UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

IVANILSON VIEIRA SOUZA JUNIOR

Um novo método para determinação de cobalto em amostras de águas e medicamentos empregando a microextração líquido-líquido dispersiva e a análise de imagem digital

> JEQUIÉ – BA JULHO / 2019

IVANILSON VIEIRA SOUZA JUNIOR

Um novo método para determinação de cobalto em amostras de águas e medicamentos empregando a microextração líquido-líquido dispersiva e a análise de imagem digital

> Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica Orientador: Valfredo Azevedo Lemos

JEQUIÉ – BA JULHO / 2019

S725n Souza Junior, Ivanilson Vieira. Um novo método para determinação de cobalto em amostras de águas e medicamentos empregando a microextração líquido-líquido dispersiva e a análise de imagem digital / Ivanilson Vieira Souza Junior.- Jequié, 2019. 48f.
(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos)
1.Colorimetria 2.Imagem Digital 3.Cobalto I.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária - UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO

IVANILSON VIEIRA SOUZA JUNIOR

"Um novo método para determinação de cobalto em amostras de águas e medicamentos empregando microextração líquido-líquido dispersiva e análise de imagem digital"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos - Orientador (UFBA, Salvador - BA, 2001)

Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos (UFBA, Salvador - BA, 2004) Prof. Dr. Clarivaldo Santos de Sousa (UFBA, Salvador - BA, 2004)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em <u>26</u> / <u>0</u> / <u>2019</u>

Dedico este trabalho à Deus, aos meus familiares, em especial minha esposa, amigos e alunos e a todos os professores que foram responsáveis pela minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me oportunizar a realização de mais um sonho, o mestrado em Química Analítica pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Me sinto privilegiado em fazer parte desse programa de pós-graduação.

A todos os meus familiares, meus pais Ivanilson Vieira Souza e Clemilda Ribeiro Souza pelo apoio concedido ao longo da minha vida acadêmica. Minha irmã Vanessa Ribeiro Souza.

A Rafaella do Santos Andrade, minha esposa, por estar sempre ao lado nesse período de realização do mestrado.

Ao professor Valfredo Azevedo Lemos por exercer a docência e pesquisa com excelência, de modo a nos fazer amar à Química. E por contribuir de forma bastante significativa na minha formação e apoiar concedendo as orientações necessárias ao exercício da pesquisa.

Aos professores Djalma Menezes de Oliveira, Cléber Galvão Novaes e Marcos de Almeida Bezerra pelo apoio dado, sobretudo as aulas ministradas, na pósgraduação, nas suas respectivas áreas de atuação.

A todos os colegas do laboratório que compartilham os momentos de realização das atividades, em especial Luana Bastos, Jeferson Barreto, Leane Nunes, Rebeca Moraes.

A todos os colegas alunos do mestrado.

Aos amigos que sempre me apoiaram e me incentivaram a ingressar no curso superior e dar prosseguimento nos estudos, ingressando em programas de pósgraduação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa e a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia por proporcionar o ingresso no ensino superior, graduação e incentivo para cursar o mestrado.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização desse sonho.

"Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento;"

Provérbios 3:13

"Porque melhor é a sabedoria do que os rubis; e tudo o que mais se deseja não se pode comparar com ela." **Provérbios 8:11**

> Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e o mais ele fará. Salmos 37:5

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1: Superfície de resposta e curvas de níveis de (a) VSD \times pH, (b) VSE \times pH
e (c) VSD × VSE da matriz Doehlert com três variáveis do sistema de pré-
concentração de Co (II)16
Figura 4.2: Valores observados versus valores preditos obtidos através da matriz de
Doehlert com três variáveis para a determinação de Co (II)17
Figura 4.3: Imagens geradas para o processo de construção da curva de calibração
do cobalto, a partir da diluição do padrão18
Figura 4.4: Curvas de calibração obtidas para o Co (II) usando valores de absorbância
no vermelho (a), verde (b) e azul (c)21

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Matriz de Doehlert para três variáveis.	15
Tabela 4.2: Valores críticos, mínimo e máximo obtidos da matriz de Doehlert	17
Tabela 4.3: Média dos sinais de cada componente RGB gerados no ImageJ	19
Tabela 4.4: Média dos valores de absorvância usados para construção da cur	va
analítica	20
Tabela 4.5: Repetibilidade dos valores de absorvância para 40 µg L ⁻¹ de Co (II)	23
Tabela 4.6: Estudo da reprodutibilidade dos valores de absorvância para 20 μ g L ⁻¹	de
Co (II)	23
Tabela 4.7: Parâmetros analíticos para o método proposto.	24
Tabela 4.8: Estudo de alguns íons interferentes na determinação Co (II) em água	as.
	24
Tabela 4.9: Determinação do teor de cobalto em CRM e amostras de água e vitami	na
B12, com intervalo de confiança de 95%	26
Tabela 4.10: Determinação do teor de cobalto em vitamina B12, com intervalo	de
confiança de 95%	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica; (Do inglês atomic		
	absorption spectrometer		
ABS	Absorvância		
BCR	Community Bureau Reference		
DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva; (Do inglês:		
	dispersive liquid-liquid microextraction)		
DIC	Colorimetria de Imagem Digital		
DPR	Desvio Padrão Relativo		
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama; (Do inglês:		
	Flame atomic absorption spectrometer)		
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite; (Do		
	inglês: graphite furnace atomic absorption spectrometer)		
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma com plasma		
	indutivamente acoplado; (Do inglês; Inductively coupled plasma		
	mass spectrometry)		
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente		
	acoplado; (Do inglês: Inductively Coupled Plasma Optical		
	Emission Spectrometry)		
LD	Limite de Detecção		
LED	Diodo Emissor de Luz; (Do inglês: Emitting Diode)		
LLE	Extração Líquido-Líquido; (Do inglês: Liquid–liquid extraction)		
LQ	Limite de Quantificação		
MCR	Material de Referência Certificado		
MDF	Placa de Fibra de Média Densidade; (Do inglês: Medium-		
	Density Fiberboard)		
ROI	Região de Interesse; (Do inglês: Region Of Interest)		
RSM	Metodologia da Superfície de Resposta		
TAC	2-(2-tiazolilazo)-p-cresol		
VSD	Volume do Solvente Dispersor		
VSE	Volume do Solvente Extrator		

Um novo método para determinação de cobalto em amostras de águas e medicamentos empregando a microextração líquido-líquido dispersiva e a análise de imagem digital

Autor: Ivanilson Vieira Souza Junior Orientador: Valfredo Azevedo Lemos

RESUMO

Neste trabalho, foi desenvolvido um método para determinação cobalto em amostras de água e medicamento utilizando a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e a Colorimetria de Imagem Digital (DIC). O analito foi complexado utilizando o reagente quelante 2-(2-tiazolilazo)-p-cresol (TAC) e pré-concentrado com a mistura tricloroetileno e etanol. As condições ótimas de trabalho foram obtidas através da otimização multivariada, empregando a matriz de Doehlert para três variáveis. Os valores ótimos encontrados para pH, volume do solvente dispersor e volume do solvente extrator foram, respectivamente, 7,48, 648 µL e 48 µL. As imagens foram capturas com um microscópio portátil e os sinais RGB foram adquiridos e processados no sofware *ImageJ*. O canal R (vermelho) apresentou maior sensibilidade, sendo usado como parâmetro na obtenção das respostas analíticas. Nas condições ótimas de trabalho, o método apresentou limite de detecção de 1,77 µg L⁻¹, limite de quantificação 5,35 µg L⁻¹ e o desvio padrão relativo (DPR) precisão foi de 4,1%. O método proposto foi aplicado em amostras de água e vitamina B12, a exatidão foi avaliada pela determinação de cobalto em material de referência certificado BCR 397.

Palavras-Chave: Colorimetria, Imagem Digital, Cobalto.

