



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

---



Alailson Falcão Dantas

“AVALIAÇÃO DA 2,2’-BIQUINOLINA NA  
SEPARAÇÃO, PRECONCENTRAÇÃO E  
DETERMINAÇÃO DE COBRE POR  
ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO  
MOLECULAR EM SOLUÇÃO E EM FASE SÓLIDA”

Salvador  
Janeiro de 2004

Alailson Falcão Dantas

“AVALIAÇÃO DA 2,2’-BIQUINOLINA NA  
SEPARAÇÃO, PRECONCENTRAÇÃO E  
DETERMINAÇÃO DE COBRE POR  
ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO  
MOLECULAR EM SOLUÇÃO E EM FASE SÓLIDA”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Química, Instituto de Química, Universidade  
Federal da Bahia, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Celso Spínola Costa

Salvador  
Janeiro de 2004

---

Dantas, Alailson Falcão.

Avaliação da 2,2'-biquinolina na separação, preconcentração e determinação de cobre por espectrofotometria de absorção molecular em solução e em fase sólida / Alailson Falcão Dantas – Salvador: IQ-UFBA, 2004.

141 f.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Celso Spínola Costa.

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, 2004.

1. Análise espectrofotométrica – Determinação de cobre. 2. Sistema de análise em fluxo - preconcentração em fase sólida. 3. 2,2'-biquinolina – Avaliação. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química. II. Costa, Antonio Celso Spínola. III. Título.

CDU: 543.422.3

CDD: 543.085 8

---

Janeiro / 2004

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Antônio Celso Espínola Costa (IQ-UFBA)  
Orientador

---

Prof. Dr. Sérgio Luís Costa Ferreira (IQ-UFBA)

---

Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira (UNIFACS)

---

Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis (CENA)

---

Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha (USP)

Homologada pelo Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação em Química  
Em \_\_ / \_\_ / \_\_

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Aloisio e Graciete Dantas*

*À minha esposa  
Cléa Borges*

*À minha grande amiga  
Neide Borges (in memoriam)*

*A todos com todo carinho*

## **AGRADECIMENTOS**

- A Deus, por estar sempre fazendo o melhor por mim.
- A minha família, por todo amor, carinho e apoio nos momentos decisivos da minha vida e nas horas mais difíceis deste doutorado.
- A minha amada esposa, Cléa, maior incentivadora, tanto na alegria quanto nas horas difíceis, e que não me deixou desistir de tudo.
- Ao Prof. Dr. Antônio Celso Spínola Costa, meu orientador, pela amizade, pelo carinho, pelos preciosos ensinamentos, dentro e fora do laboratório, que me ajudam a crescer como pessoa e como profissional, mas principalmente pela tolerância nas horas difíceis.
- Ao Prof. Dr. Sérgio Luís Costa Ferreira, meu eterno co-orientador, pela amizade e carinho, dicas preciosas e a quem eu sou eternamente grato pelo convite inicial para integrar sua equipe de pesquisa, como aluno de I.C., e que veio a resultar em diversos trabalhos importantes na minha vida científica, inclusive este doutorado.
- Ao Prof. Dr. Boaventura Reis (sua história de vida e sua humildade é um exemplo para todos) e todo o pessoal do CENA, que fizeram me sentir em casa, em especial, Fábio Rocha, Dário, Fernando, Cherryne, Marise e Sheila.
- Ao meu amigo e irmão, Leonardo Teixeira, por ter me passado seus conhecimentos sobre C18 e me ajudado nos primeiros passos desta tese. É bom saber que nas horas difíceis tenho um amigo como você.
- A todos os amigos e colegas do IQ-UFBA, principalmente os companheiros do GPQA que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Um agradecimento especial aos meus parceiros de bancada, Maria Rúbia Gonçalves, Elsimar Leão, Jorge Franco e Domingos, que tornaram o trabalho de laboratório sempre mais divertido e menos sofrido.
- Aos professores Miguel Fascio (pelas fotos maravilhosas) e Humberto Testagrossa e às professoras Heloysa Martins (seus conhecimentos e incentivos foram preciosos), Maria Helena Melo (sua fé e incentivo foram muito importantes), Neyla Araújo, Cristina Raimundo pela amizade, apoio e contribuições desde o início deste doutorado.
- Aos funcionários Cristovão, Paulo, Vivaldino e Maria Alice que, cada um à sua maneira, contribuíram para este trabalho.
- Aos colegas, coordenadores e diretores da Faculdade Área 1, onde leciono, em especial aos professores Fernando Neves, Roberto Márcio e Abraão Félix.
- Aos amigos de fora do IQ-UFBA, que não entendem nada de química, mas torceram para este trabalho dar certo.

## Índice geral

<b>1 – Introdução</b>	1
<b>2 – Reagentes orgânicos formadores de quelatos</b>	3
<b>3 – Cobre</b>	5
3.1 – Considerações gerais	5
3.2 – Histórico	5
3.3 – Produção, ocorrência e utilização	6
3.4 – Propriedades químicas e físicas	8
3.5 – Essencialidade e toxicologia	11
3.6 – Reagentes orgânicos para dosagem de cobre	13
<b>4 – 2,2'-Biquinolina e derivados da 1,10-fenantrolina</b>	16
4.1 – Considerações gerais	16
4.2 – Seletividade da cuproína e derivados da 1,10-fenantrolina	18
4.3 – Aplicações da 2,2'-biquinolina	22
4.4 – Aplicações da 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina	27
4.5 – Aplicações da 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina	35
<b>5 – Extração em fase sólida</b>	42
5.1 – Considerações gerais	42
5.2 – Histórico	42
5.3 – Etapas e aparatos da EFS	43
5.3.1 – Etapas da EFS	43
5.3.2 – Aparatos da EFS	45
5.4 – Fase reversa sílica funcionalizada C18	46
5.4.1 – Considerações gerais	46
5.4.2 – Síntese das sílicas funcionalizadas	47
5.4.3 – Sílica funcionalizada C18	50
5.4.4 – Aplicações analíticas da sílica funcionalizada	50
<b>6 – Determinação de cobre por espectrofotometria de absorção molecular usando cuproína em presença de etanol e Triton – X100.</b>	55
6.1 – Considerações gerais	55
6.2 – Objetivos	55
6.3 – Reagentes e Instrumentos	56
6.3.1 – Reagentes	56
6.3.2 – Instrumentos	56
6.4 – Procedimento experimental sugerido	57
6.5 – Estudo da natureza dos tensoativos	57
6.6 – Espectros e estabilidade do sistema biq-Cu(I)	58

6.7 – Efeito da variação da acidez	60
6.8 – Efeito da concentração do tampão	61
6.9 – Efeito da concentração de cuproína	62
6.10 – Efeito da natureza e concentração do redutor	63
6.11 – Efeito de outros íons	65
6.12 – Efeito da concentração de EDTA	66
6.13 – Efeito da ordem de adição dos reagentes	67
6.14 – Características analíticas do método	68
<b>7 – Estudo da retenção, separação e determinação de cobre por espectrofotometria em fase sólida usando cuproína imobilizada em sílica funcionalizada C18 utilizando uma cela de fluxo axial e tiouréia como eluente.</b>	<b>72</b>
7.1 – Considerações gerais	72
7.2 – Objetivos	73
7.3 – Reagentes e Instrumentos	73
7.3.1 – Reagentes	73
7.3.2 – Instrumentos	74
7.3.3 – Cela de fluxo axial (cilíndrica)	75
7.3.4 – Imobilização do reagente no C18	77
7.3.5 – Procedimento Experimental	79
I – Procedimento com a seringa plástica	79
II – Procedimento com sistema FIA	79
7.3.6 – Resultados e discussões	81
I – Espectro do $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ em fase sólida	81
II – Estabilidade do $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ retido na fase sólida	83
III – Estudo da natureza e da concentração do eluente	84
IV – Efeito da acidez na retenção do $\text{Cu}(\text{I})$	86
V – Efeito da variação da vazão sobre a retenção do cobre	87
7.4 – Características analíticas do método	88
<b>8 – Estudo da retenção, separação e determinação de cobre por espectrofotometria em fase sólida usando cuproína imobilizada em sílica funcionalizada C18 utilizando uma cela de fluxo plana e tiouréia como eluente.</b>	<b>90</b>
8.1 – Considerações gerais	90
8.2 – Objetivos	91
8.3 – Reagentes e Instrumentos	92
8.3.1 – Reagentes	92
8.3.2 – Instrumentos	92
8.3.3 – Cela de fluxo plana	93



8.3.4 – Imobilização no C18 e diagrama de fluxo	94
8.4 – Resultados e discussão	95
8.4.1 – Geometria e posicionamento da cela plana	95
8.4.2 – Espectros de absorção para cela plana	97
8.4.3 – Efeito da variação da acidez e da concentração de tampão acetato	98
8.4.4 – Efeito da natureza do redutor e da concentração do redutor	100
8.4.5 – Efeito da concentração do eluente	101
8.4.6 – Efeito da vazão na retenção do cobre	102
8.5 – Características analíticas do método	103
<b>9 – Estudo da retenção, separação e determinação de cobre por espectrofotometria em fase sólida usando cuproína imobilizada em sílica funcionalizada C18 utilizando uma cela de fluxo plana e ferro (III) como eluente.</b>	105
9.1 – Considerações gerais	105
9.2 – Objetivos	106
9.3 – Reagentes e Instrumentos	107
9.3.1 – Reagentes	107
9.3.2 – Instrumentos	108
9.3.3 – Imobilização do reagente e diagrama de fluxo	109
9.4 – Resultados e discussão	113
9.4.1 – Estudo da natureza do eluente	113
9.4.2 – Espectros de absorção obtidos na cela plana	113
9.4.3 – Efeito da variação da concentração de Fe(III) no eluente	114
9.4.4 – Efeito da variação da concentração de íons cloreto no eluente	115
9.4.5 – Efeito da natureza da solução transportadora	117
9.4.6 – Efeito da variação da acidez na retenção do Cu(I)	118
9.4.7 – Efeito da natureza e da concentração do redutor	119
9.4.8 – Efeito da variação da vazão na retenção do cobre	119
9.4.9 – Capacidade de retenção do Cu(I) pela fase modificada cuproína-C18	120
9.4.10 – Estudo da relação entre as alças de amostragem e de eluição na retenção do Cu(I) pela cuproína-C18.	122
9.4.11 – Estudo de íons interferentes na determinação do cobre	123
9.5 – Características analíticas do método	124
<b>10 – Conclusões</b>	127
<b>11 – Referências bibliográficas</b>	131

## Lista de tabelas

Tabela 1 – Principais espécies minerais do cobre	7
Tabela 2 – Potenciais de redução padrão do cobre	9
Tabela 3 – Teor de cobre em alguns alimentos	11
Tabela 4 – Quelatos de Cu(I) e Fe(II) da 1,10-fenantrolina e reagentes correlatos	21
Tabela 5 – Dissolução da cuproína em etanol na presença de tensoativos	58
Tabela 6 – Efeito da natureza do redutor	64
Tabela 7 – Estudo da ordem de adição dos reagentes	67
Tabela 8 – Características analíticas do método proposto	68
Tabela 9 – Condições operacionais do espectrofotômetro UV-VIS CARY – 1E	75
Tabela 10 – Teste de retenção da cuproína em diversas fases sólidas	78
Tabela 11 – Estudo da concentração da tiouréia como solução eluente	85
Tabela 12 – Estudo da mistura da tiouréia com outras soluções eluentes	85
Tabela 13 – Características analíticas do método proposto	88
Tabela 14 – Condições operacionais do espectrofotômetro UV-VIS CARY–1E	93
Tabela 15 – Efeito da natureza do redutor	100
Tabela 16 – Efeito da concentração de tiouréia	102
Tabela 17 – Características analíticas do método proposto	103
Tabela 18 – Condições operacionais do espectrofotômetro UV-VIS CARY–5E	109
Tabela 19 – Condições operacionais do espectrofotômetro UV-VIS FEMTO–432	109
Tabela 20 – Estudo da natureza do eluente	113
Tabela 21 – Efeito da presença de íons cloreto no eluente	116
Tabela 22 – Efeito da presença de íons cloreto no eluente na ausência de HCl	116
Tabela 23 – Efeito da natureza da solução transportadora	117
Tabela 24 – Efeito da natureza do redutor	118
Tabela 25 – Características analíticas do método proposto	124

## Lista de figuras

Figura 1 – Reação de formação do oxinato de cobre	4
Figura 2 – Perfil do consumo de cobre no Brasil	6
Figura 3 – Estrutura da 2,2'-Bipiridina	16
Figura 4 – Estrutura da 1,10-Fenantrolina	16
Figura 5 – Grupo Ferroína	18
Figura 6 – Grupo Cuproína	19
Figura 7 – Quelato da neocuproína com o Cu(I) extraído com álcool amílico	20
Figura 8 – Estrutura da 2,2'-Biquinolina	22
Figura 9 – Estrutura da <i>cis</i> -cuproína	26
Figura 10 – Estrutura da <i>trans</i> -cuproína	26
Figura 11 – Estrutura da 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina	27
Figura 12 – Estrutura da 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina	35
Figura 13 – Estrutura do ácido 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina-dissulfônico	35
Figura 14 – Etapas da extração em fase sólida	44
Figura 15 – Aparatos para EFS: discos, cartuchos e seringas	46
Figura 16 – Exemplos de algumas fases reversas de sílicas funcionalizadas	48
Figura 17 – Síntese de uma fase sólida reversa do tipo sílica funcionalizada C8	49
Figura 18 – Espectro do quelato $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$	59
Figura 19 – Variação da absorvância com o tempo	59
Figura 20 – Variação da absorvância em função da variação da acidez	60
Figura 21 – Efeito da variação da concentração de tampão ácido acético/acetato de sódio	61
Figura 22 – Efeito da variação da concentração de cuproína sobre a absorvância do $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$	62
Figura 23 – Variação da absorvância em função da variação da concentração do cloreto de hidroxilamina	64
Figura 24 – Efeito da variação da concentração de EDTA sobre a absorvância do $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$	66
Figura 25 – Curva analítica do sistema $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$	68
Figura 26 – Avaliação do limite de detecção através da ordenada na origem das curvas analíticas de calibração.	70
Figura 27 – Cella axial para medidas por EFS	76
Figura 28 – Imagens da cela axial usada para determinar cobre por EFS	76
Figura 29 – Imagens da cela axial adaptada a uma seringa	77
Figura 30 – Diagrama de fluxos do módulo de análise para medidas de Cu(I) por FI-EFS.	81
Figura 31 – Espectros de absorção dos quelatos de $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ na fase sólida e em solução etanólica.	82

Figura 32 – Efeito da variação do tempo sobre a estabilidade da sílica C18 modificada com cuproína e do quelato $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ retido na fase sólida.	83
Figura 33 – Efeito da acidez na capacidade de retenção do Cu(I) em cuproína – C18	86
Figura 34 – Efeito da variação da vazão da solução transportadora na capacidade de retenção do Cu(I) em cuproína – C18	87
Figura 35 – Curva analítica do sistema $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ em fase sólida para uma cela axial e tiouréia como eluente.	89
Figura 36 – Representação esquemática da cela de fluxo plana para FI-EFS	94
Figura 37 – Efeito do posicionamento da cela de fluxo plana	96
Figura 38 – Posicionamento da cela plana no caminho óptico do espectrofotômetro	97
Figura 39 – Espectros de absorção do quelato $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ em fase sólida, em celas axial e plana, respectivamente, e em solução etanólica.	98
Figura 40 – Efeito da acidez na capacidade de retenção do Cu(I) em cuproína-C18	99
Figura 41 – Efeito da variação da concentração do tampão acetato de sódio pH 4,8 na capacidade de retenção do Cu(I) em cuproína-C18	99
Figura 42 – Efeito da variação da concentração de hidroxilamina na capacidade de retenção do Cu(I) em cuproína-C18	101
Figura 43 – Efeito da variação da vazão da solução transportadora na capacidade de retenção do Cu(I) em cuproína-C18	102
Figura 44 – Curva analítica do sistema $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ em fase sólida para uma cela plana e tiouréia como eluente.	104
Figura 45 – Diagrama de fluxo do módulo de análise para medidas de Cu(I) por FI-EFS	110
Figura 46 – Sistema FI-EFS adaptado ao CARY – 5E	110
Figura 47 – Cela de fluxo adaptada próximo ao detector do espectrofotômetro CARY-5E.	111
Figura 48 – Sílica funcionalizada C18 modificada com cuproína	111
Figura 49 – Fase sólida modificada sendo condicionada com a solução transportadora	111
Figura 50 – Injeção de $400\mu\text{L}$ de $\text{Cu}(\text{I})$ $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$	112
Figura 51 – Retenção de $400\mu\text{L}$ de $\text{Cu}(\text{I})$ $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$	112
Figura 52 – Eluição do $\text{Cu}(\text{I})$ $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ com uma solução de $\text{Fe}(\text{III})$ $25 \text{ mg.L}^{-1}$ / HCl 5%	112
Figura 53 – Lavagem e condicionamento da fase sólida modificada com a solução transportadora para uma nova injeção da amostra.	112
Figura 54 – Espectros de absorção dos quelatos do cobre, ferro e da mistura (1:1) de cobre e ferro no sistema cuproína-C18	114
Figura 55 – Efeito da variação da concentração de $\text{Fe}(\text{III})$ no eluente	115
Figura 56 – Efeito da acidez na capacidade de retenção do Cu(I) em cuproína-C18	118
Figura 57 – Efeito da variação da vazão da solução transportadora na capacidade de retenção do Cu(I) em cuproína-C18	120

Figura 58 – Capacidade de retenção do Cu(I) pela fase sólida cuproína-C18	121
Figura 59 – Efeito da variação do volume de amostra injetada.	122
Figura 60 – Efeito da variação do volume de eluente injetado.	123
Figura 61 – Curva analítica do sistema Cu (biq) <sub>2</sub> <sup>+</sup> – C18 para uma cela plana e Fe(III) / HCl como eluente	125
Figura 62 – Corrida analítica referente à curva analítica do sistema Cu (biq) <sub>2</sub> <sup>+</sup> – C18 em fase sólida para uma cela plana e Fe(III) / HCl como eluente.	126
Figura 63 – Corrida analítica referente a um teste de repetibilidade para uma amostra de Cu(I) 4µg.mL <sup>-1</sup> e seu ensaio em branco.	126

## Lista de Símbolos e Abreviaturas

$\epsilon$  - Absortividade molar

°C – Graus Celsius

**batocup** – batocuproína

**biq** – 2,2'-biquinolina

**C<sub>18</sub>** – Sílica modificada octadecilsilano

**C<sub>8</sub>** – Sílica modificada octilsilano

**CTAB** – brometo de cetil-trimetilamônio

**Cu(batocup)<sub>2</sub><sup>+</sup>** - quelato do Cu(I)-batocuproína

**Cu(batocup)<sub>2</sub><sup>2+</sup>** - quelato do Cu(II)-batocuproína

**Cu(biq)<sub>2</sub><sup>+</sup>** - quelato do Cu(I)-cuproína

**Cu(biq)<sub>2</sub><sup>2+</sup>** - quelato do Cu(II)-cuproína

**Cu(neocup)<sub>2</sub><sup>+</sup>** - quelato do Cu(I)-neocuproína

**Cu(neocup)<sub>2</sub><sup>2+</sup>** - quelato do Cu(II)-neocuproína

**CyDTA** – ácido *trans*-1,2-ciclohexano-diamino-tetra-acético

**D** – coeficiente de distribuição da extração

**DMF** – dimetilformamida

**DTPA** – ácido dietilenotriamino-penta-acético

**EDTA** – Ácido etileno-diamino-tetra-acético

**E<sub>o</sub>** – Potencial de redução padrão

**FAAS** – Espectroscopia de absorção atômica por chama

**fen** – 1,10-fenantrolina

**FI – EFS** – Espectrofotometria em fase sólida por injeção de fluxo

**FIA** – Análise por injeção de fluxo

**g/cm<sup>3</sup>** – densidade absoluta

**HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência

**MIBK** – Metil-iso-butil-cetona

**Na-DDTC** – Dietilditiocarbamato de sódio

**neocup** – neocuproína

**NTA** – ácido nitrilo-acético  
**ohm/m.g** – Resistividade elétrica  
**PAR** – Piridilazo-resorcinol  
**Pb(DDTC)<sub>2</sub>** – Dietilditiocarbamato de chumbo  
**PEI** – Polietilenimina  
**pH** – potencial hidrogeniônico  
**PPT** – 5-fenil-3-(4-fenil-2-piridil)-1,2,4-triazina  
**Procobre** – Associação Brasileira do Cobre  
**PVC** – policloreto de vinila  
**SDS** – dodecilsulfato de sódio  
**SIA** – Análise por injeção seqüencial  
**SPE** – extração em fase sólida  
**SPS** – espectrofotometria em fase sólida  
**THF** – Tetrahydro-furano  
**UV** – radiação ultra-violeta  
**VIS** – radiação visível

## RESUMO

O presente trabalho propõe o estudo da utilização da cuproína na separação, preconcentração e determinação de cobre por espectrofotometria de absorção molecular em solução e espectrofotometria de absorção molecular em fase sólida.

Em uma primeira etapa, estudou-se um sistema para espectrofotometria em solução, sendo que o cátion cobre (I) reage com a cuproína em pH 4,8 formando um complexo rosa, estável por cerca de 48 horas, com absorvância máxima em 545 nm e absorvidade molar  $\epsilon = 6,25 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , contra um branco do reagente. A reação de complexação ocorre na presença de hidroxilamina, etanol, do tensoativo Triton-X100 e de EDTA. A determinação do cobre é possível numa faixa linear dinâmica que vai de 0,2 a até 5,0 mg.L<sup>-1</sup>, com um limite de detecção de 0,05 mg.L<sup>-1</sup>. A principal vantagem do procedimento sugerido é à eliminação da etapa de extração líquido – líquido ou a eliminação da utilização de solventes orgânicos tóxicos, como dimetilformamida (DMF), para dissolução da cuproína

Em uma segunda etapa, estudaram-se três sistemas para separação, preconcentração e determinação de cobre por espectrofotometria em fase sólida, utilizando sílica funcionalizada C18 modificada com cuproína para retenção do quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ , na presença de hidroxilamina e tampão acetato pH 4,8. As três metodologias propostas envolvem sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) com injetores e celas de fluxo artesanais, tornando os procedimentos rápidos, sensíveis, baratos e com baixo consumo de reagentes e baixa produção de resíduos. Estes estudos envolveram a comparação entre uma cela axial e uma cela plana, onde a primeira mostrou-se mais sensível, porém com muitos problemas de vazamento em função da alta impedância hidrodinâmica. Houve também a comparação das soluções de tiouréia/tampão acetato e Fe(III) / HCl como eluentes do Cu(I) retido na fase sólida modificada cuproína-C18 em uma cela plana. A solução ácida de Fe(III) mostrou-se mais eficiente que a tiouréia, pois não deixava resíduos e aumentava a vida útil da fase sólida modificada.

**Palavras chaves:** cobre, cuproína, FIA, EFS, fase sólida, C18



## **ABSTRACT**

The present work proposes the evaluation of the cuproine as a reagent for copper extraction, preconcentration and determination using molecular absorption spectrophotometry in solution and in solid phase.

In first study, copper (I) cation reacts with cuproine in pH 4.8 forming a pink complex, stable for at least 48 hours, with absorption maximum at 545nm and molar absorptivity  $\varepsilon = 6.25 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  against a reagent blank. The reaction occurs in the presence of hydroxylamine, ethanol, Triton-X100 tensoative and EDTA. Copper determination is possible from 0.2 up to 5.0  $\text{mg.L}^{-1}$ , with a detection limit of 0.05  $\text{mg.L}^{-1}$ . The great advantage of the proposed methodology is the elimination of liquid-liquid extraction step and toxic organics solvents, like dioxane, for dissolve the reagent.

In the second study, we have evaluated three methods for copper separation, preconcentration and determination using solid phase spectrophotometry, with modified cuproine / octadecyl reversed phase (C18) for  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$  complex retention, in presence of the hydroxylamine and acetate buffer pH 4.8. For three methods were employed flow-injection analysis (FIA) with artesanal valve injection and flow cells. These systems are faster, sensitivity, cheapness and allow low reagent consumption and low waste generation. These three studies have envolved the comparation between cilindric and rectangular cells, so the cilindric cell has been more sensitive, but the cilindric cell has showed fluid leakage because of higer hydrodynamic pressure. It was also evaluate thiourea / acetate buffer and Fe(III) / HCl solutions as eluent for Cu(I) adsorbed in cuproine-C18 solid-phase in the rectangular cell. The acid solution of Fe(III) showed better than thiourea because it presents better elution efficiency and increases the solid-phase lifetime.

**Keywords:** cupper, cuproine, FIA, SFS, solid-phase, C18

## **1 – INTRODUÇÃO [1, 2, 3]**

Desde o século XVIII, os reagentes orgânicos cumprem um importante papel na química analítica. Desde esse tempo, as substâncias orgânicas são utilizadas no controle de acidez, na decomposição de amostras, como solventes e soluções de lavagem. Mas, foi somente no século XIX que ocorreu a consolidação do uso desses reagentes na análise inorgânica. Um dos registros mais antigos do uso de um reagente orgânico na análise quantitativa data de 1831, quando Sérullas observou que o perclorato de potássio podia ser separado do perclorato de sódio através da extração com etanol. Depois, em 1885, Illinski e von Knorre introduziram o 1-nitroso-2-naftol como agente precipitante para a determinação quantitativa de cobalto. Tempos depois, já no século XX, Cazeneuve relatou a reação entre a difenilcarbazida e o Cr(VI), no ano de 1901.

Apesar do uso em análise inorgânica não ser mais nenhuma novidade, o reconhecimento dos reagentes orgânicos como importante ferramenta para a química analítica só se deu mais tarde, quando Tschugaeff, em 1905, descreveu com clareza a alta seletividade e sensibilidade da dimetilglioxima, e Brunck, em 1907, utilizou esse reagente numa série de separações envolvendo níquel. Esses trabalhos foram um importante estímulo para a descoberta de novos reagentes analíticos de origem orgânica.

Os reagentes orgânicos possuem uma ampla aplicação em química analítica. No passado, eles basicamente foram usados em determinações gravimétricas e volumétricas, principalmente sob a forma de indicadores. Mais tarde, eles foram utilizados, direta ou indiretamente, em análises instrumentais, principalmente nas técnicas de espectrofotometria de absorção molecular. Hoje, constantemente são desenvolvidas novas técnicas analíticas e sintetizados novos reagentes, ao mesmo tempo em que se desenvolvem novas aplicações para os reagentes já existentes, principalmente para a dosagem de quantidades cada vez menores de metais pesados, entre eles o cobre.

Devido à sua grande importância econômica, principalmente nas indústrias metalúrgica, de materiais elétricos e na catálise, assim como também pela sua participação em inúmeros metabolismos essenciais à vida humana e em

importantes fenômenos biológicos; o desenvolvimento de novas metodologias para a análise de traços de cobre se faz sempre necessário, principalmente, com o intuito de se propor métodos cada vez mais rápidos, baratos, sensíveis e seletivos.

Apresentaremos, nesta tese, um quadro geral dos métodos que utilizam os reagentes derivados da 1,10-fenantrolina e 2,2'-biquinolina, que apresentam, como principal característica, uma altíssima seletividade e sensibilidade para o cobre. Apresentaremos modificações realizadas no método envolvendo a 2,2'-biquinolina, para melhorar a solubilidade deste reagente e de seus quelatos com cobre em soluções aquosas e a sensibilidade dos mesmos, quando utilizado em espectrofotometria de absorção molecular em solução. Apresentaremos também um novo método para análise de cobre, utilizando espectrofotometria de absorção molecular em fase sólida constituída por C18 modificada com 2,2'-biquinolina, além de um estudo comparativo entre as técnicas de FI-EFS com reatores axiais (cilíndricos) e planos (retangulares), além da comparação entre procedimentos baseados em FI-EFS e a espectrofotometria de absorção molecular convencional.

## **2 – REAGENTES ORGÂNICOS FORMADORES DE QUELATOS [3, 4, 5]**

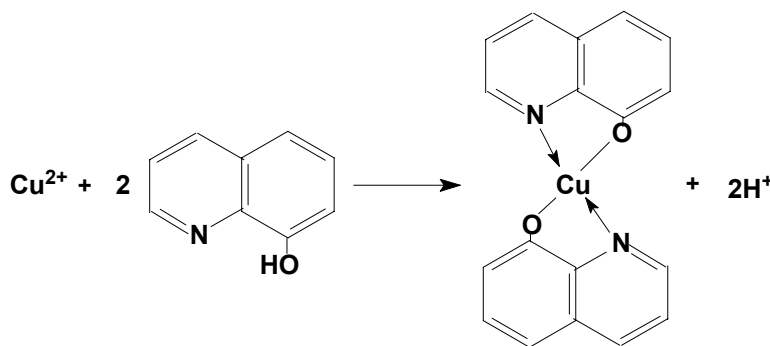
Dentre os muitos usos dos reagentes orgânicos em química analítica, podemos destacar o uso dos mesmos na análise de traços de metais. Entre estes metais, destacam-se os metais de transição externa (bloco d), presentes na maioria dos materiais e matrizes analisadas no dia a dia dos químicos analíticos.

Os metais de transição externa são elementos cujo subnível de maior energia de seus átomos é o subnível **d**, variando de um a dez elétrons. Os níveis eletrônicos mais externos normalmente contêm dois elétrons no subnível **s**. Assim, de um modo geral, configuração eletrônica dos metais de transição externa pode ser descrita como **ns<sup>2</sup>(n-1)d**, o que confere a estes metais algumas propriedades importantes, como os vários estados de oxidação e a capacidade de formar complexos. Sobre esta capacidade de formar complexos, é importante destacar a formação dos quelatos (do grego, **chele = garra**), que são um caso particular de complexação.

Alguns reagentes orgânicos possuem dois ou mais grupos doadores de elétrons, que podem compartilhar dois ou mais pares de elétrons com um único íon metálico, pela coordenação simultânea desses pares de elétrons ao redor do íon metálico central. Esses ligantes são geralmente conhecidos como ligantes multidentados, e geralmente classificados em bidentados, tridentados, etc. Os ligantes multidentados complexam os íons metálicos formando anéis heterocíclicos conhecidos como quelatos, nos quais o cátion metálico ocupa a posição central do anel. Os ligantes bidentados são os que aparecem com mais frequência; há, porém, quelatos importantes formados por ligantes multidentados, como os formados com os reagentes da família do EDTA.

No caso dos ligantes bidentados, é muito comum o íon central ligar-se, por um lado, a um átomo de oxigênio, enxofre ou nitrogênio de um grupamento ácido que libera um próton e torna-se um doador aniônico. Os grupamentos ácidos mais freqüentes são: **-COOH**, **-SO<sub>2</sub>H**, **-SO<sub>3</sub>H**, **-OH**, **-SH**, **-NOH**, **-NO-OH**, **=NH**, **-As(OH)<sub>2</sub>** e **-AsO(OH)<sub>2</sub>**. Pelo outro lado, o íon central liga-se a um átomo doador, que fornece o par de elétrons compartilhados na ligação. De uma maneira geral, os grupos de coordenação contêm átomos de oxigênio, enxofre ou nitrogênio, como

por exemplo: =CO, =CS, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -NO, -NO<sub>2</sub>. Também os átomos de nitrogênio e os átomos de carbono ligados duplamente em cadeias, abertas ou fechadas, podem atuar como doadores [3]. Um exemplo típico de um quelato é o formado pelo cobre e a 8-hidroxiquinolina (oxina) (figura 1):



**Fig. 1 – Reação de formação do oxinato de cobre**

Uma das propriedades mais notáveis dos quelatos é a sua estabilidade incomum. Eles se assemelham aos anéis aromáticos da química orgânica. Um quelato estável, normalmente, apresenta cinco ou seis átomos, ligados covalentemente, em seu anel. A estabilidade do quelato é tanto maior quanto: (a) mais elevada a carga, (b) menor o raio e (c) maior a afinidade eletrônica do átomo central. Esta é a razão pela qual os elementos alcalinos e alcalino – terrosos somente formam quelatos excepcionalmente, por exemplo, com o EDTA [5].

Os quelatos encontram muitas aplicações em química analítica. Os quelatos neutros pouco solúveis em água são utilizados em processos de separação por extração ou na determinação gravimétrica de metais. Outros quelatos são intensamente coloridos e formam sistemas para a determinação espectrofotométrica de metais. Alguns reagentes orgânicos são bastante seletivos, originando quelatos com um número limitado de íons metálicos; outras vezes, a seletividade das reações pode ser melhorada mediante o ajuste de parâmetros como pH, a adição de tensoativos e agentes complexantes auxiliares.

### **3 – COBRE**

#### **3.1 – Considerações gerais**

O cobre é um dos metais de maior importância para o desenvolvimento da humanidade. A sua descoberta é tão antiga quanto a própria origem da humanidade. É bem provável que o homem primitivo tenha aprendido, acidentalmente, que se algumas pedras azuis bonitas fossem aquecidas ao fogo, se transformavam em cobre metálico. Com o tempo, por causa das suas propriedades físicas e químicas singulares e a tendência de se concentrar em grandes depósitos minerais, o cobre, juntamente com o ferro, a prata e o ouro, destacaram-se como um dos mais importantes elementos metálicos [6, 7].

Embora o uso do cobre tenha conhecido o seu apogeu na Antigüidade, devido à sua beleza e praticidade, principalmente na confecção de armas e ferramentas; ainda hoje encontramos uma ampla aplicação comercial e tecnológica em função da sua alta condutividade térmica e elétrica, sua excelente ductibilidade e resistência à corrosão.

#### **3.2 – Histórico**

Os mais antigos registros do uso do cobre pelo homem ocorreram na Mesopotâmia (hoje norte do Iraque) cerca de 8500 a.C. e na então Ásia Menor e Egito por volta de 7000 a.C. Artefatos feitos de cobre encontrados na Península do Sinai datam de 3800 a.C. e as minas da ilha de Chipre começaram a ser exploradas já em 3000 a.C. Já nesse período, os egípcios desenvolveram a arte metalúrgica, o uso do bronze (liga de cobre e estanho) tornou-se moderadamente comum e o carbonato de cobre era usado como pigmento. As minas da ilha de Chipre foram conquistadas pelos impérios que se seguiram aos egípcios e tornaram-se a principal fonte do metal para o império romano. É desta época de domínio romano que o metal ganhou o nome de cobre, que é derivado do latim “*cuprum*”, que é a corruptela de “*aes cyprium*”, termo usado pelos romanos para designar o metal obtido da ilha de Chipre (do grego *Kypros*).

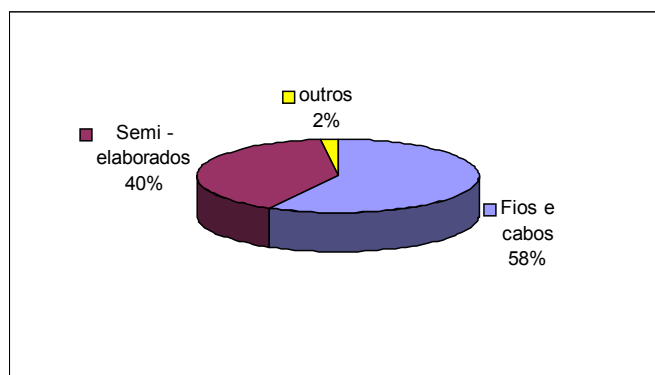
Durante o império romano, muito minério de cobre foi extraído de mina no sul da Espanha e em Chipre. Com a queda de Roma, a mineração na Europa

diminuiu significativamente, até ser retomada em território germânico no ano de 920 d.C. A partir deste período e durante toda a idade média, a mineração dos metais cresceu significativamente no restante da Europa até que em 1556 Georgius Agricola publicou o livro *“De Re Metallica”*, onde descreve o processamento de cobre e de vários outros metais.

Os territórios germânicos lideraram a produção de cobre até 1800, quando a Inglaterra assumiu o primeiro lugar. Os ingleses foram ultrapassados em 1850 pelo Chile, que dominou a produção mundial até o final do século XIX, quando os americanos assumiram a liderança, que permanece até os dias atuais.

### **3.3 – Produção, ocorrência e utilização**

Segundo o Instituto Brasileiro do Cobre (Procobre) [8], a produção mundial de cobre é de aproximadamente 14 milhões de toneladas / ano, sendo que os três primeiros colocados são Estados Unidos, Chile e Japão. O Brasil, mesmo não aparecendo entre os dez maiores produtores, é responsável por cerca de 1,3% da produção mundial com aproximadamente 193 mil toneladas / ano. O consumo de cobre no Brasil é de aproximadamente 272 mil toneladas / ano, sendo a maior parte para produção de fios e cabos.



**Fig. 2 – Perfil do consumo de cobre no Brasil. Fonte: Sindicel – 2003**

O cobre é o 26º elemento mais abundante da crosta terrestre. Na parte superior da crosta terrestre (16 km de profundidade), a concentração média do cobre é de 50 ppm. Estimativas mais antigas eram de aproximadamente 100 ppm, enquanto valores mais recentes indicam de 30 a 40 ppm.

O cobre é pouco reativo o suficiente para ser encontrado nativo, porém a maior parte dele é encontrada sob a forma combinada em mais de 200 espécies minerais, mas apenas 20 destas espécies são importantes, destacando-se os sulfetos, óxidos e carbonatos, encontrados sob a forma de minérios e pedras semipreciosas (como a turquesa e malaquita). Os minérios de cobre de maior importância econômica e industrial estão listados na Tabela 1. Os minérios esmagados e moídos são separados dos excessos de rochas por **flotação**. O cobre metálico pode ser obtido por **pirometalurgia** (o minério enriquecido é aquecido a altas temperaturas) ou **hidrometalurgia** (os íons  $\text{Cu}^{2+}$  são obtidos pela ação do  $\text{H}_2\text{SO}_4$  sobre o minério e o metal obtido após a redução eletroquímica da solução aquosa). O cobre impuro obtido por ambos os processos é refinado eletroquimicamente: ele é transformado em ânodos, e é depositado no cátodo como cobre puro. Os metais raros – mais notadamente, platina, prata e ouro – obtidos como escória do ânodo (lama anódica) são vendidos para pagar os custos da eletricidade consumida na eletrólise [9].

**Tabela 1** – Principais espécies minerais do cobre

<b>Minerais</b>	<b>Fórmula química</b>	<b>%Cu</b>
Cuprita	$\text{Cu}_2\text{O}$	88,8
Tenorita	$\text{CuO}$	79,9
Calcocita	$\text{Cu}_2\text{S}$	79,8
Bornita	$\text{Cu}_5\text{FeS}_4$	63,3
Malaquita	$\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$	57,5
Azurita	$2 \text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$	55,3
Calcopirita	$\text{CuFeS}_2$	34,5

O cobre metálico, com 99,9% de pureza, é utilizado na construção elétrica (motores e material), no transporte de eletricidade (cabos, barras e condutores), na fabricação de automóveis e de eletrodomésticos. As numerosas ligas de cobre são muito utilizadas na maioria das indústrias: os **latões** (liga de cobre e zinco) são moldados e trabalhados facilmente para obtenção de barras, perfilados e laminados, os **bronzes** (ligas de cobre e estanho) têm interessantes qualidades mecânicas sendo muito utilizadas em fundições e na construção de peças



mecânicas, as ligas de cobre e alumínio, assim como as ligas de cobre e níquel, resistem bem à oxidação.

O cobre metálico e os sais de cobre encontram muitas aplicações na catálise. Reações de oxidação de compostos orgânicos e inorgânicos são freqüentemente aceleradas pela presença de sais de cobre. Na determinação de nitrogênio orgânico, pelo tradicional método de Kjeldahl, o sulfato de cobre(II) catalisa a oxidação da amostra pelo ácido sulfúrico.

### **3.4 – Propriedades químicas e físicas**

O cobre é um metal que apresenta uma coloração rosa salmão bastante característica. Com número atômico 29 e massa atômica  $63,546 \pm 0,003$ , o cobre possui dois isótopos naturais,  $^{63}\text{Cu}$  (68,94%) e  $^{65}\text{Cu}$ (31,06%) e nove isótopos radioativos artificiais com massas atômicas entre 60 e 68 u.m.a. O cobre também se destaca por ser o segundo melhor condutor de calor e eletricidade, perdendo apenas para prata, apresentando uma resistividade elétrica igual a  $0,15328 \text{ ohm.m}^{-1}.\text{g}^{-1}$ . Sua condutividade e propriedades mecânicas são afetadas pela presença de impurezas, principalmente o oxigênio presente no cobre refinado. O cobre tem pontos de fusão e de ebulição  $1083^{\circ}\text{C}$  e  $2595^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, e uma densidade igual a  $8,9592 \text{ g.cm}^{-3}$  para o cobre puro [10].

Na tabela periódica, o cobre está localizado no quarto período e grupo 11, acima da prata e do ouro. Sua distribuição eletrônica irregular ( $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4s^1$ ), apresentando saque de elétrons, faz com que, além das características típicas de um metal de transição, em algumas situações ele se assemelhe aos metais alcalinos. Assim, por causa desta configuração atípica, o cobre normalmente forma compostos que apresentam números de oxidação +1 e +2, embora se tenha notícia de alguns compostos que apresentam números de oxidação +3, +4 e zero, mas sem grande importância comercial. Embora seja muito raro encontrarmos minas de cobre metálico, observa-se pelos valores dos potenciais de redução padrão, apresentados na Tabela 2, que o cobre metálico é o estado de oxidação preferencial, se assemelhando aos seus companheiros de grupo prata e ouro.

**Tabela 2 – Potenciais de redução padrão do cobre.**

Reação de redução	$\epsilon^\circ$
$\text{Cu}^+ + e^- \rightarrow \text{Cu}$	+ 0,52 V
$\text{Cu}^{2+} + 2e^- \rightarrow \text{Cu}$	+ 0,34 V
$\text{Cu}^{2+} + e^- \rightarrow \text{Cu}^+$	+ 0,15 V
$\text{Cu}^{3+} + e^- \rightarrow \text{Cu}^{2+}$	+ 1,83 V

A dissolução do cobre metálico requer o uso de agentes oxidantes ou agentes complexantes fortes, que estabilizem um dos cátions do metal. Veja, por exemplo, a dissolução do cobre metálico usando ácido nítrico (eq. 1) ou usando cianeto de potássio (eq. 2):



O ácido sulfúrico dissolve o cobre metálico apenas em condições oxidantes, tais como altas concentrações do ácido e altas temperaturas (eq. 3):

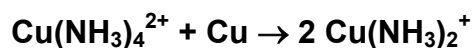


A configuração eletrônica do íon Cu(I) é representada por  $[\text{Ar}]3d^{10}$ . Os compostos são diamagnéticos e incolores, exceto onde ocorre transferência de cargas. O Cu(I) é isoeletrônico com o Zn(II) o que torna a estequiometria de ambos similares, como por exemplo, os haletos cuprosos (CuCl, CuBr e CuI) que apresentam a mesma estrutura cristalina da blenda, ZnS. O nível 3d totalmente preenchido faz com que ocorra a estabilização dos campos não ligantes e as distorções eletrônicas sejam minimizadas. A estequiometria do Cu(I) é determinada, principalmente, pelo tamanho dos ânions, assim como pelas forças covalentes e eletrostáticas presentes. A estereoquímica preferencial do Cu(I) é a tetraédrica, embora alguns compostos possam apresentar estrutura linear ( $\text{CuCl}_2^-$

). É importante destacar que o íon Cu(I) livre não é estável em soluções aquosas, tendendo a se desproporcionar em Cu(II) e cobre metálico na ausência de ligantes que o estabilizem. A meia reação é apresentada abaixo, e o seu potencial padrão é +0,37V:



A esta reação corresponde uma constante de equilíbrio igual  $1,8 \times 10^6$ , a 25°C, o que significa que o íon Cu(I) não pode existir numa concentração apreciável em solução aquosa, salvo se estabilizado por ligantes como amônia, cloreto e cianeto formam-se complexos estáveis de Cu(I), como o já bastante conhecido diamincobre(I):



Compostos como Cu<sub>2</sub>S, CuCN e haletos de Cu(I) são estáveis, porém são insolúveis em água.

O íon Cu(II), cuja distribuição eletrônica é representada por [Ar]3d<sup>9</sup>, é predominantemente azul e seu elétron desemparelhado faz com que os seus compostos apresentem características paramagnéticas. A maioria dos compostos de Cu(II) exibem configurações quadrado-plana ou tetragonal distorcida. Sua estrutura eletrônica 3d<sup>9</sup> dá origem ao clássico exemplo de distorção Jahn-Teller, onde a distância das quatro ligações planares são menores que as duas distâncias axiais. O íon Cu(II) é também encontrado em tetraedros distorcidos e em algumas espécies penta-coordenadas muito mais raras. A química do Cu(II) é semelhante a química de outros íons +2 de metais de transição. A adição de base a uma solução de Cu(II) leva a formação de um precipitado de Cu(OH)<sub>2</sub>. Esse hidróxido dissolve-se facilmente em ácidos e em pequena extensão em excessos de base para formar o ânion [Cu(OH)<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>. Como outros sulfetos de metais de transição, o CuS é bastante insolúvel em água.

