



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



**EMPREGO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA
ANÁLISES EM LARGA ESCALA: SCREENING,
EXTRAÇÃO ULTRA-SÔNICA E PRÉ-
CONCENTRAÇÃO POR PONTO NUVEM**

CLÉSIA CRISTINA NASCENTES

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

**CAMPINAS -SP
JUNHO DE 2002**

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE ICH
Nº CHAMADA T/UNICAMP
N17e
V EX
TOMBO BCI 50915
PROC 16-837/02
C DX
PREÇO R\$ 11,00
DATA 12/09/02
Nº CPD _____

Ventura

CM00173382-4

BIB ID 256968

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

N17e

Nascentes, Clésia Cristina

Emprego de diferentes estratégias para análises em larga escala: *screening*, extração ultra-sônica e pré-concentração por ponto nuvem / Clésia Cristina Nascentes. – Campinas, SP: [s.n], 2002.

Orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Preparo de amostras. 2. Espectrometria de absorção atômica. 3. Espectrofotometria. 4. Pré-concentração. I. Arruda, Marco Aurélio Zezzi. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

**A vitória de hoje me incentiva e fortalece para a batalha de
amanhã.**

**Dedico esta Tese de Doutorado aos meus pais,
Isaias e Diva, que me deram a essência e me
ensinaram a lutar e a valorizar as conquistas.
Aos meus irmãos Cléver, Clau, Re e Cleuton
pelo amor e incentivo constantes.
Obrigado por terem acreditado em mim!!!!**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda pela amizade, orientação e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À Universidade Estadual de Campinas, mais particularmente ao Instituto de Química, pelas oportunidades oferecidas.

Ao CNPq e a CAPES pelas bolsas de estudo concedidas.

À FAEP pelo apoio financeiro concedido.

Ao Prof. Dr. Mauro Korn pelas contribuições que enriqueceram em muito meu conhecimento e meu trabalho.

Aos Profs. Drs. Miguel Valcárcel, Mercedes Gallego e Marisol, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus companheiros do GEPAM e amigos, Edenir, Luciana, Madson, Araceli, Geraldo, César, Fabíola, Leonardo, Marcos, Adriana e Marcel pelo carinho e apoio constantes.

Aos demais "colegas" do laboratório e, nem por isso menos amigos, Alex, André, Lilian, Guida, Billy pela convivência agradável.

Aos meus companheiros/amigos da Universidad de Córdoba pela paciência, amizade e carinho que sempre demonstraram.

Aos funcionários da CPG, André, Bel, Celi e Rodrigo pela paciência e pelos serviços prestados.

Aos funcionários da BIQ pela atenção e simpatia.

A todos aqueles amigos, que me cativaram durante estes 4 anos e que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, compartilhando comigo momentos de muita alegria e descontração.

Aos meus amigos/irmãos Edilaine, Edna, Eduarda, Fábio, Fabíola, Gi, Luciano, Márcia, Miyuki, Marisi, e Rodrigo que de perto ou de longe sempre estiveram presentes.

Por fim, a todos aqueles, os quais cometi a injustiça de esquecer de citar o nome e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SÚMULA CURRICULAR

1 - DADOS PESSOAIS

Nome: Clésia Cristina Nascentes

RG: 36.066.992 - X ssp-SP

CPF: 006587816-77

Filiação: Isaias de Souza Nascentes

 Diva Maria Nascentes

Endereço: R. Rio Grande do Sul, 186

 B. Brasil – Patos de Minas - MG

 CEP: 38.700-000

Telefone: (34) 3821-0592

E-mail: clesia16@hotmail.com

2 - FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Doutorado em Química Analítica
 Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
 Instituto de Química
 Período: 1998-2002

- Mestrado em Agroquímica
 Universidade Federal de Viçosa - UFV
 Departamento de Química
 Período: 1995-1998

- Bacharel e Licenciada em Química
 Universidade Federal de Viçosa - UFV
 Período: 1991-1995

3 - COMUNICAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS

3.1. Otimização de um Sistema de Fluxo para Determinação Espectrofotométrica de Fenotiazinas em Urina.

Nascentes, C. C., Cárdenas, S., Gallego, M., Valcarcel, M., Arruda, M. A. Z.
11º Encontro Nacional de Química Analítica, 2001, Campinas, SP.

3.2. Cloud Point Approach for Cobalt Preconcentration and Determination by Flame Atomic Spectrometry.

Nascentes, C. C., Maniasso, N., Arruda, M. A. Z.

Sixth Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 2000, Concepción - Chile.

3.3. Otimização de Parâmetros que Favorecem a Cavitação em Banhos de Ultra-som.

Nascentes, C. C., Korn, M., Arruda, M. A. Z.

23ª Reunião Anual da SBQ, 2000, Poços de Caldas.

3.4. Determinação de macro e micro nutrientes em plantas por meio de extração ácida rápida.

Nascentes, C. C., Korn, M., Arruda, M. A. Z.

10º Encontro Nacional de Química Analítica, 1999, Santa Maria-RS.

3.5. Emprego de banhos de ultra-som no preparo de amostras: método de mapeamento.

Nascentes, C. C., Souza, C. S., Korn, M., Arruda, M. A. Z.

10º Encontro Nacional de Química Analítica, 1999, Santa Maria-RS.

OBS.: Foram apresentados ainda, mais 15 comunicações científicas em congressos e encontros nacionais.

4 – PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

4.1. NASCENTES, C.C., KORN, M., SOUZA, C.S., ARRUDA, M.A.Z. *Use of Ultrasonic Baths for Analytical Applications: A New Approach for Optimisation Conditions.* Journal of the Brazilian Chemical Society , v.12, n.1, p.57-63, 2001.

4.2. NASCENTES, C.C., KORN, M., ARRUDA, M.A.Z. *A Fast Ultrasound-Assisted Extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from Vegetables.* Microchemical Journal, v.69, n.1, p.37-43, 2001.

4.3. NASCENTES, C.C., MANIASSO, N., ARRUDA, M.A.Z. *Experimentos Didáticos em Química Analítica Envolvendo Separação de Fases e Pré-concentração.* Química Nova, v.25, n.3, p.483-489, 2002.

4.4. NASCENTES, C.C., CÁRDENAS, S., GALLEGOS, M., VALCÁRCEL, M. *Continuous Photometric Method for the Screening of Human Urines for Phenothiazines,* Analytica Chimica Acta (aceito para publicação)

RESUMO

EMPREGO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA ANÁLISES EM LARGA ESCALA: SCREENING, EXTRAÇÃO ULTRA-SÔNICA E PRÉ-CONCENTRAÇÃO POR PONTO NUVEM. Este trabalho de tese propõe três diferentes estratégias para simplificar as análises químicas, minimizando, principalmente, tempo e custos. Primeiramente, foi desenvolvido um sistema de *screening* para a detecção de fenotiazinas em urina humana. Foi proposto um método espectrofotométrico baseado na reação das drogas com o $K_3Fe(CN)_6$ em meio ácido. As condições do sistema em fluxo foram otimizadas e as características analíticas do método foram determinadas para uma mistura de clorpromazina, metotrimoprazina e prometazina. A concentração de corte foi estabelecida como $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 250 amostras contendo diferentes concentrações ($0,5$; $1,0$; $1,5$; $2,5$; $3,0$ e $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram analisadas para verificar a confiabilidade do *screening*. Foram obtidos 6 % de falsos positivos (em $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 10 % de falsos negativos (em $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Na segunda parte da tese, foram desenvolvidos dois métodos, um para otimização das condições de máxima cavitação em banhos de ultra-som e outro de extração ácida assistida por energia ultra-sônica para a determinação de Ca, Fe, Mg, Mn e Zn em plantas. Os fatores que mais influenciaram a cavitação foram: volume de água no banho (1L) e posições vertical (0 cm do fundo) e horizontal (central) do tubo de reação. Nas condições otimizadas para a extração (HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$, 10 min de sonicação e partículas $< 75 \mu\text{m}$) obtiveram-se recuperações próximas a 100 % para Ca, Mg, Mn e Zn. Na última parte da tese desenvolveu-se dois métodos para a pré-concentração de Co por ponto nuvem, utilizando tensoativos aniônicos e não-iônicos. No primeiro, a separação das fases foi induzida por HCl e no outro, por NaCl. Foram otimizadas as condições de complexação (5-Br-PADAP $3,5 \times 10^{-4}$ % m/v, pH=9,0) e as de separação das fases (HCl 4 mol L^{-1} , Triton X-100 0,1 % m/v e SDS 0,75 % m/v para o 1º método e NaCl 10 % m/v, Triton X-100 0,25 % m/v e SDS 0,1 % m/v para o 2º). Os fatores de pré-concentração obtidos foram respectivamente 28,5 e 21,7 para os métodos do HCl e do NaCl, sendo esse último aplicado para a análise de medicamentos, e foi obtida boa concordância com os resultados da técnica ETAAS.

ABSTRACT

DIFFERENT STRATEGIES FOR ROUTINE ANALYSES: SCREENING, ULTRASONIC EXTRACTION AND CLOUD POINT PRECONCENTRATION. This thesis proposes three different procedures to simplify chemical analyses, mostly minimizing time and costs. In the first part, it was developed a screening system to detection of phenothiazines in human urine. A spectrophotometric method based on the reaction of the drugs with $K_3Fe(CN)_6$ in acid medium was proposed. The flow system was optimized and the analytical characteristics of the method were determined using a mixture composed by chlorpromazine, methotrimeprazine and promethazine. The cut-off level was established as $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ and to check the reliability of the proposed screening system, 250 samples containing different concentrations ($0.5; 1.0; 1.5; 2.5; 3.0$ and $4.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) were analyzed. Six percent of false positives (in $1.5 \mu\text{mol L}^{-1}$) and 10% of false negatives (in $2.5 \mu\text{mol L}^{-1}$) were obtained. In the second part of this thesis, it was developed two methods involving ultrasonic bath: an optimization of the conditions to maximize the cavitation and another to acid extraction for Ca, Fe, Mg, Mn and Zn determination in plants. The most important variables in the cavitation were: bath volume water (1L) and vertical (0 cm from the bottom) and horizontal (central) positions of the reaction tube. In the optimized conditions of extraction ($0.14 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$, 10 min of sonication and particle sizes $< 75 \mu\text{m}$) recoveries of ca.100 % were obtained for Ca, Mg, Mn and Zn. In the last part of this thesis two methods were developed for Co preconcentration using cloud point formed with the mixture of anionic and non-ionic surfactants. In the first, phase's separation were induced adding HCl, and in the second, NaCl. The conditions for complexation ($3.5 \times 10^{-4} \%$ m/v 5-Br-PADAP, pH=9,0) and phases separation ($4 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$, 0.1 % m/v Triton X-100 and 0.75 % m/v SDS 1st method and 10 % m/v NaCl, 0.25 % m/v Triton X-100 and 0.1 % m/v SDS 2nd method) were optimized. The preconcentration factors 28.5 and 21.7 for HCl and NaCl methods respectively were obtained. The last was used to the analysis of medicine with good agreement with those results obtained by ETAAS.

ÍNDICE

Introdução.....	01
Objetivos.....	03
Capítulo I - Método espectrofotométrico para <i>screening</i> de fenotiazinas em urina humana através de um sistema de fluxo.....	05
1. Revisão Bibliográfica.....	07
1.1. Métodos de <i>screening</i>	07
1.2. Aplicações de sistemas de <i>screening</i>	10
1.3. Sistemas de fluxo.....	12
1.4. Análise de fármacos.....	13
1.4.1. Tipos de amostras.....	13
1.4.2. Fenotiazinas.....	14
1.4.3 Métodos para determinação de fenotiazinas.....	16
2. Materiais e métodos.....	18
2.1. Equipamentos e acessórios.....	18
2.2. Reagentes e soluções.....	18
2.3. Otimização do sistema de fluxo para o <i>screening</i>	21
2.4. Estudo de interferências.....	23
2.5. Determinação da absorvidade molar dos produtos de oxidação das fenotiazinas..	24
2.6. Confiabilidade do sistema de <i>screening</i>	24
3. Resultados e discussão.....	26
3.1. Efeito do ácido sulfúrico e do ácido nítrico.....	26
3.2. Otimização do sistema de fluxo.....	27
3.2.1. Efeito da concentração dos reagentes.....	27
3.2.2. Efeito das vazões dos reagentes e do carregador.....	28

3.2.3. Efeito do segundo reator.....	29
3.3. Otimização das variáveis que influenciam a pré-concentração.....	30
3.3.1. Efeito do tipo e quantidade de sorvente na pré-concentração das fenotiazinas.....	31
3.3.2. Efeito do pH da amostra na pré-concentração das fenotiazinas.....	33
3.3.3. Efeito da vazão e do volume de amostra na pré-concentração das fenotiazinas.....	34
3.3.4. Composição e volume da solução de lavagem.....	36
3.3.5. Efeito da composição e do volume do eluente.....	37
3.4. Estudo de recuperação das fenotiazinas.....	37
3.5. Estudo de interferências.....	38
3.6. Absortividade molar dos produtos de oxidação das fenotiazinas estudadas.....	39
3.7. Características analíticas.....	41
3.8. Confiabilidade do <i>screening</i>	42
3.9. Análise de amostras desconhecidas.....	44
4. Conclusões parciais.....	45
5. Referências bibliográficas.....	46
Capítulo II - Extração ácida de macro e micronutrientes em plantas usando energia ultra-sônica.....	51
1. Revisão Bibliográfica.....	53
1.1. Métodos para tratamento de amostras.....	53
1.1.1. Radiação ultra-violeta.....	54
1.1.2. Microondas.....	54
1.1.3. Ultra-som.....	55
1.2. Aplicações do ultra-som na química analítica.....	59

1.3. Materiais vegetais.....	61
2. Materiais e métodos.....	62
2.1. Equipamentos e acessórios.....	62
2.2. Reagentes e soluções.....	63
2.3. Amostras.....	65
2.4. Otimização das condições de utilização dos banhos de ultra-som.....	66
2.5. Otimização do método de extração ácida assistida por banhos de ultra-som.....	69
2.6. Método de mineralização por via úmida.....	69
3. Resultados e discussão.....	70
3.1. Otimização das condições de utilização dos banhos de ultra-som.....	70
3.1.1. Efeito do volume de água dentro do banho.....	70
3.1.2. Efeito da temperatura da água.....	72
3.1.3. Efeito da concentração de detergente na água do banho.....	73
3.1.4. Distribuição vertical das ondas ultra-sônicas no banho.....	74
3.1.5. Efeito do número de tubos dentro do banho.....	74
3.1.6. Distribuição horizontal das ondas ultra-sônicas.....	76
3.1.7. Intensidade de cavitação em função do tempo de sonicação.....	79
3.1.8. Efeito da substituição de água nos banhos.....	79
3.2. Extração ácida de metais em plantas com o uso de banhos de ultra-som.....	80
3.2.1. Otimização do tempo de sonicação e da concentração do ácido.....	81
3.2.2. Otimização do tamanho de partículas.....	84
3.2.3. Análise de amostras.....	85
4. Conclusões parciais.....	87
5. Referências bibliográficas.....	88
Capítulo III - Pré-concentração de cobalto com extração no ponto nuvem.....	93

1. Revisão bibliográfica.....	95
1.1. Tensoativos.....	95
1.2. O fenômeno do ponto nuvem.....	98
1.3. Aplicações analíticas do ponto nuvem.....	101
1.4. Cobalto.....	104
2. Materiais e métodos.....	105
2.1. Equipamentos e acessórios.....	105
2.2. Reagentes e soluções.....	105
2.3. Amostras.....	107
2.4. Pré-concentração de cobalto pelo método ponto nuvem.....	108
2.4.1. Otimização do método de pré-concentração com ponto nuvem induzido por ácido.....	108
2.4.2. Otimização do método de pré-concentração com ponto nuvem induzido pela adição de NaCl.....	110
2.4.3. Determinação das características analíticas dos métodos.....	110
2.4.4. Análise de amostras de medicamentos.....	112
3. Resultados e discussão.....	113
3.1. Otimização do método de pré-concentração com ponto nuvem induzido por HCl ...	113
3.1.1. Efeito das concentrações de HCl, SDS e Triton X-100.....	114
3.1.2. Efeito do complexante e da concentração do complexante.....	117
3.1.3. Efeito do tensoativo e da concentração do tensoativo.....	118
3.1.4. Efeito do pH de complexação.....	119
3.1.5. Efeito dos tempos de complexação e de contato entre complexo e tensoativo.....	121
3.2. Otimização do método de pré-concentração de Co com ponto nuvem induzido pela adição de NaCl.....	122

3.2.1. Efeito das concentrações de Triton X-100, SDS e NaCl.....	122
3.3. Características analíticas.....	127
3.4. Análise de amostras de medicamentos.....	129
4. Conclusões parciais.....	130
5. Referências bibliográficas.....	132
Considerações finais.....	137

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de artigos sobre <i>screening</i> publicados em algumas das mais veiculadas revistas de Química Analítica nas últimas 3 décadas.....	08
Figura 2. Estrutura básica das fenotiazinas com substituintes nas posições (a) 2 e 10 e (b) 3 e 7.....	15
Figura 3. Mecanismo proposto para a reação de oxidação das fenotiazinas pelo íon hexacianoferrato: (I) derivado de fenotiazina; (II) radical livre colorido; (III) íon fenotiazônio; (IV) intermediário do sulfóxido; (V) sulfóxido da fenotiazina.....	22
Figura 4. Sistema de fluxo otimizado para o <i>screening</i> de fenotiazinas em urina: VI ₁ e VI ₂ - Válvulas de injeção; BP - bomba peristáltica; E - eluente; D - descarte.....	25
Figura 5. Efeito da concentração dos reagentes no sistema de <i>screening</i> : (a) HNO ₃ (n=3) e (b) K ₃ Fe(CN) ₆ (n=3).....	28
Figura 6. Efeito do comprimento do segundo reator no sistema de <i>screening</i> (n=3).....	30
Figura 7. Efeito da quantidade de sorvente (LiChrolut [®] EN) na retenção das fenotiazinas (n=3).....	33
Figura 8. Efeito do pH da amostra na pré-concentração das fenotiazinas (n=3).....	34
Figura 9. Efeito da vazão da amostra (a) e do tempo de amostragem (b) na pré-concentração das fenotiazinas (n=3).....	35
Figura 10. Efeito da concentração de HNO ₃ (a) e do volume da solução de lavagem (b) na pré-concentração das fenotiazinas (n=3).....	36
Figura 11. Porcentagem de falsos positivos e falsos negativos obtidos no <i>screening</i> de fenotiazinas em urina.....	42
Figura 12. Foto de uma microbolha de cavitação no momento anterior a implosão extraída do site http://rsrch.com/saturna/	57
Figura 13. Posições dos tubos para os experimentos de otimização, obtidas por meio de suportes de isopor em dois diferentes banhos de ultra-som: (a) Banho Neytech e (b) Banho Cole-Parmer.....	66
Figura 14. Sistema de fluxo monosegmentado utilizado para a determinação de H ₂ O ₂ , onde: I - injetor comutador; C _s - carregador; R ₁ - NaOH 1 mol L ⁻¹ ; R ₂ - Tiron 5 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ ; R ₃ - cobalto 10 µg L ⁻¹ ; S _D - amostra; B ₁ - reator para mescla de reagentes; B ₂ - reator onde ocorre a reação; L _a , L _b e L _c - alça de amostragem; D - descarte.....	68

Figura 15. Distribuição espacial da energia ultra-sônica no banho Neytech: (a) usando 1 L de água dentro do banho e (b) usando o volume total de água (2 L) dentro do banho.....	73
Figura 16. Distribuição espacial da energia ultra-sônica no banho Cole-Parmer: (a) usando 1 L de água dentro do banho e (b) usando o volume total de água (1,3 L) dentro do banho.....	77
Figura 17. Resultados obtidos durante a otimização das condições de extração para concentração de ácido e tempo de sonicação, usando amostras de alface e repolho: (a) Ca, (b) Fe, (c) Mg, (d) Mn e (e) Zn.....	82
Figura 18. Efeito do tamanho de partícula do material vegetal na extração ultra-sônica.....	85
Figura 19. Esquema representativo de (a) micela normal (meio aquoso) e (b) reversa (meio não aquoso).....	97
Figura 20. Seqüência de fotos obtidas durante a pré-concentração de Co com ponto nuvem induzido por HCl (tempo total \approx 5 min). O tubo 1 apresenta a solução resultante logo após a adição do HCl. Nos tubos 2, 3 e 4 segue-se o processo de separação das fases e o tubo 5 apresenta as duas fases após a etapa de centrifugação, sendo verificada uma fase aquosa amarelada, devido ao excesso de complexante que não foi extraído.....	114
Figura 21. Resultados obtidos na pré-concentração de Co, variando a concentração dos complexantes. Concentrações fixas: 0,1 % m/v TX-100, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ Co e 4 mol L^{-1} HCl (n=4).....	118
Figura 22. Resultados obtidos na pré-concentração de Co, variando a concentração dos tensoativos. Concentrações fixas: 0,1 % m/v TX-100, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ Co e 4 mol L^{-1} HCl (n=4).....	119
Figura 23. Efeito do pH de complexação na pré-concentração de Co empregando ponto nuvem induzido por ácido (n=3).....	120
Figura 24. Fatores de pré-concentração obtidos para Co variando-se os tempos de complexação e de contato entre o complexo e o tensoativo (n=3).....	121
Figura 25. Efeito do NaCl e do SDS no ponto nuvem de soluções com diferentes concentrações de Triton X-100: a) 0,1, b) 0,25, c) 0,35 e d) 0,45 % m/v	123

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Resultados obtidos variando-se as concentrações dos ácidos sulfúrico e nítrico na reação de oxidação das fenotiazinas.....	26
Tabela 2. Efeito das vazões dos reagentes e do carregador no sistema de <i>screening</i> ...	29
Tabela 3. Porcentagem de retenção das fenotiazinas pelos sorventes a diferentes valores de pH.....	31
Tabela 4. Recuperação de clorpromazina no sistema de <i>screening</i> otimizado.....	38
Tabela 5. Limite tolerado de diferentes compostos na determinação de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de clorpromazina.....	39
Tabela 6. Massa molecular e absortividade molar para as fenotiazinas estudadas.....	40
Tabela 7. Características analíticas obtidas para o sistema de <i>screening</i> das fenotiazinas.....	41
Tabela 8. Resultados do <i>screening</i> realizado com amostras desconhecidas.....	44
Tabela 9. Efeito do volume de água dentro dos banhos de ultra-som sobre as absorbâncias obtidas pelo método do I_2	71
Tabela 10. Efeito da temperatura da água do banho avaliado por meio das absorbâncias obtidas pelo método do I_2	72
Tabela 11. Efeito da concentração do detergente sobre as absorbâncias obtidas pelo método do I_2	73
Tabela 12. Efeito da posição vertical dos tubos no banho Neytech sobre as absorbâncias obtidas pelo método do I_2	74
Tabela 13. Efeito do número e disposição dos tubos no banho da Cole-Parmer sobre as absorbâncias obtidas pelo método do I_2	75
Tabela 14. Efeito do número e disposição dos tubos no banho da Neytech sobre as absorbâncias obtidas pelo método do I_2	75
Tabela 15. Quantidade de peróxido de hidrogênio formando pela sonicação de água pura, nas diferentes posições do banho de ultra-som da Neytech contendo 1 L de água.....	78
Tabela 16. Efeito da substituição contínua da água do banho sobre as absorbâncias obtidas pelo método do I_2	80

Tabela 17. Resultados das amostras analisadas após decomposição ácida (n=3) e após extração ultra-sônica rápida (n=5). Ca e Mg são expressos em % m/m e Mn e Zn em $\mu\text{g g}^{-1}$	86
Tabela 18. Fatores de pré-concentração máximos obtidos na otimização do processo de separação das fases.....	115
Tabela 19. Fatores de pré-concentração máximos obtidos no estudo do efeito do SDS e do NaCl no ponto nuvem do Triton X-100.....	125
Tabela 20. Fatores de pré-concentração obtidos para o cobalto por meio de separação por ponto nuvem induzido por NaCl.....	126
Tabela 21. Características analíticas dos métodos desenvolvidos para a pré-concentração de cobalto com emprego do ponto nuvem.....	127
Tabela 22. Porcentagens de recuperação obtidas na pré-concentração de Co pelos métodos do ponto nuvem induzidos por HCl e NaCl.....	128
Tabela 23. Resultados obtidos na determinação de Co após a pré-concentração por ponto nuvem induzido por NaCl e quantificação por FAAS e na quantificação direta por ETAAS (n = 4).....	129
Tabela 24. Condições otimizadas para o sistema de <i>screening</i>	138
Tabela 25. Principais resultados obtidos no sistema de <i>screening</i>	139
Tabela 26. Condições otimizadas para a utilização dos banhos de ultra-som	139
Tabela 27. Condições otimizadas e principais resultados obtidos com a extração de metais em plantas.....	140
Tabela 28. Condições otimizadas para a pré-concentração de cobalto: ponto nuvem induzido por HCl e por NaCl.....	140
Tabela 29. Principais resultados obtidos pelos dois métodos de pré-concentração para cobalto.....	140

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Algumas aplicações dos sistemas de <i>screening</i>	11
Quadro 2. Substituintes nas posições 2 e 10 das fenotiazinas estudadas.....	40
Quadro 3. Condições experimentais para a determinação de Ca, Fe, Mg, Mn e Zn por FAAS.....	69
Quadro 4. Estruturas de tensoativos de diferentes classes.....	95
Quadro 5. Programa de aquecimento utilizado na determinação do cobalto por ETAAS.....	112

INTRODUÇÃO

A química analítica e a sociedade estão em constante interação, uma vez que a primeira fornece meios para que a sociedade obtenha uma melhor qualidade de vida, e são as necessidades dessa sociedade que, de uma certa forma, vão direcionar o desenvolvimento da química analítica.

Neste contexto, a determinação qualitativa e quantitativa dos constituintes de uma amostra é de fundamental importância em muitos campos da ciência, tecnologia e processos industriais.

Têm-se observado uma demanda crescente por análises químicas mais rápidas, com maior exatidão e precisão. Para atender as necessidades destas diferentes áreas, a química analítica tem passado por profundas transformações nas últimas décadas, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de novos processos e técnicas. Atualmente, alguns instrumentos são capazes de determinar rapidamente diversos elementos e compostos em concentrações tão baixas quanto $\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1} . No entanto, as etapas iniciais de uma análise química não acompanharam a evolução das técnicas de quantificação, sendo consideradas o "calcanhar de Aquiles" da química analítica. Devido a isso, o desenvolvimento de métodos alternativos que tornem o tratamento das amostras mais rápido e mais econômico é de grande importância, principalmente em laboratórios de rotina, onde um grande número de amostras precisa ser analisado diariamente.

Desta forma, o desenvolvimento da química analítica tem apresentado algumas tendências, tais como: módulos automáticos de tratamento de amostras, novas fontes de energia, quimiometria, biossensores, sistemas de *screening*, estações robotizadas, química limpa e especiação.

Neste trabalho pretendem-se destacar:

- Os sistemas de *screening* – são sistemas analíticos rápidos para identificar e selecionar, a partir de uma série inicial, um grupo de amostras que contenham um ou mais analitos acima de uma concentração de corte pré-estabelecida. Esses sistemas objetivam minimizar operações preliminares e a necessidade do uso permanente de instrumentos com altos custos de aquisição e

manutenção, sendo que, somente aquelas amostras, para as quais o sistema de *screening* forneceu uma resposta positiva confiável, serão analisadas pelos métodos analíticos convencionais;

- O uso de diferentes formas de energia – o uso das energias de microondas, ultra-som, ultra-violeta, infra-vermelho no preparo de amostras, tem crescido em função de sua grande potencialidade. Os fornos de microondas são muitas vezes empregados para a mineralização das amostras. O ultra-som pode ser considerado outra alternativa para o tratamento de amostras, já que esta energia facilita e acelera algumas etapas, tais como: dissolução, fusão, extração de analitos orgânicos e inorgânicos, dispersão de suspensões e homogeneização de soluções. O emprego dessas formas de energia, normalmente, reduz o tempo e o consumo de reagentes no preparo das amostras;

- A substituição de reagentes que apresentam elevada toxicidade – muitas vezes na química analítica, a sensibilidade e/ou seletividade da técnica de quantificação utilizada não são suficientes para se obter os resultados desejados, sendo necessário o emprego de métodos de separação/pré-concentração. A extração líquido-líquido e a extração em fase sólida são os métodos mais comumente utilizados com este propósito. A preocupação com o meio ambiente tem aumentado a busca por métodos mais “limpos”, que gerem menos resíduos tóxicos. Neste contexto, tem-se proposto o uso de tensoativos, que são substâncias biodegradáveis, para procedimentos de pré-concentração em substituição aos solventes orgânicos. Além da menor toxicidade, esses reagentes apresentam menor custo.

Assim, este trabalho de tese propõe e discute métodos alternativos que podem contribuir para tornar as etapas iniciais das análises químicas mais simples e rápidas, com menor custo e periculosidade para o analista e para o ambiente.

OBJETIVOS

Este trabalho de tese visa a simplificação das análises químicas por meio da utilização de estratégias analíticas alternativas que minimizem o consumo de tempo e de reagentes e também a geração de resíduos tóxicos durante o processo analítico.

Para isso, o trabalho foi dividido em três partes e a tese, conseqüentemente, em três capítulos, de forma a facilitar a discussão e a compreensão dos tópicos estudados.

Os objetivos específicos foram três, sendo que cada um é abordado em um dos capítulos da tese:

- Desenvolver um sistema de *screening* para detectar/quantificar fenotiazinas em urina humana, empregando um método espectrofotométrico em sistema de fluxo.
- Desenvolver um método para otimizar as condições de máxima cavitação em banhos de ultra-som e desenvolver um método rápido de extração ácida de macro e micronutrientes em diferentes amostras de plantas usando a energia ultra-sônica.
- Desenvolver um método para pré-concentração de cobalto em medicamentos empregando a extração por ponto nuvem e posterior determinação por espectrometria de absorção atômica com chama.

CAPÍTULO I

MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA *SCREENING* DE FENOTIAZINAS EM URINA HUMANA EMPREGANDO UM SISTEMA DE FLUXO

“O homem deve viver intensamente como se fosse morrer amanhã e aprender imensamente como se fosse viver para sempre”. (Isidoro de Sevilla)

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Métodos de *screening*

Em muitas situações práticas um grande número de amostras precisa ser analisado e, muitas vezes, o que importa não é a concentração exata de um analito, mas determinar se essa concentração é maior ou menor que um certo valor [1].

Os métodos de *screening* são considerados métodos para averiguação preliminar, e são usados quando um grande número de amostras precisa ser analisado rapidamente [2]. De uma maneira geral, estes métodos consistem de uma análise qualitativa ou semiquantitativa das amostras, sem tratamento prévio ou com um tratamento que não demande muito tempo e material.

Os métodos convencionais de laboratório que fornecem informações quantitativas e qualitativas sobre amostras estão sendo crescentemente substituídos por estas ferramentas analíticas de resposta rápida. Essas ferramentas, muitas vezes denominadas de sistemas de *screening* de amostras, visam identificar e selecionar, a partir de uma série inicial, um grupo de amostras que contêm um ou mais analitos acima de um nível de concentração pré-estabelecido [1,3,4]. Dessa forma são obtidas algumas vantagens importantes, incluindo redução dos custos, rapidez, simplicidade e minimização de erros operacionais pela demora entre a amostragem e a análise [5].

Observou-se, nos últimos 30 anos, um aumento significativo no número de artigos publicados sobre este assunto em periódicos de grande relevância em química analítica. A figura 1 apresenta um gráfico com estes números, no qual se pode notar o interesse crescente da comunidade científica neste tópico, principalmente ao longo da última década.

De acordo com alguns autores [1,3,6,7], os principais objetivos dos sistemas de *screening* são:

- Fornecer uma resposta rápida e confiável em relação a uma propriedade específica de uma amostra, objeto ou sistema, de modo a evitar o processamento completo de um grande número de amostras e, assim, obter medidas globais de substâncias tóxicas ou poluentes e/ou tomar decisões rápidas;

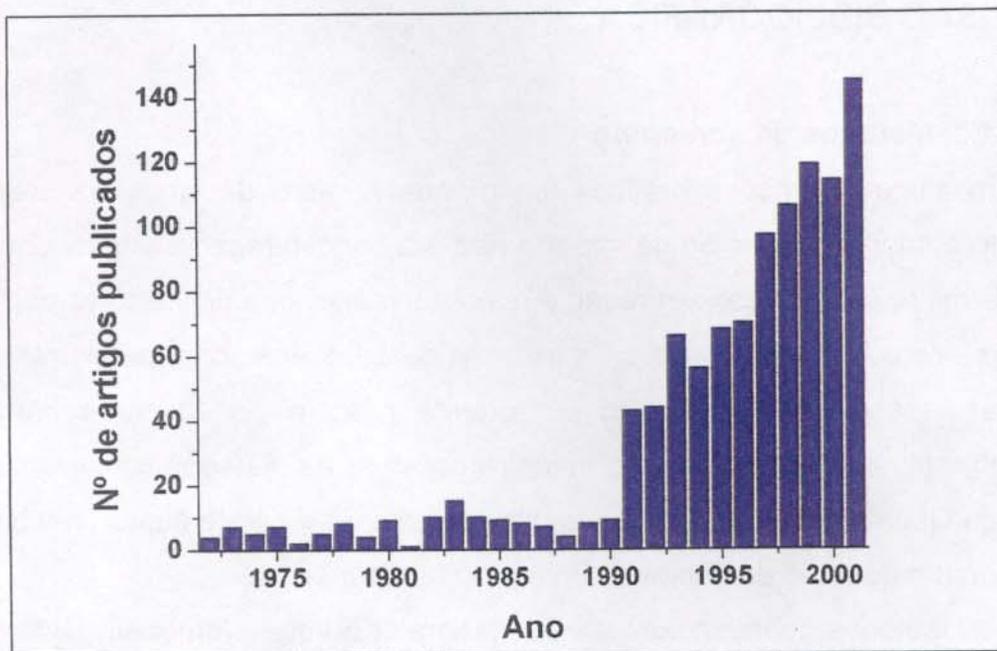


Figura 1 - Número de artigos sobre *screening* publicados em algumas das mais veiculadas revistas de Química Analítica nas últimas 3 décadas.

- Minimizar as operações preliminares de um processo analítico convencional. Estas operações preliminares, normalmente são trabalhosas e são as maiores fontes de erros sistemáticos ou aleatórios, sendo o ponto fraco do processo analítico [8]. Além disso, em alguns casos, oferecem perigo para o operador e para o ambiente;

- Minimizar a necessidade do uso permanente de instrumentos com altos custos de aquisição e manutenção. Ao invés de serem usados para avaliar todas as amostras, estes poderiam ser reservados para processar somente aquelas amostras para as quais o sistema de *screening* previamente fornecesse uma resposta positiva confiável.

O procedimento básico deve usar equipamentos e operações simples, e produzir uma resposta binária SIM/NÃO que ocasionalmente requer confirmação [6].

As principais diferenças entre um sistema de *screening* e os métodos analíticos tradicionais são [1,3,6, 9]:

- Tendem a ter uma ênfase mais qualitativa do que quantitativa;
- Normalmente envolvem pouco ou nenhum tratamento da amostra;

- Os métodos utilizados são rápidos;
- A resposta binária obtida algumas vezes requer confirmação pelo uso de um método convencional;
- A resposta é usada para se tomar uma decisão imediata.

Nem todos os sistemas de *screening* apresentam todas as cinco diferenças, embora a maior parte exiba três ou mais.

Em muitos casos apenas uma pequena sub-série de amostras fornece uma resposta positiva e deve, então, ser submetida ao processo analítico convencional, tanto para confirmar a resposta do sistema de *screening* quanto para adicionar informações analíticas quantitativas [10]. Em alguns casos, além de indicar em quais as amostras o analito está presente, o sistema de *screening* pode também indicar a concentração aproximada [11] de forma a facilitar a escolha do método de confirmação.

A resposta binária (sim/não) qualitativa fornecida pelo sistema de *screening* também possui conotações quantitativas. Quando são utilizados instrumentos nos sistemas de *screening*, gerando dados que são convertidos em uma resposta binária, algumas informações quantitativas devem ser levadas em conta [3,7,10]:

- O limite de detecção da técnica utilizada;
- O limite imposto pelo cliente ou pela legislação em vigor;
- O nível da concentração de corte adotado pelo analista;
- As incertezas nas quantificações prévias.

Ainda, deve ser dada a devida consideração aos padrões usados para estabelecer algumas das quantificações descritas acima, bem como suas faixas. Obter uma resposta binária correta requer considerações sobre as respectivas incertezas nas quantificações envolvidas [3]. Erros na resposta binária conduzem a falsos negativos (isto é, amostras que contêm um ou mais analitos acima da concentração de corte, porém, dão uma resposta negativa) e falsos positivos (amostras nas quais a concentração dos analitos em questão está abaixo da concentração de corte, porém, dão uma resposta positiva) [7,10].

Segundo Valcárcel e Rios [12] a resposta binária tem conotações especiais que requerem cuidadosa adaptação do conjunto de propriedades analíticas, e também de suas inter-relações mútuas. A resposta do sistema de *screening* de amostras deve ser representativa do objeto ou sistema considerado na definição do problema analítico. Deste modo, para se obter exatidão, deve se possuir adequadas sensibilidade e seletividade e, também, uma precisão adequada. O limite de detecção deve ser menor que a concentração de corte [3,4,7].

Em análises qualitativas é altamente prático referir-se a "confiabilidade", a qual engloba todas as propriedades relacionadas à exatidão. Em sistemas de *screening* a confiabilidade é definida como a proporção de respostas sim/não corretas a partir de um grande número de testes conduzidos com alíquotas do mesmo padrão (preferencialmente um material de referência certificado). A confiabilidade depende criticamente do nível de concentração dos analitos em relação ao limite de detecção, da incerteza e do tipo específico de resposta (índices globais ou individuais) [3,10].

A robustez (resistência da resposta binária a mudanças, quando ocorrem alterações nas condições experimentais) é um aspecto analítico muito importante [4], particularmente quando o sistema analítico de interesse, ou é instável (materiais biológicos e bioquímicos, testes de imunoensaios), ou é sensível a mudanças mínimas de pH, força iônica e temperatura ou, ainda, a presença de interferentes. A robustez é diretamente relacionada com a exatidão/precisão [3].

Diante disto, conclui-se que os sistemas de *screening* devem apresentar simplicidade, baixo custo e robustez para análise direta de um grande número de amostras [13].

1.2. Aplicações de sistemas de *screening*

Na química analítica os sistemas de *screening* são utilizados para diversos tipos de amostras e analitos, nas mais diversas áreas, desde o controle de qualidade de alimentos até análises de *doping*. O quadro 1 cita alguns exemplos destas aplicações.

Quadro 1 - Algumas aplicações dos sistemas de *screening*.