A new method for the determination of cobalt level in water samples and drugs employing dispersive liquid-liquid microextraction and digital image analysis

Author: Ivanilson Vieira Souza Junior Advisor: Valfredo Azevedo Lemos

Abstract

In this work, a method for cobalt determination in water and drug samples was developed using dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and Digital Image Colorimetry (DIC). The analyte was complexed using 2- (2-thiazolylazo) -p-cresol chelating reagent (TAC) and preconcentrated with the mixture trichlorethylene and ethanol. Optimal working conditions were obtained through multivariate optimization using the Doehlert matrix for three variables. The optimum values found for pH, dispersing solvent volume and extracting solvent volume were, respectively, 7.48, 648 μ L and 48 μ L. The images were captured with a portable microscope and the RGB signals were acquired and processed in ImageJ software. The R channel (red) presented higher sensitivity, being used as a parameter to obtain the analytical responses. Under optimal working conditions, the method had a detection limit of 1.77 μ g L-1, a quantitation limit of 5.35 μ g L-1 and the relative standard deviation (DPR) accuracy was 4.1%. The proposed method was applied to water and vitamin B12 samples, accuracy was assessed by cobalt determination in BCR 397 certified reference material.

Keywords: Colorimetry, Digital Image, Cobalt.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Cobalto	1
1.2. Microextração líquido-líquido dispersiva	2
1.3. Imagem digital	3
2. OBJETIVOS	7
2.1. Objetivo geral	7
2.2. Objetivos específicos	7
3. PARTE EXPERIMENTAL	8
3.1. Reagentes e soluções	8
3.2. Instrumentação	8
3.3. Procedimento para pré-concentração	9
3.4. Obtenção das imagens e avaliação de dados RGB	10
3.5. Otimização das condições experimentais do método analítico	12
3.6. Preparo de amostras	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1. Otimização do procedimento	14
4.2. Características analíticas do método	18
4.2.1. Curvas analíticas	18
4.2.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	21
4.2.3. Precisão	22
4.3. Estudo de interferentes	24
4.4. Aplicação do método	25
5. CONCLUSÕES	27
6. REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cobalto

O elemento químico cobalto é um metal de transição localizado no grupo 9 da tabela periódica. O Co corresponde a cerca de 23 ppm em peso em relação a costa terrestre, sendo, portanto, pouco abundante. Os principais minérios de obtenção são a cobaltita (CoAsS), esmaltita (CoAs₂), eritrita (Co₃(AsO₄)₂.8H₂O) e linneíta (Co₃S₄) [1, 2]. Ele é identificado na natureza associado a outros metais sobretudo níquel, cobre e chumbo. Foi isolado pela primeira vez em 1735, por meio da esmaltita, pelo químico sueco Georg Brandt (1694-1768) [1].

O cobalto tem sido utilizando mundialmente para finalidades variadas, entre elas destacam-se: fabricação de ligas metálicas usadas na produção de turbinas a jato, na produção de aços rápidos usados na confecção de ferramentas de corte, na fabricação de pigmentos para indústria de cerâmica, vidros e tintas e no tratamento radioterápico de tumores cancerígeno a partir do isótopo radioativo ⁶⁰Co [2].

Nos seres vivos o Co está presente em algumas enzimas e na estrutura química da vitamina B12 (cianocobalamina) [3], influenciando na funcionalidade de vitaminas, entre elas, a C (ácido ascórbico) e B12 [4]. Sendo, também, elemento traço fundamental encontradas nos tecidos do corpo. Em concentração relativamente maiores, são encontradas no fígado associado a vitamina B12 obtida a partir da dieta de alimentos de origem animal e posterior síntese por microrganismos [3]. Esse metal possui importância vital ao corpo humano, visto que desempenha biologicamente influência sobre a formação do sangue, síntese hormonais, hemoglobina, neurotransmissores, ácidos biliares e DNA [4].

Por outro lado, o cobalto caracteriza-se por possuir duas faixas de exposição que são nocivas aos seres vivos. Tanto deficiência na concentração de Co no organismo quanto o excesso podem causar doenças ou até mesmo a morte [3, 5]. A deficiência pode gerar, entre outras doenças, anemia perniciosa [4, 6, 7]. Portanto, o monitoramento da quantidade de cobalto em fluidos corporais é de suma importância para evitar deficiências nutricionais, além do risco de intoxicação associado a exposição em concentrações elevadas [4, 8].

A contaminação pela exposição em concentrações acima do tolerável pelos organismos vivos pode gerar problemas: no trato respiratório, pele, sistema cardíaco

e glândula tireoide [6]. A toxicidade nos seres humanos pode desencadear doenças como vasodilatação, rubor e cardiomiopatia [4]. Além de evidências da atividade genotóxica e carcinogênica associada ao Co [6, 9]. Estudos, a partir de testes com roedores, apontam que tanto a forma solúvel quanto a insolúvel de compostos de cobalto podem ser carcinogênicas após a exposição por inalação, bem como alterações hormonais e intracelulares [10, 11]. A citotoxicidade e genotoxicidade, também, tem sido estudada a partir de nanopartículas de cobalto (Co-nano) e íons cobalto (Co²⁺) [9, 12]. Um estudo recente identificou os metais pesados arsênico, cromo, cobalto, chumbo e níquel, como contaminantes em pesticidas, considerando e avaliando sua toxicidade [13].

Métodos analíticos para determinar Co em quantidade traço tem sido desenvolvidos para quantificar a concentração do metal em matrizes variadas, a partir de diferentes métodos analíticos. Nesse sentido, emerge a necessidade em otimizar técnicas já existentes, bem como propor novos métodos de detecção considerando-se o baixo custo, exatidão, precisão, rapidez, robustez, seletividade e sensibilidade.

1.2. Microextração líquido-líquido dispersiva

Na busca por maior sensibilidade na determinação de elementos traço, métodos de pré-concentração tem sido largamente utilizados [14]. O cobalto, e outros metais de transição, tem sido pré-concentrado usando as seguintes técnicas: extração líquido-líquido, microextração líquido-líquido dispersiva, extração em fase sólida, coprecipitação, flotação e extração de ponto de nuvem [7, 15, 16]. Os principais fatores que restringem a quantificação de íons metálicos em limite de detecção adequado, estão associados a baixa concentração do analito e interferências de matriz [8], [14].

A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), apresentada em 2006 por Assadi e colaboradores [4], tem como principais vantagens a: simplicidade, uso reduzido de solventes orgânicos perigosos, baixo custo, rapidez, altas recuperações e fatores de enriquecimento [4, 8, 17]. Tornando-se uma das técnicas mais utilizadas em microextração em fase líquida. Analitos de natureza química variada tem sido préconcentrados de forma eficiente, entre eles compostos orgânicos presentes em pesticidas, amina biogénica e íons metálicos em matrizes diversas [4]. A DLLME fundamenta-se na diferença de polaridade e solubilidade entre solventes que formam um sistema ternário. Esse sistema é constituído por um solvente imiscível em água (extrator), um solvente miscível em água (dispersor) e a solução aquosa contendo o analito [4]. Injeta-se, através de uma seringa, uma mistura contendo o solvente extrator e o solvente dispersor na solução aquosa de interesse, instantaneamente uma emulsão estável é formada contendo microgotículas do extrator disperso na solução, aumentando superfície de contato entre as fases [8]. O analito é transferido para a fase extrativa devido à baixa tensão superficial entre as fases [15]. A solução turva formada é, na maioria dos casos, centrifugada para separação das fases: aquosa e enriquecida, por fim, o analito é quantificado na fase sedimentada [4, 8, 15, 17].

1.3. Imagem digital

Procedimentos analíticos para determinação de Cobalto em amostras naturais tradicionalmente são realizados por meio dos métodos espectrométricos. Entre as principais técnicas de análise quantitativa destacam-se: espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), espectroscopia de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), espectrometria de massa de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) [7, 16, 17] e espectrofotometria UV-Vis [17]. A espectrometria de absorção atômica (AAS) e o ICP-OES tem sido bastante utilizados como método sensível e seletivo para quantificar íons metálicos, entre eles cobalto [4].