### 3.5 – Essencialidade e toxicologia

Tabela 3 – Teor de cobre em alguns alimentos [11]

Alimento	Cu ( $\mu\text{g} / 100\text{g}$ )	Alimento	Cu ( $\mu\text{g} / 100\text{g}$ )
Água Mineral	5,2	Mel de abelha	117,4
Aguardente	15,2	Pêssego	120,0
Mamão	18,2	Manga – rosa	125,6
Manteiga	19,6	Alface	129,2
Guaraná	22,7	Morango	132,6
Abóbora moranga	21,7	Cenoura	138,7
Cerveja	24,7	Abacate	316,0
Tomate	41,0	Ovos de galinha	143,4
Leite tipo A	45,8	Pepino	160,0
Repolho	55,7	Milho seco	163,4
Melão	56,6	Brócolis	233,6
Ameixa	64,4	Beterraba	254,6
Maçã	65,8	Quiabo	269,2
Chuchu	69,4	Farinha de trigo	280,2
Limão	72,2	Vinho tinto	302,2
Pêra	73,0	Abacate	316,0
Açúcar	82,0	Alho	329,2
Melancia	88,2	Peito de frango	351,5
Berinjela	95,0	Arroz–agulha	393,0
Queijo prato	103,0	Agrião	401,4
Cebola	107,0	Ervilha enlatada	583,2
Batata inglesa	116,2	Coco da Bahia	741,6
Camarão	1186,0	Pó de café torrado	1480,8
Castanha de caju	3569,0	Amendoim torrado	1870,6
Ostra	2840,0	Marisco	3150,0

O cobre está presente sob a forma de traços na maioria dos alimentos como pode ser observado na Tabela 3 [11]. O Codex Alimentarius estabelece que não se deve consumir um teor de cobre superior a 0,5mg por kg de massa corporal [12], porém a FNB (Food Nutricional Board) definiu para o cobre uma RDA (Recommended Dietary Allowance), para um adulto, de cerca de 2,0 a 3,0 mg de cobre por dia.

O cobre é também um dos metais-traços essenciais à vida. Cerca de 18 cuproproteínas foram identificadas como participantes em vários ciclos metabólicos. São particularmente importantes aquelas enzimas participantes na transferência de oxigênio, tais como a dopamina mamífera hidroxilase e galactose oxidase [7]. Ainda no metabolismo humano, o cobre participa como catalisador na absorção e síntese de ferro heme (proveniente das células do tecido animal (carnes, peixes etc) e o ferro não-heme (encontrado nos demais alimentos (cereais, leguminosas, folhas etc) e que corresponde, normalmente, a 90% do ferro total ingerido, porém o excesso de alguns minerais na alimentação pode comprometer a absorção de ferro, como cálcio, zinco e o próprio cobre [13]. O cobre também é um promotor da maturação das proteínas e também possui atividade quimioterápica estimulando a angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) não-patológica [14]. Por outro lado, quando o cobre é ingerido em quantidades superiores a 400mg/dia pode causar náuseas, vômitos e hemorragia gastro intestinal, diarreia, anemia hemolítica, cirrose hepática crônica, icterícia, bronquite e até levar o paciente ao coma. O excessivo acúmulo de cobre no organismo provoca a lenta e gradual degeneração do cérebro e fígado característicos da Doença de Wilson, lesões nos vasos capilares do fígado e dos rins, cirrose em crianças dentre outras patologias [11, 14].

Os depósitos naturais de sulfeto de cobre(I) são a principal fonte de cobre para o crescimento de plantas. Por outro lado, quantidades de cobre maiores que as necessárias podem ser venenosas, especialmente para espécies de vidas inferiores como fungos. Sais de cobre ainda são usados como fungicidas agrícolas. O sulfato de cobre foi particularmente usado para matar fungos do gênero *Tilletia*, que causa doenças em cereais como trigo e centeio. Muitos outros

compostos de cobre foram desenvolvidos para serem usados como fungicidas e inseticidas.

### **3.6 – Reagentes orgânicos para a dosagem de cobre**

Se o chumbo é o elemento mais universalmente distribuído, como foi reivindicado por alguns, o cobre poderia ser descrito como um dos elementos mais universalmente analisados, em virtude da grande quantidade de literatura existente sobre a determinação de traços de cobre. A análise de cobre em alimentos e bebidas é necessária, pois traços do elemento podem provocar alterações de aroma e sabor. No sangue, urina e tecido humano, a presença do cobre pode ser significativa em diagnósticos médicos e explorações bioquímicas. O controle de qualidade de muitos produtos tais como papel, petróleo e ligas necessita da análise de cobre. [15]

Existem várias referências do uso de reagentes orgânicos em extrações para separação do cobre. A maioria delas faz referência à extração de cobre, sob a forma de ditizonatos e ditiocarbamatos, como uma etapa preliminar à sua determinação espectrofotométrica com um outro reagente.

Há também os inúmeros reagentes empregados em determinações gravimétricas de cobre. A  $\alpha$ -benzoinoxima foi introduzida como precipitante para cobre em 1885. A precipitação é efetuada em solução amoniacal contendo tartarato, que impede a precipitação de certos elementos pelo hidróxido de amônio. Apesar da sua baixa seletividade, a 8-hidroxiquinolina pode ser utilizada na determinação gravimétrica de cobre mediante o ajuste de pH, adição de agentes mascarantes ou extrações prévias para remoção de interferentes.

Em um meio ácido contendo um excesso de ditizona, o cobre forma um ditizonato violeta,  $\text{Cu}(\text{HDz})_2$ , que é solúvel em solventes apolares e é a base de um sensível método espectrofotométrico para cobre [16]. A absorvidade molar do  $\text{Cu}(\text{HDz})_2$  é  $4,52 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , em 550 nm, e, embora seja muito estável, o ditizonato de cobre se forma de maneira muito lenta, exigindo um longo tempo de agitação durante a extração. Metais nobres, como Pt, Pd, Au, Ag e Hg, interferem na extração, mas podem ser mascarados por uma solução 1% de iodeto de

potássio. A ditizona é utilizada para a determinação de cobre em vários materiais, como estanho, titânio e ligas de titânio [17], compostos de urânio [18] e material biológico [15].

O dietilditiocarbamato de sódio é, sem dúvida, o mais utilizado reagente orgânico em determinações espectrofotométricas de cobre [15]. A adição de uma solução aquosa de Na-DDTC a uma solução, em pH 4 - 11, contendo pequenas quantidade de Cu(II) produz um quelato insolúvel cuja estequiometria é 1:2. Colóides protetores, tipo goma arábica, estabilizam o quelato permitindo a determinação direta em solução aquosa. A sensibilidade e a precisão aumentam com a extração do dietilditiocarbamato de cobre com solventes orgânicos apolares [19] formando soluções bastante estáveis. A absorvidade molar do quelato em  $\text{CCl}_4$  é  $1,4 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , em 436 nm. O uso do EDTA, em meio tartarato ou citrato, em pH 8 a 9 mascara Fe, Mn, Ni e Co, enquanto Cd, Pb, Zn e In formam complexos incolores com o DDTC. Tálcio não interfere quando reduzido a Tl(I). Cianeto e tiosulfato também podem interferir. A maior desvantagem do Na-DDTC é a sua baixa solubilidade em solventes orgânicos e a baixa estabilidade em soluções ácidas. O reagente sofre considerável decomposição em 5 minutos em pH 5.

Em função dos problemas de solubilidade e estabilidade do Na-DDTC, vários outros derivados do reagente foram sugeridos em sua substituição. O dietilditiocarbamato de dietilamônio [20], que é solúvel em  $\text{CHCl}_3$  e estável em meio ácido. O dietilditiocarbamato de chumbo [15],  $\text{Pb}(\text{DDTC})_2$ , também solúvel em  $\text{CHCl}_3$  e que forma quelatos com o cobre por deslocamento do chumbo. O dietilditiocarbamato de zinco [21], que é solúvel em  $\text{CCl}_4$  e  $\text{CHCl}_3$ , é menos seletivo que o  $\text{Pb}(\text{DDTC})_2$ , mas é mais resistente à decomposição em meio fortemente ácido.

O ácido rubeânico também foi utilizado com uma certa freqüência na determinação de cobre [22]. O reagente combina-se com o cobre alcançando absorvância máxima em 425 nm. A reação obedece à lei de Beer numa faixa de 2-12  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  e pequenas quantidades de Co e Ni interferentes são mascaradas com EDTA.

Nos últimos anos, vários reagentes orgânicos foram utilizados na preconcentração de cobre. Em 1989, Santelli, Galego e Valcárcel [23] desenvolveram um método seletivo para absorção atômica para a pré-concentração de cobre após a precipitação, em fluxo, com ácido rubeânico. O precipitado é separado por filtração contínua e dissolvido por uma mistura de  $K_2Cr_2O_7$  e  $HNO_3$ . O sistema apresentava uma faixa de aplicação de 0,3 – 200  $ng.mL^{-1}$ , frequência de amostragem entre 1 e 20  $h^{-1}$  e um fator de preconcentração de 500 vezes.

Perez-Cid, Rio-Segade e Bendicho [24] determinaram o teor de cobre na água mineral comercial da Galícia, Espanha, através de uma extração em fase sólida usando sílica gel recoberta com Na-DDTC e posterior determinação por FAAS. A preconcentração do cobre foi estudada em sistemas em fluxo e em batelada. Para as amostras analisadas foram encontrados teores de cobre variando de 8,4 a 23,8  $\mu g.L^{-1}$ . Os valores obtidos foram comparados com o tradicional sistema de extração com solventes e não apresentou diferenças significativa entre os métodos.

Araújo, Costa e Alonso-Chamarro [25] desenvolveram um sistema FIA para análise de espectrofotométrica de cobre baseado na preconcentração em uma mini-coluna contendo PEI (polietilenimina) imobilizada em sílica-gel. Depois da etapa de enriquecimento, o cobre é eluído com  $HNO_3$  e pós-derivatizado com PAR para análise espectrofotométrica. O sistema apresenta uma frequência de amostragem de 24 e 12  $h^{-1}$  com limites de detecção 25 e 13  $\mu g.L^{-1}$ , respectivamente.

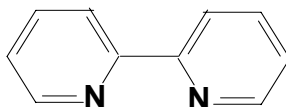
Ferreira [26, 27] e colaboradores desenvolveram duas metodologias para separação e pré-concentração de cobre, através da extração em fase sólida, utilizando a resina Amberlite XAD-2 recoberta com calmagita. No primeiro, os autores utilizaram um sistema envolvendo colunas de vidro e eluição por gravidade para análise de águas naturais e no segundo, utilizou mini-colunas acopladas ao FAAS para determinações em fluxo em material biológico.



## **4 – 2,2'-BIQUINOLINA E DERIVADOS DA 1,10-FENANTROLINA**

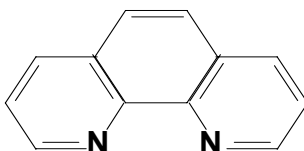
### **4.1 – Considerações gerais** [5, 10]

As primeiras referências a respeito da 2,2'-bipiridina (figura 3) e 1,10-fenantrolina (figura 4) datam do final do século XIX. Em 1888, Fritz Blau sintetizou a 2,2'-bipiridina e relatou a excepcional capacidade deste reagente em formar compostos intensamente coloridos com sais de ferro. A descoberta incentivou Blau a estudar com mais detalhes as propriedades destes compostos [28].



**Fig. 3 – Estrutura da 2,2'-Bipiridina**

Continuando suas investigações, Blau sintetizou em 1898 um novo reagente, a 1,10-fenantrolina, que apresentava uma reatividade semelhante à da 2,2'-bipiridina frente aos sais de ferro.



**Fig. 4 – Estrutura da 1,10-Fenantrolina**

A síntese destes dois reagentes foi de grande importância na elucidação da química do ferro e de outros elementos. Com estes dois reagentes, Fritz Blau preparou e caracterizou complexos de Fe(II) e Fe(III), descobriu a natureza reversível da oxidação de complexos de Fe(II), sintetizou complexos de Ni(II), Co(II) e Cu(II) com a 2,2'-bipiridina e 1,10-fenantrolina entre outras descobertas.

Mesmo quando as aplicações analíticas de determinadas reações são bastante óbvias, freqüentemente nenhum uso imediato é feito delas. Apesar de Blau descrever com detalhes a intensa coloração dos complexos de ferro com

2,2'-bipiridina e 1,10-fenantrolina, o primeiro registro de aplicações analíticas destas substâncias ocorreu quase 40 anos depois. Só em 1931 perceberam que o complexo formado com o ferro(II) e a 1,10-fenantrolina apresentava um alto potencial de oxidação e por isso foi usado como indicador de oxi-redução para ferro em alguns procedimentos analíticos [28].

O primeiro método espectrofotométrico envolvendo a 1,10-fenantrolina foi proposto por Fortune e Mellon [29]. O ferro foi reduzido a Fe(II) com cloreto de hidroxilamina e misturado a uma solução contendo um excesso de 1,10-fenantrolina. A reação forma um complexo colorido hexavalente, do tipo  $\text{Fe}(\text{fen})_3^{2+}$ , com absorvância máxima em 508nm. O sistema obedece a lei de Beer numa faixa de concentração de 0,10 a 6,00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e pode ser aplicado numa faixa de pH variando de 2,0 a 9,0. O complexo é estável por cerca de 6 meses, incluindo 100 horas sob radiação ultra-violeta. O ferro pode ser reduzido por vários agentes redutores, como sulfito de sódio, formiato de sódio e formaldeído, porém o cloreto de hidroxilamina é preferível por não formar complexos com Fe(II). Embora a reação seja muito sensível para o ferro, vários íons, principalmente os divalentes, interferem formando complexos coloridos como o Ni(II), Co(II), e Cu(I) e (II), e também complexos incolores, como Zn(II) e Cd(II), que, embora não absorvam na região do visível, concorrem no consumo do reagente cromogênico.

O sucesso na determinação do ferro fez com que outros trabalhos surgissem usando a 1,10-fenantrolina. Margerum e Banks [30] determinaram ferro extraíndo o íon  $\text{Fe}(\text{fen})_3^{2+}$  sob a forma de perclorato usando o nitrobenzeno como solvente. Hibbits, Davis e Menke [31] sugeriram o uso de ácido cítrico, em pH 4,0, para a eliminação de 68 interferentes e apenas o Cr(III), Cr(VI), Co, Ni, Rh, e Pd continuaram interferindo.

Nos últimos anos, a 1,10-fenantrolina tem sido usada em métodos para pré – concentração ou sistemas automatizados de análise. Sultan e colaboradores [32] desenvolveram um sistema FIA para a determinação de vitamina C. No método, a vitamina C é injetada numa linha contendo Fe(III) e misturada à 1,10-fenantrolina em meio sulfúrico 0,05  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . O sistema analisa 100 amostras por hora e foi aplicado para uma concentração de vitamina de 100 – 400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Zaporozhets e colaboradores [33] desenvolveram um método para a determinação de Fe(II), Cu(II) e Ag(I) em águas usando sílica-gel modificada com 1,10-fenantrolina. A sílica-gel modificada é colocada em contato com uma solução tamponada da amostra e, depois de completada a reação, levada para análise por reflectância.

Segundo Alfred Schilt [28], embora a 1,10-fenantrolina e 2,2'-bipiridina formem complexos coloridos com o cobre, principalmente o Cu(I), esses reagentes raramente são usados para a determinação de cobre por causa da alta interferência do ferro. Especificamente para análise de cobre é recomendado o uso dos derivados substituídos destes reagentes, que apresentam em sua estrutura grupos metil ou outros alquil substituintes adjacentes aos átomos de nitrogênio heterocíclico.

#### 4.2 – Seletividade da Cuproína e derivados da 1,10-fenantrolina

Um grande número de compostos se assemelham com a 1,10-fenantrolina e a 2,2'-bipirina formando complexos intensamente coloridos com Fe(II) que apresentam espectros de absorvância similares. Após examinar vários desses compostos alifáticos e aromáticos, Krumholtz [34] concluiu que a presença do grupamento  $\alpha$ - $\alpha'$ -di-imino em todos estes compostos era o responsável por esta alta reatividade.

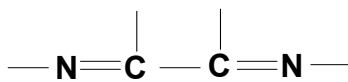


Fig. 5 – Grupo Ferroína

Os compostos contendo o grupo ferroína (figura 5) formam quelatos estáveis contendo anéis com cinco membros, e estequiometria **3:1 (ML<sub>3</sub>)** ou **2:1 (ML<sub>2</sub>)** com vários metais, principalmente Fe(II) e Cu(I). Como a absorvidade molar do quelato com Fe(II) ( $\epsilon = 11,10 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) é maior que a do quelato com Cu(I) ( $\epsilon = 7,25 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), a 1,10-fenantrolina não é recomendada como reagente para o cobre. Entretanto, observou-se que alguns compostos

derivados da 1,10-fenantrolina e 2,2'-bipiridina, que apresentam substituintes adjacentes ao nitrogênio do grupo  $\alpha$ - $\alpha'$ -di-imino, não apresentam a característica coloração para Fe(II), porém continuam apresentando intensa coloração para o Cu(I). Esse grupamento é conhecido como grupamento cuproína (figura 6):

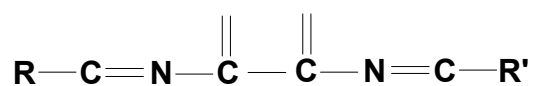


Fig. 6 – Grupo Cuproína (R e R'  $\neq$  H)

Assim, a 1,10-fenantrolina pode ser convertida num reagente específico para Cu(I) com a adição de grupos metil nas posições 2- e 9- adjacentes aos nitrogênio heterocíclico.

Por causa do impedimento estérico provocado pela adição dos dois grupos **CH<sub>3</sub>**, a 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (neocuproína) não pode formar quelatos **3:1**, ou **2:1 quadrado-plano**, com qualquer cátion. Entretanto, os grupos **CH<sub>3</sub>** não interferem com a coordenação do Cu(I) ou do Cu(II), que formariam quelatos **2:1 tetraédricos**, **CuL<sub>2</sub><sup>+</sup>** (colorido) e **CuL<sub>2</sub><sup>2+</sup>** (incolor), porém são encontrados no plano formando um ângulo reto. Esses quelatos do Cu(I) e Cu(II) podem ser extraídos com álcool amílico ou outros solventes orgânicos. Na figura 7, temos um exemplo de um desses quelatos para Cu(I) sob a forma **CuL<sub>2</sub>X**, onde **X<sup>-</sup>** é o ânion cloreto ou outro ânion extraível [35, 36].

G. Smith [37] foi um dos primeiros a estudar com mais detalhes os derivados da 2,2'-bipiridina, 1,10-fenantrolina, 2,2'-biquinolina e terpiridina. O autor fez alguns prognósticos das propriedades físico-químicas dos derivados mono, bi, tri e tetra substituídos por grupos alquilo e arilo, como por exemplo, o aparecimento do impedimento estérico e as complicações nas modificações estruturais em configurações coplanares e não-coplanares. Também levantou a importância da dificuldade de síntese de alguns derivados, principalmente os que envolvem reações de Skraup, que, mesmo muito sensíveis como reagentes analíticos, eram comercialmente inviáveis.

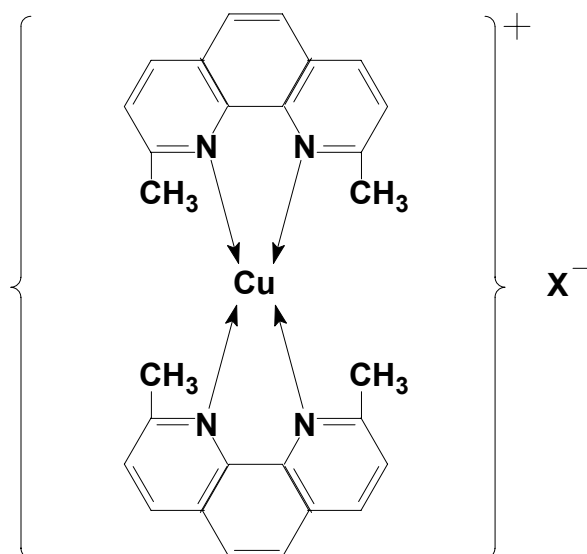


Fig. 7 – Quelato da neocuproína com o Cu(I) extraído com álcool amílico

Além das substituições nas posições 2- e 9- por grupos metila, outras posições e outros grupos foram tentados. Em 1955, Wilkins e colaboradores [38] propuseram a síntese de 11 novos derivados da 1,10-fenantrolina, e determinamos seus respectivos comprimentos de onda de absorção máxima, utilizando grupos substituintes como difenila, etila, dietila, difenoxi, dimetoxi e amino nas posições 2- e 9-, 4-, 5-, 4- e 7-, 5- e 6-. Confirmando as expectativas, o único reagente seletivo para Cu(I) foi o 2,9-difenil-1,10-fenantrolina, que apresenta a substituição na posição 2- e 9- adjacente aos nitrogênio heterocíclicos. Todos os outros formaram quelatos com Fe(II) e Cu(I).

A Tabela 4 apresenta um resumo das propriedades espectrofotométricas dos quelatos de Cu(I) e Fe(II) com a 1,10-fenantrolina, derivados alquil-substituídos e reagentes correlatos. A maioria dos quelatos foi obtida por extração com solventes orgânicos como álcool iso-amílico e butílico.

Tabela 4 – Quelatos de Cu(I) e Fe(II) da 1,10-fenantrolina e reagentes correlatos.[39]

Reagente	Cu(I)		Fe(II)	
	$\lambda_{max}$ (nm)	$\epsilon \times 10^3$	$\lambda_{max}$ (nm)	$\epsilon \times 10^3$
1,10-fenantrolina	435	7,25	508	11,1
<i>Neocuproína</i>	455	7,95	-	-
Batofenantrolina	457	12,1	533	22,4
<i>Batocuproína</i>	479	14,2	-	-
2,2'-Bipiridina	435	4,5	522	8,7
4,4'-Difenil-2,2'-Bipiridina	463	9,6	552	21,1
2,2',2''-Terpiridina	-	-	552	12,5
4,4',4''-Trifenil-2,2',2''-Terpiridina	-	-	583	30,2
<i>2,2'-Biquinolina (Cuproína)</i>	545	6,5	-	-
4,4'-Difenil-2,2'-Biquinolina	559	9,0	-	-
4,4'-Dihidroxi-2,2'-Biquinolina	525	6,9	-	-
4,4'-Bis-(4-etoxicarbonilamilino)-2,2'-Biquinolina	556	17,4	-	-
2,4,6-Tripiridil-1,3,5-Triazina (TPTZ)	-	-	594	22,6
3-(2-Piridil)-5,6-difenil-1,2,4-Triazina (PDT)	488	8,0	555	23,5
3-(2-Piridil)-5,6-bis-(4-ácido fenilsulfônico)-1,2,4-Triazina (Ferrozina)	470	4,3	562	27,9

### 4.3 – Aplicações da 2,2'-Biquinolina

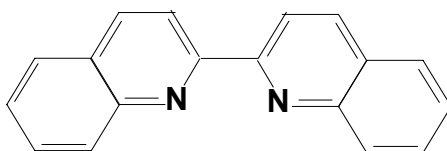


Fig. 8 – Estrutura da 2,2'-Biquinolina

A 2,2-Biquinolina (figura 8) é sintetizada a partir da condensação de Friedländer da metil-quinolil-cetona com o *o*-aminobenzaldeído ou a partir da desidrogenação catalítica da quinolina. Possui fórmula molecular  $C_{18}H_{12}N_2$  e massa molecular 256,28 e é encontrada comercialmente sob a forma de cristais incolores com PF = 196°C. É pouco solúvel em água ( $6,4 \times 10^{-5} \text{ g.L}^{-1}$ ), mas solúvel em ácido diluído, metanol, álcool iso-amílico ( $2 \text{ g.L}^{-1}$ ), ácido acético, acetato de isoamila, dimetilformamida (DMF), acetonitrila e tetracloreto de carbono e é muito solúvel em DMF,  $pK_a = 3,10$  ( $\mu = K_2SO_4$  0,1M, 25°C). [5]. A 2,2'-Biquinolina é também conhecida pelos sinônimos: 2,2'-Biquinolil, 2,2'-Diquinolina, 2,2'-Diquinolil, Cuproína e 2-(2-Quinolil)-Quinolina [39].

Embora vários outros pesquisadores já tivessem constatado a alta reatividade do 1,10-fenantrolina e de reagentes correlatos para cobre, o primeiro estudo sobre a possibilidade do uso destes como reagentes analíticos foi proposto por Hoste [40]. Ele sintetizou e estudou 10 reagentes que continham o grupo ferroína e cuproína, entre eles a 1,10-fenantrolina, 2,2'-bipiridina e a 2,2'-biquinolina. Numa primeira etapa, o autor realizou um estudo comparativo dos quelatos de Cu(I) e concluiu que, exceto pela 1,10-fenantrolina e 2,2'-bipiridina, todos os outros reagentes formavam quelatos extraíveis com solventes imiscíveis em água e formavam complexos muito estáveis, sensíveis e específicos em meio ácido. Embora o 2-piridil-2'-quinolina fosse o reagente mais sensível entre os específicos, devido à sua síntese muito difícil, ele não foi recomendado como reagente analítico. Numa segunda etapa, o autor realizou um estudo da cuproína como reagente analítico para cobre. Segundo Hoste, embora fosse o quarto

reagente mais sensível entre os 10 estudados, a recomendação da cuproína advinha da sua síntese fácil, coloração rosa intensa, alta estabilidade, extração quantitativa com álcool iso-amílico e a não necessidade de um controle rigoroso do pH da solução a ser analisada.

Depois, em 1953, o próprio Hoste e colaboradores [41] estenderam seus estudos para a determinação espectrofotométrica de cobre, previamente reduzido a Cu(I) com cloreto de hidroxilamina, usando a cuproína. Primeiro, foram realizados estudos para a determinação do espectro de absorção molecular do quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ , extraído com álcool iso-amílico, com um máximo de absorvância em 546 nm e uma absortividade molar  $\epsilon = 6430 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  e apresentando intensa coloração rosa. Depois foi realizado um estudo sistemático de parâmetros como natureza do solvente, coeficiente de distribuição de extração ( $D = 1680$ ), tempo de agitação (mínimo de 50 s.), estabilidade do quelato (cerca de 72 h), influência do pH na extração (pH 2-9), íons interferentes (apenas  $\text{CN}^-$  e oxalato interferem), temperatura (17 a 23°C), qualidade do álcool iso-amílico, excesso de reagente (mínimo de 0,02%), obediência a lei de Beer (1-10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) apresentando erros menores que 1%. Ao final do estudo, os autores aplicaram o método para análise de traços de cobre em plantas, tecidos animais, plasma sanguíneo, águas, negro-de-fumo e aços.

Guest [42] também fez uso da cuproína para análise de cobre, reduzindo o Cu(II) com cloreto de hidroxilamina em meio ácido. Embora este trabalho não difira muito dos anteriores, o autor teve uma grande preocupação em avaliar o efeito do pH e do tempo de agitação da etapa de extração para várias concentrações de cobre. Também houve a comparação entre os solventes álcool iso-amílico e n-amílico, não se constatando diferença significativa no uso de ambos. Ao fim de suas investigações, o autor aplicou a metodologia na análise de várias ligas e minérios certificados e, ao contrario de Hoste [40, 41], destacou a importância do controle rigoroso do pH, pois, segundo ele, as extrações só seriam completas, para intervalos de tempo entre 30 e 120 segundos, em numa faixa de pH entre 4,4 e 7,5.



Elwell [43] propôs a aplicação do procedimento de Hoste em amostras de ligas cromadas utilizando citrato de sódio para prevenir a precipitação de hidróxidos de metais interferentes. O problema foi que para ligas contendo um teor de crômio acima de 5% o procedimento não era satisfatório. A explicação para tal fenômeno só veio mais tarde, quando Irving e Tomlinson [44], em 1968, descobriram que o Cr(III), o Cu(II) e o citrato formavam um complexo ternário, Cr(III)-Cu(II)-(citrato)<sub>2</sub>, impedindo a formação do quelato com a cuproína. Os autores também descobriram que metais como Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II) e Zn(II) podiam deslocar o cobre neste complexo ternário, formando complexos do tipo Cr(III)-Fe(II)-(citrato)<sub>2</sub>, liberando o cobre, e este último é reduzido a Cu(I) podendo assim ser determinado normalmente. Com essa explicação, é possível entendermos o porquê nas amostras analisadas por Elwell que continham um excesso de Fe(II) os resultados foram satisfatórios enquanto na situação contrária isso não era possível.

Pflaum e colaboradores [45] conseguiram um grande avanço no uso da cuproína na análise de cobre ao introduzirem o uso da dimetilformamida (DMF) como solvente. Todos os trabalhos desenvolvidos até então envolviam uma etapa de extração com solvente imiscível com água, principalmente o álcool iso-amílico, porém, como a cuproína e o seu quelato com o Cu(I) são totalmente solúveis em DMF, é possível a determinação direta de cobre numa solução de água-DMF (1:1 v/v) numa faixa de pH entre 5 e 7. A outra grande vantagem é que o DMF reduz o Cu(II) a Cu(I), eliminando também a necessidade da introdução de um redutor auxiliar, como o cloreto de hidroxilamina, ao processo. Apesar das vantagens, o sistema apresenta alguns problemas de interferência como a redução de Ag ao estado metálico, a precipitação de Al, Fe e Pb eliminada pela adição prévia de tartarato. Outro problema é a presença de Fe(III) e oxidantes similares que interferem no desenvolvimento da cor. São toleradas apenas baixas concentrações de Fe(II) e a redução prévia do Fe(III) com o cloreto de hidroxilamina. Um detalhe curioso é que os autores obtiveram espectros na região do UV da cuproína ( $\lambda=325$  nm) e do seu quelato ( $\lambda=358$  nm e  $\epsilon = 5,20 \times 10^4$  L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>), mostrando que o sistema é bastante sensível nesta região, porém os

autores nada justificam ao optarem pelo comprimento de onda tradicional ( $\lambda=545\text{nm}$  e  $\varepsilon = 6,45 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) bem menos sensível.

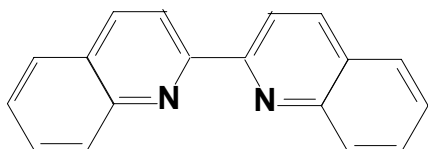
Shanahan e Jenkins [46] aplicaram a cuproína, em presença de DMF, na determinação direta de cobre em matrizes com alto teor de ferro. Embora não difira muito do trabalho anterior e os autores reconheçam a baixa sensibilidade do método proposto, o trabalho apresenta um estudo sistemático do efeito da variação de vários componentes, como a cuproína, cloreto de hidroxilamina e HCl. A grande novidade é a introdução do ácido ascórbico como redutor auxiliar em substituição à hidroxilamina.

A cuproína também foi utilizada em outras aplicações analíticas fora do campo da espectrofotometria de absorção molecular. Em 1991, Carrera e colaboradores [47] realizaram o enriquecimento do cobre num papel de filtro recoberto com uma fina camada de carvão ativo. Depois de passada a amostra, o carvão era levado a uma centrífuga, juntamente com uma mistura de acetonitrila e  $\text{HClO}_4$ . Ao final da centrifugação, uma alíquota do sobrenadante era retirada e levada a um polarógrafo de pulso diferencial. O método foi aplicado para análise de água do mar e apresentou um limite de detecção de  $0,33 \text{ ng.mL}^{-1}$ .

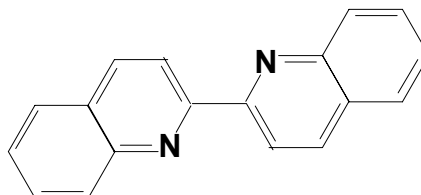
Gao e colaboradores [48] desenvolveram um método sensível e seletivo utilizando um eletrodo de carbono modificado com Nafion e cuproína para a preconcentração e análise de  $\text{Cu(I)}$  por voltametria de pulso diferencial. O método foi utilizado na análise de amostras biológicas e apresenta um  $\% \text{RSD} = 4,4\%$  e limite de detecção de  $1 \text{ nmol.L}^{-1}$ .

Em 1998, Chung e colaboradores [49] sugeriram um teste semiquantitativo utilizando uma coluna de vidro de  $3,0 \times 0,1 \text{ cm}$  contendo uma pequena massa de XAD-2 ou XAD-4 impregnada com uma solução de cuproína em metanol. Usando uma seringa, a amostra previamente tratada com tampão pH 6, cloreto de hidroxilamina e tartarato de sódio, era injetada na coluna que ao final era lavada com água. Apesar de bem simples, este método permite a análise de cobre com um limite de detecção de  $1,0 \text{ ng.mL}^{-1}$ , embora agentes complexantes como cianeto, EDTA e fosfato possam interferir.

Benali e colaboradores [50] e Chowdhury e colaboradores [51] investigaram a estrutura da cuproína através das técnicas de espectroscopia UV-VIS e análise de superfície por espalhamento Raman (SERS) e descobriram a existência de dois isômeros *cis* (figura 9) e *trans* (figura 10), sendo que a forma *cis* é a predominante e a mais reativa.



**Fig. 9 – Estrutura da *cis* - cuproína**



**Fig. 10 – Estrutura da *trans* - cuproína**

#### 4.4 – Aplicações da 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina

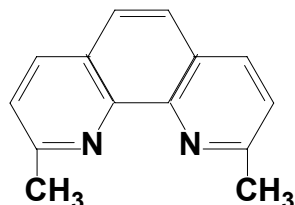


Fig. 11 – Estrutura da 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina

A 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (figura 11), também conhecida como neocuproína, é obtida a partir de uma dupla síntese de Skraup entre a *o*-fenilenodiamina e o crotonaldeídodiacetato. Possui fórmula molecular  $C_{14}H_{12}N_2$  e peso molecular 208,25. O material anidro é um pó branco, com ponto de fusão  $167^{\circ}C$ , obtido pela recristalização em solventes apolares, como o benzeno. O diidrato é obtido pela recristalização em água e tem ponto de fusão  $140^{\circ}C$ . Muitos dos reagentes obtidos comercialmente são hidratados, e seus pontos de fusão variam de  $158$  até  $162^{\circ}C$ , dependendo dos graus de hidratação. É ligeiramente solúvel em água, mas é facilmente solúvel em etanol, álcool amílico, álcool iso-amílico, *n*-hexanol, clorofórmio e benzeno e ácidos minerais diluídos.  $pK_a = 5,85$  ( $\mu = KCl$   $0,1M$ ,  $25^{\circ}C$ ) [5].

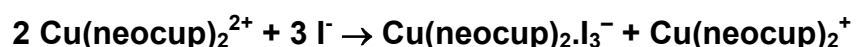
O uso da neocuproína como reagente espectrofotométrico para cobre foi inicialmente sugerido por Smith e McCurdy [52]. O cobre, previamente reduzido a  $Cu(I)$  com cloreto de hidroxilamina, forma um quelato laranja com  $Cu(I)$ , do tipo  $CuL_2^+$ , com a neocuproína, solúvel em álcool iso-amílico e com absorvância máxima em  $454\text{ nm}$  e  $\epsilon = 7950\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . O complexo é estável por 17 dias numa faixa de pH de 3 a 10. A lei de Beer é obedecida numa faixa de 1 a  $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O sistema é altamente seletivo e não apresentou interferência na presença dos principais cátions e ânions. O procedimento foi aplicado em matrizes ricas em ferro, em pH de 4 a 6, utilizando cloreto de hidroxilamina como redutor, ácido cítrico como mascarante e *n*-hexanol como solvente para extração.

Gahler [53] sugeriu um procedimento para a determinação de cobre utilizando uma mistura etanol-clorofórmio no lugar do álcool iso-amílico proposto inicialmente. O quelato absorve em 457 nm e obedece a lei de Beer numa faixa de 0,4 a 8,0  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ . O quelato é estável por 4 dias e pode ser aplicado para uma faixa de pH entre 2,3 até 9,8. Embora o autor afirme que a ordem de adição dos reagentes não seja importante, ele recomenda a adição do citrato de sódio, para evitar a precipitação de alguns metais presentes, após o ajuste do pH. O cobre é completamente extraído com 30 segundos, mas por garantia são recomendadas duas extrações com 10 e 5 mL de clorofórmio. O método foi aplicado com sucesso para análise de uma série de ligas e minérios de Fe, Ni, Cr e Pb, todos certificados. O método proposto por Gahler foi usado por Fulton e Hastings [54] para analisar cobre em alumínio de alta pureza (99,6 – 99,99% de Al) e soldas de Pb-Sn. O método é sensível e preciso para teores de cobre entre 0,002 - 1,00% nas amostras de alumínio e entre 0,004 – 0,4% nas amostras de solda.

Luke [55] sugeriu a adição de dietilditiocarbamato de dietilamônio (DDC) ao sistema cobre–neocuproína para aumentar a seletividade e sensibilidade do sistema. O procedimento consistia em adicionar 0,1g de DDC aos 10mL de extrato etanol – clorofórmio contendo o quelato  $\text{Cu}(\text{neocup})_2^+$  e medir a absorvância da mistura em 435 nm. O sistema foi testado em amostras sintéticas contendo 20 $\mu\text{g}$  de cobre na presença de 100 $\mu\text{g}$  de vários metais escolhidos aleatoriamente. Foi observado que a recuperação do cobre foi menor na mistura contendo Zr e Hf.

Em 1969, Lindsay e Plock [56] propuseram a extração do quelato cobre - cuproína com uma mistura etanol–clorofórmio para análise do metal em plutônio. O sistema, que absorve em 457 nm, obedece a lei de Beer de 0,8 a 8,0  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  na presença de 300mg de plutônio.

Yamamoto e colaboradores [57] propuseram um método espectrofotométrico para a determinação de traços de iodeto. O método é baseado na redução em fase aquosa do  $\text{Cu}(\text{neocup})_2^{2+}$  à  $\text{Cu}(\text{neocup})_2^+$  pelo íon iodeto e subsequente extração do par iônico  $[\text{Cu}(\text{neocup})_2]_2\text{I}_3$  com cloro-benzeno.



Para a reação acontecer, é necessário uma concentração molar mínima do quelato do Cu(II) cinco vezes maior que a concentração do ânion iodeto, e a faixa de pH ótima é de 3 a 5. O sistema obedece a lei de Beer de 0,6 a 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de iodeto. CN<sup>-</sup> e SCN<sup>-</sup> precipitam o cobre enquanto Ag, Hg(II) e Cd precipitam com o iodeto, entretanto, Cl<sup>-</sup> e F<sup>-</sup> (2000:1) e Br<sup>-</sup> (50:1) não interferem. Todos os experimentos tiveram suas amostras medidas nos comprimentos de onda 370 e 455nm para uma posterior comparação, porém, por apresentar uma sensibilidade cerca de três vezes maior e uma maior seletividade, o comprimento de onda 370nm foi escolhido ao final das investigações.

Larsen [58] determinou cobre em fertilizantes usando a neocuproína. O método consistia em, num balão de 50mL, adicionar alíquotas das amostras contendo entre 3 a 50 µg.mL<sup>-1</sup> de cobre juntamente com 12 mL de uma solução de EDTA 5% para extração do cobre. A este extrato, adicionar 1g de cloreto de hidroxilamina, 10 mL de uma solução tampão contendo ácido nitriloacético e tris-(hidroximetil)-amino-metano e 5mL de uma solução de neocuproína 0,002% dissolvida em 2-propanol 50%. As amostras foram medidas em 450 nm, após 10 min e 24 horas de espera, respectivamente, tendo como referência uma solução em branco sem a neocuproína.

Besada [59] sugeriu um método espectrofotométrico para análise de adrenalina pela reação da mesma com Cu(neocup)<sub>2</sub><sup>2+</sup>. Após a reação, a concentração de adrenalina é diretamente proporcional à concentração de Cu(neocup)<sub>2</sub><sup>+</sup> formado. Num balão de 25mL adiciona-se alíquotas contendo de 10 a 60 µg de adrenalina, 10mL de tampão acetato pH 6,84 e 2mL de uma solução aquosa de Cu(II)-neocuproína. Após 12 minutos, as amostras são medidas em 458 nm contra um ensaio em branco do reagente. O sistema obedece a lei de Beer numa faixa de concentração de 0,4 a 2,4 µg.mL<sup>-1</sup> de adrenalina numa faixa de pH entre 6,8 e 8,6. Vários interferentes como aminoácidos, açúcares, efedrina, cloretos e sulfatos foram tolerados em até 10 vezes, e Procaína foi tolerada em até 1000 vezes. O método foi aplicado para análise de adrenalina pura e em vários medicamentos. O mesmo autor sugeriu um método semelhante ao anterior para análise de cinco tipos diferentes de hidrazinas [60] na presença de tampão

tetraborato de sódio pH 9,3. O sistema obedece a lei de Beer entre 0,4 e 1,6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  numa faixa de pH entre 8,6 e 9,6. É importante destacar que outros redutores, como ácido ascórbico, interferem seriamente, enquanto substâncias como uréia, açúcares e ácidos orgânicos são toleradas em concentrações inferiores a dez vezes.

Nagahiro e Uesugi [61] desenvolveram um método de preconcentração para cobre utilizando naftaleno modificado com tetrafenilborato e neocuproína. O adsorvente é preparado pela mistura de tetrafenilborato e naftaleno dissolvidos em acetona. Essa mistura é gotejada numa solução de neocuproína dissolvida em HCl 0,2 mol.L<sup>-1</sup>. Depois de filtrado e seco, o adsorvente é guardado num refrigerador. Para análise, uma alíquota da amostra, contendo de cobre, tampão pH 4,8 e cloreto de hidroxilamina, é carregada através de uma coluna contendo 0,2g de adsorvente em uma vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. O adsorvente colorido é dissolvido em 5mL de carbonato de propileno e sua absorvância medida em 456 nm contra um branco do reagente. A adsorção é completa numa faixa de pH entre 3,8 a 7,3, e não é afetada por variações de vazão e volume da amostra. O sistema obedece a lei de Beer entre 0,4 – 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com  $\varepsilon = 7,8 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . Pd, W e oxalato interferem acima de 500 vezes. O método foi aplicado com sucesso para análise de cobre em ligas de zinco, ligas de magnésio e água do mar.

Itabashi e colaboradores propuseram dois sistemas de análise por injeção de fluxo (FIA) para a determinação espectrofotométrica indireta de vanádio [62] e de agentes complexantes [63] aproveitando as características redox do quelato  $\text{Cu}(\text{neocup})_2^{2+}$ . No primeiro, um método espectrofotométrico indireto por FIA é sugerido para a determinação de traços de V(IV). Na presença da neocuproína e tampão acetato pH 5,6, o Cu(II) é facilmente reduzido, formando o quelato  $\text{Cu}(\text{neocup})_2^+$ , que apresenta um máximo de absorção em 454 nm. Pela medida da absorvância do quelato do cobre, o vanádio(IV), na faixa de  $2 \times 10^{-6} - 8 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ , com uma frequência de amostragem de 120h<sup>-1</sup>. Usando água como carregador e alças de amostragem de 200  $\mu\text{L}$ , a absorvância do sistema permanece constante numa faixa de pH 5,4 – 7,0, concentrações de neocuproína entre  $5 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  e não varia com a temperatura. Uma bobina de

reação foi inserida no sistema, porém percebeu-se que para bobinas maiores que 30cm a dispersão aumentava consideravelmente. A presença de vários íons, em concentrações superiores a 1000 vezes, é tolerada, exceto oxalato (500:1), Co(II) (100:1) e Fe(II) (10:1). No segundo artigo, um sistema semelhante é sugerido para a análise de agentes complexantes (EDTA, DTPA, CyTPA, NTA, citrato e pirofosfato) baseado na aceleração que estas espécies proporcionam à reação redox do Cu(II) e Fe(II) na presença de neocuproína. As concentrações dos agentes complexantes, variando entre  $10^{-6}$ – $10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, podem ser determinadas numa frequência de 180 amostras por hora. As análises foram feitas tendo água como carregador, uma bobina de reação de 1m e uma alça de amostragem de 200 $\mu$ L. A mistura oxidante continha neocuproína, cobre e tampão acetato pH 5,6. Vários íons foram testados e não apresentaram interferências, entretanto Al, Fe(III), Co(II), Ni, Cu(II) e Zn, em proporções de 1:1, causaram um decréscimo do sinal por formarem complexos estáveis com o EDTA e os outros agentes complexantes.

Outros autores fizeram uso das propriedades redox do Cu-neocuproína para aplicações analíticas. Tütem [64] e colaboradores desenvolveram, em 1997, um método para dosagem de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol). O método consistia em misturar uma solução de CuCl<sub>2</sub>, neocuproína e tampão acetato de amônio a uma solução de  $\alpha$ -tocoferol dissolvida em éter ou álcool absoluto. Após 30 minutos mediou-se a absorvância da mistura em 450 nm contra um branco contendo Cu(II)-neocuproína. A coloração é estável por 90 minutos e o procedimento foi aplicado à análise de medicamentos. Para certificação do método, as amostras também foram analisadas por HPLC e pelo método espectrofotométrico com o Fe(III)-batofenantrolina indicados na literatura. Sobre este último método é importante destacar que, embora o autor reconheça que o método da neocuproína seja menos sensível, ele é muito mais trabalhoso que o procedimento proposto, pois exige o uso de reagentes e solventes de difícil manipulação. O sistema sofre a interferência de redutores comuns, como ácido ascórbico e Fe(II), facilmente encontrados nos medicamentos, principalmente os complexos vitamínicos.



Al-Obaid e colaboradores [65] desenvolveram um método para análise espectrofotométrica da (S)(-)-catinona. A catinona é o princípio ativo de uma droga estimulante análoga à anfetamina e é encontrada em folhas e brotos jovens de uma planta da espécie *Catha edulis* conhecida como Khat. A catinona é uma substância redutora e o produto da sua reação com Cu(II)-cuproína, na presença de tampão acetato de sódio, pode ser medido em 455 nm. Como a reação é lenta, há a necessidade de aquecimento antes das medidas. A curva de calibração é linear numa faixa entre 0,08 – 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  com um desvio padrão relativo de 1,35% para 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A absorvância do sistema é afetada pelas concentrações de Cu(II) e neocuproína, pela temperatura, pelo tempo de aquecimento e pela ordem de adição dos reagentes, mas não é afetada pela presença de surfactantes como CTAB e Brij-35. O método foi aplicado para análise de catinona em folhas de Khat pelo método tradicional e por adição padrão.

Yamini e Tamaddon [66] desenvolveram um método para pré-concentração de cobre, por extração em fase sólida do quelato  $\text{Cu}(\text{neocup})_2^+$ , através da filtração das amostras em discos de sílica- $\text{C}_{18}$ . Após a retenção, o quelato é eluído completamente com 5mL de iso-pentanol ou  $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$  (4:1) e a absorvância do extrato medida em 454 nm. A retenção do quelato é completa numa faixa de pH de 4 a 8,5 na presença de um excesso de neocuproína e cloreto de hidroxilamina. Embora a vazão de filtração da amostra seja alta (5 – 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), a etapa de eluição exige uma vazão mais lenta (1 – 6,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) para a extração total do quelato adsorvido. A concentração da maioria dos íons é tolerada acima de 500 vezes, exceto  $\text{MoO}_4^{2-}$  e  $\text{WO}_4^{2-}$  (20:1) e Be(II) e Hg(II) (10:1). O limite de detecção é de 12  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  e o sistema foi aplicado para análise das águas de um rio próximo a uma mina de cobre e comparado com a mesma análise por ICP-OES.