Amostra	Analito	Método utilizado	Ref.
Saliva	Cocaína	Fluorimetria (Fosforescência)	14
Águas superficiais e residuais	Herbicidas a base de triazina	Imunoensaio (FIA)	15
Peixes	Histamina	Fluorescência (FIA)	16
Leite	Resíduos de Penicilina	Imunoensaio baseado em biossensores	17
Águas naturais	Cu, Zn e Mn	Espectrofotometria com arranjo de diodos (FIA)	18
Vegetais	Pesticidas peritróides e organoclorados	Cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (FIA)	9
PVC	Antimônio	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite	1
Urina humana	Benzodiazepínicos	Espectrofotometria UV/VIS (FIA)	10
Águas naturais	Diuron e atrazina	Imunoafinidade (FIA)	6
Células	Agentes citotóxicos	Método cinético	19
Proteínas	Fosfopeptídeos	Espectrometria de massas	20
Extratos de folhas de chá	Antioxidantes	Cromatografia líquida com detecção por quimioluminescência (FIA)	21
Águas contaminadas	Clorobenzeno	Espectrometria de Mobilidade de Ions (FIA)	22
Óleos	Derivados de Anilina	HPLC-MS e HPLC-MS/MS c/ fonte API	23
Água Mineral e sangue	Chumbo	Sensor eletroquímico	24
Água de Chuva	Compostos orgânicos de Pb	CG com diferentes detectores (FIA)	25
Água do mar	Cd, Cu, Pb e Zn	Espectrofotometria com arranjo de diodos (FIA)	26
Solos	VOC	CG-MS com purga e membrana	27
Águas Naturais	Mercúrio	Fluorimetria (FIA)	28
Solos	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	Imunoensaio Enzimático	29

Como pode ser observado no quadro 1, os sistemas de fluxo são muito utilizados na implementação dos sistemas de *screening*. Isto ocorre porque, muitas vezes, eles viabilizam a aplicação de alguns métodos convencionais nos sistemas de *screening*, tornando-os mais rápidos.

Muitos destes sistemas são desenvolvidos a partir de um procedimento em batelada que seria demorado e trabalhoso, sendo este substituído por uma operação automatizada [30].

1.3. Sistemas de fluxo

Os sistemas de fluxo são muito úteis na química analítica moderna. Como as análises por injeção em fluxo têm se apresentado como uma ferramenta poderosa na automação analítica, suas aplicações vêm aumentando a cada dia, com as mais variadas configurações [31].

Operações em fluxo são muito mais fáceis de controlar no tempo e no espaço, já que o uso de tubos fechados evita a evaporação de líquidos, permite a mistura de reagentes, bem como a formação altamente reprodutível de produtos de reação [32].

Suas principais vantagens/características são [31,33,34]:

- Consumo reduzido de amostras;
- Boa precisão;
- Aumento da frequência analítica;
- Redução dos riscos de contaminação;
- Diminuição de erros operacionais;
- Grande versatilidade (possibilidade de acoplamento a várias técnicas de pré-tratamento, separação e pré-concentração de amostras, bem como a diferentes técnicas analíticas).

As configurações em fluxo contínuo têm um papel fundamental no desenvolvimento dos sistemas de *screening*, pois preenchem a maior parte dos seus requisitos [35].

1.4. Análise de fármacos

A química analítica é muito utilizada em procedimentos de rotina para análise de fármacos que, em geral, são demorados e, às vezes, apresentam elevados custos, principalmente devido a que o número de amostras a ser analisado é grande e nem sempre os analitos são encontrados em todas as amostras.

Segundo Maurer [36], outro fator primordial na análise de fármacos, principalmente em toxicologia clínica, é a rapidez – os resultados devem ser comunicados em curtos intervalos de tempo para que possam auxiliar efetivamente em diagnósticos e tratamentos, sendo que erros maiores são tolerados, se comparados a análises quantitativas.

O diagnóstico laboratorial de intoxicações agudas por fármacos é feito por meio da identificação e, se possível, da quantificação destes fármacos [11]. A fase de identificação inclui o *screening* das amostras, seguido de testes confirmatórios [36].

1.4.1. Tipos de amostras

A seleção correta da amostra para análise e sua preservação são pré-requisitos em toxicologia analítica. As amostras mais utilizadas para *screening* de fármacos são sangue e seus componentes (plasma e soro), urina e conteúdo gástrico [37].

- **Sangue**

Para este tipo de amostra, os procedimentos de pré-tratamento são mais complexos, devido à presença de proteínas. A análise pode ser feita no sangue total ou em alguma fração sanguínea (plasma ou soro), dependendo do tipo de determinação [2]. A amostra de sangue deve ser manipulada com cuidado para evitar hemólise. O sangue deve ser coletado antes da administração de medicamentos ao paciente [37].

- **Urina**

A urina é a amostra ideal para *screening*, pois a coleta é não invasiva e usualmente está disponível em grandes volumes [38]. De acordo com Aerts *et al.*[2] a

urina freqüentemente contém os fármacos em concentrações até 100 vezes maiores que o sangue, e possui baixa quantidade de proteínas e lipídios, facilitando o tratamento da amostra. A urina apresenta a desvantagem de que algumas drogas são excretadas quase completamente como metabólitos [37]. A presença de metabólitos dos fármacos na urina também pode ser utilizada na identificação.

A amostra de urina também deve ser coletada antes que medicamentos sejam administrados ao paciente, a fim de minimizar as interferências na análise [37,38].

- **Conteúdo Gástrico**

Inclui vômito, aspirado e lavado gástrico. É importante que se colete a primeira porção do lavado gástrico, uma vez que as porções posteriores são bem mais diluídas [37]. Esse tipo de amostra é bastante útil para análises qualitativas, pois normalmente os fármacos e as drogas estão presentes em altas concentrações e não estão bio-transformados [38].

A obtenção de resultados confiáveis depende de uma coleta apropriada, do tipo de matriz e da conservação da amostra. As drogas presentes em amostras biológicas podem se decompor durante a estocagem. As fenotiazinas, por exemplo, são fotodegradáveis e as amostras devem ser armazenadas em frascos protegidos da luz. Outro cuidado a ser tomado com este tipo de drogas é o armazenamento a baixas temperaturas (geladeira), uma vez que elas são facilmente oxidadas [37].

As análises toxicológicas de urgência são, em geral, realizadas logo após a coleta, tornando-se desnecessária a adição de conservantes, os quais poderiam provocar interferências nas análises. Segundo alguns autores [38,39] para a realização do *screening* toxicológico nenhum preservativo deve ser adicionado às amostras, e estas devem ser acondicionadas em temperaturas adequadas.

1.4.2. Fenotiazinas

O grupo de compostos chamados derivados de fenotiazinas inclui compostos caracterizados por um anel aromático tricíclico com átomos de S e N e substituintes nas posições 2 e 10 ou 3 e 7 [40]. A estrutura básica é apresentada na figura 2.

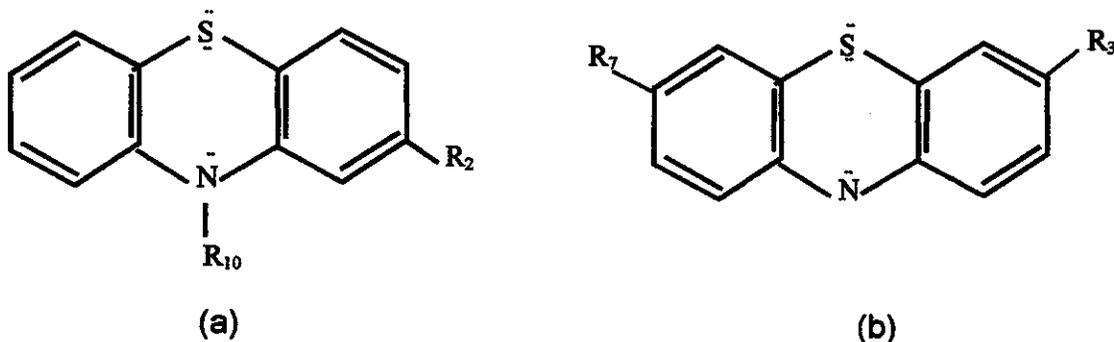


Figura 2 – Estrutura básica das fenotiazinas com substituintes nas posições (a) 2 e 10 e (b) 3 e 7.

Os derivados de fenotiazinas podem existir na forma de bases livres e sais (mais comumente encontrados nos medicamentos) como, cloridratos, maleatos, tartaratos e dimetilsulfonatos [40].

As fenotiazinas e seus derivados estão entre as drogas mais largamente utilizadas na medicina, devido à sua toxicidade relativamente baixa, alta atividade fisiológica e ampla ação farmacológica [41,42].

Estas drogas são primariamente empregadas como neuroléticos no tratamento de pacientes com esquizofrenia e outras doenças psicóticas [43,44]. Ainda, muitos dos derivados têm outras propriedades que são aproveitadas clinicamente, como: efeitos antiemético e anti-histamínico; antialérgicos, analgésicos, tranquilizantes, sedativos e anestésicos [41,43,45].

O derivado tioridazina é usado para aliviar a tensão e a ansiedade, e é também efetivo na redução de desordens depressivas e alucinações. Entretanto, uma *overdose* dessa droga causa erupções na pele, fotossensibilidade, sedação e vertigem e, em alguns casos, têm sido relatadas mortes súbitas [46]. Segundo Hattori *et al.* [47] estas drogas são frequentemente encontradas em investigações de química forense e em toxicologia analítica.

Mais de 30 drogas à base de fenotiazinas e 100 formulações são comercialmente disponíveis [42]. Essas drogas são absorvidas facilmente após sua administração oral, sofrem extenso metabolismo e são excretadas principalmente na urina [44]. Aproximadamente de 20-70 % das doses orais são excretadas na urina como metabólitos na forma conjugada [37]. O metabólito mais abundantemente

excretado é o sulfóxido [48]. No plasma, as fenotiazinas se encontram ligadas às proteínas (95-98 %), devido ao seu caráter lipofílico [49]. As concentrações que aparecem em fluidos biológicos variam muito, pois dependem da dose e da duração do tratamento e também do metabolismo, mudando de um indivíduo para outro.

Devido à sua acumulação, essas drogas podem seguir apresentando efeitos terapêuticos e serem detectadas na urina, mesmo depois de suspenso o tratamento [37,49].

O grande emprego dessas drogas tem aumentado a necessidade de desenvolver métodos rápidos, simples e precisos para detectar e quantificar fenotiazinas, derivados e metabólitos [50]. Estes métodos podem ser usados em controle de qualidade, em estudos farmaco-cinéticos e em toxicologia analítica [51]. O interesse terapêutico nestes compostos justifica a pesquisa para estabelecer métodos analíticos para essas drogas em produtos farmacêuticos e em fluidos biológicos [43].

1.4.3. Métodos para determinação de fenotiazinas

Existem muitas técnicas para quantificar fenotiazinas e seus derivados em medicamentos e fluidos biológicos. Entre elas estão a volumetria [43], a cromatografia [52,53], a voltametria [54], amperometria [55], a condutimetria [56], a potenciometria [57], e a espectrofotometria no UV-Vis [41,42,45,46,50].

Os métodos oficiais propostos pela Farmacopéia Britânica [58] e pela Farmacopéia Americana [59] são baseados na espectrofotometria UV e na titulação não aquosa.

Os derivados de fenotiazina apresentam fluorescência quando irradiados com luz ultravioleta [40]. Devido a isso, a fluorimetria é muitas vezes usada para a determinação destes compostos [51,60].

Muitos desses procedimentos estão sujeitos a interferências dos excipientes, reagentes e dos produtos de degradação das próprias fenotiazinas [61]. Alguns apresentam baixa sensibilidade e seletividade [62,63] ou requerem longos tempos de aquecimento [64]. Alguns outros métodos espectrofotométricos não apresentam bons

limites de detecção [65] e outros requerem o uso de altas concentrações de H_2SO_4 (até 50% v/v) [66].

Um procedimento longo e trabalhoso está envolvido na utilização da cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de produtos de degradação das fenotiazinas [67] e também da cromatografia gasosa com detecção por ionização superficial [47].

Pournaghi-Azar e Farhadi [56] desenvolveram um método de titulação potenciométrica para a determinação de derivados de fenotiazinas. Os limites de detecção obtidos não foram suficientes para a análise de fluidos biológicos e o método requer o uso de grandes volumes de clorofórmio.

Um método espectrofotométrico baseado na oxidação das fenotiazinas por N-bromoftalimida foi proposto por El-Kerdawy *et al.* [63]. Um meio de metanol:ácido sulfúrico 1:1 foi utilizado e a faixa linear obtida foi de 5–40 $\mu g mL^{-1}$.

Maurer e Pflieger [68] propuseram um método de *screening* para a detecção de fenotiazinas e metabólitos em urina, usando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. As amostras foram hidrolisadas e extraídas por meio de procedimento complexo e demorado, sendo que o extrato ainda passava por um processo de acetilação antes de ser injetado no cromatógrafo. Apesar do método de *screening* proposto detectar um grande número de derivados de fenotiazinas, a complexidade e o tempo gasto para o procedimento, limitam a aplicação do mesmo.

Um método de quimioluminescência empregando sistema de fluxo foi proposto para determinar três derivados de fenotiazinas em urina. Antes da introdução da amostra no sistema, a mesma era submetida a um processo de extração e evaporação/dissolução em HCl 0,1 mol L^{-1} [41].

Emara [64] empregou o reagente difenilpicrilidrazil para a determinação espectrofotométrica de algumas fenotiazinas em medicamentos. O produto colorido era formado após 20 min de aquecimento a 60 °C e a absorbância era determinada a 520 nm. Foram obtidas recuperações entre 98,6 e 102,1 %.

Desta forma, verifica-se que apesar da quantidade de métodos existentes para a determinação de fenotiazinas, muitos deles apresentam sérias limitações.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Equipamentos e acessórios

- Espectrofotômetro UNICAM, modelo 8625 UV/VIS (Cambridge, Reino Unido) equipado com uma cela de fluxo Helima com caminho óptico de 10 mm e volume interno de 18 μL (Jamaica, NY, EUA).
- Bomba peristáltica Gilson, modelo Minipuls-2 (Villiers-le-Bel, França).
- Potenciômetro modelo GLP21, marca Crison (Barcelona, Espanha).
- Balança Analítica modelo E01140, marca Ohaus (Pinie Brook, NJ, EUA).
- Válvulas Injetoras Rheodyne 5041 (Cotati, CA, EUA).
- Tubos de Tygon para sistemas de fluxo com diferentes diâmetros internos.
- Registrador Radiometer Servograph, modelo REC-80 (Copenhague, Dinamarca).
- Tubos de PTFE de 3 cm x 4 mm de d.i. para empacotamento de colunas.
- Tubos de PTFE de 0,5 mm de d.i. usados na confecção das bobinas de reação, alças de amostragem e conexões.
- Conectores disponíveis comercialmente para sistemas de fluxo.

2.2. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

- Cloridrato de clorpromazina, $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{S}\cdot\text{HCl}$, $\text{MM}=355,30 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha)
- Dicloridrato de flufenazina, $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_3\text{OS}\cdot 2\text{HCl}$, $\text{MM}=510,40 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha)
- Cloridrato de tioridazina, $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{S}_2\cdot\text{HCl}$, $\text{MM}=407,00 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha)
- Cloridrato de prometazina, $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{S}\cdot\text{HCl}$, $\text{MM}=320,90 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha)
- Maleato de metotrimetoprazina, $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{OS}\cdot\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$, $\text{MM}=444,50 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha)
- Hexacianoferrato (III) de potássio, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $\text{MM}=329,30 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)

- Ácido nítrico concentrado, HNO_3 65 % m/v, $d=1,40 \text{ g mL}^{-1}$, $\text{MM}=63,01 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Ácido sulfúrico concentrado, H_2SO_4 95-97 % m/v, $\text{MM}=98,08 \text{ g mol}^{-1}$, $d=1,84 \text{ g mL}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha).
- Etanol LiChrosolv, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OH}$, $\text{MM}=46,07 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha).
- Hidróxido de sódio, NaOH , $\text{MM}=40,0 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Ácido acetilsalicílico, $2-(\text{CH}_3\text{CO}_2)\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$, $\text{MM}=180,16 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha)
- Ácido ascórbico, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, $\text{MM}=176,12 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha)
- Ácido salicílico, $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$, $\text{MM}=138,12 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha)
- Ácido tartárico, $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CO}_2\text{H}$, $\text{MM}=230,08 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha)
- Cafeína, $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$, $\text{MM}=194,19 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha)
- Codeína, $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_3$, $\text{MM}=299,4 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha)
- Frutose, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, $\text{MM}=180,2 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha)
- Glicose, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, $\text{MM}=180,2 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha)
- Paracetamol, $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$, $\text{MM}=151,17 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha)
- Ácido cítrico, $\text{HOC}(\text{CO}_2\text{H})(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$, $\text{MM}=210,14 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Iodeto de sódio, NaI , $\text{MM}=149,89 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Oxalato de sódio, $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, $\text{MM}=134,01 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Sulfito de sódio, Na_2SO_3 , $\text{MM}=126,04 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Sorvente Vydac RP-C18 (Nest Group, Massachusetts, EUA)
- Sorvente Oásis[®]MCX (Waters, Massachusetts, EUA)
- Sorvente LiChrolut[®]EN (Merck, Darmstadt, Alemanha)

- Sorvente Amberlite XAD-2 (Aldrich, Madrid, Espanha)

As soluções estoque das fenotiazinas foram preparadas em água desionizada (com exceção do maleato de metotrimeprazina que foi preparado em etanol), armazenadas em frascos revestidos com papel alumínio e mantidas na geladeira, a fim de evitar a degradação das mesmas. Essas soluções eram preparadas uma vez por semana, ou sempre que se observava alguma alteração das mesmas. As soluções padrões de trabalho foram preparadas de acordo com a necessidade, pela diluição apropriada das soluções estoque em água ou urina.

As soluções de $K_3Fe(CN)_6$ foram preparadas em HNO_3 2 mol L^{-1} , pela dissolução da quantidade apropriada do sal, sendo que as mesmas foram armazenadas em frascos escuros a baixas temperaturas (geladeira).

As soluções de HNO_3 e de H_2SO_4 utilizadas como reagentes foram preparadas pela diluição apropriada dos ácidos concentrados.

Foram preparadas soluções de $NaOH$ e HNO_3 em concentrações que variaram de 0,001 a 1 mol L^{-1} para o ajuste do pH das amostras.

O eluente para a extração em fase sólida foi preparado a partir de misturas em diferentes proporções de etanol e HNO_3 .

As soluções de HNO_3 que foram utilizadas como soluções de lavagem (0,25 a 1 mol L^{-1}) também foram preparadas por diluição do ácido concentrado.

Foram preparadas soluções estoque de cada um dos interferentes estudados e dependendo das características de cada reagente, estes foram devidamente acondicionados e armazenados.

A água utilizada no preparo das soluções era destilada e desionizada através de um sistema Milli-Q (Millipore).

O tipo de coleta de urina utilizado foi o da primeira expelida pela manhã, sendo as amostras coletadas em frascos de polietileno. As amostras foram submetidas à análise no mesmo dia da coleta. Com isso evitava-se problemas causados por crescimento microbiológico e degradação das mesmas. Antes de serem introduzidas no sistema de fluxo, as amostras foram filtradas para remoção de algum possível material particulado, e depois passavam por um ajuste de pH.

Todo o material utilizado (frascos plásticos e vidrarias) foi devidamente descontaminado, por meio de lavagem com água desionizada e acetona.

2.3. Otimização do sistema de fluxo para o *screening*

Uma das propriedades químicas mais importantes dos derivados das fenotiazinas é sua facilidade de oxidação, por meio de muitos agentes oxidantes, com a formação de produtos coloridos [40].

A reação escolhida para o sistema de *screening* das fenotiazinas é a oxidação das drogas em questão pelo hexacianoferrato de potássio em meio fortemente ácido. A relação estequiométrica (fenotiazina:hexacianoferrato) é de 1:2, como pode ser observado no mecanismo proposto para essa reação (figura 4).

Nesta reação, primeiramente a fenotiazina perde um elétron, sendo formado um radical livre ou semiquinona que apresenta cor violeta ou laranja (dependendo dos substituintes). Esse radical livre pode perder outro elétron, formando o íon fenotiazônio, sem cor. Este íon por sua vez é hidrolisado, formando o sulfóxido, também incolor [40,43]. Os sistemas de fluxo são ideais para se detectar espécies intermediárias, uma vez que se pode controlar o tempo de residência do produto que será determinado.

Inicialmente foram realizados alguns testes em batelada, com o objetivo de comparar a eficiência do H_2SO_4 e do HNO_3 em concentrações de, no máximo, 5 mol L^{-1} para a reação de oxidação das fenotiazinas. Para isso, foram adicionados em tubos de ensaio: 3 mL de uma solução aquosa contendo $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de clorpromazina, 3 mL de HNO_3 ou H_2SO_4 em diferentes concentrações (variando de 1 a 5 mol L^{-1}) e 0,2 mL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. A absorbância da mistura era imediatamente determinada a 520 nm. Nestes testes não se observou uma diferença significativa entre os ácidos estudados, e se optou pelo ácido nítrico.

Para a otimização do sistema de *screening* foram utilizados padrões aquosos enriquecidos com $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de clorpromazina, e água desionizada foi utilizada como branco. Foram otimizadas as variáveis químicas: concentração de HNO_3 ($2\text{-}5 \text{ mol L}^{-1}$) e de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($7,6 \times 10^{-4}$ – $1,97 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) bem como as variáveis de fluxo: vazão dos reagentes e do carregador ($0,3\text{-}2,0 \text{ mL min}^{-1}$) e comprimento do segundo reator (0-200 cm). A absorbância foi continuamente registrada a 520 nm.

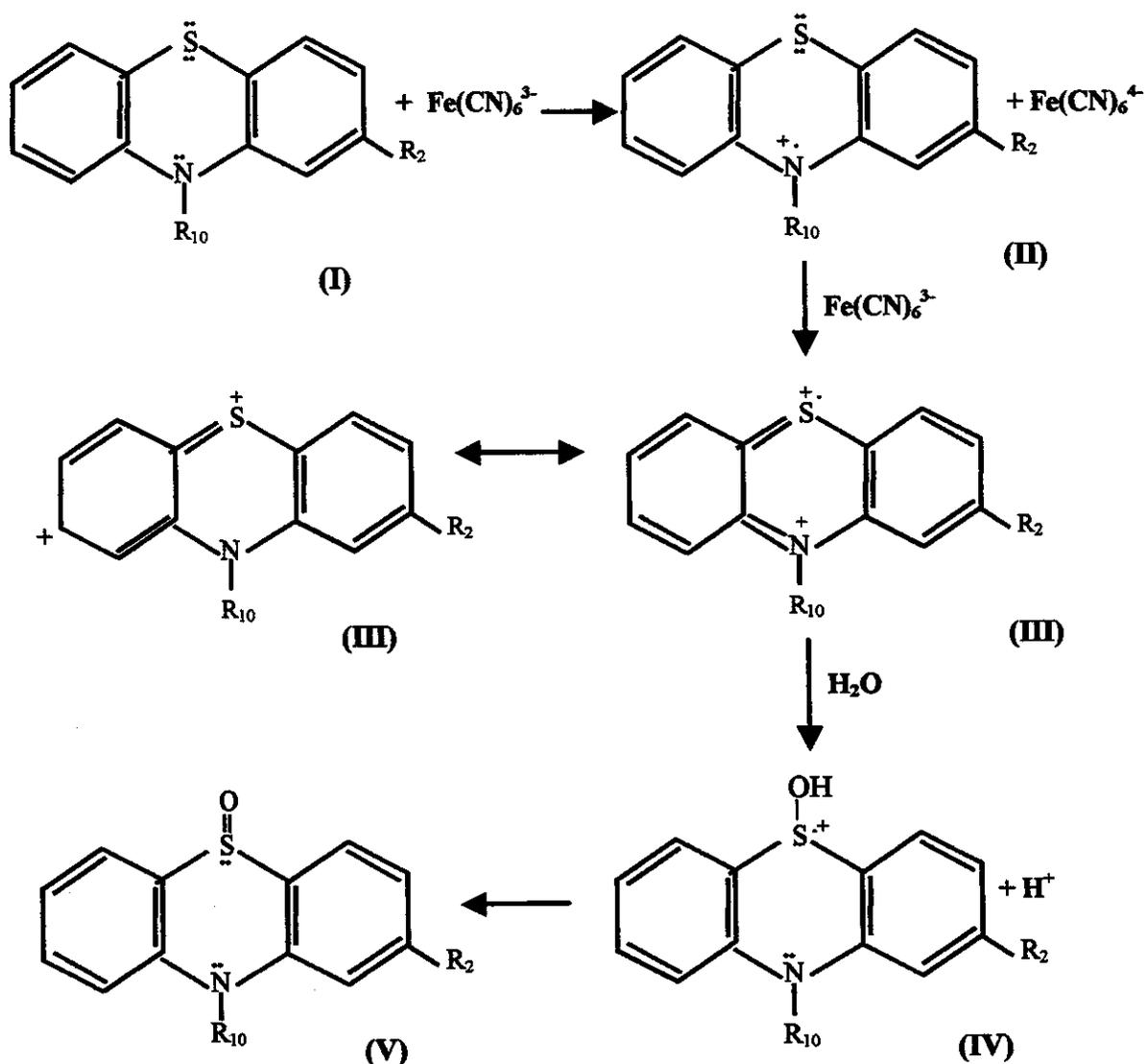


Figura 3 - Mecanismo proposto para a reação de oxidação das fenotiazinas pelo íon hexacianoferrato: (I) derivado de fenotiazina; (II) radical livre colorido; (III) íon fenotiazônio; (IV) intermediário do sulfóxido; (V) sulfóxido da fenotiazina.

Devido à complexidade da amostra e das baixas concentrações de fenotiazinas normalmente encontradas em urina, introduziu-se no sistema de fluxo uma coluna para separação/pré-concentração dos analitos. Para a introdução da extração em fase sólida (SPE) no sistema de *screening*, foram otimizadas também as condições de pré-concentração: tipo de sorvente a diferentes valores de pH (RP-

C18, LiChrolut[®]EN, Amberlite-XAD-2 e Oásis[®]MCX); quantidade de sorvente (25-75 mg); pH da amostra (5-9); volume (2,7-6,75 mL) e vazão (1,5-3,5 mL min⁻¹) da amostra; concentração (0-1 mol L⁻¹ de HNO₃) e volume (0,9-2,7 mL) da solução de lavagem; composição (proporção etanol:HNO₃) e volume de eluente (100-500 µL). A otimização destas variáveis foi realizada com amostras de urina enriquecidas com 3 µmol L⁻¹ de clorpromazina, sendo realizada fora do sistema de fluxo para facilitar e agilizar o processo. O eluato era injetado no sistema previamente otimizado.

O condicionamento dos sorventes realizado para ativação dos sítios ativos foi realizado de acordo com a literatura [69,70]. Os sorventes RP-C18 e LiChrolut[®]EN foram condicionados passando-se etanol através da coluna e, depois, água desionizada para retirar o excesso de etanol. O sorvente Amberlite-XAD2 também foi condicionado com etanol, utilizando-se posteriormente, uma solução de HNO₃ 0,1 mol L⁻¹ para a retirada do excesso de solvente. O sorvente Oásis[®]MCX não requereu a etapa de condicionamento.

Após a otimização da pré-concentração, a coluna foi introduzida no sistema de fluxo, no lugar da alça de amostragem, e foi introduzida uma outra válvula de injeção para injetar um volume fixo de eluente. Com o sistema todo montado, testaram-se novamente as concentrações dos reagentes HNO₃ e K₃Fe(CN)₆ (uma concentração acima e outra abaixo das otimizadas anteriormente). Como os resultados não foram discordantes daqueles obtidos inicialmente, as condições foram mantidas.

Nestas condições foi realizado um estudo de recuperação das fenotiazinas. Foram adicionadas diferentes concentrações de clorpromazina (variando de 2,5 a 10 µmol L⁻¹) a amostras de urina, e estas foram analisadas com o sistema otimizado.

2.4. Estudo de interferências

Nas condições otimizadas, foi realizado um estudo com compostos que poderiam interferir na pré-concentração e/ou na reação de oxidação das fenotiazinas, e que podem ser encontrados normalmente em urina. Os compostos estudados foram: ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido salicílico, ácido tartárico, cafeína, codeína, frutose, glicose, iodeto, oxalato, paracetamol e sulfito. A concentração de clorpromazina foi fixada em 5 µmol L⁻¹ e foram testadas

individualmente concentrações crescentes dos interferentes, até o ponto em que houve uma alteração significativa da absorbância (cerca de $\pm 10\%$).

2.5. Determinação da absorvidade molar dos produtos de oxidação das fenotiazinas

Para verificar se o sistema otimizado poderia ser aplicado para todas as fenotiazinas, determinou-se a absorvidade molar para cada uma. Para isso, prepararam-se soluções de cada uma separadamente na concentração de $5\ \mu\text{mol L}^{-1}$ e essas soluções foram introduzidas no sistema de fluxo. Com a absorbância obtida e a concentração molar, calculou-se a absorvidade molar para cada um dos produtos de oxidação das fenotiazinas, nas condições de análise.

2.6. Confiabilidade do sistema de *screening*

Para se verificar a confiabilidade do sistema de *screening*, construiu-se uma curva de calibração empregando urina com uma mistura das fenotiazinas que apresentaram valores de absorvidade molar próximos (clorpromazina, metotrimetrazina e prometazina), determinando-se os limites de detecção e de quantificação, e a faixa linear do método. A precisão foi determinada por meio da análise de 11 sub-amostras de urina contendo $4\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de clorpromazina.

De acordo com dados da literatura [37], das fenotiazinas estudadas, a prometazina possui as menores doses terapêuticas, sendo ministrada até em doses de 75 mg/dia. Cerca de 2% desta droga é excretada na urina sem ser metabolizada [37]. Considerando-se que uma pessoa adulta excreta cerca de 2 L de urina por dia, seriam excretados aproximadamente $0,75\ \mu\text{g}$ de prometazina por mL de urina. Essa quantidade corresponde a $2,34\ \mu\text{mol L}^{-1}$. Em casos de intoxicação ou de morte, as concentrações encontradas são muito mais altas.

Neste estudo a concentração de corte foi estabelecida como $2\ \mu\text{mol L}^{-1}$, sendo maior que o limite de detecção e menor que o limite de quantificação do método e também é próxima à concentração obtida com os cálculos teóricos de excreção da derivado de maior toxicidade. Depois de estabelecida esta concentração, realizou-se um estudo sistemático no qual foram analisadas aproximadamente 250 amostras

com diferentes concentrações de fenotiazinas para testar a confiabilidade do sistema de *screening* proposto.

As amostras de urina foram filtradas e o pH das mesmas foi ajustado para $6,5 \pm 0,2$. No sistema de fluxo otimizado (figura 3), 5,4 mL das amostras de urina enriquecidas com diferentes concentrações de fenotiazinas foram continuamente bombeados pelo canal das amostras e os analitos pré-concentrados na coluna contendo 35 mg de LiChrolut®EN, sendo o resíduo levado para o descarte.

Na etapa de limpeza foram bombeados através da coluna 1,35 mL de uma solução de HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. As drogas foram então eluídas com $200 \mu\text{L}$ de uma mistura de etanol: HNO_3 2 mol L^{-1} na proporção 8:2 (v/v). O eluato era bombeado através do canal do carregador (H_2O , vazão de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$) pela inversão das válvulas injetoras 1 e 2.

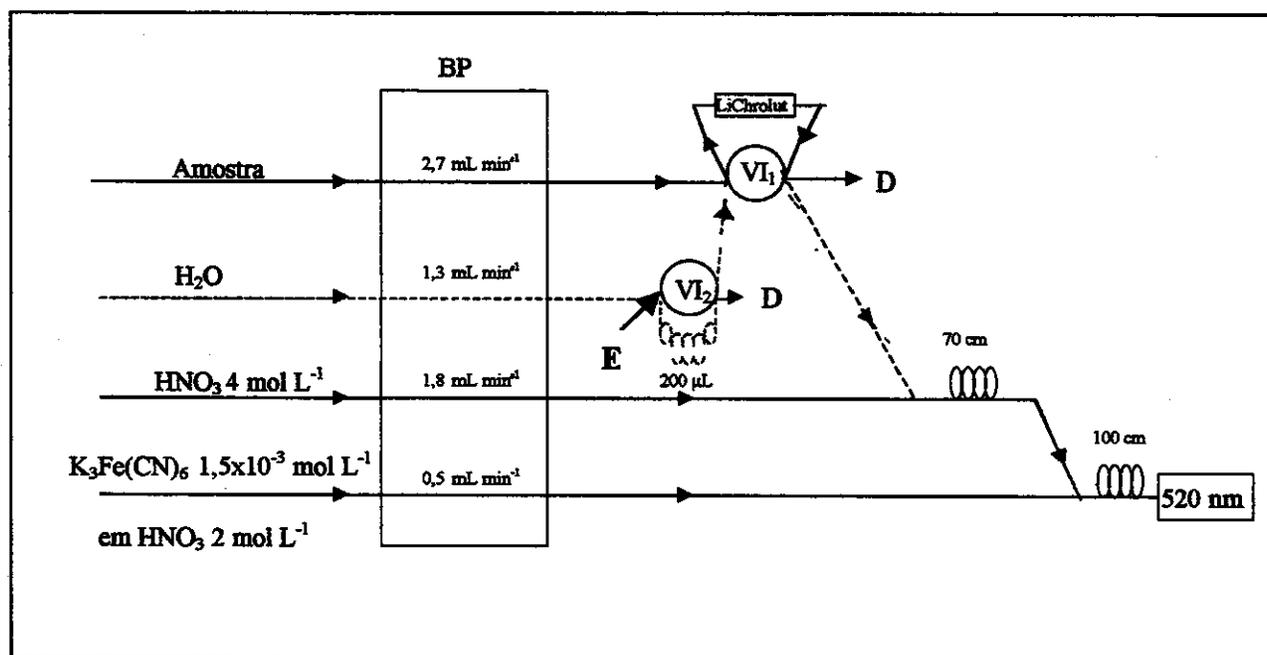


Figura 4 - Sistema de fluxo otimizado para o *screening* de fenotiazinas em urina: VI₁ e VI₂ - válvulas de injeção 1 e 2; BP - bomba peristáltica; E - eluente; D - descarte.

Após a eluição, os analitos foram confluídos com um fluxo de HNO_3 4 mol L^{-1} (vazão de $1,8 \text{ mL min}^{-1}$) e passaram por um reator de 70 cm para homogeneização. Depois, essa mistura confluiu com um fluxo de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em HNO_3

2 mol L⁻¹ (vazão de 0,5 mL min⁻¹) para a formação do produto colorido, num reator de 100 cm. O produto colorido foi então detectado à 520 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito do ácido sulfúrico e do ácido nítrico

A reação para quantificação de fenotiazinas baseada na oxidação das mesmas pelo hexacianoferrato e proposta por Basavaiah e Krishnamurthy [43], é realizada em batelada. Os reagentes utilizados são H₂SO₄ 10 mol L⁻¹ e K₃Fe(CN)₆ 0,1 mol L⁻¹. O uso de concentrações elevadas de ácidos em sistemas de fluxo é inviável.

Os experimentos em batelada foram realizados para se comparar o efeito do H₂SO₄ e do HNO₃ na reação de oxidação. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Resultados obtidos variando-se as concentrações dos ácidos sulfúrico e nítrico na reação de oxidação das fenotiazinas.

Concentração (mol L ⁻¹)	A*	A**
1	0,008±0,003*	0,002±0,003
2	0,046±0,005	0,038±0,009
3	0,087±0,006	0,075±0,007
4	0,098±0,003	0,086±0,006
5	0,084±0,002	0,079±0,004

A* e A** - Absorbâncias obtidas a 520nm, com o emprego de H₂SO₄ e de HNO₃ respectivamente.

Verifica-se que até a concentração de 4 mol L⁻¹ a absorbância aumenta com o aumento da concentração dos ácidos. A partir de 3 mol L⁻¹ esse ganho em absorbância é reduzido. Para a concentração de 5 mol L⁻¹ ocorreu uma pequena redução na absorbância, que não é significativa quando são considerados os desvios obtidos.

As absorbâncias obtidas pelo emprego do ácido sulfúrico foram um pouco superiores às obtidas com HNO₃. Foi observado, no entanto, que a estabilidade do produto colorido é significativamente maior quando se utiliza H₂SO₄. Segundo

Revanasiddappa e Ramappa [45], a estabilidade das espécies coloridas depende da natureza do meio ácido.

Grande parte dos trabalhos que descrevem a determinação de fenotiazinas por meio de reações de oxi-redução é realizada em batelada [45,50], sendo a estabilidade do produto formado de grande importância. Como o H_2SO_4 favorece essa estabilidade, sua utilização é comum nestes trabalhos.

Considerando-se a incompatibilidade de altas concentrações de ácido sulfúrico com os tubos utilizados no sistema de fluxo, e também que a estabilidade do produto colorido é menos relevante em sistemas de fluxo contínuo, onde as medidas são conduzidas quase que simultaneamente à formação do produto, o ácido nítrico foi escolhido como meio ácido.

3.2. Otimização do sistema de fluxo

A clorpromazina foi utilizada para a otimização do sistema, pois ela tem sido extensivamente estudada, e é muito utilizada em medicamentos. Problemas de *overdose* com esta fenotiazina são muito freqüentes [37]. O espectro de absorção do produto de reação apresentou um máximo em 520 nm, o qual foi utilizado para monitorar o sinal analítico (altura do pico).

3.2.1. Efeito da concentração dos reagentes

O ácido tem uma função importante na oxidação das fenotiazinas, pois estabiliza o radical livre. Segundo Karpinska *et al.* [40] a estabilidade do radical livre aumenta com o aumento da acidez, sendo devida mais à atividade do íon H_3O^+ do que a concentração, de modo que o íon H_3O^+ apresenta um efeito estabilizante termodinâmico maior do que o efeito cinético.

O efeito da concentração dos reagentes introduzidos no sistema de fluxo pode ser observado na figura 5.

A concentração de HNO_3 que mais favoreceu a reação está entre 3 e 4 mol L^{-1} (Fig. 5a), sendo que a concentração de 4 mol L^{-1} foi fixada para o sistema de *screening*. A introdução dessa concentração no sistema de fluxo é reduzida a uma concentração de HNO_3 de aproximadamente 3 mol L^{-1} no segundo reator, devido aos fluxos confluentes.

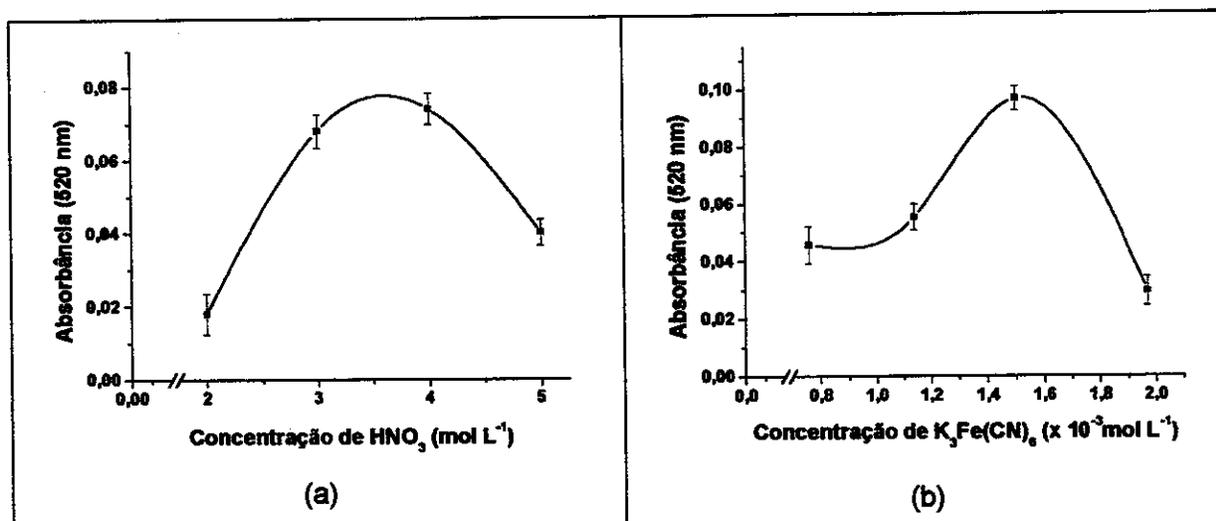


Figura 5 – Efeito da concentração dos reagentes introduzidos no sistema de *screening*: (a) HNO₃ (n=3) e (b) K₃Fe(CN)₆ (n=3).

