



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS - CFM**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**QMC5510 - ESTÁGIO SUPERVISIONADO**

**Uso de extração em fase sólida para determinação de  
metais em amostras aquosas através de espectrometria  
atômica em chama**

**ALUNO: Jeferson Schneider Carletto**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha**

**CO-ORIENTADORA: Doutoranda Heloísa França Maltez**

**Florianópolis**  
**Estado de Santa Catarina - Brasil**  
**Novembro – 2006**

"Toda a nossa ciência,  
comparada com a realidade, é  
primitiva e infantil - e, no entanto, é  
a coisa mais preciosa que temos."

(Albert Einstein)

## **AGRADECIMENTOS**

**Gostaria de agradecer a todas aquelas pessoas que de algum modo me ajudaram em minha vida acadêmica, e minhas desculpas aqueles que por ventura minha memória não puder lembrar.**

- ✓ A Deus, que está sempre presente em minha vida.**
- ✓ À minha família por todo o amor e compreensão que recebi durante toda a minha vida.**
- ✓ Ao professor Eduardo Carasek da Rocha pela amizade, paciência e orientação na realização deste trabalho.**
- ✓ À doutoranda Heloísa França Maltez em especial pela amizade, paciência e por me ajudar em todos os momentos de dificuldade na realização deste trabalho.**
- ✓ Ao mestrando Edmar Martendal por toda sua ajuda, que foi imprescindível para que este trabalho desse certo.**
- ✓ Aos colegas e amigos do laboratório 209, Dilma, Kalya, Janaína e Joyce.**
- ✓ Aos meus amigos (Alexandre, Tiago, João, Ícaro, Katrine, Levi e Diego) e principalmente à minha namorada Vanessa, por estar sempre ao meu lado apoiando e colaborando com amor e paciência.**
- ✓ Aos professores do Departamento de Química que colaboraram para minha formação acadêmica.**
- ✓ À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.**
- ✓ Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina pelo suporte na realização deste trabalho.**

## ÍNDICE GERAL

<b>ÍNDICE GERAL</b> .....	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	iv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>1.1 - A importância biológica do Zinco</b> .....	01
<b>1.2 - Métodos analíticos para determinação de Zinco</b> .....	01
<b>1.3 - Extração em fase sólida em um processo contínuo</b> .....	02
<b>1.3.1 - Sorvente utilizado na SPE</b> .....	03
<b>1.4 - Uso da estatística para a otimização do método</b> .....	04
<b>2. OBJETIVO</b> .....	06
<b>2.1 - Objetivo Geral</b> .....	06
<b>2.2 - Objetivos específicos</b> .....	06
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	07
<b>3.1 - Instrumentação</b> .....	07
<b>3.2 - Reagentes</b> .....	08
<b>3.3 - Sistema de pré-concentração em fluxo</b> .....	08

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>4.1 - Características operacionais do sorvente utilizado .....</b>	<b>11</b>
<b>4.2 - Otimização das variáveis de pré-concentração.....</b>	<b>11</b>
<b>4.3 - Estudo da variação do sinal versus volume de amostra.....</b>	<b>15</b>
<b>4.4 - Parâmetros analíticos de mérito.....</b>	<b>16</b>
<b>4.5 - Estudo de interferentes na pré-concentração.....</b>	<b>17</b>
<b>4.6 - Determinação de zinco em amostra real.....</b>	<b>19</b>
<b>4.7 - Validação da metodologia.....</b>	<b>19</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>24</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1-** Modelo estrutural da impregnação do ligante sulfoxina nas microesferas de quitosana. ....04
- Figura 2-** Sistema de pré-concentração em linha. (A): etapa de pré-concentração e (B): etapa de eluição. V: válvula, L: via aberta, D: via fechada, MC: mini-coluna contendo o adsorvente, R: retorno do fluxo da amostra ou eluente. Círculo hachurado: válvula ligada e círculo em branco: válvula desligada .....10
- Figura 3-** Gráfico de Pareto para otimização das condições de pré-concentração de zinco em amostras aquosas utilizando absorvância como resposta analítica; efeito padrão das diferentes variáveis..... 13
- Figura 4-** Superfície de resposta obtida a partir da matriz doehlert para a otimização do pH da amostra e da vazão do eluente na determinação de zinco em amostras aquosas por FI-F AAS..... 15
- Figura 5 -** Gráfico do estudo do volume da amostra (Condições utilizadas: pH igual a 7,8; vazão da amostra igual a 4,2 mL min<sup>-1</sup>; vazão do eluente igual a 4,7 mL min<sup>-1</sup>; concentração do eluente igual a 0,5 mol L<sup>-1</sup>) ..... 16
- Figura 6-** Gráfico de Pareto para determinação da influência dos íons interferentes estudados usando absorvância como resposta analítica.....18
- Figura 7-** Curva de calibração para determinação de Zinco em material de referência certificado de pó de músculo bovino.....20
- Figura 8 -** Curva de calibração para determinação de Zinco em material de referência certificado de água natural.....21

