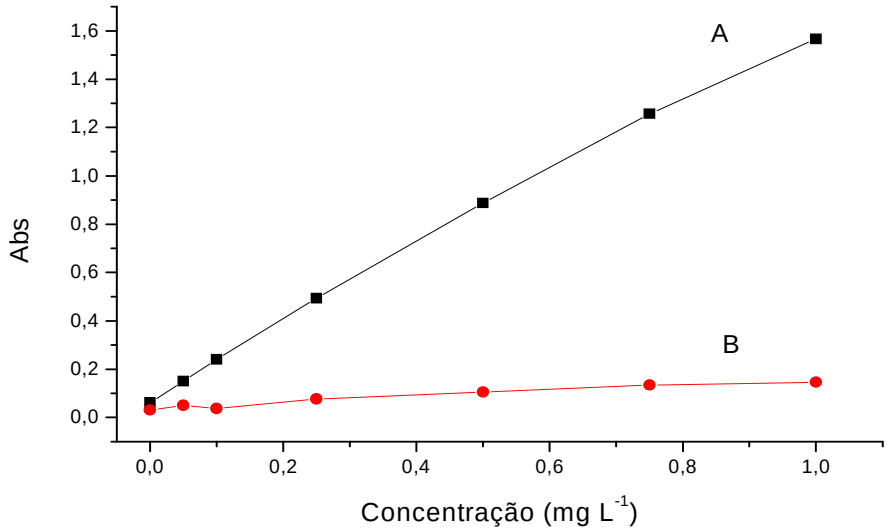

Figura 10. Registros dos sinais analíticos obtidos em função da variação dos comprimentos de onda (λ). [Co^{2+}] = 0,25 mg mL^{-1}. (A) LED de 580 nm e (B) LED de 590 nm.

4.3. Efeito do volume de amostra

Em sistemas de análise por injeção em fluxo, o valor do sinal analítico tende a aumentar com o volume da amostra inserida no sistema, portanto este parâmetro foi investigado para encontrar as melhores condições de trabalho, com o objetivo de obter boa sensibilidade.

O volume da amostra pode ser variado durante a realização do experimento, contudo o sistema utilizado nesse trabalho não utiliza as usuais alças de amostragem. No presente caso, o efeito do volume do foi investigado variando o tempo de inserção da solução de referência, mantendo a vazão de bombeamento

constante. Para avaliar esse efeito, o programa de controle foi instruído para incrementar, seqüencialmente, o intervalo de tempo para inserção da solução de referência. O incremento era feito após completar o número de replicatas programadas. Depois de executado o número de replicatas programadas, ele passaria a inserir um novo volume de amostra, determinado de acordo com as modificações feitas. O tempo de amostragem variou de 20 a 240 s, portanto o volume da amostra variou de 367 a 4.400 µL. Estes experimentos foram realizados usando soluções de referência de cobalto com concentrações de 0,25 e 0,50 mg L^{-1}. O gráfico abaixo representa a variação da absorbância em relação ao volume de amostra inserido no sistema.

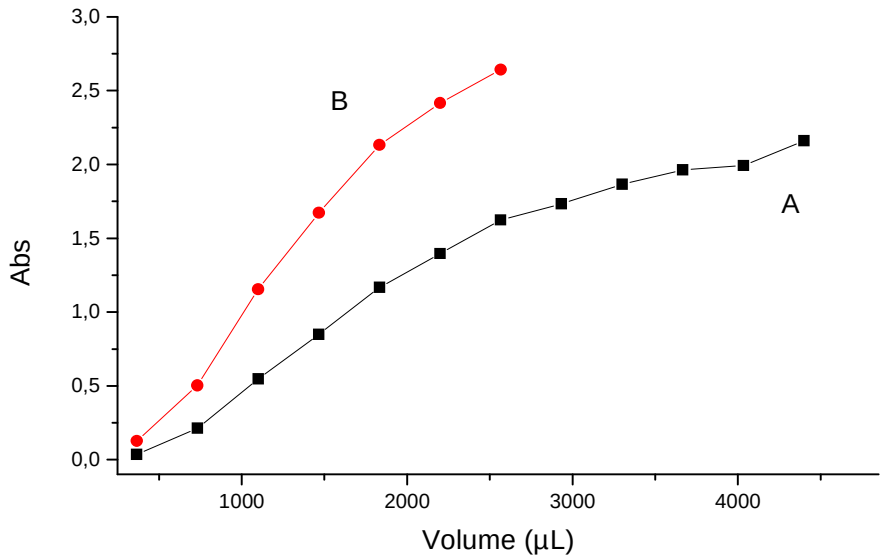

Figura 11. Registros dos sinais analíticos obtidos em função da variação do volume de amostra. Condições operacionais: (A) solução de referência de Co^{2+} 0,25 mg mL^{-1} e (B) solução de referência de Co^{2+} 0,50 mg mL^{-1}. Reagentes: solução de HCl (0,1 mol L^{-1}), solução tampão de hexamina (0,5 mol L^{-1}) e água ultra-pura. Vazão de bombeamento da água = 1,0 mL min^{-1}. A massa de C_{18} modificada com TAN usada nos experimentos foi 8,7 mg.