No sistema de fluxo também foi observada uma redução na absorbância para concentrações de ácido muito altas. No entanto, essa redução foi maior do que a obtida nos experimentos em batelada. Merkle e Discher [71] obtiveram resultados semelhantes quando trabalharam com H₂SO₄.

A concentração do reagente oxidante é crítica [50,63]. Variações na concentração deste reagente afetam significativamente o sinal obtido. A concentração ótima de K₃Fe(CN)₆ foi 1,5 x 10⁻³ mol L⁻¹ (Fig. 5b), o que corresponde a uma concentração de 2,08 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ após a confluência com a mistura amostra/HNO₃. Com concentrações menores, provavelmente a formação do radical livre é incompleta. Para concentrações maiores, a redução na intensidade da cor formada é atribuída a maior oxidação dos radicais livres a sulfóxidos incolores [71]. Além disso, a cor amarela do hexacianoferrato (III) pode interferir na medida da absorbância do radical livre, o que também pode contribuir para reduzir a absorbância medida.

3.2.2. Efeito das vazões dos reagentes e do carregador

As vazões dos reagentes e do carregador num sistema de fluxo são de extrema importância, uma vez que afetam diretamente a dispersão da zona de amostra [34]. A dispersão da zona de amostra aumenta com a raiz quadrada da

distância percorrida através dos tubos e diminui com a redução da velocidade de fluxo [32].

Os resultados obtidos no estudo das vazões dos reagentes e do carregador são mostrados na tabela 2.

Tabela 2 – Efeito das vazões dos reagentes e do carregador no sistema de *screening*.

Vazão de HNO ₃ (mL min ⁻¹)	Vazão de K ₃ Fe(CN) ₆ (mL min ⁻¹)	Vazão de H ₂ O (mL min ⁻¹)	Absorbância
1,8	0,8	2,0	0,029 ± 0,005
1,8	0,8	1,3	0,087 ± 0,007
1,8	0,8	0,8	0,057 ± 0,004
1,8	0,5	1,3	0,108 ± 0,005
1,8	0,3	1,3	0,055 ± 0,003
1,3	0,5	1,3	0,022 ± 0,004
2,0	0,5	1,3	0,043 ± 0,006

O pico resultante de uma análise por injeção em fluxo é o resultado de dois processos, ambos de natureza cinética: o processo físico de dispersão da zona de amostra no fluxo carregador e o processo químico de formação de espécies químicas [72].

A relação das vazões que produziu a maior absorbância foi 1,8 mL min⁻¹ de HNO₃, 0,5 mL min⁻¹ de K₃Fe(CN)₆ e 1,3 mL min⁻¹ do carregador (H₂O). Vazões muito altas provocam maior diluição da amostra, o que não é desejado neste caso.

3.2.3. Efeito do segundo reator

A função dos reatores é aumentar a intensidade da mistura radial pelo perfil de velocidade na direção axial. Desta forma, a mistura entre o reagente e a amostra se torna mais efetiva e a dispersão axial da zona de amostra é reduzida [32]. O comprimento do primeiro reator não foi estudado porque sua função era somente melhorar a homogeneização do HNO₃ com o eluato (fenotiazinas em etanol), sendo fixado em 70 cm. Já o comprimento da segunda bobina de reação, na qual ocorre a oxidação das fenotiazinas pelos íons hexacianoferrato, foi variado de 0 a 200 cm, e os resultados são apresentados na figura 6. Bobinas menores que 100 cm não foram

suficientes para uma homogeneização completa dos reagentes e da amostra ou para que a reação se completasse.

Quando se usou a bobina de 200 cm, a absorvância diminuiu consideravelmente. Isto é devido principalmente à baixa estabilidade do produto colorido formado, além do fato que um longo percurso aumenta a dispersão [72].

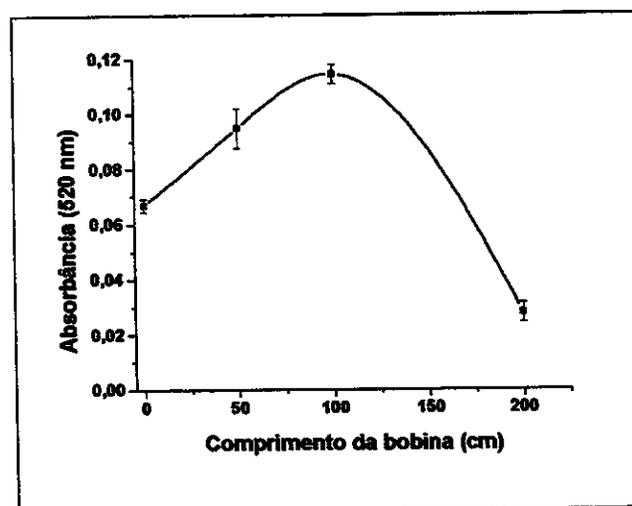


Figura 6 - Efeito do comprimento do segundo reator no sistema de *screening* (n=3).

3.3. Otimização das variáveis que influenciam a pré-concentração

O método previamente otimizado não pôde ser aplicado para a determinação das fenotiazinas por injeção direta da amostra de urina, por diversas razões: 1) a urina em meio ácido apresenta cor intensa, interferindo assim nas medidas de absorvância; 2) os compostos redutores presentes na matriz interferem por competição com o reagente e 3) a sensibilidade do método é baixa para detectar as drogas selecionadas em concentrações terapêuticas, normalmente encontradas em urina.

A extração em fase sólida (SPE) é amplamente utilizada para a pré-concentração e limpeza de amostras biológicas. A SPE, quando comparada à extração líquido-líquido, reduz o tempo requerido (especialmente quando se utilizam métodos automáticos), permite a manipulação de pequenos volumes de amostras, e são requeridos volumes reduzidos de solventes [69].

A seqüência típica de uma extração em fase sólida é: (i) condicionamento do sorvente; (ii) aplicação da amostra; (iii) lavagem da amostra e (iv) desorção e recuperação dos analitos a serem separados [70,73].

Para compreender o processo de extração é necessário compreender as interações entre o analito, a matriz e o sorvente. Os parâmetros a serem determinados são indicados pela seqüência da SPE: seleção do tipo e quantidade do sorvente, volume de amostra que pode ser aplicado sem perda na recuperação, composição e volume da solução de lavagem que pode ser aplicado sem perda de analitos e, finalmente, a composição e volume da solução de eluição.

3.3.1. Efeito do tipo e quantidade de sorvente na pré-concentração das fenotiazinas

Um bom conhecimento das interações entre analitos, matriz e sorvente é importante para se estabelecer um esquema de extração eficiente. Essas interações incluem, principalmente, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações iônicas [70].

Para escolher o melhor sorvente para a separação/pré-concentração de fenotiazinas, realizou-se um estudo de retenção em 3 diferentes valores de pH. O pH de retenção é importante, uma vez que dependendo do pH, os analitos podem estar ionizados positiva ou negativamente ou na forma neutra e as interações do analito com o sorvente podem ser alteradas [73]. O pK_a das fenotiazinas estudadas está em torno de 9,0 [37], sendo que apenas em valores de pH maiores que 9,0 as mesmas se encontram ionizadas.

As porcentagens de retenção obtidas são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 - Porcentagem de retenção das fenotiazinas pelos sorventes a diferentes valores de pH.

Sorvente	pH = 2,0	pH = 6,0	pH = 10,0
RP-C18	103 %	87 %	93 %
Amberlit XAD-2	57 %	47 %	62 %
LiChrolut®EN	95 %	108 %	87 %

O Oásis[®]MCX é um sorvente de modo misto contendo grupos funcionais não-polares e trocadores de íons, tendo sido desenvolvido para análise de compostos básicos em fluidos biológicos [70]. As interações que ocorrem entre o analito e o sorvente se dão por atrações eletrostáticas e por forças de Van-der-Waals. Segundo o fabricante, este sorvente apresenta a vantagem de não requerer a etapa de condicionamento, o que simplifica o procedimento, tornando-o mais rápido. Por outro lado, a eluição dos compostos retidos neste sorvente deve ser realizada com NH₄OH preparado em etanol. Ao se introduzir esse eluato no sistema de fluxo, a reação não ocorreu, provavelmente devido a acidez insuficiente do meio. Seria então necessário aumentar muito a concentração de HNO₃ para se atingir a acidez adequada e possibilitar o progresso da reação de oxidação; entretanto, o sistema se tornaria inviável.

As séries das resinas XAD são análogas aos sorventes C18 com fases ligadas. Com uma base polimérica, XAD apresenta estabilidade numa faixa de pH mais ampla. O sorvente Amberlite XAD-2 é um copolímero de poliestireno divinilbenzeno [74]. Este sorvente apresenta um mecanismo de retenção por troca iônica, prevalecendo as interações por atração eletrostática. Como pode ser observado na tabela 3, este sorvente não apresentou bons resultados, mesmo no pH acima do pK_a das fenotiazinas. Isto sugere que as interações entre as fenotiazinas e o sorvente ocorrem mais por polaridade do que por atração eletrostática.

Os sorventes LiChrolut[®]EN e RP-C18 apresentaram boas porcentagens de retenção para as fenotiazinas. A resina LiChrolut[®]EN foi escolhida por apresentar melhor retenção em pH próximo ao da urina (pH = 6,0), e também devido a algumas vantagens que apresenta. Em relação ao RP-C18, este sorvente possui estabilidade na faixa de pH de 1-14, maior volume de ruptura (*breakthrough*) e maior área superficial, o que favorece a retenção [75]. O sorvente LiChrolut[®]EN é um copolímero poroso de etilvinilbenzeno divinilbenzeno, altamente entrelaçado, e exibe uma alta eficiência de adsorção devido a sua grande área superficial específica (1200 m² g⁻¹) [76]. Devido a estruturas de microporos ele exibe uma alta capacidade adsortiva, especialmente para analitos com baixa massa molecular [69]. Em comparação com C18, possui um maior número de sítios ativos.

Após a seleção do sorvente, otimizou-se a quantidade do mesmo que conduz a uma maior eficiência na pré-concentração. A quantidade do sorvente foi variada de 25 a 75 mg. Como pode ser observado na figura 7, 35 mg do sorvente foi à quantidade mais adequada para a pré-concentração.

Quanto maior a quantidade de sorvente utilizada, maior a capacidade de retenção. Maiores quantidades de sorvente também requerem maior volume de solvente para eluir os compostos de interesse da coluna [77]. Uma coluna com uma grande quantidade de sorvente pode dificultar a etapa de eluição [75], sendo necessário um volume de eluente maior para arrastar os analitos da coluna. Provavelmente devido a isso, ocorreu uma redução na absorbância quando foram utilizadas massas maiores que 35 mg.

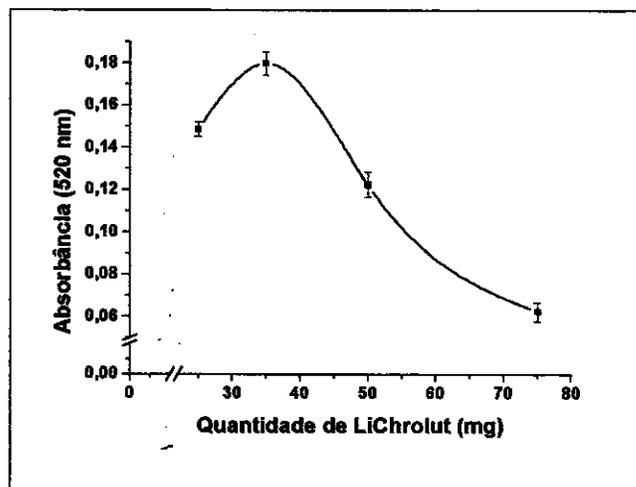


Figura 7 - Efeito da quantidade de sorvente (LiChrolut[®]EN) na retenção das fenotiazinas (n=3).

3.3.2. Efeito do pH da amostra na pré-concentração das fenotiazinas

O pH das amostras foi estudado por influenciar a retenção das fenotiazinas. O estudo discutido anteriormente para a escolha do sorvente, foi realizado em três faixas de pH distintas (ácida, neutra e básica). Desta vez, o estudo abrangeu uma faixa mais estreita de pH (5,0-9,0), próxima àquela obtida no estudo anterior (6,0), sendo realizado tanto com padrões aquosos quanto com urina. A figura 8 apresenta os resultados obtidos neste estudo. Existe uma diferença na absorbância obtida

quando se usa solução aquosa e amostra de urina. Isso se deve à presença de outros compostos na urina que podem interferir tanto na interação do analito com a fase sólida na coluna, quanto na reação com o hexacianoferrato. Essa interferência é negativa, pois a absorbância diminui quando se trabalha com urina.

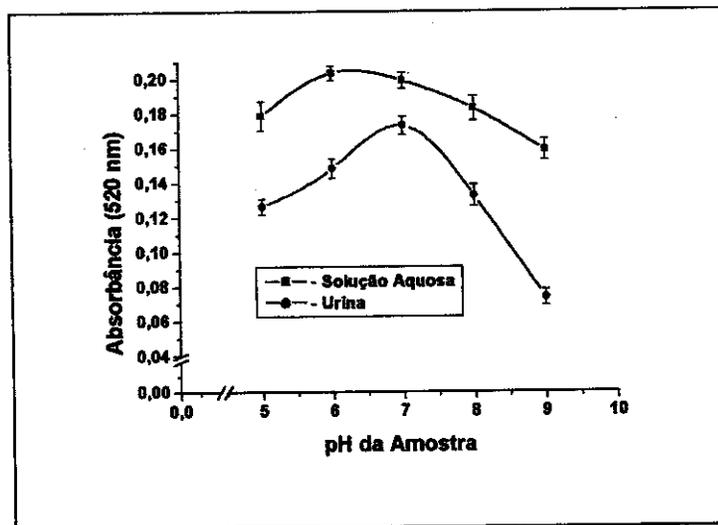


Figura 8 – Efeito do pH da amostra na pré-concentração das fenotiazinas (n=3).

Observou-se que a partir de pH 7,0-7,5 (dependendo da amostra) começa a ocorrer formação de um precipitado na urina. Antes de introduzir as amostras de urina nas quais ocorreu precipitação, estas foram filtradas para evitar um entupimento do sistema de fluxo. É possível que nestas condições ocorra uma co-precipitação das fenotiazinas, pois houve uma queda brusca no sinal analítico, a partir do pH em que ocorreu a precipitação. A redução na absorbância para as soluções aquosas foi menos intensa, e talvez seja causada pela menor retenção das fenotiazinas nestes valores de pH. O pH fixado para o *screening* foi de 6,5 por ser mais favorável à retenção das fenotiazinas, e por não ocorrer a formação de precipitado neste pH (nas amostras testadas).

3.3.3. Efeito da vazão e do volume de amostra na pré-concentração das fenotiazinas

A vazão da amostra passando pela coluna de pré-concentração também foi otimizada e os resultados são apresentados na figura 9(a). Normalmente, essa vazão

aplicações essa vazão varia de 0,5 a 5 mL min⁻¹ [77]. A vazão de 2,7 mL min⁻¹ foi escolhida por produzir os melhores resultados. Uma vazão alta pode dificultar a retenção das drogas na coluna, e causar a redução na absorbância obtida. Utilizando-se vazões menores, o tempo de pré-concentração deveria ser maior, o que, conseqüentemente, afetaria a freqüência analítica do método.

O tempo de amostragem (ou volume de amostra) é outro fator de grande importância e o seu efeito sobre a pré-concentração pode ser verificado por meio da figura 9(b).

Em sistemas de fluxo, os volumes típicos para matrizes biológicas estão na faixa de 1 a 10 mL [70]. O volume de ruptura representa o volume máximo de amostra que pode ser aplicado com uma recuperação teórica de 100% [70], e deve ser determinado para evitar que o analito seja eluído pela própria amostra quando é utilizado um grande volume da mesma [78]. O volume de ruptura determinado para este sistema foi de 8 mL. O volume de amostra utilizado deve ser menor que o volume de ruptura.

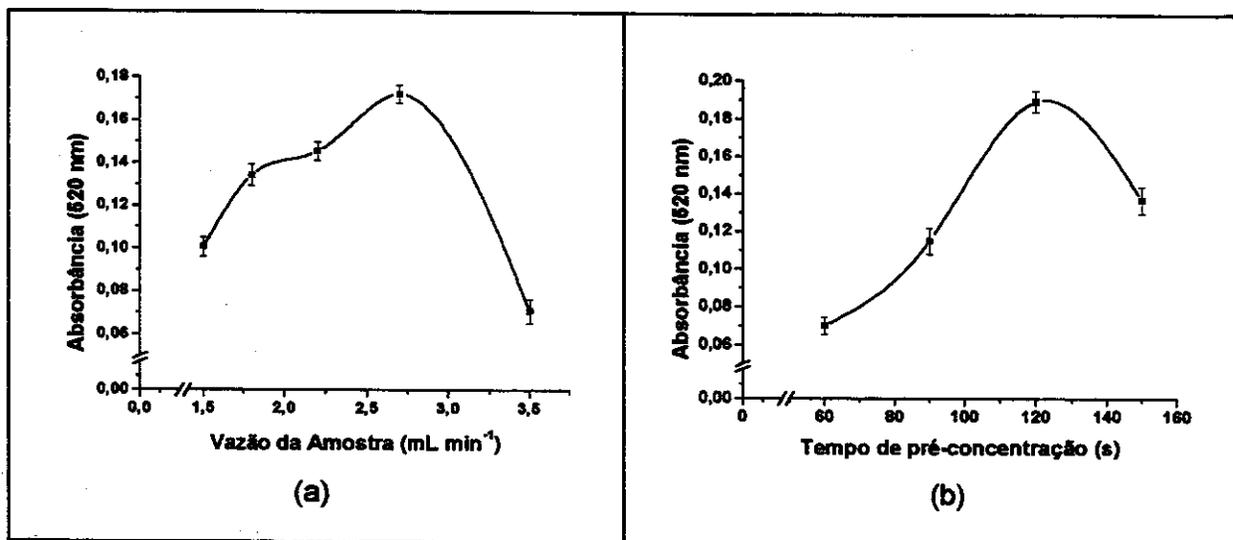


Figura 9 – Efeito da vazão da amostra (a) e do tempo de amostragem (b) na pré-concentração das fenotiazinas (n=3).

Tempos maiores que 2 min causaram uma redução na absorbância, o que pode ser uma conseqüência da supersaturação da coluna com concomitantes da matriz, os quais também podem ser retidos. O tempo de 2 min foi, então, fixado para

a pré-concentração. Com a vazão anteriormente otimizada, esse tempo corresponde a um volume de 5,4 mL. Além disso, como já discutido anteriormente, tempos maiores tornariam o *screening* mais demorado.

3.3.4. Composição e volume da solução de lavagem

A etapa de limpeza ou lavagem é extremamente útil, principalmente quando se trata de amostras complexas, como é o caso da urina, pois esta etapa auxilia na eliminação de interferentes [76]. Para extrações em fase reversa, normalmente se usa como solução de lavagem água pura, soluções diluídas de ácido ou base ou, ainda, mistura de solventes [77].

Neste trabalho testou-se água desionizada e soluções de HNO₃ variando de 0,25 a 1 mol L⁻¹. Os resultados são apresentados na figura 10(a). Quando se utilizou água, a remoção dos interferentes foi pouco eficaz, o que pode afetar a reação de oxidação. Quando se usou a concentração de 1 mol L⁻¹, observou-se que a absorbância diminuiu razoavelmente, e os desvios obtidos foram altos. Talvez isto seja devido ao arraste dos analitos durante a etapa de lavagem. Não se verificou diferença significativa entre as concentrações de 0,5 e 0,75 mol L⁻¹. Desta forma, optou-se por trabalhar com HNO₃ 0,5 mol L⁻¹, devido ao menor gasto com reagentes.

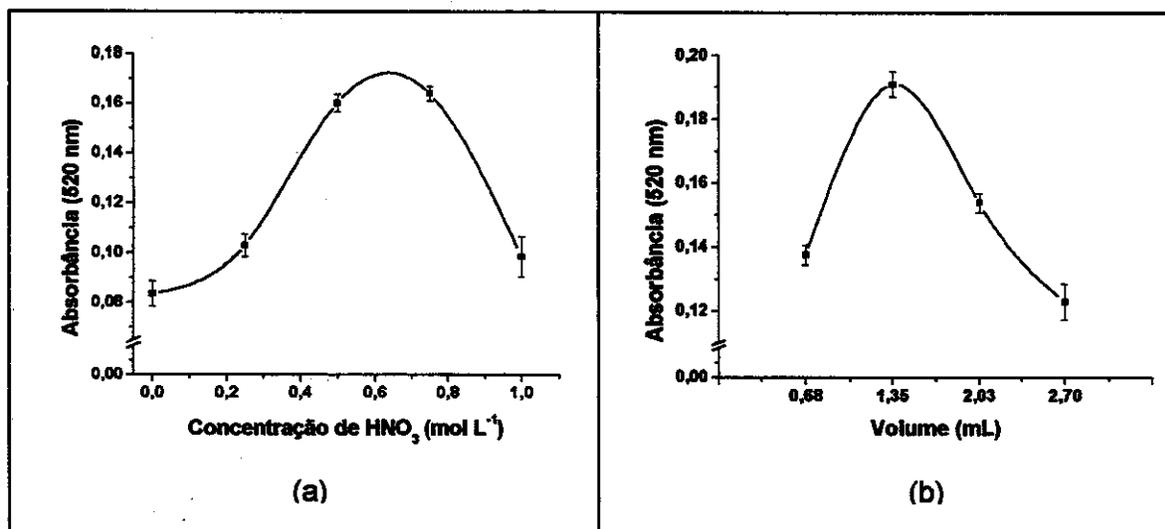


Figura 10 - Efeito da concentração do HNO₃ (a) e do volume da solução de lavagem (b) na pré-concentração das fenotiazinas (n=3).

Com relação ao volume de solução de lavagem a ser utilizado, os resultados são apresentados na figura 10(b). O volume mais adequado foi de 1,35 mL (30 s). Volumes maiores causaram uma redução na absorbância, o que pode ser devido a eluição dos analitos de interesse pela solução de lavagem.

3.3.5. Efeito da composição e do volume do eluente

O eluente mais comumente usado neste tipo de extração em fase sólida é o metanol [70,74,78]. Devido à sua toxicidade, optou-se por trabalhar com etanol.

Diferentes proporções de etanol:HNO₃ foram testadas para a eluição das fenotiazinas. Quando se empregava etanol 100 % (v/v) para a eluição, a quantidade de bolhas formadas no sistema de fluxo impossibilitava a medida correta do sinal analítico. Desta forma, a quantidade de etanol foi sendo reduzida e a de HNO₃ aumentada até o ponto onde a eficiência da eluição começou a ser afetada. Quando se tentou eluir as fenotiazinas com etanol:HNO₃ na proporção 7:3 (v/v) a eluição não foi completa. Devido a isso, preferiu-se trabalhar com etanol:HNO₃ na proporção 8:2 (v/v), com o qual, além de uma boa eficiência de eluição, conseguiu-se reduzir a formação de bolhas no sistema. A concentração final de HNO₃ no eluente era 2 mol L⁻¹.

O volume do eluente também foi estudado. Quanto menor o volume de eluente utilizado, maior o fator de pré-concentração obtido [76]. O volume de 100 µL não foi suficiente para eluição, ficando resíduos de fenotiazinas na coluna. No sistema em questão, o uso de quantidades de etanol maiores que 300 µL produziu resultados insatisfatórios, tanto pela quantidade de bolhas formadas, como pela difícil homogeneização da amostra e dos reagentes, o que é sugerido pelos picos duplos obtidos. Assim, optou-se por trabalhar com o volume de 200 µL.

3.4. Estudo de recuperação das fenotiazinas

Após a otimização de todas as variáveis, realizou-se um estudo para se verificar a recuperação das fenotiazinas a partir do sistema completo (com a SPE em linha). Para isso, obteve-se uma curva de calibração com clorpromazina, variando-se a concentração de 3 a 12 µmol L⁻¹. Foram adicionadas diferentes concentrações de

clorpromazina em amostras de urina, e estas foram analisadas com o emprego do sistema de *screening*.

A tabela 4 apresenta as concentrações adicionadas e obtidas, e também a porcentagem de recuperação.

As recuperações obtidas foram satisfatórias, estando todas acima de 90 %. Valores de recuperação abaixo de 100 % eram esperados, devido à pequena diferença obtida entre as absorbâncias para padrões aquosos e urina, conforme observado e comentado em estudos anteriores. Essas recuperações indicam que o sistema proposto apresenta um bom desempenho, principalmente no que diz respeito à extração em fase sólida.

Tabela 4 – Recuperação de clorpromazina no sistema de *screening* otimizado.

Amostra	Concentração real ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração obtida ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	% Recuperação
1	2,5	2,4	96,0
2	5,0	4,8	96,0
3	6,0	5,7	95,0
4	7,5	7,0	93,3
5	10,0	9,3	93,0

Para o sistema de *screening* é mais adequado que a curva de calibração seja obtida a partir de amostras de urina, para minimizar essa diferença e os erros que dela possam advir.

3.5. Estudo de interferências

O estudo de interferentes foi realizado pois o sorvente usado para separação/pré-concentração não é específico para fenotiazinas. Este estudo foi baseado em alguns dos compostos freqüentemente presentes na urina. A escolha dos compostos a serem estudados foi uma tarefa difícil, uma vez que a matriz é muito complexa e sua composição varia enormemente, dependendo da dieta, do metabolismo e da ingestão de medicamentos, entre outros fatores [79].

A concentração de fenotiazinas foi fixada em $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos são listados na tabela 5. Como interferência, foi considerada a concentração

do composto que alterou a absorvância em $\pm 10 \%$. Apesar da concentração destes compostos variar muito na urina humana, as concentrações em que se obtiveram problemas de interferência foram altas, e dificilmente são encontradas em amostras de urina [37].

O único composto que deve ser mais considerado é o ácido tartárico, pois a concentração de $125 \mu\text{mol L}^{-1}$ pode ser encontrada na urina se for ingerida uma grande quantidade de vinho. Normalmente, a ingestão de bebidas alcoólicas é contra-indicada para pessoas em tratamento com estas drogas.

Quanto à codeína, em condições de máximo uso terapêutico e máxima excreção, é encontrada na urina uma concentração de aproximadamente $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ [37], bem abaixo da concentração que produziu a interferência ($125 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Tabela 5 – Limite tolerado de diferentes compostos na determinação de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de clorpromazina.

Interferente	Limite tolerado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Interferente	Limite tolerado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Ácido acetilsalicílico	1500	Frutose	3500
Ácido ascórbico	1000	Glicose	2000
Ácido cítrico	1000	Iodato	500
Ácido salicílico	2500	Oxalato	500
Ácido tartárico	125	Paracetamol	2000
Cafeína	1500	Sulfito	1000
Codeína	125		

3.6. Absortividade molar dos produtos de oxidação das fenotiazinas estudadas

A cor dos produtos de oxidação das fenotiazinas depende do tipo de substituintes nas posições 2 e 10 [40]. Devido a isso, com as condições otimizadas, determinou-se experimentalmente a absortividade molar para cada um dos produtos da reação das fenotiazinas estudadas, a fim de avaliar a possibilidade de se trabalhar com uma mistura das mesmas para o *screening*. A massa molecular e a absortividade molar para cada uma das fenotiazinas estudadas são apresentadas na tabela 6.

Tabela 6 - Massa molecular e absorvidade molar para as fenotiazinas estudadas.

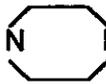
Fenotiazina	Massa molecular (g mol ⁻¹)	Absortividade molar (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
Clorpromazina	355,3	3,44 x 10 ⁴
Metotrimeprazina	444,5	3,86 x 10 ⁴
Prometazina	320,9	3,90 x 10 ⁴
Flufenazina	510,4	1,35 x 10 ⁴
Tioridazina	407,0	1,74 x 10 ⁴

As fenotiazinas cujos produtos de oxidação apresentaram absorvidade molar próxima (clorpromazina, metotrimeprazina e prometazina) podem ser avaliadas juntamente, uma vez que produzem resposta espectrofotométrica semelhante.

De acordo com Jelinek *et al.* [80], o tipo e a posição dos substituintes na estrutura básica das fenotiazinas afetam a estabilidade do composto colorido. Radicais livres que possuem uma cadeia alifática na posição 10 são mais estáveis do que aqueles com substituintes heterocíclicos.

No quadro 2 são apresentados os substituintes R₂ e R₁₀ para cada uma das fenotiazinas estudadas. Observa-se que a flufenazina e a tioridazina que possuem um grupo piperidil como substituinte na posição 10, tiveram coeficientes de

Quadro 2 - Substituintes nas posições 2 e 10 das fenotiazinas estudadas.

Fenotiazina	R ₂	R ₁₀
Clorpromazina	-Cl	-CH ₂ (CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂
Metotrimeprazina	-OCH ₃	-CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ N(CH ₃) ₂
Prometazina	-	-CH ₂ CH(CH ₃)N(CH ₃) ₂
Flufenazina	-CF ₃	-(CH ₂) ₃  NCH ₂ CH ₂ OH
Tioridazina	-SO ₂ N(CH ₃) ₂	-(CH ₂) ₃  NCH ₃

absortividade molar diferentes, o que pode ser devido a uma menor estabilidade do produto de oxidação, já que a otimização foi realizada com clorpromazina que apresenta um substituinte R₁₀ alifático.

3.7. Características analíticas

Após os testes já realizados, utilizou-se o sistema de fluxo otimizado para a obtenção da curva analítica de calibração de uma mistura das fenotiazinas clorpromazina, prometazina e metotrimeprazina em concentrações molares iguais.

As características analíticas foram calculadas com base na curva de calibração realizada com urina. Foram introduzidos no sistema de fluxo 5,4 mL de urina com pH ajustado para 6,5, contendo concentrações entre 3 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da mistura de fenotiazinas. A curva de calibração foi obtida a partir de 5 concentrações distintas, sendo realizadas 3 replicatas para cada concentração.

A tabela 7 mostra os valores das características analíticas determinadas para o método otimizado.

Tabela 7 – Características analíticas obtidas para o sistema de *screening* das fenotiazinas

Características analíticas	urina
Equação da reta	$y = 0,0227x + 0,0085$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
R	0,9987
Faixa Linear	3 -12 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Limite de Detecção	0,82 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Limite de Quantificação	2,73 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Precisão (repetibilidade)	4,1 %

O limite de detecção foi calculado como 3 vezes o desvio padrão obtido em 12 determinações do branco (urina), dividido pela inclinação da curva de calibração. O limite de quantificação foi calculado como 10 vezes o desvio padrão obtido em 12 determinações do branco, dividido pela inclinação da curva de calibração [81]. A precisão, em nível de repetibilidade do método, expressa como desvio padrão relativo, foi avaliada com 11 amostras de urina individuais contendo 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de clorpromazina.

3.8. Confiabilidade do *screening*

Para se verificar a confiabilidade do sistema de *screening* foram analisadas várias amostras de urina com diferentes concentrações da mistura de fenotiazinas. A concentração de corte foi definida como $2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Um resultado era considerado como falso negativo quando uma amostra de urina, enriquecida com uma concentração do analito maior que $2 \mu\text{mol L}^{-1}$, apresentava uma concentração menor que $2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Já um resultado falso positivo era definido quando uma amostra de urina, enriquecida com uma concentração menor que $2 \mu\text{mol L}^{-1}$, apresentava um resultado maior que esta concentração [7,10]. Um estudo sistemático foi conduzido com 6 níveis de concentração: 0,5; 1,0; 1,5; 2,5; 3,0 e $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Nas concentrações extremas ($0,5$ e $4 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram analisadas 20 amostras para cada concentração, e para as outras concentrações foram analisadas 50 amostras de cada concentração. Os resultados obtidos são mostrados na figura 11, e estão expressos em porcentagem de falsos negativos e falsos positivos.

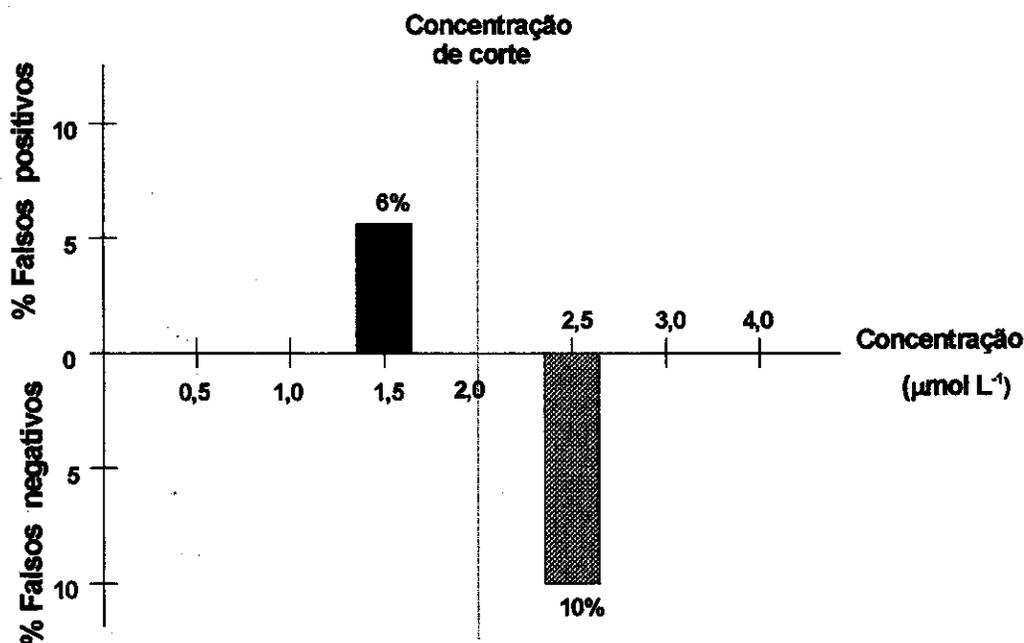


Figura 11 – Porcentagem de falsos positivos e falsos negativos obtidos no *screening* de fenotiazinas em urina.

Foram obtidos falsos resultados somente nas concentrações próximas a concentração de corte ($1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), nas quais a incerteza das medidas é maior. As amostras que apresentam um resultado falso positivo em um sistema de *screening* são analisadas pelos métodos convencionais, sendo que a porcentagem obtida (6 %) é considerada baixa. Obtiveram-se 10 % de resultados falsos negativos, ou seja, 5 das 50 amostras que tinham uma concentração de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ deram um resultado negativo. Pelo sistema de *screening*, estas amostras seriam descartadas, sendo que essa porcentagem de falsos negativos pode ser considerada relativamente alta para a finalidade proposta.

A escolha da concentração de corte pode ter sido inadequada. Isto poderia ter sido resolvido realizando-se um outro estudo utilizando o limite de quantificação (aproximadamente $3 \mu\text{mol L}^{-1}$) como concentração de corte, para se evitar ou minimizar falsos negativos.

Outra opção seria utilizar a concentração excretada na urina da fenotiazina mais tóxica. Como discutido anteriormente, das fenotiazinas estudadas, a prometazina possui as menores doses terapêuticas, sendo ministrada até em doses de 75 mg/dia. Com os cálculos realizados para a excreção desta droga na forma não metabolizada, chegou-se a concentração de $2,34 \mu\text{mol L}^{-1}$. Em casos de intoxicação ou de morte, as concentrações encontradas na urina são muito mais altas. Como o sistema de *screening* proposto visa principalmente resolver problemas de toxicologia analítica e de química forense, poderia se estipular, satisfatoriamente, a concentração de corte em $2,5$ ou $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, de forma que a porcentagem de falsos resultados fosse bem menor. Realizando-se uma simulação com os dados obtidos no estudo anterior, se a concentração de corte fosse fixada em $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ a porcentagem de falsos negativos se reduziria a 4 % e para uma concentração de corte de $3 \mu\text{mol L}^{-1}$, essa porcentagem seria reduzida a zero, o que seria o ideal. A porcentagem de falsos positivos é mais difícil de ser avaliada, pois não foi realizado um estudo na concentração de $2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Como já discutido anteriormente, uma porcentagem um pouco maior de falsos positivos seria bem aceitável, pois estas amostras serão analisadas posteriormente para confirmação do *screening*.

3.9. Análise de amostras desconhecidas

Para se verificar a aplicabilidade do sistema de *screening*, foram analisadas amostras desconhecidas. Diante da impossibilidade de se conseguir amostras de pacientes em tratamento com fenotiazinas, foram coletadas amostras de diferentes voluntários e foram realizadas adições de quantidades desconhecidas de uma mistura das fenotiazinas estudadas. Estas amostras foram submetidas ao sistema de *screening*, e os resultados obtidos foram comparados posteriormente com os resultados verdadeiros. Considerou-se como concentração de corte, a concentração estipulada inicialmente de $2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Estes resultados podem ser observados na tabela 8.

Das 15 diferentes amostras analisadas, para somente uma, o sistema de *screening* forneceu uma resposta errada, justamente quando a concentração da amostra era muito próxima ($1,9 \mu\text{mol L}^{-1}$) à concentração de corte estabelecida ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). O resultado errado foi um falso positivo devendo esta amostra ser analisada pelo método de confirmação. Esse estudo mostra a aplicabilidade do sistema de *screening* proposto.

Tabela 8 - Resultados do *screening* realizado com amostras desconhecidas

Amostra	Concentração adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Resposta do <i>Screening</i>
1	1,3	Não
2	1,9	Sim
3	1,0	Não
4	4,4	Sim
5	1,5	Não
6	4,2	Sim
7	3,3	Sim
8	5,5	Sim
9	1,4	Não
10	3,9	Sim
11	1,8	Não
12	2,5	Sim
13	3,5	Sim
14	1,6	Não
15	0,8	Não

4. CONCLUSÕES PARCIAIS

O sistema de *screening* proposto para a detecção de fenotiazinas em urina possibilitou uma análise rápida e de baixo custo. Cerca de 20 amostras podem ser processadas em uma hora, utilizando-se um sistema de fluxo relativamente simples e um espectrofotômetro.

O sistema proposto também se mostrou robusto, uma vez que mesmo trabalhando-se com amostras tão complexas como as de urina, o sistema apresentou bons limites de detecção e quantificação e boa precisão.

Os resultados obtidos foram satisfatórios para os objetivos propostos, uma vez que a porcentagem de falsos resultados obtida foi relativamente baixa. A concentração de corte estabelecida talvez não tenha sido a mais adequada, como discutido. Para resolver este problema, outros fatores podem ser avaliados e outra concentração de corte, estabelecida. O ideal em casos de intoxicação seria trabalhar com a menor dose tóxica da fenotiazina. Entretanto, a diferença no metabolismo das pessoas dificulta o estabelecimento de uma concentração segura, sendo que os dados encontrados na literatura variam muito.

Outra forma de melhorar ainda mais o sistema, seria o acoplamento do mesmo a um microcomputador, de forma que a resposta binária fosse obtida automaticamente.