Entretanto, esses métodos, nem sempre possuem sensibilidade suficiente para quantificar baixas concentrações do analito presente na amostra [7, 18], sendo necessário a pré-concentração o analito [8] e uso de equipamentos analíticos modernos que nem sempre estão à disposição do pesquisador ou da instituição de ensino. Fatores que estão associados ao custo relativamente alto de aquisição e manutenção, dificuldades operacionais, necessidade de instrumentos robustos e sofisticados [4, 19-21]. S. Bahar et. al [8] determinou traços de Co (II) em materiais naturais pré-concentrando o analito por DLLME e detecção pelo FAAS, obtendo limite de detecção de 5,6 µg L⁻¹.

Nessa perspectiva, cresce a demanda por técnicas que utilizem instrumentação acessível, simples, preciso e de baixo custo que atendam a necessidade e mantenha a confiabilidade analítica. A colorimetria de imagem digital (DIC) vem ganhando

destaque nos últimos anos por apresentar essas características [18, 22-25]. Ferramentas computacionais tais como scanner, câmera digital, smartphone, computador tablet e webcam tem sido propostas [18-22, 26], associadas a softwares que permite o tratamento e manipulação dos dados [20]. Os softwares *ImageJ* e *Matlab* tem sido proposto para efetuar o processamento das imagens e obtenção da intensidade das cores [27].

Composta por uma matriz de X linhas e Y colunas, a imagem é o resultado da combinação de um número finito e inteiro de pontos, definido como pixeis. A posição e cor de cada ponto dessa matriz vai estar associada a cada pixel. Uma imagem é classificada basicamente como binária, escala de cinza, RGB e indexada, dependendo da maneira como a informação é organizada numericamente na matriz de formação dos pixeis [28].

A imagem RGB é constituída por uma matriz de pixeis ($m \times n \times 3$) que vão gerar 24 bits, onde cada elemento contribui, logicamente, com 8 bits. A combinação entre as cores vermelho (red, R), verde (green, G) e azul (blue, B) no plano resulta na cor de cada pixel [28]. O modelo RGB é representado por sistema de coordenadas cartesianas composto por três cores primárias (vermelho, verde e azul) que estão em três eixos perpendiculares, três cores secundárias (ciano, magenta e amarelo) em três eixos distintos, o preto na origem do plano e o branco no lado totalmente oposto ao preto [23, 28]. Essa ideia comumente é representada pelo cubo RGB em 3D [28]. Por convenção, a imagem colorida é constituída por três canais de cores primárias (RGB) tendo (0-255) pixels de valores unitários que variam de acordo a tonalidade, que visualmente observa-se pela mudança na coloração [20]. Basicamente, todo espectro eletromagnético na região do visível pode ser representado por esse sistema tricomático [29].

Para obtenção precisa das imagens, parâmetros como fonte de luz da iluminação, refletância do objeto e características da câmera devem ser ajustados, visto que são determinantes na confiabilidade dos valores das respostas RGB [29]. Nesse sentido, as fotos devem ser tiradas em condições fixas, iluminação uniforme, adequação do objeto de referência e seleção de regiões fixas de respostas [18, 29]. Após aquisição e processamento das imagens, a concentração do analito é obtida pela conversão das intensidades proveniente das cores vermelha, verde e azul em absorbância [26] a partir da curva calibração.

Nessa pesquisa, utilizou-se o espaço de cor RGB na obtenção das cores e suas respectivas intensidades, seguida do processamento pelo software *ImageJ* e posterior aplicação da DIC na quantificação de cobalto (II) em águas. As confiabilidades analíticas dos dados de um número considerável de artigos publicados foram determinantes na escolha desse sistema de cores. O modelo RGB é classificado como mais amplo e cientificamente aceito [29].

No campo quimiométrico das ciências analíticas várias pesquisas têm sido propostas aplicando a DIC como método de detecção. Firdaus et al. [30] fizeram a determinação quantitativa de cromo e ferro e validação por espectrofotometria no UVvisível com precisão do método melhor do que 2,5%. Barros et al. [26] determinou alumínio, ferro, nitrito e fósforo em águas por DIC com limites de detecção adequado a legislação brasileira de água potável, eles usaram uma webcam para aquisição das fotos e destacaram a simplicidade, versatilidade e baixo custo do procedimento. Lima et al. [18] propôs a determinação de cloro residual em águas a partir da pré-concentração do analito por LLE e DLLME, seguida da aquisição direta da imagem digital em um tubo cônico contendo o extrato da amostra, obtendo um limite de detecção igual a 2,6 µg L⁻¹. Kearns et al. [31] fizeram um estudo que sugere a DIC para determinação de arsênio usando o AgNO3 como reagente ao invés do HgBr2 nos kits de teste de campo comumente utilizados no mundo para determinar arsênio em águas, tendo em vista a toxidade do mercúrio. Os resultados indicaram a possibilidade de obter precisamente concentrações de 0, 5, 10, 15 e 50 μ g L⁻¹ no nível de confiança de 95%. Asano et al. [32] desenvolveu, usando uma impressora 3D, um dispositivo analítico baseado em papel microfluídico para quantificar cromo hexavalente em amostras de água, o 1,5difenilcarbazida foi usado como reagente complexante. A intensidade de cor verde apresentou maior sensibilidade entre o conjunto RGB, com um limite de detecção de 30 ppm. Neto et al. [22] propôs a especiação de ferro em vinho branco por DIC, tendo como princípio a reação colorimétrica entre o ferro (II) e a 1,2 orto-fenantrolina, obtendo sensibilidade compatível com a concentração do analito na matriz.

Nesse trabalho, uma nova metodologia de determinação de Co (II) em águas e vitamina B12 é desenvolvida. Primeiramente, é feita a otimização multivariada a partir de ferramentas quimiométricas para obtenção dos valores ótimos de pH e quantidade de solventes utilizados na pré-concentração do analito por DLLME. A partir da reação colorimétrica dos íons Co (II) com o reagente complexante 2-(2-tiazolilazo)-p-cresol

(TAC), o metal foi quantificado por colorimetria de imagem digital, usando um microscópio portátil para obtenção das imagens.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Propor uma nova metodologia analítica baseada em colorimetria de imagem digital para determinação de traços de cobalto em amostras de água e vitamina B12.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver um método de baixo custo e de instrumentação simples para determinar cobalto em águas;
- Utilizar a colorimetria de imagem digital associada a microextração líquidolíquido para quantificar traços de cobalto;
- Validar o método proposto através da determinação de cobalto em amostra de material certificado;
- Aplicar o método proposto para quantificar cobalto em vitamina B12 e comparar com a determinação pelo F AAS;

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e soluções

Os procedimentos experimentais relacionados ao preparo de soluções e higienização de vidrarias foram executados com água desionizada ultrapura obtida através do sistema Elga modelo Purelab Classic. Os reagentes utilizados para o procedimento da microextração líquido-líquido dispersiva foram o etanol e tricloroetileno. O cobalto foi pré-concentrado usando a solução alcoólica do 2-(2-tiazolilazo)-p-cresol (TAC) 0,015% (m/v), como reagente complexante. Todos os reagentes foram do tipo comercial Sigma-Aldrich.

A solução aquosa usada para descontaminação das vidrarias foi o ácido nítrico a 10 % (v/v). O pH das soluções contendo o analito, foram ajustados com o tampão borato de sódio preparado com 38,13 g do soluto em 1000 ml água desionizada ultrapura, com faixa de trabalho entre 7,0 e 8,5 ajustado com HCl 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 0,1 mol L⁻¹. O tampão amoniacal (pH de 9 a 11) e acetato de sódio (pH 5 e 6) também foram empregados no estudo de pH no procedimento da otimização. Após essa etapa, apenas o tampão borato de sódio pH 7,5 foi aplicado nas análises experimentais desenvolvidas nesse estudo. Todos os ácidos utilizados foram MERCK.

As amostras de água analisadas foram coletadas no Rio das Contas a montante e a jusante da cidade de Jequié-Ba. A vitamina B12 foi adquirida em uma loja de produtos naturais, em forma de capsulas de 240 mg. O material de referência certificado de cabelo humano (MCR 397), advindo da Community Bureau Reference (BCR) foi empregado para avaliar a exatidão.