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Comparativo entre sorventes utilizados na SPE para pré-concentração de zinco <sup>7</sup> .....	03
<b>Tabela 2-</b> Parâmetros operacionais do espectrômetro de absorção atômica em chama .....	07
<b>Tabela 3-</b> Níveis usados no planejamento fatorial das variáveis envolvidas na pré-concentração do zinco.....	12
<b>Tabela 4-</b> Valores experimentais utilizados durante a otimização multivariada das variáveis envolvidas na pré-concentração do zinco.....	12
<b>Tabela 5-</b> Matriz Doehlert utilizada na otimização do pH da amostra e da vazão do eluente para obtenção da superfície de resposta na determinação de zinco em amostras aquosas por FI- F AAS.....	14
<b>Tabela 6-</b> Parâmetros analíticos de mérito para determinação de zinco em amostras aquosas por FI-F AAS.....	17
<b>Tabela 7-</b> Valores de absorvância obtidos para material de referência certificado de pó de músculo bovino.....	20
<b>Tabela 8-</b> Valores de absorvância obtidos para material de referência certificado de água natural.....	22

## LISTA DE ABREVIATURAS

- F AAS- Espectrometria de absorção atômica em chama.
- FIA- Análise por injeção em fluxo.
- GF AAS- Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.
- HDL- Lipoproteína plasmática de alta densidade.
- ICP-AES- Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado.
- ICP-MS- Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado.
- LLE- Extração líquido-líquido.
- LOD- Limite de detecção.
- LOQ- Limite de quantificação.
- SPE- Extração em fase sólida.

## Resumo

Neste trabalho foi desenvolvido uma metodologia para determinação de zinco em matrizes aquosas utilizando processo de extração em fase sólida (SPE) em um sistema de análise por injeção em fluxo (FI) acoplado à espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS). O adsorvente utilizado para a pré-concentração e extração do zinco foi a resina quelante obtida pela imobilização do ligante sulfoxina via diazotização da quitosana. As variáveis do processo foram otimizadas pelo método multivariado usando planejamento fatorial completo ( $N = 2^k + 1$ ). Os fatores escolhidos foram pH da amostra, concentração do eluente ( $\text{HNO}_3$ ), vazão da amostra e vazão do eluente. A partir dos resultados obtidos e usando análise de variância (ANOVA) e probabilidade estatística ( $p = 0,05$ ) foi construído o gráfico de Pareto para determinar a significância estatística de cada variável. Verificaram-se significativas a vazão do eluente e pH da amostra. A partir da matriz Doehlert fez-se uma otimização final e obteve-se a superfície de resposta. Com isso, os resultados obtidos foram vazão da amostra de  $4,2 \text{ mL min}^{-1}$  e vazão do eluente de  $4,7 \text{ mL min}^{-1}$ , pH da amostra de 7,8 e concentração do eluente de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . Determinaram-se os parâmetros analíticos de mérito, que foram: limite de detecção de  $0,8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ; limite de quantificação de  $2,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , RSD de 2,7 % ( $25,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $n=8$ ), faixa linear de trabalho de  $2,5 - 75 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , coeficiente de correlação (R) de 0,99951 e fator de enriquecimento de 17,6. A frequência analítica foi de 18 amostras por hora. Amostra de água mineral proveniente de Rio dos Bugres (Rancho Queimado-SC) foi analisada e a quantidade de zinco presente ficou abaixo do limite de detecção, sendo então a amostra fortificada com  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  gerando uma recuperação na faixa de 85-93 %. Amostra certificada Nist Bovine Powder Muscle 8414 ( $\text{Zn } 142 \pm 14 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ) foi analisada e obteve-se resultado de  $131,28 \pm 14 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ . Uma segunda amostra certificada, NIST (SRM1643e), elementos traços em água natural com concentração de zinco de  $78,5 \pm 2,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  foi analisada e obteve-se resultado de  $70,52 \pm 1,44 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

**Palavras-chave:** Zinco, FI-F AAS, Matriz Doehlert.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1- Importância biológica do Zinco

O zinco é considerado um elemento traço essencial ao homem devido a sua ação como co-fator em mais de 200 enzimas e é necessário para produção da insulina<sup>1</sup>.