Estas curvas indicam que a imobilização do reagente *off-line* é muito eficiente. Observa-se, nos dois casos, que ainda não há uma tendência à saturação, mesmo considerando-se que a absorbância supera 2 unidades. Neste caso, temos um dado adicional de grande importância instrumental, o desempenho de detecção fotométrica.

4.4. Estudo do volume de ácido para remover o analito

Para remover o complexo formado entre a fase sólida (C_{18}) e o Co(II) poderiam ser usados solventes, agentes complexantes ou soluções ácidas diluídas. A fase sólida (C_{18}) modificada com o reagente cromogênico (TAN) é estável em soluções ácidas e neutras (TEIXEIRA et al., 2000). A literatura tem mostrado que as soluções ácidas diluídas têm sido usadas na maioria das vezes (TEIXEIRA E ROCHA, 2003), portanto para remoção do cobalto foram usados nos experimentos realizados soluções de HCl nas concentrações de 0,1 e 0,05 mol L^{-1}. Os resultados mostraram que o HCl 0,1 mol L^{-1} poderia ser usado sem prejuízos na remoção do cobalto, tendo sido essa a concentração escolhida para o eluente.

4.5. Efeito da vazão de bombeamento na retenção do cobalto

O estudo de efeito da vazão de bombeamento foi feito mudando a vazão da passagem da amostra pela cela de fluxo contendo C_{18} modificado com TAN, onde a velocidade de rotação da bomba peristáltica foi modificada para obter as vazões de 0,50; 1,1; 1,6 e 2,1 mL min^{-1}. Nestes experimentos foi usada solução de referência de Co(II) com concentração variando de 0,05 a 1,0 mg mL^{-1}.

Observou-se que quando o sistema trabalhava em baixa vazão de bombeamento (0,50 mL min^{-1} de amostra) não havia sinal analítico que mostrasse que tivesse havido retenção do cobalto. Este comportamento foi observado inserindo um volume de amostra de aproximadamente 333 µL. Quando o sistema trabalhava na vazão de 2,1 mL min^{-1} houve aumento excessivo da pressão e os vazamentos não permitiram a realização de experimentos.

Os resultados obtidos para as vazões de 1,1 e 1,6 mL min^{-1}, com volume de amostra de 733 e 1.067 µL respectivamente, estão mostrados na Figura 12.

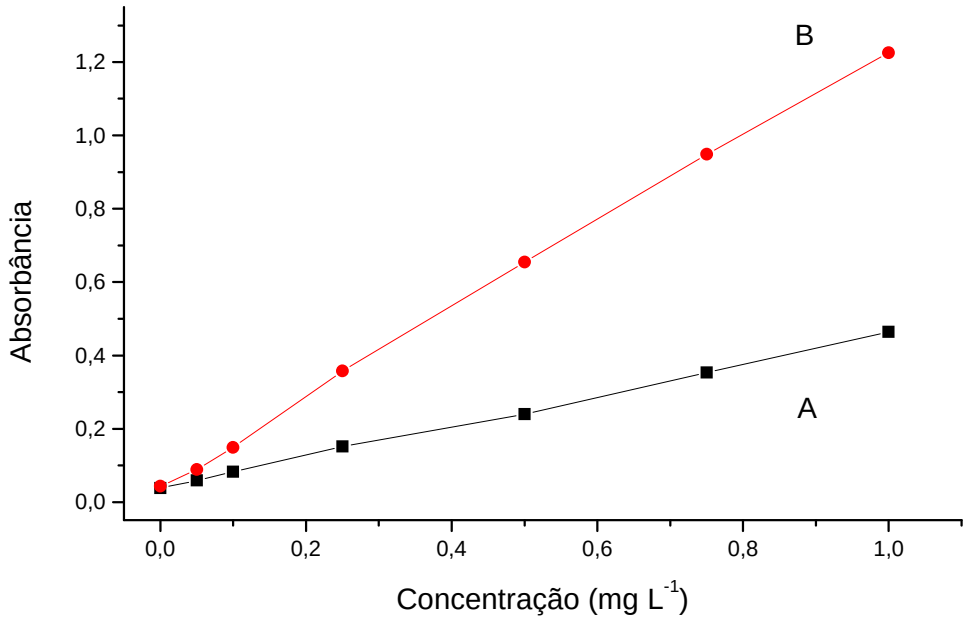

Figura 12. Registros obtidos variando a vazão de bombeamento. Condições operacionais: solução de referência de Co(II) variando 0,05 a 1,0 mg mL^{-1}; reagentes HCl (0,1 mol L^{-1}), solução tampão de hexamina (0,5 mol L^{-1}) e água ultra-pura para lavar a fase sólida. (A) Vazão de bombeamento de 1,1 ml L^{-1} e (B) Vazão de bombeamento de 1,6 mL min^{-1}. Os volumes de amostra inseridos foram de 733 e 1.067 µL, respectivamente.