O método recomendado para a confirmação do *screening* de fenotiazinas é a Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massas. Como não foi possível se trabalhar com amostras de pacientes em tratamento, a etapa de confirmação não foi realizada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – M.A. Belarra, I. Belategui, I. Lavilla, J.M. Anzano, J.R. Castillo, *Talanta* **46** (1998) 1265.
- 2 - M.M.L. Aerts, A.C. Hogenboom, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. B* **667** (1995) 1.
- 3 – M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, *Trends Anal. Chem.* **18** (1999) 685.
- 4 – M. de la Guardia, S. Garrigues, *Trends Anal. Chem.* **17** (1998) 263.
- 5 – S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* **402** (1999) 1.
- 6 - P.M. Krämer, A. Franke, C. StandfuB-Gabish, *Anal. Chim. Acta* **399** (1999) 89.
- 7 - A. Criado, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* **435** (2001) 281.
- 8 - M.T. Tena, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Proc.* **30** (1993) 276.
- 9 – A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* **436** (2001) 153.
- 10 - D. Gambart, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* **366** (1998) 93.
- 11 – I. Ojanperä, I. Rasanen, E. Vuori, *J. Anal. Toxicol.* **15** (1991) 204.
- 12 - M. Valcárcel, A. Rios, *Anal. Chem.* **65** (1993) 781A.
- 13 - S.A. Eremin, B. Laassis, J.J. Aaron, *Talanta* **43** (1996) 295.
- 14- A.D. Campigliam, T. Vo-Dinh, *Anal. Chim. Acta* **372** (1998) 349.
- 15 - B. Bjarnason, L. Chimuka, P. Onnerfjord, S. Eremin, J.A. Jonsson, G. Johansson, J. Emnéus, *Anal. Chim. Acta* **426** (2001) 197.
- 16 – J. M. Hungford, T.A. Hollingworth, M.M. Wekell, *Anal. Chim. Acta* **438** (2001) 123.
- 17 – V. Gaudin, J. Fontaine, P. Maris, *Anal. Chim. Acta* **436** (2001) 191.
- 18 – M. Azubel, F.M. Fernández, M.B. Tudino, O.E. Troccoli, *Anal. Chim. Acta* **398** (1999) 93.
- 19 – Z. Quan, t. Ozawa, M. Sato, Y. Umezawa, *Anal. Chim. Acta* **423** (2000) 197.
- 20 - M.P. Molloy, P.C. Andrews, *Anal. Chem.* **73** (2001) 5387.

- 21 - A. Ogawa, H. Arai, H. Tanizawa, T. Miyahara, T. Toyooka, *Anal. Chim. Acta* **383** (1999) 221.
- 22 - H. Borsdorf, A. Rämmler, D. Schulze, K.O. Boadu, B. Feist, H. Weib, *Anal. Chim. Acta* **440** (2001)63.
- 23 - R.E. Calaf, J. Pena, S. Paytubi, B.C. Blount, M.P. de la Paz, E. Gelpi, J. Abian, *Anal. Chem.* **73** (2001) 3828.
- 24 - C. Yarnitzky, J. Wang, B. Tian, *Talanta* **51** (2000) 333.
- 25 - J.R. Baena, M. Gallego, M. Valcárcel, J. Leenaers, F.C. Adams, *Anal. Chem.* **73** (2001) 3927.
- 26 – E. Engstion, I. Jönerbring, B. Karlberg, *Anal. Chim. Acta* **371** (1998) 227.
- 27 - M. Ojala, I. Mattila, V. Tarkiainen, T. Same, R. A. Ketola, A. Maattanen, R. Kostiainen, T. Kotiaho, *Anal. Chem.* **73** (2001) 3624.
- 28 - A.G. Lista, M.E. Palomeque, B.S.F. Banda, *Talanta* **50** (1999) 881.
- 29 - S. Kipp. H. Peyer, W. Kleiböhmer, *Talanta* **46** (1998) 385.
- 30 - S. M. Golabi, M. Showkati-Shishwan, *Talanta* **38** (1991) 1253.
- 31 – M.D. Almeida, K.C. Leandro, C.V. Costa, R.E. Santelli, M. de La Guardia, *J. Anal. At. Spectrom.* **12** (1997) 1235.
- 32 - J. Ruzicka, E.H. Hansen, **Flow Injection Analysis**, John Wiley & Sons, New York, 1988.
- 33 – A. Woller, H. Garraud, F. Martin, O.F.X. Donard, P. Fodor, *J. Anal. At. Spectrom.* **12** (1997) 53.
- 34 - M.F. Guiné, R.L. Tuon, F.J. Krug, M.A.Z. Arruda, *Anal. Chim. Acta* **261** (1992) 533.
- 35 - M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, **Non-Chromatographic Continuous Separation Techniques**, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991.
- 36 – H.H. Maurer, *J. Chromatogr.* **580** (1992) 3.
- 37 – M.J. Stewart, in A.C. Moffat, (ed.), **Clarke's Isolation and Identification of Drugs**, The Pharmaceutical Press, London, 1986.
- 38 – R.S. Weisman, M.A. Howland, K. Verebey, in L.R. Goldfrank, N.E. Flomenbaum, N.A. Lewin, R.S. Weisman, M.A. Howland, **Toxicology Emergencies**, Appleton & Lange, East Norwal, 1990.

- 39 – S.M. Mello, **Cromatografia em Fase Gasosa como Técnica de Triagem para Diagnóstico Laboratorial das Intoxicações Agudas por Medicamentos que Causam Síndrome de Depressão do Sistema Nervoso Central**, Dissertação de Mestrado, USP-SP, 1997.
- 40 – J. Karpinska, B. Starczewska, H. Puzanowska-Tarasiewicz, *Anal. Sci.* **12** (1996) 161.
- 41 – F.A. Aly, N.A. Alarfaj, A.A. Alwarthan, *Anal. Chim. Acta* **358** (1998) 255.
- 42 – K. Basavaiah, G. Krishnamurthy, *Talanta* **46** (1998) 665.
- 43 – K. Basavaiah, G. Krishnamurthy, *Talanta* **47**(1998) 59.
- 44 – A. Mounsey, D. Strachan, F.J. Rowell, V. Rowell, J.D. Tyson, *Analyst* **121** (1996) 955.
- 45 – H.D. Revanasiddappa, P.G. Ramappa, *Talanta* **43** (1996) 1291.
- 46 – T. Aman, A. Ali, I. Khokhar, A. Rashid, *Mikrochim. Acta* **126** (1997) 295.
- 47 - H. Hattori, S. Yamamoto, M. Iwata, E. Taka Shima, T. Yamada, O. Suzuki, *J. Chromatogr. B* **579** (1992) 247.
- 48 - J. Caldwell, S.C. Mitchell, **"Metabolic Pathways" in Comprehensive Medicinal Chemistry**, C. Hansch (ed.) Pergamon Press, Oxford, 1990, Vol. 5.
- 49 – Y. Ishikawa, O. Suzuki, H. Hattori, *Forensic Sci. Int.* **44** (1990) 93.
- 50 – K. Basavaiah, G. Krishnamurthy, *Anal. Lett.* **31** (1998) 1037.
- 51 – R. Pérez, A. Rupérez, J.J. Laserna, N. Felidj, B. Laassis, J.J. Aaron, J. Aubard, *Anal. Chim. Acta* **369** (1998) 197.
- 52 - O.I. Glukhova, V.I. Tkach, L.P. Tsyganok, L.I. Khmel'nikova, *J. Anal. Chem.* **52** (1997) 234.
- 53 – J.B. Fourtillan, J. Girault, S. Bouquet, M.A. Levebre, *J. Chromatogr.* **309** (1984) 391.
- 54 - V.V. Cosofret, R.P. Buck, *Analyst* **109** (1984) 1312.
- 55 - S. Khalil, N. Borham, *Microchem. J.* **63** (1999) 389.
- 56 - M. H. Pournaghi-Azar, K. Farhadi, *Talanta* **44** (1997) 1773.
- 57 - C. Petit, K. Murakami, A. Erdem, E. Kilinc, G.O. Borondo, J.F. Liegeois, J.M. Kauffmann, *Electroanalysis* **10** (1998) 1241.
- 58 - **The British Pharmacopoeia**, Her Majesty's Stationery Office, London, 1993.

- 59 - **The United States Pharmacopoeia**, XXII Revision, National Formulary XVII, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 1990.
- 60 - T. Jira, G. Raether, *Pharmazie* **46** (1991) 849.
- 61 - A. El-Maaboud, I. Mohamed, *Talanta* **44** (1997) 1173.
- 62 - P.G. Ramappa, H.S. Gowda, A.N. Nayak, *Analyst* **105** (1980) 663.
- 63 - M.M. El-Kerdwy, S.M. Hassan, M.M. El-Ashy, *Mikrochim. Acta* **108** (1992) 323.
- 64 - K.M. Emara, *Anal. Lett.* **25** (1992) 99.
- 65 - M. Rizk, N.A. Zakhari, F. Ibrahim, M.I. Waksh, *Talanta* **33** (1986) 111.
- 66 - I.S. Ates, E. Gok, *Anal. Lett.* **20** (1987) 117.
- 67 - B. Laassis, M. Maafi, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, *Anal. Lett.* **30** (1997) 1541.
- 68 - H. Maurer, K. Pflieger, *J. Chromatogr. B* **306** (1984) 125.
- 69 - D. Puig, D. Barceló, *J. Chromatog. A* **733** (1996) 371.
- 70 - M.C. Hennion, *J. Chromatog. A* **856** (1999) 3.
- 71 - F. H. Merkle, C.A. Discher, *J. Pharm. Sci.* **53** (1964) 620.
- 72 - J.M. Calatayud, **Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals: Automation in the Laboratory**, Taylor & Francis, Londres, 1996.
- 73 - C.W. Huck, G.K. Bonn, *J. Chromatog. A* **885** (2000) 51.
- 74 - D. Yan, I.L. Shutter, *Anal. Chim. Acta* **316** (1995) 313.
- 75 - D. Barcelo, S. Chiron, S. Lacorte, E. Martinez, J.S. Salau, M.C. Hennion, *Trends Anal. Chem.* **13** (1994) 352.
- 76 - A. Junker-Buchheit, M. Witzemberger, *J. Chromatog. A* **737** (1996) 67.
- 77 - Varian Inc, **Catálogo de suprimientos para cromatografía**, EUA, 2001.
- 78 - P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, A. Sevillano-Cabeza, *J. Chromatog.* **619** (1993) 177.
- 79 - I. Sunshine (ed.), **Methodology for Analytical Toxicology**, CRC Press, Cleveland, 1982.
- 80 - I. Jelinek, I. Nencova, P. Rychlosky, *Talanta* **38** (1991) 1309.
- 81 - Analytical Methods Committee, *Analyst* **112** (1987) 199.

CAPÍTULO II

EXTRAÇÃO ÁCIDA DE MACRO E MICRONUTRIENTES EM PLANTAS USANDO ENERGIA ULTRA-SÔNICA

"Algumas pessoas olham coisas que já existem e perguntam: por que? Outras, sonham coisas que não existem e perguntam: por que não?"

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Métodos para tratamento de amostras

A determinação de metais em amostras complexas por espectrometria de absorção ou emissão atômica, muitas vezes requer a decomposição da matriz da amostra para produzir uma solução dos analitos a serem determinados [1].

Em procedimentos analíticos convencionais envolvendo eliminação da matriz orgânica, o pré-tratamento da amostra é freqüentemente considerado o “calcanhar de Aquiles” do processo analítico [1,2], principalmente devido ao grande tempo consumido.

Usualmente, o tempo necessário para o preparo das amostras é maior do que o tempo que o instrumento leva para realizar a medida. Por outro lado, tempo e esforços tornam-se fatores críticos na praticabilidade e custos das análises de rotina e dos programas de monitoramento [3].

No tratamento de amostras vegetais, os métodos de calcinação e mineralização por via úmida são comumente utilizados [4,5]. Na calcinação, a matriz orgânica é completamente destruída. As principais limitações deste método são a longa duração (de 3 a 40 h) e as possíveis perdas dos elementos mais voláteis [6]. Além disso, os métodos de calcinação podem apresentar outros problemas, tais como: a reação do analito com o material do cadinho, dificuldades envolvendo a dissolução do resíduo da combustão e problemas de contaminação das amostras [7,8].

De acordo com Matejovic e Durackova [9], os métodos mais comuns para a determinação de metais em amostras de plantas podem ser divididos em:

- Mineralização total com ácido concentrado ou mistura de ácidos em sistema aberto, com aquecimento convencional ou por microondas;
- Mineralização total com ácido ou mistura de ácidos em um sistema fechado, com aquecimento convencional ou por microondas;
- Solubilização ou extração com ácidos diluídos, que são empregados se a decomposição total da matriz não é necessária.

Os métodos clássicos de mineralização por via úmida total consistem na oxidação da matéria orgânica por agentes oxidantes fortes. As seguintes misturas são mais comumente utilizadas [6]: (1) $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HClO}_4$; (2) $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$; (3) $\text{HClO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$ e (4) $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$. Normalmente, a mineralização com aquecimento convencional pode levar de 4 a 12 h [10,11,12]. Em geral, procedimentos clássicos de mineralização (em sistemas abertos) são trabalhosos e envolvem muitas etapas, sendo possível também que ocorram perda dos analitos e/ou contaminação das amostras [1,2,7].

Em vista destes problemas, alguns outros procedimentos para o preparo de amostras vegetais têm sido propostos e outras formas de energia, como ultra-violeta (UV), microondas e ultra-som, têm sido usadas para intensificar a decomposição da matéria orgânica [13-17].

1.1.1. Radiação ultra-violeta

A aplicação de irradiação UV e a oxidação fotoquímica têm sido estudadas no preparo de amostras [18,19]. A irradiação UV com a adição de agentes oxidantes reduziu o tempo de decomposição de compostos orgânicos em amostras de água para cerca de 15-25 min e também favoreceu a remoção de oxigênio dissolvido de amostras de água [20]. Este procedimento tornou a análise voltamétrica mais rápida e melhorou a exatidão do método.

Achterberg *et al.* [21] construíram um sistema de digestão com luz ultra-violeta, e este foi utilizado com sucesso para destruir complexos orgânicos de cobre em amostras de água de mar, sendo o Cu posteriormente determinado por quimiluminescência. A irradiação UV também foi utilizada por outros autores [22] para destruir ácidos húmicos em amostras de água potável, sendo o processo de oxidação catalizado por peróxido de hidrogênio.

1.1.2. Microondas

As microondas são definidas como energia eletromagnética com comprimentos de onda de 1 cm a 1 m e frequência de 30 GHz a 300 MHz. Essa energia é uma radiação não ionizante, que causa movimento das moléculas pela

migração dos íons e rotação de dipolos, mas não causa mudanças na estrutura molecular [23].

Abu-Samra *et al.* em 1975 [24], foram os primeiros a utilizar a energia das microondas para o preparo de amostras biológicas. As mineralizações foram realizadas em um forno de microondas caseiro e tempos de 5 a 15 min foram suficientes para preparar um conjunto de 20 amostras.

A utilização da energia de microondas em laboratórios de química, melhorou processos já existentes que envolvem o tratamento de amostras sólidas, tais como mineralização, lixiviação, remoção de gás e destilação, reduzindo drasticamente o tempo requerido para completar estes processos [25]. Métodos envolvendo fornos de microondas são bastante empregados para mineralização de amostras [1,26-29].

Segundo Agazzi e Pirola [30], as razões para a grande difusão da tecnologia de microondas relacionam-se às vantagens que apresenta: tempo de digestão ácida mais curto; melhor recuperação de compostos e elementos voláteis; menores níveis de contaminação; pequenos volumes de reagentes e procedimentos mais reprodutíveis. O tempo de mineralização em sistemas fechados pode ser reduzido por um fator de 15 a 30 vezes pelo uso da energia de microondas [31-34].

No preparo de amostras, as mesmas são dissolvidas sob a ação de três fatores: temperatura, pressão e irradiação das microondas [35]. Este tipo de radiação é caracterizado por uma alta penetração nos materiais. Outras vantagens específicas incluem rapidez, fácil manuseio e rápida transferência de energia para a amostra como um todo, sem superaquecimento da superfície [3]. São descritos na literatura diversos sistemas e métodos empregando a energia de microondas para o preparo de amostras.

Embora os fornos de microondas para uso em laboratório sejam uma excelente alternativa para pré-tratamento de amostras sólidas, este equipamento é normalmente caro e limitado para análises de rotina [25].

1.1.3. Ultra-som

Ultra-som é um termo usado para descrever ondas sonoras com frequências maiores do que as audíveis, ou seja, frequências maiores que 16 KHz [36]. A

existência destas ondas é conhecida desde 1883, quando Galton desenvolveu um apito para investigar a frequência de audição do ouvido humano [37]. A primeira aplicação comercial do ultra-som só apareceu em 1917 com uma técnica para estimar a profundidade da água. Mais tarde, durante a guerra, este sistema foi muito importante para o "Allied Submarine Detection Investigation Committee" e tornou-se popularmente conhecido como ASDIC. Depois, outros desenvolvimentos resultaram no sistema conhecido como SONAR (Sound Navigation and Ranging) [36,37].

Somente a partir de 1945, ocorreu uma rápida expansão nas aplicações do ultra-som para processos químicos. Isso se deu pelo aumento da compreensão do fenômeno de cavitação, juntamente com desenvolvimentos significativos feitos na área dos circuitos eletrônicos e dos transdutores [38].

Os transdutores são os dispositivos responsáveis pela geração do ultra-som e podem ser piezoelétricos ou magnetoestrictivos, sendo que as configurações mais empregadas nos equipamentos são as baseadas em arranjos com cerâmicas piezoelétricas [36,38-40]. Os transdutores magnetoestrictivos são metálicos, usualmente feitos de níquel laminado e são soldados a uma chapa metálica [39]. Já o efeito piezoelétrico é encontrado em alguns materiais cristalinos, como o quartzo [36]. Estes transdutores são constituídos de um gerador de frequência que transmite sinal elétrico à cerâmica, que por sua vez transforma o sinal elétrico em ondas mecânicas. A cerâmica é posicionada entre duas chapas metálicas que são empregadas para amplificar os sinais. A frequência gerada é inversamente proporcional à espessura do transdutor [36,38,40]. Desta forma, sendo a espessura da armadura que contém a cerâmica invariável, a frequência será constante.

A ciência do ultra-som é dividida em duas partes que são identificadas em termos de sua faixa de frequência e de suas aplicações [36-38,40]:

- Ultra-som de diagnóstico ou de alta frequência (2-10 MHz)
- Ultra-som de potência ou de baixa frequência (20-100 KHz)

O ultra-som utilizado na química é o de baixa frequência, por ser capaz de causar mudanças físicas e químicas a sistemas químicos. O estudo do efeito do ultra-som nestes sistemas é denominado sonoquímica [41].

A reação sonoquímica é originária da cavitação acústica [42]. A cavitação é um processo que ocorre quando, em certas condições, líquidos são expostos ao ultra-som [43]. Este processo pode ser caracterizado pela formação, crescimento e colapso de bolhas de gás na solução. O crescimento das microbolhas depende da intensidade do som [42-44]. O colapso pode proceder como uma compressão adiabática, e gera altas temperaturas e pressões [42], enquanto a implosão das microbolhas estabelece um ambiente incomum para reações químicas [43,45]. A figura 12 apresenta uma foto realizada no momento anterior a implosão de uma microbolha.

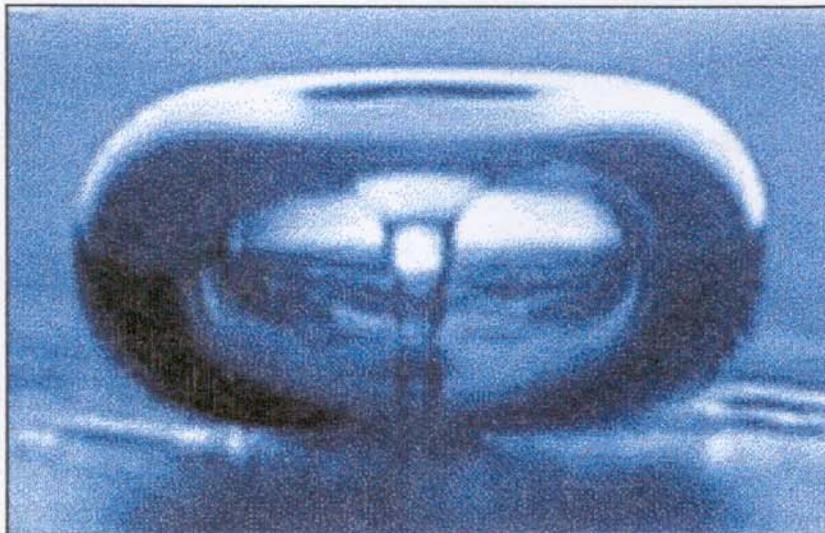


Figura 12 - Foto de uma microbolha de cavitação no momento anterior a implosão extraída do site <http://rsrch.com/saturna/>

A cavitação gera altas temperaturas locais e ação mecânica na interface sólido-líquido [46,47]. Tem sido estimado por alguns autores [36,43,48] que temperaturas de 5000 K e pressões na ordem de 1000 atm são geradas pelo colapso das microbolhas de cavitação, produzidas pelo ultra-som de potência, em água a 25 °C. Estas altas temperaturas e pressões geradas conduzem a formação de radicais livres e outros compostos. A sonicação de água pura conduz a dissociação térmica de vapor de água em radicais H^* e *OH , e a recombinação destes tende a formar peróxido de hidrogênio [43,45,49,50]. De acordo com Wakeford *et al.* [49] e Kotronarou *et al.* [51], a sonicação de água contendo nitrogênio dissolvido pode gerar

ions nitrito e nitrato e também ácido nitroso. Ainda, radicais iodo são liberados à partir da sonicação de uma solução aquosa de iodeto de potássio [44,52]. Desta forma, a eficiência de processos químicos envolvendo energia ultra-sônica depende das variáveis que influenciam o processo de cavitação.

Os equipamentos mais comumente empregados para a produção de ultra-som e aplicáveis em estudos químicos são o banho de ultra-som (constituído de uma bacia metálica, no fundo da qual estão fixados os transdutores piezoelétricos) e a sonda ultra-sônica (que se encontra fixada na extremidade de um amplificador do transdutor) [53,54]. No banho ocorre muita dispersão da energia ultra-sônica devido às múltiplas reflexões nas paredes metálicas [37].

Geradores de ultra-som transformam energia elétrica em energia ultra-sônica, a qual é uma energia mecânica. A eficiência da transformação da energia depende não somente do equipamento, mas também das condições de utilização do ultra-som [55]. A alta intensidade ultra-sônica e a cavitação dependem de muitas variáveis. Entre as mais importantes estão as características do meio reacional (viscosidade, tensão superficial, pressão de vapor do líquido, natureza e concentração do gás dissolvido, presença de partículas sólidas, etc), parâmetros de tratamento (pressão e temperatura), desempenho do gerador de ultra-som (frequência, potência de entrada), e também do tamanho e da geometria do frasco de reação [38,55].

A energia ultra-sônica não é distribuída uniformemente nos banhos de ultra-som [53]. Somente uma pequena fração do volume total do líquido próximo a fonte geradora de ultra-som experimenta efeitos de cavitação. A intensidade do ultra-som é continuamente atenuada pelas moléculas presentes no líquido devido às várias forças coesivas agindo sobre o líquido [56]. O padrão da intensidade do ultra-som no banho depende completamente do desenho e localização dos transdutores. Para banhos de ultra-som disponíveis comercialmente, existe uma variedade de transdutores com diferentes configurações [37,54].

Os resultados de uma reação sonoquímica dependem amplamente da localização do frasco de reação no banho. Para estudar o efeito do ultra-som na reação, é necessária uma exposição reprodutível às ondas ultra-sônicas. Desta

forma, é essencial identificar as condições de ótima sonicação individualmente para cada banho de ultra-som [54].

Uma grande variedade de técnicas para medir a intensidade ultra-sônica ou a cavitação tem sido apresentada na literatura, tais como: reações químicas [57,58], radiômetros de esfera elástica [59], erosão de placas de alumínio [60], métodos calorimétricos e ópticos [58, 61,62], sondas térmicas [60] e métodos eletroquímicos [63].

A energia ultra-sônica é um modo eficiente de melhorar o desempenho em diferentes aplicações da química analítica, tais como extração de compostos orgânicos e inorgânicos [64,65], dispersão de suspensões [66], homogeneização [44] entre outras aplicações [67-70]. Desta forma, o uso do ultra-som é uma alternativa para o pré-tratamento de amostras sólidas, pois, esta energia facilita e acelera algumas etapas, tais como: dissolução, fusão e lixiviação, entre outras [26]. Os efeitos do ultra-som têm sido explorados para o tratamento de amostras em aplicações agronômicas, biológicas e ambientais [15,26,71,72].

1.2. Aplicações do ultra-som na química analítica

Existem alguns métodos de identificação e determinação de substâncias que são baseados nas medidas de velocidade e tempo da propagação do ultra-som, na resistência acústica e na taxa de decaimento de vibrações ultra-sônicas [16]. Medidas da velocidade do ultra-som foram usadas para a análise de misturas [73] e identificação de gases [74].

Uma outra interação entre a sonoquímica e a química analítica ocorre nos métodos eletroquímicos de análise. Madigan *et al.* [75] utilizaram o ultra-som num processo eletroquímico e obtiveram uma melhora significativa na repetibilidade do método. A energia ultra-sônica também é usada para a limpeza da superfície do eletrodo em analisadores eletroquímicos, o que conduz a uma melhora na eficiência do eletrodo e, conseqüentemente, na precisão do método [16].

Outras aplicações do ultra-som em procedimentos analíticos estão relacionadas a desgaseificação de solventes para a cromatografia líquida de alta eficiência [38].

Na espectroscopia atômica, a nebulização ultra-sônica de soluções pode ser usada ao invés da nebulização pneumática [76], sendo que a primeira permite a manipulação de materiais viscosos [16], e forma partículas esféricas com o tamanho requerido para a análise [77]. O uso do nebulizador ultra-sônico melhora a sensibilidade [16].

Outros processos nos quais a energia ultra-sônica é de grande auxílio são: extração líquido-líquido (principalmente quando os métodos convencionais requerem longos tempos de extração) [78] e reações catalisadas por enzimas [79].

A energia ultra-sônica tem muitas aplicações no pré-tratamento de amostras sólidas. Com o rápido fluxo criado pelo ultra-som, o contato entre os componentes da reação é acelerado. Usualmente os efeitos do ultra-som em sistemas químicos heterogêneos são muito mais intensos que em sistemas homogêneos, porque a emulsificação é favorecida e a transferência de massa em um sistema de 2 fases é maior [26,80].

Misexare [81] utilizou a energia de ultra-som para a mineralização de diferentes alimentos (milho, carne, farinha de osso e farelo de trigo) e conseguiu reduzir o tempo de preparo de 4 a 8 vezes. Em outro trabalho [64], a recuperação de elementos traço em análises de amostras de solo e plantas foi melhorada pela utilização de uma sonda ultra-sônica no processo de extração, com a minimização do tempo de tratamento.

Compostos aromáticos foram extraídos de suco de uva e de vinho sob ação da energia ultra-sônica [82]. Sánchez *et al.* [15] utilizaram um banho de ultra-som e ácidos concentrados para a extração de Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn de amostras de lodo de esgoto, de sedimento de rio e de solo. Lázaro *et al.* [83] determinaram ferro em amostras vegetais, sendo sua extração realizada com o emprego de uma sonda ultra-sônica e de um sistema para recircular a solução extratora continuamente.

O selênio foi determinado em amostras de lagostim e de fígado bovino, e foram utilizados para a extração um banho de ultra-som com aquecimento e HNO₃ 4 % (v/v) [71].

O tempo de determinação de Ca em aluminossilicatos foi reduzido com o uso de uma sonda ultra-sônica de 22 KHz durante as etapas de fusão alcalina e de

extração ácida [84]. No trabalho de Minami *et al.* [85] o processo de extração sólido-líquido foi acelerado por um banho de ultra-som para a determinação direta de Cd, Co, Mn e Pb em amostras biológicas pulverizadas.

Vinatoru *et al.* [86] utilizaram um banho de ultra-som para extrair compostos orgânicos bioativos de mais de 50 espécies vegetais, obtendo resultados extremamente satisfatórios.

Desta forma, verifica-se que a energia ultra-sônica pode ser usada para minimizar gastos com reagentes e o tempo de pré-tratamento dos mais variados tipos de amostras, tomando os procedimentos mais simples e rápidos para um grande número de amostras.

1.3. Materiais vegetais

Os materiais vegetais são, muitas vezes, usados como bio-indicadores para estabelecer o grau de poluição ambiental. A quantificação de nutrientes e de elementos tóxicos em plantas também é realizada para diagnosticar o desenvolvimento anormal das mesmas [2].

Os vegetais são a fonte primária de diversos elementos (macro e micronutrientes) para a dieta humana e animal [87], sendo de fundamental importância na cadeia alimentar.

A composição química das plantas reflete, em geral, a composição elementar do meio de crescimento. As plantas podem acumular íons em seus tecidos, devido a sua grande capacidade de adaptação à ambientes com propriedades químicas variadas [88]. Assim, a análise foliar é útil para se avaliar a necessidade de adubação de solos cultiváveis.

Diante disto, verifica-se que a análise de materiais vegetais é de extrema importância e muito comum em laboratórios de rotina que trabalham com monitoramento ambiental, avaliações agronômicas e também com controle de qualidade de alimentos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Equipamentos e acessórios

- Espectrofotômetro FEMTO, modelo 432 (São Paulo, SP, Brasil).
- Banho de ultra-som Neytech, modelo 28H, com sistema de aquecimento, frequência de 44-48 KHz (Yucaipa, CA, EUA).
- Banho de ultra-som Cole-Parmer, modelo R8890, frequência de 47 KHz \pm 6 % (Vernon Hills, Illinois, EUA).
- Bloco Digestor Marconi, modelo MA 4025, com 40 cavidades e tubos de 50 mL de capacidade (Piracicaba, SP, Brasil).
- Bomba peristáltica com 8 canais e velocidade variável, marca Ismatec, modelo IPC (Glattburg, Suíça).
- Injetor comutador confeccionado em acrílico.
- Tubos de polietileno com diâmetro interno de 0,7 mm para a confecção de reatores, linhas de transmissão e alças de amostragem do sistema de fluxo empregado.
- Tubos de Tygon de diversos diâmetros para o transporte dos reagentes e amostras.
- Espectrômetro de Absorção Atômica Perkin-Elmer, modelo AAnalyst 300, equipado com sistema de correção de fundo por lâmpada de deutério (Norwalk, CT, EUA).
- Lâmpadas de cátodo oco para Ca, Fe, Mg, Mn e Zn (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, EUA).
- Balança Analítica, marca Mettler, modelo AE 200 (Bradford, MA, EUA).
- Estufa, marca QUIMIS (Diadema, SP, Brasil).
- Processador de Alimentos, marca Walita, modelo Mega Master Pro (São Paulo, SP, Brasil).
- Peneiras com malhas $< 63 \mu\text{m}$, $< 75 \mu\text{m}$ e $< 150 \mu\text{m}$, marca Bertel (Caieiras, SP, Brasil).

2.2. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

- Iodeto de potássio, KI, MM=166,01 g mol⁻¹ (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil).
- Molibdato de amônio, (NH₄)₆Mo₇O₂₄, MM=196,02 g mol⁻¹ (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).
- Peróxido de hidrogênio, H₂O₂ 30 % m/v, d=1,11 g mL⁻¹, MM=34,01 g mol⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemanha).
- Hidróxido de sódio, NaOH, MM=40,0 g mol⁻¹ (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).
- 4,5 dihidroxi-1,3-ácido benzenodisulfônico-sal disódio monohidratado, Tiron, (OH)₂C₆H₂(SO₃Na)₂.H₂O, MM=332,22 g mol⁻¹ (Sigma, St. Louis, MO, EUA).
- Ácido nítrico, HNO₃ 65 % m/v, d=1,40 g mL⁻¹, MM=63,01 g mol⁻¹ (Mallinckrodt, Xalostoc, México).
- Ácido clorídrico, HCl 37 % m/v, d=1,19 g mL⁻¹, MM=36,45 g mol⁻¹ (Mallinckrodt, Xalostoc, México).
- Nitrato de cobalto, Co(NO₃)₂.6H₂O, MM=291,05 g mol⁻¹ (QUIMIS, Diadema, SP, Brasil).
- Carbonato de cálcio, CaCO₃, MM=100,09 g mol⁻¹ (Mallinckrodt, Paris, Kentucky, EUA).
- Nitrato de ferro, Fe(NO₃)₃.9H₂O, MM=404,00 g mol⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemanha).
- Carbonato de magnésio, MgCO₃, MM=84,31 g mol⁻¹ (Mallinckrodt, Paris, Kentucky, EUA).
- Nitrato de manganês, Mn(NO₃)₂.4H₂O, MM=251,01 g mol⁻¹ (Ecibra, Santo Amaro, SP, Brasil).
- Nitrato de zinco, Zn(NO₃)₂.6H₂O, MM=297,38 g mol⁻¹ (Ecibra, Santo Amaro, SP, Brasil).
- Óxido de lantânio, La₂O₃, MM=325,82 g mol⁻¹ (Sigma, St. Louis, MO, EUA).

A água utilizada no preparo das soluções era destilada e desionizada através de um sistema Milli-Q (Millipore).

Para o método do iodeto de potássio, foram preparadas soluções de KI $0,29 \text{ mol L}^{-1}$ pela dissolução da quantidade apropriada do sal em água deionizada. Essa solução era preparada a cada dois dias, e armazenada em frasco escuro para evitar a sua fotooxidação. As soluções de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ $3,67 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas a partir de uma solução estoque de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, por diluição com água.

Para o método do peróxido de hidrogênio, a curva de calibração de H_2O_2 ($500\text{-}2000 \mu\text{g L}^{-1}$), foi preparada a partir de uma solução estoque de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, que por sua vez foi preparada a partir do peróxido de hidrogênio concentrado (30 % v/v). As outras soluções utilizadas no método do H_2O_2 foram: NaOH 1 mol L^{-1} , preparada pela dissolução direta de quantidade apropriada do sal; Tiron $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, preparado por diluição de uma solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e Co (II) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ preparado por sucessivas diluições de uma solução estoque $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (a partir do sal $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, devidamente seco).

Para a otimização do método de extração foram preparadas soluções de HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ e $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ pela diluição do ácido nítrico concentrado. Para a determinação dos elementos de interesse por espectrometria de absorção atômica, foram preparadas curvas analíticas de calibração: Ca ($1,0\text{-}4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), Mg ($0,2\text{-}0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), Fe ($1,0\text{-}6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), Mn ($0,5\text{-}2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e Zn ($0,25\text{-}1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) por diluição das soluções estoque de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada metal. Essas soluções estoques foram preparadas por pesagem e dissolução de quantidades apropriadas dos sais de cada metal: CaCO_3 para Ca, MgCO_3 para Mg, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ para Fe, Mn e Zn, respectivamente.

Para as soluções de Ca e Mg, utilizou-se LaCl_3 numa concentração final de 1 % m/v, para suprimir o efeito de concomitantes. O LaCl_3 foi preparado na concentração de 10 % m/v pela dissolução de 11,73 g de La_2O_3 em 30 mL de HCl concentrado. Após a dissolução, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água desionizada.

Todo o material (frascos plásticos e vidrarias) foi descontaminado por meio de imersão em solução de HNO₃ 10 % v/v por 12 h e depois lavado com água desionizada.

2.3. Amostras

Para a otimização das condições de extração com banhos de ultra-som, foram utilizadas folhas de alface e de repolho. Essas amostras foram adquiridas comercialmente, e provêm de hortas da região de Campinas. Essas amostras foram lavadas com água destilada e colocadas em sacos de papel para secagem em estufa à 60 ± 5 °C. As amostras foram secas até peso constante, o que levou cerca de 70 h. Após secas, as amostras foram trituradas em um processador de alimentos e peneiradas, de modo a se separar diferentes tamanhos de partícula (entre 150 e 63 μm). As amostras secas e trituradas foram armazenadas em frascos de polietileno devidamente descontaminados e limpos, com boa vedação para evitar a absorção de umidade do ar.

Para verificar a exatidão do método, além das amostras de repolho e alface, utilizou-se também uma planta medicinal, comumente chamada de "Cavalinha" e cujo nome científico é *Equisetum arvense*. Essa amostra foi obtida seca. Para melhor controle, ela também foi deixada em estufa a 60 ± 5 °C até massa constante (cerca de 3 h). Após esta etapa, a amostra foi triturada, peneirada e separada nos diferentes tamanhos de partícula.

Dois materiais certificados também foram analisados com o objetivo de se avaliar a exatidão do método proposto:

- Folhas de macieira - NIST (National Institute of Standards & Technology) SRM (Standard Reference Material) 1515;
- Folhas de espinafre - NIST SRM 1570a.

Esses materiais são fornecidos secos e finamente divididos. Como se tratava de materiais já manipulados anteriormente, os mesmos foram colocados em estufa a 60 ± 5 °C por 2 horas para retirar a umidade que pode ter sido absorvida pelo contato com o ar.

2.4. Otimização das condições de utilização dos banhos de ultra-som

Para evitar problemas de repetibilidade, observados em alguns testes de extração preliminares, foi realizado um estudo com os banhos de ultra-som a serem utilizados no processo de extração. Alguns dos fatores que podem influenciar o processo de cavitação foram otimizados:

- volume de água dentro do banho (1-2 L),
- temperatura da água do banho (26-36 °C),
- concentração de detergente na água (0-0,4 % v/v),
- posição vertical de sonicação (de 0 a 2 cm, à partir do fundo do banho),
- posição horizontal (1-9, distribuídas uniformemente dentro do banho),
- número de tubos dentro do banho (de 1 a 9 em diferentes combinações),
- linearidade da intensidade de cavitação em função do tempo de sonicação,
- substituição contínua da água do banho durante a sonicação (utilizando-se um sistema de fluxo).

Para este estudo, foram confeccionados suportes de isopor a fim de se fixar os tubos nas posições a serem estudadas dentro do banho (Fig. 13). Estes suportes eram posicionados na parte superior dos banhos e não tinham contato com a água contida nos mesmos.

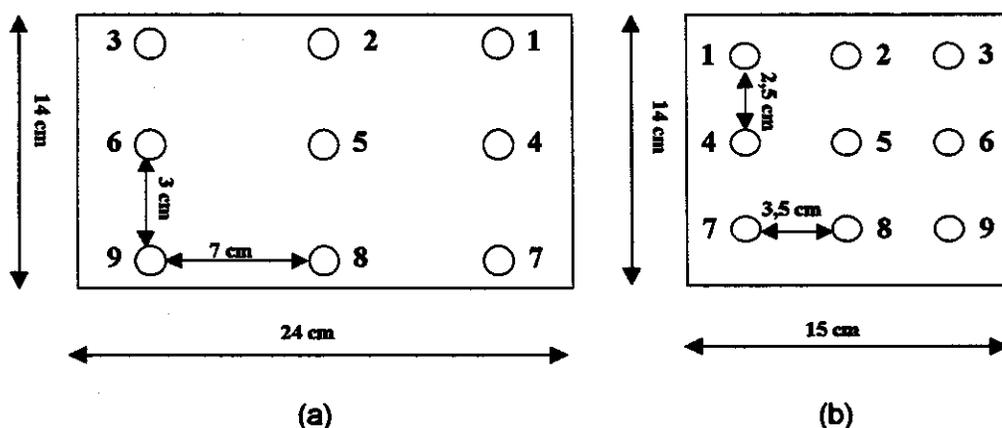
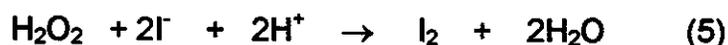
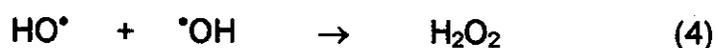


Figura 13 – Posições dos tubos para os experimentos de otimização, obtidas por meio de suportes de isopor em dois diferentes banhos de ultra-som: (a) Banho Neytech e (b) Banho Cole-Palmer

Os métodos utilizados para a otimização foram o método do KI e o método do H₂O₂. No primeiro método, 5 mL de uma solução de KI 0,29 mol L⁻¹ e 0,1 mL de uma solução de molibdato de amônio 3,67 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ foram colocados em tubos de ensaio com capacidade para 20 mL e sonicados por 5 min nas diferentes condições estudadas. Logo após a sonicação, a absorbância da solução foi determinada em um espectrofotômetro a 352 nm. Quanto maior a cavitação, maior a quantidade de iodo formado e maior a absorbância obtida.