Araújo e colaboradores [67] descreveram um método de análise por injeção seqüencial (SIA) para a determinação de açúcares redutores (glicose e frutose) em vinhos, pela redução do cobre e posterior reação com neocuproína. Um sistema de diálise foi acoplado ao sistema de fluxo, não só para permitir a diluição da amostra, mas também para minimizar a interferência de compostos coloridos

presentes, principalmente em vinho tinto, permitindo a injeção direta da amostra sem tratamento prévio. O sistema usa hidróxido de sódio como carregador e pode ser aplicado para a determinação de açúcares em vinhos de mesa ( $2 - 25 \text{ g.L}^{-1}$ ) e vinhos do Porto ( $20 - 140 \text{ g.L}^{-1}$ ), para uma frequência de amostragem de 14 a  $18 \text{ h}^{-1}$ . Como o teor de álcool presente nas amostras interferem na análise, foi adicionado 10 a 20% de etanol às soluções padrões a depender do tipo de vinho, se de mesa ou do Porto. Os resultados obtidos para dezenove diferentes tipos de vinho foi comparável com aqueles obtidos pelos métodos de referência.

Fora a espectrofotometria de absorção molecular, outros autores sugeriram o uso direto ou indireto do bis(neocuproína) em outras técnicas analíticas. Chattaraj e Das [68] propuseram um método para a determinação indireta de sulfato por FAAS em soro sanguíneo. O sulfato forma um par iônico estável, do tipo  $[\text{Cu}(\text{neocup})_2]^{2+} \cdot (\text{SO}_4)^{2-}$ , em meio neutro, que pode ser extraído com MIBK, em presença de MeOH, com eficiência superior a 98%. A análise do cobre no extrato pode ser realizada diretamente por absorção atômica permitindo a análise de sulfato numa faixa de concentração entre  $0,14 - 1,12 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ , que é cerca de 450 vezes mais sensível que tradicional método de análise por precipitação com bário. O limite de detecção é  $3,2 \text{ ng.mL}^{-1}$ , bem melhor que o limite de detecção para cromatografia iônica ( $0,15 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Trojanowicz [69] e colaboradores utilizaram a neocuproína para eliminar a interferência do cobre num sistema FIA na determinação potenciométrica de cádmio em água de rio, utilizando um eletrodo íon – seletivo.

Nomura e Sato [70] desenvolveram um método de determinação adsortiva de cobre como um par iônico, formado entre a bis(neocuproína)-cobre(I) e o dodecilssulfato de sódio (SDS), utilizando um eletrodo piezoelétrico de quartzo. A adsorção depende do pH e das concentrações da neocuproína, cloreto de hidroxilamina e dodecilsulfato de sódio. A mudança de frequência do cristal é proporcional à concentração de Cu(II) variando de  $2,0 - 15 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , com %RSD de 6,9% para  $5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ . O quelato pode ser removido do cristal com uma solução aquosa de 2-propanol 50%, e os íons tiocianato, tiosulfato, Ag(I) e Hg (II) interferem e devem ser eliminados previamente.

Stefan e colaboradores [71] desenvolveram dois eletrodos de membrana seletivos para oxalato originário da urina. Os eletrodos foram construídos a partir da impregnação de varetas de grafite com uma solução de  $[\text{Fe}(\text{o-fenantrolina})_3]^{2+}$  (eletrodo A), ou  $[\text{Fe}(\text{neocuproína})_3]^{2+}$  (eletrodo B), em nitrobenzendo e adaptada na extremidade de um tubo de PTFE. O eletrodo foi mergulhado diretamente nas amostras centrifugadas, e responde satisfatoriamente para uma faixa de pH entre 2,0 – 8,0 (A) e 2,0 – 7,0 (B). Os eletrodos respondem a equação de Nernst para concentrações  $0,01\text{--}100\mu\text{mol.L}^{-1}$  (eletrodo A) e  $0,1\text{--}100\mu\text{mol.L}^{-1}$  (eletrodo B), apresentando um limite de detecção de  $1\text{ nmol.L}^{-1}$  para ambos eletrodos. O sistema foi testado para análise em urina e os resultados comparados com cromatografia iônica.

Chernysh e colaboradores [72] propuseram um método para a determinação de bis(neocuproína)–cobre por espectrometria de lentes térmicas. O cobre reage com neocuproína na presença de ácido ascórbico, tampão acetato numa solução de água – etanol (9:1). O método foi aplicado para uma faixa de concentração entre  $7 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5}\text{ mol.L}^{-1}$ , com um limite de detecção de  $4 \times 10^{-7}\text{ mol.L}^{-1}$ . Concentrações de ferro inferiores a  $10^{-4}$  não interferem no sistema.

High e colaboradores [73] determinaram íons Cu(II) em águas usando eletroquimiluminescência (EQL). No referido trabalho, a EQL é gerada pela redução do Cu(II) a Cu(I) com cloreto de hidroxilamina e então a reação da complexação com a neocuproína, formando o  $\text{Cu}(\text{neocup})_2^+$ , seguida pela oxidação do quelato na presença do tri-*n*-propilamina (TPrA). A medida do pico de potencial corresponde à oxidação de ambas as espécies, o TPrA e o  $\text{Cu}(\text{neocup})_2^+$ , indicando que a emissão originada no  $\text{Cu}(\text{neocup})_2^+$  é consequência de transferências eletrônicas do quelato no estado excitado. O sistema de emissão gerou uma curva de calibração linear numa faixa entre  $0,1 - 5,0\text{ mg.L}^{-1}$ , com  $6,0\mu\text{g.L}^{-1}$  para o limite de detecção e  $0,1\text{mg.L}^{-1}$  para o limite de quantificação. O método foi testado na presença de nove metais (Co(II), V(V), Ni(II), Zr(IV), Cd(II), Bi(III), Cr(VI), Mn(II) e Ag(I)) e apenas o Ag(I) interferiu.

#### 4.5 – Aplicações da 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina

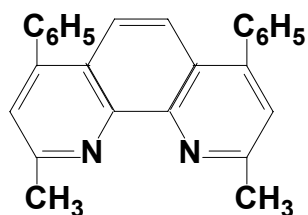


Fig. 12 – Estrutura da 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina

A 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina (figura 12), também conhecida como batocuproína, é obtida a partir de uma síntese dividida em etapas muito longas. Começa com a reação entre a *o*-nitroanilina e a fenil-propil-cetona para formar a 2-metil-8-nitro-4-fenilquinolina. Este intermediário é reduzido ao amino-composto correspondente que finalmente é condensado com fenil-propil-cetona pela reação de Skraup modificada. Possui fórmula molecular  $C_{26}H_{20}N_2$  e peso molecular 360,46. A batocuproína é um pó incolor ou amarelo pálido, com ponto de fusão  $278^{\circ}C$ , que é purificado por recristalização em benzeno. É insolúvel em água, mas é facilmente solúvel nos solventes orgânicos mais comuns, tipo clorofórmio e benzeno [5].

É muito comum encontrarmos a batocuproína na forma de seu derivado sulfônico, conhecido como ácido 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina-dissulfônico, ou ácido batocuproínadissulfônico (figura 13).

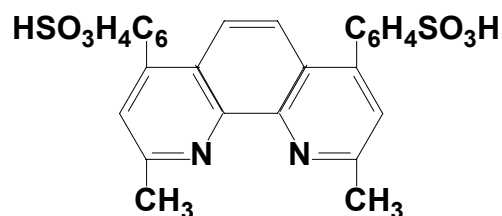


Fig. 13 – Estrutura do ácido 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina- dissulfônico

O ácido batocuproína-dissulfônico é um pó incolor ou amarelo pálido e levemente higroscópico. Ele apresenta uma fluorescência azulada quando iluminado por uma lâmpada UV e é muito solúvel em água, mas não é solúvel em solventes orgânicos apolares.  $pK_a(\text{SO}_3\text{H}) = 2,65$  e  $pK_a(\text{N}^+\text{H}) = 5,80$  [5].

Os primeiros a proporem o uso da batocuproína como reagente analítico para cobre foram Smith e Wilkins [74]. O cobre, previamente reduzido a Cu(I) com cloreto de hidroxilamina, forma um quelato alaranjado, do tipo  $\text{Cu}(\text{batocup})_2^+$ , estável por cerca de 2 horas e que absorve em 479 nm. As absorvidades molares variam de acordo com o solvente utilizado,  $\epsilon = 14200 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (álcool *n*-hexílico ou iso-amílico) e  $\epsilon = 13900 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (álcool etílico). Pelos valores da absorvidades molares, percebe-se que a batocuproína é a mais sensível das cuproínas para a determinação de cobre. O método obedece a lei de Beer numa faixa entre 1,0 – 10,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e foi aplicado em amostras sintéticas contendo 0,250 mg de ferro para 0,040 mg de cobre em presença de ácido cítrico e tampão pH 5. O quelato é oxidado lentamente pelo ar, cerca de 0,05% por hora à temperatura ambiente.

A dosagem de cobre é importante para a indústria de papel, pois pequenas quantidades do metal são responsáveis pela deteriorização da matéria-prima no processo de empacotamento e estocagem. Por esta razão, Borchardt e Butler [75] sugeriram um método de dosagem de cobre em papel, polpa e licor de polpa usando batocuproína. Depois da digestão das amostras com  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HClO}_4$ , e sua neutralização com  $\text{NH}_4\text{OH}$ , uma alíquota da amostra é levada a um funil de separação e a ela são adicionados cloreto de hidroxilamina, neocuproína e *n*-hexanol. Após 2 minutos de agitação e 5 minutos de espera, a fase orgânica é lida em 479nm. O método foi aplicado para diversas amostras de papel, polpa e licores contendo cobre numa faixa entre 0,1 – 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para confirmação dos resultados, as amostras também foram analisadas com dietilamôniditiocarbamato + EDTA e dietilditiocarbamato de zinco.

Com a intenção de eliminar a etapa de extração na determinação com batocuproína, Blair e Diehl [76] recomendaram o uso do ácido batocuproínadissulfônico para a determinação de cobre, uma vez que o derivado e

seu quelato são solúveis em água. O sistema não é muito diferente do sugerido por Smith e Wilkins [74], apresentando inclusive a mesma sensibilidade, porém, com a eliminação da etapa de extração, elimina-se também a possibilidade da separação do quelato de outros compostos coloridos, que porventura possam interferir; assim como o significativo efeito de pré – concentração percebido na extração.

Penner e Inman [77] propuseram a determinação de traços de cobre em nióbio, tântalo, molibdênio e tungstênio de alta pureza com batocuproína. Em um funil de separação é adicionada uma solução, ajustada com amônia em pH 5,5, contendo tartarato de amônio, ácido bórico e ácido ascórbico. A esta solução é adicionada uma alíquota da amostra, mais batocuproína, álcool amílico e agita-se por 2 minutos. Após 5 minutos de espera, o extrato orgânico é centrifugado por 30 segundos e depois lida a absorvância em 476 nm numa cubeta de 2 cm. Apesar do método usar o ácido ascórbico com sucesso, o autor recomenda o uso de cloreto de hidroxilamina uma vez que o ácido ascórbico forma uma solução escura após três dias. O sistema apresenta uma coloração estável numa faixa de pH entre 1,45 – 6,25 e foi aplicado para amostras contendo teores entre 0,0005 – 0,125% de cobre.

Peter Hulthe [78] desenvolveu um método semiquantitativo para dosagem de cobre utilizando tiras de papel de filtro modificadas com cloreto de sódio, hidroquinona e batocuproína. As tiras de 4 cm de papel de filtro foram impregnadas inicialmente com cloreto de sódio e, posteriormente à secagem, impregnadas com batocuproína e hidroquinona dissolvidas em clorofórmio. Após 48 horas de secagem, as tiras são utilizadas para análise de cobre em concentrações entre 10–70  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  numa faixa de pH entre 3,0–6,0 em tampão acetato de sódio. As medidas são feitas pingando-se 25 $\mu\text{L}$  da amostra tamponada nas tiras e a área da mancha é diretamente proporcional à concentração de  $\text{Cu}(\text{batocup})_2\text{Cl}$  formado.

Sánchez-Razero [79] estudou as melhores condições para a formação do quelato do cobre com a batocuproína, bem como sua estequiometria, curva de Ringbom (que apresenta os dados de reflectância como função do logaritmo

decimal da concentração do analito em questão) e obediência Lei de Beer. Segundo o autor, o cobre, previamente reduzido com ácido ascórbico e na presença de tampão acetato, forma um complexo três vezes mais estável em clorofórmio que em etanol e não é afetado pela temperatura e pela luz, por pelo menos 1h. Em soluções diluídas, percebeu-se uma pequena adsorção pelas paredes de vidro, e a ordem de adição não afeta os resultados. O espectro de absorção, em clorofórmio, indica a formação de um único complexo, com um máximo em 465 nm, com estequiometria 2:1. O sistema obedece a lei de Beer numa faixa de concentração entre 0,2 – 4,4  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , absorvidade molar igual a  $1,3 \times 10^4 \text{ L}.\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  e uma curva de Ringbom entre 0,7–4,0  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ . O sistema apresenta um desvio padrão relativo inferior a 1% e, ao contrário do que indica a maioria dos autores, Sn(II) e Co(II) (100:1) interferem significativamente.

Moffett e colaboradores [80] propuseram um método para especificação de Cu(I) em águas naturais usando ácido batocuproínadissulfônico. A solução estoque de Cu(I) foi preparada a partir do CuBr, acidificada com HCl, na presença de 1  $\text{mol}.\text{L}^{-1}$  de NaCl e purgada com  $\text{N}_2$  de alta pureza para eliminar o oxigênio, para impedir a oxidação do Cu(I). Para impedir a interferência do Cu(II), que pode ser reduzido a Cu(I) por redutores naturais, principalmente ácido húmico, foi utilizado um agente mascarante. O EDTA foi descartado, pois em águas naturais forma complexos preferencialmente com Ca e Mg limitando a sua eficácia para complexar o cobre, assim como a histidina, que forma complexos muito estáveis com Cu(I) dificultando a análise. A etilenodiamina foi escolhida, porque forma um complexo estável com o Cu(II) e não apresenta as dificuldades dos outros dois mascarantes. Na ausência de redutores auxiliares, o sistema apresentou um pequeno decaimento na absorvância para pH abaixo de 6 e um decaimento acentuado em pH 5, fazendo com que o pH 8 fosse escolhido por apresentar-se mais estável. O sistema foi aplicado para água do mar com um limite de detecção de  $10^{-8} \text{ mol}.\text{L}^{-1}$  utilizando-se cubetas de 10 cm.

Saito [81] desenvolveu um método de extração e determinação espectrofotométrica de cobre na fase sólida utilizando membranas de PVC (30 x 15 x 0,15mm) modificadas com batocuproína e o-nitrofenil-octil-éter, que funciona

como agente plastificante, dissolvido em THF. A fita de PVC modificada é introduzida num béquer contendo a amostra de cobre, sulfato de amônio, picrato de sódio e tampão acetato pH 5,9. A mistura é agitada por 10 minutos a 60°C. Após o desenvolvimento da cor, a tira é lavada com água e introduzida diretamente no caminho óptico do espectrofotômetro para medida da absorvância em 480 nm. A absorvância da membrana é influenciada pelo aumento da temperatura e do tempo de aquecimento, assim como pela variação do pH, permanecendo constante numa faixa ente 4,1 – 8,0. O Fe(II) (1:1) interfere no sistema, sendo necessário o uso do ácido cítrico para amostras com alto teor de ferro. A membrana colorida é estável por poucos meses e o método pode ser aplicado para concentrações entre 9,5 ng.mL<sup>-1</sup> e 2,7 µg.mL<sup>-1</sup>.

Glazewski e Morrison [82] utilizaram a metodologia sugerida por Moffett [80] para a especiação de Cu(I) em rios urbanos. A amostra de Cu(I) é filtrada diretamente numa mistura contendo NaCl, batocuproína e etilenodiamina, e a mistura é carregada através de cartuchos C<sub>18</sub>. O quelato retido é eluído por uma mistura metanol-água (9:1) e a sua absorvância lida em 484 nm. O fator de enriquecimento é de 100 vezes e o limite de detecção é 0,1 ng.mL<sup>-1</sup>. Para amostras com teor de Cu(I) inferiores a 1 ng.mL<sup>-1</sup>, foi utilizada a técnica de voltametria anódica de pulso diferencial. Estudou-se a influência da radiação UV na geração de Cu(I) em águas urbanas, expondo as amostras à luz UV em 365nm, e concluiu-se que a razão Cu(I)/Cu dissolvido aumenta com o aumento da intensidade da luz UV. Foi investigada também a importância de partículas coloidais e microorganismos no mecanismo de foto-produção de Cu(I), através da diluição/filtração das amostras. Os autores também verificaram que a especiação de Cu(I)/Cu(II) pode ser influenciada pela luz solar através de processos de fotoredução envolvendo Fe(II)/Fe(III), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e material orgânico coloidal e dissolvido. Baixos teores de oxigênio em rios urbanos impedem a reoxidação e conduz a altos teores de Cu(I).

Toral e colaboradores [83] realizaram a determinação simultânea de cobre e ferro por espectrofotometria derivativa (2ª derivada) utilizando uma mistura de batocuproína e 5-fenil-3-(4-fenil-2-piridinil)-1,2,4-triazina (PPT). O método é



baseado na extração dos complexos ternários  $\text{Fe(PPT)}_3(\text{picrato})_2$  e  $\text{Cu}(\text{batocup})_2(\text{picrato})$ , em dicloro-metano e pH 5,0, após a redução dos analitos com cloreto de hidroxilamina. Os espectros da segunda derivada foram obtidos entre 450 e 650 nm, e os sinais analíticos obtidos pela medida das alturas em 613 nm (Fe) e 508 nm (Cu) através da técnica de “zero-crossing”. O ferro foi determinado numa faixa entre 8 – 120  $\text{ng.mL}^{-1}$ , com limite de detecção 2,9  $\text{ng.mL}^{-1}$ , e o cobre entre 8 – 125  $\text{ng.mL}^{-1}$ , com limite de detecção 2,8  $\text{ng.mL}^{-1}$ . O sistema apresentou interferências na presença de Co, EDTA e  $\text{CN}^-$ . O método proposto foi aplicado para a análise de ambos os elementos em água de torneira e de rio e os resultados foram satisfatórios quando comparados com o método padrão por FAAS.

Björklund e Morrison [84] propuseram um método de especiação de cobre em águas por espectrofotometria em fase sólida (SPS), utilizando sílica- $\text{C}_{18}$  modificada com batocuproína. Os autores sugeriram três procedimentos possíveis. Os dois primeiros envolviam a formação prévia do quelato bis(batocuproína)- $\text{Cu(I)}$ , em presença de cloreto de hidroxilamina e citrato de sódio, e posterior passagem da mistura através cartuchos ou discos de  $\text{C}_{18}$ . O quelato retido foi eluído com uma mistura de metanol-água (9:1) e medido em 484 nm. O terceiro envolveu a modificação dos discos de  $\text{C}_{18}$  com batocuproína e a posterior passagem da amostra, contendo a hidroxilamina, tampão citrato e metanol, através do disco. O disco colorido foi introduzido no caminho óptico do espectrofotômetro e as absorvâncias medidas em 484 nm. Foram feitos vários testes para investigar a eficiência entre a pré-concentração com cartuchos e a análise direta em discos modificados, como também seus respectivos tempos de carreamento, para amostras filtradas e não filtradas previamente. Também foi feita uma comparação entre a análise direta em discos de  $\text{C}_{18}$ -PTFE, modificados ou não, e análise voltamperométrica, na presença de agentes complexantes. Para discos de  $\text{C}_{18}$ -PTFE, os L.D. variaram bastante (0,4 – 3,8  $\text{ng.mL}^{-1}$ ) dependendo do volume e da natureza da amostra. Para análise de cobre total, a redução a  $\text{Cu(I)}$  foi feita através da irradiação da amostra com luz UV.

Pereira e Fatibello-Filho [85] desenvolveram um sistema FIA para análise espectrofotométrica indireta de L - ácido ascórbico pela reação do mesmo com um reator sólido contendo  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ . O reator sólido é preparado através da imobilização de  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  em uma resina poliéster. O procedimento consiste de um sistema de fluxo onde a amostra de ácido ascórbico é injetada numa coluna de vidro contendo o  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  imobilizado e, após essa reação, o Cu(I) gerado em linha é misturado a uma solução de batocuproína e a absorvância do quelato formado é lida em 480 nm. Foram feitos estudos para escolha do carreador (tampão acetato pH 4,5), dimensões da coluna de vidro (60 x 1,5 mm), volume da amostra (500  $\mu\text{L}$ ), bobina de reação (100 cm), vazão (7,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), concentração da batocuproína ( $4,3 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e interferentes. O sistema apresenta resposta linear na faixa de concentração entre  $5,0 \times 10^{-6} - 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  com um limite de detecção de  $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e uma frequência de amostragem de 80 amostras. $\text{h}^{-1}$ . O método foi aplicado em 6 medicamentos obtidos comercialmente.

Ervin e colaboradores [86] sugeriram um sensor de fibra óptica de Nafion modificado com batocuproína para a determinação e monitoramento de Cu(I). O procedimento consiste em inicialmente bombear água desionizada através do sensor modificado até a obtenção de uma linha de base estável. Depois, bombeia-se uma solução de ácido ascórbico até a obtenção de uma nova linha de base estável. Por fim, bombeia-se a amostra contendo o cobre a ser monitorado. O quelato adsorvido em Nafion apresenta um máximo de absorvância em 470 nm e os valores de absorvância obtidos foram determinados pela subtração dos sinais em 470 nm e 700 nm. Foram comparadas duas técnicas de monitoramento: na primeira, chamada de técnica reciclada, o Cu(I) é bombeado por um período específico de tempo e depois lavado com uma solução de  $\text{HNO}_3$  0,1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  antes de uma nova injeção; no segundo, chamada técnica seqüencial, a solução é bombeada indefinidamente e o sensor só é lavado com a solução de  $\text{HNO}_3$  depois que toda solução de Cu(I) houver sido medida, ou seja, não há regeneração do sensor entre as medidas. Na comparação dos dois métodos, a técnica reciclada apresentou melhor precisão que a técnica seqüencial com um limite de detecção de 380  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

## **5 – EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS) [87, 88]**

### **5.1 – Considerações gerais**

A extração em fase sólida (EFS) é uma técnica de preparação de amostras. Ela consiste em concentrar e purificar um analito de uma solução através da retenção do mesmo, após o contato com uma fase sólida, e posterior eluição com um solvente apropriado, seguido da sua análise instrumental. A EFS pode ser realizada em batelada, onde o sólido extrator é diretamente misturado à solução da amostra, ou realizada em fluxo, onde um fluxo constante da solução da amostra atravessa um pequeno tubo, disco ou cartucho contendo a fase sólida devidamente empacotada. A EFS não se limita ao uso de fases sólidas para a extração em soluções líquidas, mas também ar e outras amostras gasosas podem ser concentradas e purificadas.

A fase sólida consiste, tipicamente, de minúsculas partículas porosas feitas de sílica funcionalizada com uma fase orgânica (C2, C8, C18, etc.) ou de polímeros orgânicos, tais como poliestireno cruzado, poliacrilatos e outros (XAD-2, XAD-4, XAD-7, etc.) acondicionados sob a forma de discos de Teflon, cartuchos ou seringas de polipropileno ou polietileno, contendo de 50mg a 10g do material empacotado.

A grande vantagem da EFS é o uso de pequenas quantidades de amostra e de eluente e os altos fatores de enriquecimento do analito. Devido à sua grande rapidez e fácil manipulação, a EFS pode ser utilizada em análises de campo podendo ser facilmente automatizada.

### **5.2 – Histórico**

A EFS data de antes dos anos 70, quando Jeffrey e Hood, em 1958, utilizaram carvão ativo para concentrar pequenas quantidades de compostos orgânicos em amostras de água. Os autores registraram várias limitações para o carvão como baixo fator de enriquecimento, baixa adsorção para algumas espécies orgânicas e baixas eluições pelo clorofórmio.

Em 1968, colunas contendo resinas do tipo XAD foram utilizadas para concentrar quantidades muito pequenas de poluentes orgânicos em amostras de

água. Em 1972, cartuchos empacotados com XAD foram utilizados na remoção de drogas em fluídos biológicos para análises clínicas. Esses cartuchos, formalmente representados pela Brinkman, representam uma das primeiras aplicações comerciais de cartuchos para EFS.

Embora tenham sido sintetizadas pela primeira vez em 1950, as sílicas funcionalizadas só tornaram-se populares por volta de 1975, quando passaram a ser amplamente utilizadas em colunas de fases reversas para HPLC. O problema é que a utilização do C18 para preconcentração de solutos orgânicos diretamente nas colunas de HPLC diminuía a vida útil da mesma, o que levou os usuários da cromatografia a adaptarem uma pequena pré-coluna, antes da coluna principal, para reter os contaminantes ou reter traços do próprio analito. Foi no mesmo ano de 1975 que se cunhou o termo “*enriquecimento de traços*”. Em 1978, a Water lança os cartuchos Sep-Pak C18 e em 1979 a Analytichem introduziu o C<sub>18</sub> empacotado em seringas, formato este muito popular até hoje.

Durante os anos 80 e 90 o desenvolvimento e utilização da EFS expandiu tremendamente. Em 1982, Zief e colaboradores da empresa J.T.Baker utilizaram, pela primeira vez, o termo “*extração em fase sólida*”. Em 1989, a 3M introduziu o formato de fase sólida em discos de Teflon e em 1993 começaram as primeiras tentativas de automação para EFS.

### **5.3 – Etapas e aparatos da EFS**

#### **5.3.1 – Etapas da EFS**

O processo de extração em fase sólida pode ser dividido, basicamente, em quatro etapas: **(1) condicionamento da fase sólida, (2) adsorção do analito, (3) lavagem da fase sólida e (4) eluição do analito**. As quatro etapas estão resumidas na figura 14.

Uma quinta etapa necessária para completar todo processo é a análise em si. Normalmente, a etapa de análise freqüentemente consiste em tomar uma alíquota da porção eluída e realizar a medida dos componentes individuais com a técnica analítica mais adequada.

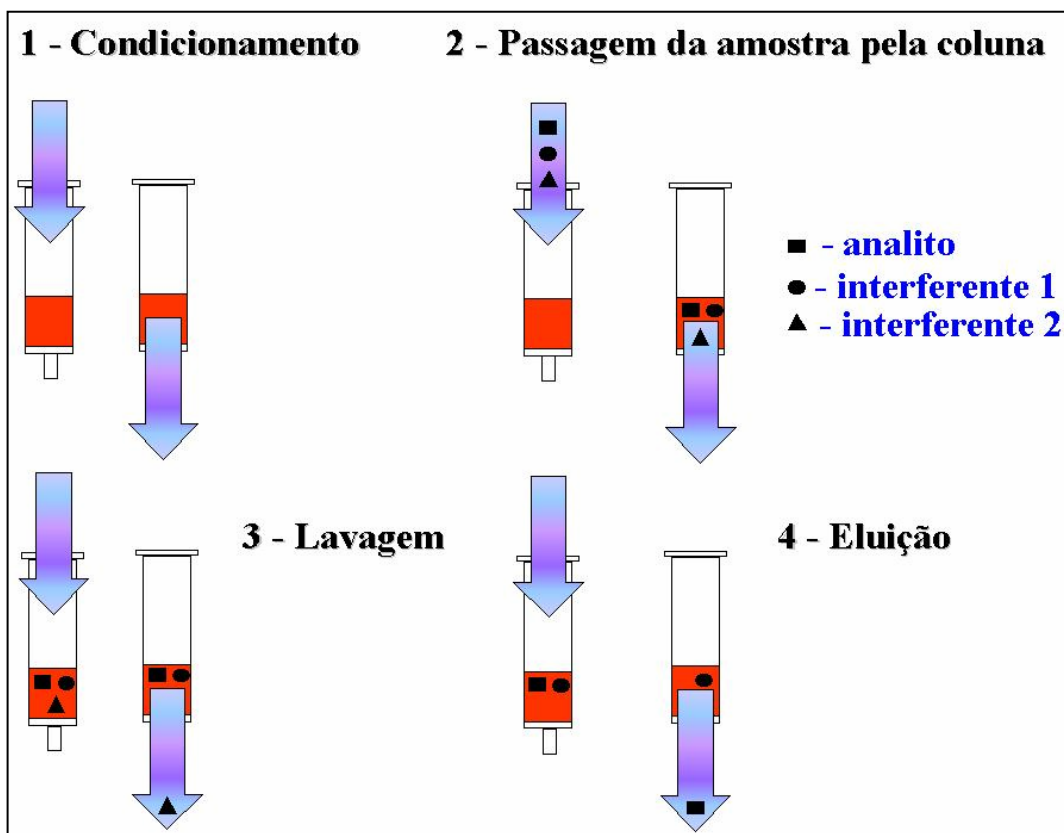


Fig.14 – Etapas da extração em fase sólida

**ETAPA 1 – Condicionamento:** antes de acontecer a EFS propriamente dita, é necessário condicionar a fase sólida com uma solução compatível com o meio no qual a amostra se encontra. Por exemplo, numa extração de substâncias hidrofóbicas em um meio aquoso é necessário antes condicionar a fase apolar (por exemplo, C18) com um solvente polar, no caso a água. Sem o pré-tratamento, o líquido polar flui através dos minúsculos canais através da fase sólida sem realizar o contato necessário para a retenção do analito. O condicionamento envolve o uso de um solvente que irá promover a melhor superfície de contato entre as fases.

**ETAPA 2 – Adsorção:** O líquido contendo a amostra atravessa a fase sólida com a ajuda da gravidade, sucção, pressão ou impulsionado por uma bomba. O fluxo através da fase sólida deve ser constante e depende das dimensões da coluna ou do tamanho das partículas empacotadas. A escolha da

melhor vazão deve ser obtida experimentalmente e em função do tipo de análise que se deseja fazer. Normalmente, quanto mais lento o fluxo, maior o tempo de contato entre as fases e maior a retenção do analito. É importante salientar que o fluxo de solução deve ser ininterrupto, para evitar que a fase sólida seque e a presença de bolhas de ar na coluna diminua a eficiência de contato entre as fases sólidas e líquidas. A etapa de adsorção pode ser feita numa única etapa ou em várias etapas, com pequenas alíquotas da amostra, para aumentar o enriquecimento da amostra.

**ETAPA 3 – Lavagem:** esta etapa é a oportunidade de remover interferentes da matriz que estejam fracamente ligados à fase sólida e pode ser realizada com o próprio solvente da amostra ou com algum solvente mais fraco, que não provoque a remoção do analito antes do momento apropriado.

**ETAPA 4 – Eluição:** esta é seguramente, depois da etapa de adsorção, a etapa mais importante. É nesta etapa que o analito de interesse é concentrado e separado de possíveis interferentes para posterior análise. A etapa de eluição envolve a escolha, normalmente, de um solvente mais forte e mais seletivo que possa extrair da fase sólida apenas o analito de interesse. A eluição pode ser feita com um único solvente ou com uma mistura deles. Assim como a etapa de adsorção, a etapa de eluição pode ser realizada de uma única vez ou em pequenas porções em várias etapas.

### 5.3.2 – Aparatos da EFS

As fases sólidas usadas em EFS são acondicionadas em três formatos básicos: discos, cartuchos e seringas. Os três formatos são apresentados na figura 15.

Os discos são disponibilizados em diferentes diâmetros e espessuras. Os diâmetros variam de 4,0 a 90 mm, sendo que o diâmetro considerado padrão é o de 47mm. A espessura do disco vai depender do tamanho da partícula e da massa de fase sólida distribuída sobre o disco.

Os cartuchos variam de pequenos, contendo 100mg, até os considerados grandes, que contêm 1g ou mais de fase sólida empacotada. Os diâmetros dos

cartuchos também variam e normalmente eles contêm pequenos estreitamentos nas extremidades para serem adaptados em seringas, colunas cromatográficas ou sistemas em linha (FIA).



**Fig.15 – Aparatos para EFS: discos, cartuchos e seringas.**

As seringas, que são o formato mais utilizado em EFS, consistem em pequenos barris com volumes que variam de 1,0 a 25mL contendo de 50mg a 100g de fase sólida empacotada. Nas seringas, que normalmente são feitas de polietileno, cerca de 40mg de fase sólida fica acondicionada entre dois discos de polipropileno, com espessuras de 20 $\mu$ m, formando uma espécie de “sanduíche” de fase sólida.

## **5.4 – Fase reversa sílica funcionalizada C18**

### **5.4.1 – Considerações gerais**

Um grande número de materiais sólidos é utilizado para a EFS de compostos orgânicos e inorgânicos, principalmente em amostras aquosas. Sílicas modificadas, polímeros (XADs e espumas de poliuretano), carvão ativo e mais recentemente carvão grafitado são alguns dos materiais utilizados como fases sólidas.

Na hora de escolher o material a ser utilizado na EFS é preciso considerar alguns aspectos importantes como: versatilidade para extração de orgânicos e inorgânicos, disponibilidade e tipo de amostra, tipo de solvente, a técnica analítica a ser empregada após a EFS, tempo de análise e, principalmente, custos.

Além das características acima, um dos aspectos mais importantes na escolha do material da fase sólida são suas características físico-químicas. Normalmente, a fase sólida ideal tem como características: baixa porosidade, grande área superficial, adsorção facilmente reversível, alta pureza, grande estabilidade química, boa superfície de contato com a solução da amostra e altos percentuais de recuperação. As sílicas modificadas, em especial a sílica funcionalizada C18, contemplam a maioria destas características e por isso mesmo são as mais popularmente empregadas em EFS.

#### **5.4.2 – Síntese das sílicas funcionalizadas**

Em 1950, Howard e Martin foram os primeiros a usar o que se tornou conhecido como cromatografia com fase reversa. Ao invés de usar uma fase estacionária polar para reter compostos polares em solventes apolares, eles criaram uma fase estacionária apolar para reter compostos apolares em solventes polares. Eles trataram sílica com diclorometilsilano, que modificou a superfície da sílica de polar para apolar. Eles utilizaram esta fase estacionária para separar ácidos graxos de cadeias longas em uma fase móvel água – metanol (80:20) pela partição dos solutos através da fase estacionária apolar, que era *n*-octano saturado com metanol.

O conceito básico da cromatografia com fase reversa foi modificado quando, em 1966, Abel e colaboradores trocaram a fase estacionária líquida por uma fase estacionária sólida para a adsorção dos analitos na superfície sólida. Eles sintetizaram a fase reversa sólida pela reação da sílica com o triclorosilano para produzir uma sílica com superfície modificada. Essa nova fase estacionária foi utilizada, inicialmente, na cromatografia gasosa. Essa modificação na superfície da sílica, através da ligação com organossilanos revolucionou a cromatografia e



levou à produção de uma série de outras fases a base de sílica funcionalizada pela variação do tipo do organossilano.

A maioria das sílicas funcionalizadas disponíveis comercialmente é do tipo siloxano, tendo ligação do tipo **Si-O-Si-C** (figura 16). Elas são preparadas pela reação anidra do silanol sílica-gel com o monofuncional organoclorossilano ou organoalcoxissilanos. As sílicas funcionalizadas obtidas contêm grupos funcionais que são usados em vários tipos de separações, como a fase reversa, a fase normal ou a troca iônica. A reação de síntese é mostrada na figura 17 para um grupo alquila contendo oito carbonos, uma das fases sólidas mais comuns utilizadas na EFS.

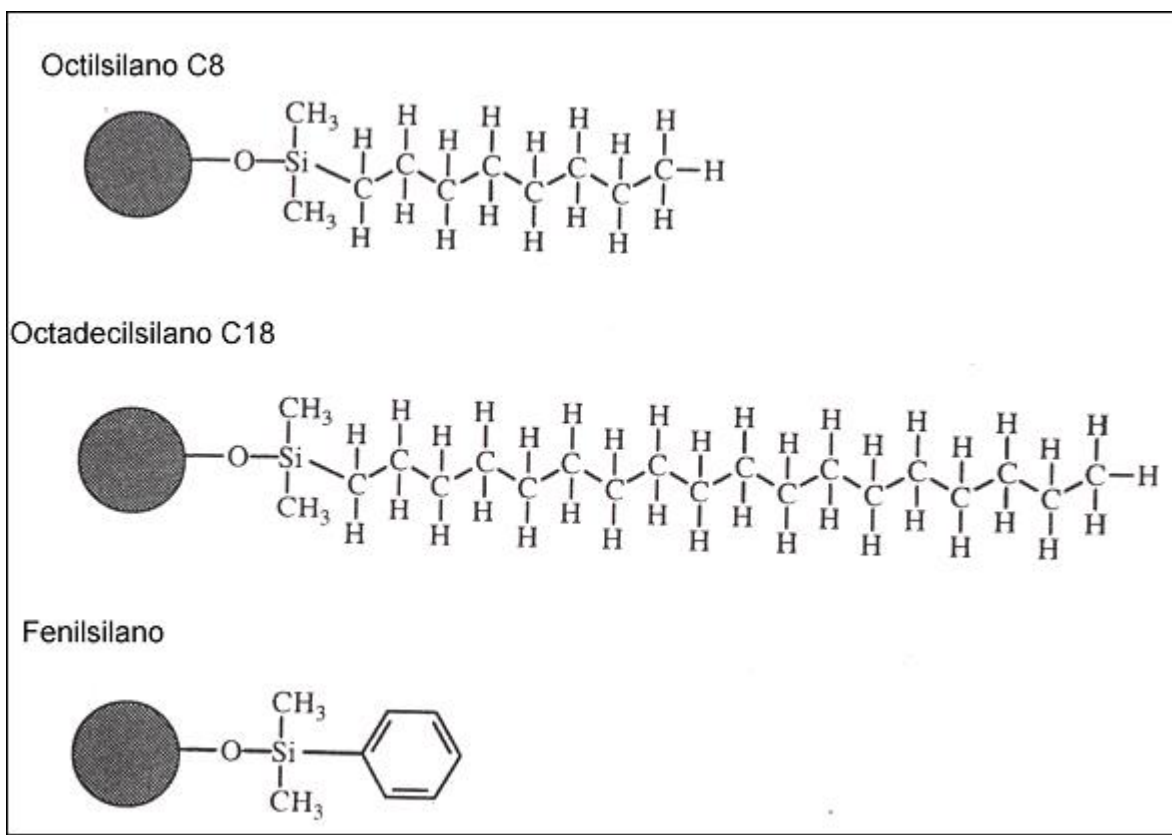


Fig.16 – Exemplos de algumas fases reversas de sílicas funcionalizadas.

A sílica funcionalizada mais popular é a sílica C18 por causa da sua ampla utilização em HPLC e sua imediata adoção na EFS no início dos anos 80. A sílica C18 é uma fase sólida versátil para o uso em amostras aquosas com uma ampla variação de polaridades. O grau de recobrimento da superfície pelo grupo alquila do organossilano (de C2 até C18) variará, respectivamente, de 5 até 19% em massa de carbono por sólido empacotado. Modificações baixas para grupos alquila de cadeia curta, tipo C2, com a maior modificação de todas ocorrendo na longa cadeia do C18. A capacidade de retenção da fase sólida é tanto maior quanto a percentagem de modificação. Assim, as sílicas do tipo C18 têm a maior capacidade de retenção de analito por grama de fase sólida.

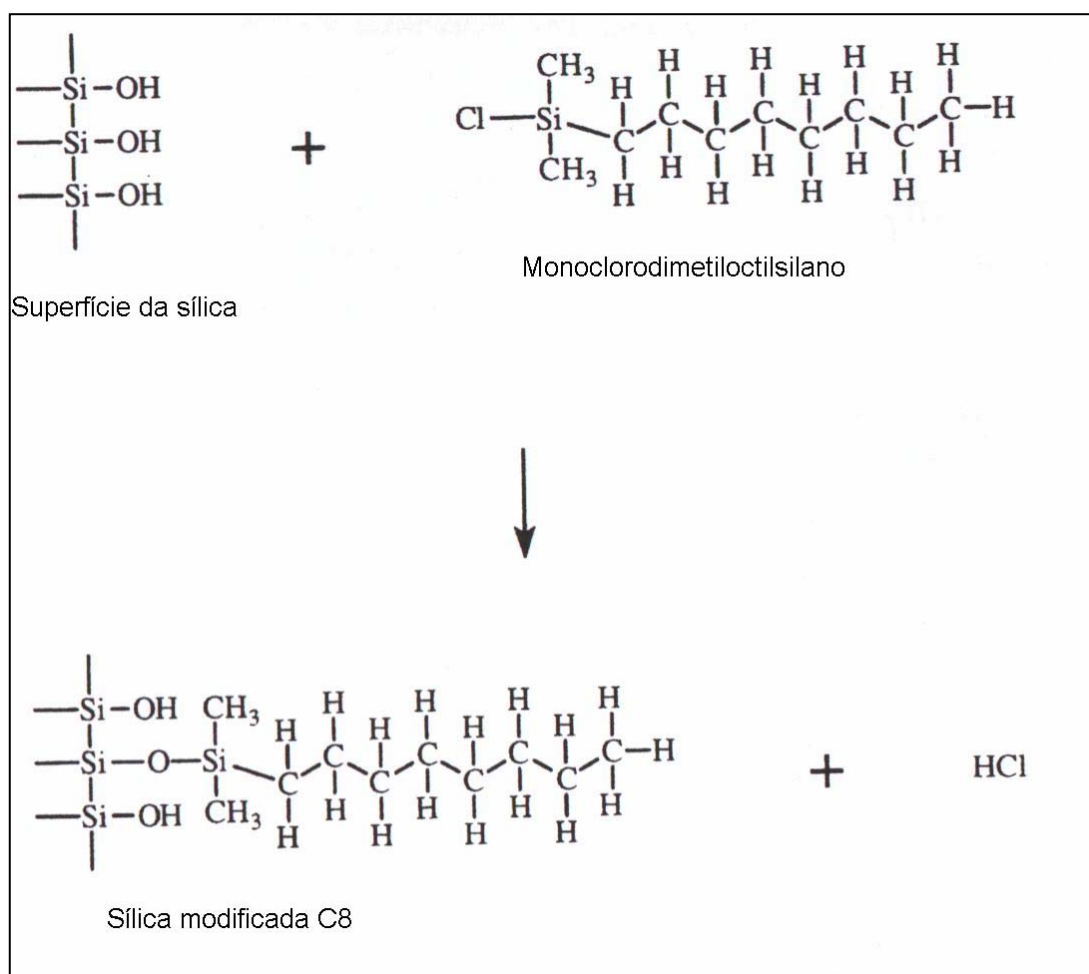


Fig.17 – Síntese de uma fase sólida reversa do tipo sílica funcionalizada C8.

### 5.4.3 –Sílica funcionalizada C18

As fases sólidas do tipo C18 são as mais empregadas em EFS. A fase reversa sílica C18, ODS, ou octadecilsiloxano  $[\text{Si}-\text{O}-\text{S}-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]$ , são disponíveis comercialmente (Varian, J.T.Baker, Waters, IST, P.R.COLA, etc) e são sintetizadas a partir da reação anidra da sílica-gel com o monoclorooctadecilsilano (forma monofuncional) e com o triclorooctadecilsilano (forma trifuncional). O C18 trifuncional tem tamanho médio de partícula de  $40\mu\text{m}$ , grau de recobrimento de 12 a 18% de C, porosidade média igual a  $60\text{Å}$ , área superficial específica de  $550\text{m}^2/\text{g}$ . É amplamente utilizado em EFS para: **(a)** extração de espécies hidrofóbicas em soluções aquosas, **(b)** drogas em soro, plasma e urina, **(c)** dessalinização de peptídeos, **(d)** ácidos orgânicos em vinhos e **(e)** preconcentração de traços de pesticidas em águas.

### 5.4.4 –Aplicações analíticas da sílica funcionalizada C18

Desde a década de 70, a sílica C18 é amplamente empregada no preparo e análise de um número variado de amostras, seja por cromatografia, principalmente HPLC, seja por extração em fase sólida. Mas foi no final dos anos 80, e principalmente durante toda a década de 90, que a automatização de processos analíticos envolvendo fases sólidas deu um destaque significativo às sílicas funcionalizadas, principalmente ao C18, pela sua grande versatilidade.

Em 1991, King, Lin e Kester [89] utilizaram cartuchos de Sep-Pak C18 modificados com ferrozina para a determinação espectrofotométrica de traços de Fe(II) em água do mar. Em um cartucho de Sep-Pak C18, previamente impregnado com ferrozina, fazia-se passar entre 50 e 400ml de água para retenção do Fe(II) sob a forma do complexo colorido Fe(II)-ferrozina. O complexo era posteriormente extraído com 10 mL de metanol. Utilizando este método, foi possível um fator de enriquecimento de cerca de 40 vezes para o Fe(II). A absorvidade molar do complexo Fe(II)-ferrozina foi estimada em  $22,81 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , em metanol, no comprimento de onda de 562nm. A recuperação do Fe(II) no C18 foi de 91% e o limite de detecção, em água do mar, foi de  $0,6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . O sistema apresentou uma faixa de aplicação entre  $0,6$  e  $185 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , com um

desvio padrão relativo de 2%. As principais interferências do sistema foram Cu(I), Ni(II), Co(II) e Fe(III), com o destaque para o uso de neocuproína dissolvida no eluente para eliminação da interferência de Cu(I).