Os resultados indicaram que na vazão de 1,6 mL min^{-1} o coeficiente angular é maior, mostrando boa sensibilidade. Considerando o ganho de sensibilidade, a vazão de 1,6 mL min^{-1} deveria ser escolhida, entretanto devido à ocorrência de vazamento que acorram durante a realização do experimento, a vazão de trabalho escolhida foi a de 1,1 mL min^{-1}. Em virtude de a fase sólida ser formada por partículas de pequeno diâmetro, a impedância hidrodinâmica do sistema é muito alta, então com o aumento da vazão temos a possibilidade de ocorrência de vazamento, ou mesmo ruptura de conexões.

4.6. Estudo do pH das amostras

A capacidade de retenção do cobalto das soluções aquosas foi estudada através da variação do pH das amostras. O estudo foi feito usando uma solução de cobalto com concentração de 1,0 mg L^{-1}, e o os valores de pH ajustados com a mesma solução de HCL 0,24 mol.L^{-1} usada para retomar as amostras de fármacos após a calcinação. A solução tampão de hexamina 0,5 mol L^{-1} e pH 7,0 foi usada para manter o pH do meio constante. Os resultados são mostrados na Figura 13, onde podemos observar que a acidez do meio exerce forte influência na retenção do analito até pH 6,5. Observa-se que entre pH 6,5 e 7,0, não ocorre variação significativa de sinal, portando uma tampão de hexamina pH 7,0 foi usada para manter o pH do meio.

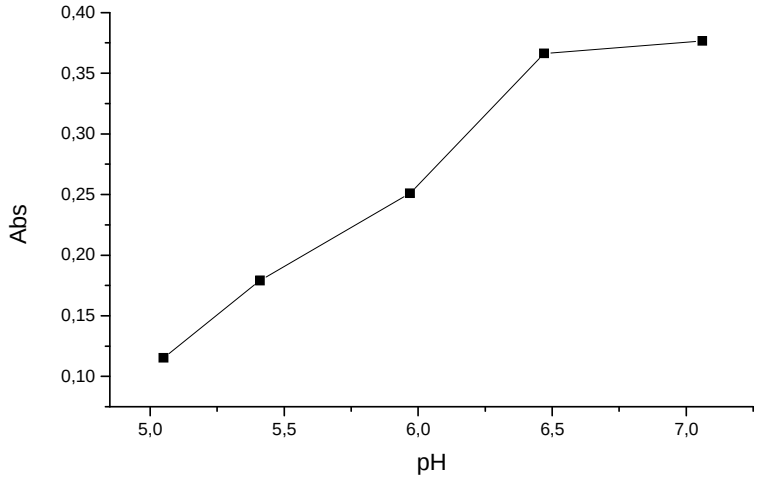

Figura 13. Registros obtidos variando o pH das amostra inseridas no sistema. Condições operacionais: solução de referência de Co(II) 1,0 mg mL^{-1}; solução de HCl (0,1 mol L^{-1}), solução tampão de hexamina (0,5 mol L^{-1}) e água; vazão de bombeamento da água = 1,0 mL min^{-1}.

4.7. Estudo comparativo da curva de calibração em meio ácido e em meio aquoso

As amostras de fármacos foram calcinadas e retomodas em solução de HCL 0,24 mol L^{-1}, e tendo em vista essas condições foram realizados testes comparativos entre as curvas analíticas, obtidas com soluções de referência com concentrações de 0,0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mg L^{-1} preparadas em solução de HCl 0,24 mol L^{-1} e em água ultra pura. As curvas analíticas obtidas a partir dos valores máximos de absorbâncias são mostradas na Figura 14, onde se observa que houve uma pequena variação na magnitude do sinal usando as soluções de referência em água.