A deficiência do zinco é o mais importante estado patológico envolvendo metabolismo relacionado a um metal. Devido à multiplicidade de funções do zinco, com envolvimento de vários sistemas do organismo, a sua deficiência pode manifestar-se com poucas alterações clínicas. Entre elas, uma leve anorexia, alteração do paladar, redução da atividade física e pré-disposição a infecções, podendo, no entanto, ocorrer evolução para quadros clínicos mais intensos, com retardo do crescimento e da puberdade, alterações imunológicas e anormalidades neurosensoriais<sup>2</sup>. A ingestão recomendada de zinco na dieta é de 8 mg/dia para mulheres e de 11 mg/dia para homens<sup>3</sup>.

A suplementação excessiva de zinco (50 mg por dia) pode inibir a absorção de cobre proveniente da dieta<sup>4</sup>. Além disso, a suplementação de 160 mg de zinco por dia, durante 16 semanas, foi associada à redução da concentração de lipoproteína plasmática de alta densidade (HDL) em homens<sup>5</sup>.

Em concentrações acima de 5,0 mg L<sup>-1</sup> confere sabor à água e uma certa opalescência a águas alcalinas e pode precipitar a secreção da mucosa produzida pelas brânquias dos peixes, que morrem por asfixia.

### 1.2- Métodos analíticos para determinação de Zinco

Diversos métodos são utilizados para determinação de zinco. A espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS), espectrometria atômica em forno de grafite (GFAAS), espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) ou voltametria são comumente usados. Os limites de detecção para zinco são reportados como sendo, geralmente, 8,0 ng

$\text{mL}^{-1}$  para o F AAS, cerca de  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  para GFAAS e  $0,05 - 1,3 \text{ ng mL}^{-1}$  para ICP-MS<sup>6</sup>.

Espectrometria de absorção atômica oferece muitas vantagens, como por exemplo, alta frequência analítica, baixo custo operacional, alta precisão e seletividade. Em contra partida esta técnica tem alguns inconvenientes como interferência química da matriz da amostra e alto limite de detecção (baixa sensibilidade). Entretanto esses problemas podem ser resolvidos utilizando-se algumas técnicas de pré-concentração, tais como precipitação, extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE)<sup>7-11</sup>.

### 1.3- Extração em fase sólida em um processo contínuo

A SPE, técnica de preparação de amostra utilizada neste trabalho, além de pré-concentrar a amostra, ainda elimina os interferentes da matriz<sup>12</sup>. As vantagens da SPE sobre a LLE são a facilidade de uso, alto fator de pré-concentração e flexibilidade na escolha do melhor sorvente para o analito a ser determinado. Entretanto, existem também alguns inconvenientes, como perda de seletividade devido a pré-concentração de outros metais presentes na amostra, que são minimizados pela alta seletividade da técnica utilizada (F AAS).

O procedimento convencional, fora de linha, para pré-concentração e separação, embora eficiente, é geralmente demorado e laborioso, requer grandes quantidades de amostra e reagentes e também é susceptível a contaminação e perda de analito. A busca de alternativas para diminuir o impacto ambiental sugerem que técnicas como injeção em fluxo<sup>13</sup> possuem muitas qualidades, entre elas um baixo consumo de reagentes produzindo um mínimo de rejeitos<sup>14</sup>.

Sistemas *on-line* com SPE tem envolvidas duas etapas: uma de pré-concentração e outra de eluição. Uma variedade de materiais como resinas quelantes poliméricas<sup>7,15,16</sup>, trocadores de íons, sílica funcionalizada<sup>1,7</sup>, alumina ativada, carvão ativado, fullerano e espuma de poliuretano (PUF), tem sido empregadas em SPE com detecção espectrométrica<sup>7</sup>.

A **Tabela 1** mostra uma comparação entre alguns procedimentos propostos para pré-concentração de zinco usando extração em fase sólida.