3.2. Instrumentação

A centrífuga de rotação fixa de 3500 rpm (modelo SP-32T) foi usada em uma das etapas do procedimento da microextração líquido-líquido dispersiva.

O instrumento empregado para obtenção das imagens foi o microscópio portátil multifunção Supereyes (Shenzhen, Guangdong, China), modelo B007, conectado a uma caixa branca iluminada com luz branca proveniente da lâmpada de LED (7W). Um notebook foi utilizado para conectar, via porta USB, a microcâmera possibilitando o recebimento das informações. O equipamento usado na obtenção de dados comparativos foi um espectrômetro de absorção atômica com chama ar/acetileno Perkin Elmer, (Norwalk, CT, EUA), modelo AAnalyst 200.

3.3. Procedimento para pré-concentração

A pré-concentração foi efetuada seguindo os princípios da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).

Uma solução estoque de 1000 μ g L⁻¹ de Co²⁺ foi utilizada para preparar soluções intermediárias na faixa linear de trabalho, contendo o analito e o tampão borato pH 7,5. Dessas soluções, foram retiradas alíquotas de 5ml, equivalente a 1 ml do tampão e o analito nas concentrações de 5 a 80 μ g L⁻¹ de Co²⁺. Esse volume de amostra foi transferido para cada tubo de ensaio. Em seguida adicionou-se 30 μ L do reagente complexante TAC a 0,015%, homogeneizando suavemente. A estrutura do 2-(2-tiazolilazo)-p-cresol (TAC) é apresentada na figura 3.1.



Figura 3.1: Estrutura do reagente complexante 2-(2-tiazolilazo)-p-cresol (TAC).

Posteriormente, preparou-se a mistura contendo 50 µL do solvente extrator tricloroetileno (C₂HCl₃) e 650 µL do solvente dispersor etanol (CH₃CH₂OH). Para efetuar a microextração utilizou-se uma seringa de 5 ml, injetou-se a mistura no tubo resultando na turvação imediata do sistema.

A fim de separar a fase rica contendo o Co da fase aquosa utilizou-se uma centrífuga com rotação de 3500 rpm durante 6 minutos. Após a centrifugação obtevese a sedimentação do analito complexado com o reagente TAC. Removeu-se o sobrenadante do tubo de ensaio, possibilitando a quantificação através do método de detecção. A figura 3.2 ilustra o procedimento da microextração adotado para préconcentração do Co (II).



Figura 3.2: Principais etapas do procedimento da DLLME empregado na pré-concentração do Co (II) [33].

3.4. Obtenção das imagens e avaliação de dados RGB

As imagens foram obtidas usando o microscópio portátil acoplado a uma caixa de MDF (*Medium-Density Fiberboard*) retangular de dimensões 20x30x12 cm que foi confeccionada e pintada de branco. Na parte interna, uma lâmpada de LED (7W) foi acoplada, na parte lateral, para obtenção da luz branca. Na parte superior da caixa, um orifício com diâmetro equivalente ao do tubo de ensaio, foi aberto para entrada e saída dos tubos contendo a fase rica.

O microscópio foi conectado ao computador portátil via USB, sendo reconhecida automaticamente. Utiliza-se o software AMCap como dispositivo para obtenção das imagens no formato JPEG. Nessa etapa, foram feitos alguns ajustes na distância entre a lente do microscópio e da fase rica, fixando esse afastamento em 2,5 cm, seguido pelo ajuste de zoom para melhorar a resolução da imagem. Com isso, a distância e o zoom foram mantidos constantes na aquisição dos sinais RGB. A figura 3.3 ilustra as principais etapas do sistema de aquisição das imagens empregadas no método proposto.



Figura 3.3: Principais etapas e componentes do sistema de obtenção de imagens utilizando a DLLME e a Colorimetria de Imagem Digital.

As imagens geradas foram processadas através do software *ImageJ*. Para isso, uma ferramenta de ajuste foi usada para delimitar a região específica de interesse (ROI) para obtenção dos sinais RGB. Esses conjuntos de pixels gerados estão condicionados as cores obtidas e suas respectivas intensidades, representado por um histograma correspondente a cada cor do sistema RGB. Os sinais gerados são convertidos em absorvância, aplicando a lei de Lambert Beer. Considerando o modelo RGB, os pontos gerados na faixa de trabalho do vermelho (RED) apresentou maior sensibilidade, por esse motivo utilizou-se como parâmetro nas análises quantitativas apresentadas nesse estudo.

3.5. Otimização das condições experimentais do método analítico

Estudos preliminares univariado foram realizados para verificar, de maneira elementar, quais seriam as variáveis mais significativas para realização da otimização das condições experimentais de maneira multivariada. Constatou-se que a formação do complexo Co(II)-TAC é potencializada em uma faixa específica de pH, nesse intervalo específico a magnitude do sinal analítico é maior. Ao avaliar a eficiência da microextração, verificou-se que a estabilidade da gota enriquecida influencia diretamente na reação colorimétrica, e, portanto, na qualidade da imagem capturada.

Nesse contexto, o método proposto foi otimizado a partir da otimização multivariada pela matriz de Doehlert. Essa metodologia tem se popularizado cada vez mais, uma vez que a otimização multivariada possibilita observar as interações entre as variáveis, propõe um menor número de experimentos. Essas vantagens são extremamente relevantes, se comparadas ao método tradicional: univariado [34]. Para obter as condições ótimas de trabalho, usando a otimização multivariada, duas etapas foram levadas em consideração: construção da matriz contendo os valores associado as variáveis estudadas e posterior otimização da resposta. O sistema de Doehlert para três variáveis foi usado como parâmetro quimiométrico.

A matriz de Doehlert é uma ferramenta quimiométrica multivariada que apresenta uma metodologia capaz avaliar a influência das variáveis que constituem o sistema, e ao mesmo tempo estabelecer possíveis relações entre elas. Um número relativamente pequeno de experimentos possibilita estudar as variáveis, o que confere a essa matriz vantagens se comparadas a outros tipos de otimização [35], além de apresentar alta eficiência [36].

A metodologia da superfície de resposta (RSM) tem sido empregada para interpretar os dados oriundos da matriz de Doehlert. Essas superfícies são descritas a partir de uma função polinomial contendo as variáveis em estudo. Ao igualar essa função a zero e aplicar a derivada parcial para cada fator de interesse, o ponto crítico é obtido [35]. A partir disso, os valores ótimos para cada variável são estabelecidos e o processo de otimização é finalizado. As variáveis que influenciam diretamente na eficiência do método foram combinadas simultaneamente, sendo elas: pH, quantidade do solvente dispersor e quantidade do solvente extrator. O pH da solução tampão foi submetida a uma faixa de 5 a 11, correspondente a 7 níveis, o volume do solvente extrator na faixa de 30 a 70 μ L, correspondente a 3 níveis e o volume do solvente dispersor na faixa de 200 a 1000 μ L, correspondente a 5 níveis. A concentração usada como parâmetro foi 50 μ g L⁻¹ de Co²⁺, sendo ela mantida nos 13 experimentos com medidas em duplicata para cada condição avaliada.

Após obtenção dos dados, eles foram tratados no software *Statistics StatSoft version* 10, com nível de confiança constante em 95%. A partir disso, superfícies de respostas e curvas de níveis foram descritas em gráficos contendo três variáveis. Equações matemáticas descrevem esse processo e possibilitaram identificar se nas superfícies há um ponto de máximo, ponto de mínimo ou ponto de sela. A interpretação matemática desses dados e do comportamento das curvas de níveis permitiram estabelecer, a partir do critério de Lagrange e da RSM, o ponto ótimo a ser aplicado no curso desse trabalho.

3.6. Preparo de amostras

As amostras de água foram coletadas nos mananciais, filtradas com papel filtro e armazenadas a 2 °C, em um refrigerador. O pH foi ajustado as condições ótimas de trabalho.