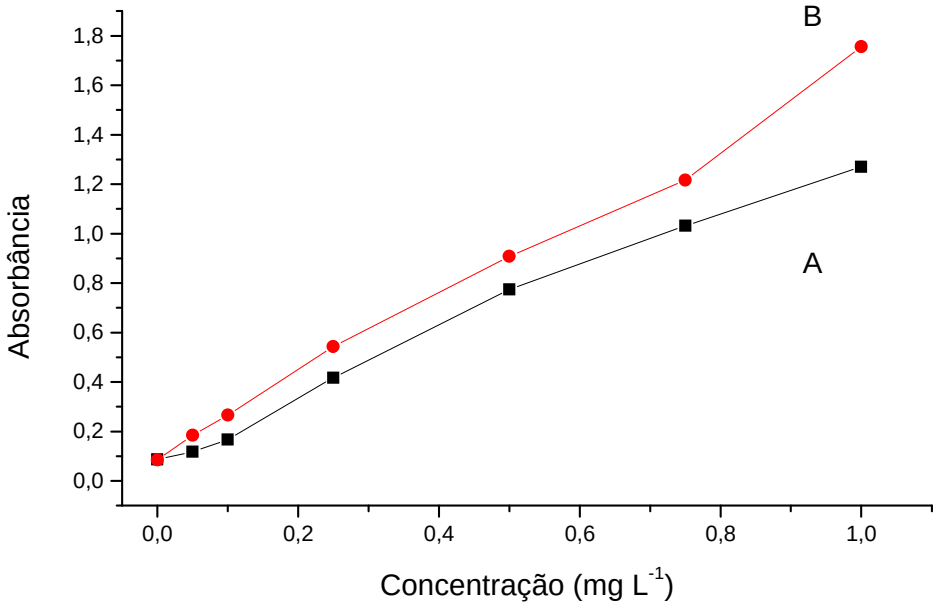

Figura 14. Comparação para os registros dos perfis analíticos obtidos em meio ácido e aquoso. Os registros foram obtidos em meio ácido (A) e meio aquoso (B). Condições operacionais: Solução de referência de Co(II) (0,25 mg mL^{-1}) = 667 µL, Volume de HCl (0,1 $mol.L^{-1}$) = 773 µL, Solução tampão de hexamina (0,5 $mol.L^{-1}$) = 367 µL. Vazão de bombeamento da água = 1,0 mL min^{-1}.

4.8. Estudo da faixa de resposta linear e aplicação em amostras reais.

Com o objetivo de atestar a aplicação do sistema proposto, um conjunto de soluções de referência (concentração na faixa de 0,05 a 2,0 mg L^{-1}) e amostras de fármacos mineralizadas em meio ácido foi processada. Na Figura 15 é mostrada a curva de regressão linear obtida a partir dos dados coletados no processamento das soluções de referência, sendo representada pela seguinte equação: Abs = 0,09196 + 1,79605C.

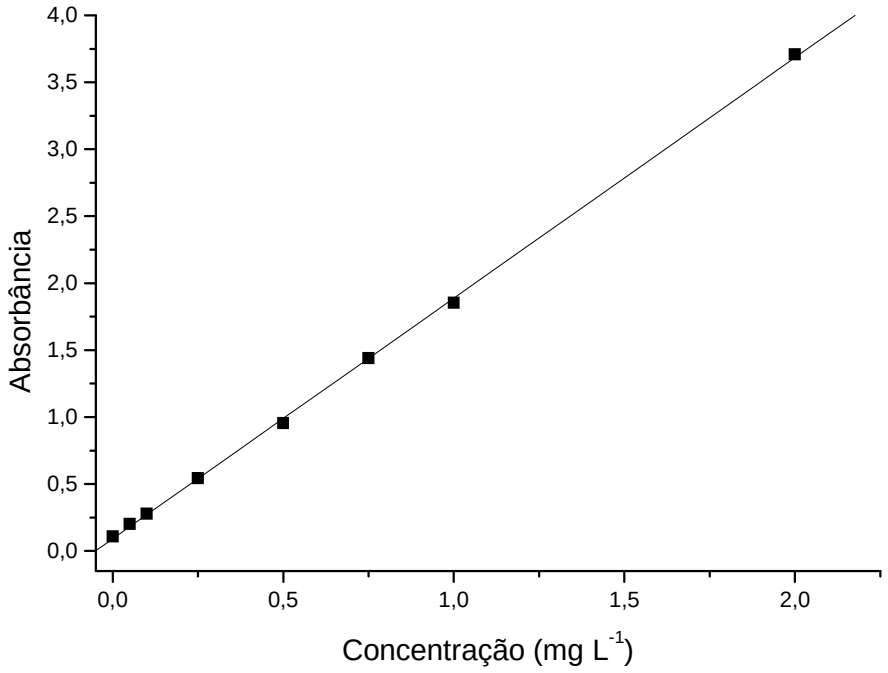

Figura 15. Curva analítica referente às soluções de referência usadas para a determinação de cobalto nas amostras.

Tomando-se como parâmetro de medida o valor máximo dos registros foi traçada a curva da Figura 15, apresentando os seguintes parâmetros de regressão linear: intersecção (A) = 0,09196; coeficiente angular (B) = 1,79605 e coeficiente de regressão linear (R) = 0,9998. Os limites de detecção e quantificação foram estimados como 0,0166 e 0,055, respectivamente e a precisão expressa como DPR, foi de 4,2% (n = 9).

Na Figura abaixo são mostrados os registros dos sinais analíticos obtidos processando o conjunto de soluções de referência e sete amostras. Os dados obtidos para as amostras processadas são mostrados na Tabela 2.