**Tabela 1** - Comparativo entre sorventes utilizados na SPE para pré-concentração de zinco<sup>7</sup>.

Sorvente	Amostra	EF	f (h <sup>-1</sup> )	LD (µg L <sup>-1</sup> )	R.S.D (%)	Deteccão
Silica C18	Água do mar	60	30	0,5	6,5	F AAS
PUF	Água natural	15	17	0,85	6,0	F AAS
Nb2O5-SiO2	Sangue	77	27	0,77	1,5	F AAS
Chelex-100	Água natural	50	6	-	-	F AAS
Chelex-100	-	50	60	0,04	3,2	F AAS
CPG-8Q	-	87	60	0,03	2,6	F AAS
Silica DPTH	Água do mar		40	1,7		ICP-OES
Amberlite XAD-2	Água natural	60	12	0,030	-	ICP-OES
CPPI	Água natural e água da torneira	49	20	0,08	4,0	ICP-OES
PUF	Matrizes biológicas	8	20	0,9	1,2	Espectrofotometria
Silica C18	Preparações farmacêuticas	-	45	10	3,3	Espectrofotometria
PUF Me-BTAb	Água natural	23	48	0,37	5,9	F AAS

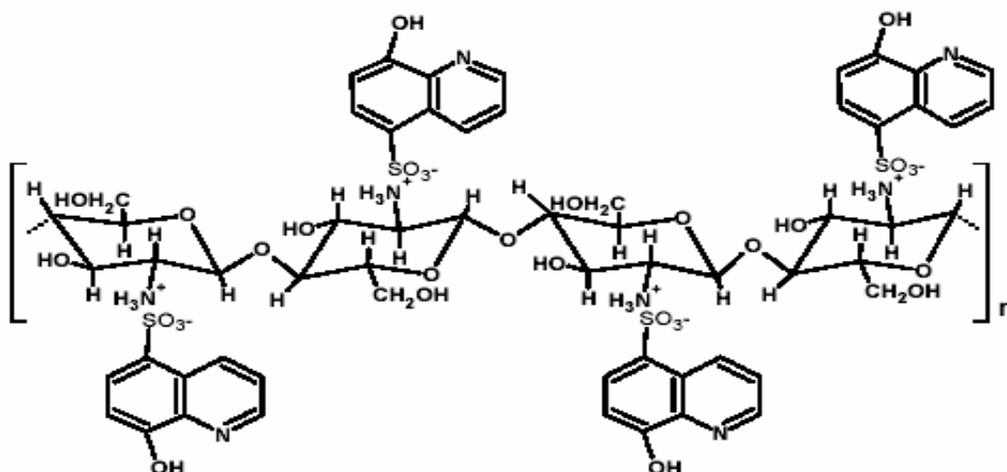
EF. Fator de enriquecimento; f. Freqüência analítica; CPPI, (isocianato poli(etilenimino)poli(metilenopolifenileno) carboximetilado); PUF, Espuma de poliuretano; DPTH, 1,5-bis(di-2-piridilmetileno tiocarbonohidrazina); F AAS, espectrometria de absorção atômica em chama; ICP-OES, espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado.

### 1.3.1 - Sorvente utilizado na SPE

O ácido 8-hidroxiquinolina 5-sulfônico, também conhecido como sulfoxina, é um ligante que tem como característica possuir nitrogênio básico e grupos

fenólicos, os quais são os sítios responsáveis pela complexação dos íons metálicos através da formação de um anel quelato. A resina quelante obtida pela imobilização do ligante sulfoxina via diazotização da quitosana (**Figura 1**) foi utilizada como sorvente para a pré-concentração e extração do zinco<sup>15</sup>. Essas resinas quelantes possuem grupos funcionais quimicamente ligadas a uma matriz polimérica.

A formação dos quelatos na fase sólida pode ser afetada por diferentes fatores, como a atividade química do grupo complexante, a natureza física da matriz polimérica, a carga do íon hidratado e o pH da solução.



**Figura 1** - Modelo estrutural da impregnação do ligante sulfoxina nas microesferas de quitosana.

#### 1.4- Uso da estatística para a otimização do método

Os métodos propostos pela química analítica são otimizados de forma univariada, onde uma variável é otimizada de cada vez. Desta forma esse processo requer um grande número de experimentos, tornando a otimização mais onerosa. Procedimentos envolvendo otimização multivariada<sup>1,17-20</sup> exigem menor

quantidade de experimentos e resultam em melhores resultados. Além disso, eles fornecerem uma correlação do comportamento de cada variável estudada em função das demais.