A vitamina B12 foi adquirida em uma loja de produtos naturais em forma de capsulas de 240 mg. O procedimento empregado para fazer abertura da amostra foi a digestão ácida conforme descrito por Tekin et. al [37]. Inicialmente, 240 mg do comprimido foi dissolvido em 50 ml de água deionizada para preparar a solução estoque. Ao aplicar a relação estequiométrica estabelecida por Tekin et. al [37], a solução obtida continha, aproximadamente, 208,93 mg L⁻¹ de cobalto. Os átomos de Co presentes na vitamina B12 foram transformados em íons Co (II) após o tratamento, com ácido nítrico 65% PA, de 1 ml da solução estoque. Essa mistura teve seu pH ajustado para 7,5 com adição gota a gota das soluções de ácido clorídrico 1,0 M e hidróxido de sódio 0,1 M. A solução resultante foi diluída para 1000 μg L⁻¹ e armazenada a 2,0 ° C em um refrigerador. Outras diluições foram realizadas em

concentrações da faixa linear de trabalho. A solução de 1000 µg L⁻¹ também foi quantificada pelo F AAS.

O material de referência certificado de cabelo humano BCR 397 foi preparado por meio da pesagem de 0,1 g, seguida pela transferência para o recipiente da bomba de Teflon para o efetuar o processo de digestão ácida. O ácido nítrico 65% PA (2,0 ml) e 1 ml do peróxido de hidrogênio 30% (v/v) foram transferidos para o material sólido. A digestão ácida foi realizada a partir do fechamento da bomba e o repouso do sistema por 5,0 h a uma temperatura de 110 °C. O pH resultante foi ajustado para 7,5 com adição gota a gota de NaOH 1,0 M e transferido para o balão volumétrico de 5,0 ml e aferido com a água desionizada ultrapura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização do procedimento

A reação colorimétrica responsável pela formação do complexo Co (III)-TAC estão associadas as condições químicas bem definidas. Os principais parâmetros avaliados foram o pH, volume do solvente extrator e dispersor usados na microextração, bem como a interação entre essas três variáveis, afim de estabelecer condições ótimas de trabalho.

Ao analisar preliminarmente de forma univariada essas variáveis, constatou-se que a solução tampão tem papel fundamental na manutenção do pH ótimo constante, já o volume dos solventes influencia na eficiência da pré-concentração. Por outro lado, o estudo multivariado, mostrou-se vantajoso por levar em consideração a interação entre as variáveis e possibilitar o uso reduzido de solventes organoclorados. Nesse contexto, foi aplicado o método de otimização multivariado, a fim de estabelecer as condições ideais para garantir a sensibilidade e precisão dos sinais.

O planejamento multivariado, o sistema Doehlert foi usado como ferramenta quimiométrica na obtenção dos valores ótimos. Ao aplicar a equação $N=K^2 + K + C$ e considerar a duplicidade das medidas 13 experimentos foram executados, já que o valor 13 foi obtido ao propor 3 variáveis (valor de K) em duplicata (valor de C). A tabela 4, apresenta as absorbâncias para cada condição experimental.

O pH variou de 5 a 11 (7 níveis), o volume do solvente extrator variou de 30 a 70 μ L (3 níveis) e o volume do solvente dispersor variou de 200 a 1000 μ L (5 níveis). Os sinais RGB foram analisados nas cores vermelho, verde e azul, porém o vermelho apresentou maior sensibilidade, evidenciado pelos maiores valores nos sinais e características analíticas da curva de calibração. Nesse sentido, o presente estudo foi realizado na dimensão *R* desse sistema de cores.

Leitura no VERMELHO					
Experimentos	рН	VSE (µL)	VSD (µL)	Abs 1	Abs 2
1	11	50	400	0,128	0,108
2	11	50	800	0,021	0,021
3	10	70	600	0,119	0,109
4	9	30	400	1,240	1,287
5	9	30	800	0,546	0,764
6	8	50	200	0,888	0,895
7	8	50	600	1,054	1,063
8	8	50	1000	1,119	1,116
9	7	70	400	0,395	0,250
10	7	70	800	0,509	0,552
11	6	30	600	0,010	0,012
12	5	50	400	0,006	0,002
13	5	50	800	0,001	0,004

Tabela 4.1: Matriz de Doehlert para três variáveis.

VSE: Volume do solvente extrator.

VSD: Volume do solvente dispersor.

Ao analisar, de forma elementar, a tabela 4 percebe-se que há valores de absorbância mais sensíveis e precisos na faixa levemente alcalina, evidenciado pelo efeito do tampão borato na manutenção do pH constante. A quantidade de cada solvente usado na microextração tendem a valores centrais do intervalo estudado. No entanto, é de suma importância aplicar a metodologia de superfície de resposta (RSM) para avaliação das interações entres os fatores e posterior aquisição do ponto crítico.

Com a execução desses 13 experimento, os dados obtidos (sinais de absorbância) foram tratados, com auxílio do software *Statistics StatSoft version* 10,

geraram a superfície de resposta e o gráfico contendo as curvas de níveis, a partir da matriz de Doehlert, apresentado para cada conjunto de variáveis estudadas. Constatou-se que todos os três níveis do planejamento fatorial estudados e a interação entre eles são estatisticamente relevantes como mostra a figura 4.1.



Figura 4.1: Superfície de resposta e curvas de níveis de (a) VSD × pH, (b) VSE × pH e (c) VSD × VSE da matriz Doehlert com três variáveis do sistema de pré-concentração de Co (II).

A correlação entre os dados apresentados pode ser avaliada a partir da figura 4.2, gerada pela comparação entre os valores preditos e os observados. Os pontos estão distribuídos aleatoriamente ao logo da linha bissetriz na extensão do intervalo de y, indicando que há uma aproximação entre as medidas teoricamente esperadas e os valores experimentais associados a esses valores [38].



Figura 4.2: Valores observados versus valores preditos obtidos através da matriz de Doehlert com três variáveis para a determinação de Co (II).

As superfícies de respostas geradas com o planejamento multivariado pela matriz de Doehlert estabeleceu a influência das três variáveis e a interação entre elas. A equação 4.1 descreve a expressão que relaciona a absorvância com pH, volume do solvente extrator (VSE) e volume do solvente dispersor (VSD).

 $Abs=4,06 + 21,71pH - 1,33pH^{2} + 1,20VSE - 0,02VSE^{2} + 0,03VSD - 0,00004VSD^{2} - 0,008pH.VSE - 0,002pH.VSD + 0,0008 VSE.VSD$ (4.1)

Ao calcular as derivadas parciais em função de cada variável os valores críticos foram obtidos. A tabela 4.2 apresenta esses dados e os pontos mínimo e máximo do conjunto de experimentos.

Variáveis	Mínimo	Valores Críticos	Máximo
pН	5,0000	7,4839	11,000
VDE (µL)	30,0000	48,0480	70,000
VSD (µL)	200,0000	648,4415	1000,000

Tabela 4.2: Valores críticos, mínimo e máximo obtidos da matriz de Doehlert.

4.2. Características analíticas do método

O método analítico proposto foi desenvolvido seguindo os parâmetros tradicionalmente seguidos nos trabalhos publicados no campo das ciências analíticas. Entre eles, curvas de calibração, figuras de méritos: limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão. Para avaliar a influências de íons presentes na matriz, foi realizado o estudo de interferentes.

4.2.1. Curvas analíticas

As imagens digitais foram obtidas seguindo os procedimentos descritos no tópico 3.3. Após determinar a região específica de interesse, os sinais do conjunto RGB foram determinados a partir do branco, seguido pela variação da concentração de Co (II) presente nas solução preparadas a partir da diluição do padrão de 1000 mg L⁻¹. A faixa de trabalho para confecção da curva analítica foi de 0 µg L⁻¹ a 80 µg L⁻¹. Medidas em triplicata foram realizadas, e os valores médio de cada componente RGB são apresentados na tabela 4.3.

As secções das imagens dos padrões encontram-se na figura 4.3. A cor amarelada, da primeira imagem, indica o ponto de origem da curva (0 µg L⁻¹ de Co²⁺) e a cor azul o ponto mais concentrado, seguida por intensidades intermediárias associadas a diferentes concentrações do analito.



Figura 4.3: Imagens geradas para o processo de construção da curva de calibração do cobalto, a partir da diluição do padrão.