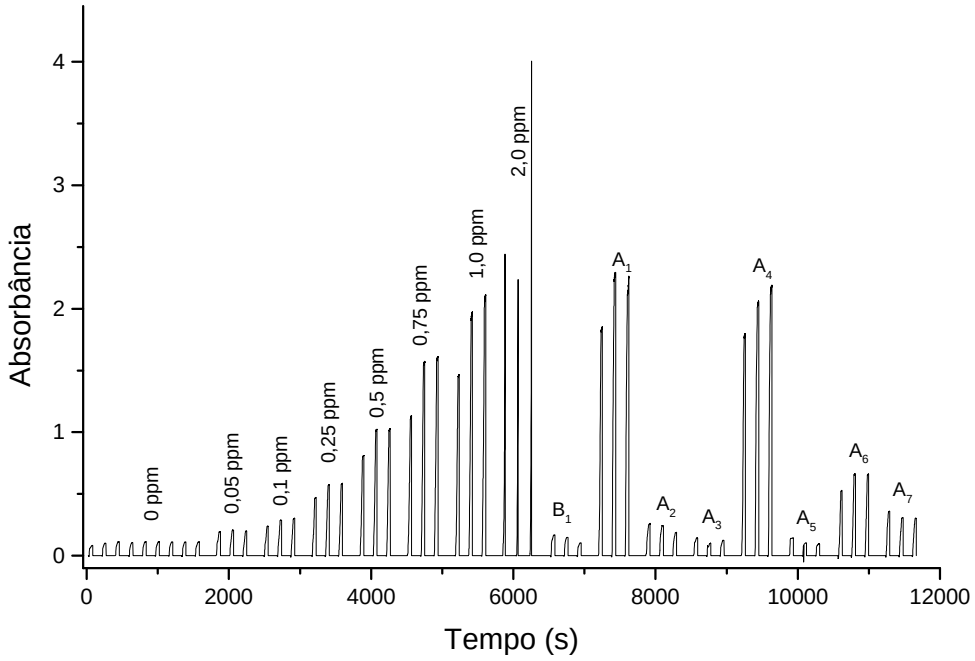

Figura 16. Perfil analítico obtido empregando solução de referência de cobalto e 7 amostras diferentes de fármacos. Os parâmetros operacionais utilizados foram os mesmos da Figura 14. Legenda: B_1: branco da amostra; A_1: Dorical; A_2: Vitatonus; A_3: La Vitan; A_4: Vytinal; A_5: Beminal; A_6: Tongifort; A_7: Complexo B Plus Roche.

Tabela 2 Resultados obtidos na determinação de cobalto em digeridos de fármacos empregando C_{18} modificado com TAN. Os dados, em mg L^{-1} Co(II), são valores estimados para as médias e os desvio-padrão dos resultados obtidos em triplicata.

Amostra	Método proposto (mg L^{-1})*
Dorical	0,8958 ± 0,0451
Vitatonus	0,0782 ± 0,0357
La Vitan	Nd
Vytinal	1,0721 ± 0,0602

Beminal	Nd
Tongifort	0,1596 ± 0,01582
Complexo B Plus	0,0572 ± 0,0036

Nd – não-detectado

*Média de três determinações

O sistema proposto permitia efetuar 17 determinações por hora, consumindo por determinação 667µL de amostra, 7,0 µL de HCl concentrado, e 0,8 µL de solução tampão de hexamina, gerando 3,0 mL de efluente.

A Tabela abaixo mostra um resumo dos parâmetros otimizados no desenvolvimento do procedimento analítico:

Tabela 3. Resumo dos parâmetros experimentais obtidos para o procedimento analítico.

Parâmetro	Faixa estudada	Escolhido
Caminho ótico (mm)	1 - 3	3
Volume de amostra (µL)	367 – 4.400	667
Volume de Hexamina (µL)	367 – 2.750	367
Volume de HCl (µL)	183 – 2.750	733
Volume de água (µL)	183 – 2.750	1.000
Vazão da amostra (ml min^{-1})	0,5 – 2,1	1,0

Vazão da água ($ml.min^{-1}$)	0,5 – 2,1	1,0
Vazão do HCl ($ml.min^{-1}$)	0,5 – 2,1	1,1
Vazão da solução tampão ($ml.min^{-1}$)	0,5 – 2,1	1,1
Tempo de recondicionamento da fase sólida (s)	20 - 150	20

4.9. Estudo dos íons interferentes.

Anderson e Nickless (1967) relatam em um review que o TAN é seletivo para a determinação de cobalto. Hovind (1975) também afirma a capacidade de seletividade do TAN

Embora a literatura relatasse a seletividade do TAN, um estudo foi feito para ver o comportamento dos possíveis íons interferentes nas amostras. Foram observados os íons presentes nas amostras de fármacos e os mesmos foram usados como referências para o estudo dos concomitantes. Assim, os estudos com os possíveis interferentes foram realizados utilizando como solução de referência uma solução Co(II) 1,0 mgL^{-1} em HCl 0,24 $molL^{-1}$, tampão de hexamina 0,5 $molL^{-1}$ pH 7,0, cloridrato de hidroxilamina 1% e a solução dos cátions e ânios em questão.

Os ânions estudados foram: fosfato e sulfato. Os cátions estudados foram: potássio, zinco, sódio, manganês, magnésio e ferro. As concentrações dos cátions variaram entre 1, 10 e 100 mg L^{-1}.

Os resultados mostraram que os seguintes cátions e ânions, quando presentes interferiram nas três concentrações estudadas entre parênteses (mg L^{-1}): K^{+} (1, 10 e 100); Zn^{2+}(1, 10 e 100); Na^{+} (1, 10 e 100); Mn^{2+} (1, 10 e 100); PO_4^{3-} (1, 10 e 100); Mg^{2+} (1, 10 e 100); SO_4^{2-} (1, 10 e 100); Fe^{3+} (1, 10 e 100).