A formação de I₂ pode ocorrer de duas formas [44,89]: pela formação de radicais I[•] a partir da sonicação de uma solução de iodeto de potássio (reações 1 e 2) e pela reação de oxi-redução entre I⁻ e H₂O₂ (reação 5). O H₂O₂ é formado pela sonicação de água (reações 3 e 4).



O iodo formado é determinado espectrofotometricamente a 452 nm. Quanto maior a cavitação, maior é a formação de iodo e, conseqüentemente, maior a absorbância obtida.

No método do H₂O₂, foram sonicados 5 mL de água deionizada e a quantidade de peróxido de hidrogênio formado pela cavitação foi determinada indiretamente pela reação com Tiron e Co(II), sendo o produto formado nesta reação determinado espectrofotometricamente a 426 nm. O sistema de fluxo utilizado para este método foi desenvolvido por Pereira-Filho *et al.* [29], e é apresentado na figura 14.

A geração de H₂O₂ ocorre pela formação dos radicais H[•] e OH[•] a partir da sonicação da H₂O, como se observa nas reações 3 e 4. Para a quantificação do H₂O₂ formado, foi usado um método indireto [90]. Esta reação (6), é baseada no efeito catalítico do cobalto na oxidação de Tiron pelo peróxido de hidrogênio.

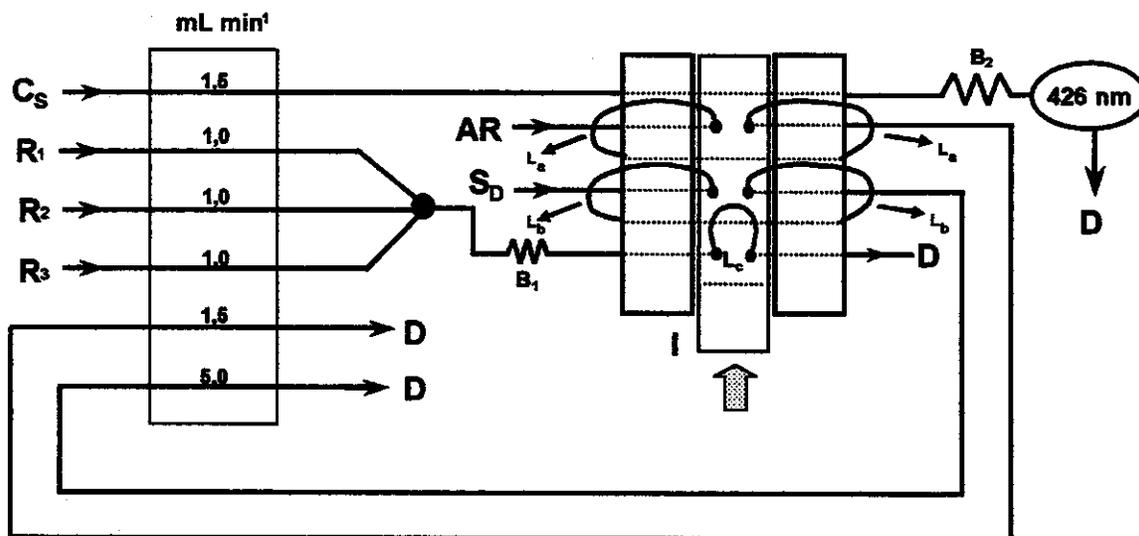
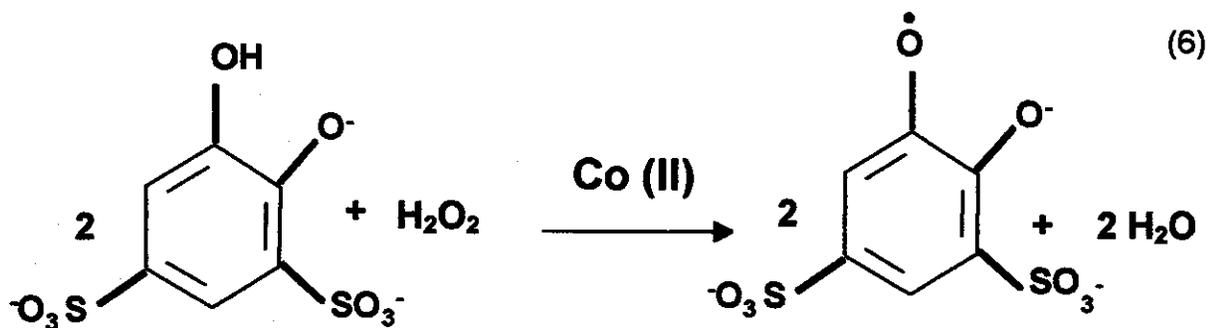


Figura 14 – Sistema de fluxo monosegmentado utilizado para a determinação de H₂O₂, onde: I – injetor comutador; C_s – carregador; R₁ – NaOH 1 mol L⁻¹; R₂ – Tiron 5 x 10⁻⁴ mol L⁻¹; R₃ – cobalto 10 µg L⁻¹; S_D – amostra; B₁ – reator para mescla de reagentes; B₂ – reator no qual ocorre a reação; L_a, L_b e L_c – alça de amostragem; D – descarte.

Inicialmente este método foi otimizado por Pereira-Filho *et al.* [29] para a determinação de cobalto. Com algumas modificações, o método foi utilizado para a determinação de H₂O₂, com bons limites de detecção [90].



Medidas de branco foram realizadas com a solução de KI e molibdato ou água, respectivamente para os métodos do KI e do H₂O₂, sem a etapa de sonicação.

2.5. Otimização do método de extração ácida assistida por banhos de ultra-som

Nas condições otimizadas anteriormente, foram realizados os experimentos para otimizar a extração de Ca, Fe, Mg, Mn e Zn em diferentes amostras de plantas. As variáveis estudadas foram: concentração do HNO₃ (0-1,4 mol L⁻¹), tempo de sonicação (0-30 min) e tamanho de partículas (63-150 µm).

Para o procedimento de extração, pesaram-se aproximadamente 0,3000 g das amostras (folhas de alface e de repolho, devidamente preparadas) em tubos de 50 mL e adicionaram-se 15 mL do extrator. Os tubos foram colocados (1 por vez) no banho de ultra-som (posição 5) e sonicados nos diferentes tempos estudados. Após a sonicação, as amostras foram filtradas em papel de filtro quantitativo e os analitos (Ca, Fe, Mg, Mn e Zn) foram determinados no extrato por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). As condições de operação do FAAS foram as recomendadas pelo fabricante e são apresentadas na quadro 3.

Quadro 3 - Condições experimentais para a determinação de Ca, Fe, Mg, Mn e Zn por FAAS.

Parâmetros	Ca	Fe	Mg	Mn	Zn
Comp. de onda (nm)	422,7	248,3	285,2	279,5	213,9
Abertura da fenda (nm)	0,7	0,2	0,7	0,2	0,7
Corrente da lâmpada (mA)	10	30	6	20	15
Vazão de C ₂ H ₂ (L min ⁻¹)	2	2	2	2	2
Vazão de ar (L min ⁻¹)	10	10	10	10	10

2.6. Método de mineralização por via úmida

Para fins de comparação, as amostras foram também preparadas pelo método da mineralização completa. Para isso, pesaram-se aproximadamente 0,5000 g das amostras em tubos de digestão e adicionaram-se 10 mL de HNO₃ concentrado. Os tubos foram aquecidos a 80 °C até a redução dos fumos de NO_x e foram, então, retirados do bloco digestor. Depois de resfriados, adicionaram-se 6 mL de H₂O₂ 30 % v/v e aqueceram-se novamente os tubos a 140 °C até que a solução estivesse límpida e o volume fosse reduzido para aproximadamente 2-3 mL. Depois de

resfriadas, as soluções foram filtradas para balões volumétricos de 25 mL e o volume foi completado com água deionizada.

Para validação do método, utilizaram-se amostras certificadas de referência: folhas de macieira (NIST SRM 1515) e espinafre (NIST SRM 1570a). Estas amostras foram submetidas ao processo de extração ultra-sônica otimizado anteriormente, sendo os resultados obtidos comparados com os valores certificados. As amostras de *Equisetum arvense*, alface e repolho também foram utilizadas para validação do método proposto, sendo analisadas pelo método de mineralização convencional e pelo método de extração ultra-sônica otimizado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Otimização das condições de utilização dos banhos de ultra-som

3.1.1. Efeito do volume de água dentro do banho

A intensidade de cavitação em líquidos orgânicos é menor que na água, e esta intensidade muda entre os diferentes solventes usados. Líquidos de estrutura cíclica (tais como estireno, tolueno e xileno) tendem a cavitarem mais intensamente, enquanto ácidos carboxílicos e aminas alifáticas tendem a cavitarem mais fracamente [91]. Embora o método do I_2 nunca tenha sido usado para este propósito, este pode ser usado para medir a intensidade de cavitação em alguns solventes orgânicos ou numa mistura destes solventes com água. Entretanto, a intensidade de cavitação pode ser menor se comparada com o uso de água somente [91], assim como podem ser requeridos tempos mais longos de sonicação para se obter o mesmo resultado.

Como este trabalho foi proposto para aplicações analíticas, com ênfase no preparo de amostras, e a maior parte destas aplicações é realizada em meio aquoso, somente as condições de utilização empregando-se água foram estudadas.

Este estudo foi realizado com duas marcas distintas de banhos, e diferentes níveis de água foram usados devido às diferentes capacidades de cada banho. Na

tabela 9 pode-se observar os resultados obtidos. Absorbâncias mais altas significam maior intensidade de cavitação.

Tabela 9. Efeito do volume de água dentro dos banhos de ultra-som sobre as absorbâncias obtidas pelo método do I_2 .

Cole-Parmer			Neytech		
Vol. (L)	A ^a	DPR (%)	Vol. (L)	A ^a	DPR (%)
0,40	0,064	17,4	1,00	1,162	5,0
0,60	0,031	22,9	1,25	0,005	16,1
0,80	0,173	11,6	1,50	0,038	23,9
1,00	0,507	11,0	1,75	0,085	14,8
1,20	0,386	10,5	2,00	0,299	14,3
1,30	0,228	10,1			

^a Absorbância média obtida com 5 repetições.

O volume de água que promoveu a maior cavitação foi o mesmo (1 L de água) para as duas marcas de banho estudadas, muito embora a cavitação produzida no banho Neytech seja bem maior (aproximadamente o dobro) que a obtida no banho da Cole-Parmer. Isso pode ser devido ao fato do primeiro banho apresentar dois transdutores piezoelétricos e o segundo (Cole-Parmer) apenas um. Além disso, com 1 L de água os desvios obtidos entre as medidas foram menores (cerca de 5 e 12 %, respectivamente para os banhos Neytech e Cole-Parmer).

Banhos de ultra-som são normalmente desenhados para produzir uma onda padrão dentro do líquido, com máxima intensidade de ultra-som gerada na crista da onda [36]. De acordo com alguns autores [45,58,60], se o nível da água for significativamente menor do que metade do comprimento de onda do ultra-som na água, a intensidade do ultra-som diminui com o aumento da distância da fonte. Quando o nível da água for menor ou igual a $\lambda/2$ um perfil de intensidade de ondas padrão é observado. Se o nível de água for cerca de $n \times \lambda/2$ ondas padrão ressonantes são obtidas.

Faid *et al.* [58] utilizaram um método eletroquímico para determinar a intensidade de cavitação variando a altura de uma sonda ultra-sônica dentro de um recipiente com uma coluna de água de 16 cm. Os resultados obtidos por eles indicaram um aumento cíclico na intensidade da cavitação com a altura, ou seja, a

cada 4 cm era obtido um máximo de cavitação. Niemczewski [91] observou o mesmo comportamento cíclico ao realizar um estudo semelhante com um banho de ultra-som. Pela tabela 10 pode-se verificar que isto ocorreu também com o banho da Neytech, sendo que quando se utilizou o volume de 2 L (o dobro da altura obtida com 1 L) obteve-se novamente um aumento na intensidade de cavitação.

O λ (comprimento da onda ultra-sônica) poderia ser calculado com a frequência do banho e a velocidade do som no meio. Entretanto, a velocidade de uma onda ultra-sônica em líquidos é dependente da temperatura e da densidade [92]. Neste caso é difícil calcular exatamente o λ , porque a temperatura ambiente varia durante o dia e a frequência fornecida pelo fabricante do banho tem uma variação de $\pm 6\%$. Sendo assim, a melhor forma de obter as condições de máxima cavitação para aplicações analíticas é a experimental.

Para os outros estudos, o volume de água dentro do banho foi fixado em 1 L.

3.1.2. Efeito da temperatura da água

O banho de ultra-som da Cole-Parmer não possui sistema de aquecimento e, por isso, este parâmetro foi estudado somente no banho da marca Neytech. A faixa de estudo variou de 26 a 36 °C, uma vez que para a maioria das aplicações, utilizam-se normalmente temperaturas próximas à ambiente e temperaturas maiores requerem um longo tempo de aquecimento, o que tornaria o método de extração muito demorado. Além disso, não foram estudadas temperaturas maiores que 36 °C porque alguns autores [55,59,93] sugerem que altas temperaturas (acima de 40 °C) diminuem a intensidade do ultra-som. Os resultados obtidos na variação da temperatura da água do banho são apresentados na tabela 10.

Tabela 10. Efeito da temperatura da água do banho, avaliado por meio das absorvâncias obtidas pelo método do I_2 .

Temperatura (°C)	A ^a	DPR (%)
26	1,144	5,3
31	1,255	1,8
36	1,202	1,4

^a Absorvância média obtida com 5 repetições

Não houve diferenças significativas pelo teste *t* ao nível de 95 % de probabilidade, quando se variou a temperatura de 26 a 36 °C, muito embora tenham sido obtidos desvios menores com as temperaturas de 31 e 36 °C.

Raso *et al.* [55] avaliaram o efeito da temperatura na potência ultra-sônica de uma sonda e observaram que de 20 a 70 °C, a potência de saída quase não é afetada pela temperatura, e acima de 70 °C, diminui drasticamente.

O tempo gasto para se atingir as temperaturas de 31 ou 36 °C, não compensa a melhora nos resultados. Desta forma, optou-se por trabalhar à temperatura ambiente, devido a maior praticidade.

3.1.3. Efeito da concentração de detergente na água do banho

Desde que é necessário que a pressão de rarefação supere as forças de coesão no líquido para ser capaz de gerar uma microbolha, um aumento na viscosidade e/ou na tensão superficial irá naturalmente conduzir a um aumento na quantidade de energia necessária para separar o líquido [37]

Com o uso do detergente, a tensão superficial é diminuída, o que facilita a propagação do ultra-som [94], com conseqüente melhora no processo de cavitação. Isto é confirmado pelos resultados obtidos neste estudo e que são apresentados na tabela 11.

Tabela 11. Efeito da concentração do detergente sobre as absorvâncias obtidas pelo método do I₂.

Detergente (%v/v)	A ^a	DPR (%)
0,0	1,007	5,6
0,2	1,336	1,9
0,4	1,265	1,3

^a Absorbância média obtida com 5 repetições

Verifica-se que com o uso de 0,2 ou 0,4 % v/v de detergente, foram obtidos aumentos nas absorvâncias de aproximadamente 33 e 26 % respectivamente, em relação àquelas obtidas sem detergente. Majumdar *et al.* [57] avaliaram o efeito da redução da tensão superficial de um líquido na intensidade de cavitação. Para isso adicionaram diferentes quantidades de laurilsulfato de sódio em uma solução e

concluíram que, quanto menor a tensão superficial do líquido, maior a intensidade de cavitação obtida.

Desta forma, a concentração de detergente para os outros experimentos foi fixada em 0,2 % v/v.

3.1.4. Distribuição vertical das ondas ultra-sônicas no banho

Para avaliar este parâmetro, realizou-se um estudo com o banho da marca Neytech, variando-se a altura do tubo em relação à base do banho em 0, 1 e 2 cm.

De acordo com Pugin [61], a intensidade de cavitação varia com a distância dos transdutores piezoelétricos. Nos banhos de ultra-som estudados, estes transdutores se encontram fixados à base dos mesmos. Como se pode verificar na tabela 12, quando os tubos foram posicionados a 1 ou 2 cm da base do banho, foram obtidas absorvâncias bem menores (cerca de 10 vezes para a distância de 2 cm) em relação à posição zero (tubo encostado na base), confirmando assim que, quanto maior a distância dos transdutores, menor a intensidade de cavitação. Alguns autores [57] reportaram em seu trabalho, realizado com uma sonda ultra-sônica, que a intensidade de cavitação diminui com o aumento da distância da fonte geradora de ultra-som. No presente trabalho a posição zero foi definida como a melhor para a obtenção de efeitos sonoquímicos.

Tabela 12. Efeito da posição vertical dos tubos no banho Neytech sobre as absorvâncias obtidas pelo método do I_2 .

Altura (cm)	A ^a	DPR (%)
0,0	1,267	4,6
1,0	1,071	5,5
2,0	0,119	15,6

^a Absorvância média obtida com 5 repetições

3.1.5. Efeito do número de tubos dentro do banho

Uma grande quantidade de tubos dentro do banho provoca reflexão das ondas ultra-sônicas, reduzindo assim a eficiência do processo de sonicação [38]. Para este estudo entre 1 e 9 tubos foram localizados nas posições especificadas no suporte de

isopor em diferentes arranjos. Observando-se as tabelas 13 e 14, verifica-se que a absorvância diminui (cerca de 5 e 12 vezes para os banhos Cole-Parmer e Neytech, respectivamente) com o aumento do número de tubos dentro do banho.

Tabela 13 - Efeito do número e disposição dos tubos no banho da Cole-Parmer sobre as absorvâncias obtidas pelo método do I₂.

Posição	9 ^a	7	5	5	4	3	3	2	1 ^b
1	0,031 ^c			0,067					0,154
2	0,052		0,037				0,025		0,025
3	0,029	0,022		0,060					0,022
4	0,064	0,016	0,018		0,034	0,036			0,325
5	0,186	0,185	0,084	0,264	0,032	0,661	0,632	0,730	0,869
6	0,165	0,130	0,228		0,023	0,135		0,022	0,035
7	0,028	0,022		0,040					0,040
8	0,050	0,102	0,271		0,151		0,271		0,270
9	0,030	0,138		0,095					0,024

^a Número de tubos dentro do banho simultaneamente.

^b Um tubo sonicado por vez.

^c Absorvância média obtida com 3 repetições.

Tabela 14 - Efeito do número e disposição dos tubos no banho da Neytech sobre as absorvâncias obtidas pelo método do I₂.

Posição	9 ^a	7	5	5	4	3	3	2	1 ^b
1	0,058 ^c			0,040					0,063
2	0,024		0,023			0,007			0,033
3	0,018	0,032		0,024					0,020
4	0,041	0,026	0,037		0,039		0,080		0,018
5	0,020	0,189	0,670	0,448	0,792	0,958	1,030	1,171	1,280
6	0,033	0,021	0,023		0,045		0,013	0,015	0,034
7	0,050	0,035		0,040					0,024
8	0,030	0,019	0,048		0,027	0,007			0,039
9	0,015	0,027		0,020					0,032

^a Número de tubos dentro do banho simultaneamente.

^b Um tubo sonicado por vez.

^c Absorvância média obtida com 3 repetições.

É interessante notar ainda que para o banho da Cole-Parmer, dependendo da distribuição dos tubos, a melhor posição para cavitação é modificada (ver tabela 13, colunas 4 e 5).

Estes resultados mostram que para aplicações analíticas, um único tubo por vez, e na mesma posição, deve ser usado para se obter maior precisão.

3.1.6. Distribuição horizontal das ondas ultra-sônicas

Este estudo foi realizado empregando-se o método do I_2 , com os dois banhos de ultra-som disponíveis e com dois diferentes volumes de água dentro dos mesmos: 1 L de água (volume que forneceu a máxima intensidade de cavitação na posição central) e a capacidade máxima de cada banho (2 e 1,3 L para os banhos da Neytech e da Cole-Parmer, respectivamente). A distribuição espacial da energia ultra-sônica nos banhos é apresentada nas figuras 15 e 16, respectivamente para os banhos Neytech e Cole-Parmer. Os desvios obtidos nos pontos de máxima cavitação variaram de 4 a 12 %. Nos outros pontos, as absorbâncias foram muito baixas e os desvios variaram de 23 a 78 %.

Embora os dois banhos tenham apresentado a mesma posição como a de maior cavitação (ponto 5 (central), Fig. 13a e 13b) quando se usou 1 L de água, a distribuição do ultra-som no banho da Cole-Parmer foi mais uniforme em relação ao banho da Neytech.

De acordo com Pugin [61] em banhos que contêm um único transdutor (como o da Cole-Parmer), a máxima intensidade de cavitação é encontrada acima do transdutor; para banhos equipados com dois transdutores (como o banho da Neytech) a intensidade máxima é encontrada entre os dois geradores de ondas ultra-sônicas. Pela geometria dos banhos, a posição 5 (central), é localizada aproximadamente acima do transdutor no banho da Cole-Parmer, e entre os dois transdutores no banho da Neytech, o que justifica os resultados obtidos quando se utilizou 1 L de água.

A distribuição espacial das ondas ultra-sônicas é afetada por vários fatores, incluindo o volume de água dentro do banho, a voltagem de operação dos transdutores e o formato e a posição do tubo ou frasco de reação no banho [36].

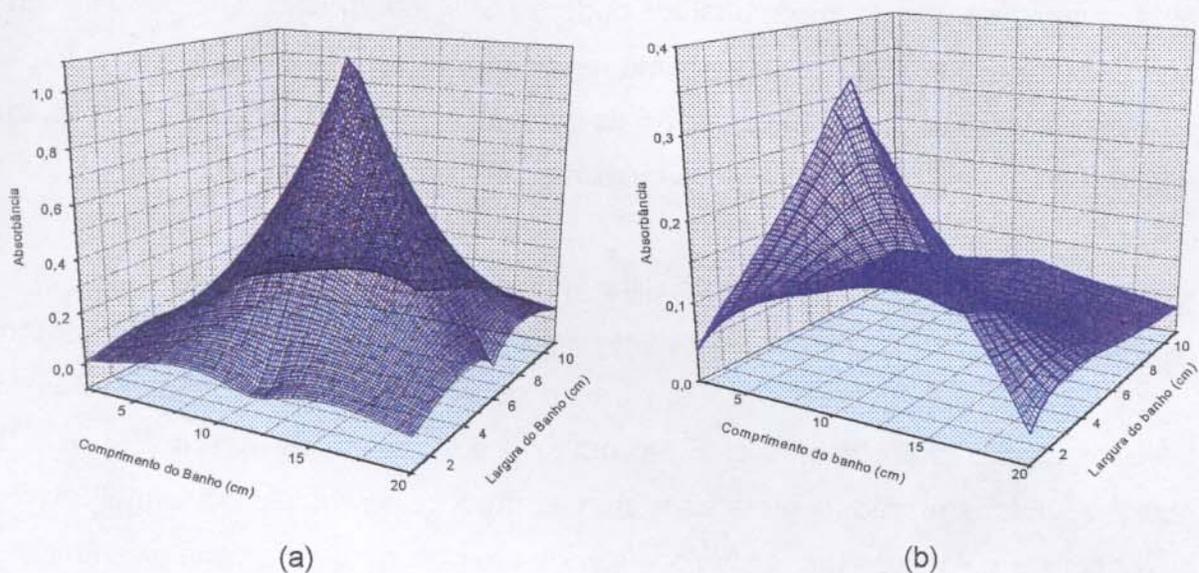


Figura 15 – Distribuição espacial da energia ultra-sônica no banho Neytech: (a) usando 1 L de água dentro do banho e (b) usando o volume total de água (2 L) dentro do banho.

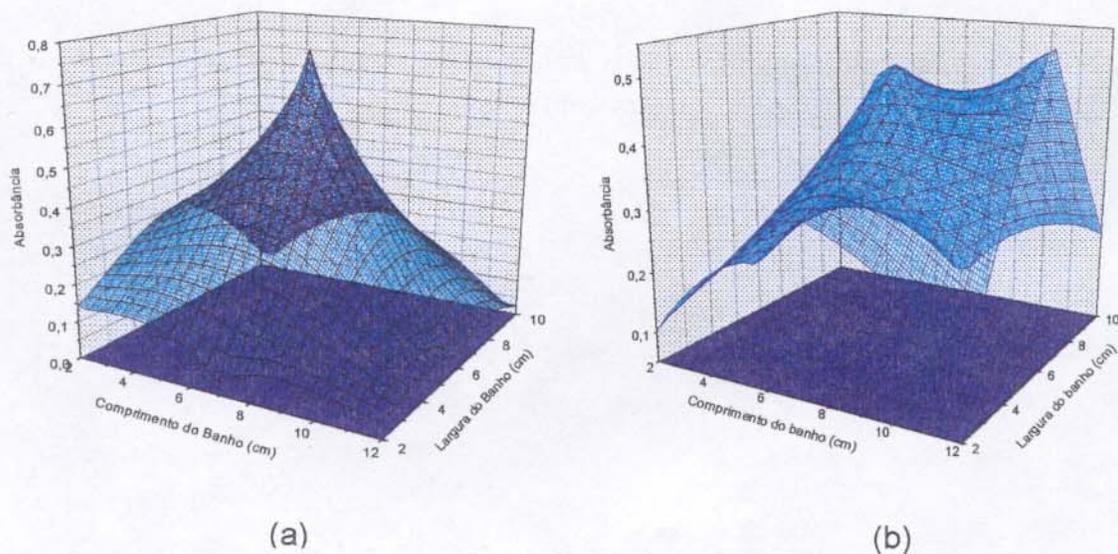


Figura 16 - Distribuição espacial da energia ultra-sônica no banho Cole-Parmer: (a) usando 1 L de água dentro do banho e (b) usando o volume total de água (1,3 L) dentro do banho.

Como pode ser visto pela comparação entre as figuras 15a e 15b ou 16a e 16b, a mudança no volume de água no banho modifica completamente a distribuição horizontal da cavitação. Quando foi usado o volume total, o banho da Cole-Parmer

apresentou 2 pontos de máxima intensidade de cavitação (posições 5 e 6, Fig. 13b), que podem ser considerados como uma região de máxima intensidade de cavitação, quando são levados em consideração os desvios entre as medidas. Com o volume total, o banho da Neytech apresentou máxima intensidade de cavitação em um ponto diferente (posição 8, Fig. 13a).

A susceptibilidade do campo ultra-sônico dentro do banho com estes vários fatores externos, conduz a consideráveis dificuldades em medir a potência dissipada e a cavitação gerada dentro de um frasco de reação localizado no banho. Isto também conduz a problemas com reprodutibilidade. Segundo Mason [36] para se obter resultados reprodutíveis e consistentes, frascos de reação de formato similar deveriam ser colocados na mesma posição dentro do banho para cada experimento.

Devido a maior complexidade e custo, o método do H_2O_2 foi utilizado somente para a confirmação da distribuição horizontal no banho Neytech contendo 1 L de água. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 15.

Tabela 15 - Quantidade de peróxido de hidrogênio formado pela sonicação de água pura, nas diferentes posições do banho de ultra-som da Neytech contendo 1 L de água.

Posição	H_2O_2 ($\mu g L^{-1}$)
1	< 19,0*
2	< 19,0
3	< 19,0
4	32,8
5	950,2
6	< 19,0
7	< 19,0
8	< 19,0
9	< 19,0

* Limite de detecção

Por este método obteve-se $950 \mu g L^{-1}$ de H_2O_2 formado pela sonicação de água na posição 5. Nas outras posições, a quantidade de H_2O_2 formado foi muito pequena ou menor que o limite de detecção do método. Apesar de não ter sido realizado um mapeamento pelo método do H_2O_2 , uma vez que para a maioria dos pontos a concentração obtida foi menor que o limite de detecção do método, os

resultados obtidos pelos dois métodos utilizados são concordantes com relação ao ponto de máxima cavitação. A ação oxidante do ultra-som tem importância secundária, uma vez que a quantidade de agentes oxidantes gerada é muito pequena.

3.1.7. Intensidade de cavitação em função do tempo de sonicação

Longos tempos de sonicação, podem diminuir a intensidade de cavitação como uma consequência da redução dos núcleos de cavitação (microbolhas de gás dissolvido), que vão sendo consumidos durante o processo de sonicação.

Este estudo foi realizado para se verificar a eficiência do tempo de sonicação, ou seja, até que ponto o aumento do tempo de sonicação produz um aumento linear na intensidade de cavitação. Para isso, diferentes tempos foram aplicados (1-10 min) com o tubo posicionado no ponto 5 (Fig. 13). Não foram testados tempos maiores, pois foram produzidas absorvâncias altas ($> 1,8 A$) pelo método do I_2 , comprometendo as medidas e gerando desvios elevados (maiores que 50 %). Comparando os dois banhos, foram observadas diferenças mínimas, sendo que os coeficientes de correlação linear obtidos foram de 0,990 e 0,998, respectivamente para os banhos Neytech e Cole-Parmer.

Com isso se pode concluir que, pelo menos até o tempo de 10 min, quanto maior o tempo de sonicação, maior a eficiência do processo sonoquímico.

3.1.8. Efeito da substituição de água nos banhos

Pelo processo de cavitação e as altas temperaturas geradas, os líquidos usados nos banhos de ultra-som são aquecidos durante o uso, principalmente se forem utilizados por um longo período de tempo. Isto conduz a resultados inconsistentes quando se trabalha à temperatura ambiente ou a temperaturas menores que a ambiente [36], pois como discutido anteriormente, a temperatura influencia o processo de cavitação. A troca total da água entre cada extração tornaria o método extremamente trabalhoso. Este problema pode ser resolvido pelo uso de banhos termostatizados ou pela substituição contínua da água do banho. Por outro

lado, a substituição contínua da água, além de auxiliar no controle da temperatura, renova os núcleos de cavitação.

Este estudo foi realizado somente com o banho da Neytech, e como pode ser observado na tabela 16, houve uma grande diferença nos resultados obtidos quando a água foi continuamente trocada durante o processo de sonicação.

A vazão da água foi de $18,2 \text{ mL min}^{-1}$, sendo inserida na posição 9 e retirada na posição 1 (Fig. 13a). Com este sistema simples, até 6 amostras foram sonicadas consecutivamente (por 5 min cada uma) obtendo-se um desvio padrão de 5,3 %. Porém, sem a utilização deste sistema o desvio padrão para 5 amostras foi de 45 %, sendo que foi observada uma gradual redução nas absorbâncias (de 1,156 para 0,277 para 5 sonicações de 5 min, sem troca de água).

Tabela 16. Efeito da substituição contínua da água do banho sobre as absorbâncias obtidas pelo método do I_2 .

Amostras	Sem substituição de água		Com substituição de água	
	A ^a	DPR (%)	A ^a	DPR (%)
1 ^a	1,156	10,5	1,057	8,4
2 ^a	0,932	21,4	1,131	5,1
3 ^a	0,879	30,8	1,149	4,2
4 ^a	0,568	42,4	1,097	3,1
5 ^a	0,277	13,2	1,054	4,1
6 ^a			0,993	4,2
Média	0,762	45,0	1,080	5,3

^a Absorbância média obtida com 3 repetições.

3.2. Extração ácida de metais em plantas com o uso de banhos de ultrassom

As condições utilizadas para a extração foram as que promoveram maior intensidade de cavitação no estudo anterior. O sistema de fluxo para a substituição contínua de água foi utilizado, sendo que a água era trocada completamente a cada 3 amostras sonicadas por 10 min, 2 amostras sonicadas por 20 min ou 1 amostra por 30 min.

3.2.1. Otimização do tempo de sonicação e da concentração do ácido

A fim de selecionar as melhores condições para a extração ultra-sônica, duas diferentes plantas foram estudadas: alface (*Lactuca sativa*) e repolho (*Brassica oleracea capitata*). Nessas amostras as extrações de Ca, Fe, Mg, Mn e Zn foram avaliadas com diferentes concentrações de ácido nítrico e em diferentes tempos de sonicação.

A extração dos elementos estudados foi verificada pela comparação do método rápido de extração proposto com o método de decomposição ácida completa sugerido por Huang e Schulte [95].

Os resultados obtidos na otimização do tempo de sonicação e da concentração ácida são expressos em porcentagem de extração e são mostrados na figura 17.

Em todos os experimentos o tempo de contato entre amostra e extrator foi de 30 min (tempo máximo de sonicação) de modo que o efeito apresentado é apenas o da sonicação. Ambos os parâmetros estudados (concentração ácida e tempo de sonicação) tiveram influência sobre a eficiência de extração, embora o efeito da concentração do ácido tenha sido mais pronunciado. Como já comentado anteriormente, a ação oxidante do ultra-som tem função secundária, sendo que sua utilização melhora principalmente a penetração do extrator, pois diminui ainda mais o tamanho de partículas.

Pela figura 17 pode-se verificar também que para a maior parte dos elementos estudados (com exceção do Ca), os desvios obtidos em geral foram maiores quando não se utilizou o ultra-som.

Toma *et al.* [80] investigaram o efeito do ultra-som sobre tecidos vegetais secos, durante a extração por solvente, e concluíram que o processo de extração envolve dois estágios: 1) impregnação do material vegetal pelo extrator para facilitar a intumescência e o processo de hidratação; 2) a transferência de massa dos constituintes solúveis a partir do material sólido para o extrator, por processos de difusão e osmoze.

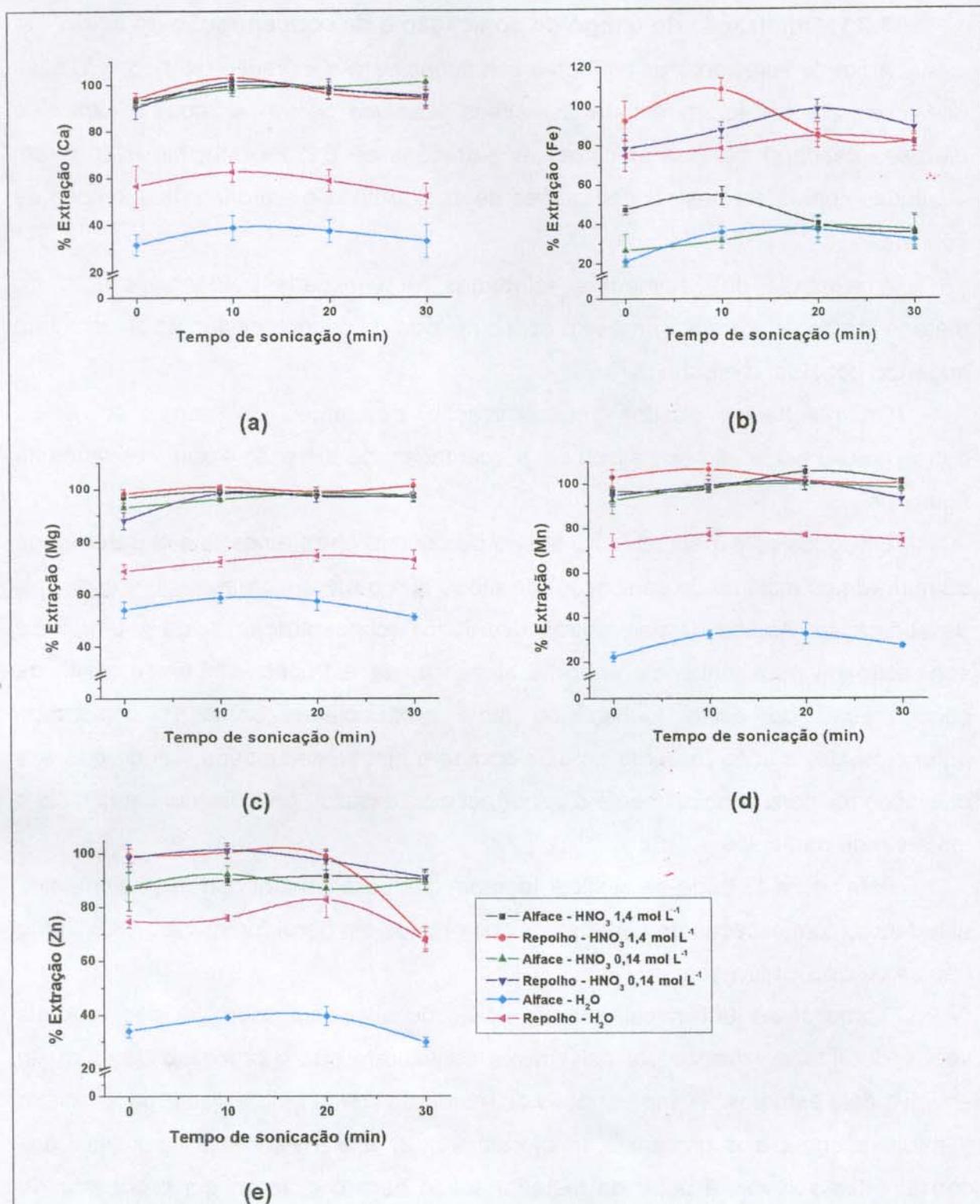


Figura 17. Resultados obtidos durante a otimização das condições de extração para concentração de ácido e tempo de sonicação, usando amostras de alface e repolho: (a) Ca, (b) Fe, (c) Mg, (d) Mn e (e) Zn.

De uma forma geral a sonicação melhorou o processo de extração. Extrações quantitativas e desvios aceitáveis (menores que 5 %) foram obtidos após 10 ou 20 min de sonicação, e foram dependentes do metal estudado. Para alguns elementos a extração foi quantitativa mesmo sem a etapa de sonicação, muito embora os desvios tenham sido mais altos. Quando foi empregado um tempo de 30 min, foram obtidas menores porcentagens de extração (Fig.17). Como diferentes espécies podem ser formadas durante a sonicação, é possível que um longo tempo de sonicação provoque a recombinação de diferentes estruturas, formando novas espécies que não contribuam efetivamente no processo de extração, podendo ainda formar espécies que atuem como agentes quelantes e, desta forma, reduzam a concentração do metal livre na fase líquida [45].

Mierzwa *et al.*[66] compararam a extração ultra-sônica com o método de mineralização para a determinação de selênio em amostras biológicas. Diferentes concentrações ácidas e tempos de sonicação foram testados para a extração. Para o Se, o ultra-som aumentou de 59 para 85 % a porcentagem de extração, muito embora extrações quantitativas não tenham sido obtidas.

Amoedo *et al.* [96] realizaram uma comparação entre extração ultra-sônica com sonda e com banho e, também, compararam com o método de amostragem por suspensões para a determinação de Pb em diferentes materiais certificados. A eficiência de extração da sonda foi maior do que a obtida com o banho, sendo que somente 80 % do Pb foi extraído quando da utilização do banho. Por outro lado, Minami *et al.* [85] reportaram que Cd, Cu, Pb e Mn foram extraídos quantitativamente a partir de amostras biológicas pulverizadas com o uso de um banho de ultra-som operando a 40 °C por 5 min.