Em 1994, Maksimova e Morosanova [90] utilizaram sílica C16 modificada com 1-nitroso-2-naftol para a determinação simultânea de Co(II) e Ni(II) adsorvidos em sistemas FIA. A faixa analítica de aplicação para o Ni(II) era de  $2,0 \times 10^{-6}$  a  $8,0 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, enquanto para o Co(II) foi de  $10^{-6}$  a  $5,0 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>. A proporção dos componentes, nas amostras, variou de 1:25 até 80:1. Neste mesmo ano, Maksimova, Morosanova e mais três outros colaboradores [91] utilizaram tubos indicadores recheados com sílica C16 e CF (fenilsilano) modificadas com 1-nitroso-2-naftol, 1,10-fenantrolina e 2,2'-dipiridil para a determinação de cobalto(II) e ferro(III). As amostras eram injetadas nos tubos com seringas.

Em 1995, Frenzel e Krekler [92] realizaram um estudo comparativo para a determinação espectrofotométrica de fenóis utilizando FIA para extração líquido-líquido (FIA-ELL) e extração em fase sólida (FIA-EFS), tendo C18 com adsorvente. A imina obtida como produto da reação entre o fenol e a 4-aminoantipirina (4-AAP) é extraída com clorofórmio, assim como é retida em C18. O sistema de extração em FIA apresenta um fator de enriquecimento de 10 vezes do analito quando comparado com o sistema de extração líquido-líquido convencional. Os limites de detecção observados para o sistema FIA-ELL foi de 11 µg.L<sup>-1</sup> e para o sistema FIA-EFS foi de 0,4 µg.L<sup>-1</sup>. Neste mesmo ano, Liu e Fang [93] determinaram traços de cobalto em material biológico utilizando um sistema FIA acoplado ao FAAS. O analito foi pré-concentrado e separado da matriz pela formação em linha do par iônico Co-Sal Nitroso R em presença de brometo de tetrabutylamônio. O par iônico era adsorvido, em linha, em micro-colunas de C18 e eluídos com etanol diretamente na entrada do sistema de nebulização do FAAS. O fator de enriquecimento obtido foi de 40 vezes e a frequência de amostragem foi de 45 h<sup>-1</sup>. O limite de detecção foi de 3 µg.L<sup>-1</sup> e o desvio relativo para níveis de cobalto de 50 µg.L<sup>-1</sup> foi de 2,4%. O método foi testado em material biológico de referência e apresentou boa concordância com os valores de referência.

Lima, Leandro e Santelli [94] propuseram um procedimento para a preconcentração e determinação de chumbo em amostras biológicas em um sistema contínuo acoplado ao FAAS. O Pb é quantitativamente pré-concentrado em tampão acetato na forma de um quelato formado entre o Pb e o dietilditiocarbamato retido numa minicoluna de C18, colocada na alça de injeção, e eluído com MIBK e introduzido diretamente no nebulizador. O limite de detecção de  $3\mu\text{g.L}^{-1}$  foi obtido utilizando-se a técnica para um tempo de preconcentração de 2 min e um desvio padrão relativo de 3,8% foi encontrado para três medidas de  $25\mu\text{g.L}^{-1}$  de Pb. A frequência de amostragem foi de  $24\text{h}^{-1}$  e usando um tempo de preconcentração de 10 min um fator de enriquecimento de 189 vezes foi estimado. O sistema de fluxo contínuo foi aplicado a algumas amostras de referência revelando que a metodologia pode ser facilmente aplicada para vegetais e amostras biológicas.

Em 1997, Gong e Zhang [95] desenvolveram um sensor óptico para a determinação de riboflavina em medicamentos por fluorescência. O sensor foi desenvolvido a partir da combinação de um sistema FIA acoplado a uma coluna contendo C18. O comprimento de onda de excitação e de emissão eram 466 e 515nm, respectivamente. O método foi aplicado para uma faixa de concentração entre  $2,2 - 91,8 \text{ ng.mL}^{-1}$ , com um limite de detecção de  $0,4 \text{ ng.mL}^{-1}$ . O desvio padrão relativo para uma amostra contendo  $15 \text{ ng.mL}^{-1}$  foi de 1,1%. Também neste mesmo ano, Cuculić, Mlakar e Branica [96] estudaram a adsorção sinérgica de misturas de complexantes para Cu(II) numa coluna de C18. O estudo foi dividido em dois sistemas de complexantes para Cu(II): o primeiro, 2-tenoiltrifluoracetona (TTA) e tri-*n*-butilfosfato (TBP) e o segundo, oxina-TPB. As medidas foram realizadas numa solução de NaCl  $0,55 \text{ mol.L}^{-1}$  com concentrações constantes de ligantes e íons Cu(II), em pH 6,0. Após ser complexado por uma das duas misturas, o cobre era adsorvido pela coluna de C18 e depois eluído com HCl  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  para posterior determinação dos íons Cu(II) por voltametria anódica de pulso diferencial. O efeito da adsorção sinérgica na coluna pelo sistema Cu-TTA-TTB apresentou uma retenção de cerca de 80% de Cu(II) enquanto nenhuma adsorção foi observada para a mistura oxina-TPB.

Tikhomirova e Fadeeva [97] propuseram um método para preconcentração de Cu(II) e As(III) com dietilditiocarbamato (DEDTC). As reações com DEDTC eram feitas em linha e os complexos Cu(DEDTC)<sub>2</sub> e As(DEDTC)<sub>3</sub> eram retidos numa micro coluna contendo C16 e depois os complexos eram eluídos com etanol e lidos diretamente por FAAS. Em condições ideais, o arsênio teve uma recuperação maior que 80%.

Gong, Zhang e Yang [98] desenvolveram um sensor óptico para a determinação por fluorescência de alguns alcalóides utilizando C18 como substrato. O sensor foi acoplado a um sistema FIA, utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol.L<sup>-1</sup> como carregador. Os limites de detecção para quinina, cinchonina, quinidina e cinchonidina foram 2,3, 31,6, 2,3 e 31,6ng.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Akatsuka e colaboradores [99] desenvolveram um método para dosagem de Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd e Pb em água do mar por ICP-MS. O método se baseava na formação de quelatos destes metais com o 5-Br-PAPS em solução aquosa e posterior adsorção dos mesmos em sílica C18. Para tal, tomava-se 100mL da amostra de água do mar, adicionava o agente quelante em pH 8,3 e fazia passar tal mistura pela coluna de C18. Os metais era eluídos com 4,0mL de HNO<sub>3</sub> 1,0 mol.L<sup>-1</sup>. O método apresentou um fator de enriquecimento de 25 vezes, e os limites de detecção variaram de 0,08 ng.L<sup>-1</sup> para o Cd a 16 ng.L<sup>-1</sup> para o Fe.

Teixeira e colaboradores produziram uma série de trabalhos, utilizando o reagente TAN imobilizado em C18 para separação, preconcentração e determinação de metais. No primeiro trabalho [100], utilizou-se uma cela defluxo feita em acrílico, de 1mm de espessura por 78mm<sup>2</sup> de área preenchida com o C18 impregnado com TAN. Esta cela foi utilizada para a determinação de Zn em medicamentos utilizando a espectrofotometria de absorção molecular em fase sólida associada a um sistema de fluxo. O Zn(II) era retido no sistema TAN-C18, em pH 6,2, e posteriormente eluído com HCl 0,5 mol.L<sup>-1</sup>. O sistema foi aplicado para uma faixa de concentração de Zn(II) de 0,04 a 4,0 mg.L<sup>-1</sup> com um desvio relativo de 3,3%. O sistema apresentava uma frequência de amostragem de 45 h<sup>-1</sup> e um LD de 10µg.L<sup>-1</sup> para 99,7% de confiança. O segundo trabalho [101] relata detalhes da construção desta mesma cela de fluxo e aplicação para medidas

espectrofotométricas de Co(II), em fase sólida, utilizando o mesmo sistema TAN-C18. Este trabalho descreve com detalhes todas as etapas da confecção de uma cela de acrílico plana como reator para FI-EFS, suas vantagens em relação à utilização de mini-colunas, principalmente com relação à impedância hidrodinâmica do sistema de fluxo. O sistema também relata detalhes sobre o posicionamento da cela no caminho óptico do espectrofotômetro e dos riscos devido a ocorrência de caminhos preferências quando a cela não está corretamente preenchida. O sistema Co(II)-TAN-C18 apresentou absorvidade molar igual a  $1,86 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  e um desvio padrão relativo de 1,4% (n=15). A frequência de amostragem foi de  $40 \text{ h}^{-1}$  e o limite de detecção para o Co(II) foi de  $15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  para 99,7% de confiança. Um terceiro trabalho relata a determinação de Co(II) em fármacos utilizando uma cela de vidro cilíndrica, de 3mm de comprimento por 1,5mm de diâmetro interno preenchida com o C18 impregnado com TAN [102], que é introduzido no caminho óptico de um espectrofotômetro de absorção molecular. O procedimento consistia em injetar manualmente, com uma seringa plástica de 5mL, 3mL da solução aquosa da amostra, contendo tampão hexamina pH 7,0 e um pouco de amônia, com um fluxo de aproximadamente  $1,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . É importante destacar que a absorvância do Co(II) retido no sistema TAN-C18 é medida em dois comprimentos de onda: 572nm, onde observa-se o maior sinal de absorvância do complexo, e 750nm, comprimento de onda onde o analito não absorve. A absorvância final é determinada pela diferença entre os dois sinais. Ao final de cada medida, o cobalto é eluído com HCl  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  e a cela é lavada com água e tampão hexamina antes de cada medida. O Co(II) pode ser determinado numa faixa entre  $10\text{--}160 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  e apresenta uma absorvidade molar aparente de  $\epsilon = 2,62 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

## **6 - DETERMINAÇÃO DE COBRE POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR USANDO CUPROÍNA EM PRESENÇA DE ETANOL E TRITON – X100.**

### **6.1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Antes do estudo dos sistemas em fase sólida para a separação, preconcentração e determinação de cobre, foram realizados estudos preliminares em sistemas espectrofotométricos utilizando a 2,2'-biquinolina (cuproína) com o intuito de coletar informações para determinar em quais condições o reagente seria mais propício para ser adaptado para medidas por espectrofotometria em fase sólida. Durante os testes preliminares foram introduzidas algumas modificações, como o uso de etanol absoluto e agentes tensoativos, nos sistemas espectrofotométricos já conhecidos, com o intuito de melhorar a eficiência dos mesmos e também como parâmetro de comparação com os resultados obtidos nos sistemas de EFS.

### **6.2 – OBJETIVOS**

Os métodos espectrofotométricos tradicionais, que utilizam cuproína para a dosagem de cobre, sempre envolveram a extração do quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$  com solventes apolares como tetracloreto de carbono. O objetivo inicial era a eliminação dos solventes tradicionalmente utilizados na dosagem de cobre, uma vez que a 2,2'-biquinolina é pouco solúvel em água ( $6,4 \times 10^{-5} \text{ g.L}^{-1}$ ) e solúvel em solventes orgânicos apolares (álcool iso-amílico, acetato de isoamila, tetracloreto de carbono) ou pouco polares, como a dimetilformamida. Para eliminar a etapa de extração, foi necessário o uso de agentes surfactantes para auxiliar na dissolução do reagente e de seus quelatos em água ou etanol. Esta etapa do trabalho se propõe a desenvolver um método espectrofotométrico convencional para a determinação de Cu(I) utilizando o reagente 2,2'-biquinolina dissolvido em água ou etanol com o auxílio de surfactantes.



## **6.3 – REAGENTES E INSTRUMENTOS**

### **6.3.1 - Reagentes**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções utilizadas foram preparadas com água purificada em um sistema *Easypure* (resistência 18,2 MΩ.cm) e armazenadas em recipientes plásticos de PVC previamente descontaminados. As soluções estoques de cobre ( $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foram preparada partindo-se de soluções ácidas contidas em ampolas do tipo *Titrisol* (Merck) transferindo-se o conteúdo da referida ampola para um balão de 1000mL e completando o volume do mesmo com água desionizada. As soluções de trabalho de 100, 10 e  $1\mu\text{g.mL}^{-1}$  foram preparadas a partir das diluições apropriadas da solução estoque. A solução etanólica de cuproína 0,01% ( $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ) foi obtida dissolvendo-se 0,01g de 2,2'-biquinolina (Baker) na presença 0,05g de Triton X-100 (Aldrich) e o volume completado até 100mL com etanol absoluto (Merck). A solução aquosa de hidroxilamina 1% (m/v) foi obtida dissolvendo-se 1g de cloreto de hidroxilamina (Aldrich) em 100 mL de água. O tampão ácido acético / acetato de sódio  $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 4,8) foi preparado pela dissolução de 23,67mL de ácido acético glacial (Merck) e 17,31g de acetato de sódio tri-hidratado em água purificada até o volume de 1000mL. A solução de EDTA 1% (m/v) foi preparada pela dissolução de 1g do sal dissódico do ácido etileno-diamino-tetracético (Baker) com 100mL de água.

### **6.3.2 - Instrumentos**

- Espectrofotômetro de Absorção Molecular VARIAN DMS 80
- Espectrofotômetro de Absorção Molecular UV-VIS CARY-1E
- Espectrofotômetro de Absorção Molecular UV-VIS CARY-5E
- Potenciômetro para medidas de pH Digimed DM 20 com eletrodo de vidro combinado DME-MV1
- Agitador magnético combinado com aquecedor Analyser
- Sistema de purificação de água Easypure Barnstead

#### **6.4 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL SUGERIDO**

Tomar uma alíquota contendo Cu(II) e transferi-la para um balão de 25mL e então adicionar 1mL de hidroxilamina 1% (m/v), 10mL de uma solução etanólica de cuproína  $4,0 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> / Triton X-100 0,05% (m/v), 5,0 mL de tampão ácido acético / acetato de sódio 1,0 mol.L<sup>-1</sup> (pH 4,8), 1,0 mL de EDTA 1% e completar com água purificada. Ler o sinal de absorvância contra um branco do reagente em 545nm com uma cubeta de 1,0 cm. As curvas analíticas de calibração foram obtidas pelo mesmo procedimento, tomando-se alíquotas de 0,0 a 5,0 mL de Cu(II) 50 mg.L<sup>-1</sup>.

#### **6.5 – ESTUDO DA NATUREZA DOS TENSOATIVOS**

Sabe-se que os agentes tensoativos têm a capacidade de alterar algumas características dos sistemas espectrofotométricos, tais como, sensibilidade, seletividade, solubilidade, cinética e estabilidade. Em alguns casos, os agentes tensoativos podem alterar o espectro do complexo, principalmente deslocando seu comprimento de onda de máxima absorvância.

Foram testados os tensoativos **Triton X-100**, **CTAB**, **Tween 20**, **Dodecil-hidrogenossulfato (DHS)**, **Tergitol XD** e **Polietilenoglicol**. Cada tensoativo foi testado nas concentrações de 0,5% e 1% (v/v), na presença da biquinolina nas concentrações de 0,1%, 0,05% e 0,01% (m/v) todos dissolvidos em água ou etanol.

Na tabela 5 são apresentados os resultados dos testes para os diversos tensoativos. Observando-se os resultados percebe-se que só foi possível solubilizar a cuproína em etanol nas concentrações de 0,05% e 0,01% (m/v) e na presença do surfactante Triton X-100 com concentrações superiores a 0,5% (v/v). Porém, ao prepararmos as amostras do quelato formado entre a cuproína e o Cu(I), para a obtenção do respectivo espectro de absorção molecular, apenas os balões onde foram adicionadas alíquotas da solução alcoólica de 2,2'-biquinolina a 0,01% (m/v) não apresentaram turvação.

**Tabela 5 – Dissolução da cuproína em etanol na presença de tensoativos**

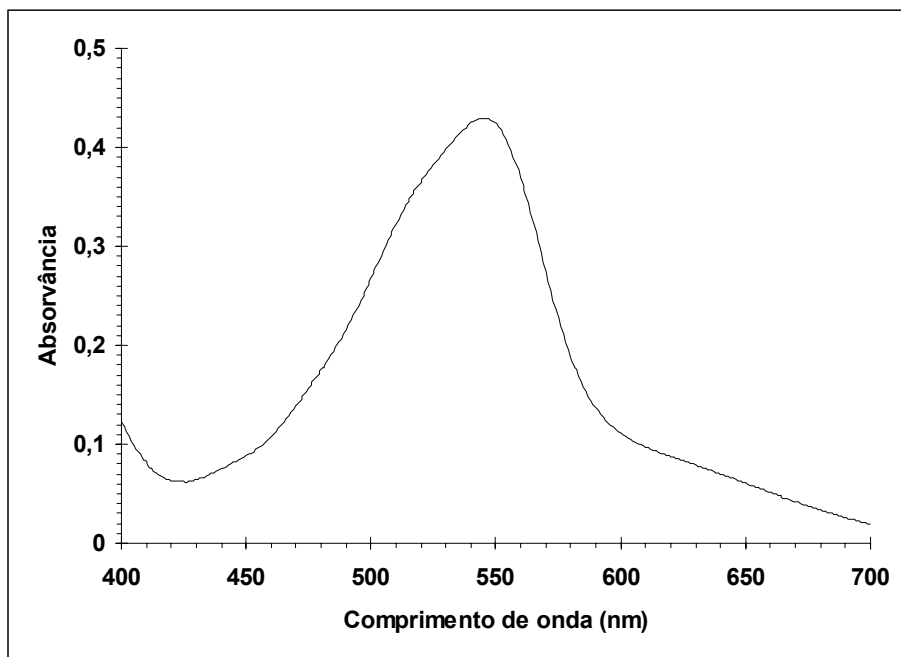
Tensoativos	Concentração da cuproína				
	0,50%	0,20%	0,10%	0,05%	0,01%
Triton X-100 1%	N	N	N	S	S
Triton X-100 0,5%	N	N	N	S	S
Tween 20 1%	N	N	N	N	N
Tergitol XD 1%	N	N	N	N	N
CTAB 1%	N	N	N	N	N
DHS 1%	N	N	N	N	N
Polietilenoglicol	N	N	N	N	N

**N = não dissolveu – S = dissolveu**

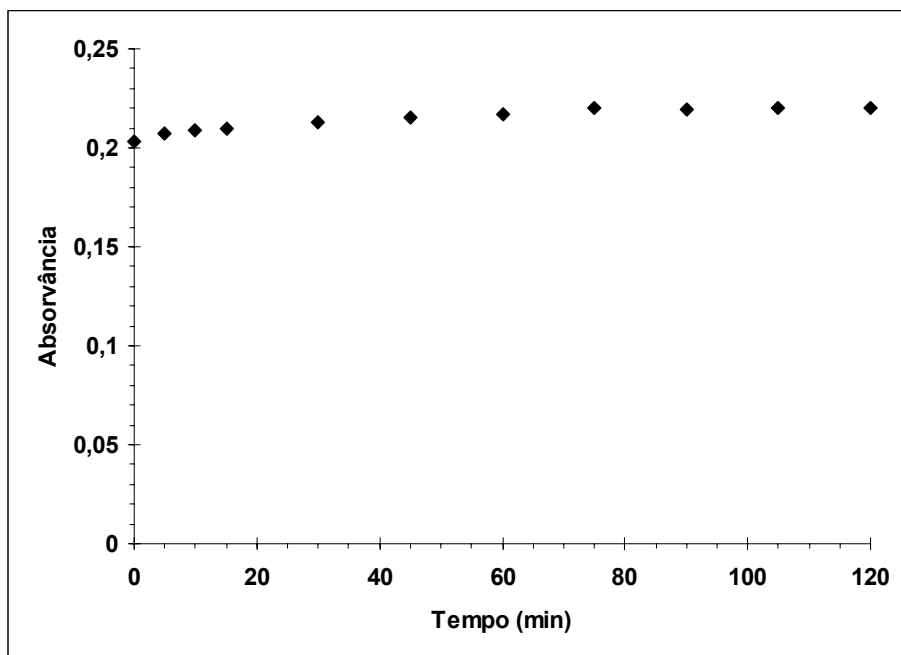
### **6.6 – ESPECTROS E ESTABILIDADE DO SISTEMA BIQ-Cu(I)**

A cuproína dissolvida em etanol é incolor, assim como o quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^{2+}$ , formado a partir da reação da cuproína com  $\text{Cu}(\text{II})$ , e por isso não houve a necessidade de obtermos os respectivos espectros destas espécies na região do visível. Uma solução alcoólica da cuproína / Triton-X100 reage imediatamente com o  $\text{Cu}(\text{I})$ , na presença do cloreto de hidroxilamina, que age como redutor, em meio ácido, na presença do tampão acetato pH 4,75, formando um complexo rosa, solúvel no meio, que atinge sua absorvância máxima em 545nm contra um branco do reagente em presença do tensoativo Triton X-100. A figura 18 mostra o espectro na região do visível do quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ , para uma solução contendo  $4\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  de  $\text{Cu}(\text{I})$  contra seu ensaio em branco em solução aquosa.

Observou-se que os quelatos do cobre(I) e cobre(II) com a 2,2'-biquinolina apresentaram uma alta estabilidade. O quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$  é estável por cerca de 48 horas. A figura 19 mostra o efeito da variação do sinal de absorvância com o tempo apenas para as primeiras 2 horas. No período de 48 horas observou-se que a variação da absorvância é inferior a 10%.



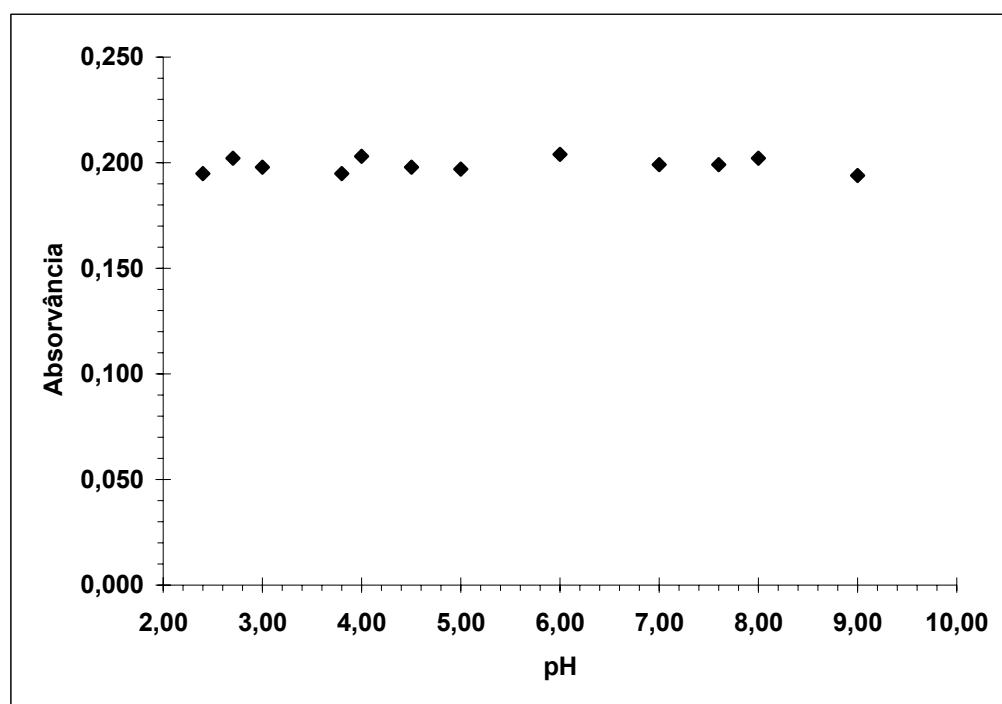
**Fig. 18 – Espectro do quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ :**  $\text{Cu}(\text{I}) = 2 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , em presença de cloreto de hidroxilamina 0,04% (m/v), cuproína  $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , tampão acético  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 4,8), etanol 0,4% (v/v) e Triton-X100 0,2% (v/v) contra um branco do reagente.



**Fig. 19 – Variação da absorvância com o tempo:**  $\text{Cu}(\text{I}) = 2 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , em presença de cloreto de hidroxilamina 0,04% (m/v), cuproína  $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , tampão acético  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 4,8), etanol 0,4% (v/v) e Triton-X100 0,2% (v/v) contra um branco do reagente.

## 6.7 – EFEITO DA VARIAÇÃO DA ACIDEZ

O efeito da variação da acidez sobre a absorvância do complexo  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$  foi estudado e os resultados, apresentados na figura 20, demonstraram que o sistema é muito estável para uma variação grande do pH, o que levou ao uso de um tampão com baixa concentração. Os testes foram realizados com os tampões glicina (faixa de pH entre 2 e 3), acético (faixa de pH entre 4 e 6), tris (faixa de pH entre 6 e 8) e tampão amoniacal (faixa de pH entre 9 e 11), todos com concentração aproximadamente 1M. Admitindo-se uma flutuação de 5% entre as medidas de absorvância, optou-se pelo tampão ácido acético / acetato de sódio pH 4,75 para o procedimento geral. Para o referido tampão, o pH 4,75 é onde o tampão apresenta a maior eficiência, ou seja, maior poder tamponante.

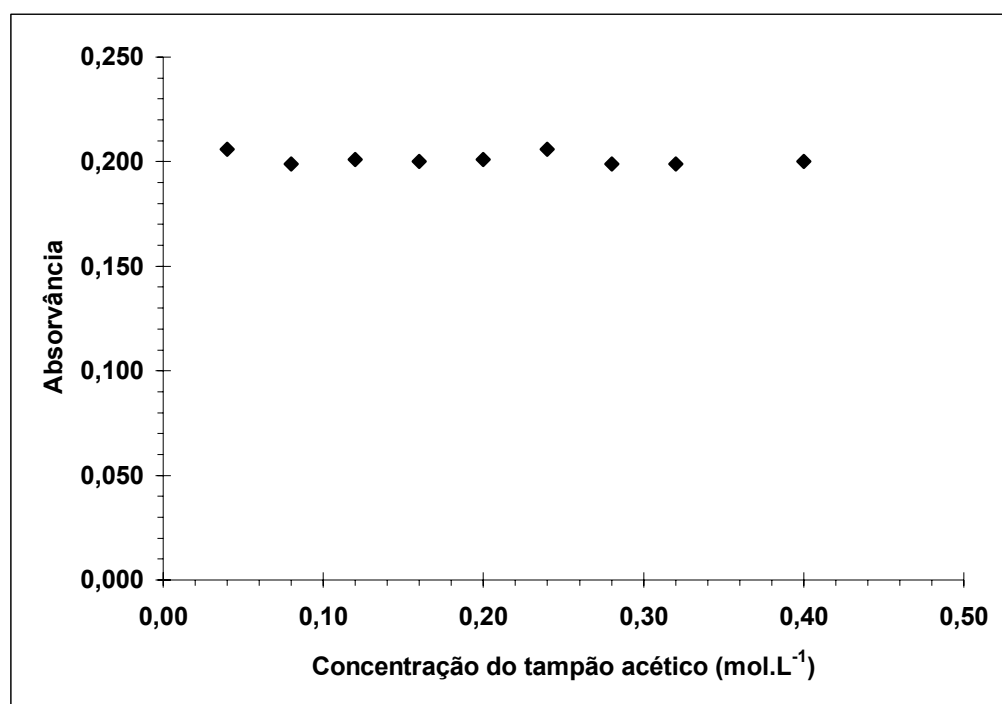


**Fig. 20 – Variação da absorvância em função da variação da acidez:**  $\text{Cu}(\text{I}) = 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , em presença de cloreto de hidroxilamina 0,04% (m/v), cuproína  $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , etanol 0,4% (v/v) e Triton-X100 0,2% (v/v), contra um branco do reagente.

## 6.8 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO

Estudou-se o efeito da variação da absorvância em função da variação da concentração da solução tampão ácido acético/acetato de sódio e pH 4,8. A variação da concentração do tampão acético não influencia significativamente no sinal de absorvância. Os resultados encontrados são apresentados na figura 21.

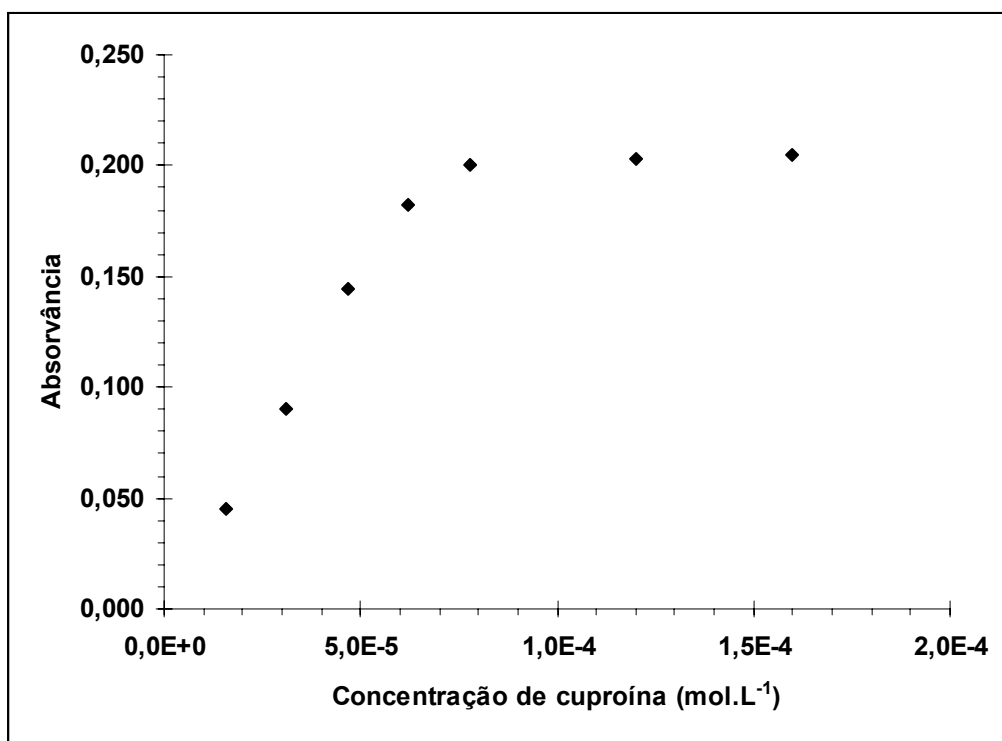
Como pode ser observado no item 8.5, a variação do pH não é um fator crítico para o sistema  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ . Assim, como o sistema não apresentou uma grande variação do valor da absorvância em função da variação do pH ou da concentração do tampão acético, adotou-se o valor de 5mL de tampão ácido acético / acetato de sódio pH 4,8, e concentração  $1\text{mol.L}^{-1}$ , para o procedimento geral.



**Fig. 21 – Efeito da variação da concentração de tampão ácido acético / acetato de sódio (pH 4,8):**  $\text{Cu}(\text{I}) = 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , em presença de cloreto de hidroxilamina 0,04% (m/v), cuproína  $1,6 \times 10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$ , etanol 0,4% (v/v) e Triton-X100 0,2% (v/v) contra um branco do reagente.

## 6.9 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CUPROÍNA

O efeito da variação da concentração da cuproína foi estudado e os resultados obtidos indicam que, para  $50\mu\text{g}$  de  $\text{Cu(I)}$  e uma solução de cuproína  $3,9 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , dissolvida em Triton X-100 0,05% (v/v) e etanol, a concentração mínima necessária para se obter um valor máximo e constante de absorvância é de  $7,8 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ . A figura 22 apresenta o gráfico da variação da absorvância em relação à variação da concentração da cuproína. Vale a pena salientar que, ao contrário de alguns reagentes espectrofotométricos, como os da família dos *o,o'*-dihidroxiarilazo, a cuproína e seus derivados apresentam uma alta pureza. As soluções alcoólicas de cuproína com concentrações superiores a 1% (m/v), mesmo na presença do tensoativo Triton X-100, apresentam baixa solubilidade.



**Fig. 22 – Efeito da variação da concentração de cuproína sobre a absorvância do  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ :**  $\text{Cu(I)} = 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , em presença de cloreto de hidroxilamina 0,04% (m/v), tampão acético 0,2 mol.L<sup>-1</sup> (pH 4,8), etanol 0,4% (v/v) e Triton-X100 0,2% (v/v) contra um branco do reagente.

Em face aos resultados obtidos, adotou-se 10mL da solução alcoólica da cuproína  $3,9 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ /Triton X-100 0,5% como margem de segurança no

procedimento geral para garantir um excesso do complexante no meio reacional. Vale salientar que, para que não houvesse precipitação do reagente ou dos seus quelatos em solução aquosa, mesmo na presença do tensoativo, era necessário manter a concentração final de etanol igual ou superior a 0,2% (v/v).

#### **6.10 – EFEITO DA NATUREZA E CONCENTRAÇÃO DO REDUTOR**

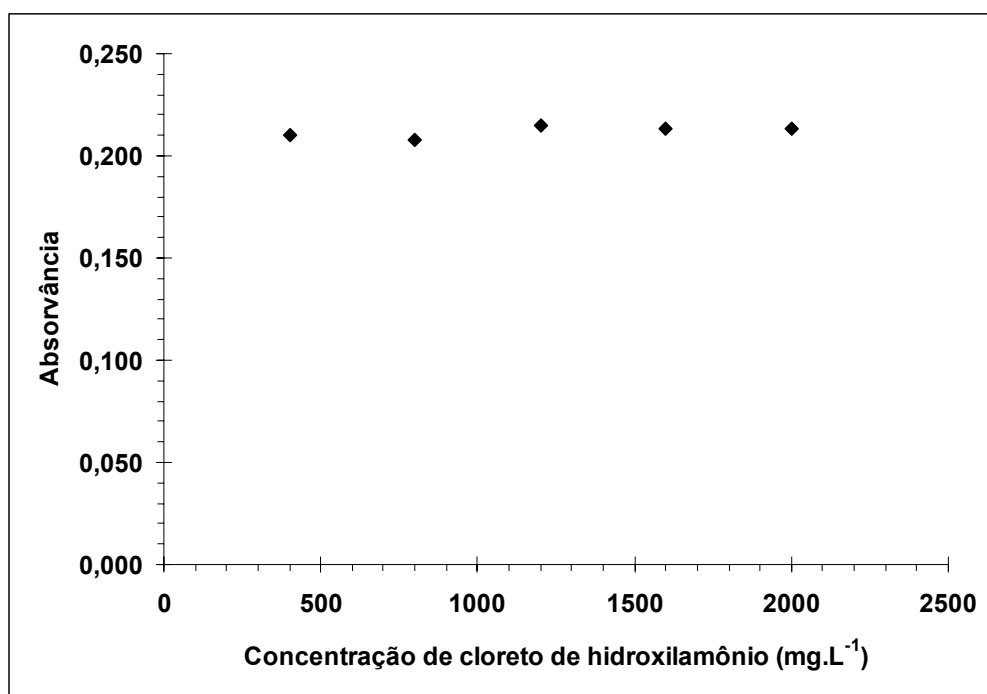
A cuproína pode ser obtida a partir da desidrogenação catalítica da quinolina, que apresenta um anel benzênico geminado a um anel de piridina (vide item 4.3, p. 21). Esta estrutura molecular é a razão da sua alta seletividade para os íons cobre, pois a presença de um grupo benzênico nas posições **2-** e **9-** adjacentes aos nitrogênios heterocíclicos causa um impedimento estérico tornando o reagente seletivo para íons cobre. Assim, devido a presença dos dois grupos benzênicos geminados, a cuproína não pode formar quelatos **3:1**, ou mesmo **2:1 quadrado-planos**, com qualquer cátion, como Fe(II) ou V(IV). Entretanto, os grupos benzênicos não interferem com a coordenação do Cu(I) ou Cu(II), que forma quelatos **2:1 tetraédricos**, que encontram-se no plano formando um ângulo reto (vide item 4.2, p. 18). Devido a esta alta seletividade para os íons Cu(I), qualquer método espectrofotométrico desenvolvido com a cuproína faz uso de algum reagente redutor, para converter o Cu(II) em Cu(I), uma vez que o quelato **Cu(biq)<sub>2</sub><sup>2+</sup>** é incolor e apenas o quelato **Cu(biq)<sub>2</sub><sup>+</sup>** é colorido. Assim, foi feito o estudo da natureza do redutor e da variação da absorvância em função da concentração do redutor. Para isto foram testados os redutores cloreto de hidroxilamina, ácido ascórbico, sulfito de sódio e sulfato de hidrazina, para uma concentração de Cu(I) igual a  $2,0\mu\text{g.mL}^{-1}$ , todos a uma concentração final de 0,04% e preparados imediatamente antes do teste. Observou-se que não houve variação significativa do sinal de absorvância em função da natureza do redutor. Em face destes resultados optamos por continuar utilizando hidroxilamina, pois a solução da mesma deteriora-se muito mais lentamente que as outras podendo ser usada por alguns dias. Os resultados dos testes para natureza do redutor encontram-se na tabela 6.



**Tabela 6 – Efeito da natureza do redutor. Cu(I) = 2,0 mg.L<sup>-1</sup> e pH 4,8.**

<b>Redutor</b>	<b>Absorvância</b>
Cloreto de hidroxilamina	0,204
Ácido ascórbico	0,202
Sulfito de sódio	0,203
Sulfato de hidrazina	0,207

Uma vez escolhido o redutor, estudou-se então o efeito variação da absorvância em função da concentração do redutor cloreto de hidroxilamina. Os resultados encontram-se representados na figura 23. Como o sinal se manteve estável em toda a faixa estudada (400-2000 mg.L<sup>-1</sup>) optou-se por utilizar apenas 400mg.L<sup>-1</sup> que era o valor mínimo.



**Fig. 23 – Variação da absorvância em função da variação da concentração do cloreto de hidroxilamina:** Cu(I) = 2 µg.mL<sup>-1</sup>, cuproína 1,6x10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>, tampão acético 0,2 mol.L<sup>-1</sup> (pH 4,8), etanol 0,4% (v/v) e Triton-X100 0,2% (v/v) contra um branco do reagente.

## **6.11 – EFEITO DE OUTROS ÍONS**

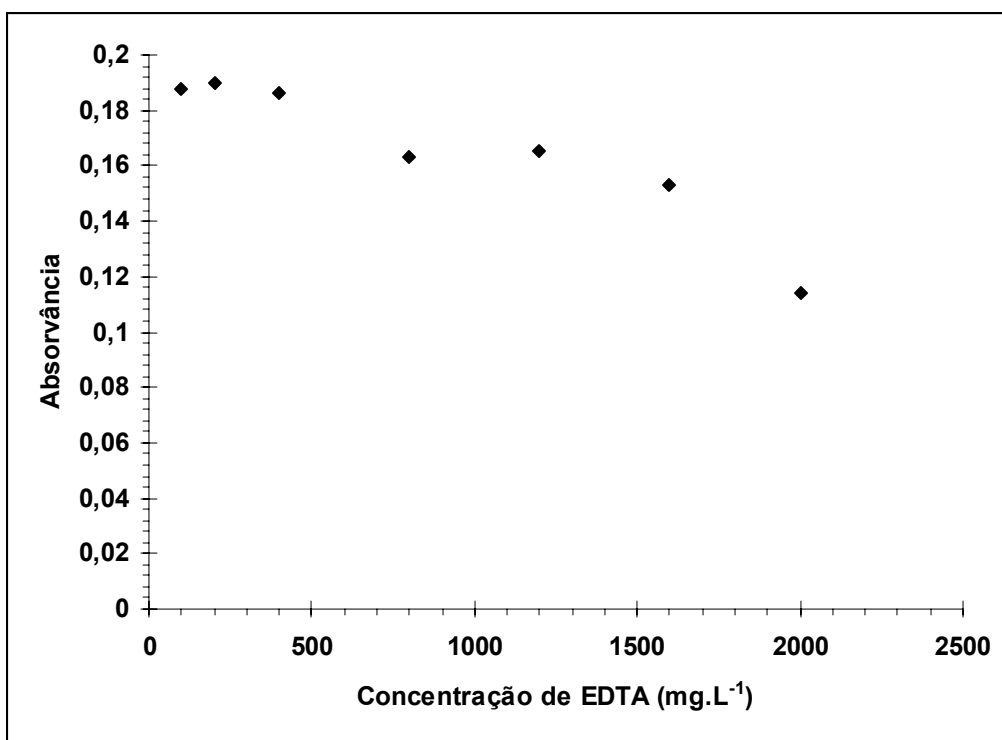
Embora a literatura relate, desde 1950, a alta seletividade da cuproína para dosagem de cobre, principalmente em matrizes altamente ferrosas, estudou-se o grau de interferência de vários íons, em diversas proporções, sobre a absorvância do quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ . Assim, tomou-se uma massa de  $\text{Cu}(\text{I})$  igual a 50  $\mu\text{g}$ , em presença de cloreto de hidroxilamina 0,04% (m/v), cuproína  $1,6 \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, tampão acético 0,2 mol.L<sup>-1</sup> (pH 4,8), etanol 0,4% (v/v) e Triton X-100 0,2% (v/v), levados a 25mL com água purificada, contra um branco do reagente.

Foram testados os ânions: citrato, sulfato, tartarato, tiosulfato, fosfato, pirofosfato, cloreto, cianeto e alguns ácidos poliaminocarboxílicos (EDTA, CDTA, DTPA, NTA, HEDTA e TTHA), todos em uma proporção de 100:1 em relação à concentração de  $\text{Cu}(\text{I})$  e adicionados após a cuproína. Entre os ânions testados, apenas o HEDTA e TTHA provocaram interferência no sinal de absorvância. Como nenhum dos demais ânions provocou alterações significativas na absorvância do complexo, estes foram testados como agentes mascarantes de alguns cátions interferentes.

Para o estudo da interferência dos cátions foram testadas soluções ácidas 100:1 dos metais: Pb, W, Mo, Hg, Na, K, Ca, Mg, Ba, Bi, Sb, Sr, Zn, Cd, Al, Ni, Cr, Co, Ti, Fe, Sn, Be, La, Mn e V. Vale salientar que, em virtude da ação redutora da hidroxilamina presente no meio, alguns metais, como ferro e vanádio, foram testados em estados de oxidação mais baixos, ou seja,  $\text{Fe}(\text{II})$  e  $\text{V}(\text{IV})$ , por exemplo. Entre os íons testados, os seguintes cátions interferem sobre o sistema:  $\text{Ti}(\text{IV})$ ,  $\text{Cr}(\text{III})$ ,  $\text{Co}(\text{II})$ ,  $\text{Sn}(\text{II})$ ,  $\text{Bi}(\text{II})$ ,  $\text{Hg}(\text{II})$ ,  $\text{Ca}(\text{II})$ ,  $\text{Mo}(\text{VI})$ ,  $\text{U}(\text{VI})$ ,  $\text{W}(\text{VI})$  interferem a uma proporção igual ou maior que 100:1; o  $\text{Hg}(\text{II})$  interfere a uma proporção igual ou maior a 10:1 e nenhum metal interfere na proporção de 1:1 com relação ao  $\text{Cu}(\text{I})$ . A interferência do tungstênio, na proporção de 100:1, foi eliminada com a adição de EDTA. Essas interferências podem ser explicadas pelo fato de desde os anos 50, quando foram descobertas, até hoje, os métodos espectrofotométricos padrões de dosagem cobre envolvendo a cuproína e derivados[103, 104] envolvem uma etapa de extração líquido-líquido, o que indiretamente já aumenta a seletividade e sensibilidade do sistema.

## 6.12 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE EDTA

Contrariando a literatura, a cuproína apresentou uma baixa seletividade, pois o sistema  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$  sofreu a interferência de alguns cátions. Para aumentar a seletividade, adicionou-se como parte integrante do procedimento experimental o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) de forma a prevenir a ação destes metais. Assim, estudou-se o efeito da variação da concentração do EDTA sobre a absorvância do quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ . Observou-se que concentrações de EDTA acima de  $400 \text{ mg.L}^{-1}$  reduz a absorvância do sistema. Vale destacar que o EDTA foi adicionado após a cuproína. Os resultados encontram-se na figura 24.



**Fig. 24 – Efeito da variação da concentração de EDTA sobre a absorvância do  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ :**  $\text{Cu}(\text{I}) = 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , em presença de cloreto de hidroxilamina 0,04% (m/v), cuproína  $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , tampão acético  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 4,8), etanol 0,4% (v/v) e Triton-X100 0,2% (v/v) contra um branco do reagente.

### 6.13 – EFEITO DA ORDEM DE ADIÇÃO DOS REAGENTES

Estudou-se o efeito da adição dos reagentes envolvidos no procedimento experimental. Como o procedimento envolve a adição de cinco diferentes soluções, e haveria muitas combinações a serem testadas, selecionaram-se aquelas consideradas mais importantes. Entre uma adição e outra, executa-se uma rápida agitação, ocorrendo assim um pequeno intervalo de tempo entre as adições. O estudo foi realizado com uma concentração de Cu(I) igual a  $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e seguindo o mesmo procedimento dos testes anteriores.

Pelos resultados apresentados na tabela 7 observou-se que a ordem de adição é crítica, devendo a adição do cobre e do redutor anteceder a adição do reagente. Observa-se que há uma diminuição maior que 5% para o sinal de absorvância quando: **(a)** o EDTA é adicionado antes da cuproína, **(b)** quando o Cu(II) é adicionado após o EDTA e a cuproína e **(c)** quando o tampão é adicionado antes do cloreto de hidroxilamina.

**Tabela 7 – Estudo da ordem de adição dos reagentes**

<b>Ordem de adição</b>	<b>Absorvância</b>
Cu-biquinolina-hidroxilamina-tampão-EDTA	0,185
Cu-hidroxilamina-biquinolina-tampão-EDTA	0,183
Cu-tampão-hidroxilamina-biquinolina-EDTA	0,180
Biquinolina-hidroxilamina-Cu-tampão-EDTA	0,180
Biquinolina-hidroxilamina-tampão-Cu-EDTA	0,179
Cu-biquinolina-tampão-hidroxilamina-EDTA	0,160
Cu-tampão-biquinolina-hidroxilamina-EDTA	0,098
Cu-hidroxilamina-tampão-EDTA-biquinolina	0,056
Biquinolina-EDTA-Cu-tampão-hidroxilamina	0,052
Cu-EDTA-hidroxilamina-biquinolina-tampão	0,051
Biquinolina-hidroxilamina-tampão-EDTA-Cu	0,050
Cu-biquinolina-EDTA-hidroxilamina-tampão	0,048

## 6.14 – CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO

A obediência à lei de Beer foi verificada variando-se a concentração do íon cobre(I) de 1,0 a 5,0 mg.L<sup>-1</sup> e a absorvidade molar para o complexo Cu(biq)<sub>2</sub><sup>+</sup> foi estimada em 6,25 x 10<sup>3</sup> L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. A curva analítica foi feita em presença de hidroxilamina 0,04%, cuproína 1,6x10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>, EDTA 0,04% (m/v), tampão acetato de sódio 0,2 mol.L<sup>-1</sup> (pH 4,8), etanol 0,4% (v/v) e Triton-X100 0,2% (v/v) contra um branco do reagente em 545nm. A curva analítica e outras características analíticas encontra-se na figura 25 e na tabela 8, respectivamente.