Considerou-se como critério de aceitabilidade interferências em torno de 5%. Observou-se que dentre os cátions e ânions testados, o zinco foi o único que apresentou tolerância máxima para concentrações de 10 mg L^{-1}, Os demais cátions e ânions apresentaram valores de interferência maiores do que 5%.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos a cela proposta apresenta características compatíveis para análise química em fluxo e fotometria em fase sólida, contudo o emprego de fase sólida na cela de fluxo causou aumento da impedância hidrodinâmica do sistema, podendo causar vazamentos em vazões mais altas. A geometria desta cela possibilitou trabalhar com caminho de 3.0 mm sem vazamento.

O emprego de LED com emissão de alta intensidade (10000 mcd) permitiu que o caminho óptico da cela de fluxo fosse maior do que o usado em equipamento comercial (TEIXEIRA et al., 1999). Portanto, podemos concluir que esta geometria de cela tem desempenho superior aquela usada em trabalho anterior. O limite de detecção pode ser melhorado, aumentando o tempo de bombeamento da amostra através da fase sólida.

Não temos um procedimento analítico concluído, pois não foi efetivada a exatidão dos resultados obtidos, processando amostras de fármacos. O objetivo do trabalho era verificar as possibilidades de usar uma cela de fluxo com caminho óptico maior do que o usual em fotometria de fase sólida, empregando um fotômetro de LED. Os resultados obtidos comprovam que é perfeitamente viável. A cela de fluxo apresentou vazamento para vazões superiores a 1,1 mL por minuto, entretanto mostrou que não perdia a capacidade de retenção do analito. Considerando que esta cela é um protótipo de primeira geração, então o aperfeiçoamento em sua construção resolverá este defeito. O importante é que a geometria da cela favorece o acoplamento ao módulo de análise e a operação do sistema como um todo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AÇ, B.; ALPDOAN, G.; SUNGUR, S. Liquid chromatographic determination of Co(II), Cu(II), Ni(II), and Fe(II) using Di-2-pyridylketon Thiosemicarbazone (DPKT) as derivatizing reagent', **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies,** v. 31, p.1299 - 1305, 2008.

ALVES, A. N. L.; ROSA, H. V. D. Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos. **Revista Brasileira de Ciências Framacêuticas**, v. 39, p. 129 – 139, 2003.

ANDERSON, R. G.; NICKLESS, G. Thyazolylazo dyes and their applications in analytical chemistry. A review. **The Analyst,** v. 92, p. 207-238, 1967.

BAGHBAN, N.; SHABANI, A. M. H.; DADFARNIA, S.; JAFARI, A. A. Flame Atomic Absorption Spectrometric Determination of Trace Amounts of Cobalt after Cloud Point Extraction as 2-[(2-Mercaptophenylimino)methyl]phenol Complex. **Journal of Brazilian Chemichal Society,** vol. 20, p. 832-838, 2009.

BERGAMIN FILHO, H.; MEDEIROS, J. X.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G. Solvente extraction in flow analysis: determination of molibidenium in plant material. **Analytica Chimica Acta**, v. 101, p. 09-15, 1978.

BELLÚ, S.; RIZZOTTO, M.; OKULIK, N.; JUBERT, A. The interaction between sulfathiazole and cobalt(ii): potentiometric studies. **Química *Nova*,** vol. 30, p. 1136-1142, 2007.

BRYKINA, G. D.; MARCHENNKO, D. Yu; SHPIGUN, O. A. Solid-Phase Spectrophotometry. **Journal of Analytical Chemistry,** v.50, p. 440 – 446, 1995.

CASSELLA, R. J.; TEIXEIRA, L. S. G.; GARRIGUES, S.; COSTA, A. C.S.; SANTELLI, R. E.; DE LA GUARDIA, M. Determination of sulfide in waters by flow-injection solid phase spectrophotometry. **Analyst,** v. 125, p. 1835 – 1838, 2000.

CADORE, S.; GOI, R. D.; BACCAN, N. Flame Atomic Absorption Determination of Cobalt in Water After Extraction of its Morpholinedithiocarbamate Complex. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 957-962, 2005.

CHAUHAN, M.; KOTHARI, S. L. Optimization of nutrient levels in the medium increases the efficiency of Callus Induction and Plant Regeneration in Recalcitrant Indian Barley (Hordeum vulgare L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 40, p. 520-527, 2004.

COMITRE, Ana Lúcia Dizeró. **Determinação espectrofotométrica de etanol em bebidas alcoólicas empregando sistema de análise em fluxo com multicomutação e amostragem binária.** 1998. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

COMITRE, A. L. D.; REIS, B. F. Automatic flow procedure based on multicommutations exploiting liquid-liquid extraction for spectrophotometric lead determination in plant material. **Talanta**, v. 65, p. 846-852, 2005.

COMITRE, A. L. D.; REIS, B. F. Liquid-liquid extraction procedure exploiting multicommutations in flow system for determination of molybdenum in plants. **Analytica Chimica Acta**, v. 479, p. 185-190, 2003.