Os dados encontrados na literatura com respeito ao uso do ultra-som são bastante diversificados, talvez pelos vários fatores que afetam a sua utilização e que já foram discutidos anteriormente.

Pela figura 17 pode se verificar que ocorreram extrações incompletas quando a água foi usada como extrator, indicando assim a necessidade de usar ácido para extrair os metais Ca, Fe, Mg, Mn e Zn. Entretanto, as extrações são muito similares quando a concentração do ácido variou de 0,14 para 1,4 mol L⁻¹, sendo que somente

pequenas variações (cerca de 3 %) foram obtidas para todos os elementos estudados. A propagação das ondas ultra-sônicas em soluções mais concentradas é dificultada, o que pode reduzir o efeito do ultra-som na extração.

Usando HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ e 10 min de sonicação, as melhores condições para extração (extrações quantitativas e desvios mais baixos) foram encontradas para os elementos estudados, exceto para o Fe em alface, o qual produziu extrações menores em relação aos resultados obtidos pelo método convencional (mineralização completa). Isto pode ser devido à forma como o Fe se encontra ligado nestas amostras, podendo este elemento fazer parte de redes de silicatos, o que dificulta a sua extração apenas com HNO_3 . Pode também ser devido à depressão na resposta do Fe em presença de ácidos orgânicos [77]. O uso de HNO_3 $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ resultou em melhores recuperações para o ferro. Talvez o uso de uma mistura de ácidos (HCl e HNO_3) ou de outros agentes oxidantes seja um modo efetivo para se obter a completa extração do ferro [2].

Com exceção do ferro, é interessante notar que a eficiência de extração para os outros metais foi similar para as amostras de alface e repolho, quando foi usado ácido nítrico $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ como extrator.

3.2.2. Otimização do tamanho de partículas

Usando a amostra de repolho, foi realizado um estudo sobre o melhor tamanho de partículas, variando-o de 63 a $150 \mu\text{m}$. Utilizou-se HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ como extrator e as amostras foram sonicadas por 10 min. Para comparação, esse estudo foi realizado também com o método da mineralização total.

Os resultados obtidos são apresentados na figura 18.

O tamanho de partículas foi um fator importante, principalmente para a extração de Ca, Mg e Mn, onde foram obtidas extrações de cerca de 100 % somente com partículas $< 75 \mu\text{m}$.

Para o Fe, a porcentagem de extração obtida foi maior quando se trabalhou com partículas menores que $75 \mu\text{m}$, muito embora as extrações tenham sido próximas a 90 %. Para Zn, não houve diferenças significativas nas extrações para as 3 diferentes faixas de tamanhos de partícula estudadas.

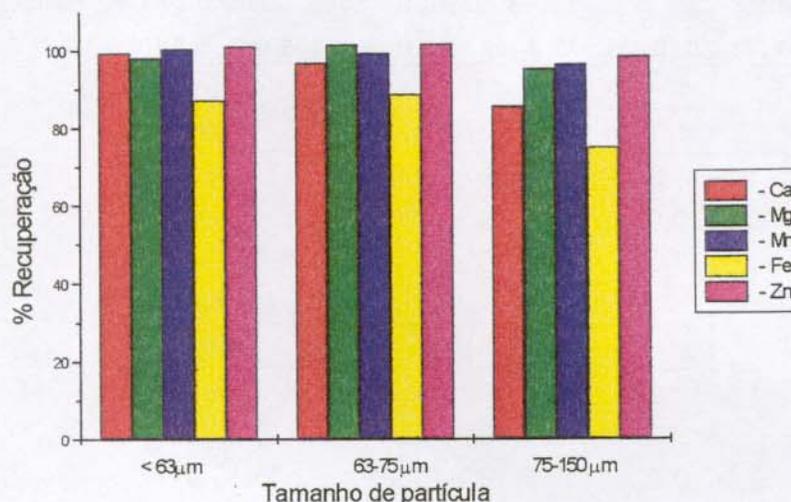


Figura 18 - Efeito do tamanho de partícula do material vegetal na extração ultra-sônica.

Para confirmar o efeito do tamanho de partícula utilizou-se o teste t em nível de 95 % de probabilidade, comparando-se os resultados obtidos pela extração com os da mineralização total (usando os mesmos tamanhos de partículas). Este teste foi realizado porque diferentes resultados poderiam ser produzidos devido à distribuição natural do metal nos diferentes tamanhos de partícula [97]. Deste modo, partículas <math>< 75\mu\text{m}</math> foram escolhidas para a avaliação da exatidão do método.

3.2.3. Análise de amostras

A exatidão do método de extração proposto foi determinada pela comparação dos resultados obtidos na extração por ultra-som com aqueles obtidos pelo método de mineralização completa para alface, repolho e uma planta medicinal conhecida comumente por cavalinha (*Equisetum arvense*), e também pela análise de dois diferentes materiais de referência certificados (CRM): espinafre (NIST 1570a) e folhas de macieira (NIST 1515). Os resultados apresentados na tabela 17 mostram que não há diferenças significativas entre os resultados em nível de 95 % de probabilidade. A única exceção é para a extração de cálcio no material certificado de referência NIST1570a (espinafre) onde o nível de probabilidade utilizado foi de 99,5 %. Os resultados para Fe não são mostrados porque recuperações aceitáveis

Tabela 17 – Resultados das amostras analisadas após decomposição ácida (n=3) e após extração ultra-sônica rápida (n=5). Ca e Mg são expressos em % m/m e Mn e Zn em $\mu\text{g g}^{-1}$.

Amostra	Decomposição ácida			
	Ca	Mg	Mn	Zn
Alface	1,69±0,06	0,280±0,009	177,10±6,92	119,39±5,17
Repolho	0,88±0,05	0,180±0,008	30,69±1,03	25,66±1,17
Cavalinha	2,64±0,07	0,200±0,005	80,39±0,79	36,11±0,50
	Extração ultra-sônica			
	Ca	Mg	Mn	Zn
Alface	1,68±0,03	0,280±0,012	165,69±1,91	112,26±2,09
Repolho	0,89±0,04	0,180±0,010	32,35±0,10	26,36±0,23
Cavalinha	2,68±0,02	0,190±0,008	75,10±2,77	32,94±0,32
Espinafre ^a	1,10±0,05 ^c	0,850±0,022	71,61±3,2	74,01±3,84
Folha de maçã ^b	1,60±0,14	0,250±0,007	53,38±0,67	10,66±0,03

^a NIST 1570a: $1,53 \pm 0,05$; $0,9$; 79 ± 2 ; $82 \pm 8 \mu\text{g g}^{-1}$ para Ca, Mg, Mn e Zn, respectivamente.

^b NIST 1515: $1,51 \pm 0,02$; $0,270 \pm 0,012$; 54 ± 2 ; $12,5 \pm 0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ para Ca, Mg, Mn e Zn, respectivamente.

^c Não há diferenças significativas em nível de 99,5 % de confiança

(ca. 98 %) foram obtidas somente para repolho (Fig. 17). Para as outras amostras estudadas a porcentagem de extração de Fe variou de 11 % (cavalinha) a 53 % (folhas de macieira).

Pelos resultados obtidos na validação concluiu-se que o método de extração ácida rápida usando ultra-som é aplicável para este tipo de amostra (plantas), abrindo assim a possibilidade de aplicação para outros tipos de amostras. O ferro teria que ser extraído empregando-se um tratamento mais drástico com outros extratores.

4. CONCLUSÕES PARCIAIS

Com relação ao método proposto para a otimização das condições de cavitação em banhos de ultra-som, verifica-se que este método apresenta algumas vantagens em relação aos outros existentes na literatura, os quais utilizam termopares, erosão de placas de alumínio, sondas ópticas e calorimétricas. O sistema proposto pelo método em questão pode simular as condições a serem utilizadas para as aplicações analíticas. Por exemplo, esta otimização pode ser conduzida com o mesmo frasco que será utilizado para a extração. Além disso, este método é extremamente simples, uma vez que requer basicamente um espectrofotômetro, que pode ser encontrado na maioria dos laboratórios.

Como pode se verificar pelos resultados obtidos, o mapeamento dos banhos de ultra-som é de grande importância para as reações sonoquímicas, sendo que as condições de máxima cavitação podem ser diferentes para distintas marcas e modelos de banho de ultra-som e, ainda, para banhos da mesma marca e modelo. Devido a isso, algumas vezes se torna difícil comparar resultados obtidos pelo uso de banhos de ultra-som. Em química analítica, quando resultados reprodutíveis são requeridos, as condições experimentais devem ser estudadas, estabelecidas e reproduzidas para cada experimento.

Com relação ao método de extração assistida por ultra-som, verificou-se que Ca, Mg, Mn e Zn podem ser determinados quantitativamente em diferentes plantas, de uma forma rápida, fácil e de baixo custo. A concentração do ácido nítrico foi o fator que mais influenciou a eficiência da extração, muito embora os outros fatores estudados (tempo de ultra-som e tamanho de partículas) também tenham influenciado, só que em menor grau, os resultados obtidos. O Fe apresentou um comportamento distinto, sendo que sua extração foi quantitativa apenas em uma das amostras estudadas. É necessário um processo de extração mais drástico para a sua extração e quantificação. Os resultados obtidos com o método proposto e com o método convencional (decomposição ácida por via úmida) foram estatisticamente comparáveis, sendo possível à substituição de um método que pode apresentar problemas de periculosidade, contaminação e grande consumo de tempo e reagentes, por outro mais rápido e simples, com resultados satisfatórios. O método proposto pode ser utilizado principalmente em análises de rotina de cunho ambiental ou agrônomo, nas quais o número de amostras a ser analisado é muito grande.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – J. Alvarado, L. E. León, F. López, C. Lima, *J. Anal. At. Spectrom.*, **31** (1988) 135.
- 2 - E. Wieteska, A. Zióek, A. Drzewínska, *Anal. Chim. Acta*, **330** (1996) 251.
- 3 - Z. A. de Benzo, M. Velosa, C. Ceccarelli, M. de la Guardia, A. Salvador, *Fresenius J. Anal. Chem.* **339** (1991) 235.
- 4 – I. Novozamsky, V.J. Houba, J. van der Lee, R. Van Eck, M.D. Mignorange, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **24** (1993) 2595.
- 5 – G. Knapp, B. Sadjadi, H. Spitzzy, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **274** (1975) 275.
- 6 - F. A. Chmilenko, A.N. Baklanov, *J. Anal. Chem.* **54** (1999) 2.
- 7 – P. Mader, J. Száková, D. Miholová, O. Mestek, M. Scánek, *Analusis* **26** (1998) 121.
- 8 – M. Stoeppler (Ed.) **Hazardous Metals in the Environmental**, Elsevier, Amsterdam, 1992.
- 9 - I. Matejovic, A. Durackova, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **25** (1994) 1277.
- 10 - X. Liu, J. Xu, Z. Fang, *At. Spectrosc.* **15** (1994) 229.
- 11- W. Faromars, L. Zcwski, N. Rolf, *Fresenius J. Anal. Chem.* **338** (1990) 163.
- 12 - K. Boyer, S. Capar, *Foods Process.*, **40** (1979) 72.
- 13 –E. Curdová, J. Száková, D. Miholová, O. Mestek, M. Schánek, *Analusis* **22** (1994) 222.
- 14 – M. Ahlgrén, A. Kontkanen, K. Vattulainen, H. Vehvilainen, *Analyst* **113** (1988) 285.
- 15 – J. Sánchez, R. García, E. Millán, *Analusis* **22** (1994) 222.
- 16 - F.A. Chmilenko, A.N. Baklanov, L.P. Sidorova, Y.M. Piskin, *J. Anal.Chem.* **49** (1994) 494.
- 17 - H.M. Kingston, L.B. Jassie (Eds.) **Introduction to Microwave Sample Preparation Theory and Practice**, Americal Chemical Society, Washington, DC, 1988.
- 18 - N.N. Volkova, E.A. Zakharova, L.A. Khustenko, *J. Anal.Chem.* **42** (1987) 195.
- 19 - R.D. Tsingarelli, V.B. Gaidadymov, O.M. Tabakova, *J. Anal. Chem.* **38** (1983) 210.

- 20 - E.A. Zakharova, G.M. Mokrousov, V.N. Volkova, V.N. Lisetskii, *J. Anal. Chem.* **38** (1983) 1205.
- 21 - E.P. Achterberg, C.B. Braungardt, R.C. Sandford, P.J. Worsfold, *Anal. Chim. Acta* **440** (2001) 27.
- 22 - G.S. Wang, S.T. Hsieh, C.S. Hong, *Wat. Res.* **34** (2000) 15.
- 23 - H.M. Kingston, S.J. Haswell (Eds.) **Microwave-Enhanced Chemistry - Fundamentals, Sample Preparation and Applications**, American Chemical Society, Washington, DC, 1997.
- 24 - A. Abu-Samra, J.S. Morris, S.R. Koirtiyohann, *Anal. Chem.* **47** (1975) 1475.
- 25 - M.D. Luque de Castro, M.P. da Silva, *Trends in Anal. Chem.* **16** (1997) 16.
- 26 - H. Polkowska-Motrenko, B. Danko, R. Dybczynski, A. Koster-Ammerlaan, P. Bode, *Anal. Chim. Acta* **408** (2000) 89.
- 27 - I. Lavilla, A.V. Filgueiras, C. Bendicho, *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 5072.
- 28 - A. Sahuquillo, R. Rubio, G. Rauret, *Analyst* **124** (1999) 1.
- 29 - E. R. Pereira-Filho, M.A.Z. Arruda, *Analyst* **124** (1999) 1873.
- 30 - A. Agazzi, C. Pirola, *Microchem. J.* **67** (2000) 337.
- 31 - L. Gilman, W. Grooms, *Anal. Chem.* **60** (1988) 1624.
- 32 - M.N. Finberg, *Anal. Chim. Acta* **272** (1993) 83.
- 33 - E. Zeiller, *Fresenius J. Anal. Chem.* **345** (1993) 68.
- 34 - N. Mitoxono, *Lab. Pract.* **17** (1995) 62.
- 35 - I.V. Kubrakova, T.F. Kudinova, E.B. Stavnivenko, N.M. Kuz'min, *J. Anal. Chem.* **52** (1997) 522.
- 36 - T.J. Mason (Ed.), **Chemistry With Ultrasound**, Critical Reports on Applied Chemistry, Vol. 28, Elsevier Applied Science, Londres, 1990.
- 37 - T.J. Mason, **Sonochemistry: The Uses of Ultrasound in Chemistry**, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1990.
- 38 - T.J. Mason, J.P. Lorimer, **Sonochemistry: Theory, Applications and Uses of Ultrasound in Chemistry**, John Wiley & Sons, Chichester, 1988.
- 39 - K.R. Allen, *Metal Finishing* **97** (1999) 165.
- 40 - J.P. Lorimer, T.J. Mason, *Chem. Soc. Rev.* **16** (1987) 239.
- 41 - J.C.S. Barboza, A.A. Serra, *Quim. Nova* **15** (1992) 302.

- 42 - G. Cum, G.Galli, R. Gallo, A.Spadaro, *Ultrasonics* **30** (1992) 267.
- 43 - Y. Mizukoshi, H. Nakamura, H. Bandow, Y. Maeda, Y. Nagata, *Ultrason. Sonochem.* **6** (1999) 203.
- 44 - K.S. Suslick, *Scient. Amer. Feb.* (1989) 80.
- 45 - L.R.F. Carvalho, S.R. Souza, B.S. Martinis, M. Korn, *Anal. Chim. Acta* **317** (1995) 171.
- 46 - Rotoarinoro, F. Contamine, A.M. Wilhelm, J. Berlan, H. Delmas, *Ultrason. Sonochem.* **2** (1995) S43.
- 47 - K.S. Suslick, D.A. Hammerton, R.E. Cline, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 5641.
- 48 - E.J. Hart, C.H. Fischer, A. Henglein, *J. Phys. Chem.* **90** (1986) 5989.
- 49 - C.A. Wakeford, R. Blackburn, P.D. Lickiss, *Ultrason. Sonochem.* **6** (1999) 141.
- 50 - A. Weisller, *J. Appl. Phys.* **21** (1950) 171.
- 51 - A. Kotronarou, G. Mills, M.R. Hoffmann, *J. Phys. Chem.* **95** (1991) 3630.
- 52 - F.O. Schimtt, C.H. Johnson, A.R. Olson, *J. Am. Chem. Soc.* **51** (1929) 370.
- 53 - A. Henglein, *Ultrasonics*, **25** (1987) 6.
- 54 - S.R. Soudagar, S.D. Samant, *Ultrason. Sonochem.* **2** (1995) S49.
- 55 - J. Raso, P. Mañas, R. Pagán, F.J. Sala, *Ultrason. Sonochem.* **5** (1999) 157.
- 56 - J. Berlan, T.J. Mason, *Ultrasonics* **30** (1992) 203.
- 57 - S. Majumdar, P.S. Kumar, A.B. Pandit, *Ultrason. Sonochem.* **5** (1998) 113.
- 58 - F. Faid, F. Contamine, A.M. Wilhelm, H. Delmas, *Ultrason. Sonochem.* **5** (1998) 119.
- 59 - T. Kimura, T. Sakamoto, J.M. Leveque, H. Sohmiya, M. Fujita, S. Ikeda, T. Ando, *Ultrason. Sonochem.* **3** (1996) 157.
- 60 - T. Hasegawa, *J. Acoust. Soc. Am.* **46** (1969) 1139.
- 61 - B. Pugin, *Ultrasonics* **25** (1987) 49.
- 62 - J.K. Zieniuk, R.C. Chivers, *Ultrasonics* **14** (1976) 161.
- 63 - J.L. Hardcastle, J.C. Ball, Q. Hong, F. Marken, R.G. Compton, S.D. Bull, S.G. Davis, *Ultrason. Sonochem.* **7** (2000) 7.
- 64 - D.M. Kunina, A.V. Karyakin, I.F. Gribovskaya, *J. Anal. Chem.* **40** (1985) 930.
- 65 - J.L. Gomez-Ariza, E. Morales, R. Beltran, I. Giraldez, M. Ruiz-Benitez, *Analyst* **120** (1995) 1171.

- 66 - J. Mierzwa, Y.C. Sun, M.H. Yang, *Anal. Chim. Acta* **355** (1997) 277.
- 67 - K. Vinodgopal, J. Peller, O. Makogon, P.V. Kamat, *Water Res.* **32** (1998) 3646.
- 68 - B.W. Pack, S.J. Ray, R.A. Potyrailo, G.M. Hieftje, *Appl. Spectros.* **52** (1998) 1515.
- 69 - P.L. Budini, A. Melovi, J.L. Sharma, *Talanta* **47** (1998) 203.
- 70 - B. Fransson, U. Ragnarsson, *J. Chromatogr.* **827** (1998) 31.
- 71 - J. Mierzwa, S.B. Adeloju, H.S. Dhindsa, *Anal. Sci.* **13** (1997) 189.
- 72 - M. Akçay, A.Elik, S. Savasci, *Analyst* **114** (1989) 1079.
- 73 - R.C. Asher, *Anal. Proc.* **22** (1985) 180.
- 74 - R.C. Asher, *Ultrasonics* **25** (1987) 17.
- 75- N.A. Madigan, T.J. Murphy, J.M. Fortuna, C.R.S. Hagan, L.A. Coury, Jr., *Anal. Chem.* **67** (1995) 2781.
- 76 - R. W. Wendt, V.A. Fassel, *Anal. Chem.* **37** (1965) 920.
- 77 - W.J. Price, **Analytical Atomic Absorption Spectrometry**, Heyden, New York, 1972.
- 78 - S. Kawakubo, Y. Tsuchiya, M. Iwatsuki, *Anal. Chim. Acta* **310** (1995) 501.
- 79 - R. Chen, L. Weng, N.C. Sizto, B. Osorio, C.J. Hsu, R. Rodgers, D.J. Litman, *Clin. Chem.*, **30** (1984) 1446.
- 80 - M. Toma, M. Vinatoru, L. Paniwnyk, T.J. Mason, *Ultrason. Sonochem.* **8** (2001) 137.
- 81 - M. Misexare, *J. Agric. Food Chem.* **42** (1994) 1126.
- 82 - C. Cocito, G. Caetano, C. Delfini, *Food Chem.* **52** (1995) 311.
- 83 - F. Lázaro, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* **242** (1991) 283.
- 84 - L.I. Pleskach, E.P. Ezhova, G.D. Chirkova, *J. Anal. Chem.* **45** (1990) 788.
- 85 - H. Minami, T. Honjyo, I. Atsuya, *Spectrochim. Acta* **51B** (1996) 211
- 86 - M. Vinatoru, M. Toma, O. Radu, P.I. Filip, D. Lazurca, T.J. Mason, *Ultrason. Sonochem.* **4** (1997) 135.
- 87 - A. Carlosena, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Anal. At. Spect.* **12** (1997) 479.
- 88 - A. Kabata-Pendias, H. Pendias, **Trace elements in soils and plants**, Boca Raton: CRC, New York, 1992.
- 89 - A. Weissler, *J. Am. Chem. Soc.* **81** (1959) 1077.

- 90- E.R. Pereira-Filho, R. Petrus, J.A.F. Faria, M.A.Z. Arruda, *J. Flow Inj. Anal.*
(submetido)
- 91 - B. Niemczewski, *Ultrasonics* **18** (1980) 107.
- 92- S. Kocis, Z. Figura, **Ultrasonic measurements and technologies**, Chapman & Hall, Londres, 1996.
- 93- M.H. Entezari, P. Kruus, *Ultrason. Sonochem.* **3** (1996) 19.
- 94 - Ney Dental International, **Ultrasonik Cleaner: Owner & Operator's Manual.**
- 95- C.L. Huang, E.E. Schulte, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **16** (1985) 943.
- 96 - L. Amoedo, J.L. Capelo, I. Lavilla, C. Bendicho, *J. Anal. At. Spectrom.* **14** (1999) 1221.
- 97 - E.I. Hamilton, *Sci. Total Environ.* **176** (1995) 3.

CAPÍTULO III

PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE COBALTO COM EXTRAÇÃO NO PONTO NUVEM

“Pensar para acertar. Calar para resistir. Agir para vencer”. (Renato Kehl)

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Tensoativos

Os tensoativos são moléculas que possuem distintas regiões hidrofílica e hidrofóbica, o que confere às mesmas a propriedade de solubilizar moléculas hidrofóbicas em água [1-5]. Um tensoativo simples tem a estrutura R-X, onde R é uma longa cadeia de hidrocarbonetos contendo de 8 a 18 átomos de carbono e X é o grupo cabeça polar (ou iônico). Dependendo da natureza do grupo cabeça, os tensoativos podem ser classificados como não-iônicos, catiônicos, aniônicos ou anfóteros [1,2,5]. O grupo cabeça de tensoativos aniônicos normalmente inclui sais de metais alcalinos e alcalino terrosos de ácidos carboxílico, sulfúrico e fosfórico. Devido à estabilidade e a disponibilidade comercial, os tensoativos catiônicos usualmente contêm grupos cabeça com nitrogênio quaternário; enquanto os não-iônicos apresentam cadeias de polioxietileno ou polioxipropileno como grupo polar [6]. Alguns outros tensoativos consistem de duas ou mais cadeias hidrofóbicas, e podem incorporar grupos funcionais [3]. Alguns exemplos das classes mais comuns de tensoativos são apresentados no quadro 4.

Quadro 4 - Estruturas de tensoativos de diferentes classes.

Tensoativo	Fórmula estrutural	Tipo
Dodecilsulfato de sódio (SDS)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}^+$	Aniônico
Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$	Catiônico
Polioxietileno (9-10) p-tercotil fenol (Triton X-100)	$(\text{CH}_3)_3\text{C}(\text{CH}_2)\text{C}(\text{CH}_3)_2$  $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OH}$	Não-iônico
Butirato de 4-(dodecildimetilamônio) (DAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_3\text{COO}^-$	Anfótero

As diferenças nas propriedades químicas dos tensoativos, que são devidas à natureza da cadeia hidrofóbica (grau de ramificação, número de carbonos, aromaticidade) são usualmente menos pronunciadas que àquelas devidas ao grupo cabeça hidrofílico [1].

Dependendo de sua estrutura química e da natureza do meio no qual se encontra, estas moléculas anfífilas podem originar diferentes estruturas organizadas chamadas de micelas normal e reversa, microemulsões, monocamadas, bicamadas e vesículas [4].

As micelas normais são definidas como agregados moleculares, possuidoras de regiões estruturais hidrofílica e hidrofóbica, que dinamicamente e espontaneamente se associam em meio aquoso, a partir de uma determinada concentração crítica (CMC – concentração micelar crítica) [1,4]. Segundo McIntire [5], a CMC é muitas vezes referida como uma concentração única, quando de fato, é uma faixa estreita de concentrações acima da qual algumas propriedades físicas da solução são alteradas. Abaixo da CMC, o tensoativo está predominantemente na forma monomérica [7]. A geometria das micelas é ainda um assunto bastante discutido, mas alguns autores [2,5,8] consideram que em concentrações próximas a CMC, as micelas são esféricas (3-6 nm diâmetro) e consistem de 30-200 monômeros, dependendo do tensoativo. Um aumento na concentração do tensoativo, conduz a formação de micelas cilíndricas.

A CMC depende da estrutura do tensoativo, sendo que quanto mais longa a cadeia de hidrocarbonetos, menor a CMC [2,3]. Ela depende também das condições experimentais (força iônica, contra-íon, temperatura e pressão) [9,10]. Os monômeros de tensoativos estão em equilíbrio dinâmico entre as micelas e a solução. Micelas são termodinamicamente estáveis e facilmente reprodutíveis, sendo destruídas pela diluição com água quando a concentração dos tensoativos é menor que a CMC [2].

Em uma micela normal, os monômeros individuais estão orientados com a região hidrofílica em contato com a fase aquosa (formando uma superfície polar) e a região hidrofóbica comprimida no interior do agregado, formando um núcleo central não polar [1,3,4]. As micelas reversas são formadas quando os tensoativos se associam em meios não aquosos. A parte hidrofóbica da molécula se estende pelo solvente não polar, enquanto o grupo cabeça está unido com outros para formar o núcleo hidrofílico destes agregados [2,5]. A figura 19 mostra um esquema representativo das micelas normal e reversa.

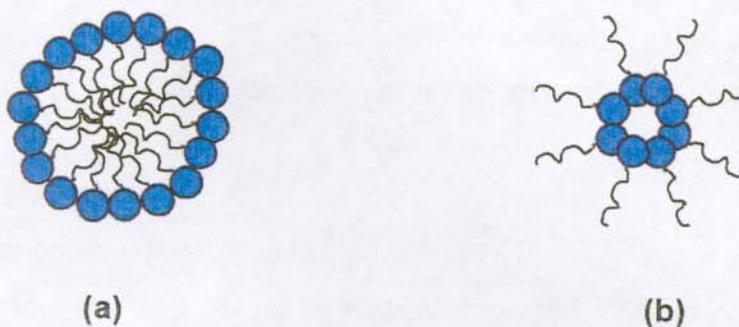


Figura 19 – Esquema representativo de (a) micela normal (meio aquoso) e (b) reversa (meio não aquoso).

Como a maioria das aplicações analíticas envolvendo tensoativos ocorre em meio aquoso, neste capítulo o termo micela será utilizado para se referir à micela normal.

Uma importante propriedade das micelas (e de outras estruturas organizadas) é a solubilização de moléculas orgânicas. Esta incorporação de moléculas geralmente causa uma diminuição na CMC do sistema [2,11,12]. Além disso, a solubilização de uma quantidade relativamente grande de moléculas não polares pode alterar o número de agregação (N) da micela [3,12]. O sítio de solubilização varia com a natureza da espécie solubilizada e do tensoativo. Espécies iônicas com carga oposta à do grupo cabeça da micela podem ligar-se fortemente a estes grupos por atração eletrostática [2,11,13]. Existem evidências de que espécies não polares com elétrons polarizáveis (compostos aromáticos) se localizam mais próximo ao grupo cabeça polar do que no interior do núcleo da micela [14], enquanto alcanos, possivelmente interajam mais com o núcleo da micela [2,11,15]. As informações sobre estes sítios são usualmente obtidas a partir de estudos do solubilizado antes e depois da solubilização por meio de técnicas, tais como: ultra-violeta, ressonância magnética nuclear e fluorescência. Baseado nestas investigações, os seguintes modelos de incorporação têm sido sugeridos [2,3,8,16]:

- 1- Adsorção sobre a superfície da micela, na interface micela/solvente,
- 2- No caso de grupos polioxietileno (tensoativos não-iônicos) entre os grupos cabeças hidrofílicos;

- 3- Na camada paliçada (formada pelas longas cadeias de hidrocarbonetos), próximo aos grupos hidrofílicos;
- 4- Mais profundamente na camada paliçada;
- 5- No núcleo interno da micela.

Essas interações entre micelas e os substratos solubilizados são altamente dinâmicas. As micelas têm natureza transiente sendo que um monômero dentro da micela apresenta um tempo de vida na ordem de 10 μ s, enquanto micelas se formam e dissolvem numa escala de tempo de milisegundos [3,7,11]. A localização e o microambiente do substrato em questão não são constantes, pois o mesmo está continuamente em um estado de fluxo entre as fases aquosa e micelar [2,17,18].

As micelas podem solubilizar, concentrar e compartimentalizar íons e moléculas, podem modificar propriedades ácido-base e de oxi-redução, e equilíbrios e, ainda, podem influenciar a velocidade de reações, modificar rotas químicas e influenciar a estequiometria de uma reação [7]. Devido a isso, os ambientes micelares são empregados em vários campos da química analítica, visando a melhora das características analíticas dos métodos já existentes e/ou o desenvolvimento de novos métodos, como os de extração/pré-concentração que serão discutidos a seguir.

Algumas das aplicações mais importantes e práticas do emprego das micelas se encontram nos processos de separação, principalmente por meio do fenômeno do ponto nuvem.

1.2. O fenômeno do ponto nuvem

A extração no ponto nuvem é um dos métodos mais simples e versáteis para a pré-concentração e extração de espécies hidrofóbicas à partir de soluções aquosas [19]. O método mais conhecido baseia-se na propriedade dos tensoativos não-iônicos de formar micelas em soluções aquosas. Esta solução, quando aquecida a uma determinada temperatura (conhecida como ponto nuvem), torna-se turva e, acima desta, a solução se separa em duas fases isotrópicas: uma fase de pequeno volume e rica em tensoativo (denominada fase rica), e a outra denominada fase

aquosa ou fase pobre, contendo uma concentração de tensoativo próxima a CMC [3,20,21]. A temperatura na qual ocorre a separação de fases depende da estrutura e da concentração do tensoativo [21].

Watanabe e Tanaka [22] foram os primeiros a desenvolver este método de extração, baseado na separação de fases induzida por elevação da temperatura a partir de uma solução micelar aquosa.

De acordo com Corti *et al.* [23], este fenômeno, que é especialmente observado com tensoativos do grupo do polioxietilenos, pode ser atribuído aos segmentos óxido etil na micela. Estes se repelem a baixas temperaturas e se atraem a altas temperaturas. Outros autores [24] sugerem que a separação das fases resulta de uma competição entre entropia, a qual favorece a miscibilidade das micelas na água e a entalpia, que favorece a separação das micelas da água. Blankschtein *et al.* [25] e Rupert [26], discutem em seus trabalhos que o fenômeno ponto nuvem ocorre devido a mudanças no balanço das interações hidrofílicas e hidrofóbicas. Embora diferentes mecanismos tenham sido propostos para explicar a separação das fases, estes ainda não foram completamente elucidados. De qualquer modo, é consenso que a separação das fases é extremamente dependente das interações que ocorrem no sistema [27].

Para uma série homóloga de tensoativos não-iônicos polioxietilados, o ponto nuvem aumenta com a redução do comprimento da cadeia de hidrocarbonetos ou com o aumento do comprimento do segmento oxietileno [28].

A presença de outros tensoativos, ácidos e bases, sais e aditivos orgânicos pode alterar, muitas vezes drasticamente, a temperatura do ponto nuvem [21,27,29-31]. O ponto nuvem dos tensoativos não-iônicos aumenta bruscamente pela adição de pequenas quantidades de um tensoativo iônico (aniônico ou catiônico) [32-34]. Para sistemas mistos, formados por tensoativos não-iônicos e iônicos, o ponto nuvem diminui quando se adicionam pequenas quantidades de sais inorgânicos [34-37].

O processo de separação das fases é reversível, e quando a temperatura cai abaixo da temperatura de ponto nuvem, uma única fase é obtida novamente [20,21,28].

As soluções micelares de tensoativos anfóteros também apresentam uma separação de fases dependente da temperatura [38]. Ao contrário do que ocorre com os tensoativos não-iônicos, a separação de fases em soluções aquosas da maior parte dos sistemas micelares anfóteros é induzida pelo abaixamento da temperatura [21]. A presença de aditivos também pode alterar o ponto nuvem de soluções de tensoativos anfóteros [39,40], muito embora o efeito destes aditivos seja oposto àquele que ocorre com tensoativos não-iônicos [41,42].

A adição de altas concentrações de sal ($> 2 \text{ mol L}^{-1}$) a uma solução de tensoativo iônico (aniônico ou catiônico), pode causar a separação de uma fase rica em tensoativo [19,43]. De acordo com Casero *et al.* [44] a adição de uma grande quantidade de eletrólito minimiza os efeitos de repulsão eletrostática entre as micelas, possibilitando assim a separação das fases. Quando a separação de fases é induzida em um sistema micelar com tensoativos iônicos pela adição de um eletrólito ou de outro tensoativo, se usa o termo *coacervato* [43,45].

Uma outra possibilidade da ocorrência do fenômeno ponto nuvem se relaciona com o emprego de tensoativos aniônicos quando a concentração ácida do meio é elevada [44].

Como discutido anteriormente, durante a sua formação, as micelas possuem a capacidade de reter substâncias hidrofóbicas, isolando-as da solução aquosa [6,46]. Assim, compostos hidrofóbicos, os quais são solubilizados na solução micelar, são extraídos em uma fase rica em tensoativos, enquanto compostos hidrofílicos permanecem na fase aquosa [22,47]. Devido a isto, o fenômeno do ponto nuvem com tensoativos não-iônicos tem sido muito utilizado em eficientes métodos de extração para a separação, pré-concentração ou purificação de uma variedade de substâncias, incluindo íons metálicos [48,49] e vários compostos orgânicos [50-52]. Já os outros métodos foram ainda pouco estudados, sendo que estes sistemas também são de grande interesse na química analítica, principalmente por sua versatilidade.

Com relação ao emprego de tensoativos na separação/pré-concentração, alguns aspectos devem ser considerados [48,53-56]: i) o tensoativo deve possuir capacidade natural de extrair o analito para a fase rica, sendo que o analito pode ser

extraído em pequenos volumes desta fase; ii) a pré-concentração depende da hidrofobicidade do complexo formado com o analito; iii) o processo de separação das fases é reversível;

O uso de tensoativos em processos de extração e pré-concentração apresenta algumas vantagens [17,22,49,57]:

- altos fatores de pré-concentração (de 10 a 100) são facilmente obtidos com boas recuperações, o que resulta em melhora na sensibilidade;
- são requeridas quantidades menores das amostras aquosas (normalmente de 50 a 100 mL) para se obter os mesmos fatores de pré-concentração obtidos com cerca de 1 L de amostra para os procedimentos clássicos de extração líquido-líquido;
- o uso de pequenas quantidades de tensoativos (que apresentam menor toxicidade) elimina a manipulação de grandes volumes de solventes orgânicos voláteis e inflamáveis e minimiza também os custos, tornando assim, os procedimentos mais seguros e econômicos;
- a disposição final dos resíduos é facilitada, uma vez que estes podem ser incinerados;
- o procedimento de extração é mais simples e conveniente do que o empregado para a extração líquido-líquido.

A principal desvantagem das extrações por ponto nuvem é o baixo coeficiente de partição de muitas espécies neutras de quelatos metálicos, o que pode ser resolvido somente com o uso de ligantes altamente hidrofóbicos [21].

Desta forma, a crescente utilização dos tensoativos em química analítica é justificada, pois propicia maior sensibilidade e possibilita, muitas vezes, melhora em seletividade.

1.3. Aplicações analíticas do ponto nuvem

Sistemas micelares aquosos têm sido empregados com sucesso em muitos campos da química analítica, com aplicações em espectroscopia, eletroanalítica e processos de separação. O método do ponto nuvem é empregado em processos que envolvem separação e/ou pré-concentração.

A separação de membranas protéicas (acetilcolinesterase, bacteriorodopsina e citocromo C oxidase) de proteínas hidrofílicas (catalase, ovobumina, concanavalina A e albumina) foi realizada com o método do ponto nuvem pelo uso de Triton X-114 [58].

Horvath e Huie [59] extraíram coproporfirina de amostras de urina utilizando Triton X-100 e K_3PO_4 para abaixar a temperatura de ponto nuvem. Os fatores de pré-concentração obtidos variaram de 10 a 100, e a eficiência de extração foi cerca de 94%.

O método do ponto nuvem induzido por temperatura utilizando o tensoativo não-iônico Triton X-114 foi aplicado para a pré-concentração de Co, Fe e Ni, sendo a determinação realizada por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Foram obtidos fatores de pré-concentração de 20 vezes para todos os elementos estudados [19]. Oliveros *et al.* [20] utilizaram o mesmo tensoativo para a pré-concentração de Ni e Zn, com a determinação também sendo realizada por FAAS. Os fatores de pré-concentração obtidos foram de 10 vezes para Zn e de 25 vezes para Ni.

A determinação de chumbo em amostras biológicas (saliva) foi realizada com sucesso, após a pré-concentração do analito pelo método do ponto nuvem, mas sem o uso de agentes complexantes. O tensoativo utilizado pelos autores [60] foi o PONPE 7,5 (não-iônico), e FAAS foi a técnica de quantificação. Foi obtido um fator de pré-concentração de aproximadamente 67 e a porcentagem de recuperação foi de 99,9 %.

Paleologos *et al.* [61] realizaram a pré-concentração com o método do ponto nuvem (Triton X-114) para a determinação seletiva das espécies de Cr por fluorimetria, empregando um sistema de fluxo. Os autores obtiveram um fator de pré-concentração de 25 vezes.

O método do ponto nuvem foi empregado para a pré-concentração de germânio (complexado com quercetina) antes da quantificação por espectrometria de absorção atômica com chama e geração de hidretos. Quando os autores [62] utilizaram o Triton-X114 foram obtidos fatores de pré-concentração de 200 e recuperações que variaram de 93 a 105 %.

Gadolínio foi pré-concentrado a partir de amostras de urina, na forma do complexo Gd(III)-2-(3,5-dicloro-2-piridilazo)-5-dimetilaminofenol, utilizando-se o tensoativo não-iônico PONPE 7,5. O maior fator de pré-concentração obtido foi de 25 vezes e a eficiência de extração foi de aproximadamente 99 % [63].

O método do ponto nuvem pode ser utilizado para a extração direta de compostos orgânicos presentes em amostras de solos, sendo algumas vezes aplicado na descontaminação deste tipo de material. Com a utilização do tensoativo não-iônico Genapol X-80, cerca de 67 % de benzo[a]pireno e benzo[k]fluoranteno foram solubilizados e recuperados à partir de uma suspensão de amostras de solo [64]. Laha e Luthy [65] conseguiram remover 82 % de fenantreno em amostras de solo contaminado, utilizando uma solução de Brij 30 1,5 % m/v. Os autores testaram também uma solução de Triton X-100 1,5 % m/v, sendo obtida uma remoção de 88 %.