Tabela 8 – Características Analíticas do Método Proposto

Absorvidade Molar	6,25 x 10 <sup>3</sup> L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
Coefficiente de Correlação	0,9999
Limite de Detecção (LD)	0,049 mg.L <sup>-1</sup>
Limite de Quantificação (LQ)	0,16 mg.L <sup>-1</sup>
Faixa Linear Dinâmica	0,16 a 5,0 mg.L <sup>-1</sup>
Coefficiente de variação (n=13)	2,5%

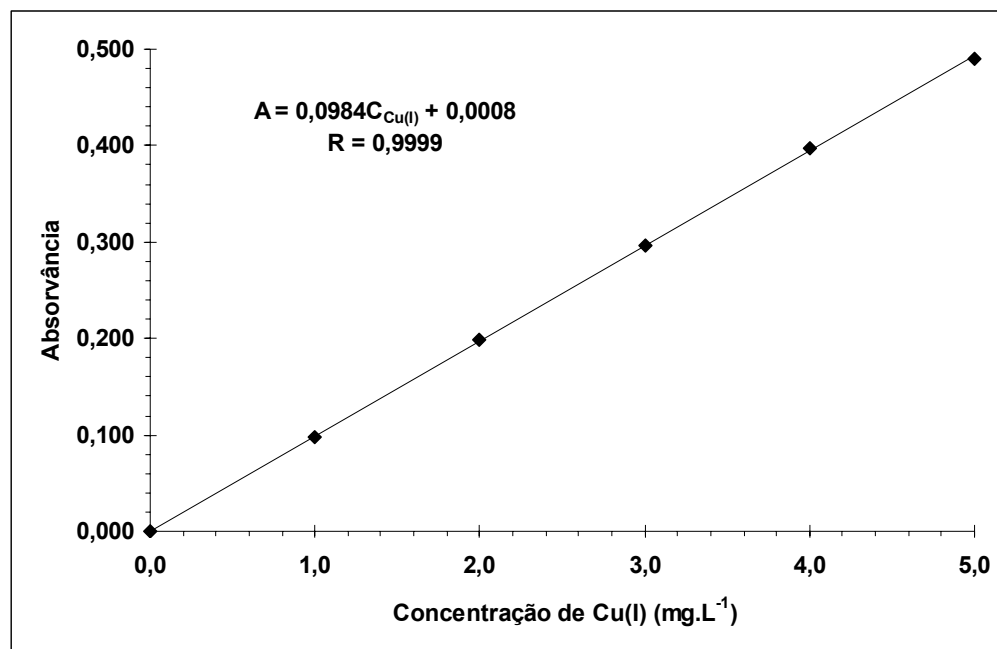


Fig. 25 - Curva analítica do sistema Cu(biq)<sub>2</sub><sup>+</sup>: Cu(I) = 0 a 5 mg.L<sup>-1</sup>, em presença de hidroxilamina 0,04%, cuproína 1,6x10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>, EDTA 0,04%, tampão ácido acético/acetato de sódio 0,2 mol.L<sup>-1</sup> (pH 4,8), etanol 0,4% e Triton-X100 0,2%, contra um branco do reagente.

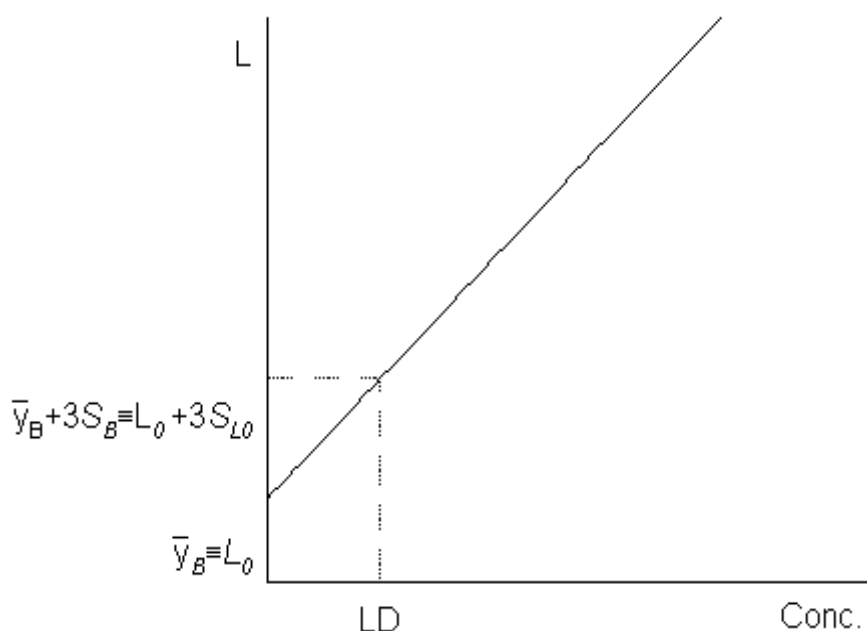
Os *limites de detecção (LD)* e *quantificação (LQ)* são parâmetros importantes, pois nos fornecem a possibilidade de analisar com boa precisão um elemento com baixo nível de concentração. Convencionalmente, o LD para um determinado analito é a quantidade mínima ou concentração que pode ser detectada por um dado procedimento analítico, enquanto o LQ para um determinado analito é a quantidade mínima ou concentração que pode ser quantificada por um dado procedimento analítico. Há ainda um outro limite, não muito utilizado, conhecido como *critério de decisão* ou *nível crítico (CD)*, que é o limiar da aplicabilidade de um método, ou seja, abaixo deste ponto não é mais possível realizar nenhuma medição segura, nem quantitativa e nem qualitativa, do analito. A *faixa linear dinâmica* é a região entre o LQ e o limite superior da curva analítica, onde realmente ocorre a medição analítica, ou seja, é a faixa de trabalho real [105].

Segundo Currie [106], em uma situação que exista uma grande quantidade de ensaios para os valores do branco e em que se garanta também que, na gama das baixas concentrações, os desvios padrão associados aos sinais são constantes, o valor do CD é determinado como  $1,65\sigma_b$ , o LD é determinado como  $3,29\sigma_b$  e o LQ como  $10\sigma_b$ , onde  $\sigma_b$  é o desvio padrão do sinal de trinta medidas do sinal instrumental do ensaio em branco e 95% de confiança.

Os vários tipos de limites anteriormente citados, definidos com base nos valores do sinal médio do branco e do respectivo desvio padrão associado, têm de ser posteriormente convertidos em concentrações equivalentes, operação cuja concretização nem sempre é fácil dentro da realidade laboratorial. Em análise instrumental a conversão de um sinal na respectiva concentração é levada a efeito através de um referencial, normalmente uma curva analítica, obtida pelo cálculo dos mínimos quadrados, do tipo  $L = aC + L_0$  (figura 26), onde  $L$  é o sinal instrumental,  $a$  é a inclinação da reta,  $C$  a concentração do analito,  $L_0$  o sinal instrumental para uma concentração analítica igual a zero.

Nestas condições, o valor de um sinal convertido na respectiva concentração irá depender do referencial utilizado e da qualidade por este apresentada, não sendo, portanto, passível de qualquer uniformização. Além

disso, uma outra dificuldade que freqüentemente ocorre reside na impossibilidade de se produzir em laboratório um branco verdadeiro, dado que, em situações de matriz complexa, não é viável a preparação de uma solução que apresente exatamente todas as características das amostras em estudo, exceto o analito que se pretende dosar. A substituição do branco verdadeiro pelo branco dos reagentes adicionados à amostra no decorrer do ensaio é uma prática a evitar uma vez que irá fornecer valores subestimados para o limite de detecção.



**Fig. 26 – Avaliação do limite de detecção através da ordenada na origem das curvas analíticas de calibração.**

A estimativa do LD ou do LQ, com base na aquisição dos sinais de várias replicatas de um branco de reagentes, fornece apenas informações sobre o desempenho do equipamento, um dos muitos aspectos envolvidos em situações analíticas reais. O valor assim obtido, normalmente bastante baixo, representará um **limite de detecção instrumental**, não estando nele contabilizadas as variâncias adicionais da subtração do branco de reagentes, da influência das matrizes das amostras em estudo e das variações do estado de funcionamento dos equipamentos em período alargado.

A quase total impossibilidade de preparar em laboratório um branco verdadeiro determinou o aparecimento de uma tendência para o cálculo do limite de detecção, onde em substituição do sinal médio e desvio padrão de trinta leituras do branco, utiliza-se os valores da ordenada na origem e o respectivo desvio padrão do referencial definido na gama das baixas concentrações [105, 107, 108].

Tal procedimento, muito mais realista, é mais fácil de ser executado no âmbito da análise instrumental e fornece valores que, embora de carácter não absoluto, conseguem traduzir com boa fidelidade a eficiência de uma metodologia em situação de rotina.

Assim, seguindo um procedimento sugerido pelo Miller e Miller [105] e recomendado pela IUPAC [106], todos os LD e LQ calculados nesta tese foram obtidos a partir do quociente do desvio padrão do coeficiente linear pelo coeficiente angular das curvas analíticas de calibração obtidas durante os nossos estudos experimentais e este quociente multiplicado por 3 ou por 10, respectivamente, ou seja:

$$LD = \frac{3\sigma_{L_0}}{a} \quad \text{e} \quad LQ = \frac{10\sigma_{L_0}}{a}$$

Onde  $\sigma_{L_0}$  é o desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica e **a** é o coeficiente angular (inclinação) da mesma.



## **7 – ESTUDO DA RETENÇÃO, SEPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE COBRE POR ESPECTROFOTOMETRIA EM FASE SÓLIDA USANDO CUPROÍNA IMOBILIZADA EM SÍLICA FUNCIONALIZADA C18 UTILIZANDO UMA CELA DE FLUXO AXIAL E TIOURÉIA COMO ELUENTE.**

### **7.1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Informações levantadas na literatura indicam a existência de sistemas desenvolvidos para a extração, preconcentração e determinação de cobre através das técnicas de extração em fase sólida ou espectrofotometria de absorção molecular em fase sólida (*vide capítulos 4 e 5*). Em procedimentos envolvendo EFS, o feixe luminoso incidente sofre tanto absorção quanto espalhamento de radiação [109]. Estes dois fatores contribuem para a atenuação da radiação que atinge o detector, o que diferencia a EFS da espectrofotometria convencional, na qual a atenuação ocorre principalmente devido aos processos de absorção. O espalhamento de radiação na cela que contém a fase sólida, principalmente em celas cilíndricas, é a principal desvantagem da EFS, pois aumenta significativamente os desvios nas medidas. Entretanto, essa limitação vem sendo superada pelo emprego de lentes para a dispersão da radiação incidente, ou pelo posicionamento da cela próximo à entrada do sistema de detecção [109, 110].

Apesar dos problemas com a atenuação do feixe luminoso, a EFS é utilizada como técnica analítica e alguns desses sistemas apresentam a cuproína ou a sílica funcionalizada C18 como parte integrante de suas metodologias, seja como reagente complexante ou como fase reversa para retenção dos quelatos. Porém, vale ressaltar que não há registros da utilização da cuproína imobilizada em sílica funcionalizada C18 para a retenção de íons Cu(I), e mais ainda, não há registros da utilização de tal combinação em sistemas de fluxo (FIA) para a leitura direta da absorvância da espécie  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ -C18 por espectrofotometria de absorção molecular.

## **7.2 – OBJETIVOS**

Há registros na literatura de que o quelato  $\text{Cu}(\text{neocup})_2^+$  é facilmente retido em discos de C18 e eluído com isopentanol ou uma mistura de  $\text{CHCl}_3/\text{NaOH}$  para posterior medida das respectivas absorvâncias do material eluído [57]. De maneira semelhante, o quelato  $\text{Cu}(\text{batocup})_2^+$  é facilmente retido em cartuchos de C18 e eluído com uma mistura de  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (9:1) e posterior medida das respectivas absorvâncias do material eluído [72]. Medidas espectrofotométricas em fase sólida foram realizadas com sucesso para o conjunto  $\text{Cu}(\text{batocup})_2^+$ -C18 após o quelato ser retido em discos de C18-PTFE e os mesmos introduzidos no caminho óptico de um espectrofotômetro para a especificação de cobre em águas [74]. Os três sistemas citados têm em comum, além da boa retenção dos quelatos de  $\text{Cu}(\text{I})$  e facilidade de eluição com solventes orgânicos, o fato de cada disco ou cartucho de sílica funcionalizada C18 utilizado ser depois descartado, sem tentativas de regeneração dos mesmos para medidas posteriores. Essas informações nos levaram a crer que os mesmos procedimentos, de retenção e leituras diretas da absorvância na fase sólida, poderiam ser realizados com o conjunto  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ -C18, uma vez que a cuproína possui características químicas e físicas semelhantes à neocuproína e a batocuproína.

Nesta etapa do trabalho, propõe-se o estudo da retenção, separação e determinação de cobre em fase sólida utilizando cuproína imobilizada em sílica funcionalizada C18 utilizando uma cela de fluxo axial (cilíndrica) tendo como detector um Espectrofotômetro de absorção molecular e uma solução de tiouréia como eluente.

## **7.3 – REAGENTES E INSTRUMENTOS**

### **7.3.1 - Reagentes**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções utilizadas foram preparadas com água purificada em um sistema *Easypure* (resistência 18,2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ) e armazenadas em recipientes plásticos de PVC previamente descontaminados. A solução estoque de cobre ( $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foi preparada partindo-se de uma solução ácida contida em ampolas do tipo *Titrisol*

(Merck) transferindo-se o conteúdo da referida ampola para um balão de 1000mL e completando o volume do mesmo com água desionizada. As soluções de trabalho de 100, 10 e  $1\mu\text{g.mL}^{-1}$  foram preparadas a partir das diluições apropriadas da solução estoque. A solução estoque de cuproína 0,05% ( $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) foi obtida dissolvendo-se 0,0125g da 2,2'-biquinolina (Baker) em 25mL de dimetilformamida (DMF) (Merck). A solução aquosa de ácido ascórbico 1% (m/v) era preparada diariamente dissolvendo-se 1g de ácido ascórbico (Merck) com 100 mL de água. O tampão ácido acético / acetato de sódio  $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 4,8) foi preparado pela dissolução de 47,34 mL de ácido acético glacial (Merck) e 34,62 g de acetato de sódio tri-hidratado em água purificada até o volume de 1000mL. A solução carregadora de tampão ácido acético / acetato de sódio  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 4,8) foi preparada pela diluição da solução tampão original. A solução eluente de tiouréia  $0,26 \text{ mol.L}^{-1}$  foi obtida dissolvendo-se 2,0 g de tiouréia (Merck) em 100mL de tampão ácido acético / acetato de sódio  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ . A solução de EDTA 1% foi preparada pela dissolução de 1g do sal dissódico do ácido diaminotetracético (Baker) com 100mL de água. A sílica funcionalizada foi obtida a partir de Cartuchos de sílica funcionaliza  $\text{C}_{18}$  (60-100 mm) Waters – 600mg, Cartuchos de sílica funcionaliza  $\text{C}_{18}$  (60-100 mm) PR Cola – 600mg e Seringas de sílica funcionalizada  $\text{C}_{18}$  (60-100 mm) Varian – 500mg.

### 7.3.2 - Instrumentos

As medidas das absorvâncias foram feitas utilizando-se um espectrofotômetro de absorção molecular UV-VIS modelo CARY-1E (Varian), no qual foi adaptada a cela de fluxo axial, descrita a seguir, desenvolvida especialmente para este estudo; com um suporte feito em acrílico semelhante aos suportes para cubetas utilizados pela própria Varian. As medidas de pH das soluções e amostras foram feitas utilizando um potenciômetro para medidas de pH Digimed DM 20 com eletrodo de vidro combinado DME-MV1. A propulsão dos fluidos foi efetuada por uma bomba peristáltica Reglo (Ismatec) de quatro vias equipada com tubos de Tygon com conexões de PTFE. Para a inserção das soluções (amostra e eluente) foi empregado um injetor comutador proporcional de

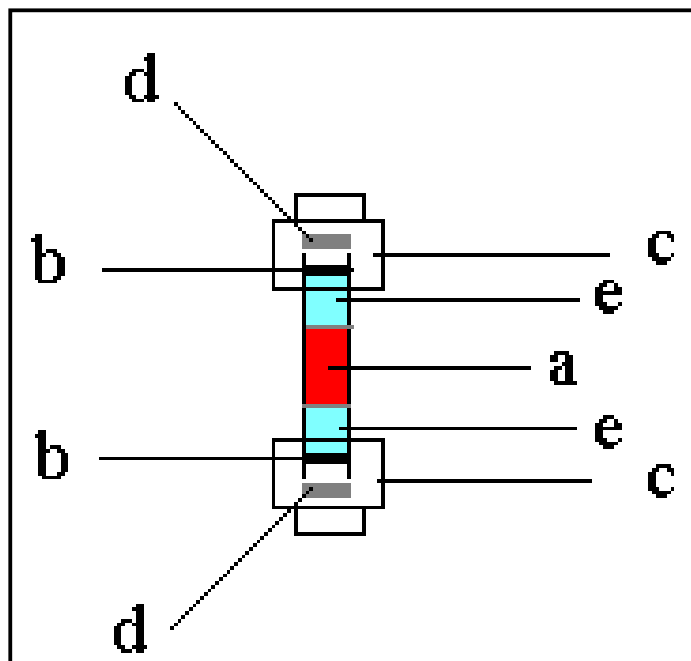
barra deslizante e uma seringa hipodérmica plástica de 5mL. As condições operacionais do espectrofotômetro de absorção molecular estão mostradas na tabela 9.

**Tabela 9 – Condições operacionais do espectrofotômetro UV-VIS CARY-1E**

<b>Parâmetros</b>	<b>Condições operacionais</b>
Velocidade de varredura	1800 nm.s <sup>-1</sup>
Tempo de varredura	120 min
Tempo de incidência do feixe	0,033 s
Largura da fenda	4 nm
Lâmpada	Tungstênio/halogênio
Tipo do feixe	Duplo feixe

### **7.3.3 – Cella de fluxo axial (cilíndrica) [111]**

A cela de fluxo axial, desenvolvida artesanalmente por um vidreiro, é constituída de um tubo de vidro cilíndrico com 3,0 cm de comprimento, 1,5 mm de diâmetro externo e 0,5 mm de diâmetro interno. Nas extremidades da cela foram acopladas duas peças de Teflon, que eram rosqueadas à cela, e onde se podia adaptar uma seringa ou tubos de Tygon para introdução da amostra (fig. 27, 28 e 29). Dois anéis de borracha foram colocados entre cada extremidade do tubo de vidro e as peças de Teflon para evitar vazamento de líquido. O tubo de vidro é preenchido com aproximadamente 15 mg de C18 de modo que a resina esteja compreendida entre duas camadas de lã de vidro e que não haja volume morto entre o C18 e as extremidades dos tubos. Nas duas extremidades do tubo foram colocados dois discos de vidro sinterizado.



**Fig. 27 – Cella axial para as medidas por EFS: (a) C18 modificado com cuproína; (b) anéis de silicone; (c) peças de Teflon rosqueadas; (d) disco de vidro sinterizado; (e) Lã de vidro.**



**a**



**b**



**c**

**Fig. 28 – Imagens da cela axial usada para a determinação de cobre por EFS: (a) fotografia frontal da cela; (b) cela desmontada; (c) cela posicionada no suporte do espectrofotômetro.**



**Fig. 29 –** Imagens da cela axial adaptada a uma seringa: a) amostra sendo introduzida na cela; b) eluição do cobre com tiouréia.

#### **7.3.4- Imobilização do reagente no C18**

Antes de optarmos pelo C18, outras fases sólidas foram testadas, entre elas, sílica, florisil ( $\text{MgSiO}_3$ ), alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), Amberlite XAD-2, Amberlite XAD-4 e Amberlite XAD-7. As imobilizações da cuproína nas respectivas resinas eram feitas preparando-se uma solução saturada da cuproína em dimetilformamida (DMF) e misturando-se cerca de 5,0 mL desta solução saturada com cerca de 500mg da fase sólida em um vidro de relógio, tomando cuidado para garantir que toda fase sólida estivesse em contato com a solução saturada do reagente. Depois, a mistura era deixada ao ar livre, por 24 horas ou mais, até que ficasse completamente seca e homogênea. Esses sólidos secos eram transferidos para pequenos frascos de polietileno, devidamente identificados e armazenados em lugar seco e longe da ação da luz. Para testar a eficiência da retenção da cuproína sobre cada fase sólida, tomou-se 100mg de cada fase modificada e transferiu-se para pequenos tubos de ensaio. Em cada um deles foi adicionado 2mL de uma

solução de Cu(I) 10 mg.L<sup>-1</sup>, em presença de ácido ascórbico e tampão ácido acético / acetato de sódio pH 4,8. Os resultados encontram-se na tabela 10.

**Tabela 10 – Teste de retenção da cuproína em diversas fases sólidas**

<b>Fase sólida</b>	<b>Cor observada</b>	<b>Observações</b>
Florisil	Incolor	Não houve retenção da cuproína
Alumina	Incolor	O quelato se desprende deixando a solução rosada
Sílica	Incolor	O quelato se desprende deixando a solução rosada
XAD-2 XAD-4 XAD-7	Rosa claro	Houve a necessidade de imobilizar o reagente a cada teste
Sílica C18	Rosa escuro	Não houve desprendimento do quelato na solução e nem a necessidade de imobilizar o reagente a cada teste

Depois de verificar o melhor desempenho da sílica funcionalizada C18, na retenção da cuproína, foi preparada uma cela axial com aproximadamente 15mg de C18 modificado com cuproína. Essa massa era equivalente a um preenchimento de 5mm da cela, localizada exatamente no centro da mesma, para que a fase sólida pudesse ser igualmente iluminada por todo feixe de luz originado de uma fenda de 4nm de largura. Para esta adaptação, ajustava-se o monocromador em 600nm, que é equivalente a um feixe de luz laranja brilhante que permitia ajustar corretamente a área iluminada. Para melhor focalizar o feixe, era colocado um anteparo de cartolina preta, entre a fonte de luz e a cela, contendo uma pequena janela de 5mm de altura por 2mm de largura.

Não foi possível estimar a quantidade de cuproína retida no C18, pois o DMF usado como solvente atacava as seringas plásticas e os tubos de Tygon. Além disso, o tradicional método de ir adicionando pequenas alíquotas com concentrações conhecidas em pequenas celas ou colunas e medir a absorvância da solução residual num espectrofotômetro contra um branco do seu solvente não

funcionaria neste caso, pois a solução de cuproína em DMF é incolor o que nos obrigaria a fazer leituras na região do UV, o que nem sempre é tão conveniente.

### **7.3.5- Procedimento experimental**

#### **I – Procedimento com a seringa plástica**

Os testes preliminares para a escolha da melhor fase sólida modificada com cuproína e a melhor solução eluente foram feitos utilizando uma seringa plástica de 5mL. Os resultados foram determinados por observações visuais e introduzindo a cela no caminho óptico do espectrofotômetro para a obtenção de espectros cobrindo a região do visível para a determinação do comprimento de onda de absorção máxima e comparando com o sistema de espectrofotometria de absorção molecular convencional. 1,0 mL de um ensaio em branco, contendo apenas tampão ácido acético / acetato de sódio pH 4,8 (0,4 mol.L<sup>-1</sup>), ácido ascórbico 0,04% (m/v) e água purificada, é introduzido com a seringa na cela axial e esta última posteriormente introduzida no caminho óptico do espectrofotômetro. Sendo um aparelho de feixe duplo, havia a necessidade de zerar o aparelho, mesmo que no outro caminho óptico não houvesse uma outra cela axial semelhante. Testes foram feitos programando o CARY-1E para feixe simples e os resultados foram iguais. Depois do aparelho ser “zerado”, a cela era retirada do caminho óptico e lavada algumas vezes com água purificada. Uma nova alíquota de 1,0 mL contendo de 0,5 a 4 µg.mL<sup>-1</sup> de cobre, tampão ácido acético / acetato de sódio pH 4,8 (0,4 mol.L<sup>-1</sup>), ácido ascórbico 0,04% (m/v) e água purificada, foi introduzida na cela e o Cu(I) presente foi quantitativamente retido na cuproína imobilizada no C18 sob a forma do complexo Cu(biq)<sub>2</sub><sup>+</sup> de coloração rosa. Para garantir que a cada retirada e reposição da cela axial do caminho óptico fosse feita na mesma posição foram feitas marcas nas peças de Teflon para a orientação da cela em relação à posição do feixe.

#### **II – Procedimento com sistema FIA**

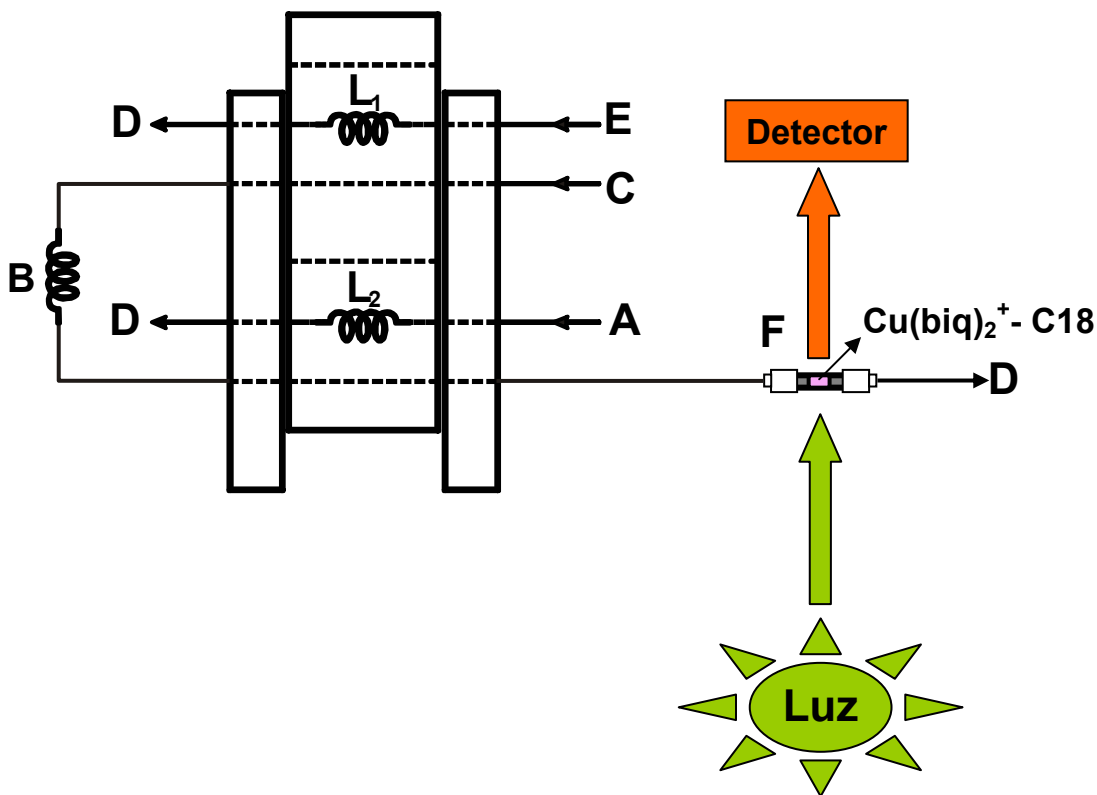
Uma vez verificada a compatibilidade do sistema cuproína-C18 com o sistema de detecção, permitindo o uso de espectrofotômetro simples para



medidas de absorvância diretamente na fase sólida, decidiu-se adaptar a cela axial a um sistema de análise em fluxo para desenvolvimento de uma metodologia FIA-EFS. A imobilização da cuproína em sílica funcionalizada C18 e o empacotamento da cela axial seguem o mesmo procedimento para os testes com seringa plástica. As soluções de Cu(I) contendo 0,5 a 4,0 mg.L<sup>-1</sup> foram preparadas em tampão ácido acético / acetato de sódio pH 4,8 (0,4 mol.L<sup>-1</sup>) e ácido ascórbico 0,04% (m/v), por diluições apropriadas da solução estoque de Cu(II) 1000 mg.L<sup>-1</sup>.

O diagrama de fluxos empregado é mostrado na figura 30. O módulo de análise permite a inserção simultânea de alíquotas de amostra e de eluente (tiouréia) no fluido transportador (tampão pH 4,8). Uma bobina (**B**) é empregada para permitir a defasagem temporal entre a chegada da amostra e do eluente na cela de fluxo, evitando uma sobreposição excessiva entre a zona da solução da amostra e a zona do eluente. O analito é retido na fase sólida devido à formação de complexo com cuproína, sendo posteriormente eluído pela solução de tiouréia. Simultaneamente, medidas de absorvância na fase sólida são efetuadas em 546nm.

Ainda no diagrama de fluxo podem ser vistas as alças **L<sub>1</sub>** e **L<sub>2</sub>** que são preenchidas com as soluções de tiouréia e de amostra respectivamente a uma vazão de 0,5 ml.min<sup>-1</sup>. Enquanto isso, uma solução diluída do tampão ácido acético / acetato de sódio pH 4,8 (0,2 mol.L<sup>-1</sup>) flui pelo percurso analítico, também à uma vazão de 0,5 ml.min<sup>-1</sup>. Fazendo a comutação do injetor, as alíquotas de amostra e de tiouréia são simultaneamente inseridas no percurso analítico e transportado pela solução carregadora (tampão acetato pH 4,8) até a cela de fluxo. O Cu(I) presente na amostra reage com a 2,2'-biquinolina imobilizada no C18 e o complexo Cu(biq)<sub>2</sub><sup>+</sup> é formado na fase sólida contida no interior da cela axial. Simultaneamente, as medidas de absorvância são feitas em 546 nm. Depois da reação e detecção, a solução de tiouréia atinge a cela promovendo a eluição dos íons Cu(I) retidos, sem remoção da cuproína.



**Fig. 30 – Diagrama de fluxos do módulo de análise para medidas de Cu(I) por FI-EFS:** A - amostra ( $0,5$  a  $4\mu\text{g.mL}^{-1}$ ); C - transportador (tampão acetato  $0,2\text{ mol.L}^{-1}$ );  $L_1$ ,  $L_2$  - alças de amostragem ( $500\mu\text{L}$ ) e eluição ( $500\mu\text{L}$ ), respectivamente; B - bobina de dispersão ( $80\text{ cm}$ ); D - descarte de soluções; F - cela de fluxo axial contendo o suporte sólido modificado inserida no caminho óptico do espectrofotômetro. Foi empregada como eluente uma solução de tiouréia  $0,13\text{ mol.L}^{-1}$ . A vazão da solução transportadora foi mantida em  $0,5\text{ ml.min}^{-1}$ .

### 7.3.6- Resultados e discussões

#### I – Espectro do $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ em fase sólida

Usando a seringa hipodérmica plástica  $1,0\text{ ml}$  de um ensaio em branco, contendo apenas tampão pH  $4,8$  e ácido ascórbico, é introduzida na cela e esta última posteriormente introduzida no caminho óptico do espectrofotômetro. O espectro obtido indica a ausência de cobre ou outros contaminantes na cela. Depois de lavada algumas vezes com água purificada, uma nova alíquota contendo uma amostra de cobre, nas mesmas condições do branco, contendo  $4\mu\text{g.mL}^{-1}$  de cobre, foi introduzida na cela e o Cu(I) presente é quantitativamente retido na cuproína imobilizada no C18 sob a forma do complexo  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$  de

coloração rosa. Para uma melhor comparação, estão apresentados na figura 31 os espectros do ensaio em branco e da amostra de Cu(I) na fase sólida e do mesmo complexo em solução aquosa na presença de Triton-X100 e etanol.

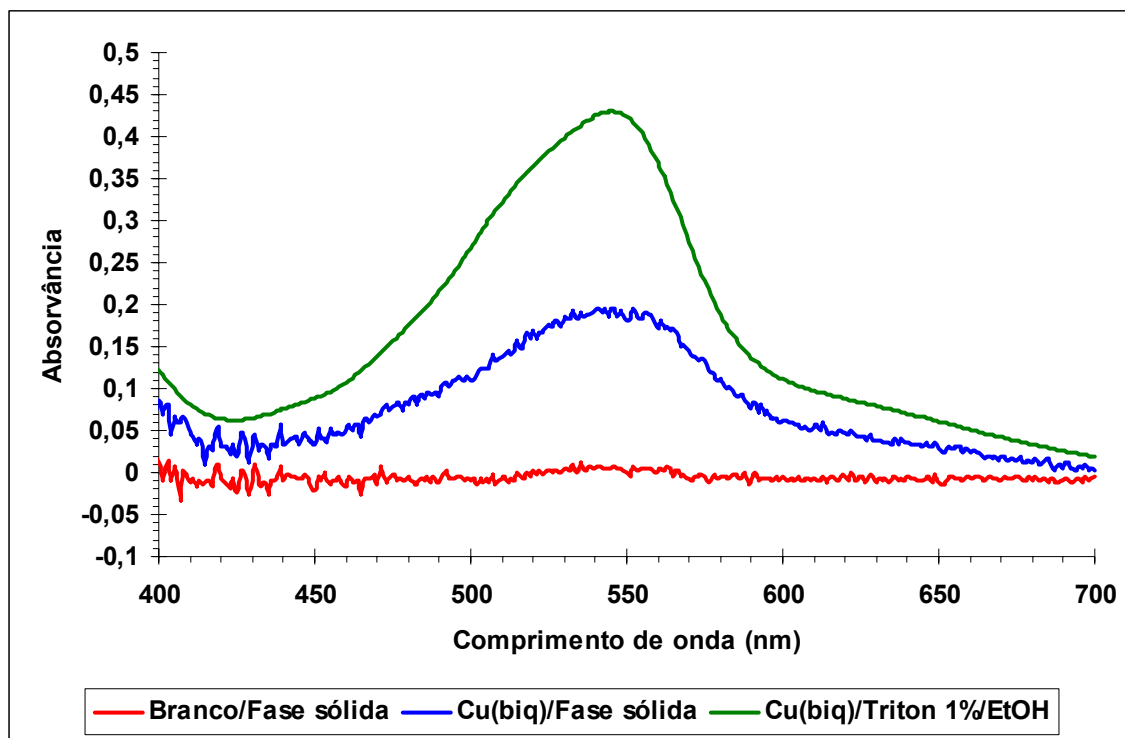


Fig. 31 – Espectros de absorção dos quelatos  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$  na fase sólida e em solução etanólica. Concentração de  $\text{Cu}(\text{I}) = 4 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Quando, em 1953, Hoste e colaboradores [41] obtiveram os primeiros espectros do quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ , extraído com álcool iso-amílico, determinaram um pico máximo de absorvância em 546nm e uma absorvidade molar igual a  $6,43 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . No estudo descrito no capítulo 6 desta tese, o quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ , solúvel em água na presença de Triton-X100 e etanol, determinamos um pico máximo de absorvância em 545nm e uma absorvidade molar igual a  $6,25 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , concordante com o valor determinado pelo trabalho original do Hoste *et al.* Porém, quando observou-se os espectros do quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$  em fase sólida, a primeira coisa que chama a atenção é o aumento do ruído do sinal do espectro, seguido de um pequeno deslocamento do pico de máxima absorvância para 550nm. Deslocamentos do comprimento de onda de máxima

absorvância do quelato, quando se trabalha com leituras de absorvância em fase sólida, foram observadas em outros trabalhos [112].

## II – Estabilidade do $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ retido em fase sólida

Em um sistema de espectrofotometria em fase sólida é desejável que o reagente seja facilmente imobilizado, haja formação rápida e imediata do complexo, reversibilidade da reação sem necessidade de nova imobilização do reagente e, principalmente, alta estabilidade da fase sólida modificada e do quelato retido frente ao meio de trabalho. A figura 32 mostra os resultados do teste para avaliação da estabilidade do quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$  retido na fase sólida. Durante o teste, com a ajuda de um sistema de fluxo, foi realizada uma injeção de um ensaio em branco, na presença de tampão acetato pH 4,8 e ácido ascórbico como redutor, seguido da injeção de uma amostra de cobre contendo  $0,6 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  de  $\text{Cu}(\text{I})$ .

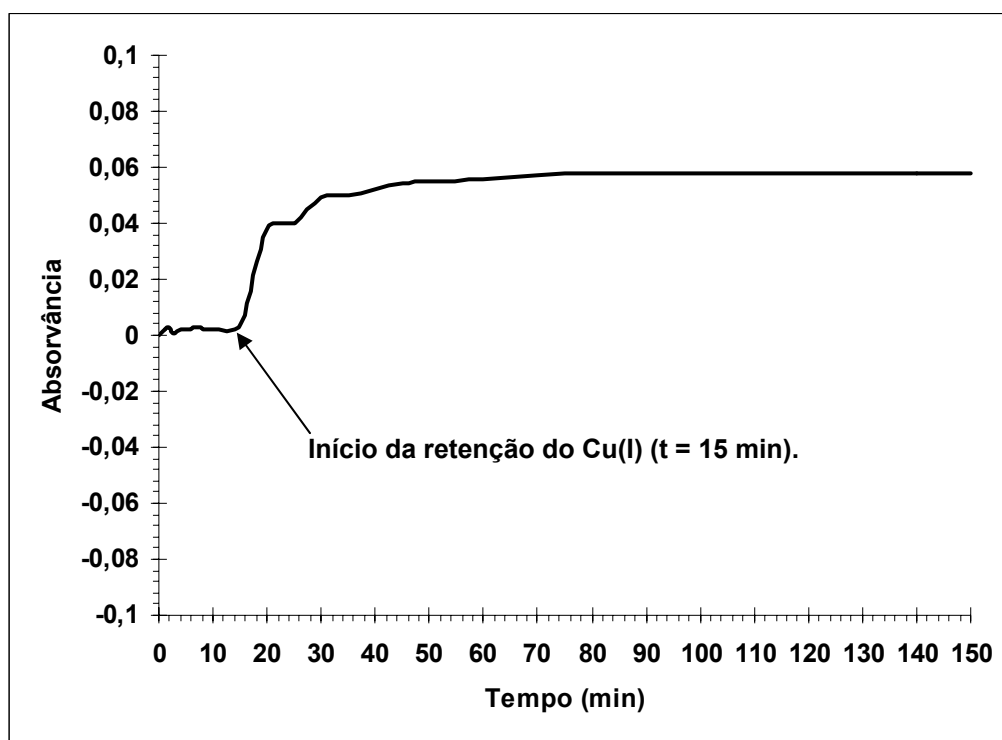


Fig. 32 – Efeito da variação do tempo sobre o sinal de absorvância do quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$  retido na fase sólida.

Sabe-se que os quelatos do cobre(I) e cobre(II) com a 2,2'-biquinolina apresentam uma alta estabilidade em solventes orgânicos ou soluções aquosas. O quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$  é estável por cerca de 48 horas e o mesmo se observa para o sistema  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ -C18. A figura 32 mostra que o sistema é estável nos primeiros 15 minutos, referente ao tempo de injeção do ensaio em branco. Depois de 15 minutos, o sinal começa a subir à medida que o Cu(I) vai sendo retido no C18 modificado até aproximadamente 40 minutos, quando todo o cobre foi completamente retido. A partir daí, como não houve eluição (a linha do eluente foi preenchida com a solução transportadora), o sinal de absorvância permanece constante até 150 minutos, quando o teste foi interrompido. As celas preparadas com cuproína-C18 tinham durabilidade de cerca de sete dias, porém, havia uma preferência de preparar uma nova cela a cada série de estudos.

### III – Estudo da natureza e da concentração do eluente

Após a obtenção dos espectros, que confirmaram a retenção do Cu(I) pela fase sólida C18-biquinolina, e do estudo da estabilidade do mesmo, foi realizado um estudo para a montagem de um protocolo analítico para preconcentração e determinação de traços de cobre por espectrofotometria em fase sólida, usando FIA. O sistema de fluxo foi montado segundo a figura 30. As corridas analíticas do FIA têm os seus picos lidos pela diferença entre o valor de absorvância máxima e o valor de absorvância mínima. O valor final do sinal para cada amostra é determinado pela média dos máximos e mínimos de absorvância de três picos.

Realizou-se estudos para a escolha do eluente mais adequado para a dessorção do Cu(I) retido. Foram testados os seguintes eluentes: **HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dicromato de potássio, permanganato de potássio, tiosulfato de sódio, tiouréia, persulfato de potássio, periodato de potássio, EDTA, CDTA, EGTA e tiocianato de potássio**. Dentre todos os eluentes testados, a tiouréia 1% (m/v) foi a que apresentou melhor desempenho, eluindo completamente o cobre retido.

Uma vez escolhida a tiouréia como eluente, foram realizados estudos sobre a concentração do eluente. As tabelas 11 e 12 representam o estudo da eficiência

da concentração da tiouréia como eluente, sozinha ou misturada com ácidos. Os testes foram realizados para amostras de Cu(I)  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , na presença de ácido ascórbico 1% e tampão acetato de pH 4,8. Foram injetados  $500\mu\text{L}$  de amostra ou de eluente, respectivamente.

**Tabela 11 – Estudo da concentração da tiouréia como solução eluente**

Concentração da tiouréia (m/v)	Absorvância
Tiouréia 0,1%	0,012
Tiouréia 0,25%	0,035
Tiouréia 0,5%	0,063
Tiouréia 1,0%	0,120
Tiouréia 2,0%	0,119

Testou-se também a eficiência da tiouréia, na concentração de 1% (m/v), quando misturada com outras soluções ácidas, como: tampão acetato de sódio / ácido acético pH 4,8 ( $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ), ácido acético  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ , ácido clorídrico  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  e ácido nítrico  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ . Apesar do  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol.L}^{-1}$  aumentar o poder de eluição da tiouréia 1%, a queda na linha de base das corridas obtidas apresentou indicativos de que o ácido nítrico empobrecia a fase sólida, arrastando a cuproína inicialmente retida. Desta maneira, optou-se pelo uso da tiouréia adicionada ao tampão, pois manteria tanto a solução transportadora quanto a solução eluente no mesmo pH.

**Tabela 12 – Estudo da mistura da tiouréia com outras soluções eluentes**

Eluente	Absorvância
Tiouréia 1% + Ácido Acético $1 \text{ mol.L}^{-1}$	0,119
Tiouréia 1%	0,120
Tiouréia 1% + HCl $1 \text{ mol.L}^{-1}$	0,122
Tiouréia 1% + tampão acetato pH 4,8 $1 \text{ mol.L}^{-1}$	0,127
Tiouréia 1% + $\text{HNO}_3$ $1 \text{ mol.L}^{-1}$	0,129

#### IV – Efeito da acidez na retenção do Cu(I)

A retenção do cobre(I), a partir de soluções aquosas, foi estudada em diferentes valores de pH. Para o estudar uma ampla faixa de pH (entre 1 e 10) foram utilizados os tampões: biftalato de potássio, glicina, acetato de sódio hexamina e amônia. Observou-se que o pH não afeta de maneira significativa à reação e a capacidade de retenção do cobre(I) se o mesmo for mantido numa faixa entre 3,2 e 4,1; como pode ser visto na figura 33.

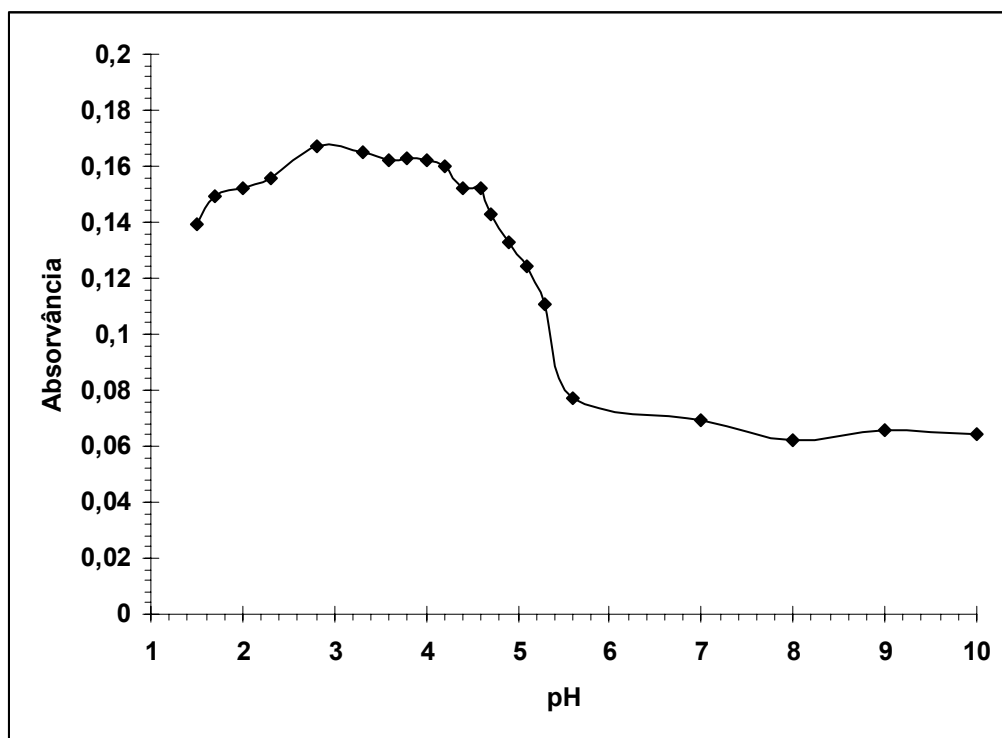


Fig. 33 – Efeito da acidez na capacidade de retenção do Cu(I) em cuproína-C18, na presença de ácido ascórbico, para uma concentração de Cu(I) =  $0,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Embora não seja o pH na faixa com maiores valores de sinais de absorvância, escolheu-se o pH 4,8, pois neste pH o tampão acetato apresenta seu maior poder tamponante. Deste modo, as soluções das amostras, contendo uma concentração de Cu(I) igual  $0,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , tiveram o pH controlado através de uma solução tampão ácido acético / acetato de sódio pH 4,8 ( $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ ).