DANTAS, A. F.; COSTA, A. C. S.; FERREIRA, S. L. C. Determinação espectrofotométrica de cobalto usando o corante ácido Violeta de Alizarina N. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23., 2000, Poços de Caldas. Livro de resumos...São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2000. ref. QA-574-2.

ESHWAR, M.; SHRAMA, C. D. Rapid spectrophotometric determination of Vanadium (V) with 1-(2-thiazolyloazo)-2-naphthol. **Microchemical Journal,** v. 35, p. 27-29, 1987.

FENÁNDEZ-DE CÓRDOVA, M. L.; MOLINA-DÍAZ, A.; PASCUAL-REGUERA, M. I.; CAPITÁN-VALLVEY, L. F. Determination of trace amounts of cobalt at sub-µg l^{-1} level by solid phase spectrophotometry. **Analytical Letters,** v. 25, p. 1961-1980, 1992.

GHAREHBAGHI, M.; SHEMIRANI, F.; BAGHDADI, M. Dispersive liquid-liquid microextraction and spectrophotometric determination of cobalt in water samples, **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 88, p. 513 – 523, 2008.

GUREVA, R. F; SAVVIN, S. B. Spectrophotometric methods for determination noble metals. **Journal of analytical chemistry,** v. 57, p. 980 – 996, 2002.

HOVIND, H. R. Thyazolylazo dyes and their applications in analytical chemistry. A review. **The Analyst,** v. 100, p. 769-796, 1975.

KHORRAMI, A. R.; HASHEMPUR, T.; MAHMOUDI, A.; KARIMI, A. R. determination of ultra trace amounts of cobalt and nickel in water samples by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry after preconcentration on modified C_{18}-silica extraction disks**. Microchemical Journal**, v. 84, p. 75-79, 2006.

KIRK, R. E.; OTHMER, D. F. Encyclopedia of chemical technology. 3 ed. Nova Iorque: Wiley, 1979. v. 6, 819 p.

LAVORANTE, A.F.; FERES, M. A.; REIS, B. F.; Multi-commutation in flow analysis: a versatile tool for the development of the automatic analytical procedure focused on the reduction of reagent consumption. **Spectroscopy Letters**, v. 39, p. 631-650, 2006.

LEE, J. D. Química Inorgânica não tão concisa. São Paulo: Edgard Blücher, 2003. 527 p.

LEMOS, V. A.; FRANÇA, R. S.; MOREIRA, B. O. Cloud point extraction for Co and Ni determination in water samples by flame atomic absorption spectrometry. **Separation and Purification Technology**, v. 54, p.349-354, 2007.

LI, R.; HUANG, X.; JIANG, Z. Determination of trace amounts of cobalt in foods by polymer-phase fluorophotometry with thiamine**. European Food Research and Technology,** v. 227, p. 111–116, 2008.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; VALCÁRCEL, M. Integration of separation and detection in continuous-flow systems. **Trends in analytical chemistry,** v. 10, p. 114 – 120, 1991.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas.** São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 631 p.

MARCZENKO, Z. **Separation and spectrophotometric determination of elements.** Chichester; New York: E. Horwood: Halsted Press, 1986. 678 p.

MARTELLI, Patrícia Benedini. **Determinação espectrofotométrica de níquel em ligas metálicas empregando o processo de análise química por injeção em fluxo.** 1993. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1993.

MATSUOKA, S.; SHIOTA, N.; YOSHIMURA, K. Determination of trace amount of cobalt(II) by flow injection solid-phase spectrofotometry (FI-SPS) with 5-Br- PADAB. **Analytical Sciences,** v. 22, p. 177 – 181, 2006.

MITIC, S. S., MICI, R. J. AND BUDIMIR, M. V. Highly Sensitive Determination of Traces of Co(II) in Pharmaceutical and Urine Samples Using Kinetic-Spectrophotometric Method. **Analytical Letters**, v. 42, p. 935 — 947, 2009.

ORTEGA-BARRALES, P.; RUIZ-MEDINA, A.; FERNÁNDEZ-DE CÓRDOVA, M. L.; MOLINA-DIAZ, A. Sensitive and simple determination of diclofenac sodium by use of a continuous flow-injection procedure wih solid-phase spectroscopic detection. **Analytical Sciences**, v. 15, p. 985 – 989, 1999.

PAGE, V.; FELLER, U. Selective transport of zinc, manganese, nickel, cobalt and cadmium in the root system and transfer to the leaves in young plants. **Annal of Botany**, v. 96, p. 425-434, 2005.

PANIZ, C.; GROTTO, D.; SCHMITT, G. C.; VALENTINI, J.; SCHOTT, K. L.; POMBLUN, V. J.; GRACIA, S. C. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnostic laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicinal Laboratorial**, v. 41, p. 323 – 34, 2005.

PASCUAL-REGUERA, M. I.; AYORA-CAÑADA, M. I.; RUIZ, M. S. C. Determination of piroxicam by solid-phase spectrophotometry in a continuous flow system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 179 – 183, 2002.

PEREIRA, M. D. S.; REIS, B. F. Determinação espectrofotométrica de alumínio em concentrados salinos utilizados em hemodiálise empregando pré-concentração em fluxo. **Química Nova,** v. 25, p. 931-934, 2002.