Os valores dos sinais do conjunto RGB foram processados no ImageJ.

		-	-
Conc. (µg L ⁻¹)	R	G	В
0	164,331	179,943	43,805
5	142,559	159,164	19,841
10	127,826	148,333	4,848
20	101,520	127,866	27,504
30	76,937	107,882	25,920
40	53,130	80,755	47,638
50	40,782	66,185	33,404
60	25,979	52,274	33,210
70	18,712	47,329	46,180
80	6,604	38,454	55,454

Tabela 4.3: Média dos sinais de cada componente RGB gerados no ImageJ.

Conc.: concentração

Os componentes R e G apresentaram uma diminuição progressiva na intensidade do sinal, apresentando uma coerência, já que a cor verde e azul do complexo formado constitui componente complementar dos canais R e G do sistema de cores RGB. O canal B, porém, não apresentou variação constante, mas valores alternados, tendo em vista a similaridade da cor do complexo com a intensidade no componente B, não tenho um aumento linear com a variação da concentração do cobalto.

Ao observar os valores, constatou-se que a relação entre as cores complementares e a concentração do cobalto eram inversamente proporcionais e levaria a uma curva analítica negativa, visto que o sinal diminuiu com o aumento da presença do analito.

A lei de Lambert Beer pode ser aplicada para transformar esses sinais em absorvância. Isso é possível em virtude a propriedade de reflexão e absorção da luz incidente sobre os átomos. Esse processo ocorre em comprimentos de onda específicos. Com o aumento da concentração do cobalto foi verificado a redução da intensidade do sinal, evidenciado pela maior absorção da luz pelas moléculas que são representados em forma de imagem. O olho humano, por sua vez, consegue interpretar essa variação pela mudança de coloração e intensificação da cor com aumento da quantidade do analito, mas não é capaz de quantificar essa absorção. Na determinação quantitativa da absorvância foi realizada três medidas em branco nas faixas dos canais vermelho, verde e azul, sendo consideradas como radiação incidente (P_0). Os padrões de calibração e as medidas realizadas nesse estudo foram associados a radiação transmitida (P). Ao aplicar a equação 4.2 correspondente a Lei de Beer os valores de absorvância foram calculados e usados na construção da curva analítica expressa na figura 4.5.

$$A = \log \frac{P_0}{P} \tag{4.2}$$

A média dos valores de absorvância calculados e usados para construção da curva são expressos na Tabela 4.4.

Conc. (µg L ⁻¹)	R	G	В
0	0,020	0,002	0,566
5	0,083	0,056	0,629
10	0,123	0,081	0,982
20	0,246	0,163	0,710
30	0,386	0,244	0,613
40	0,514	0,351	0,274
50	0,664	0,455	0,395
60	0,909	0,554	0,392
70	0,990	0,584	0,252
80	1,201	0,655	0,126

Tabela 4.4: Média dos valores de absorvância usados para construção da curva analítica.

Conc.: concentração

Os valores obtidos nos componentes R e G foram coerentes com que teoricamente era esperado, isto é, aumento progressivo da absorbância com o aumento da concentração do analito. O componente, B, no entanto, apresentou dados que não seguiram a mesma lógica, tendo em vista a baixa sensibilidade dos sinais oriundos no histograma azul para interpretar variações do analito nas condições estudadas.



Figura 4.4: Curvas de calibração obtidas para o Co (II) usando valores de absorbância no vermelho (a), verde (b) e azul (c).

O canal R apresentou maior inclinação da reta e um coeficiente de correlação 0,9943, sendo descrido pela equação da reta A=0,0137C – 0,0072, onde A representa o valor da absorvância oriunda do sinal analítico e C é a concentração de Co (II) em µg L⁻¹. Essas características conferem ao espaço RED maior sensibilidade, sendo por esse motivo utilizado como parâmetro na aquisição das respostas atribuídas ao estudo das figuras de méritos e nas análises quantitativas. O componente G, por sua vez, teve um bom coeficiente de correlação linear, mas menor sensibilidade em relação ao canal R.

4.2.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

As figuras analíticas de mérito limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) são ferramentas essenciais para estabelecer a sensibilidade de um método e garantir a confiabilidade analítica das medidas. O LD é o valor mínimo que o analito, em uma amostra, pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado em determinadas condições experimentais. O LQ é valor mínimo que o analito, em uma amostra, pode ser confiavelmente quantificado, ou seja, com precisão e exatidão aceitáveis. Nesse estudo, as figuras de mérito foram calculadas com base em

procedimentos analíticos cientificamente aceitos, os quais estão fundamentados em tratamento estatístico de dados experimentais.

O limite de detecção foi calculado pela medida de dez valores da solução em branco. As absorbâncias obtidas foram submetidas ao cálculo do desvio padrão da resposta (*s*). O valor obtido foi multiplicado por três e dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração (*S*), conforme a equação 4.3.

$$LD = \frac{s_{3,3}}{s} \tag{4.3}$$

Foi encontrado 1,765 µg L⁻¹ como limite de detecção para o método proposto.

O limite de quantificação foi calculado pelo desvio padrão da resposta (*s*) de dez valores da solução em branco multiplicado por 10 e dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração. Ao aplicar a equação 4.4 foi encontrado 5,347 µg L⁻¹ como LQ.

$$LQ = \frac{s10}{S} \tag{4.4}$$

As figuras de mérito estudadas apresentaram dados coerentes com faixa de trabalho, visto que os resultados numéricos encontrados são compatíveis aos objetivos do método. Considerando os valores de LD e LQ, traços de Co (II) podem ser quantificados.

4.2.3. Precisão

Precisão é uma figura de mérito que estabelece a dispersão de valores medidos em torno de um valor médio, a partir do desvio padrão relativo (DPR) a precisão é estimada. A repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade são parâmetros estabelecidos para mensurar a precisão de um conjunto de medidas [39]. Nesse estudo foram avaliados a repetibilidade e reprodutibilidade.

A repetibilidade foi mensurada seguindo as recomendações do INMETRO. As medidas devem sejam realizadas com repetição de sete a nove vezes, em uma dada condição experimental, para o cálculo do DPR [40], [39]. Na concentração 40 µg L⁻¹, oito medidas foram executas e os dados obtidos, em termos de absorvância, são expressos na tabela 4.5.

Pontos	Abs
1	0,458
2	0,463
3	0,410
4	0,431
5	0,426
6	0,434
7	0,436
8	0,453

Tabela 4.5: Repetibilidade dos valores de absorvância para 40 µg L⁻¹ de Co (II).

O cálculo do desvio padrão relativo foi efetuado aplicando a equação 4.5, sendo s o desvio padrão e x o valor médio do número total de medidas.

$$DPR = \frac{s100}{x} \tag{4.5}$$

O valor percentual encontrado foi de 4,077% para o DPR, não excedendo o limite máximo de 30% estabelecido para analises de traços [41].

A reprodutibilidade é a repetição de medidas realizadas em um mesmo laboratório, podendo variar o analista, ou dias de trabalho, ou equipamentos distintos [39]. Nesse estudo, foram avaliados os valores experimentais em condições fixas, no mesmo laboratório, mas em dias diferentes, com intervalo mínimo de três dias. A tabela 4.6 mostra os valores encontrados para 20 µg L⁻¹ de Co (II).

Tabela 4.6: Estudo da reprodutibilidade dos valores de absorvância para 20 μ g L⁻¹ de Co (II).

Dias	Abs
1	0,260
2	0,257
3	0,255
4	0,214
5	0,259
6	0,266

O desvio padrão relativo foi calculado com base na equação 4.5 e o valor obtido de 7,507% Portanto, o método proposto pode ser considerado preciso, uma vez que

a repetibilidade e a reprodutibilidade apresentaram desvio padrão relativo com percentual aceitável.

Os parâmetros analíticos estudados são apresentados na tabela 4.7.

70
72

Tabela 4.7: Parâmetros analíticos para o método proposto.