O planejamento fatorial completo é uma das técnicas quimiométricas mais freqüentemente aplicadas em otimização multivariada. Tem sido usado para avaliação preliminar da significância de variáveis. O número de experimentos (N) requeridos para isto é calculado como  $(N = 2^k)$ , ou  $(N = 2^k + 1)$  caso utilize-se de ponto central, onde k é o número de variáveis a serem otimizadas. É comum a utilização em conjunto de outra ferramenta da otimização multivariada, a matriz Doehlert. Este é um planejamento uniforme proposto por Doehlert em 1970 que tem sido muito usado em otimização de duas variáveis. Ela consiste de um ponto central e seis pontos formando um hexágono, situado em um círculo<sup>1,17-19</sup>. Como resultado final obtêm-se uma superfície de resposta que representa o sinal obtido em todas as combinações possíveis das variáveis dentro do planejamento fatorial estudado<sup>1,17-20</sup>.

Neste trabalho foi utilizado um modelo experimental de dois níveis completo e matriz Doehlert para a otimização das variáveis que afetam a pré-concentração de zinco em amostras aquosas utilizando espectrometria de absorção atômica em chama. Esta metodologia foi baseada na sorção de Zn no sorvente resultante da imobilização do ácido 8-hidroxiquinolina 5-sulfônico em microesferas de quitosana.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1- Objetivo Geral**

Uso da resina quelante obtida pela imobilização do ligante sulfoxina em microesferas de quitosana para determinação de zinco em amostras aquosas.

### **2.2- Objetivos Específicos**

- Elaborar um método de alta sensibilidade e frequência analítica para determinação de zinco em amostras aquosas;

- Otimizar, através de análise multivariada, as variáveis operacionais do sistema de pré-concentração;

- Determinar os parâmetros analíticos de mérito e validar o método proposto.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1- Instrumentação

Um espectrômetro de absorção atômica Varian SpectrAA 50 (Varian, Victória, Austrália), equipado com atomizador em chama, lâmpada de catodo oco (Hitachi HLA- 4S) e corretor de fundo lâmpada de Deutério foi usado para a determinação de zinco. As leituras de absorvância foram obtidas em área de pico e foram realizadas conforme as condições operacionais mostradas na **Tabela 2**. Uma bomba peristáltica da Ismatec - IPC, dotada de 8 canais e provida de tubos de Tygon® foi usada para bombear todas as soluções nas etapas de pré-concentração e eluição.

A digestão do material de referência certificado via digestão ácida auxiliada por microondas foi realizada em um forno de microondas MLS-1200 MEGA (Milestone, Sorisole, Itália), usando um programa recomendado pelo fabricante de cinco etapas. 2 minutos a 250 W, 2 minutos a 0 W, 6 minutos a 250 W, 5 minutos a 400 W e 5 minutos a 650 W, seguido por 5 minutos de ventilação.

**Tabela 2** - Parâmetros operacionais do espectrômetro de absorção atômica em chama.

Parâmetro	
Comprimento de onda (nm)	213,9
Corrente da lâmpada (mA)	5
Largura da fenda (nm)	1
Altura do queimador (mm)	7,5
Vazão de acetileno (L min <sup>-1</sup> )	1,5
Vazão de ar (L min <sup>-1</sup> )	10
Taxa de aspiração (mL min <sup>-1</sup> )	4,5

### 3.2- Reagentes

Todas as soluções foram preparadas empregando-se água deionizada proveniente de um sistema de purificação de água Milli-Q® da Millipore® (Bedford, MA, USA). Todos os reagentes usados foram de grau analítico. Toda a vidraria de laboratório foi lavada com detergente neutro, mantida durante uma noite em solução de ácido clorídrico 10% (v/v) e a seguir enxaguada com água deionizada.

Soluções de trabalho foram preparadas no dia de sua utilização, a partir de diluições adequadas de uma solução estoque de zinco  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  (Fluka, Suíça).