QUAGLIANO, J. V.; VALLARINO, L. M. Química. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1979. 855p.

REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 293, p.129-138, 1994.

REIS, B. F.; ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G.; COSTA, A. C. S.; KORN, M. Construção de uma cela de fluxo para medidas por espectrofotometria em fase sólida. **Química Nova**, v. 23, p.116-118, 2000.

REIS, B. F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, v. 19, n. 1, p.51 - 57, 1996.

ROCHA, F. R. P.; BOAVENTURA, F. R.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S.; SANTOS, J. L. M. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 468, p. 119-131, 2002.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento da sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, p. 807-812, 2004.

RUCHER, R. B.; SUTTIE, J. H.; McCORMICK, D. B.; MACHLIN, L. J. Handbook of Vitamins: Third Edition - Revised and Expanded. New York: Marcel Dekker, 2001. 600 p.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses. Part 1. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta,** v. 78, p.145-157, 1975.

SÄBEL, C. E.; SHEPHERD, J. L.; SIEMANN, S. A direct spectrophotometric method for the simultaneous determination of zinc and cobalt in metalloproteins using 4-(2-pyridylazo)resorcinol. **Analytical Biochemistry**, v. 391, p. 74–76, 2009.

SADER, Ana Paula de Oliveira. **Estudo espectrofotométrico do sistema Co(II)tiocianato e seu aproveitamento analítico.** 2002. 91f. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

SASMAZ, A.; YAMAN, M. Distribution of chromium, nickel, and cobalt in different parts of plant species and soil in mining area of Keban, Turkey. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 37, p. 1845-1857, 2006.

SMIDERLE, Marisa. **Determinação espectrofotométrica de manganês empregando amostragem binária e fluxo monossegmentado por ar.** 1998. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos (IQSC), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

SKOOG, D. A.; Princípios de análise instrumental. Porto Alegre : Bookman, 2006. 836 p.

TEIXEIRA, Leonardo Sena Gomes. **Aplicações de 1-2-(tiazolilazo)-2-naftol imobilizado em sílica funcionalizada C18 em espectrofotometria em fase sólida.** 2000. 168 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química , Universidade Federal da Bahia , Bahia, 2000.

TEIXEIRA, L. S. G; COSTA, A. C. S; ASSIS, J. C. R.; FERREIRA, S. L. C.; KORN, M. Solid Phase Spectrophotometry for determination of cobalt in pharmaceutical preparations. **Mikrochimica Acta**, v. 137, p. 29-33, 2001.

TEIXEIRA, L. S. G.; ROCHA, F. R. P. Espectrofotometria em fase sólida. **Revista Analytica**, **v.5**, p. 36-43, 2003.

TEIXEIRA, L. S. G.; ROCHA, F. R. P. A green analytical procedure for sensitive and selective determination of iron in water samples by flow-injection solid-phase spectrophotometry. **Talanta,** v. 71, p. 1507 -1511, 2007.

TEIXEIRA, L. S. G.; ROCHA, F. R. P.; KORN, M; REIS; B. F.; FERREIRA, S. L. C.; COSTA, A. C. S. Nickel and zinc determination by flow-injection solid-phase spectrophotometry exploiting different sorption rates. **Talanta,** v. 51, p. 1027-1033, 2000.

TEIXEIRA, L. S. G.; ROCHA, F. R. P.; KORN, M; REIS; B. F.; FERREIRA, S. L. C. Flow-injection solid-phase spectrophotometry for the determination of zinc in pharmaceutical preparations. **Analytica Chimica Acta**, v. 383, p. 309 - 315, 1999.

WHO, 2006. World Health Organazation. Cobalt and inorganic cobalt compounds. Geneva, 2006. (Concise International Chemical Assessment Document, 69).

UENO, K.; IMAMURA, T.; CHENG, K.L. **Handbook of Organic Analytical Reagents,** CRC Press. Florida, 203, 1992.

VOGEL, ARTHUR I. **Química analítica qualitativa.** São Paulo: Mestre Jou, 1981. 665 p. 5. ed. rev

YOSHIMURA, K.; WAKI, H. Ion-exchanger phase absorptiometry for trace analysis. **Talanta,** v. 32, p. 345-352, 1985.

YOSHIMURA, K.; WAKI, H.; OHASHI, S. Ion-exchanger colorimetry-I. Micro determination of chromium, iron, copper and cobalt in water. **Talanta,** V. 23, p. 449-454, 1976.

ZHANG, L.; WANG, W.; WANG, K.; DING, Z.; WEI, Z. Rapid Determination of Vitamin B12 by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry in Multivitamin Tablets. **Spectroscopy Letters**, 41, p. 332–336, 2008.

ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. H. Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo (Recomendações - IUPAC 1994). **Química Nova,** v. 22, p. 143–146, 1999.

WADA, H; NAKAGAWA, G. Spectrophotometric determination of nickel with 1-(2-thiazolylazo)-2-naphthol (TAN). **Analytical Letters**, v. 1, p. 687 - 695, 1968.