4.3. Estudo de interferentes

A seletividade do método foi avaliada através do estudo de interferentes de espécies iônicas presentes na matriz, sobretudo amostras de água. Os possíveis interferentes foram adicionados, na proporção inicial de 1:1000, a soluções padrão contendo o analito. Algumas espécies iônicas tiveram suas proporções reduzidas até estabelecer uma alteração, significativa, na resposta, outras não interferiram e o níquel sempre modificava o sinal analítico esperado, independentemente do valor adicionado.

Espécie	Proporção limite Co ²⁺ : Espécie
K ⁺ , NO ₃ ⁻	Acima de 1:1000
Al ³⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Fe ²⁺	1:10
Na⁺, Cl⁻	1:50
Ni ²⁺	1:1
Pb ⁴⁺	1:25
Se ²⁺	1:100
Cd ²⁺	1:10
Mn ²⁺	1:25

Tabela 4.8: Estudo de alguns íons interferentes na determinação Co (II) em águas.

Os íons analisados são expressos na tabela 4.5. O Ni²⁺ pode ser considerado como principal interferente da reação colorimétrica Co(II)-TAC, visto que o níquel também reage com TAC em pH equivalente, formando um complexo estável. As demais espécies avaliadas interferem apenas em proporções elevadas. Portanto, o estudo proposto pode ser considerado seletivo, tendo em vista os dados apresentados e a natureza da matriz.

4.4. Aplicação do método

As amostras de água do rio de contas, vitamina B12 foram as matrizes utilizadas para aplicação do método. Em virtude das concentrações em níveis traço, foi realizado o ensaio de recuperação para avaliar a exatidão, e por consequência a validade do método.

O estudo de recuperação consiste na quantidade do analítico recuperado, após o processo de adição de concentrações conhecidas a uma certa quantidade presente na amostra. Nesse estudo, fizemos medidas diretas, após o preparo da amostra, e adição de padrão, contendo concentrações conhecidas do cobalto nas amostras reais e na amostra de material certificado.

Os valores foram calculados pela equação 4.6 e os resultados das recuperações são expressos na Tabela 4.9, e evidenciam que os dados estão de acordo ao percentual cientificamente aceitável.

$$Rec \% = \frac{(valor \ obtido - valor \ real) \ .100}{valor \ real}$$
(4.6)

O Material de Referência Certificado BCR 397 (Cabelo) foi empregado para avaliar a exatidão da técnica. As análises quantitativas do teor de cobalto presentes a amostra certificada e o ensaio de recuperação nas amostras de água apresentaram valores adequados para determinação do analito nas matrizes estudadas, na faixa de trabalho em níveis traços. A tabela 4.9 apresenta a concentração de cobalto encontrada na amostra certificada, através da análise colorimétrica proposta nesse estudo. Houve uma boa correlação entre o valor certificado e o valor encontrado, com erro percentual de +7,27%, em um intervalo de confiança de 95%.

	Quantidade de cobalto (µg g ⁻¹)		
CRM	Certificado	Encontrado	Erro (%)
BCR 397	$0,55 \pm 0,03$	$0,59 \pm 0,04$	+7,27
Cabelo			
	Adicionado (µg L ⁻¹)	Encontrado (µg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Água 1	0	<ld< td=""><td>111</td></ld<>	111
	20	$22,2 \pm 0,3$	
Água 2	0	<ld< td=""><td>94</td></ld<>	94
	20	$18,7 \pm 0,2$	
Água 3	0	<ld< td=""><td>98</td></ld<>	98
	20	$19,6 \pm 0,1$	

Tabela 4.9: Determinação do teor de cobalto em CRM e amostras de água, com intervalo de confiança de 95%.

A concentração de cobalto na vitamina B12, digerida, foi determinada pelo método proposto a partir do preparo da amostra descrito no item 3.6, seguida por processos de diluição para concentração final de 1000 µg L⁻¹ de Co²⁺ presentes no medicamento. Medidas diretas dessa solução foram realizadas no F AAS, e os valores de absorvância associados a curva de calibração correspondente a esse método espectrométrico, e a concentração do analito foi calculada.

Através método colorimétrico desenvolvido, determinações na faixa linear de trabalho, foram realizadas para avaliar o desempenho analítico e compara-los com o F AAS. Os valores encontrados são expressos na tabela 4.10.

	Quantidade de cobalto (mg g ⁻¹)		
-	Fabricante	F AAS	Este método
Vitamina B12	Não declarado	218 ± 10	228 ± 12

Tabela 4.10: Determinação do teor de cobalto em vitamina B12, com intervalo de confiança de 95%.

Infere-se que há uma correlação entre a quantidade de cobalto obtida através do F AAS com a do método proposto. Caso houvesse o valor declarado pelo fabricante seria possível avaliar a exatidão das medidas.

5. CONCLUSÕES

Um novo método para determinação de cobalto em amostras de água e vitamina B12 foi desenvolvido de maneira eficaz. A microextração líquido-líquido dispersiva foi fundamental na pré-concentração do analito. Essa técnica forneceu subsídios para obter uma configuração viável na obtenção de imagens, e aplicação Colorimetria de Imagens Digitais. A versatilidade, simplicidade, rapidez, eficiência, baixo custo e sensibilidade são as principais vantagens apresentadas, tendo em vista o custo elevado dos métodos espectrométricos comumente utilizado em análises quantitativas.

Os ensaios de recuperação comprovaram que o cobalto pode ser determinado em amostras de água sem efeitos de matriz e com boa precisão, visto que esses valores foram em torno de 100%, evidenciando a sensibilidade e seletividade do método. A determinação na amostra de material certificado avaliou a boa exatidão da técnica, no intervalo linear empregado. As análises quantitativas do teor de cobalto em vitamina B12, exigiram a digestão da amostra e diluição, sendo essas etapas de preparo da amostra determinantes na obtenção de resultados satisfatórios. Ao comparar os resultados das análises por DIC com o F ASS, infere-se que há similaridade entre os valores relativos à quantidade do analito na vitamina B12.

Nessa perspectiva, novas pesquisas podem ser desenvolvidas para aprimorar e ampliar ainda mais o uso de Imagens Digitais como ferramenta analítica para determinações em matrizes variadas. Muitos estudos tem sido propostos, no entanto, ainda há muito a ser explorado, tendo em vista o enorme potencial que a Colorimetria de Imagem Digital tem fornecido as ciências analíticas nos últimos anos.

6. REFERÊNCIAS

1. MEDEIROS, M.A. Elemento Químico Cobalto. **QUÍMICA NOVA NA ESCOLA**, v. 35, n. 3, p. 220-221, 2013

2. Lee, J.D. Química inorgânica não tão concisa. 1999: Edgard Blucher.

3. Paniz, C.; D. Grotto; G.C. Schmitt; J. Valentini; K.L. Schott; V.J. Pomblum; S.C. Garcia. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnóstico laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e medicina Laboratorial**, v. 41, n. 5, p. 323-34, 2005

4. Chaiyamate, P.; K. Seebunrueng; S. Srijaranai. Vortex-assisted low density solvent and surfactant based dispersive liquid–liquid microextraction for sensitive spectrophotometric determination of cobalt. **RSC Advances**, v. 8, n. 13, p. 7243-7251, 2018

Alves, A.N.L.; H.V. Della Rosa. Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 39, n. 2, p. 129-139, 2003

6. Lison, D.; M. De Boeck; V. Verougstraete; M. Kirsch-Volders. Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. **Occupational and environmental medicine**, v. 58, n. 10, p. 619-625, 2001

7. Baghban, N.; A.M.H. Shabani; S. Dadfarnia; A.A. Jafari. Flame atomic absorption spectrometric determination of trace amounts of cobalt after cloud point extraction as 2-[(2-mercaptophenylimino) methyl] phenol complex. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 5, p. 832-838, 2009

8. Bahar, S.; B. Babamiri. Preconcentration and determination of low amounts of cobalt in black tea, paprika and marjoram using dispersive liquid–liquid microextraction and flame atomic absorption spectrometry. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 12, n. 1, p. 51-56, 2015

9. Colognato, R.; A. Bonelli; J. Ponti; M. Farina; E. Bergamaschi; E. Sabbioni; L. Migliore. Comparative genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions on human peripheral leukocytes in vitro. **Mutagenesis**, v. 23, n. 5, p. 377-382, 2008