## V – Efeito da variação da vazão sobre a retenção do cobre

Em sistemas de fluxo, a vazão é um parâmetro muito importante, pois pode influenciar outros parâmetros como sensibilidade, seletividade e frequência de amostragem. Mudanças na vazão da passagem da amostra pela cela axial, contendo cuproína imobilizada em C18, foram feitas entre 0,2 e 1,2 mL.min<sup>-1</sup>. Observando-se a figura 34, verificou-se que a retenção do cobre(I) sofreu grande influência com pequenas modificações nessas vazões.

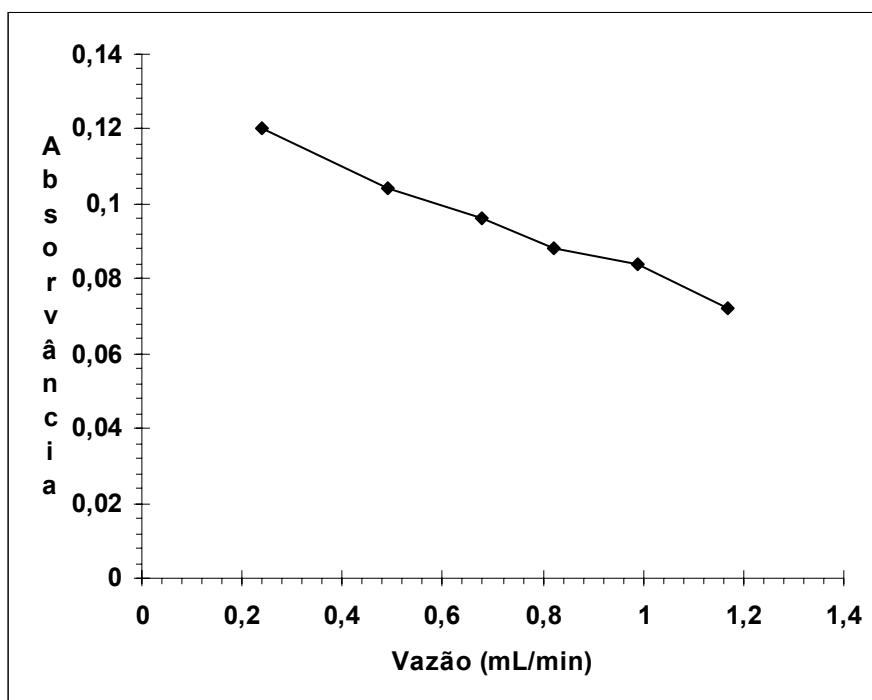


Fig. 34 – Efeito da variação da vazão da solução transportadora na capacidade de retenção do Cu(I) em cuproína-C18, na presença de ácido ascórbico e tampão acetato pH 4,8, para uma concentração de Cu(I) = 0,2µg.mL<sup>-1</sup>.

Testes com vazões superiores a 1,2 mL.min<sup>-1</sup> não puderam ser realizadas uma vez que foi observado vazamento no sistema, principalmente nas conexões da cela axial.



#### 7.4 – CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO

A obediência à lei de Beer foi verificada variando-se a concentração do íon Cu(I) de 0 a 350 ng.mL<sup>-1</sup> e a absorvidade molar ( $\epsilon$ ) para o quelato retido no sistema Cuproína-C18 foi estimada em  $1,22 \times 10^5$  L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> quando 500µL da amostra foram injetados. A curva analítica, lida em 550nm, foi feita em presença de ácido ascórbico 0,04% (m/v) e tampão acetato de sódio pH 4,8 (0,2 mol.L<sup>-1</sup>), tendo como solução transportadora tampão acetato de sódio pH 4,8 (0,2 mol.L<sup>-1</sup>) e solução eluente tiouréia 0,13mol.L<sup>-1</sup> (500µL). A curva analítica e outras características analíticas encontra-se na figura 35 e na tabela 13, respectivamente.

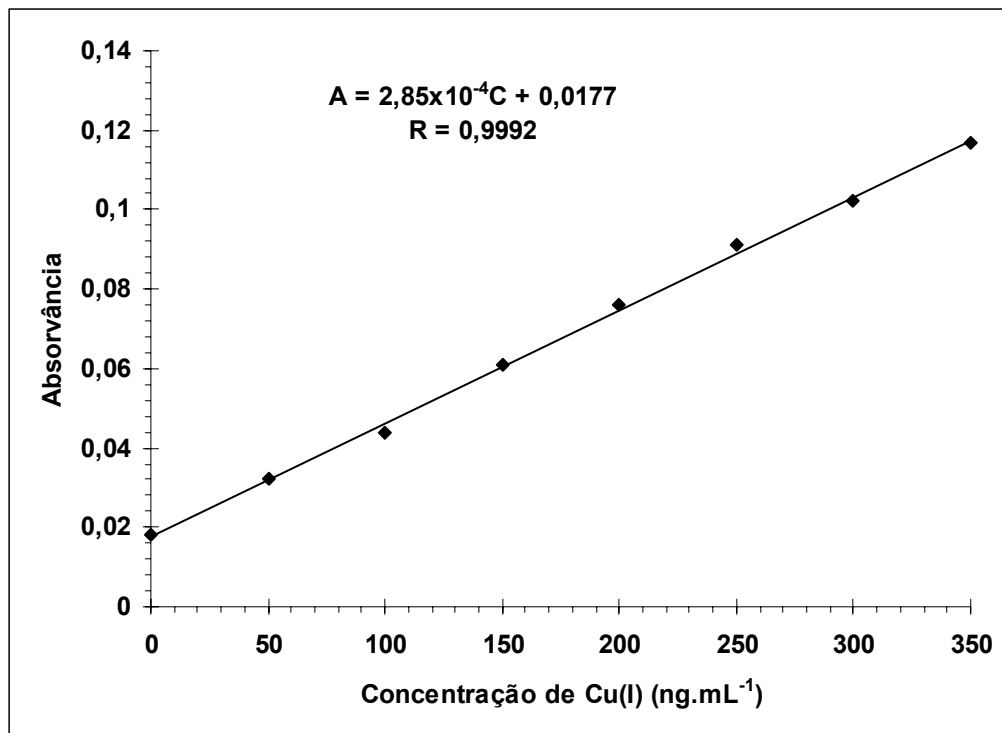
**Tabela 13 – Características Analíticas do Método Proposto**

Absortividade Molar Aparente	$1,22 \times 10^5$ L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>
Coefficiente de Correlação	0,9992
Limite de Detecção (LD)	9,9 ng.mL <sup>-1</sup>
Limite de Quantificação (LQ)	32,9 ng.mL <sup>-1</sup>
Faixa Linear Dinâmica	32,9 a 350 ng.mL <sup>-1</sup>
Coefficiente de variação (n=10)	5,6%

Seguindo o procedimento adotado no capítulo anterior, todos os LD e LQ calculados nesta tese foram obtidos a partir dos quocientes entre os desvios padrões dos coeficientes angulares e os coeficientes lineares das curvas analíticas multiplicadas por três e por dez respectivamente, ou seja:

$$LD = \frac{3\sigma_{L_0}}{a} \text{ e } LQ = \frac{10\sigma_{L_0}}{a}$$

Onde  $\sigma_{L_0}$  é o desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica e **a** é a inclinação (coeficiente angular) da mesma numa reta do tipo **y=ax+b** [105].



**Fig. 35 – Curva analítica do sistema  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$  em fase sólida para uma cela axial e tiouréia como eluente.  $\text{Cu}(\text{I}) = 0$  a  $350 \text{ ng.mL}^{-1}$ , em presença de ácido ascórbico 0,04% (m/v) e tampão ácido acético / acetato de sódio  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 4,8).**

## **8 – ESTUDO DA RETENÇÃO, SEPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE COBRE(II) POR ESPECTROFOTOMETRIA EM FASE SÓLIDA USANDO CUPROÍNA IMOBILIZADA EM SÍLICA FUNCIONALIZADA C18 UTILIZANDO UMA CELA DE FLUXO PLANA USANDO TIOURÉIA COMO ELUENTE.**

### **8.1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Embora os testes do capítulo anterior tenham nos mostrado a possibilidade da utilização de uma cela axial (cilíndrica) preenchida com sílica funcionalizada C18 modificada com cuproína acoplada a um sistema de fluxo para a separação e detecção de Cu(I), a cela axial nos trás uma série de desvantagens.

O primeiro deles é o espalhamento da radiação incidente sobre a cela axial que contém a fase sólida, pois aumenta significativamente os desvios das medidas. Embora, em um primeiro momento, a curvatura da cela axial funcione como uma lente convexa e proporcione um pequeno aumento no sinal de absorvância, como ocorria nos antigos fotômetros usando cubetas cilíndricas, esse pequeno ganho pode ser perdido pelo espalhamento da radiação. Nesse caso, a obtenção de resultados reproduzíveis requer que a cela seja colocada sempre na mesma posição com respeito ao feixe incidente; para facilitar isso, a cela axial era sempre marcada com um sinal na peça de Teflon. Do contrário, ocorreriam variações no caminho óptico, pois as cubetas cilíndricas não apresentam seções transversais perfeitamente circulares [113].

Como a cela axial é um verdadeiro “sanduíche” que envolve peças de Teflon, discos de vidro sinterizado, anéis de silicone, lâ de vidro e o C18 propriamente dito, faz com que haja uma segunda desvantagem, essa sim muito crítica, que é o aumento excessivo da impedância hidrodinâmica (pressão interna), principalmente com o uso constante da mesma cela empacotada, onde o fluido transportador compacta cada vez mais o recheio da cela axial provocando vazamentos depois de algumas horas, ou dias, de uso.

Estas desvantagens apresentadas pela cela axial nos levou a substituir a mesma por uma cela retangular, de geometria plana e feita em acrílico, que foi concebida e confeccionada artesanalmente pelo Prof. Dr. Boaventura F. Reis, que

integra o elenco de pesquisadores da Seção de Química Analítica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), baseada nas especificações indicadas pelo mesmo na revista **Química Nova** no ano de 2000 [101].

É importante destacar que as celas do professor Boaventura F. Reis já são referência para criação de novas celas artesanais. Oliveira e colaboradores publicaram uma nota técnica em 2001 [114] sobre a construção de uma cela espectrofotométrica de camada delgada para análises em fluxo. O trabalho tem como objetivo apresentar as vantagens da referida cela como: simples construção, baixo custo, não retenção de bolhas, eliminação de intervenções durante as análises, variar facilmente o percurso óptico através da troca do espaçador e apresentar pequeno volume interno. O sistema foi aplicado para a análise de Cr(VI) em amostras de ligas de aço numa faixa entre 1,0 e 10,0 mg.L<sup>-1</sup>.

## 8.2 – **OBJETIVOS**

Como o sistema utilizando uma cela axial apresentou sérios problemas com espalhamento de luz e vazamentos, fomos levados a substituir a cela de fluxo axial por uma outra, de geometria plana, que apresentava menos problemas com espalhamento e vazamentos.

Nesta etapa do trabalho foi adaptada uma cela de fluxo plana (retangular), simples e de baixo custo para medidas por FI-EFS, que permite a utilização de maiores quantidades de material sólido sem ocasionar excessivo aumento da impedância hidrodinâmica e do espalhamento de radiação. A reação do cobre(I), na presença de cloreto de hidroxilamina e tampão acetato pH 4,8, com a 2,2'-Biquinolina imobilizada em sílica funcionalizada C18 foi utilizada para demonstrar as características da cela de fluxo proposta em comparação com os mesmos testes para a cela axial (cilíndrica).

## **8.3 – REAGENTES E INSTRUMENTOS**

### **8.3.1 - Reagentes**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções utilizadas foram preparadas com água purificada em um sistema *Easypure* (resistência 18,2 MΩ.cm) e armazenadas em recipientes plásticos de PVC previamente descontaminados. A solução estoque de cobre ( $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foi preparada partindo-se de uma solução ácida contida em ampolas do tipo *Titrisol* (Merck) transferindo-se o conteúdo da referida ampola para um balão de 1000mL e completando o volume do mesmo com água purificada. As soluções de trabalho de 100, 10 e  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  foram preparadas a partir das diluições apropriadas da solução estoque. A solução estoque de cuproína 0,05% ( $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) foi obtida dissolvendo-se 0,0125g da 2,2'-biquinolina (Baker) em 25mL de dimetilformamida (DMF) (Merck). A solução aquosa de cloreto de hidroxilamina 1% (m/v) era preparada diariamente dissolvendo-se 1g de cloreto de hidroxilamina (Merck) com 100 mL de água. O tampão ácido acético / acetato de sódio  $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 4,8) foi preparado pela dissolução de 47,34 mL de ácido acético glacial (Merck) e 34,62 g de acetato de sódio tri-hidratado em água purificada até o volume de 1000mL. A solução carregadora de tampão ácido acético / acetato de sódio  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 4,8) foi preparada pela diluição da solução tampão original. A solução eluente de tiouréia  $0,26 \text{ mol.L}^{-1}$  foi obtida dissolvendo-se 2,0 g de tiouréia (Merck) em 100mL de tampão ácido acético / acetato de sódio  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ . A solução de EDTA 1% (m/v) foi preparada pela dissolução de 1g do sal dissódico do ácido diaminotetracético (Baker) com 100mL de água. O suporte sólido foi obtido a partir de Cartuchos de sílica funcionaliza  $C_{18}$  (60-100 mm) Waters – 600mg, Cartuchos de sílica funcionaliza  $C_{18}$  (60-100 mm) PR Cola – 600mg e Seringas de sílica funcionalizada  $C_{18}$  (60-100 mm) Varian – 500mg.

### **8.3.2 - Instrumentos**

As medidas das absorvâncias foram feitas utilizando-se um espectrofotômetro de absorção molecular UV-VIS modelo CARY-1E (Varian), no qual foi adaptada a cela de fluxo plana, descrita a seguir, desenvolvida

especialmente para este estudo; adaptada no caminho óptico do Varian CARY-1E. As medidas de pH das soluções e amostras foram feitas utilizando um potenciômetro para medidas de pH Digimed DM 20 com eletrodo de vidro combinado DME-MV1. A propulsão dos fluidos foi efetuada por uma bomba peristáltica Reglo (Ismatec) de quatro vias equipada com tubos de Tygon com conexões de PTFE. Para a inserção das soluções (amostra e eluente) foi empregado um injetor comutador proporcional de barra deslizante e uma seringa hipodérmica plástica de 5mL. As condições operacionais do espectrofotômetro de absorção molecular estão mostradas na tabela 14 abaixo:

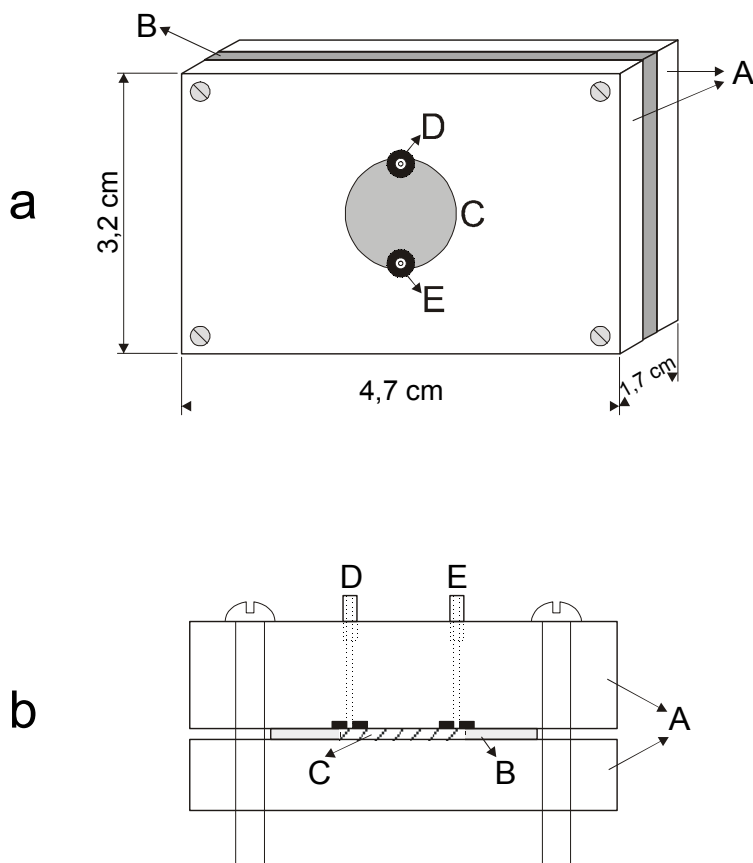
**Tabela 14 – Condições operacionais do espectrofotômetro UV-VIS CARY-1E**

Parâmetros	Condições operacionais
Velocidade de varredura	1800 nm.s <sup>-1</sup>
Tempo de varredura	120 min
Tempo de incidência do feixe	0,033 s
Largura da fenda	4 nm
Lâmpada	Tungstênio/halogênio
Tipo do feixe	Duplo feixe

### 8.3.3 – Cella de fluxo plana (retangular) [101]

A cela de fluxo (figura 36) consiste de dois blocos de acrílico **(A)** separados por uma tira de borracha **(B)** de 1,0 mm de espessura, na qual foi feito um corte circular com 10 mm de diâmetro **(C)**. Um dos blocos de acrílico possui dois furos transversais (0,8 mm), distantes 9,0 mm entre si, empregados para a entrada **(E)** e saída **(D)** dos fluidos. A tira de borracha é presa entre os blocos através de quatro parafusos, de forma a evitar vazamentos. O corte circular **(C)** define o espaço no qual é depositado o suporte sólido. Lã de vidro é utilizada para evitar o arraste do material sólido pela passagem dos fluidos. A tira de borracha é posicionada de forma que o corte circular coincida com a entrada e saída dos fluidos, definindo a posição de incidência do feixe de radiação.

A cela de fluxo é preenchida com cerca de 35mg de C<sub>18</sub> contendo cuproína previamente imobilizada. Posteriormente, a cela é lavada com a solução de tiouréia 0,26 mol.L<sup>-1</sup>, tampão acetato de sódio pH 4,8 e água purificada.



**Fig. 36 – Representação esquemática da cela de fluxo plana para FI-EFS:** (a) Vista frontal e (b) Vista em corte. **A** – blocos de acrílico; **B** – tira de borracha (1,0 mm de espessura); **C** – corte circular (10mm de diâmetro) que define o espaço onde é depositado o suporte sólido; **D** – saída de fluido; **E** – entrada de fluido. (Adaptada da ref. [101]).

#### 8.3.4- Imobilização do reagente no C18 e o diagrama de fluxo

A imobilização da cuproína na sílica funcionalizada C18 segue o mesmo procedimento para os estudos feitos com a cela axial, assim como o diagrama de fluxo para o sistema FI-EFS é o mesmo utilizado no estudo anterior, com a ressalva de que a cela axial foi substituída pela cela plana no caminho óptico do espectrofotômetro de absorção molecular Cary-1E. Os volumes da amostra e

eluente injetados foram de 500 $\mu$ L e o acompanhamento das absorvâncias foi realizado em 550nm.

## **8.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

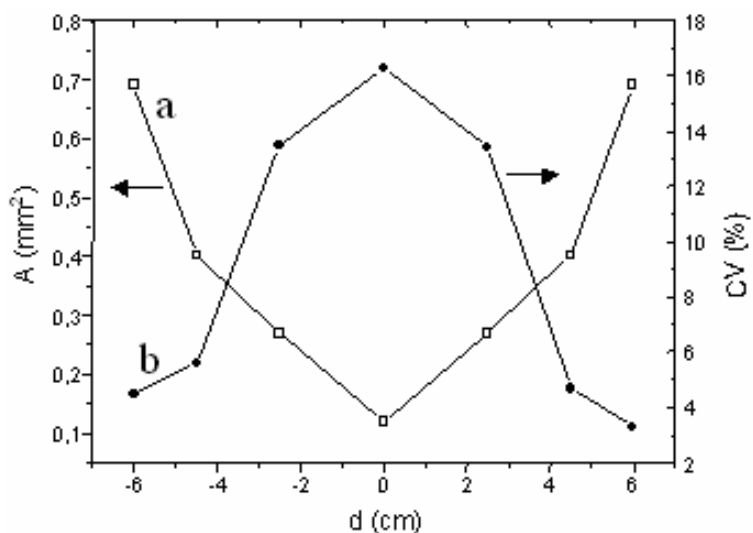
### **8.4.1 – Geometria e posicionamento da cela plana**

A cela de fluxo plana proposta apresenta 78 mm<sup>2</sup> de seção transversal e caminho óptico de 1mm (volume = 78 $\mu$ L). Este dimensionamento permite a utilização de uma maior quantidade de suporte sólido, em relação às celas comerciais, sem ocasionar atenuação excessiva do feixe de radiação incidente. O emprego de maiores quantidades de material possibilita o aumento do número de sítios de adsorção, ampliando a faixa de resposta. Outra característica resultante da geometria plana da cela é a distribuição do fluido por uma maior área, minimizando a possibilidade de vazamentos causada pelo aumento da impedância hidrodinâmica no sistema ocasionada pelo material sólido muito comum em celas axiais (cilíndricas).

Segundo Reis e colaboradores [101], em seu artigo sobre a confecção de uma cela de fluxo plana publicada em 2000 na *Química Nova*, a geometria da cela pode provocar uma distribuição não homogênea do analito, devido à ocorrência de caminhos preferenciais. Desta forma, a precisão das medidas pode ser comprometida caso a cela de fluxo seja posicionada no foco do feixe de radiação, devido à incidência de radiação em uma área limitada do suporte sólido. Segundo os autores, este inconveniente pode ser superado, afastando a cela do foco e posicionando-a próxima à entrada do sistema de detecção, permitindo que uma maior área do suporte seja iluminada.

A figura 37 representa os resultados obtidos por Reis e colaboradores, no referido artigo [101], para o sistema Co(II)/C18/TAN, onde foi observado o coeficiente de variação das medidas de absorvância (CV%) em função da área do suporte sólido iluminada (A, mm<sup>2</sup>) pelo feixe de radiação.

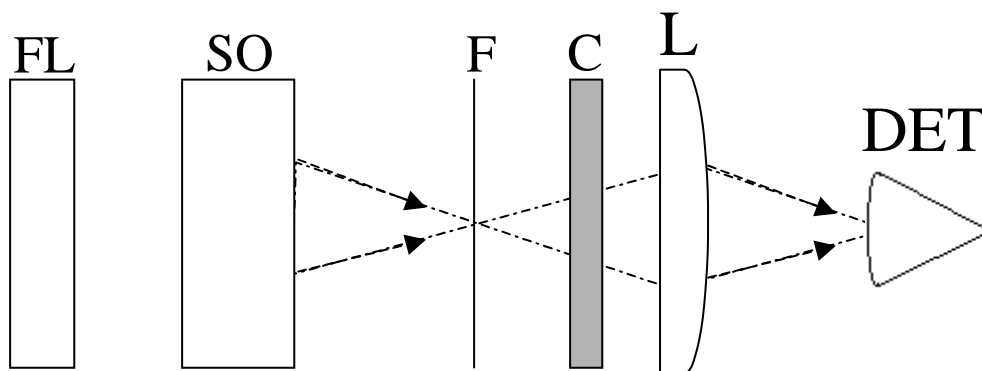




**Fig. 37 – Efeito do posicionamento da cela de fluxo plana:** na (a) área iluminada e no (b) coeficiente de variação das medidas. **d**, posição da cela de fluxo em relação ao foco da radiação. Sinais negativos indicam posicionamento da cela à esquerda do foco da radiação. **A** é área iluminada (mm<sup>2</sup>); CV% é o coeficiente de variação do sinal de absorvância. (Adaptada da ref. [101])

Pelos resultados observados na figura 37, existe um grande compromisso entre a precisão das medidas espectrofotométricas, a magnitude do sinal para o estabelecimento da área iluminada e o posicionamento da cela no gabinete do espectrofotômetro, ou seja, quanto mais próximo do detector posicionamos a cela plana, maior a precisão das medidas. Não foi possível observar tal fenômeno para a cela axial, pois a mesma sempre era posicionada no centro do caminho óptico, uma vez que a cela era encaixada no porta cubetas do CARY-1E e não havia como variar a distância da cela em relação à fonte de emissão ou ao detector.

Após a imobilização do reagente, a cela de fluxo foi posicionada no caminho ótico do espectrofotômetro próximo ao detector, como indica a figura 38. Esse posicionamento foi empregado para aumentar a área iluminada da superfície contendo a fase sólida e para obtenção de sinais mais reprodutíveis.



**Fig. 38 – Posicionamento da cela plana no caminho óptico do espectrofotômetro. C, cela de fluxo plana, FL, fonte de luz; SO, sistema ótico; L, lentes; DET, detector; F, foco da radiação. (Adaptada da ref. [101])**

#### 8.4.2 – Espectros de absorção para a cela plana

Como já foi visto no capítulo anterior, o espectro de absorção do complexo  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$  sobre C18 mostrou um deslocamento do máximo de absorção, quando comparado com o complexo em solução aquosa passando de 546nm (em solução) para 550 nm (na cela axial). A situação não é diferente para a cela plana. Os espectros em solução, fase sólida na cela axial e na cela plana podem ser vistos na figura 39.

Pelos espectros apresentados na figura 39, é fácil de observar uma superposição dos dois espectros, para cela axial e cela plana, na região referente ao comprimento de onda de máximo valor de absorvância ( $\lambda=550\text{nm}$ ,  $A=0,191$ ). Porém, observa-se também um maior espalhamento do espectro da cela plana em relação ao espectro da cela axial. Esse maior espalhamento pode ser explicado pelo fato da cela plana ter uma área iluminada maior.

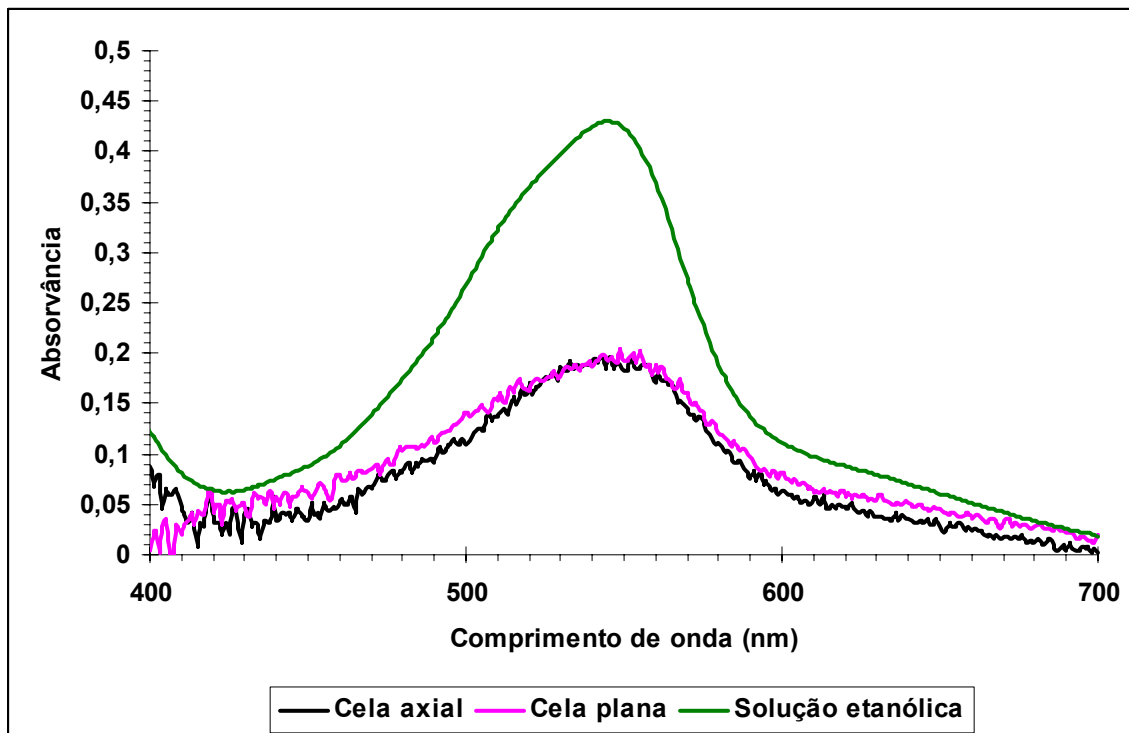
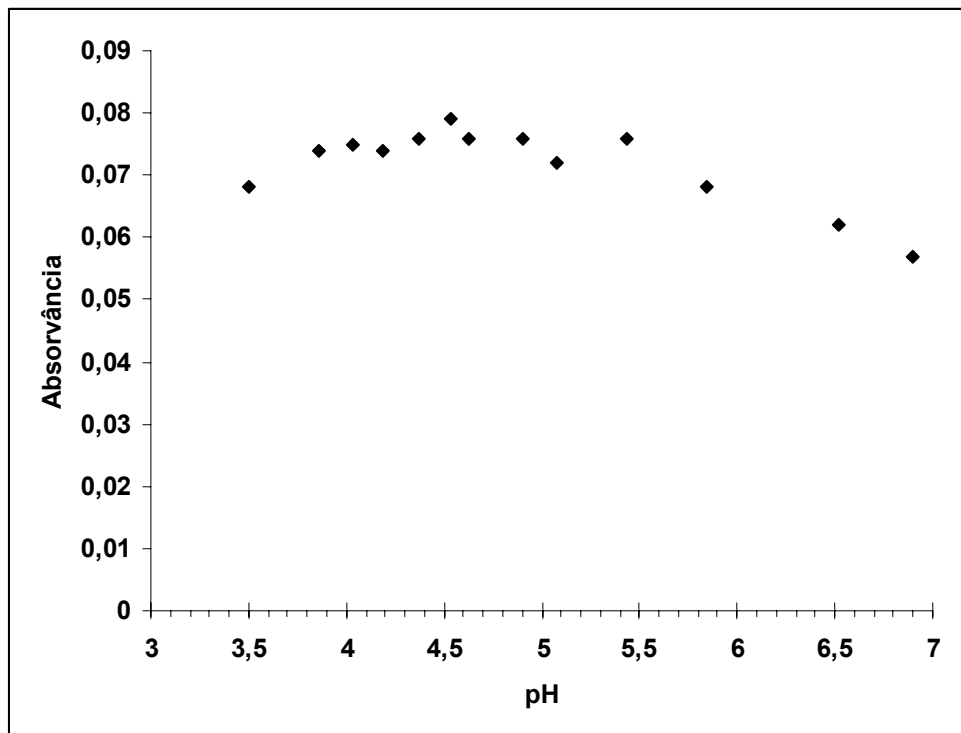


Fig. 39 – Espectros de absorção do quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$  em fase sólida, em celas axial e plana, respectivamente, e em solução etanólica. Concentração de  $\text{Cu}(\text{I}) = 4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

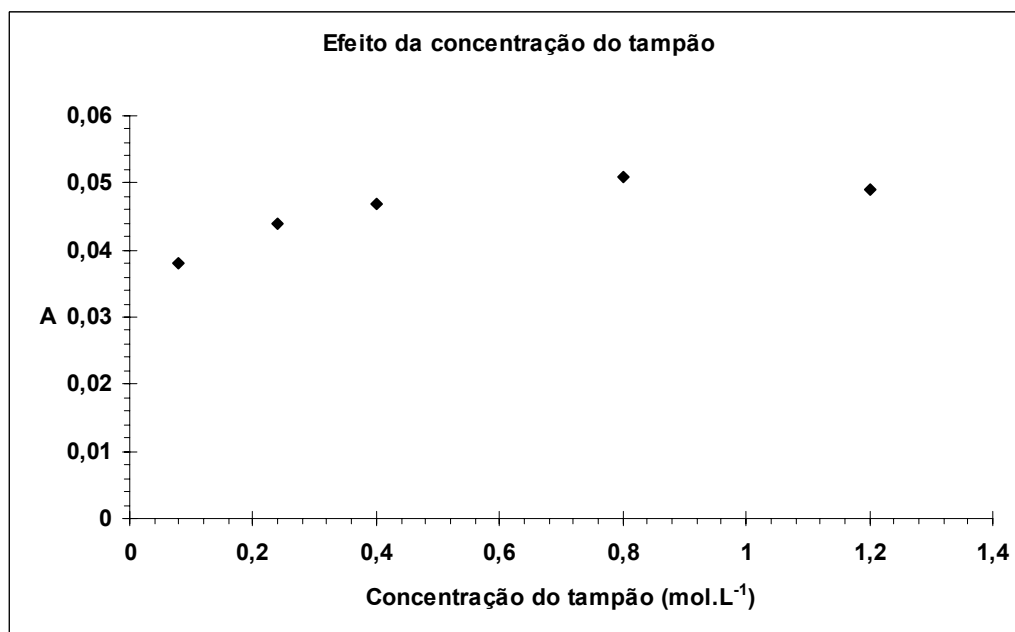
#### 8.4.3 – Efeito da variação da acidez e da concentração do tampão acetato

A retenção do cobre(I), a partir de soluções aquosas, foi estudada em diferentes valores de pH. Foi estudada apenas a faixa de pH gerada pelo tampão ácido acético / acetato de sódio (entre 3,8 e 5,8). Valores de pH maiores que este não foram avaliados, pois o estudo da acidez no capítulo anterior demonstrou uma queda significativa do sinal de absorvância para regiões alcalinas. Observou-se que o pH não afeta de maneira significativa à reação e a capacidade de retenção do cobre(I) se manteve entre 3,9 e 5,4; como pode ser visto na figura 40.

Depois de escolhido o pH 4,8, que é o pH com a maior força tamponante para o tampão ácido acético / acetato de sódio, estudou-se o efeito da variação da concentração do tampão ácido acético / acetato de sódio sobre a retenção do  $\text{Cu}(\text{I})$  sobre a sílica C18 modificada com cuproína. Os resultados encontram-se na figura 41.



**Fig. 40 – Efeito da acidez na capacidade de retenção do Cu(I) em cuproína-C18, na presença de cloreto de hidroxilamina, para uma concentração de Cu(I) = 0,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .**



**Fig. 41 – Efeito da variação da concentração do tampão acetato de sódio pH 4,8 na capacidade de retenção do Cu(I) em cuproína-C18, na presença de cloreto de hidroxilamina, para uma concentração de Cu(I) = 0,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .**

Observando-se os resultados da figura 41 vemos que não há variações significativas de retenção do Cu(I) a partir de concentrações do tampão superiores a  $0,40 \text{ mol.L}^{-1}$ . Para garantir um excesso de tampão na amostra, adotou-se o volume de 5mL para um tampão acetato de sódio pH 4,8 ( $2 \text{ mol.L}^{-1}$ ).

#### 8.4.4 – Efeito da natureza e da concentração do redutor

Como o ácido ascórbico exige que a solução seja feita diariamente, testaram-se outros redutores, principalmente um que fosse mais estável que o ácido ascórbico. Os resultados para concentração de Cu(I) igual  $0,4 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ , na presença do redutor a uma concentração de 1% (m/v) e tampão acetato de sódio pH 4,8, encontram-se na tabela 15.

**Tabela 15 – Efeito da natureza do redutor. Cu(I) =  $0,4 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ .**

Redutor	Absorvância
Hidrazina 1%	0,054
Hidroquinona 1%	0,058
Hidroxilamina 1%	0,054
Sulfito de sódio 1%	0,054
Ácido ascórbico 1%	0,048

Pelos resultados obtidos, observa-se que, exceto pelo ácido ascórbico, todas as outras espécies possuem o mesmo poder redutor. Foi escolhido o cloreto de hidroxilamina como redutor para o procedimento final, pois o mesmo era rápido de ser preparado, devido a sua alta solubilidade em água, e a solução a 1% (m/v) durava vários dias.

Uma vez escolhido o cloreto de hidroxilamina como redutor foi realizado um estudo do efeito da variação da concentração do redutor sobre a eficiência de retenção do Cu(I) pelo sistema cuproína-C18 (figura 42). Como não foi observado nenhuma variação significativa na retenção do Cu(I) para uma faixa de concentração do redutor entre 1,4 a  $28,9 \text{ mmol.L}^{-1}$  adotou-se o valor de 1mL de redutor na concentração de 1% (m/v) para o procedimento geral.

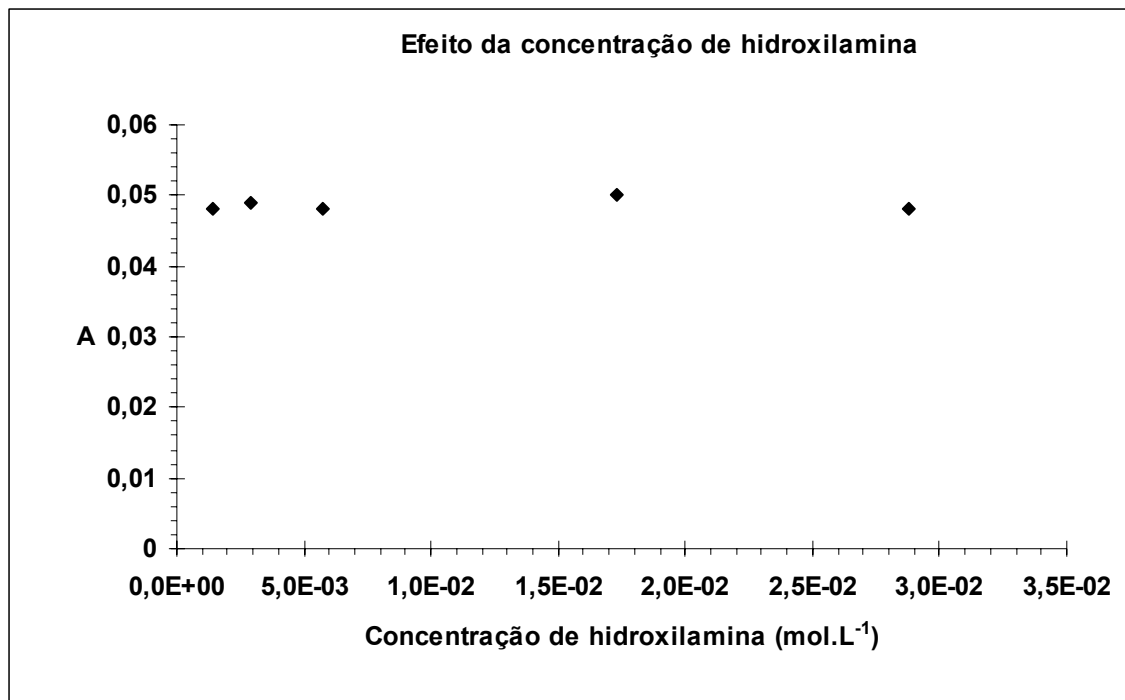


Fig. 42 – Efeito da variação da concentração de hidroxilamina na capacidade de retenção do Cu(I) em cuproína-C18, na presença de tampão acetato pH 4,8, para uma concentração de Cu(I) = 0,4 µg.mL<sup>-1</sup>.

#### 8.4.5 – Efeito da concentração do eluente

Um dos parâmetros mais importantes em um sistema do tipo FI-EFS é a escolha do eluente, o volume injetado e a concentração do mesmo. Se a concentração do eluente não for suficiente para a eluição completa do analito ou destruir a fase sólida todo trabalho será em vão. Dentre os muitos eluentes testados, ainda nos estudos da cela axial, a tiouréia foi o que apresentou os melhores resultados e por isso resolvemos fazer um outro estudo, não sobre a natureza do eluente, mas sim sobre a concentração de tiouréia para um volume injetado de 500µL. Os resultados encontram-se na tabela 16.

A eluição completa do analito só foi possível a partir de 500µL de tiouréia 0,26 mol.L<sup>-1</sup>. Embora tenha havido eluição para uma concentração de 0,13 mol.L<sup>-1</sup> essa eluição foi parcial, deixando um resíduo visível na fase sólida.

Tabela 16 – Efeito da concentração de tiouréia, volume injetado de 500 µL.

Concentração da tiouréia (mol.L <sup>-1</sup> )	Absorvância
0,03	0,000
0,06	0,000
0,13	0,074
0,26	0,084
0,52	0,084

É importante salientar que, como a área circular preenchida com a fase sólida modificada na cela plana é maior que a área preenchida na cela axial, houve uma duplicação da concentração de tiouréia até então utilizada no procedimento analítico.

#### 8.4.6 – Efeito da vazão na retenção do cobre

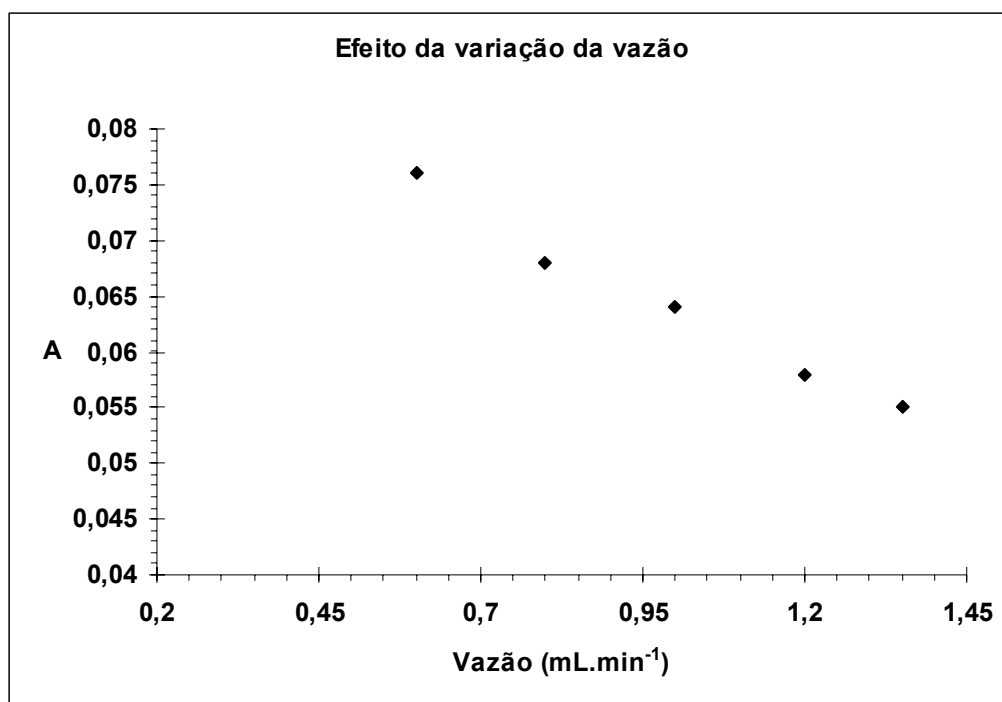


Fig. 43 – Efeito da variação da vazão da solução transportadora na capacidade de retenção do Cu(I) em cuproína-C18, na presença de cloreto de hidroxilamina e tampão acetato pH 4,8, para uma concentração de Cu(I) = 0,4µg.mL<sup>-1</sup>.

Como já foi dito no capítulo referente ao estudo da cela axial, em sistemas de fluxo, a vazão é um parâmetro muito importante, pois através dele podemos influenciar outros parâmetros como sensibilidade, seletividade e frequência de amostragem. Mudanças na vazão da passagem da amostra pela cela plana, contendo cuproína imobilizada em C18, foram feitas entre 0,3 e 1,4 mL.min<sup>-1</sup>. Observando-se a figura 43, verificou-se que a retenção do cobre(I) sofreu grande influência com pequenas modificações nessas vazões. Para vazões superiores a 1,4mL.min<sup>-1</sup> ocorre um aumento da impedância hidrodinâmica e gerando vazamentos no sistema.

### 8.5 – CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO

A obediência à lei de Beer foi verificada variando-se a concentração do íon Cu(I) de 0 a 2,0 µg.mL<sup>-1</sup> e a absorvidade molar ( $\epsilon$ ) para o quelato retido no sistema Cuproína-Cu(biq)<sub>2</sub><sup>+</sup> foi estimada em 6,37 x 10<sup>5</sup> L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> quando 500µL da amostra foram injetados. A curva analítica, lida em 550nm, foi feita em presença de cloreto de hidroxilamina 0,04% (m/v) tampão acetato de sódio pH 4,8 (0,2 mol.L<sup>-1</sup>), solução transportadora tampão acetato de sódio pH 4,8 (0,2 mol.L<sup>-1</sup>) e solução eluente tiouréia 0,26 mol.L<sup>-1</sup> (500µL). A curva analítica e outras características analíticas encontra-se na figura 44 e na tabela 17, respectivamente.