Saitoh e Hinze [39] obtiveram sucesso ao empregar o tensoativo anfótero C₉-APSO₄ para a pré-concentração de hormônios, vitamina E e bacteriorhodopsina a partir de soluções aquosas. Os fatores de pré-concentração obtidos variaram de 26 a 45 vezes, e as recuperações de 88 a 96 %.

A pré-concentração por ponto nuvem foi realizada para a determinação de alumínio em soluções parenterais. O metal foi complexado com Cromo Azurol S e extraído pelo tensoativo catiônico cloreto de benzildimetiltetradecilamônio (CBDTA). Nas condições otimizadas, os autores obtiveram um fator de pré-concentração de 50 e uma extração de 99,9 %.

Casero *et al.* [44] propuseram um método por ponto nuvem utilizando tensoativos aniônicos (SDS e SDSA), no qual a separação é induzida pelo aumento da concentração ácida do meio. Este método foi utilizado para a pré-concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras certificadas de lodo de esgoto. As recuperações obtidas foram de 85 a 100 % e os fatores de pré-concentração foram de aproximadamente 10 e 20 para SDS e SDSA, respectivamente.

O método do ponto nuvem é utilizado com diferentes configurações e finalidades, principalmente pela sua grande versatilidade. Os tensoativos não-iônicos são os mais utilizados, sendo que a aplicação dos tensoativos iônicos e de sistemas

mistos para processos de separação e/ou pré-concentração requer ainda mais estudos.

1.4. Cobalto

O cobalto é um elemento metálico que é bastante comum na crosta terrestre, apesar de não ser muito abundante. Na natureza, o cobalto ocorre em dois estados de oxidação, Co^{2+} e Co^{3+} e a formação do complexo aniônico $[\text{Co}(\text{OH})_3]^-$ também é possível [66].

O cobalto é um elemento essencial, sendo o principal constituinte da vitamina B12 [67,68]. Os organismos humanos não são capazes de sintetizar essa vitamina a partir do cobalto ingerido, sendo que a mesma necessita ser obtida pela ingestão de alimentos [67]. As principais fontes de vitamina B12 incluem alguns peixes (truta, arenque, cavala, entre outros), ostras, ovos e leite [68].

A dose diária requerida para adultos é de 3 a 4 μg desta vitamina, e a concentração normal no plasma humano é de 450 ng L^{-1} , sendo que sua deficiência pode causar anemia perniciosa [69]. Em alguns órgãos, como fígado, coração e rins a concentração de vitamina B12 é particularmente elevada. O uso de medicamentos a base de vitamina B12 é amplamente indicado para o tratamento de diversas doenças, tais como anemia perniciosa e distúrbios relacionados à fadiga muscular. Altos teores de cobalto no organismo são extremamente perigosos, pois prejudicam a absorção do ferro. Além disso, outros efeitos toxicológicos incluem vasodilatação, vermelhidão e cardiomiopatia em humanos e animais [67].

Devido à importância do cobalto como elemento essencial, a sua determinação em diferentes amostras é de grande relevância e diversas técnicas são utilizadas para este fim, tais como: espectrometria de absorção atômica [70,71], espectrometria de emissão atômica [72] e espectrofotometria de absorção molecular [73-75].

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Equipamentos e acessórios

- Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama Perkin-Elmer, modelo AAnalyst 300, equipado com sistema de correção de fundo por lâmpada de deutério (Norwalk, CT, EUA).
- Espectrômetro de Absorção Atômica com Forno de Grafite, Perkin Elmer, modelo AAnalyst 600, equipado com corretor de fundo por efeito Zeeman e auto-amostrador Perkin Elmer, modelo AS 800 (Norwalk, CT, EUA).
- Lâmpada de cátodo oco de cobalto (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, EUA).
- Centrífuga Nova Técnica modelo NT 811 (Piracicaba, SP, Brasil).
- Balança Analítica, marca Mettler, modelo AE 200 (Bradford, MA, EUA).
- Potenciômetro, marca Digimed, modelo DM20 (São Paulo, SP, Brasil).
- Bloco Digestor Marconi, modelo MA 4025, com 40 cavidades e tubos de 50 mL de capacidade (Piracicaba, SP, Brasil).
- Placa aquecedora QUIMIS (Diadema, SP, Brasil).

2.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água desionizada e reagentes de grau analítico.

Nos experimentos foram empregados os seguintes reagentes:

- 2-(5-bromo-2-piridilazo)5-dietilaminofenol (5-Br-PADAP), $C_{15}H_{17}BrN_4O$, $MM=349,23 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- 1-(2-piridilazo)2-naftol (PAN), $C_{15}H_{11}N_3O$, $MM=249,27 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Sal monossódico de 4-(2-piridilazo)resorsinol (PAR), $C_{11}H_8N_3O_2Na.H_2O$, $MM=237,20 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Dodecilsulfato de sódio (SDS), $C_{12}H_{25}SO_4Na$, $MM=288,38 \text{ g mol}^{-1}$ (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Sal sódico do ácido dodecanosulfônico (SDSA), $C_{12}H_{25}SO_3Na$, $MM=272,38 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, EUA)

- Polioxietileno (9-10) p-tercetil fenol (Triton X-100), $C_{34}H_{62}O_{11}$, $MM=646,37 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Cloreto de sódio, NaCl, $MM=58,44 \text{ g mol}^{-1}$ (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Hidróxido de sódio, NaOH, $MM=40 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- Nitrato de magnésio, $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, $MM=256,41 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Ácido Bórico, H_3BO_3 , $MM=61,83 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Cloreto de potássio, KCl, $MM=74,55 \text{ g mol}^{-1}$ (Mallinckrodt, Xalostoc, México)
- Ácido clorídrico concentrado, HCl 37 % m/v, $d=1,19 \text{ g mL}^{-1}$, $MM=36,45 \text{ g mol}^{-1}$ (Mallinckrodt, Xalostoc, México)
- Ácido nítrico concentrado, HNO_3 65 % m/v, $d=1,40 \text{ g mL}^{-1}$, $MM=63,01 \text{ g mol}^{-1}$ (Mallinckrodt, Xalostoc, México).
- Peróxido de hidrogênio, H_2O_2 30 % m/v, $d=1,11 \text{ g mL}^{-1}$, $MM=34,01 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Etanol LiChrosolv, C_2H_6O , $MM=46,07 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Solução de Co $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Mallinckrodt, Paris, Kentucky, EUA)

Todas as soluções foram preparadas e armazenadas em frascos de polipropileno previamente descontaminados. Os frascos plásticos, vidrarias e demais utensílios de laboratório foram descontaminados por meio de imersão em HNO_3 10 % v/v por 12 h. Depois, o material foi lavado 3 vezes com água Milli-Q e, em seguida, seco a temperatura ambiente.

As soluções de 5-Br-PADAP, PAN e PAR 0,025 % m/v foram preparadas pela dissolução de 25 mg dos respectivos reagentes em 25 mL de Triton X-100 16 % m/v, sendo o volume completado para 100 mL com água desionizada.

Os tensoativos SDS e SDSA foram empregados na forma sólida.

Soluções de Triton X-100 10 e 16 % m/v foram preparadas, respectivamente, pela dissolução de 10 e 16 g do reagente em água desionizada. Apesar do reagente

pesado porque, apesar de ser líquido, apresenta alta viscosidade, o que dificultava a medida do volume. Após a dissolução, as soluções foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL e o volume foi completado com água desionizada.

Foram preparadas soluções de NaOH nas concentrações de 1; 0,5 e 0,1 mol L⁻¹ pela dissolução de quantidades apropriadas do sal. Soluções de HCl, nas mesmas concentrações, foram preparadas pela diluição do ácido concentrado.

Para o preparo da solução H₃BO₃/NaOH pH 9,0, primeiramente preparou-se 50 mL de uma solução 1 mol L⁻¹ em H₃BO₃ e 1mol L⁻¹ em KCl. Depois, preparou-se 25 mL de uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹. Em um balão volumétrico de 50 mL, colocou-se 25 mL da solução de H₃BO₃/KCl e adicionaram-se 10,4 mL da solução de NaOH. O volume foi, então, completado com água desionizada [76].

Soluções de 10 e 100 mg L⁻¹ Co foram preparadas a partir de uma solução estoque de 1000 mg L⁻¹ Co em HNO₃ 1% v/v. A solução de 10 mg L⁻¹ Co foi utilizada como amostra para a otimização das condições de pré-concentração, e a de 100 mg L⁻¹ Co para a construção da curva analítica de calibração.

Para a curva analítica de calibração (0,5-3,0 mg L⁻¹), utilizada na otimização do processo de pré-concentração, aos volumes adequados a partir da solução estoque de 100 mg L⁻¹ Co, foram adicionados SDS ou SDSA, Triton X-100 e etanol na mesma concentração encontrada nas micelas (50 % v/v). O volume foi completado com HCl 1 mol L⁻¹ ou NaCl 1 mol L⁻¹. As quantidades de SDS e de Triton X-100 foram dependentes do experimento realizado.

O modificador químico Mg(NO₃)₂ 0,15 % m/v foi preparado pela dissolução da quantidade apropriada do sal hexahidratado em água desionizada.

2.3. Amostras

As amostras de medicamento foram adquiridas comercialmente, e apresentavam as seguintes especificações:

- Cobaglobal comprimidos (Legrand, S. Bernardo do Campo, SP, Brasil)
- 1 mg de cobamamida, 4 mg de ciproeptadina
- Forten - Poliaminoácidos (Farmalab, Santana de Parnaíba, SP, Brasil)

- 10 mg de L-fosfotreonina, 40 mg de L-fosfoserina, 60 mg de L-glutamina, 40 mg de L-triptofano, 100 mg de L-arginina, 500 µg de hidroxocobalamina

O medicamento Cobaglobal é fornecido na forma de comprimidos. Para facilitar o processo de mineralização, 10 comprimidos foram retirados da embalagem, pesados e triturados manualmente com o emprego de gral e pistilo. Após esta etapa, o medicamento foi armazenado em frasco de polietileno descontaminado. O medicamento Forten já se encontrava na forma de pó.

2.4. Pré-concentração de cobalto pelo método do ponto nuvem

2.4.1. Otimização do método de pré-concentração com ponto nuvem induzido por ácido.

Alguns estudos foram realizados a fim de propor o uso de tensoativos aniônicos para a pré-concentração de cobalto, pelo método do ponto nuvem.

Inicialmente, foram estudadas as condições necessárias para que ocorresse a separação de fases (sem pré-concentração) e para que se obtivesse, em cada caso, as relações entre o volume de fases. Desta forma, foram variadas as concentrações dos reagentes envolvidos no processo de separação:

- HCl (2 - 4 mol L⁻¹)
- SDS (0 - 2 % m/v)
- Triton X-100 (0 - 0,5 % v/v)

Este estudo foi conduzido em tubos de ensaio, onde o volume final (15 mL) foi sempre o mesmo, e as concentrações dos reagentes em questão foram variadas. Após a adição de todos os reagentes, o tubo foi vedado com Parafilm, a solução foi homogeneizada manualmente e, depois, centrifugada a 3000 rpm (cerca de 1780 g) por 10 min para que ocorresse a separação das fases. Naqueles experimentos onde ocorreu a separação das fases, determinou-se a altura das mesmas para o cálculo do fator de pré-concentração máximo.

Depois de estabelecidas as condições de obtenção do ponto nuvem, estudaram-se as variáveis que influenciam na pré-concentração do cobalto, tais como:

- complexante (PAN, PAR, 5-Br-PADAP)
- concentração dos complexantes (0-0,01 % m/v)
- tensoativos aniônicos (SDS e SDSA),
- concentração dos tensoativos aniônicos (0,5-3,0 % m/v),
- pH de complexação (2-10)
- tempo de complexação (0-4 h),
- tempo de contato entre complexo e tensoativo (0-4 h).

Para os experimentos foram usados tubos de ensaio de 20 mL, nos quais o volume final variou de acordo com os diferentes estudos realizados. Nestes tubos, adicionou-se solução de Co (concentração final de $100 \mu\text{g L}^{-1}$), solução do complexante e de NaOH ou HCl para ajustar o pH. Após o tempo necessário, adicionou-se o tensoativo na forma sólida e, por último, HCl concentrado (concentração final de 4 mol L^{-1}). Os tubos foram vedados com Parafilm, agitados manualmente para homogeneização da solução, e depois submetidos à centrifugação para a completa separação das fases. A relação Fase Rica (FR)/Fase Pobre (FP) foi determinada. Os tubos contendo as duas fases foram colocados em um congelador por aproximadamente 5 min para facilitar a retirada da fase rica. Devido à viscosidade, a fase rica foi diluída (1:1) com uma mistura 9:1 de etanol:HCl e o Co foi determinado por FAAS em ambas as fases. As condições experimentais utilizadas na determinação de Co foram as recomendadas pelo fabricante (comprimento de onda: 242,5 nm; abertura da fenda: 0,2 nm; vazão de acetileno: 2 L min^{-1} , vazão de ar: 10 L min^{-1}).

Como se tratava da otimização das condições de pré-concentração, não foi possível construir a curva de calibração da mesma forma como foram preparadas as amostras sintéticas. Assim sendo, a curva de calibração utilizada variou de 0,5 a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e foi preparada como descrito anteriormente.

Os fatores de pré-concentração reais foram calculados a partir da concentração inicial de cobalto na solução e da concentração obtida na fase rica. As condições ótimas de pré-concentração foram selecionadas com base nestes cálculos.

2.4.2. Otimização do método de pré-concentração com ponto nuvem induzido pela adição de NaCl

Primeiramente foram otimizadas as condições para que a separação das fases ocorresse à temperatura ambiente, sendo estudadas:

- concentração de Triton X-100 (0,1 a 0,45 % m/v)
- concentração de SDS (0,1 a 0,5 % m/v)
- concentração de NaCl (6 a 10 % m/v)

Este estudo foi realizado em tubos de ensaio de 15 mL, nos quais foram variadas as concentrações dos reagentes acima citados. Após a adição de todos os reagentes o tubo foi vedado, a mistura homogeneizada e observado o comportamento da solução. Quando esta solução permanecia límpida, a mesma era aquecida em placa aquecedora, sendo determinada a temperatura de turvação (ponto nuvem). Quando a solução turvava à temperatura ambiente, a mesma era centrifugada à 3000 rpm (~1780 g) por 10 min. Após a separação das fases, a altura das mesmas era determinada para o cálculo do fator de pré-concentração máximo (FCM).

Após a otimização das condições de separação, testaram-se os melhores resultados obtidos (maiores FCM) para a pré-concentração de cobalto. As variáveis que influenciaram a complexação do cobalto foram mantidas, e o fator de pré-concentração real foi avaliado neste estudo. Para isso, em tubos de ensaio, adicionaram-se 12,5 mL de uma solução de Co $100 \mu\text{g L}^{-1}$, 0,2 mL de 5-Br-PADAP 0,025 % m/v, 0,5 mL da solução de $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ pH=9,0 e as quantidades necessárias de Triton X-100, SDS e NaCl. Então, as soluções foram centrifugadas para facilitar a separação das fases. Após a separação, os tubos foram colocados no congelador para facilitar a retirada da fase rica, que foi diluída (1:1) com uma mistura 9:1 v/v de etanol:HCl. O cobalto foi determinado por FAAS nas duas fases.

2.4.3. Determinação das características analíticas dos métodos

Para a determinação das características analíticas (limites de detecção e quantificação, precisão e faixa linear) dos métodos de pré-concentração propostos,

foi construída uma curva analítica de calibração ($25\text{--}400\ \mu\text{g L}^{-1}$), utilizando-se as condições de pré-concentração otimizadas para cada um dos métodos:

- Ponto nuvem induzido por HCl

Em tubos de ensaio de 20 mL foram colocados: 12,5 mL de solução de Co ($25\text{--}400\ \mu\text{g L}^{-1}$), 0,2 mL de 5-Br-PADAP 0,025 % m/v em TX-100 4 % m/v, 0,5 mL da solução de $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ pH=9,0 (esperou-se aproximadamente 20 min para uma efetiva complexação), 0,15 g de SDS e 6,5 mL de HCl concentrado.

- Ponto nuvem induzido por NaCl

Em tubos de ensaio de 20 mL foram colocados: 12,5 mL de solução de Co ($25\text{--}400\ \mu\text{g L}^{-1}$), 0,2 mL de 5-Br-PADAP 0,025 % m/v em TX-100 4 % m/v, 0,5 mL da solução de $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$ pH=9,0 (para que ocorresse uma efetiva complexação, esperou-se aproximadamente 20 min), 245 μL de TX-100 10 % m/v, 270 μL de SDS 10 % m/v e 1,35 g de NaCl.

Em ambos os casos, os tubos foram vedados, a solução foi homogeneizada e centrifugada a 3000 rpm ($\sim 1780\ \text{g}$) por 10 min, sendo depois colocados no congelador para facilitar a retirada da fase rica que ficava mais densa. A fase rica foi retirada, colocada em tubos de polietileno de 5 mL e diluída com etanol: HCl 9:1 v/v até o volume de 2 mL. O cobalto foi determinado nesta solução por FAAS.

Foram realizados também 11 brancos (preparados separadamente), para se calcular os limites de detecção e quantificação, sendo que ao invés de soluções de Co, foram usados volumes iguais de água desionizada.

Os pontos da curva de calibração e os brancos foram obtidos como se fossem as amostras, sendo determinada a absorbância correspondente a cada concentração e esta absorbância foi utilizada para a construção da curva de calibração.

Para se determinar a precisão, 10 amostras enriquecidas com $100\ \mu\text{g L}^{-1}$ de Co foram pré-concentradas empregando-se cada método. A concentração nas mesmas foi determinada pela curva de calibração para cada método.

Foi também realizado um estudo para se verificar a porcentagem de recuperação dos métodos. Para isso, amostras de água de torneira foram enriquecidas com diferentes concentrações de Co (variando de 40 a $185\ \mu\text{g L}^{-1}$), e submetidas aos processos de pré-concentração induzidos por HCl ou por NaCl. A

quantidade extraída de cobalto na fase rica foi determinada, bem como avaliada a eficiência da extração.

2.4.4. Análise de amostras de medicamentos

Para a mineralização, foram pesadas aproximadamente 100,0 mg das amostras de medicamentos em tubos de digestão. Adicionaram-se 5 mL de HNO₃ concentrado. Os tubos foram colocados no bloco digestor e foram aquecidos a 80 °C até a redução dos vapores de NO_x.

Após esta etapa, os tubos foram retirados do bloco digestor e resfriados à temperatura ambiente. Então, adicionaram-se 3 mL de H₂O₂ 30 % m/v às amostras, e os tubos de digestão foram colocados novamente no bloco digestor. Os tubos foram aquecidos a 140 °C até que a solução se tornasse límpida e foram retirados do bloco, sendo em seguida resfriados. As amostras foram filtradas, através de papel de filtro quantitativo e coletadas em balões volumétricos de 50 mL. O volume dos balões foi completado com solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹ para reduzir a acidez e facilitar o ajuste de pH que ocorre na etapa de complexação. O procedimento foi realizado em quadruplicata. Foram realizados também 5 brancos dos reagentes.

O cobalto foi determinado diretamente nas amostras mineralizadas utilizando-se a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS). O comprimento de onda utilizado foi de 242,5 nm e a abertura da fenda de 0,2 nm, ambos parâmetros recomendados pelo fabricante. Nessa técnica, o modificador químico utilizado foi Mg(NO₃)₂ 0,15 % m/v. Foram utilizados 20 µL de amostra e 10 µL de modificador. O programa de aquecimento utilizado é apresentado no quadro 5.

Quadro 5 - Programa de aquecimento utilizado na determinação do cobalto por ETAAS.

Étapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tempo de Permanência (s)
Secagem 1	110	5	30
Secagem 2	130	15	30
Pirólise	1300	10	20
Atomização	2400	0	5
Limpeza	2450	1	3

Para a pré-concentração do cobalto, 12,5 mL da solução das amostras foram transferidos para tubos de ensaio de 20 mL. Depois, seguiu-se o mesmo procedimento realizado para a obtenção da curva de calibração pelo método do ponto nuvem induzido por NaCl.

As etapas de centrifugação, retirada da fase rica e diluição também foram realizadas conforme descrito anteriormente.

A curva de calibração foi feita da mesma forma, tendo variado de 25 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$.

As soluções pré-concentradas foram analisadas por espectrometria de absorção atômica com chama e os resultados obtidos foram comparados estatisticamente com aqueles obtidos por ETAAS. Este procedimento foi realizado para a validação do método, uma vez que amostras certificadas para cobalto não estavam disponíveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Otimização do método de pré-concentração com ponto nuvem induzido por HCl

Para a otimização da separação de fases por ponto nuvem para a pré-concentração de cobalto foram estudadas diferentes variáveis: concentrações de SDS, Triton X-100 e NaCl (que favorecem a separação), concentração e tipo de complexante, concentração e tipo de tensoativo aniônico, pH de complexação, tempo de reação entre metal e complexante, tempo de contato entre tensoativo e complexo. A figura 20 mostra uma seqüência de fotos obtida durante a pré-concentração de Co por ponto nuvem induzido pela adição de HCl.

Deve-se ressaltar que para avaliar a eficiência da pré-concentração para o Co durante a otimização do método, utilizou-se o fator de pré-concentração real (FCR) que é a razão entre a concentração obtida do metal na fase rica (mg L^{-1}) e a concentração inicial do metal na solução homogênea (mg L^{-1}). A concentração do metal na fase rica nos estudos de otimização foi obtida por meio de uma curva de

calibração em meio aquoso com a adição dos tensoativos, do HCl e do etanol (descrita no item 2.2) Isto foi feito no intuito de evitar/minimizar efeitos de matriz indesejáveis, bem como problemas com a nebulização/atomização. No entanto, devido à presença do etanol, a micela não era formada, não ocorrendo a pré-concentração.

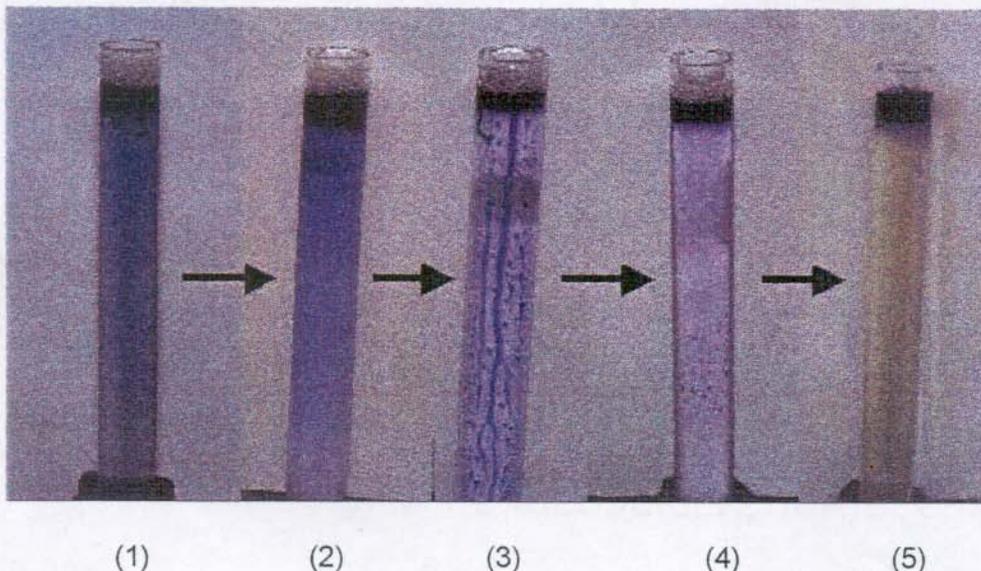


Figura 20 - Sequência de fotos obtidas durante a pré-concentração de Co com ponto nuvem induzido por HCl (tempo total \approx 5 min). O tubo 1 apresenta a solução resultante logo após a adição do HCl. Nos tubos 2, 3 e 4 segue-se o processo de separação das fases e o tubo 5 apresenta as duas fases após a etapa de centrifugação, sendo verificada uma fase aquosa amarelada, devido ao excesso de complexante que não foi extraído.

3.1.1. Efeito das concentrações de HCl, SDS e Triton X-100

Para este estudo, como não foi realizada a pré-concentração do cobalto, foi considerado apenas o fator de pré-concentração máximo. Este fator é calculado através da fórmula:

$$FCM = h_{FP}/h_{FR}$$

onde:

FCM - fator de pré-concentração máximo

h_{FP} - altura da fase pobre em tensoativo (cm)

h_{FR} - altura da fase rica em tensoativo (cm)

Este fator representa a relação entre as duas fases formadas durante o processo de separação e, por isso, é o fator máximo de pré-concentração que pode ser obtido. Os resultados obtidos neste estudo são mostrados na tabela 18.

Tabela 18 - Fatores de pré-concentração máximos obtidos na otimização do processo de separação das fases

SDS (% m/v)	HCl 2 mol L ⁻¹			
	Triton X-100 (% m/v)			
	0,0	0,1	0,25	0,5
0,0	NF*	NF	NF	NF
0,5	NF	NF	16,6	14,1
1,0	NF	NF	9,6	6,0
2,0	NF	NF	NF	NF
HCl 3 mol L ⁻¹				
0,0	NF	NF	NF	NF
0,5	NF	20,8	NF	16,5
1,0	NF	NF	14,0	10,9
2,0	NF	NF	NF	6,0
HCl 4 mol L ⁻¹				
0,0	NF	NF	NF	NF
0,5	NF	41,6	34,7	NS**
1,0	NF	32,3	26,0	22,4
2,0	NF	13,0	11,0	7,2

* Não houve formação do ponto nuvem

** Houve formação de gotículas de fase rica, mas não ocorreu a separação

Quanto maior a concentração de HCl, mais favorável é a separação das fases, indicando que o ácido aumenta a hidrofobicidade dos tensoativos [44]. A adição de um contra-íon diminui a repulsão entre as micelas, favorecendo assim a separação de fases [21].

Quando se utiliza o SDS sem a adição do Triton X-100, não ocorre imediatamente a separação de fases para nenhuma das concentrações de HCl testadas. Para a concentração de HCl 4 mol L⁻¹ foi observada a separação das fases

após 12 h de repouso. Para as concentrações de 2 e 3 mol L⁻¹, em até 48 h de observação, o processo de separação não ocorreu. Por outro lado, quando foi utilizado somente Triton X-100, não ocorreu a separação de fases no tempo máximo observado (48 h), mesmo quando altas concentrações de HCl foram testadas.

Casero *et al.* [44] realizaram um estudo semelhante para verificar a separação de fases somente para os tensoativos aniônicos SDS e SDSA (sem adição de tensoativos não-iônicos) e obtiveram resultados concordantes. Entretanto, no estudo realizado por eles, eram requeridos tempos de aproximadamente 24 h para a separação das fases com o uso do SDS. Para o SDSA a turvação da solução começava a ocorrer com HCl 2,5 mol L⁻¹ e com concentrações acima de 3 mol L⁻¹ a separação era efetiva.

Para concentrações de HCl menores que 4 mol L⁻¹ foi verificada uma relação de interdependência entre as concentrações de SDS e de Triton X-100. Quanto maior a concentração de SDS, maior a concentração de TX-100 necessária para que ocorra o fenômeno ponto nuvem. De acordo com Gandhi *et al.* [37] a presença de algumas moléculas de Triton X-100 na composição da micela minimiza as forças de repulsão, estabilizando-as e facilitando o processo de separação [37].

Com relação aos fatores de pré-concentração máximos, foi constatado que quanto maior a concentração dos tensoativos (SDS e Triton X-100), menor o fator de pré-concentração obtido. Isto ocorre porque o volume de fase rica formada é uma função da concentração dos tensoativos.

Outro fato a ser comentado é que, para as concentrações de HCl de 2 e 3 mol L⁻¹, quando a concentração de SDS era maior que a de Triton X-100, o ponto nuvem se formava na parte superior do tubo. Quando o contrário ocorria, o mesmo se formava na parte inferior. Isto pode ser explicado pela diferença de densidades. O SDS possui uma cadeia bem menor do que o Triton X-100, o que pode ser verificado pela estrutura dos tensoativos (quadro 4). Quando o SDS foi o tensoativo predominante na micela mista, a fase rica apresentava uma densidade menor do que da água, e o ponto nuvem, por sua vez, se formava acima da fase aquosa. Nos casos onde o Triton X-100 predominava, a densidade foi maior do que a da água, e a fase rica foi obtida na parte inferior do tubo.

Para os próximos experimentos a concentração de HCl será fixada em 4 mol L⁻¹ e a de triton X-100 em 0,1 % m/v.

3.1.2. Efeito do complexante e da concentração do complexante

Os complexantes estudados foram PAN, PAR e 5-Br-PADAP e a concentração dos mesmos foi variada de 0 a 0,01 % m/v. Os resultados obtidos neste estudo podem ser observados pela figura 21.

A relação metal:ligante é de 1:2 para todos os 3 complexantes estudados [77].

Sem o uso de complexantes não ocorre a extração e a pré-concentração do cobalto (FCR \approx 1,0). O metal não possui a capacidade de se ligar ao tensoativo, sendo que a ligação é feita por meio do complexante (ligante hidrofóbico). O metal se liga ao complexante e o complexo, por sua vez, se liga ao tensoativo, por meio de interações hidrofóbicas e eletrostáticas [28]. Desta forma a pré-concentração depende de vários fatores, tais como: constantes de formação do complexo, estabilidade do complexo formado, hidrofobicidade do complexante e afinidade do complexo com o tensoativo [62]. Pela figura 21, pode-se observar que para concentrações menores que $2,5 \times 10^{-3}$ % (m/v), foram obtidos fatores de pré-concentração reais (FCRs) próximos para os 3 complexantes estudados. Quando a concentração dos mesmos é reduzida, o 5-Br-PADAP apresentou um melhor desempenho e os FCRs obtidos com este complexante foram bem maiores (aproximadamente o dobro). O 5-Br-PADAP é um reagente que apresenta boa sensibilidade na determinação de baixíssimas concentrações de elementos de transição [78].

Satake *et al.* [79] e Pancras *et al.* [80] utilizaram 5-Br-PADAP para a complexação do cobalto e discutiram em seus trabalhos que o complexante em questão é bastante seletivo para Co. Além disso, uma vez formado o complexo catiônico do cobalto, este não se decompõe mesmo em meio fortemente ácido, pois é altamente estável.

O 5-Br-PADAP apresenta uma sensibilidade alta para o Co ($\vartheta=0,00067\mu\text{g cm}^{-2}$). Como a estrutura destes quelatos deve ser análoga àquelas formadas com PAR e PAN, a maior sensibilidade é atribuída a presença do grupo $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ [77].

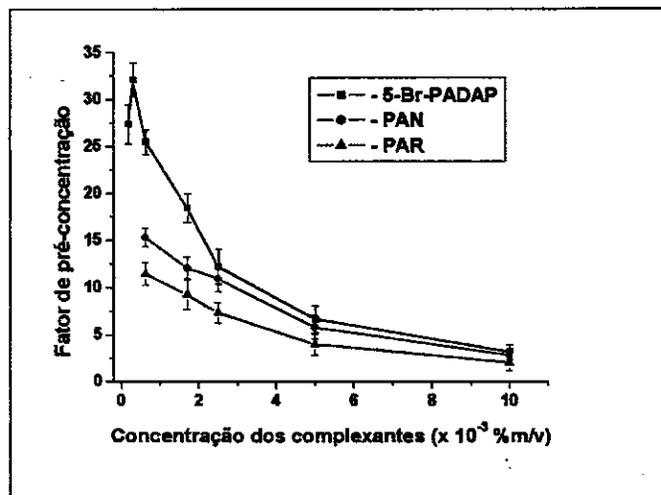


Figura 21 – Resultados obtidos na pré-concentração de Co, variando a concentração dos complexantes. Concentrações fixas: 0,1 % m/v TX-100, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Co e 4 mol L^{-1} HCl (n=4).

Existe uma relação inversamente proporcional entre a concentração do complexante e o FCR. Isto ocorre porque quando a concentração de complexante é alta, moléculas deste que não se ligaram ao metal, estarão interagindo com o tensoativo, e competindo com as moléculas do complexo formado. Compostos que apresentam longas cadeias são menos solúveis nas soluções aquosas de tensoativos. Isto impõe um limite na quantidade de ligante disponível em excesso em tais sistemas [21].

Desta forma, o complexante 5-Br-PADAP $3,5 \times 10^{-4}$ % (m/v) foi fixado para os outros experimentos.

3.1.3. Efeito do tensoativo e da concentração do tensoativo

As micelas mistas formadas a partir do aumento da acidez do meio e que possibilitaram melhores fatores de pré-concentração máximos, são predominantemente formadas pelo tensoativo aniônico. Devido a isso, foi realizado um outro estudo para se avaliar a eficiência do SDS e do SDSA na pré-concentração do cobalto, bem como a concentração dos mesmos.

Os resultados obtidos neste estudo podem ser verificados pela figura 22.

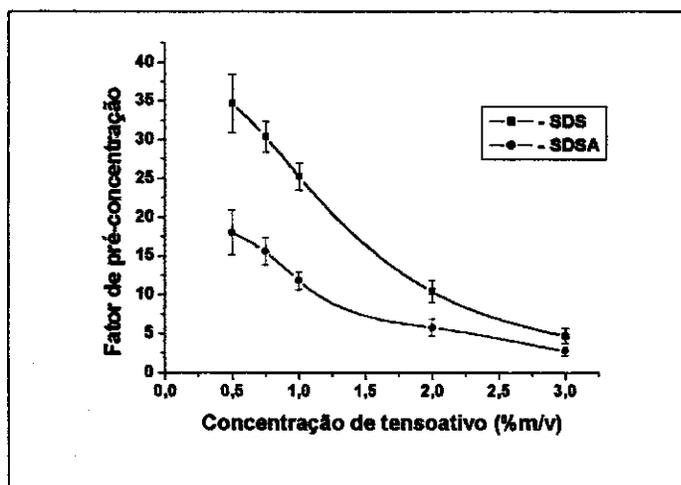


Figura 22 – Resultados obtidos na pré-concentração de Co, variando a concentração dos tensoativos. Concentrações fixas: 0,1 % m/v TX-100, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Co e 4 mol L^{-1} HCl (n=4).

O volume da fase rica e, conseqüentemente o fator de pré-concentração, depende da natureza do tensoativo ou da mistura usada, e da quantidade total de tensoativos adicionada [21].

Como pode ser observado na figura 22, o tensoativo SDS possibilitou melhores resultados de pré-concentração do Co em relação ao SDSA.

Quanto maior a concentração de SDS e SDSA, menor foi o fator de pré-concentração obtido. Isto se deve ao fato de ser obtido um maior volume da fase rica e, conseqüentemente, o metal complexado ficar distribuído em um volume maior de micela, sendo assim menos concentrado [28]. Embora a concentração de 0,5 % (m/v) de tensoativo tenha resultado em melhores fatores de pré-concentração, o pequeno tamanho de micela obtido dificultava a retirada da mesma dos tubos, o que causou desvios mais altos nas medidas. Assim, a concentração do SDS foi fixada em 0,75 % (m/v).

3.1.4. Efeito do pH de complexação

Como já discutido anteriormente, o metal na forma iônica não possui a capacidade de se ligar ao tensoativo, sendo que as interações que ocorrem entre o analito e a micela são hidrofóbicas. Para que ocorra a complexação é necessário se realizar um ajuste de pH, de forma a favorecer a formação do complexo de interesse,

e tentar minimizar a formação de complexos de outros metais que possam interferir. Um valor de pH maior aumenta a desprotonação do 5-Br-PADAP, aumentando assim, sua capacidade de complexação [81]. Os resultados obtidos no estudo do pH de complexação são mostrados na figura 23.

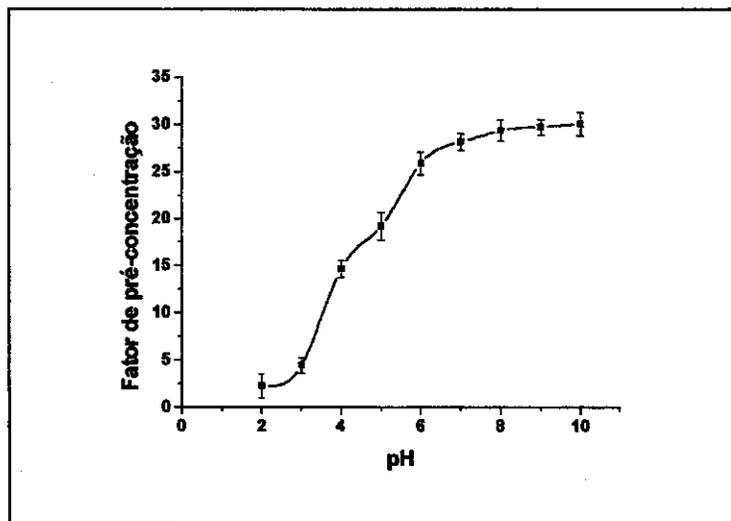


Figura 23 - Efeito do pH de complexação na pré-concentração de Co empregando ponto nuvem induzido por ácido (n=3).

De acordo com Vitouchová *et al.* [78] o complexo formado por 5-Br-PADAP e Co apresenta uma cor estável na faixa de pH de 4,0 a 10,0. Outros autores [81,82] afirmam que a estabilidade deste complexo é maior em valores de pH próximos a 9,0. Pelos resultados obtidos neste estudo, verificou-se que para baixos valores de pH, os fatores de pré-concentração são menores. À medida que se aumenta o pH são obtidos maiores FCRs, sendo que acima de pH 7,0 não se obtiveram ganhos significativos na pré-concentração do cobalto.

A eficiência da pré-concentração pode ser afetada pelo pH também pelo fato de que a diferentes valores de pH, diferentes formas do complexo são obtidas (dependendo da acidez, o 5-Br-PADAP pode existir em 4 formas distintas) [77]. O fato da molécula do complexo apresentar carga negativa ou positiva, ou ainda a forma neutra, pode modificar o sítio de ligação na micela e assim afetar a pré-concentração.

Desta forma, optou-se por tamponar a solução em pH 9,0, a fim de garantir uma boa eficiência de pré-concentração.

Deve-se ressaltar que mesmo após a adição do HCl o complexo era mantido, já que era visualizada a cor do complexo na fase rica, bem como o cobalto não era detectado na fase aquosa. Como o complexo interage com a parte hidrofóbica da micela [8,11], provavelmente o ácido não foi capaz de interagir e protonar o complexante, o que evitaria que o complexo formado fosse destruído.

3.1.5. Efeito dos tempos de complexação e de contato entre complexo e tensoativo.

Estudou-se o efeito do tempo de complexação (tempo decorrido entre as adições do complexante e a do tensoativo) e do tempo de contato entre o complexo e o tensoativo (antes da adição do HCl) na eficiência de pré-concentração. Os fatores de pré-concentração foram calculados, e os resultados são apresentados na figura 24.