10. Roychoudhury, S.; A.V. Sirotkin; R. Toman; A. Kolesarova. Cobalt-induced hormonal and intracellular alterations in rat ovarian fragments in vitro. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 49, n. 12, p. 971-977, 2014

11. Behl, M.; M.D. Stout; R.A. Herbert; J.A. Dill; G.L. Baker; B.K. Hayden; J.H. Roycroft; J.R. Bucher; M.J. Hooth. Comparative toxicity and carcinogenicity of soluble and insoluble cobalt compounds. **Toxicology**, v. 333, p. 195-205, 2015

12. Ponti, J.; E. Sabbioni; B. Munaro; F. Broggi; P. Marmorato; F. Franchini; R. Colognato; F. Rossi. Genotoxicity and morphological transformation induced by cobalt nanoparticles and cobalt chloride: an in vitro study in Balb/3T3 mouse fibroblasts. **Mutagenesis**, v. 24, n. 5, p. 439-445, 2009

Defarge, N.; J.S. de Vendômois; G. Séralini. Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. **Toxicology reports**, v. 5, p. 156-163, 2018

14. Lemos, V.A.; V.J. Ferreira; J.A. Barreto; L.A. Meira. Development of a method using ultrasound-assisted emulsification microextraction for the determination of nickel in water samples. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 5, p. 141, 2015

15. Barreto, J.A.; R.d.S. de Assis; R.J. Cassella; V.A. Lemos. A novel strategy based on in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of nickel in chocolate samples. **Talanta**, v. 193, p. 23-28, 2019

16. de Almeida, O.N.; F.H.M. Luzardo; F.A.C. Amorim; F.G. Velasco; L.N. González. Use of fiberglass support in the application of dried-spot technique with dispersion liquid-liquid microextraction for the determination of Co, Cr, Cu, Ni and Pb by Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 150, p. 92-98, 2018

17. Beikzadeh, E.; A.H. Sarrafi. Determination of trace levels of cobalt ion in different real samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by flame atomic absorption spectrometry. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 11, n. 3, p. 994-1002, 2017

18. Lima, M.J.; C.F. Nascimento; F.R. Rocha. Feasible photometric measurements in liquid–liquid extraction by exploiting smartphone-based digital images. **Analytical Methods**, v. 9, n. 14, p. 2220-2225, 2017

19. Soares, S.; M.J. Lima; F.R. Rocha. A spot test for iodine value determination in biodiesel based on digital images exploiting a smartphone. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 195-199, 2017

20. Mahato, K.; P. Chandra. based miniaturized immunosensor for naked eye ALP detection based on digital image colorimetry integrated with smartphone. **Biosensors** and **Bioelectronics**, v. 128, p. 9-16, 2019

21. Choodum, A.; W. Sriprom; W. Wongniramaikul. Portable and selective colorimetric film and digital image colorimetry for detection of iron. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 208, p. 40-47, 2019

22. Neto, J.H.S.; I.S. Porto; M.P. Schneider; A.M. dos Santos; A.A. Gomes; S.L. Ferreira. Speciation analysis based on digital image colorimetry: Iron (II/III) in white wine. **Talanta**, v. 194, p. 86-89, 2019

23. Capitan-Vallvey, L.F.; N. Lopez-Ruiz; A. Martinez-Olmos; M.M. Erenas; A.J. Palma. Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. **Analytica Chimica Acta**, v. 899, p. 23-56, 2015

24. Ahmadi, S.; A. Mani-Varnosfaderani; B. Habibi. Characterization of Binary Edible Oil Blends Using Color Histograms and Pattern Recognition Techniques. **Analytical and Bioanalytical Chemistry Research**, v. 6, n. 1, p. 111-124, 2019

25. Rahmatabadi, D.; A. Shahmirzaloo; R. Hashemi; M. Farahani. Using digital image correlation for characterizing the elastic and plastic parameters of ultrafine-

grained Al 1050 strips fabricated via accumulative roll bonding process. **Materials Research Express**, v. 6, n. 8, p. 086542, 2019

26. Barros, J.A.; F.M.d. Oliveira; G.d.O. Santos; C. Wisniewski; P.O. Luccas. Digital image analysis for the colorimetric determination of aluminum, total iron, nitrite and soluble phosphorus in waters. **Analytical Letters**, v. 50, n. 2, p. 414-430, 2017

27. Damirchi, S.; T. Heidari. Evaluation of digital camera as a portable colorimetric sensor for low-cost determination of inorganic arsenic (III) in industrial wastewaters by chemical hydride generation assisted-Fe (III)– 1, 10-phenanthroline as a green color agent. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 15, n. 11, p. 2549-2557, 2018

Cardoso, D.E.B.F. Aplicação de imagem digital ao Controlo da Qualidade,
 Dissertação (Mestrado), Universidade de Coimbra, 2014.

29. Li, W.; R. Zhang; H. Wang; W. Jiang; L. Wang; H. Li; T. Wu; Y. Du. Digital image colorimetry coupled with a multichannel membrane filtration-enrichment technique to detect low concentration dyes. **Analytical Methods**, v. 8, n. 14, p. 2887-2894, 2016

30. Firdaus, M.L.; W. Alwi; F. Trinoveldi; I. Rahayu; L. Rahmidar; K. Warsito. Determination of chromium and iron using digital image-based colorimetry. **Procedia Environmental Sciences**, v. 20, p. 298-304, 2014

31. Kearns, J.K.; C.B. Edson. Expanding Quantification of Arsenic in Water to 0 μg L- 1 with a Field Test Kit: Substituting 0.4% M/V Silver Nitrate as the Colorimetric Reagent; Employing Digital Image Analysis. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 3, p. 75, 2018

32. Asano, H.; Y. Shiraishi. Microfluidic paper-based analytical device for the determination of hexavalent chromium by photolithographic fabrication using a photomask printed with 3D printer. **Analytical Sciences**, v. 34, n. 1, p. 71-74, 2018

33. Oliveira, R.V. Desenvolvimento de um sistema em linha automatizado empregando microextração líquido-líquido dispersiva para a pré-concentração

e determinação espectrométrica de cobalto em amostras de águas, Tese (Doutorado), Universidade Federal da Bahia, 2017.

34. Caldas, L.F.S.; C.E.R. de Paula; D.M. Brum; R.J. Cassella. Application of a fourvariables Doehlert design for the multivariate optimization of copper determination in petroleum-derived insulating oils by GFAAS employing the dilute-and-shot approach. **Fuel**, v. 105, p. 503-511, 2013

35. Bezerra, M.A.; R.E. Santelli; E.P. Oliveira; L.S. Villar; L.A. Escaleira. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008

Novaes, C.; R. Yamaki; V. Paula; B. Nascimento Jr; J. Barreto; G. Valasques;
 M. Bezerra. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfícies de resposta-Parte I: variáveis de processo. Revista Virtual Quimica, v. 9, n. 3, p. 1284-1215, 2017

37. Tekin, Z.; S. Erarpat; A. Şahin; D.S. Chormey; S. Bakırdere. Determination of Vitamin B12 and cobalt in egg yolk using vortex assisted switchable solvent based liquid phase microextraction prior to slotted quartz tube flame atomic absorption spectrometry. **Food chemistry**, v. 286, p. 500-505, 2019

 Gonçalves, M.I.S. Aplicações de imagens digitais e análise multivariada para classificação e determinação de parâmetros de qualidade em plumas de algodão.
 2015

39. Ribeiro, F.A.d.L.; M.M.C. Ferreira; S.C. Morano; L.R.d. Silva; R.P. Schneider. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quimca Nova**, Vol. 31, No. 1, 164-171, 2008

40. Mendonça, R. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Revista Meio Ambiente Industrial**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2006 41. Guilhen, S.N.; M.A.F. Pires; F. Xavier; E. Dantas. Validação de metodologia analítica para determinação de mercúrio total em amostras de urina por espectrometria de absorção Atômica com geração de vapor frio (CV-AAS): estudo de caso. **Quim Nova**, v. 33, p. 1285-90, 2010