**Tabela 17 - Características Analíticas do Método Proposto**

Absortividade Molar	6,37 x 10 <sup>5</sup> L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>
Coefficiente de Correlação	0,9985
Limite de Detecção (LD)	0,10 µg.mL <sup>-1</sup>
Limite de Quantificação (LQ)	0,33 µg.mL <sup>-1</sup>
Faixa Linear Dinâmica	0,33 a 2,0 µg.mL <sup>-1</sup>
Coefficiente de variação (n=10)	4,9%

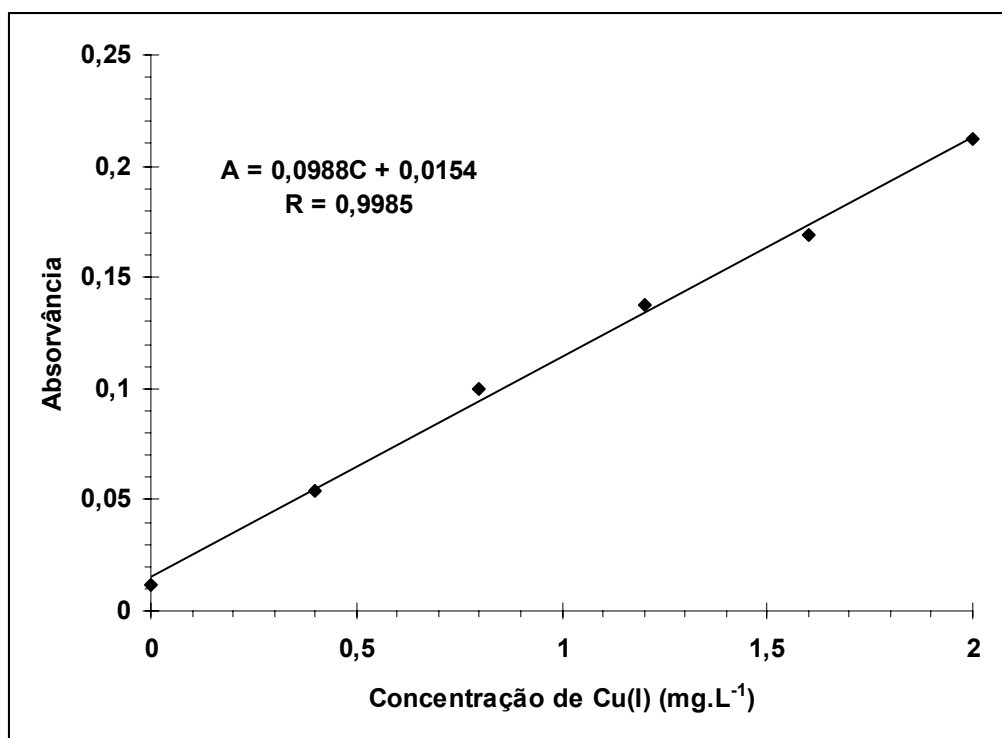
Seguindo o procedimento adotado no capítulo anterior, todos os LD e LQ calculados nesta tese foram obtidos a partir dos quocientes entre os desvios



padrões dos coeficientes angulares e os coeficientes lineares das curvas analíticas multiplicadas por três e por dez respectivamente, ou seja:

$$LD = \frac{3\sigma_{L_0}}{a} \text{ e } LQ = \frac{10\sigma_{L_0}}{a}$$

Onde  $\sigma_{L_0}$  é o desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica e **a** é a inclinação (coeficiente angular) da mesma numa reta do tipo **y=ax+b** [105].



**Fig. 44 – Curva analítica do sistema Cu(biq)<sub>2</sub><sup>+</sup> em fase sólida para uma cela plana e tiouréia como eluente. Cu(I) = 0 a 2,0 µg.mL<sup>-1</sup>, em presença de cloreto de hidroxilamina 0,04% e tampão ácido acético / acetato de sódio 0,2 mol.L<sup>-1</sup> (pH 4,8).**

## **9 – ESTUDO DA RETENÇÃO, SEPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE COBRE(I) POR ESPECTROFOTOMETRIA EM FASE SÓLIDA USANDO CUPROÍNA IMOBILIZADA EM SÍLICA FUNCIONALIZADA C18 UTILIZANDO UMA CELA DE FLUXO PLANA USANDO FERRO (III) COMO ELUENTE.**

### **9.1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Uma vez que os testes dos capítulos anteriores demonstraram a possibilidade da utilização tanto de uma cela axial (cilíndrica) quanto uma cela plana (retangular) preenchida com sílica funcionalizada C18 modificada com cuproína acoplada a um sistema de fluxo para a separação e detecção de Cu(I), o uso de tiouréia ( $\text{H}_2\text{NCSNH}_2$ ) como solução eluente trazia-nos uma série de desvantagens.

A tiouréia ou tiocarbamida,  $\text{H}_2\text{NCSNH}_2$ , é um composto cristalino, branco com ponto de fusão em torno  $180^\circ\text{C}$ . É completamente solúvel em etanol, mas sua solubilidade em água é baixa (cerca de  $0,083 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A tiouréia forma complexos do tipo amínico com muitos metais, mesmo em solução ácida. Complexos do tipo 4:1 com Cs(I), K(I), Tl(I) e  $\text{NH}_4^+$  são considerados fracos, porém os complexos formados com Cu(I), Hg(II) e Ag(I) são tão estáveis que o reagente é usado para eliminar interferências dos mencionados elementos em determinações gravimétricas de Zn e Cd. A tiouréia apresenta muitos problemas com estabilidade, tanto do seu sólido quanto de suas soluções aquosas, tal que o sólido pode se decompor em enxofre ou sulfetos e a sua solução aquosa deve ser preparada diariamente, da mesma forma que acontece com o ácido ascórbico [3].

Durante os estudos da retenção do Cu(I) pelo sistema cuproína-C18, em ambas as celas, observou-se a formação de um produto amarelado, após a eluição com tiouréia, na área onde anteriormente havia se formado o quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ . Com a utilização freqüente da mesma fase sólida modificada, o resíduo amarelo ia se intensificando e deslocando a formação do quelato para uma área livre da fase sólida, área essa que, na maioria das vezes, saía do foco de incidência da fonte de luz provocando a diminuição do sinal e diminuindo muito a

vida útil das fases sólidas. Por essa razão fomos em busca de um novo eluente que mantivesse a mesma eficiência da tiouréia, mas sem esses efeitos colaterais.

Em 1991 e 1992, Itabashi e colaboradores propuseram dois sistemas de análise por injeção de fluxo (FIA) para a determinação espectrofotométrica indireta de V(IV) e de agentes complexantes para Fe(II) aproveitando as características redox do quelato  $\text{Cu}(\text{neocup})_2^{+2}$  [62, 63]. As reações de oxi-redução produziam o quelato  $\text{Cu}(\text{neocup})_2^+$ , que é colorido, e apresenta um máximo de absorção em 454 nm. Tendo estes dois trabalhos como referência, e lembrando que a neocuproína possui as mesmas características químicas e a mesma seletividade para o cobre da cuproína, foi considerada a possibilidade de fazer o processo reverso: oxidar o Cu(I) a Cu(II) seguida da eluição do quelato, usando uma mistura Fe(III)/HCl como eluente do quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ .

## 9.2 – OBJETIVOS

Nos capítulos anteriores verificou-se que a retenção do Cu(I) pelo sistema cuproína-C18 apresentava diferenças significativas em função da geometria das celas, como: **(a)** uma sensibilidade menor ( $\text{LD} = 0,10 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) para cela plana que a mesma para cela axial ( $\text{LD} = 9,9 \text{ ng}.\text{mL}^{-1}$ ), **(b)** maiores problemas hidrodinâmicos para cela axial (vazamentos constantes), **(c)** maior área iluminada na cela plana, **(d)** menor dispersão de luz na cela plana (superfície plana) contra uma maior dispersão de luz na cela axial (superfície curva) e **(e)** maior coeficiente de variação da cela cilíndrica (cela axial = 5,6%, cela plana = 4,9%). Porém, algo era comum aos dois sistemas: o uso da tiouréia como eluente diminuía muito o tempo de vida útil da fase sólida modificada com cuproína.

O objetivo desta etapa do trabalho é estudar a eficiência da substituição da tiouréia por uma solução ácida de ferro(III) como eluente. Para tal, utilizamos a cela de geometria plana, que foi concebida pelo Prof. Dr. Boaventura F. Reis. Parte desta etapa do trabalho foi realizada na Seção de Química Analítica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), em Piracicaba-SP, sob a orientação do próprio Prof Dr. Boaventura Reis e do Prof. Dr Fábio Rocha. Aqui

em Salvador, o trabalho teve colaboração dos professores Dr. Leonardo Teixeira (UNIFACS), Dr. Sérgio Ferreira (IQ-UFBA) e Dr. Mauro Korn (UNEB).

### **9.3 – REAGENTES E INSTRUMENTOS**

#### **9.3.1 - Reagentes**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções utilizadas foram preparadas com água purificada em um sistema *Easypure* (resistência 18,2 M $\Omega$ .cm) e armazenadas em recipientes plásticos de PVC previamente descontaminados. A solução estoque de cobre (1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foi preparada partindo-se de uma solução ácida contida em ampolas do tipo *Titrisol* (Merck) transferindo-se o conteúdo da referida ampola para um balão de 1000mL e completando o volume do mesmo com água desionizada. As soluções de trabalho de 100, 10 e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foram preparadas a partir das diluições apropriadas da solução estoque. A solução estoque de ferro(III) (1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foi preparada partindo-se de uma solução ácida contida em ampolas do tipo *Titrisol* (Merck) transferindo-se o conteúdo da referida ampola para um balão de 1000mL e completando o volume do mesmo com água desionizada. As soluções de trabalho de 500, 250, 100, 50, 25, 10 e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foram preparadas a partir das diluições apropriadas da solução estoque. A solução estoque de vanádio(V) (1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foi preparada partindo-se de uma solução ácida contida em ampolas do tipo *Titrisol* (Merck) transferindo-se o conteúdo da referida ampola para um balão de 1000mL e completando o volume do mesmo com água desionizada. As soluções de trabalho de 100, 10 e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foram preparadas a partir das diluições apropriadas da solução estoque. A solução estoque de cuproína 0,05% (2,0x10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>) foi obtida dissolvendo-se 0,0125g da 2,2'-biquinolina (Baker) em 25mL de dimetilformamida (DMF) (Merck). A solução aquosa de hidroxilamina 1% (m/v) era preparada diariamente dissolvendo-se 1g de cloreto de hidroxilamina (Merck) com 100 mL de água. O tampão ácido acético / acetato de sódio 2,0 mol.L<sup>-1</sup> (pH 4,8) foi preparado pela dissolução de 47,34 mL de ácido acético glacial (Merck) e 34,62 g de acetato de sódio tri-hidratado em água purificada até o volume de 1000mL. A solução carregadora de tampão ácido acético / acetato de

sódio  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 4,8) foi preparada pela diluição da solução tampão original. A solução de EDTA 1% (m/v) foi preparada pela dissolução de 1g do sal dissódico do ácido diaminotetracético (Baker) com 100mL de água. A solução estoque de NaCl 20% foi preparada pela dissolução de 200g do sal em 1000mL de água purificada. As soluções diluídas de NaCl 10%, 5% e 1% foram preparadas pela diluição apropriada da solução estoque. A sílica funcionalizada foi obtida a partir de Cartuchos de sílica funcionaliza  $C_{18}$  (60-100 mm) Waters – 600mg, Cartuchos de sílica funcionaliza  $C_{18}$  (60-100 mm) PR Cola – 600mg e Seringas de sílica funcionalizada  $C_{18}$  (60-100 mm) Varian – 500mg.

### **9.3.2 - Instrumentos**

As medidas de absorvância foram feitas utilizando-se um espectrofotômetro de absorção molecular UV-VIS modelo CARY-5E (Varian), no qual foi adaptada a cela de fluxo plana, descrita a seguir, desenvolvida especialmente para este estudo; com um suporte feito em isopor e adaptado ao caminho óptico do Cary-5E. Também foi utilizado um fotômetro da FEMTO modelo 432, adaptado para este fim. As medidas de pH das soluções e amostras foram feitas utilizando um potenciômetro para medidas de pH Digimed DM 20 com eletrodo de vidro combinado DME-MV1. A propulsão dos fluidos foi efetuada por uma bomba peristáltica Reglo (Ismatec) e uma bomba peristáltica Miniplus 3 (Gilson), ambas de quatro vias, e uma bomba peristáltica da Ismatec (modelo MP-13R) de oito vias, todas equipadas com tubos de Tygon com conexões de PTFE. Para a inserção das soluções (amostra e eluente) foi empregado um injetor comutador proporcional de barra deslizante. As condições operacionais dos espectrofotômetros de absorção molecular estão mostradas nas tabelas 18 e 19.

**Tabela 18 – Condições operacionais do espectrofotômetro UV-VIS CARY-5E**

Parâmetros	Condições operacionais
Velocidade de varredura	1800 nm.s <sup>-1</sup>
Tempo de varredura	120 min
Tempo de incidência do feixe	0,1 s
Largura da fenda	4 nm
Lâmpada	Tungstênio/halogênio
Tipo do feixe	Duplo feixe

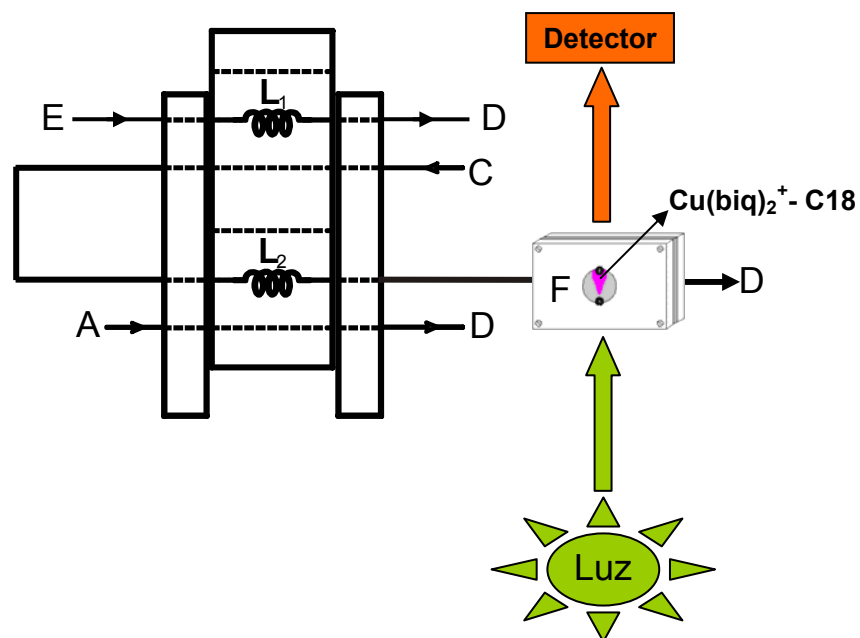
**Tabela 19 – Condições operacionais do espectrofotômetro UV-VIS FEMTO-432**

Parâmetros	Condições operacionais
Velocidade de varredura	manual
Largura da fenda	4 nm
Lâmpada	Tungstênio/halogênio
Tipo do feixe	Feixe simples

### 9.3.3- Imobilização do reagente no C18 e diagrama de fluxo do módulo de análise

A imobilização da cuproína na sílica funcionalizada C18 segue o mesmo procedimento para os estudos feitos com a cela axial. A cela plana foi adaptada diretamente no caminho óptico dos espectrofotômetros de absorção molecular CARY - 5E e FEMTO - 432 e o mais próximo possível do detector. O volume da amostra injetado foi de 400µL, o volume do eluente injetado também foi de 400µL e o acompanhamento das absorvâncias foi realizado em 550nm. A solução transportadora foi uma solução diluída do tampão acetato de sódio pH 4,8 (0,2 mol.L<sup>-1</sup>) numa vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.

Todas as etapas da FI – EFS para a análise do cobre, desde o condicionamento da fase sólida C18 modificada com cuproína, passando pela injeção da amostra, eluição do cobre e lavagem da fase sólida para uma nova injeção estão representadas nas figuras 46 a 53 a seguir.



**Fig. 45 – Diagrama de fluxo do módulo de análise para medidas de Cu(I) por FI-EFS:** A - amostra ( $0,5$  a  $4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ); C - transportador (tampão acetato  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ ); L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> - alças de amostragem ( $400\mu\text{L}$ ) e eluição ( $400\mu\text{L}$ ), respectivamente; D - descarte de soluções; F - cela de fluxo plana contendo o suporte sólido modificado inserida no caminho óptico do espectrofotômetro. Foi empregada como eluente uma solução de Fe(III)  $25 \text{ mg.L}^{-1}$  / HCl  $5\%$  (v/v). A vazão da solução transportadora foi mantida em  $1,0 \text{ ml.min}^{-1}$ .



**Fig. 46 – Sistema FI-EFS adaptado ao CARY – 5E**



**Fig. 47 – Cella de fluxo adaptada próximo ao detector do espectrofotômetro CARY-5E.**



**Fig. 48 – Sílica funcionalizada C18 modificada com cuproína. Fase sólida seca.**



**Fig. 49 – Fase sólida modificada sendo condicionada com solução transportadora (tampão acetato pH 4,8)**





**Fig. 50 – Injeção de 400 $\mu$ L de Cu(I) 4,0 mg.L<sup>-1</sup>, em presença de cloreto de hidroxilamina e tampão acetato pH 4,8.**



**Fig. 51 – Retenção de 400 $\mu$ L de Cu(I) 4,0 mg.L<sup>-1</sup>, em presença de cloreto de hidroxilamina e tampão acetato pH 4,8.**



**Fig. 52 – Eluição do Cu(I) 4,0 mg.L<sup>-1</sup> com uma solução de Fe(III) 25mg.L<sup>-1</sup> / HCl 5%.**



**Fig. 53 – Lavagem e condicionamento da fase sólida modificada com solução transportadora (tampão acetato pH 4,8) para uma nova injeção da amostra.**

## 9.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 9.4.1 – Estudo da natureza do eluente

O primeiro estudo a ser feito era se a reação empregada por Itabashi [62, 63] funcionaria no sentido inverso (o ferro(III) e o vanádio (V) oxidando o cobre(I)), em fase sólida e com cuproína no lugar da neocuproína. Para isso, foi realizado um experimento no qual 400µL de amostra de Cu(I) 4 mg.L<sup>-1</sup>, na presença de cloreto de hidroxilamina e tampão acetato de sódio pH 4,8, foi injetado no sistema e depois eluído com 400µL de eluente, usando tampão acetato de sódio pH 4,8 (0,2 mol.L<sup>-1</sup>) como transportador a uma vazão 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. Para cada eluente foram feitas 5 injeções e depois calculada a média e desvios padrões das mesmas. Os resultados encontram-se na tabela 20.

**Tabela 20 – Estudo da natureza do eluente**

<b>Eluente</b>	<b>Absorvância</b>
Tiouréia 0,26 mol.L <sup>-1</sup>	0,280 ± 0,007
V(V) 1000 mg.L <sup>-1</sup> /HCl 5%	0,320 ± 0,016
Fe(III) 1000 mg.L <sup>-1</sup> /HCl 5%	0,413 ± 0,005

Observando-se os resultados da tabela 20 vemos que a substituição da tiouréia pelo ferro ou pelo vanádio é possível e o ferro apresentou uma eficiência de eluição superior à do vanádio fazendo com que optássemos por ele na substituição.

### 9.4.2 – Espectros de absorção para a cela plana

Como já foi visto no capítulo anterior, o espectro de absorção do complexo Cu(biq)<sub>2</sub><sup>+</sup> sobre C18 mostrou um deslocamento do máximo de absorção, quando comparado com o complexo em solução aquosa passando de 546 nm (em solução) para 550 nm (na cela axial ou na cela plana). Embora a cuproína seja seletiva para o cobre, como já foi citado em outros capítulos desta tese, era necessário verificar se a presença de excesso de ferro, agora como eluente, traria alguma modificação no espectro. Assim, foi feito um espectro na fase sólida de um

ensaio em branco, de uma amostra de cobre  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ , de uma amostra de ferro  $4 \text{ mg.L}^{-1}$  e de uma amostra contendo uma amostra de cobre e ferro (1:1), todos na presença de hidroxilamina e tampão acetato de sódio pH 4,8. A partir ds espectros em fase sólida, apresentados na figura 54, é fácil de observar que não há formação nem retenção do quelato  $\text{Fe}(\text{biq})_2^{2+}$ , uma vez que o quelato com o ferro não se forma e só o quelato com o cobre é que fica retido.

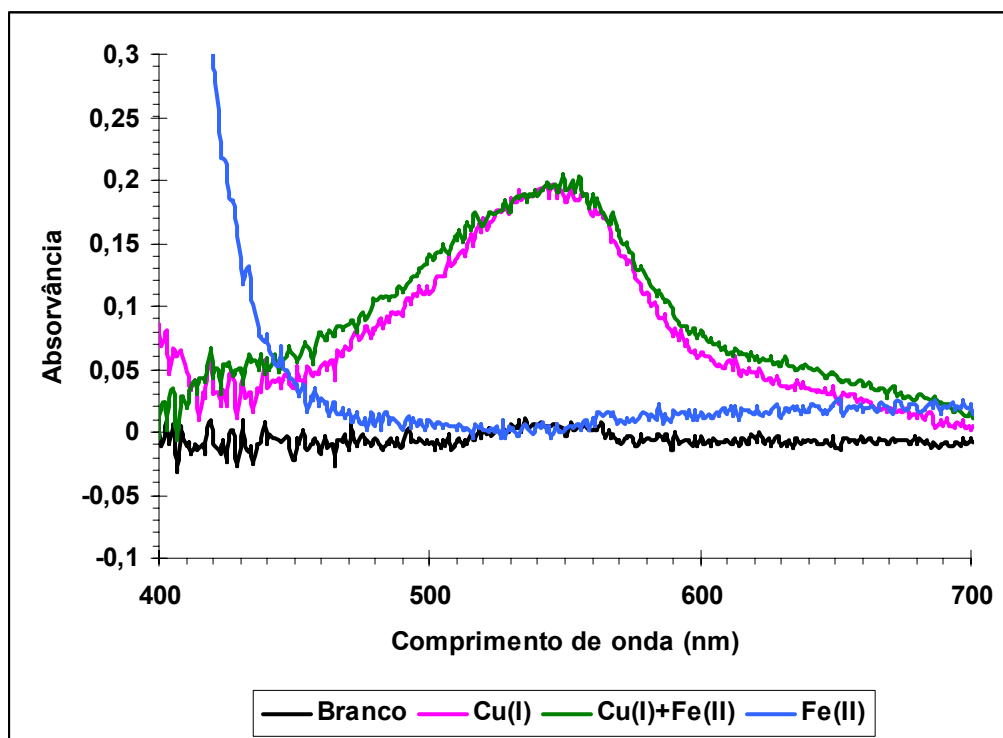


Fig. 54 – Espectros de absorção dos quelatos do cobre, ferro e da mistura (1:1) de cobre e ferro no sistema cuproína-C18. Concentração de  $\text{Cu}(\text{I}) = 4,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ .  $\text{Fe}(\text{II})=4,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$

#### 9.4.3 – Efeito da variação da concentração de $\text{Fe}(\text{III})$ no eluente.

Depois de verificado que o ferro não pode ser retido pelo sistema em fase sólida cuproína – C18, estudou-se o efeito da variação da concentração de ferro(III) em  $400 \mu\text{L}$  do eluente injetado, na presença de HCl 5%. Foram injetadas  $400 \mu\text{L}$  de amostras de  $\text{Cu}(\text{I}) 4 \text{ mg.L}^{-1}$ , na presença de hidroxilamina e tampão acetato pH 4,8, tendo a própria solução tampão como solução transportadora. Os resultados estão na figura 55.

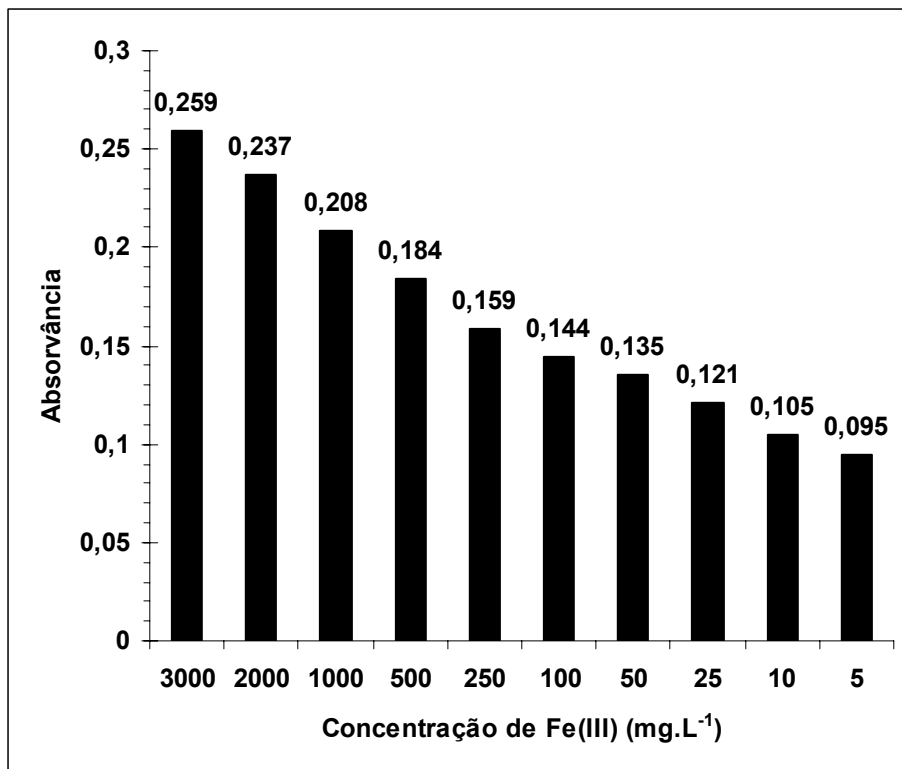


Fig. 55 – Efeito da variação da concentração de Fe(III) no eluente.

A partir dos resultados apresentados na figura 55 observa-se que quanto maior a concentração de Fe(III) mais eficiente é a eluição. Durante o teste, observou-se instabilidade na linha de base e altos sinais de branco para altas concentrações de ferro. Estes problemas podem ter sido causados por uma difusão da solução eluente através da solução transportadora, provocando uma possível mudança do índice de refração da fase sólida causada pela coloração amarelo-esverdeada da solução de ferro (III). Para o procedimento final foi adotado uma solução eluente de Fe(III) 25 mg.L<sup>-1</sup> / HCl 5%, que apresentou uma boa eficiência de aluição, uma linha de base estável e baixo sinal de branco.

#### 9.4.4 – Efeito da variação da concentração de íons cloreto no eluente.

Uma vez que a solução de Fe(III) 25mg.L<sup>-1</sup> era preparada na presença de HCl 5%, resolvemos estudar o efeito da variação da concentração de íons cloreto na eluição do cobre retido no sistema cuproína-C18. O experimento foi feito injetando 400µL de amostra de Cu(I) 2mg.L<sup>-1</sup>, eluindo com 400µL de Fe(III)

25mg.L<sup>-1</sup> na presença de NaCl com concentrações variando 1 a 20%. Foram testadas também como eluentes soluções de HCl 5 e 10% (v/v) sem a presença do Fe(III) para verificar se era possível eluir o cobre sem a etapa de oxidação do Cu(I) para Cu(II). Os resultados dos testes encontram-se na tabela 21.

**Tabela 21 – Efeito da presença de íons cloreto no eluente**

<b>Concentração de NaCl (%) / Fe(III) 25 mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>Absorvância</b>
1,0	0,079
5,0	0,086
10,0	0,087
15,0	0,087
20,0	0,086
HCl 10% - sem Fe(III)	0,034
HCl 5% - sem Fe(III)	0,027
Fe(III) 25 mg.L <sup>-1</sup> / HCl 5%	0,086

Observa-se pelos valores da tabela 21 que a partir da presença de NaCl 5% os valores de eluição são os mesmos obtidos para o eluente anteriormente empregado, no caso, Fe(III) 25 mg.L<sup>-1</sup> / HCl 5%, porém a ausência de íons Fe(III) influencia significativamente nos resultados, mesmo que a concentração de íons cloreto seja superior a 5% como pode ser visto para os resultados do HCl 5% e HCl 10% (v/v).

**Tabela 22 – Efeito da presença de íons cloreto no eluente na ausência de HCl**

<b>Fe(III) 25 mg.L<sup>-1</sup> / H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5% / Concentração de NaCl (%)</b>	<b>Absorvância</b>
5,0	0,075
10,0	0,074
15,0	0,077
20,0	0,076
Fe(III) 25 mg.L <sup>-1</sup> / HCl 5%	0,090

Ainda estudando a influência dos íons cloreto na eluição, tentou-se preparar uma mistura eluente onde o HCl 5% foi substituído por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5% e os íons cloreto fornecidos pela adição de NaCl 5, 10, 15 e 20%. A idéia era verificar se outro ácido, juntamente com o íon cloreto, poderia ser usado como eluente. Observando-se os resultados da tabela 22, percebe-se que a ausência do HCl diminui a eficiência da eluição, mesmo na presença de altas concentrações de íons cloreto.

#### 9.4.5 – Efeito da natureza da solução transportadora.

Foi feito também um estudo a respeito da natureza da solução transportadora, pois a mesma pode influenciar, não apenas na retenção do íon cobre, como também na vida útil da fase sólida modificada com cuproína (arrastando o regente imobilizado), da cela plana (que é feita de acrílico e pode ser atacada por solventes orgânicos) e nos tubos de Tygon e Teflon. Os testes foram feitos injetando-se 400µL de Cu(I) 4mg.L<sup>-1</sup>, em presença de hidroxilamina e tampão acetato pH 4,8, 400µL de Fe(III) 25 mg.L<sup>-1</sup> / HCl 5% e a solução transportadora com uma vazão de 1ml.min<sup>-1</sup>. Os resultados encontram-se na tabela 23.

**Tabela 23 – Efeito da natureza da solução transportadora**

Solução transportadora	Absorvância
Tampão ácido acético / acetato de sódio pH 4,8 (0,2mol.L <sup>-1</sup> )	0,254
Água purificada	0,245
Pirofosfato de sódio 1%	0,180
EDTA 1%	0,009

Observando os resultados da tabela 23 percebe-se que não há variação significativa entre a solução tampão e a água purificada, porém, como a solução tampão evita flutuações no pH durante o processo de retenção, achou-se mais conveniente usá-la ao invés da água purificada. Percebe-se também o efeito

mascarante do pirofosfato de sódio e do EDTA, que diminuíram significativamente a retenção do cobre.

#### 9.4.6 – Efeito da variação da acidez na retenção do Cu(I).

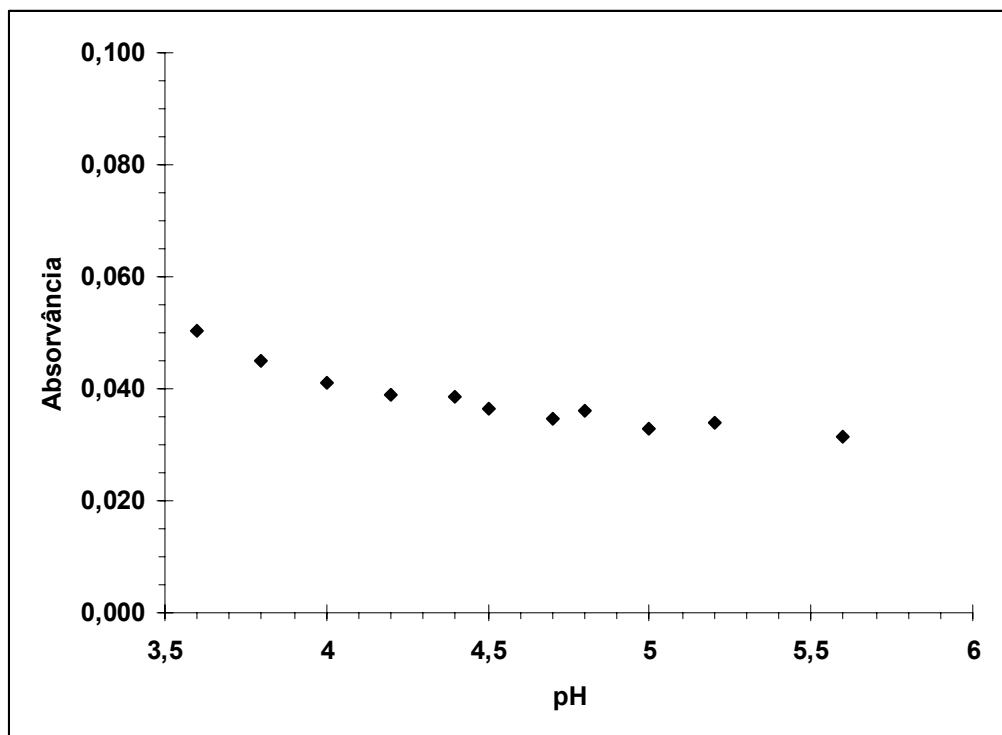


Fig. 56 – Efeito da acidez na capacidade de retenção do Cu(I) em cuproína-C18, na presença de cloreto de hidroxilamina, para uma concentração de Cu(I) = 0,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

A retenção do cobre(I), a partir de soluções aquosas, foi estudada em diferentes valores de pH. Foi estudada apenas a faixa de pH gerada pelo tampão ácido acético / acetato de sódio (entre 3,8 e 5,8). Valores de pH maiores que este não foram avaliados, pois o estudo da acidez no capítulo 7 demonstrou uma queda significativa do sinal de absorvância para regiões alcalinas. Observou-se que o pH não afeta de maneira significativa a reação e a capacidade de retenção do cobre(I) se mantido entre 4,2 e 5,2; como pode ser visto na figura 56.

Mais uma vez foi escolhido o pH 4,8, que é o pH com a maior força tamponante para o tampão ácido acético / acetato de sódio, que é colocado em excesso na amostra para garantir a manutenção do pH.

#### 9.4.7 – Efeito da natureza e da concentração do redutor

Assim como no estudo do sistema cuproína-C18 na retenção do cobre(I) utilizando uma cela plana tendo a tiouréia como eluente, também foi feito um estudo da natureza do redutor para o sistema com o Fe(III) como eluente. Os testes foram realizados para  $\text{Cu(I)} = 4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , na presença do redutor a ser testado em uma concentração de 1% (m/v) e tampão acetato de sódio pH 4,8, tendo o tampão acetato como transportador em uma vazão de  $1\text{mL.min}^{-1}$ . Os resultados encontram-se na tabela 24.

**Tabela 24 – Efeito da natureza do redutor.  $\text{Cu(I)} = 4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .**

<b>Redutor</b>	<b>Absorvância</b>
Hidrazina 1% (m/v)	0,136
Hidroquinona 1% (m/v)	0,139
Hidroxilamina 1% (m/v)	0,143
Sulfito de sódio 1% (m/v)	0,136
Ácido ascórbico 1% (m/v)	0,040

Pelos resultados obtidos, observa-se que, exceto pelo ácido ascórbico, todos os outros redutores possuem o mesmo poder redutor. Foi escolhido o cloreto de hidroxilamina como redutor para o procedimento final, pois o mesmo era rápido de ser preparado, devido a sua alta solubilidade em água, e a solução a 1% (m/v) era estável por vários dias.

É importante destacar o baixíssimo sinal obtido com ácido ascórbico na presença de Fe(III) como eluente, coisa que não aconteceu quando a tiouréia era o eluente. Essa diminuição do sinal deve ter ocorrido em função de alguma difusão do ácido ascórbico através da solução transportadora fazendo com que parte do Fe(III) seja reduzido a Fe(II) diminuindo a eficiência de eluição.

#### 9.4.8 – Efeito da variação da vazão na retenção do cobre

Como já foi dito no capítulo referente ao estudo da cela axial, em sistemas de fluxo, a vazão é um parâmetro muito importante, pois através dele podemos influenciar em outros parâmetros como sensibilidade, seletividade e frequência de



amostragem. Mudanças na vazão de transporte da amostra pela cela plana, contendo cuproína imobilizada em C18, foram feitas entre 0,3 e 2,3 mL.min<sup>-1</sup>. Observando-se a figura 57, verificou-se que a retenção do cobre(I) não sofreu grande influência com pequenas modificações nessas vazões mantendo-se constante numa ampla faixa de vazão.

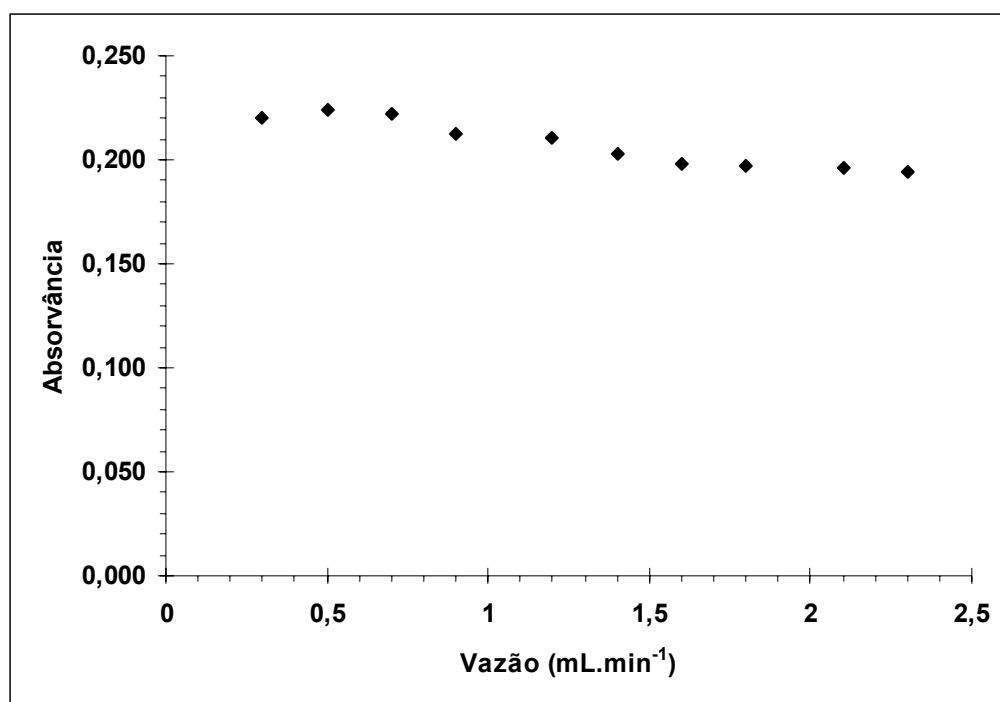


Fig. 57 – Efeito da variação da vazão da solução transportadora na capacidade de retenção do Cu(I) em cuproína-C18. na presença de cloreto de hidroxilamina e tampão acetato pH 4,8, para uma concentração de Cu(I) = 2,0 µg.mL<sup>-1</sup>.

#### 9.4.9 – Capacidade de retenção do Cu(I) pela fase modificada cuproína–C18.

Um dado muito importante é a capacidade de retenção da cuproína na fase sólida C18 e a capacidade de retenção do íon Cu(I) na fase sólida modificada. Como cuproína é imobilizada no C18 utilizando uma solução saturada de cuproína em dimetilformamida (DMF), e o dimetilformamida (DMF) pode atacar os tubos de Tygon e também a cela e o injetor comutador, ambos feitos de acrílico, não foi possível determinar quanto de cuproína fica imobilizado em C18. Porém, a

determinação da capacidade de retenção do íon Cu(I) pelo sistema cuproína-C18 foi possível.

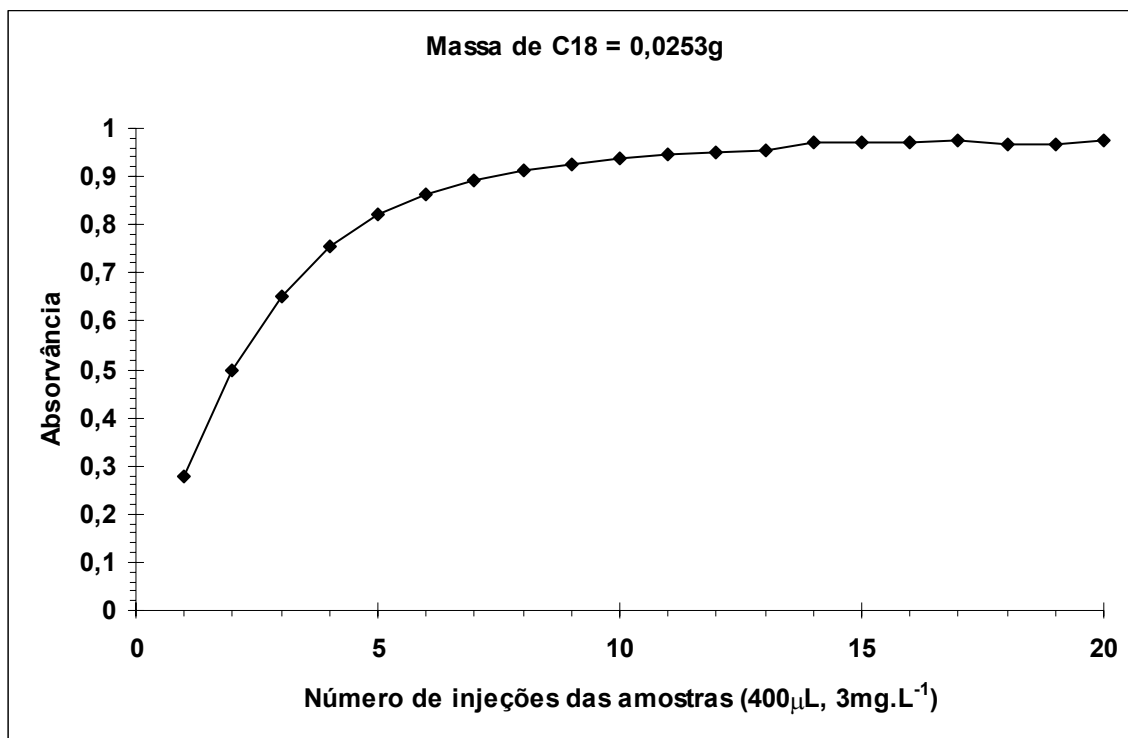


Fig. 58 – Capacidade de retenção do Cu(I) pela fase sólida cuproína-C18, na presença de cloreto de hidroxilamina e tampão acetato pH 4,8, para uma injeções de 400µL de amostra de Cu(I) = 3,0 µg.mL<sup>-1</sup>.

Para determinar a capacidade de retenção do Cu(I) tomamos 0,0253g de fase sólida cuproína-C18 nova e seca, e realizamos 20 injeções de 400µL de amostra de Cu(I) contendo 3mg.L<sup>-1</sup>, em presença de hidroxilamina e tampão acetato pH 4,8, tendo tampão acetato de sódio pH 4,8 como solução transportadora numa vazão de 2,1 mL.min<sup>-1</sup>. Os íons retidos não são eluídos, acumulando o Cu(I) até saturar a fase modificada e o sinal permanecer constante. Este é o ponto de saturação e representa a quantidade máxima de Cu(I) que a resina modificada pode comportar. Assumindo uma eficiência de retenção de 100%, a capacidade de retenção da resina modificada encontrado é de 664µg de Cu(I) por grama de resina modificada cuproína-C18. A figura 58 representa todo este processo.

#### 9.4.10 – Estudo da relação entre as alças de amostragem e de eluição na retenção e eluição do Cu(I) pela cuproína–C18.

Uma vantagem importante da FI-EFS é a possibilidade de aumentar a sensibilidade analítica aumentando-se o volume de amostra injetado. Entretanto este aumento deve ser criterioso, pois um aumento excessivo do volume da amostra pode aumentar tempo que o sinal de absorvância leva para alcançar seu valor máximo, diminuindo a frequência de amostragem e aumentando o tempo de análise. Observando-se a figura 59 nota-se uma relação linear entre o sinal de absorvância e o volume de amostra (em  $\mu\text{L}$ ), principalmente trabalhando-se com volumes entre 100 e 500  $\mu\text{L}$ . A partir dos resultados obtidos, escolheu-se o volume da alça de amostragem de 400 $\mu\text{L}$ , pois o mesmo apresenta um bom compromisso entre a sensibilidade e a frequência de amostragem do sistema.

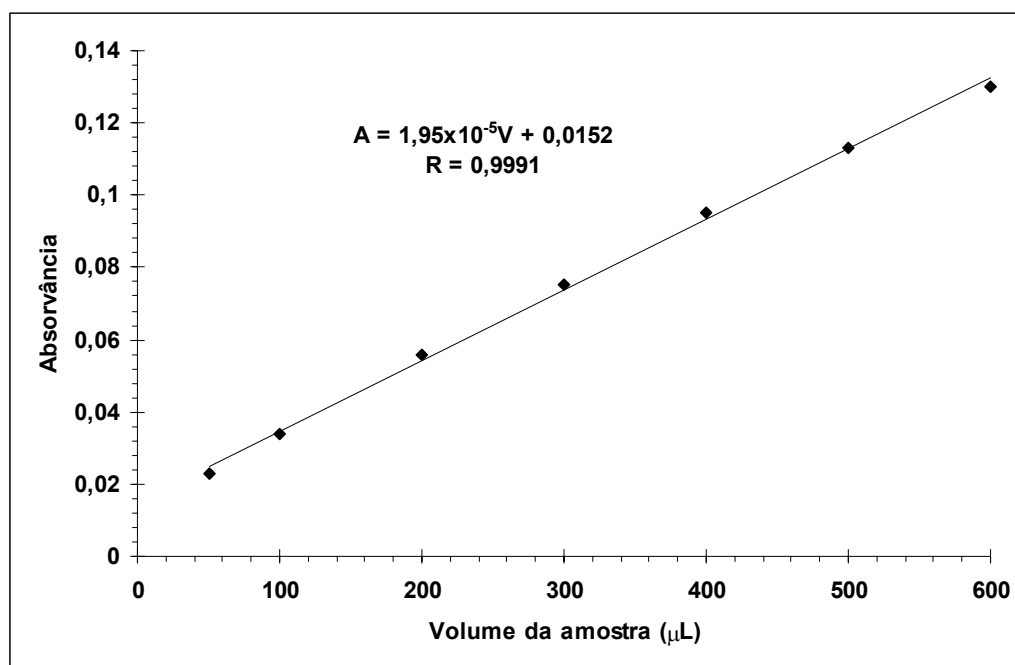


Fig. 59 – Efeito da variação do volume de amostra injetado.  $\text{Cu(I)} = 2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Um raciocínio semelhante pode ser feito para a escolha do melhor volume para a alça de eluição, ou seja, quanto maior o volume de eluente injetado mais fácil é a eluição do analito. Entretanto, um aumento excessivo do volume do eluente injetado pode resultar em uma diminuição da frequência de amostragem.

Além disso, para uma mesma concentração de eluente, existe um ponto a partir do qual, independente do volume injetado, a eficiência de eluição será a mesma. Observado-se a figura 60 percebe-se que a partir de 400  $\mu\text{L}$  a eficiência de eluição não muda. Assim, escolheu-se o volume de eluição de 400  $\mu\text{L}$ , pois o mesmo apresenta um bom compromisso entre a eficiência de eluição e a frequência de amostragem do sistema.