Soluções do tampão acetato foram preparadas pela mistura de ácido acético  $2 \text{ mol L}^{-1}$  e acetato de sódio  $2 \text{ mol L}^{-1}$  nas proporções adequadas. Soluções tampão Sörensen foram preparadas pela mistura de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $0.084 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0.067 \text{ mol L}^{-1}$  nas proporções adequadas. A concentração do tampão nas soluções foram de  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ .

Solução de ácido nítrico utilizada como eluente foi preparada pela diluição de ácido nítrico concentrado (Merck, Darmstadt, Alemanha) em água.

Amostra de água mineral comercial proveniente de Rio dos Bugres, Rancho Queimado-SC, material de referência certificado NIST 8414 Bovine Powder Muscle (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) e material de referência certificado NIST (SRM 1643e), elementos traços em água natural foram utilizados para verificar a exatidão do método proposto.

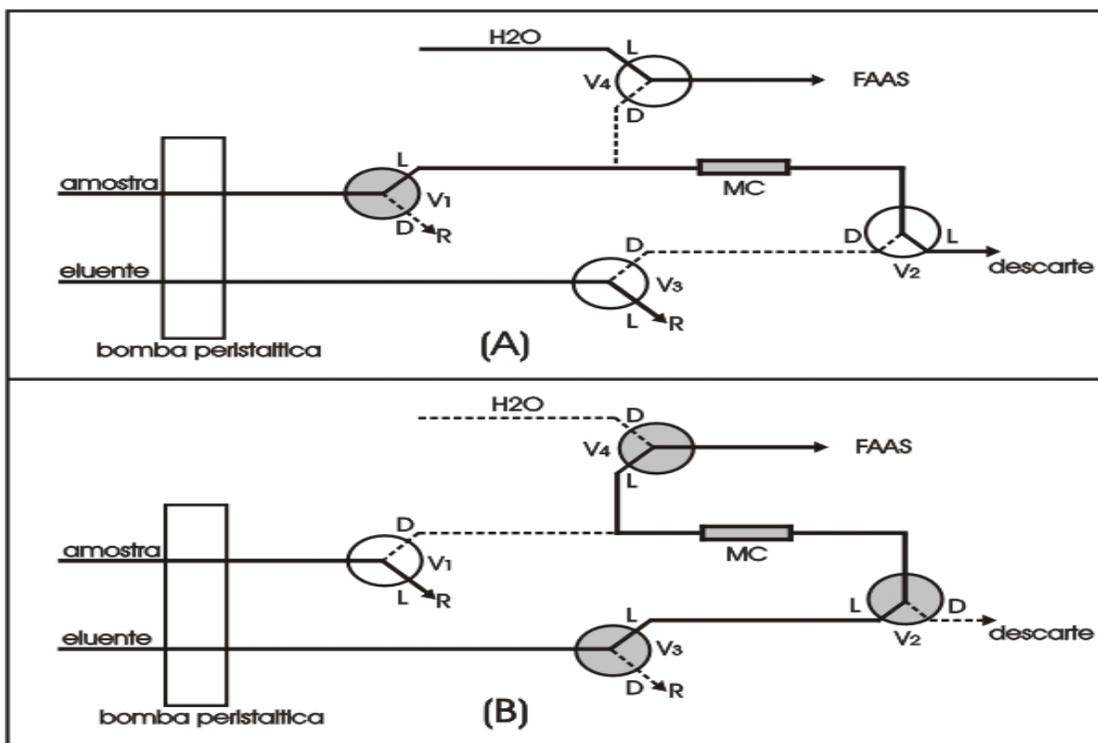
### 3.3- Sistema de pré-concentração em fluxo

A resina quelante obtida pela imobilização do ligante sulfoxina via diazotização da quitosana<sup>15</sup> foi aplicada em um sistema de pré-concentração em linha. O sistema FIA é composto de uma bomba peristáltica, quatro válvulas solenóides de três vias e uma mini-coluna de Teflon®, preenchida com 100 mg do material adsorvente, que foi acoplada ao espectrômetro de absorção atômica com chama, conforme mostra a **Figura 2**. A mini-coluna, com 110 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro interno, foi preenchida em ambas extremidades com lã de vidro, para evitar perda do sorvente, resultando em um comprimento útil de 75

mm. As quatro válvulas solenóides de três vias foram acionadas por um programa de computador escrito em Quick BASIC 4.5. As etapas de adsorção e dessorção dos analitos, no sistema de pré-concentração em linha, foram controladas por tempo.