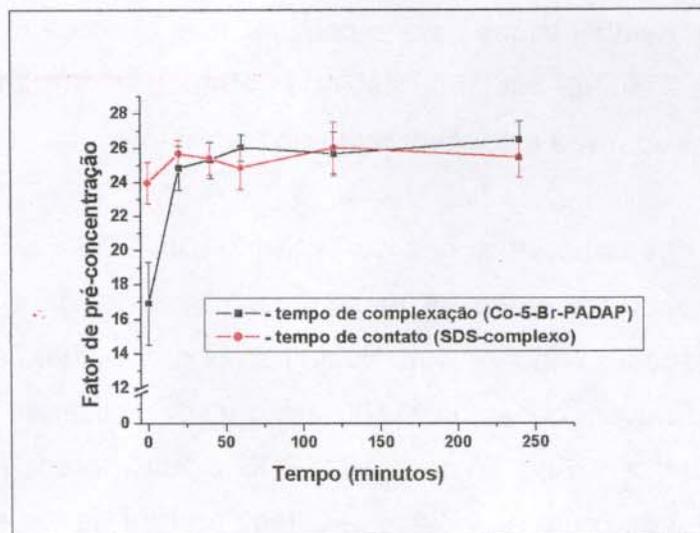


Figura 24 – Fatores de pré-concentração obtidos para Co variando-se os tempos de complexação e de contato entre o complexo e o tensoativo (n=3).

Quando o tempo de complexação é praticamente igual a zero, o FCR é menor e os desvios obtidos foram altos porque não houve tempo suficiente para a formação

do complexo Co-5-Br-PADAP. Desta forma, nem todo o cobalto está complexado quando o tensoativo é adicionado. Já para tempos iguais ou maiores que 20 min observa-se um aumento significativo nos FCR. Poderiam inclusive ser testados tempos menores, mas como esse era aproximadamente o tempo gasto para se preparar uma batelada de 3 amostras, enquanto se esperava os 20 min, outras três amostras eram preparadas.

O tempo de contato entre complexo e tensoativo não mostrou efeito significativo nos fatores de pré-concentração, o que indica que a formação das micelas e a interação das moléculas do complexo com as mesmas é praticamente instantânea.

Desta forma, para fins de implementação do método, o tempo de complexação foi fixado em 20 min, e não foi necessário nenhum tempo de espera entre a adição do tensoativo e do ácido.

3.2. Otimização do método de pré-concentração de Co com ponto nuvem induzido pela adição de NaCl

As condições estabelecidas para a complexação do cobalto foram mantidas, sendo otimizados somente os fatores que afetam a separação de fases: concentração dos tensoativos e concentração do eletrólito.

3.2.1. Efeito das concentrações de Triton X-100, SDS e NaCl

A literatura reporta o efeito de tensoativos iônicos e de eletrólitos sobre o ponto nuvem de tensoativos não-iônicos. Neste trabalho foi estudado o efeito do SDS e do NaCl no ponto nuvem do Triton X-100. Para isso, realizaram-se experimentos nos quais as concentrações de Triton X-100, SDS e NaCl foram variadas. Quando necessário, as misturas foram aquecidas, e a temperatura de turvação da solução, ou seja, o ponto nuvem era determinado. As temperaturas foram variadas desde 28 até 100 °C. Os resultados obtidos neste estudo são apresentados na figura 25.

Quando o ponto nuvem era menor que a temperatura ambiente a mistura era centrifugada diretamente, e a relação entre fases pobre e rica era determinada para o cálculo do fator de pré-concentração máximo.

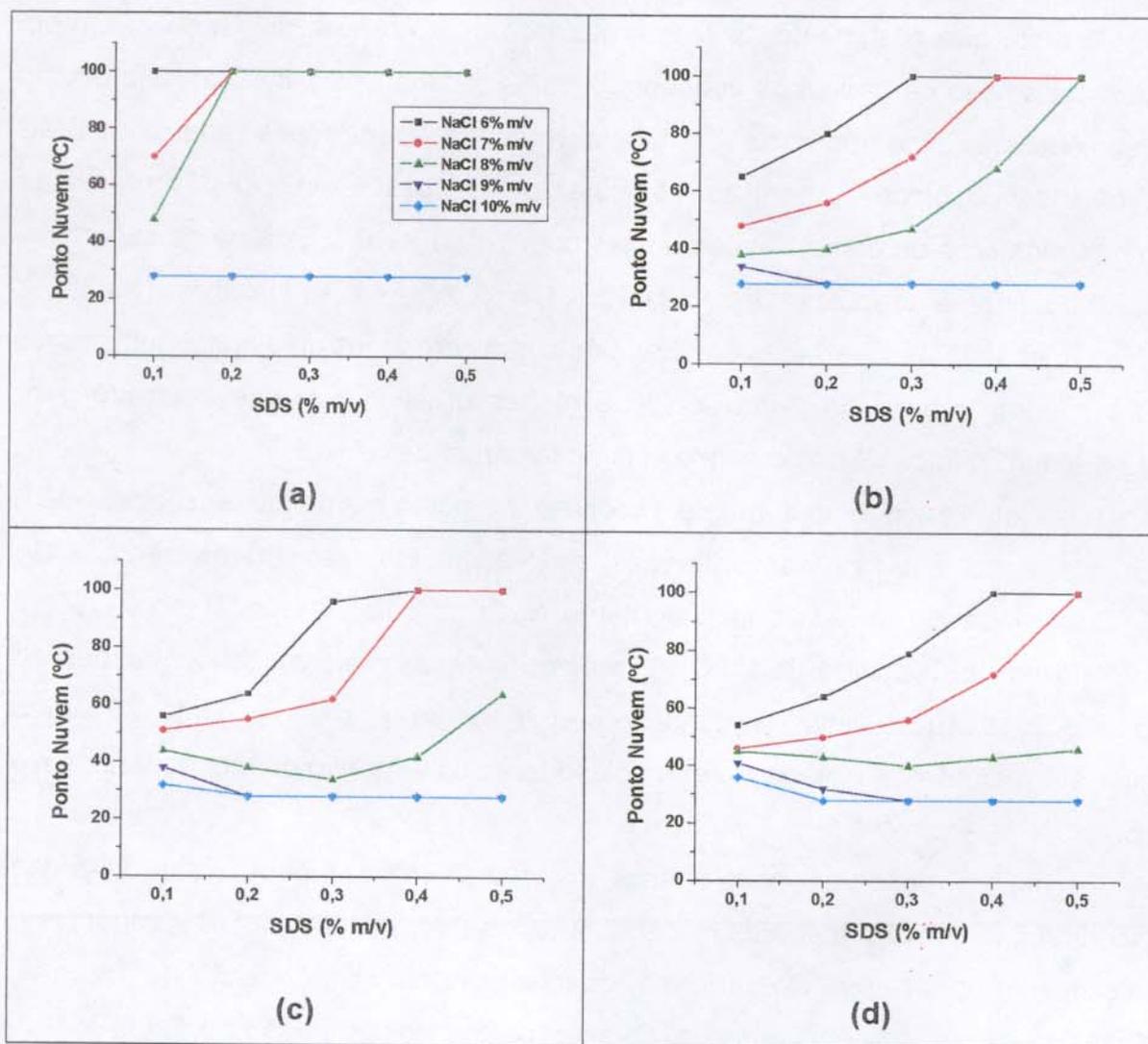


Figura 25 - Efeito do NaCl e do SDS no ponto nuvem de soluções com diferentes concentrações de Triton X-100: a) 0,1, b) 0,25, c) 0,35 e d) 0,45 % m/v.

A separação de fases observada como um ponto nuvem é acompanhada por um rápido aumento no tamanho micelar devido a elevação da temperatura ou a agregação de micelas relativamente pequenas. A determinação do ponto nuvem é útil na avaliação do efeito de eletrólitos sobre tensoativos não-iônicos.

O ponto nuvem das soluções de Triton X-100 sem adição de SDS e de NaCl foi determinado como 73 °C. Quando se adicionou SDS ao sistema (de 0,1 a 0,5 % m/v), sem a adição de NaCl, o ponto nuvem de todas as misturas TX-100/SDS ficou acima de 98 °C. Os tensoativos iônicos (catiônicos ou aniônicos) aumentam o ponto nuvem das soluções de tensoativos não-iônicos. Valaulikar e Manohar [33]

consideraram que o aumento na temperatura de ponto nuvem do Triton X-100 em função da adição de pequenas concentrações de tensoativos aniônicos seja devido ao aumento na carga superficial da micela. Nestas concentrações (abaixo da CMC do tensoativo iônico usado) as moléculas do tensoativo iônico estão presentes como monômeros ou como micelas mistas com Triton X-100. Esta carga superficial adicional aumenta a repulsão entre as micelas, e as torna mais hidrofílicas [33-35].

Gu *et al.* [34] relataram que o efeito de alguns brometos de alquiltrimetilamônio sobre o ponto nuvem do Triton X-100 é menos drástico que o encontrado para alguns alquil sulfatos de sódio com o mesmo tamanho de cadeia.

Os eletrólitos podem aumentar ou diminuir o ponto nuvem de tensoativos não-iônicos, sendo que as concentrações dos eletrólitos são normalmente altas [27,83,84]. Quando foi adicionado somente NaCl às soluções de Triton X-100, o ponto nuvem foi reduzido para 56 °C, mesmo para as maiores concentrações do eletrólito (9 e 10 % m/v). Isto indica que, para se abaixar o ponto nuvem à temperatura ambiente, é necessário a adição tanto do eletrólito quanto do tensoativo aniônico.

Como se observa pelas figuras 25(a) a 25(d), quando foram utilizadas concentrações de NaCl menores que 9 % m/v, observou-se que o SDS aumentava o ponto nuvem do sistema. Desta forma, quanto menor a concentração de Triton X-100, mais pronunciado é esse efeito. Quanto maior a concentração de Triton X-100, maior a quantidade de SDS necessária para aumentar o ponto nuvem do tensoativo não-iônico.

Outro fato a ser destacado é que a adição de altas concentrações de NaCl ao sistema, contendo Triton X-100 e SDS, diminui drasticamente o ponto nuvem, sendo que a separação pode ocorrer à temperatura ambiente. Para as concentrações de 9 e 10 % m/v de NaCl, o SDS parece produzir um efeito sinérgico no abaixamento do ponto nuvem, pois o aumento da concentração deste tensoativo, reduz o ponto nuvem.

Marszall [35] investigou o efeito de eletrólitos sobre o ponto nuvem de soluções de tensoativos iônicos e não-iônicos. Quando tensoativos iônicos são adicionados às soluções de Triton X-100 livres de eletrólitos, foi obtido um aumento

na temperatura do ponto nuvem. Entretanto, quando pequenas quantidades de eletrólitos (NaCl ou NaSCN) foram adicionadas à solução de Triton X-100 na presença de baixíssimas concentrações de SDS (1 molécula de SDS por micela de TX-100) a temperatura do ponto nuvem diminuiu numa taxa que dependeu da concentração do eletrólito e a natureza do contra-íon. O autor sugere que este efeito seja devido à mudança do contra-íon ligado as micelas mistas iônicas/não-iônicas.

Quando micelas mistas são formadas por tensoativos aniônicos e não-iônicos, estas ficam carregadas negativamente, sendo a valência do cátion adicionado um fator decisivo na modificação do ponto nuvem. O efeito dos eletrólitos sobre o ponto nuvem de tensoativos não-iônicos tem sido explicado em termos dos chamados efeitos de *salting-in* e *salting-out* [27,83,84].

Para as misturas que apresentaram o ponto nuvem abaixo da temperatura ambiente, determinou-se a relação entre as fases e calculou-se o fator de pré-concentração máximo, como relatado anteriormente. Os valores obtidos para esse parâmetro são apresentados na tabela 19.

Tabela 19 - Fatores de pré-concentração máximos obtidos no estudo do efeito do SDS e do NaCl no ponto nuvem do Triton X-100.

		Triton X-100 0,1 % m/v				
		SDS (% m/v)				
NaCl (% m/v)		0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
9		24,8	22,3	19,7	16,2	13,8
10		34,2	27,5	23,4	20,8	18,7
		Triton X-100 0,25 % m/v				
9		NF*	17,7	11,4	8,6	5,0
10		33,4	25,5	20,3	13,4	9,71
		Triton X-100 0,35 % m/v				
9		NF	16,8	9,4	7,4	6,4
10		NF	17	13,8	11,4	9,9
		Triton X-100 0,45 % m/v				
9		NF	NF	8,3	7,2	8,1
10		NF	13,6	11,8	11,4	9,8

* Não houve formação do ponto nuvem

É importante salientar que a fase rica obtida neste sistema se forma na parte inferior do tubo, o que reafirma o fato destas micelas serem formadas predominantemente pelo tensoativo não-iônico.

O aumento na concentração de NaCl melhorou os fatores de pré-concentração máximos obtidos. Isto ocorre porque quanto maior a concentração de eletrólito, menor a força de repulsão entre as micelas e, conseqüentemente, menor o volume da fase rica. Como já discutido anteriormente, como o FCM é calculado por meio da relação entre os volumes da fase aquosa e da fase rica, quanto menor o volume da fase rica, maior o FCM. Pode ser verificado também que existe a mesma relação inversamente proporcional entre a concentração dos tensoativos e o FCM, como observado no sistema anterior.

Nas melhores condições obtidas para este estudo, foi realizada a pré-concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobalto e os fatores de pré-concentração reais obtidos são apresentados na tabela 20.

Tabela 20 - Fatores de pré-concentração obtidos para o cobalto por meio de separação por ponto nuvem induzido por NaCl*.

SDS (% m/v)	Triton X-100 (% m/v)		
	0,1	0,25	0,35
0,1	23,8	27,9	22,4
0,2	18,9	19,3	17,6
0,3	16,2	14,1	11,8

* Concentração de NaCl fixa em 10 % m/v

Apesar de menores concentrações de tensoativos propiciarem um maior FCM, o mesmo não ocorreu com a pré-concentração do cobalto, sendo que com a concentração de 0,25 % m/v de Triton X-100 obteve-se resultados um pouco melhores. Isto pode ocorrer devido a problemas na separação das fases, pois parte da solução aquosa pode ter sido retirada juntamente com o pequeno volume da fase rica, diluindo a mesma. As condições que conduziram ao melhor fator de pré-concentração real foram fixadas para o método: NaCl 10 % (m/v), TX-100 0,25 % (m/v) e SDS 0,1 % (m/v).

3.3. Características analíticas

Nas condições otimizadas, foram determinadas as características analíticas dos dois métodos. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 21.

O limite de detecção foi calculado como 3 vezes o desvio padrão obtido em 11 determinações do branco, dividido pela inclinação da curva de calibração. O limite de quantificação foi calculado como 10 vezes o desvio padrão obtido em 11 determinações do branco, dividido pela inclinação da curva de calibração [85]. A precisão, em nível de repetibilidade do método e expressa como desvio padrão relativo, foi checada com 10 amostras enriquecidas com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobalto. O fator de pré-concentração é dado pela razão entre as concentrações de cobalto antes e após a etapa de pré-concentração que produzem a mesma resposta analítica (absorbância). O coeficiente de extração é a razão entre a quantidade de cobalto na fase rica e aquela contida na solução original. Por fim, a relação entre os volumes das fases é dada pela razão entre o volume da fase rica e o da fase aquosa [19,50,51].

Tabela 21 - Características analíticas dos métodos desenvolvidos para a pré-concentração de cobalto com emprego do ponto nuvem.

	Método do HCl	Método do NaCl
Equação da reta	$y = 0,0012x - 0,0041$	$y = 0,0008x + 0,003$
r	0,9996	0,9994
Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	25-200	25-200
Limite de Detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,06	1,58
Limite de Quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3,53	5,27
Precisão (DPR)	5,41 %	3,16 %
Fator de pré-concentração	28,5	21,7
Coeficiente de extração	~ 1	~ 1
Relação entre o volume das fases	0,03	0,035

Em termos das características analíticas, o desempenho dos dois métodos propostos foi satisfatório. Os dois métodos propostos foram lineares na mesma faixa de concentração ($25-200 \mu\text{g L}^{-1}$). Os limites de detecção e quantificação foram um pouco melhores para o método do HCl.

A precisão foi satisfatória para ambos os métodos, muito embora tenha sido um pouco pior para o método do HCl. Este resultado pode ser justificado pela maior dificuldade na retirada da fase rica, que era formada na parte superior do tubo.

O fator de pré-concentração foi maior no método do HCl, o que é refletido também pela menor relação obtida entre as fases rica e aquosa por este método. Quanto menor a relação, maior o fator de pré-concentração. O coeficiente de extração foi de aproximadamente 1 para os dois métodos, pois praticamente todo o cobalto presente na solução original foi extraído para a fase rica.

Foi também realizado um estudo de recuperação para os métodos de pré-concentração propostos. A tabela 22 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 22 – Porcentagens de recuperação obtidas na pré-concentração de Co pelos métodos do ponto nuvem induzidos por HCl e NaCl.

[Co] _{adic.} (µg L ⁻¹)	Método do HCl		Método do NaCl	
	[Co] _{rec.} (µg L ⁻¹)	% recuperação	[Co] _{rec.} (µg L ⁻¹)	% recuperação
40	18,6	46,5	40,7	101,8
65	32,9	50,6	66,4	102,2
90	53,3	59,2	90,8	100,9
115	75,4	65,7	114,2	99,3
140	99,1	70,8	138,5	98,9
185	147,2	79,6	185,9	100,5

Apesar das características analíticas dos dois métodos propostos terem sido semelhantes, os resultados obtidos nos estudos de recuperação indicam que o método do HCl é afetado pela presença de interferentes. Como comentado anteriormente, este estudo foi realizado com amostras de água de torneira. Provavelmente a alta concentração de outros cátions, tais como Cu²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺ e Zn²⁺ podem interferir na complexação do cobalto e diminuir a estabilidade dos complexos formados. Devido a essa menor estabilidade, ao se aumentar a acidez para que ocorra a separação das fases, o complexo é destruído e a pré-concentração é afetada. Devido a isso, observou-se que quanto maior a concentração de cobalto adicionada, maior a porcentagem de recuperação, pois a

relação entre as concentrações do Co e dos outros metais é reduzida, reduzindo-se também a interferência.

No método em que a separação de fases foi induzida por NaCl, não houve alteração significativa do pH do meio, sendo que as recuperações obtidas foram próximas a 100 %.

3.4. Análise de amostras de medicamentos

Esta parte do trabalho foi realizada para avaliar a aplicabilidade do método de pré-concentração.

Devido aos problemas de recuperação obtidos no método do ponto nuvem induzido por HCl, apenas o método do NaCl foi utilizado para pré-concentrar cobalto a partir das amostras de medicamento.

A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica foi utilizada como técnica de comparação, devido a sua maior sensibilidade em relação à chama, sendo a primeira, capaz de quantificar cobalto na mesma faixa de concentrações obtida por chama após a pré-concentração.

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 23.

Tabela 23 - Resultados obtidos na determinação de cobalto após a pré-concentração por ponto nuvem induzido por NaCl e quantificação por FAAS e na quantificação direta por ETAAS (n = 4).

Amostra	Ponto Nuvem (FAAS) ($\mu\text{g g}^{-1}$)	ETAAS ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Fabricante ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Cobaglobal	$198,60 \pm 11,39^a$	$183,08 \pm 9,76^a$	217,16
Forten	$85,74 \pm 8,02^b$	$83,18 \pm 3,52^b$	123,18

a e b - Valores iguais estatisticamente em nível de 95 % de probabilidade pelo teste *t*.

Não houve diferenças significativas em nível de 95 % de probabilidade entre as concentrações de cobalto obtidas pelos métodos avaliados (FAAS com pré-concentração por ponto nuvem e ETAAS) nos dois medicamentos analisados. Isto indica a eficiência da técnica de ponto nuvem induzido por NaCl na pré-concentração do cobalto.

Com relação aos valores fornecidos pelo fabricante, a concentração obtida nas análises realizadas foi menor. Este fato pode ser devido tanto a problemas na mineralização das amostras, quanto a problemas na produção dos medicamentos, por falta de um controle de qualidade eficaz. Por outro lado, essa diferença observada pode não ser significativa na linha de produção das indústrias farmacêuticas, estando dentro da margem de erro aceitável.

4. CONCLUSÕES PARCIAIS

Métodos de separação/pré-concentração que utilizam tensoativos são de grande interesse, pois são uma alternativa às metodologias tradicionais empregando resina trocadora, extração líquido-líquido, entre outros. Essa substituição vem de encontro aos objetivos, ora impostos à química, de minimizar a produção de resíduos tóxicos e perigosos, além de seu custo ser bastante reduzido se comparado ao dos solventes orgânicos.

O ponto nuvem vem sendo intensamente utilizado em processos de separação envolvendo tanto espécies orgânicas como metálicas. Neste trabalho, dois diferentes métodos são propostos para a pré-concentração de metais. Os estudos realizados para se observar o fenômeno do ponto nuvem, mostram como o sistema em questão é flexível e pode ser manipulado de acordo com os objetivos de cada trabalho. Variando-se a concentração dos aditivos, obteve-se uma redução significativa no ponto nuvem, de forma a não ser necessário o controle de temperatura.

Os dois métodos propostos apresentaram resultados satisfatórios no que diz respeito à melhora na sensibilidade e, por conseqüência, no desempenho da espectrometria de absorção atômica com chama. O método no qual a separação de fases é induzida pela elevação da acidez do meio, foi mais susceptível a interferências, não podendo ser aplicado para matrizes complexas. Apesar do método ser extremamente interessante, sua utilização parece ser mais viável para compostos orgânicos, os quais não dependem de etapas de complexação para

serem extraídos por micelas, ou quando se trabalhar com complexantes mais seletivos que sejam capazes de complexar um único metal ou um grupo mais restrito de metais.

O método que envolve a separação de fases induzida pela adição de NaCl apresentou ótimos resultados para amostras de medicamentos, sendo os resultados concordantes com aqueles obtidos com o uso de uma técnica de quantificação mais sensível (ETAAS).

O método proposto é prático e rápido, podendo ser realizado em batelada, sem exigir equipamentos e vidrarias mais sofisticados, longos tempos de extração e agitação vigorosa. O fato da separação de fases ocorrer em temperatura ambiente, agiliza ainda mais o processo, pois não são requeridos longos tempos de aquecimento. O método pode ser aplicado a outros elementos metálicos, bastando, para isso, o estudo das condições de complexação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - C.C. West, J.H. Harwell, *Environ. Sci. Technol.* **26** (1992) 2324.
- 2 - E. Pellizzetti, E. Pramauro, *Anal. Chim. Acta* **169** (1985) 1.
- 3 - M. J. Rosen, **Surfactants and Interfacial Phenomena**, Wiley Interscience, New York, 1987.
- 4 - N. Mariasso, *Quim. Nova* **24** (2001) 87.
- 5 - G.L. McIntire, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **21** (1990) 257.
- 6 - M.J. Schick (Ed.) **Non-ionic Surfactants**, Marcel Dekker, New York, 1987
- 7 - K.L. Mittal (Ed.) **Solution Chemistry of Surfactants**, Plenum Press, New York, 1979.
- 8 - K.L. Mittal (Ed.) **Micellization, Solubilization and Microemulsions**, Plenum Press, New York, 1977.
- 9 - D.E. Guveli, S.S. Davis, J.B. Kayes, *J. Coll. Interf. Sci.* **86** (1982) 213.
- 10 - B. Lindman, H. Wennerstrom, H.F. Eicke, **Micelles in Topics in Current Chemistry**, nº 87, Springer-Verag, New York, 1980.
- 11 - L.J. Cline-Love, J.G. Habarta, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* **56** (1984) 1132A.
- 12 - M.E. Diaz-Garcia, A. Sanz-Medel, *Talanta* **33** (1986) 255.
- 13 - C.A. Evans, J.R. Boltom, *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 4502.
- 14 - C. Mousty, P. Pouillen, A.M. Martre, G. Mousset, *J. Colloid Interface Sci.* **113** (1986) 521.
- 15 - T.H. Walter, E.E. Bancroft, G.L. McIntire, E.R. Davis, L.M. Gierasch, H.N. Blount, H.J. Stronks, E.G. Janzen, *Can. J. Chem.* **60** (1982) 1621.
- 16 - K. Shinoda, T. Nakagawa, B. Tamamushi, T. Isemura, **Colloidal Surfactants: Some Physico-Chemical Properties**, Academic Press, New York, 1963.
- 17 - K.L. Mittal, E.J. Fendler (Eds.) **Solution Behavior of Surfactants**, Plenum Press, New York, 1982.
- 18 - M.J. Eddowes, M. Gratzel, *J. Electroanal. Chem.* **163** (1984) 31.
- 19 - D.L. Giokas, E.K. Paleologos, S.M. Tzouwara-Karayanni, M.I. Karayannis, *J. Anal. At. Spectrom.* **16** (2001) 521.

- 20 - M.C.C. Oliveros, O.J. de Blas, J.L.P. Pavón, B.M. Cordero, *J. Anal. At. Spectrom.* **13** (1998) 547.
- 21 - W.L. Hinze, E. Pramauro, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **24** (1993) 133.
- 22 - H. Watanabe, H. Tanaka, *Talanta* **52** (1978) 585.
- 23 - M. Corti, C. Minero, V. Degiorgio, *J. Phys. Chem.* **88** (1984) 309.
- 24 - C.L. Liu, Y.J. Nikas, D. Blankschtein, *Biotechnol. Bioengr.* **52** (1996) 185.
- 25 - D. Blankschtein, G.M. Thurston, G.B. Benedek, *J. Chem. Phys.* **85** (1986) 7268.
- 26 - L.A.M. Rupert, *J. Colloid Interface Sci.* **153** (1992) 92.
- 27 - T. Gu, P.A. Galera-Gomez, *Coll. Surfaces* **104** (1995) 307.
- 28 - D. Attwood, A.T. Florence, **Surfactant Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology**, Chapman and Hall, New York, 1983.
- 29 - S.K. Goel, *J. Colloid Interf. Sci.* **212** (1999) 604.
- 30 - L. Koshy, A.H. Saiyad, A.K. Rakshit, *Coll. Polym. Sci.* **274** (1996) 582.
- 31 - Y.X. Huang, G.M. Thurston, D. Blankschtein, G.B. Benedek, *J. Chem. Phys.* **92** (1990) 1956.
- 32 - P.G. Nilsson, B. Lindman, *J. Phys. Chem.* **88** (1984) 5391.
- 33 - B.S. Valaulikar, C. Manohar, *J. Colloid Interface Sci.* **108** (1985) 403.
- 34 - T. Gu, S. Quin, C. Ma, *J. Colloid Interface Sci.* **127** (1989) 586.
- 35 - L. Marszall, *Colloids Surfaces* **25** (1987) 279.
- 36 - L. Marszall, *Langmuir* **6** (1990) 347.
- 37 - H. Gandhi, S. Modi, N. Jain, P. Bahadur, *J. Surfact. Deterg.* **4** (2001) 359.
- 38 - E.H. Lucassen-Reynders (Ed.), **Anionic Surfactants**, Marcel Dekker, New York, 1981.
- 39 - T. Saitoh, W. Hinze, *Anal. Chem.* **63** (1991) 2520.
- 40 - T. Imae, S. Ikeda, *J. Colloid Interface Sci.* **113** (1986) 449.
- 41 - D. Blankschtein, Y.X. Huang, G.M. Thurston, G.B. Benedek, *Langmuir* **7** (1991) 896.
- 42 - B.L. Carvalho, G. Briganti, S.H. Chem, *J. Phys. Chem.* **93** (1989) 4282.
- 43 - D.N. Rubingh, P.M. Holland (Eds.) **Cationic Surfactants**, Marcel Dekker, New York, 1991.
- 44 - I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* **71** (1999), 4526.

- 45 - D.J. Burgess, *J. Colloid Interface Sci.* **140** (1990), 227.
- 46 - F. Xia, R.M. Cassidy, *Anal. Chem.* **63** (1991) 2883.
- 47 - W.L. Hinze, D.W. Armstrong (Eds.) **Ordered Media in Chemical Separations**, American Chemical Society, Washington DC, 1987.
- 48 - M.E.F. Laespada, J.L.P Pavón, B.M. Cordero, *Analyst* **118** (1993) 209.
- 49 - T. Okada, *Anal. Chem.* **64** (1992) 2138.
- 50 - C.G. Pinto, J.L.P. Pavón, B.M. Cordero, *Anal. Chem.* **66** (1994) 874.
- 51 - R. Ferrer, J.L. Beltrán, J. Guiteras, *Anal. Chim. Acta* **330** (1996) 199.
- 52 - R.P. Frankewich, W.L Hinze, *Anal. Chem.* **66** (1994) 944.
- 53 - B.M. Cordero, J.L.P. Pavón, C.G. Pinto, M.E.F. Laespada, *Talanta* **1993**, *40*, 1703.
- 54 - T. Saitoh, H.Tani, T. Kamidate, H. Watanabe, *Trends Anal. Chem.* **14** (1995) 213.
- 55 - S. R. Sirimanne, J.R. Baarr, D.G. Patterson Jr. *Anal. Chem.* **68** (1996) 1556.
- 56 - R.E. Goldstein, *J. Phys. Chem.* **84** (1986) 3367.
- 57 - H. Tani, T. Kamidate, H. Watanabe, *J. Chromatogr. A* **780** (1997) 229.
- 58 - C.J. Bordier, *J. Biol. Chem.* **256** (1981) 1604.
- 59 - W.J. Horvath, C.W. Hine, *Talanta* **40** (1993) 1385.
- 60 - M.O. Luconi, M.F. Silva, R. A. Olsina, L.P. Fernández, *Talanta* **51** (2000) 123.
- 61 - E.K. Paleologos, C.D. Stalikas, S.M. Tzouwara-Karayanni, M.I. Karayannis, *Anal. Chim. Acta* **436** (2001) 49.
- 62 - A.E. Böyükbayram, M. Volkan, *Spectroch. Acta B* **55** (2000) 1073.
- 63 - M. F. Silva, L.P. Fernandez, R.A. Olsina, *Analyst* **123** (1998) 1803.
- 64 - A. Bockelen, R. Niessner, *Fresenius J. Anal. Chem.* **346** (1993) 435.
- 65 - S. Laha, R.G. Luthy, *Environ. Sci. Technol.* **25** (1991) 1728.
- 66 - A. Kabata-Pendias (ed.) **Trace Elements in Soils and Plants**, 3^a ed., CRC Press, New York, 1985.
- 67 - E.J. Underwood, **Trace Elements in Human and Animal Nutrition**, 4^a ed., Academic Press, New York, 1977.
- 68 - H.D. Belitz, W. Grosch, **Food Chemistry**, Springer-Verlag, Berlin, 1987.

- 69 - J.H. Conrad, L.R. McDowell, G.L. Ellis, J.K. Loosli, **Minerais para ruminantes em pastejo em regiões tropicais**. Boletim, EMBRAPA, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 1985.
- 70 – X.S. Zhu, B. Hu, L. Wang, S.Q. Li, Z.C. Jiang, *Fresenius J. Anal. Chem.* **371** (2001) 497.
- 71 – K.Cundeva, T. Stafilov, G. Pavloska, *Microchem. J.* **65** (2000) 165.
- 72 – G. C. Gomez, A.G. Detorres, J.M.C. Pavon, C.B. Ojeda, *Anal. Lett.* **28** (1995) 1181.
- 73 – M.A.Z. Arruda, E.A.G. Zagatto, N. Maniasso, *Anal. Chim. Acta* **283** (1993) 476.
- 74 – E.R. Pereira-Filho, M.A.Z. Arruda, *Analyst* **124** (1999) 1873.
- 75 – S.B. Jadhav, S.P. Tandel, S.P. Malve, *Talanta* **55** (2001) 1059.
- 76 – D.D. Perrin, B. Dempsey, **Buffers for pH and Metal Ion Control**, 3ª ed., Chapman and Hall, London, 1983.
- 77 – E.B. Sandell, **Photometric determination of traces of metals**, New York, Wiley-Interscience, 1987.
- 78 - M. Vitouchová, L. Jancar, L. Sommer, *Fresenius J. Anal. Chem.* **343** (1992) 274.
- 79 – M. Satake, T. Nagahiro, B.K. Puri, *Analyst* **118** (1993) 85.
- 80 – J.P. Pancras, B.K. Puri, M.A. Taher, A.M. Dehzoei, A. Sheibani, *Talanta* **46** (1998) 1107.
- 81 – X. Ding, S. Mou, K. Liu, A. Siriraks, J. Riviello, *Anal. Chim. Acta* **407** (2000) 319.
- 82 – N. Cardellicchio, S. Cavalli, P. Ragone, J.M. Riviello, *J. Chromatogr. A* **847** (1999) 251.
- 83 - M. Schick, *J. Colloid Sci.* **17** (1962) 801.
- 84 - H. Schott, A.E. Royce, S.K. Han, *J. Colloid Interface Sci.* **98** (1984) 196.
- 85 - Analytical Methods Committee; *Analyst* **112** (1987) 199.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta tese, três diferentes métodos foram desenvolvidos, com o intuito de minimizar operações preliminares, tempo e custos das análises químicas.

O sistema de *screening* que foi desenvolvido pode ser utilizado em substituição aos métodos convencionais para a quantificação de fenotiazinas em amostras de urina humana, em casos de intoxicações e morte por ingestão de drogas. Como ferramenta analítica, este sistema mostrou-se vantajoso, uma vez que a detecção das drogas em questão é realizada de uma forma rápida e com baixo custo, sendo que somente aquelas amostras que apresentarem uma resposta positiva pelo sistema de *screening*, serão analisadas pelos métodos confirmatórios.

O método desenvolvido para mapeamento de banhos de ultra-som pode ser executado sem a necessidade de equipamentos sofisticados e os resultados obtidos ajudam na melhor utilização da energia ultra-sônica oriunda dos banhos, uma vez que se pode perceber a diferença de cavitação dentro dos mesmos nas diferentes condições estudadas. O método de extração ácida de metais em amostras de plantas utilizando a energia ultra-sônica, ofereceu uma alternativa simples aos métodos de mineralização completa, seja por fornos de microondas ou em sistemas abertos. A redução no tempo de preparo das amostras e no consumo de reagentes são dois fatores que devem ser considerados. Apesar de, no caso de amostras de plantas, a eficiência da extração ser uma função mais da concentração do ácido do que do ultra-som, este tipo de energia apresenta grande potencialidade e pode ser utilizada para amostras mais complexas, tais como: solos, sedimentos, alimentos, amostras biológicas, etc.

Com o método de pré-concentração de cobalto utilizando tensoativos, foi possível determinar este elemento em baixas concentrações por meio de uma técnica espectroscópica que na maioria das vezes não apresenta sensibilidade adequada para este elemento. O método é mais adequado do que os métodos convencionais de extração líquido-líquido, que são demorados e requerem o uso de solventes orgânicos de alta toxicidade. Outro fato a ser considerado é o uso de

substâncias biodegradáveis em substituição a solventes orgânicos, o que torna o método mais viável no que diz respeito à geração e tratamento de resíduos.

Todo este estudo mostra que existem muitas alternativas que podem facilitar a utilização da química analítica nos mais diversos campos: alimentício, ambiental, clínico, agrônômico, entre outros.

As alternativas propostas devem ser mais estudadas, de forma a melhorar cada vez mais a eficiência das análises e reduzir, na medida do possível, o tempo e os custos das mesmas.

Assim sendo, os métodos aqui propostos apresentam um potencial muito grande para se trabalhar com análises em larga escala, com vantagens no que se refere a custos de implementação e operação, rapidez, geração de resíduos, precisão, exatidão e robustez.

Para finalizar, são apresentadas algumas tabelas com o resumo das condições otimizadas e dos resultados obtidos nos três capítulos desta tese.

Na tabela 24 são apresentadas as condições otimizadas para o sistema de *screening* proposto para a detecção das fenotiazinas.

Tabela 24 - Condições otimizadas para o sistema de *screening*

Variável	Condição otimizada
Concentração de HNO ₃	4 mol L ⁻¹
Vazão de HNO ₃	1,8 mL min ⁻¹
Concentração de K ₃ Fe(CN) ₆	1,5 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹
Vazão de K ₃ Fe(CN) ₆	0,5 mL min ⁻¹
Carregador	H ₂ O
Vazão do carregador	1,3 mL min ⁻¹
Bobina de reação	100 cm
Sorvente para separação/pré-concentração	LiChrolut®EN
pH da amostra	6,5
Massa de sorvente	35 mg
Vazão da amostra	2,7 mL min ⁻¹
Tempo de pré-concentração	2 min
Solução de lavagem	HNO ₃ 0,5 mol L ⁻¹
Tempo de lavagem	30 s
Eluente	Etanol:HNO ₃ 8:2 (v/v)
Volume do eluente	200 µL

Uma súmula dos resultados obtidos para o sistema de *screening* das fenotiazinas é mostrada na tabela 25.

Tabela 25 - Principais resultados obtidos no sistema de *screening*

Variável	Resultado obtido
Fenotiazinas que podem ser avaliadas conjuntamente	Clorpromazina, metotrimeprazina e prometazina
Faixa Linear	3-12 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Limite de detecção	0,82 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Limite de quantificação	2,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Precisão	4,1 %
Concentração de corte	2 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Porcentagem de falsos positivos	6 %
Porcentagem de falsos negativos	10 %
Análise de amostras desconhecidas (n=15)	1 resultado falso positivo
Freq�ncia analítica	20 amostras h^{-1}

Na tabela 26 são apresentadas as condições otimizadas para o emprego dos banhos de ultra-som no método de extração.

Tabela 26 - Condições otimizadas para a utilização dos banhos de ultra-som

Variável	Condição �tima
Volume de �gua	1L
Temperatura da água	~ 26 �C (temperatura ambiente)
Concentração de detergente	0,2 % m/v
Posição vertical do tubo de reação	0 cm (fundo do banho)
Posição horizontal do tubo de reação	Posição central
N� de tubos dentro do banho	1 tubo por vez
Concentração de H_2O_2 na posição 5 (central)	950 $\mu\text{g L}^{-1}$
Substituição de água (vazão)	18,2 mL min^{-1}

Nas condições otimizadas (tabela 26) foi realizada a extração de macro e micronutrientes em diferentes plantas, sendo que as variáveis otimizadas e os resultados obtidos neste estudo são mostrados na tabela 27.

Considerações Finais

Tabela 27 – Condições otimizadas e principais resultados obtidos com a extração de metais em plantas

Variáveis	Condições otimizadas
Concentração de HNO ₃	0,14 mol L ⁻¹
Tempo de sonicação	10 min
Tamanho de partículas	< 75 µm
Elementos com cerca de 100 % de extração	Ca, Mg, Mn, Zn
Amostras analisadas	plantas

Nas tabelas 28 e 29 podem ser observados as condições otimizadas e os resultados obtidos nos métodos de pré-concentração por ponto nuvem propostos neste trabalho.

Tabela 28 - Condições otimizadas para a pré-concentração de cobalto: ponto nuvem induzido por HCl e por NaCl

Variável	Método HCl	Método NaCl
Concentração de HCl	4 mol L ⁻¹	–
Concentração de NaCl	–	10 % m/v
Concentração de SDS	0,75 % m/v	0,1 % m/v
Concentração de Triton X-100	0,1 % m/v	0,25 % m/v
Complexante	5-Br-PADAP	5-Br-PADAP
Concentração de Complexante	3,5 x 10 ⁻⁴ % m/v	3,5 x 10 ⁻⁴ % m/v
pH de complexação	9,0	9,0
Tempo de complexação	20 min	20 min
Tempo de contato complexo/tensoativo	zero	zero

Tabela 29 – Principais resultados obtidos pelos dois métodos de pré-concentração para cobalto

Variáveis	Método HCl	Método NaCl
Faixa linear	25-200 µg L ⁻¹	25-200 µg L ⁻¹
Limite de detecção	1,06	1,58
Limite de quantificação	3,53	5,27
Precisão	5,41 %	3,16 %
Fator de pré-concentração	28,5	21,7
Coefficiente de extração	~ 1	~ 1
Relação entre o volume das fases	0,03	0,035
% Recuperação	46 a 80 %	~ 100 %
Amostras analisadas	–	medicamentos