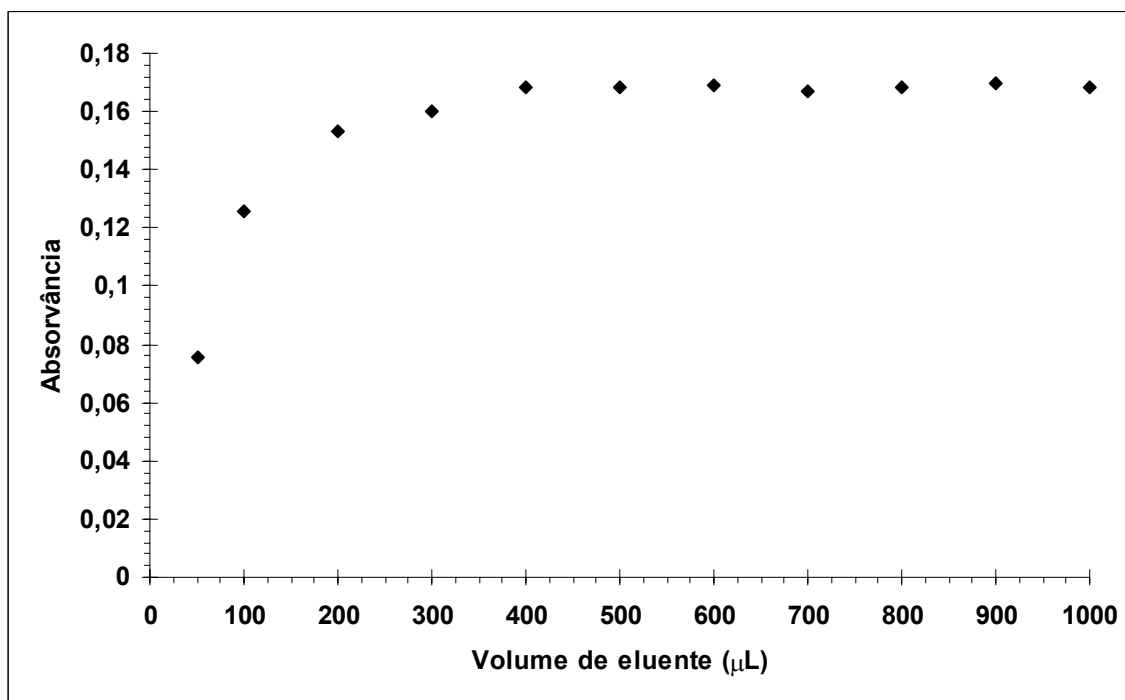


Fig. 60 – Efeito da variação do volume de eluente injetado.  $\text{Cu(I)} = 2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### 9.4.11 – Estudo de íons interferentes na determinação do cobre

Um estudo do efeito de possíveis espécies interferentes na retenção de  $\text{Cu(I)}$  pelo sistema cuproína-C18 foi realizado. Esse estudo foi feito adicionando-se  $100,0 \text{ mg.L}^{-1}$  do possível cátion interferente em uma solução contendo  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de cobre, na presença de hidroxilamina e tampão acetato de sódio pH 4,8. A tolerância na modificação no sinal de absorvância foi de  $\pm 5\%$ .  $\text{Cr(VI)}$ ,  $\text{Mo(VI)}$ ,  $\text{V(V)}$ ,  $\text{Sn(IV)}$ ,  $\text{Sb(V)}$ ,  $\text{W(IV)}$ ,  $\text{U(VI)}$ ,  $\text{Al(III)}$ ,  $\text{Fe(III)}$ ,  $\text{Cr(III)}$ ,  $\text{Ba(II)}$ ,  $\text{Be(II)}$ ,  $\text{Ca(II)}$ ,  $\text{Cd(II)}$ ,  $\text{Hg(II)}$ ,  $\text{Mg(II)}$ ,  $\text{Mn(II)}$  e  $\text{Pb(II)}$  não interferiram. Apenas o  $\text{Ti(IV)}$  interferiu na retenção do cobre. É provável que a maioria destes cátions tenham sido testados

no seu estado de oxidação mais baixo, como o Fe(II) e V(IV), devido ao excesso de hidroxilamina da amostra de Cu(I).

As presenças de 1000 mg.L<sup>-1</sup> de nitrato, sulfato, fosfato, cloreto, fluoreto, tartarato e citrato não causaram interferência na determinação de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de Cu(I). Em compensação a presença de oxalato, EDTA e tiouréia em excesso provocaram grande diminuição no sinal de absorvância durante os testes.

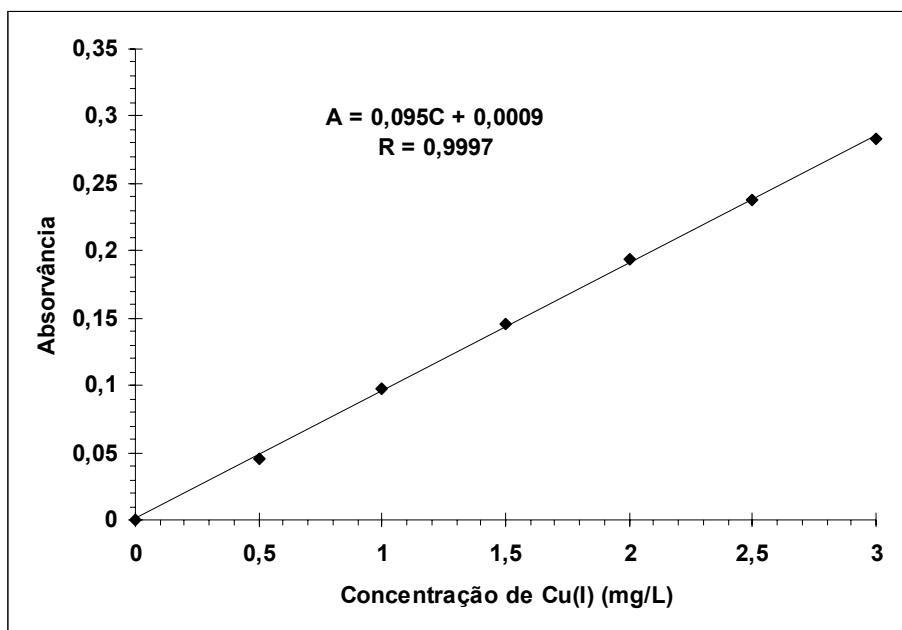
Contrariando a literatura, e os resultados obtidos para o método espectrofotométrico convencional, é uma surpresa a interferência do titânio, uma vez que o reagente é altamente seletivo para cobre. Esta interferência pode ser explicada pelo fato do Ti(IV) neste pH hidrolisar e formar um precipitado que pode reter o cobre da amostra por coprecipitação. Essa interferência poderia ser evitada usando-se uma solução de citrato ou tartarato de sódio na amostra para impedir a precipitação do titânio no pH de trabalho.

## 9.5 – CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO

A obediência à lei de Beer foi verificada variando-se a concentração do íon Cu(I) de 0 a 3,0 µg.mL<sup>-1</sup> e a absorvidade molar para o quelato retido no sistema Cuproína-C18 foi estimada em 6,09 x 10<sup>4</sup> L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> quando 400µL da amostra foram injetados. A curva analítica, lida em 550nm, foi feita em presença de cloreto de hidroxilamina 0,04% (m/v) e tampão acetato de sódio pH 4,8 (0,2 mol.L<sup>-1</sup>), tendo como solução transportadora tampão acetato de sódio pH 4,8 (0,2mol.L<sup>-1</sup>) e 400µL uma solução eluente de Fe(III) 25 mol.L<sup>-1</sup> / HCl 5% (v/v). A curva analítica é apresentada na figura 61 e outras características analíticas encontram-se na tabela 25.

**Tabela 25 - Características Analíticas do Método Proposto**

Absortividade Molar Aparente	6,09 x 10 <sup>4</sup> L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>
Coefficiente de Correlação	0,9997
Limite de Detecção (LD)	0,055 µg.mL <sup>-1</sup>
Limite de Quantificação (LQ)	0,183 µg.mL <sup>-1</sup>
Faixa Linear Dinâmica	0,183 a 3,0 µg.mL <sup>-1</sup>
Coefficiente de variação (n=10)	2,7%



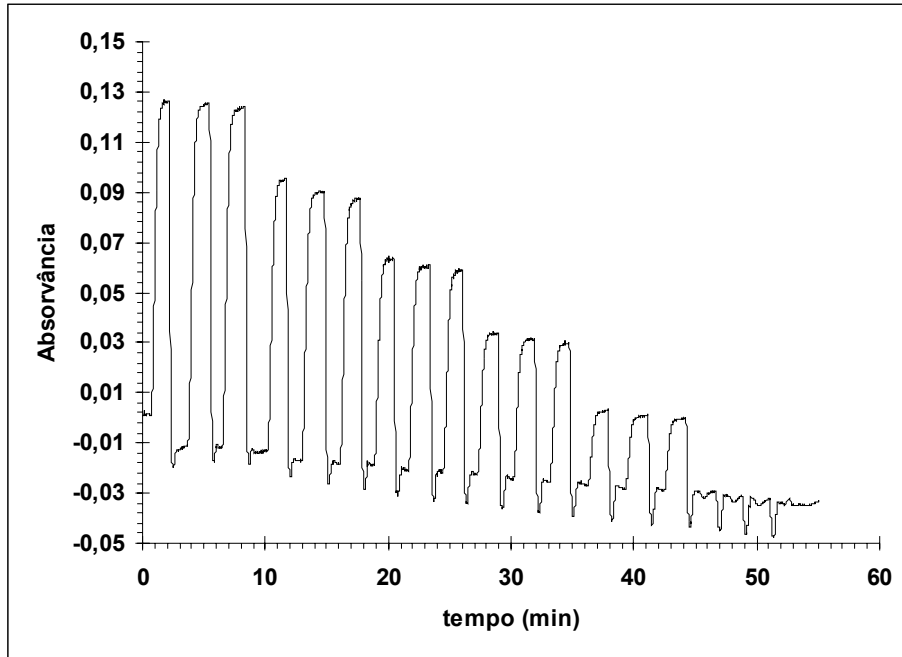
**Fig. 61 – Curva analítica do sistema Cu (biq)<sub>2</sub><sup>+</sup> – C18 para uma cela plana e Fe(III) / HCl como eluente:** Cu(I) = 0 a 3,0 µg.mL<sup>-1</sup>, em presença de cloreto de hidroxilamina 0,04% (m/v) e tampão ácido acético / acetato de sódio pH 4,8. Os volumes de amostra e de eluente foram de 400µL cada, injetados em uma solução transportadora do tampão acetato de sódio pH 4,8 para uma vazão de 2,1mL.min<sup>-1</sup>.

Seguindo o procedimento adotado no capítulo anterior, todos os LD e LQ calculados nesta tese foram obtidos a partir dos quocientes entre os desvios padrões dos coeficientes angulares e os coeficientes lineares das curvas analíticas multiplicadas por três e por dez respectivamente, ou seja:

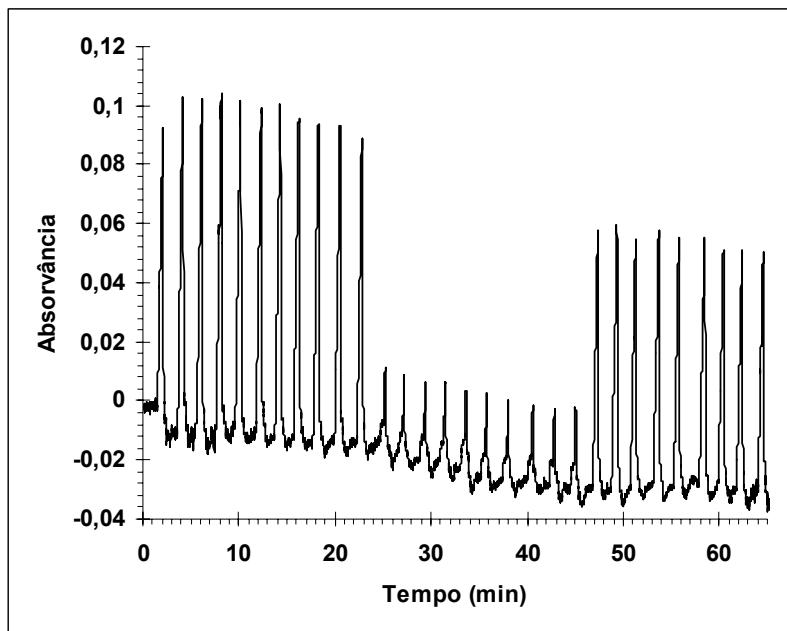
$$LD = \frac{3\sigma_{L_0}}{a} \text{ e } LQ = \frac{10\sigma_{L_0}}{a}$$

Onde  $\sigma_{L_0}$  é o desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica e **a** é a inclinação (coeficiente angular) da mesma numa reta do tipo **y=ax+b** [105].

A figura 62 representa uma corrida analítica referente a uma das curvas analíticas de calibração obtidas durante o trabalho. O sistema apresenta uma boa repetibilidade assim como uma boa frequência de amostragem (28 h<sup>-1</sup>), como pode ser visto na figura 63.



**Fig. 62 – Corrida analítica referente à curva analítica do sistema  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$  – C18 em fase sólida para uma cela plana e  $\text{Fe}(\text{III}) / \text{HCl}$  como eluente.  $\text{Cu}(\text{I}) = 0$  a  $2,0 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , em presença de cloreto de hidroxilamina 0,04% (m/v) e tampão ácido acético / acetato de sódio pH 4,8. Os volumes da amostra e do eluente foram de  $400\mu\text{L}$  cada injetados numa solução transportadora do tampão acetato de sódio pH 4,8 para uma vazão de  $1,3\text{mL}.\text{min}^{-1}$ .**



**Fig. 63 – Corrida analítica referente a um teste de repetibilidade para uma amostra de  $\text{Cu}(\text{I})$   $4\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  e seu ensaio em branco.**

## 10 – CONCLUSÕES

O principal objetivo deste trabalho foi o estudo comparativo da 2,2'-biquinolina (cuproína) na separação, preconcentração e determinação de traços cobre por espectrofotometria de absorção molecular em solução e na fase sólida modificada cuproína-C18. Em face aos resultados obtidos conclui-se que:

- A alta seletividade e estabilidade em solução etanólica / Triton-X100 da cuproína para o cobre apresentou-se como uma das principais virtudes para o sistema espectrofotométrico convencional proposto, porém a baixa solubilidade do reagente e de seus complexos em solução aquosa era um fator limitante na utilização do método, levando-nos a fixar uma proporção mínima de 40% entre a solução etanólica do reagente em relação ao volume final do balão. Qualquer proporção inferior a esta provocava a imediata precipitação do reagente e seus quelatos.
- Apesar dos inúmeros trabalhos já publicados a respeito da cuproína e seus quelatos para Cu(I) e Cu(II), estudos para a melhoria da solubilidade dos mesmos em soluções aquosas é ainda um campo a ser amplamente explorado. Deve-se insistir no uso de outros agentes tensoativos, síntese de derivados mais solúveis (como ocorreu com a batocuproína) e o uso de solventes menos tóxicos para a completa eliminação da etapa de extração líquido-líquido ainda muito utilizada em métodos padrões.
- O tensoativo Triton-X100 em presença de etanol não apresentou uma grande influência sobre o espectro do quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ , não apresentando deslocamentos significativo do comprimento de onda de máxima absorvância (de 546 para 545nm) e uma diminuição insignificante na absorvidade molar do mesmo (de  $6,5 \times 10^3$  para  $6,3 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).
- A determinação de cobre é possível, operando-se numa faixa de pH entre 2,4 e 9,0, em presença de uma solução etanólica de cuproína 0,01% (m/v) / Triton-X100 0,05% (v/v), cloreto de hidroxilamina 1% (m/v), tampão ácido acético / acetato de sódio pH 4,8 ( $1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). A reação é imediata e o sistema apresenta uma altíssima seletividade frente à maioria dos metais, porém, como



medida precatória, adicionava-se EDTA, após a formação do complexo, para aumentar ainda mais esta seletividade.

- O quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$  em etanol / Triton–X100, em pH 4,8, apresenta uma alta sensibilidade e seletividade, comparável com outros métodos existentes, como a extração líquido – líquido com neocuproína em  $\text{CHCl}_3$  e posterior análise espectrofotométrica do quelato extraído em  $\text{CH}_3\text{OH}$  ou análise espectrofotométrica direta em solução aquosa com ácido batocuproíno-sulfônico [104].
- Na formação do quelato  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$  a ordem de adição dos reagentes é muito importante, principalmente o redutor, que preferencialmente deve ser adicionado logo após a amostra, e o EDTA, ou outro mascarante qualquer, que deve ser adicionado após a formação do complexo  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+$ .

Nos estudos envolvendo extração, preconcentração e espectrofotometria em fase sólida, podemos destacar os seguintes pontos:

- Observou-se que a determinação de cobre por FI-EFS, utilizando sílica funcionalizada C18 modificada com cuproína, independente da geometria cela (axial ou plana) ou da natureza do eluente (tiouréia – complexante ou  $\text{Fe(III)/HCl}$  – oxidante), apresentou-se como uma boa opção capaz de integrar etapas de reação, retenção e detecção, além da utilização de instrumentação simples e de baixo custo (como celas artesanais e espectrofotômetros de feixes simples). Além disso, vantagens como simplicidade, facilidade de automação e baixos limites de detecção, também foram observados, características estas inerentes à FI-EFS.
- A alta pureza da cuproína comercial representou uma virtude na impregnação do reagente gerando fases modificadas com pouco ou nenhum contaminante e apresentando baixos sinais de branco.
- O sistema cuproína–C18 é reversível, pois, após a retenção e detecção do analito, a regeneração da fase sólida, através da eluição do analito, pôde ser realizada completamente. A regeneração poderia ser realizada de duas formas: (a) com a passagem de solução complexante de tiouréia misturada ao tampão acetato pH 4,8 ou (b) com a passagem da solução ácida de  $\text{Fe(III)}$  pela cela

contendo a fase sólida. Logo após a eluição a fase era lavada com a solução transportadora do tampão acetato pH 4,8. Outro fator a ser considerado é que, tanto com a tiouréia ou com Fe(III), somente o analito era eluído, mantendo a cuproína imobilizada no C18 e permitindo assim a reutilização da fase sólida para várias medidas.

- A cuproína imobilizada em C18 mostrou-se estável quando em contato com a solução da amostra ou com a solução transportadora do tampão acetato pH 4,8. O uso da tiouréia como eluente diminuía a vida útil da fase sólida, formando na mesma um resíduo amarelo que tornava a cela opaca com o passar dos dias, porém o mesmo fenômeno não foi observado para o Fe(III) como eluente. Não se observou lixiviação significativa do reagente impregnado na fase sólida para ambos os eluentes.
- Percebeu-se que a reação do Cu(I) com a cuproína-C18 acontece de maneira rápida. Percebeu-se, ainda, que a velocidade de retenção do Cu(I) dependia de dois fatores: a relação com a vazão do sistema e o empacotamento das celas (seja a cela axial ou seja a cela plana). Se durante o empacotamento houvesse a ocorrência de caminhos preferenciais a reação era lenta ou não acontecia.
- A atenuação do feixe luminoso pela cuproína-C18 não foi alta, permitindo medidas de sinais de absorvância. Tal fato permite a utilização de espectrofotômetros simples, celas artesanais de vidro ou acrílico e permitindo o desenvolvimento de metodologias analíticas de baixo custo.
- A imobilização da cuproína em C18 não alterou a reatividade do quelante conservando a já citada especificidade do reagente para o cobre.
- De um modo geral, o sistema cuproína-C18 mostrou boa sensibilidade, sendo possível ainda ajustar o volume de amostra a ser utilizado com a concentração do analito presente. Maior volume de amostra permite maior sensibilidade. Porém, essa sensibilidade era seriamente afetada pela geometria da cela e pelo eluente utilizado: **(a)** A cela axial (cilíndrica) tendo a tiouréia como eluente, apesar de seus problemas hidrodinâmicos e vazamentos, foi mais sensível ( $LD = 9,9 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) que a mesma configuração e eluente utilizando a cela plana ( $LD = 100 \text{ ng.mL}^{-1}$ ). Essa maior sensibilidade pode ser justificada por uma área

iluminada menor e mais concentrada, além do efeito de lente provocada pela superfície convexa da cela axial. **(b)** Para o estudo da cela plana, observa-se que o sistema eluído com tiouréia é menos sensível ( $LD = 100 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) que o sistema eluído com Fe(III) ( $LD = 55 \text{ ng.mL}^{-1}$ ). Isto pode ser explicado pelo fato da eluição com tiouréia ocorrer numa única etapa onde ocorre uma competição entre dois agentes complexantes para o cobre. Porém, na eluição com Fe(III) / HCl o sistema ocorre em duas etapas: a oxidação do Cu(I) a Cu(II) pelo ferro seguida da eluição com HCl.

- Em qualquer dos três sistemas de FI-EFS estudados fica claro que o sistema  $\text{Cu}(\text{biq})_2^+ - \text{C18}$  necessitou de pequenas quantidades de amostra e reagentes, quando comparado com o mesmo sistema de espectrofotometria convencional. Esse fato é importante não só porque diminui o custo do procedimento, mas também, porque menores quantidades de resíduos químicos são produzidas.

---

## **11 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1 - WEST, P. W.; MACDONALD A. M. G.; WEST, T. S. **Analytical Chemistry**. Nova Iorque: Elsevier Publishing Company, 1963.
- 2 - BURGUER, K. **Organic Reagents in Metal Analysis**. Nova Iorque: Pergamon Press Ltd., 1973. v. 54.
- 3 - OHLWEILER, O. A. **Química Analítica Quantitativa**. 2 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. v. 1, 310 p.
- 4 - SANDELL, E. B. **Colorimetric determination of traces of metals**. 3 ed. Nova Iorque: Interscience Publishers, 1959. v. 3, 437 p.
- 5 - UENO, K.; IMAMURA, T.; CHENG, K. L. **Handbook of Organic Analytical Reagents**. 2 ed. Florida: CRC Press, 1992. p. 393 – 400.
- 6 - KIRK, R. E.; OTHMER, D. F. **Encyclopedia of Chemical Technology**. 3 ed. Nova Iorque: Wiley, 1979. v. 6, 819 p.
- 7 - KIRK, R. E.; OTHMER, D. F. **Encyclopedia of Chemical Technology**. 3 ed. Nova Iorque: Wiley, 1979. v. 7, 97 p.
- 8 - PROCOBRE: INSTITUTO BRASILEIRO DO COBRE. Disponível em <<http://www.procobrebrasil.org>>. Acesso em: 10 jun. 2001
- 9 - ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Porto Alegre: Bookman, 2001.
- 10 - YOUE, J. H. **Organic analytical reagents**. Nova Iorque: J.Wiley & sons, 1941.
- 11 - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS DOENTES DE WILSON. Disponível em <<http://www.doencadewilson.org>>. Acesso em: 10 jun. 2001.
- 12 - EVANGELISTA, J. **Alimentos: um estudo abrangente**. São Paulo: Atheneu, 1994.
- 13 - ACESSA.COM./VIVER. Disponível em: <<http://www.acesa.com/viver/arquivo/nutricao/2003/03/7-Cristina/>>. Acesso em: 03 jul. 2003.
- 14 - FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9 ed. São Paulo: Atheneu, 1999.
- 15 - SNELL, F. D. **Photometric and Fluorimetric Methods of Analysis**. Nova Iorque: Wiley - Interscience, 1978. Parte 1, cap. 5, p. 141 - 273.

- 
- 16 - GEIGER, R. W.; SANDELL, E. B. Copper(II)-dithizone equilibria in water-carbon tetrachloride. **Analytica Chimica Acta**, v. 8, n. 3, p. 197 - 208, 1953.
- 17 - PENDER, H. W. Spectrophotometric determination of copper in titanium and titanium alloys by dithizone extraction. **Analytical Chemistry**, v. 30, n. 12, p. 1915 - 1917, 1958.
- 18 - MARECEK, J.; SINGER, E. Bestimmung von kupfer, quecksilber und silber in reinen uranverbindungen. **Fresenius Zeitschrift fur analytische chemie**, v. 203, n. 5, p. 336 - 339, 1964.
- 19 - JEWSBURY, A. The determination of copper with sodium diethyldithiocarbamate in the presence of nickel and other interfering elements: with particular reference to traces of copper in sodium hydroxide. **The Analyst**, v. 78, p. 363 - 367, 1953.
- 20 - WYATT, P. F. Diethylammonium diethyldithiocarbamate for the separation and determination of small amounts of metals: 1. The successive determination of small amounts of copper, manganese and iron in organic compounds. **The Analyst**, v. 78, p. 656 - 661, 1953.
- 21 - MARTENS, R. I.; GITHENS SR., R. E. Small amounts of copper in dyes and rubber chemicals – colorimetric determination with zinc dibenzylidithiocarbamate. **Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 991 - 993, 1952.
- 22 - PAUL, A. Spectrophotometric estimation of copper(I) using rubeanic acid. **Analytical Chemistry**, v. 35, n. 13, p. 2119, 1963.
- 23 - SANTELLI, R. E.; GALLEGO, M.; VALCÁRCEL, M. Atomic absorption determination of copper in silicate rocks by continuous precipitation preconcentration. **Analytical Chemistry**, v. 61, p. 1427 – 1430, 1989.
- 24 - PEREZ-CID, B.; RIO-SEGADE, S.; BENDICHO, C. Determination of copper in mineral waters from Galicia, Spain, by flame atomic absorption spectrometry using preconcentration with diethyldithiocarbamate loaded on silica gel. **Microchemical Journal**, v. 55, p. 319 – 325, 1997.
- 25 - ARAÚJO, A. N.; COSTA, A. N.; ALONSO-CHAMARRO, A. N. Colorimetric determination of copper in aqueous samples using a flow injection system with a pre-concentration poly(ethylenimine) column. **Talanta**, v. 50, p. 337 – 343, 1999.

- 
- 26 - FERREIRA, S. L. C.; FERREIRA, J. R.; DANTAS, A. F.; LEMOS, V. A.; ARAÚJO, N. M. L.; COSTA, A. C. S. Copper determination in natural water samples by using FAAS after preconcentration onto amberlite XAD-2 loaded with calmagite. **Talanta**, v. 50, p. 1253 – 1259, 2000.
- 27 - FERREIRA, S. L. C.; LEMOS, V. A.; MOREIRA, B. C.; COSTA, A. C. S.; SANTELLI, R. E. An on-line continuous flow system for copper enrichment and determination by flame atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 403, p. 259 – 264, 2000.
- 28 - SCHILT, A. A. **Analytical application of 1,10-phenantroline and related compounds**, Londres: Pergamon Press Ltd., 1969. p. 69 – 101.
- 29 - FORTUNE, W. B.; MELLON, M. G. Determination of iron with o-phenathroline: a spectrophotometric study. **Industrial and Engineering Chemistry: Analytical Edition**, v. 10, n. 2, p. 60 – 64, fev. 1938.
- 30 - MARGERUM, D. W.; BANKS, C. V. Spectrophotometric determination of iron in vanadium, chromium, manganese, nickel, and zinc – 1,10-phenanthroline rate phenomena. **Analytical Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 200 - 202, 1954.
- 31 - HIBBITS, J. O.; DAVIS, W. F.; MENKE, M. R. The determination of iron with 1,10-phenantroline. **Talanta**, v. 8, p. 163 – 164, ago. 1961.
- 32 - SULTAN, S. M.; ABDENNABI, A. M.; SULIMAN, F. E. O. Flow injection colorimetric method for the assay of vitamin C in drug formulations using tris,1-10-phenantroline-iron(III) complex as an oxidant in sulfuric acid media. **Talanta**, v. 41, 127 – 131, 1994.
- 33 - ZAPOROZHETS, O.; GAWER, O.; SUKHAN, V. Determination of Fe(II), Cu(II) and Ag(I) by using silica gel loaded with 1,10-phenantroline. **Talanta**, v. 46, p. 1387 -1394, 1998.
- 34 - KRUMHOLZ, P. Studies on the coordinate bond: 2. Ferrous complexes of alpha-diimines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 75, n. 9, p. 2163 - 2166, 1953.
- 35 - FEIGL, F.; ANGER, V. **Spot tests in inorganic analysis**. 6 ed. Amsterdan: Elsevier, 1972. v. 1, 203 p.

- 
- 36 - WELCHER, F. J. **Organic Analytical Reagents**. 3 ed. Nova Iorque: D. van Nostrand Company, 1955. v. 2.
- 37 - SMITH, G. F. The ferroine, cuproine, and terroine reacting organic analytical reagents. **Analytical Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 1534 – 1538, out 1954
- 38 - WILKINS, D. H.; SCHILT, D. H.; SMITH, G. F. New substituted 1,10-phenanthroline as ferroine and cuproine reacting ligands. **Analytical Chemistry**, v. 27, n.10, p. 1574 – 1575, out 1955.
- 39 - WELCHER, F. J. **Organic Analytical Reagents**. 3 ed. Nova Iorque: D. van Nostrand Company, 1955. v. 3.
- 40 - HOSTE, J. On a new copper specific group. **Analytica Chimica Acta**, v. 4, p. 23 – 37, 1950.
- 41 - HOSTE, J.; EECKHOUT, J.; GILLIS, J. Spectrophotometric determination of copper with cuproine. **Analytica Chimica Acta**, v. 9, p. 263 – 274, 1953.
- 42 - GUEST, R. J. Determination of copper in metallurgical analysis. **Analytical Chemistry**, v. 25, n. 10, p. 1484 – 1486, out. 1953.
- 43 - ELWELL, W. T. A colorimetric method for the determination of copper in alloyed steels with 2,2'-diquinolyl. **The Analyst**, v. 80, p. 508 - 514, 1955.
- 44 - IRVING, H. M. N.; TOMLINSON, W. R. Effect of chromium(III) and of othr ions on the absorptiometric determination of copper with 2,2'-biquinolyl. **Talanta**, v. 15, p. 1267 – 1279, 1968.
- 45 - PFLAUM, R. T.; POPOV, A. I.; GOODSPEED, N. C. Copper(I)–2,2'–biquinoline complex in aqueous dimethylformamide. **Analytical Chemistry**, v. 27, n.2, p. 253 – 255, fev. 1955.
- 46 - SHANAHAN, C. E. A.; JENKINS, R. H. The directe absorptiometric determination of copper in steel and cast iron with 2,2'-biquinolyl. **The Analyst**, v. 86, p. 166 – 171, 1961.
- 47 - CARRERA, M. E.; MOMBERG, A.; TORAL, M. I.; RICHTER, M. I. Polarographic determination of copper after enrichment by adsorption of the 2,2'-biquinoline complex on actvated carbon. **Analytical Letters**, v. 24, p. 83 – 92, 1991.

- 
- 48 - GAO, Z. Q.; IVASKA, A.; LI, P. Determination of trace amounts of copper(I) with a chemically modified carbon paste electrode. **Analytical Sciences**, v. 8, n. 3, p. 337 – 343, jun. 1992.
- 49 - CHUNG, M.; HUANG, C.; HSUNG, H. Y.; CHENG, K. L. Simple on-site tests using XAD resin with immobilized reagent: determination of copper at parts-per-billion and sub-parts-per-billion levels. **Microchemical Journal**, v. 59, p. 462 – 463, 1998.
- 50 - BENALI, B.; FADOUACK, M.; KABOUCHI, B.; CAZEAU-DUBROCA, C. Experimental investigation on the electronic properties of 2,2'-biquinoline. A study by UV-visible spectroscopy. **Journal of Molecular Liquids**, v. 81, p. 159 – 162, 1999.
- 51 - CHOWDHURY, J.; GHOSH, M.; MISRA, T. N. Surface enhanced Raman scattering of 2,2'-biquinoline adsorbed on colloidal silver particles. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 56, p. 2107 – 2115, 2000.
- 52 - SMITH, G. F.; MCCURDY JR, W. H. 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthroline. **Analytical Chemistry**, v. 24, n.2, p. 371 – 373, fev. 1952.
- 53 - GAHLER, A. R. Colorimetric determination of copper with neo-cuproine. **Analytical Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 577 – 579, mar. 1954.
- 54 - FULTON, J. W.; HASTINGS, J. Photometric determination of copper in aluminum and lead-tin solder with neocuproine. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 174 – 175, fev. 1956.
- 55 - LUKE, C. L. A new neocuproine-carbamate spectrophotometric determination of copper. **Analytica Chimica Acta**, v. 32, p. 286 – 287, ago. 1965.
- 56 - LINDSAY, J. W.; PLOCK, C. E. Spectrophotometric determination of copper in plutonium metal with 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline. **Talanta**, v. 16, p. 414 – 416, 1969.
- 57 - YAMAMOTO, Y; KUMAMARO, T; HAYASHI, Y.; YAMAMOTO, M. The spectrophotometric determination of anions by solvent extraction with metal chelate cations: Part I. Spectrophotometric determination of iodide by solvent extraction as bis(neocuproine)copper(I) tri-iodide. **Analytica Chimica Acta**, v. 69, p. 321 – 328, 1974.



- 
- 58 - LARSEN, E. R. Spectrophotometric determination of copper in fertilizer with neocuproine. **Analytical Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1131 – 1132, jul. 1974.
- 59 - BESADA, A. A simple spectrophotometric method for the determination of adrenaline by reaction with copper(II)-neocuproine. **Analytical Letters**, v. 21, n. 10, p. 1855 – 1863, out. 1988.
- 60 - BESADA, A. Analytical use of copper(II)-neocuproine in spectrophotometric determination of hydrazine. **Analytical Letters**, v. 21, n. 10, p. 1917 – 1925, out. 1988.
- 61 - NAGAIHIRO, T.; UESUGI, K. Preconcentration of copper by a column method using neocuproine and tetraphenylborate supported on naphthalene. **Journal of Analytical Chemistry of the URSS**, v. 44, n. 12, parte 1, p. 1727 – 1730, dez. 1989.
- 62 - ITABASHI, H.; UMETSU, K.; SATOH, K.; KAWASHIMA, T. Indirect spectrophotometric determination of vanadium(IV) by flow injection analysis based on the redox reaction with copper(II) in the presence of neocuproine. **Analytical Letters**, v. 24, n.7, p. 1219 – 1230, jul. 1991.
- 63 - ITABASHI, H.; UMETSU, K.; TESHIMA, N.; SATOH, K.; KAWASHIMA, T. Indirect spectrophotometric determination of complexing agents by flow-injection analysis based on redox reaction of copper(II) with iron (II). **Analytica Chimica Acta**, v. 261, p. 213 – 218, 1992.
- 64 - TÜTEM, E.; APAK, R; GÜNAYDI, E.; SÖZGEN, K. Spectrophotometric determination of vitamin E ( $\alpha$  - tocopherol) using copper(II)-neocuproine reagent. **Talanta**, v. 44, p. 249 – 255, 1997.
- 65 - AL-OBAID, A. M.; AL-TAMRAH, A. M.; ALY, F. A.; ALWARTHAN, A. A. Determination of (S)( – )-cathione by spectrophotometric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 321 – 326, 1998.
- 66 - YAMINI, Y.; TAMADDON, A. Solid-phase extraction and spectrophotometric determination of trace amounts of copper in water samples. **Talanta**, v. 49, p. 119 – 124, 1999.

- 
- 67 - ARAÚJO, A. N.; LIMA, J. L. F. C.; RANGEL, A. O. S. S.; SEGUNDO, M. A. Sequential injection system for the spectrophotometric determination of reducing sugars in wines. **Talanta**, v. 52, p. 59 – 66, 2000.
- 68 - CHATTARAJ, S.; DAS, A. K. Indirect atomic-absorption spectrometric determination of sulfate in human blood-serum. **The Analyst**, v. 117, n. 3, p. 413 – 416, mar 1992.
- 69 - TROJANOWICZ, M.; ALEXANDER, P. W.; HIBBERT, D. B. Flow-injection potentiometric determination of free cadmium ions with a cadmium ion-selective electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 370, p. 267 – 278, 1998.
- 70 - NOMURA, T.; SATO, A. Adsorptive determination of copper(II) in solution as a ion-pair of bisneocuproinecopper(I) and dodecylsulfate ions on an electrode-separated piezoelectric quartz crystal. **Analytica Chimica Acta**, v. 374, p. 291 – 296, 1998.
- 71 - STEFAN, R.; DRAGHICI, I.; BAIULESCU, G. Determination of urinary oxalate using oxalate-selective membrane electrodes. **Sensors and Actuators B**, v. 65, p. 250 – 252, 2000.
- 72 - CHERNYSH, V. V.; PROSKURNIN, M. A.; DZYABCHENKO, A. A.; IVANOVA, E. K. Determination of copper with neocuproine by thermal-lens spectrometry. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 55, n.4, p. 338 – 343, abr. 2000.
- 73 - HIGH, B.; BRUCE, D.; RICHTER, M. M. Determining copper ions in water using electrochemiluminescence. **Analytica Chimica Acta**, v. 449, p. 17 – 22, 2001.
- 74 - SMITH, G. F.; WILKINS, D. H. New colorimetric reagent specific for copper, **Analytical Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 510 – 511, mar. 1953.
- 75 - BORCHARDT, L. G.; BUTLER, J. P. Determination of trace amounts of copper. **Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 414 – 419, mar. 1957.
- 76 - BLAIR, D.; DIEHL, H. Bathophenanthrolinedisulphonic acid and bathocuproinedisulphonic acid, water soluble reagents for iron and copper. **Talanta**, v. 7, n. 3 - 4, p. 163 - 174, fev. 1961.

- 
- 77 - PENNER, E. M.; INMAN, E. M. Determination of copper in high-purity niobium, tantalum, molybdenum and tungsten metals with bathocuproine. **Talanta**, v. 10, p. 407 – 412, 1963.
- 78 - HULTHE, P. A bathocuproine reagent-paper for the rapid semi-quantitative determination of copper in the 1 to 70 ppm range. **The Analyst**, v. 95, p. 351 – 355, abr. 1970.
- 79 - SÁNCHEZ-RASERO, F. Stoichiometry, Ringbom optimal range, and other parameters for the copper(I)-bathocuproine complex. **Microchemical Journal**, v. 26, p. 418 – 425, 1981.
- 80 - MOFFETT, J. W.; ZIKA, R. G.; PETASNE, R. G. Evaluation of bathocuproine for the spectrophotometric determination of copper (I) in copper redox studies with applications in studies of natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 175, p. 171 – 179, 1985.
- 81 - SAITO, T. Sensing of trace copper ion by a solid phase extraction-spectrophotometry using a poly(vinyl chloride) membrane containing bathocuproine. **Talanta**, v. 41, n. 5, p. 811 – 815, 1994.
- 82 - GLAZEWSKI, R.; MORRISON, G. M. Copper(I)/copper(II) reactions in an urban river. **The Science of the Total Environment**, v. 189/190, p. 327 – 333, 1996.
- 83 - TORAL, M. I.; RICTER, P.; RODRÍGUEZ, C. Simultaneous determination of copper and iron by second derivative spectrophotometry using mixtures of ligands. **Talanta**, v. 45, p. 147 – 153, 1997.
- 84 - BJÖRKLUND, L. B.; MORRISON, G. M. Determination of copper speciation in freshwater samples through SPE-spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 343, p. 259 – 266, 1997.
- 85 - PEREIRA, A. V.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in pharmaceutical formulations with on-line solid-phase reactor containing copper (II) phosphate. **Analytica Chimica Acta**, v. 366, p. 55 – 62, 1998.
- 86 - ERVIN, A. M.; EWING, K. J.; NAU, G.; ROWLEY, D. A.; LAMONTAGNE, R. A.; AGGARWAL, I. D. Investigation of a robust flow-through Cu(I) optical sensor using

---

2,9-dimethyl-4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline immobilized into a Nafion film. **Sensors and Actuators B**, v. 53, p. 104 – 110, 1998.

87 - FRITZ, J. S. **Analytical solid-phase extraction**. Nova Iorque: Wiley-VCH, 2000.

88 - THURMAN, E. M.; MILLS, M. S. **Solid-phase extraction: principles and practice**. Nova Iorque: John Wiley and Sons, 1998.

89 - KING, D. W.; LIN, J.; KESTER, R. Spectrophotometric determination of iron(II) in a seawater at nanomolar concentrations. **Analytica Chimica Acta**, v. 247, p. 125 – 132, 1991.

90 - MAKSIMOVA, I. M.; MOROSANOVA, E. I. Adsorption of cobalt(II) on hydrophobic C<sub>16</sub> silica gels modified with 1-nitroso-2-naphthol and its use for simultaneous determination of cobalt(II) and nickel(II) in flow analytical systems. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 49, n. 06, p. 543 – 547, 1994.

91 - MAKSIMOVA, I. M.; KUKHTO, A. A.; MOROSANOVA, E. I.; KUZ'MIN, N. M.; ZOLOTOV, Y. A. Determination of cobalt(II) and iron (III) by means of indicator tubes with organic reagents fixed on hydrophobic supports. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 628 – 631, 1994.

92 - FRENZEL, W.; KREKLER, S. Spectrophotometric determination of total phenolics by solvent extraction and sorbent extraction optosensing using flow injection methodology. **Analytica Chimica Acta**, v. 310, p. 437 – 446, 1995

93 - LIU, X.; FANG, Z. Flame atomic absorption spectrometric determination of cobalt in biological materials using a flow-injection system with on-line preconcentration by ion-pair adsorption. **Analytica Chimica Acta**, v. 316, p. 329 – 335, 1995.

94 - LIMA, R.; LEANDRO, K. C.; SANTELLI, R. C. Lead preconcentration onto C-18 minicolumn in continuous flow and its determination in biological and vegetable samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 43, p. 977 – 983, 1996.

95 - GONG, Z.; ZHANG, Z. An optosensor for riboflavin with C<sub>18</sub> silica gel as a substrate. **Analytica Chimica Acta**, v. 339, p. 161 – 165, 1997.

- 
- 96 - CUCULIĆ, V.; MLAKAR, M.; BRANICA, M. Synergetic adsorption of the copper(II) mixed ligand complex onto the SEP-PAK C<sub>18</sub> column. **Analytica Chimica Acta**, v. 339, p. 181-186, 1997
- 97 - TIKHOMIROVA, T. I.; FADEEVA, V. I. Preconcentration of copper(II) and arsenic (III) diethyldithiocarbamates on silica chemically modified with hexadecyl groups. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 52, n. 03, p. 203 – 205, 1997.
- 98 - GONG, Z.; ZHANG, Z.; YANG, X. Optosensor for cinchona alkaloids with C<sub>18</sub> silica gel as a substrate. **The Analyst**, v. 122, p. 283 – 285, mar. 1997.
- 99 - AKATSUKA, K.; SUZUKI, T.; NOBUYAMA, N.; HOSHI, S.; HARAGUCHI, K.; NAKAGAWA, K.; OGATA, T.; KATO, T. Determination of trace elements in sea-water by inductively coupled plasma mass spectrometry after preconcentration by formation of water-soluble complexes and their adsorption on C<sub>18</sub>-bonded silica gel. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 13, p. 271 – 275, abr 1998.
- 100 - TEIXEIRA, L. S. G.; ROCHA, F. R. P.; KORN, M.; REIS, B. F.; FERREIRA, S. L. C.; COSTA, A. C. S. Flow-injection solid-phase spectrophotometry for the determination of zinc in pharmaceutical preparations **Analytica Chimica Acta**, v. 383, p. 309 – 315, 1999.
- 101 - REIS, B. F.; ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G.; COSTA, A. C. S.; KORN, M. Construção de uma cela de fluxo para medidas por espectrofotometria em fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 116 – 118, jan. 2000.
- 102 - TEIXEIRA, L. S. G.; COSTA, A. C. S.; ASSIS, J. C. R.; FERREIRA, S. L. C.; KORN, M. Solid phase spectrophotometry for the determination of cobalt in pharmaceutical preparations. **Mikrochimika Acta**, v. 137, p. 29 – 33, 2001.
- 103 - Am. Soc. Testing Materials ASTM Methods for Chemical Analysis of Metals (1956)
- 104 - **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19 ed. Nova Iorque: American Public Association, 1992. 191 p.
- 105 - MILLER, R. J. C.; MILLER, J. N. **Statistics for Analytical Chemistry**. 2 ed. Nova Iorque: Halsted Press, 1989.

- 
- 106 - CURRIE, L. A. Nomenclatures in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995), **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 105 – 126, 1999.
- 107 - MACHADO, M. J. DO C.; FERREIRA, M. A. A. **Números ou Resultados Analíticos: Qual a Fronteira - Estudos, Notas e Trabalhos**. Tomo 39. Instituto Geológico e Mineiro. Versão Online no site do IGM <[http://www.igm.pt/edicoes\\_online/estudos/tomo39/artigo8.htm](http://www.igm.pt/edicoes_online/estudos/tomo39/artigo8.htm)>, 1997.
- 108 - BORGES, M. **Extratibilidade do cádmio: influência de atributos de solos muito intemperizados em extratores convencionais e potencialidade de ácidos orgânicos de baixo peso molecular**. 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, jan. 2002.
- 109 - YOSHIMURA, K.; WAKI, H.; Ion-exchange phase absorptiometry for trace analysis. **Talanta**, v. 32, n. 5, p. 345 – 352, 1985.
- 110 - BRYKINA, G. D.; MARCHENKO, D. Y.; SHPIGUN, O. A.; Solid-phase spectrophotometry. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 50, n. 5, p. 440 – 446, 1995.
- 111 - TEIXEIRA, L. S. G. **Aplicações de 1-2-(tiazolilazo)-2-naftol imobilizado em sílica funcionalizada C18 em espectrofotometria em fase sólida**. 148 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, nov.2000.
- 112 - LIU, R. M.; LIU, D. J.; SUN, A. L.; Application of ion-exchange-resin phase spectrophotometry to flow-injection analysis system: 1. Determination of trace zinc in hair of children. **Talanta**, v. 40, n. 3, p. 381 - 384, mar. 1993.
- 113 - OHLWEILER, O. A. **Química Analítica Quantitativa**. 2 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. v. 3, p. 708.
- 114 - OLIVEIRA, P. C. C.; GOUVEIA, V. J. P.; MASINI, J. C. Construção e aplicação de uma cela espectrofotométrica de camada delgada para análises em fluxos. **Química Nova**; v. 24; n. 3, p. 399 – 403, mar. 2001.