O sistema de pré-concentração em linha foi otimizado pelo método multivariado<sup>1,17-20</sup>, com a finalidade de determinar as condições químicas e de fluxo ótimas para o analito em estudo. Na etapa de adsorção do analito pelo material adsorvente contido na mini-coluna (**Figura 2A**), a válvula  $V_1$  foi acionada, e as demais permaneceram desligadas. A solução de trabalho flui através da válvula  $V_1$ , mini-coluna e válvula  $V_2$ , respectivamente, sendo o efluente descartado. Neste estágio, ocorre a troca iônica na mini-coluna. Ao mesmo tempo o eluente, uma solução de  $\text{HNO}_3$ , é bombeada para o seu próprio frasco através da linha de retorno.

Na etapa de dessorção do analito ligado aos sítios ativos do material extrator (**Figura 2B**), a válvula  $V_1$  foi desligada e as válvulas  $V_2$ ,  $V_3$  e  $V_4$  foram acionadas pelo programa do computador. O eluente, uma solução de  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  percolou pelas válvulas  $V_2$ ,  $V_3$  e mini-coluna, respectivamente. O eluato, que é o eluente mais o analito, ao passar pela válvula  $V_4$ , foi introduzido diretamente no sistema nebulizador-queimador do espectrômetro. O fluxo do eluente passou pela mini-coluna no sentido inverso ao fluxo da solução de trabalho. As leituras dos sinais analíticos foram realizadas como área de pico. Como a linha de base variava com o decorrer do tempo, a leitura do branco era realizada previamente a cada medida. Todas as análises foram feitas em duplicata.



**Figura 2** - Sistema de pré-concentração em linha. (A): etapa de pré-concentração e (B): etapa de eluição. V: válvula, L: via aberta, D: via fechada, MC: mini-coluna contendo o adsorvente, R: retorno do fluxo da amostra ou eluente. Círculo hachurado: válvula ligada e círculo em branco: válvula desligada.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1- Características operacionais do sorvente utilizado

O sorvente utilizado é relativamente instável em altas vazões (acima de 6,5 mL min<sup>-1</sup>), principalmente com o aumento da força iônica, causando entumescimento excessivo e conseqüente perda de carga na coluna. Martins e colaboradores<sup>15</sup> propuseram a passagem de etanol pela coluna a cada ciclo analítico. No entanto uma alternativa a esse procedimento foi aumentar o volume morto da coluna, permitindo uma melhor acomodação do sorvente quando entumescido, evitando assim a perda de carga excessiva na coluna. Esse procedimento alternativo garantiu a reprodutibilidade da vazão e com isso também a do sinal analítico, que se apresentou com desvio padrão de 2,5% (100 µg L<sup>-1</sup>, n = 10).

### 4.2- Otimização das variáveis de pré-concentração

Primeiramente, foram realizados testes preliminares para verificar o comportamento da adsorção do zinco no sorvente, baseados em estudos feitos por Martins e colaboradores<sup>15</sup>, garantindo assim um bom sinal analítico. A otimização do sistema em linha foi feita pelo método multivariado usando planejamento fatorial completo ( $N = 2^k + 1$ , com  $k = 4$ , onde:  $N$  = número de experimentos e  $k$  = número de variáveis estudadas no processo). As quatro variáveis escolhidas foram: concentração do eluente (HNO<sub>3</sub>), vazão da amostra e eluente e pH da amostra. O 17º experimento foi possível pois todas as variáveis são quantitativas, possibilitando o uso de um ponto central, onde todas as variáveis são estudadas em seus valores médios, minimizando erros através de um melhor ajuste da função. Na **Tabela 3** estão dispostos os níveis mínimos e máximos utilizados para realizar os 17 experimentos.

**Tabela 3** - Níveis usados no planejamento fatorial das variáveis envolvidas na pré-concentração do zinco.

Variável	Mínimo (-)	Máximo (+)	Ponto Central
pH da amostra	4,0	8,0	6,0
Vazão da amostra (mL min <sup>-1</sup> )	4,2	6,2	5,2
Vazão do eluente (mL min <sup>-1</sup> )	4,2	6,2	5,2
Concentração do eluente (mol L <sup>-1</sup> )	0,5	1,5	1,0

Na **Tabela 4** estão dispostos os experimentos e a média da resposta analítica (absorvância), que foi realizada em duplicata.

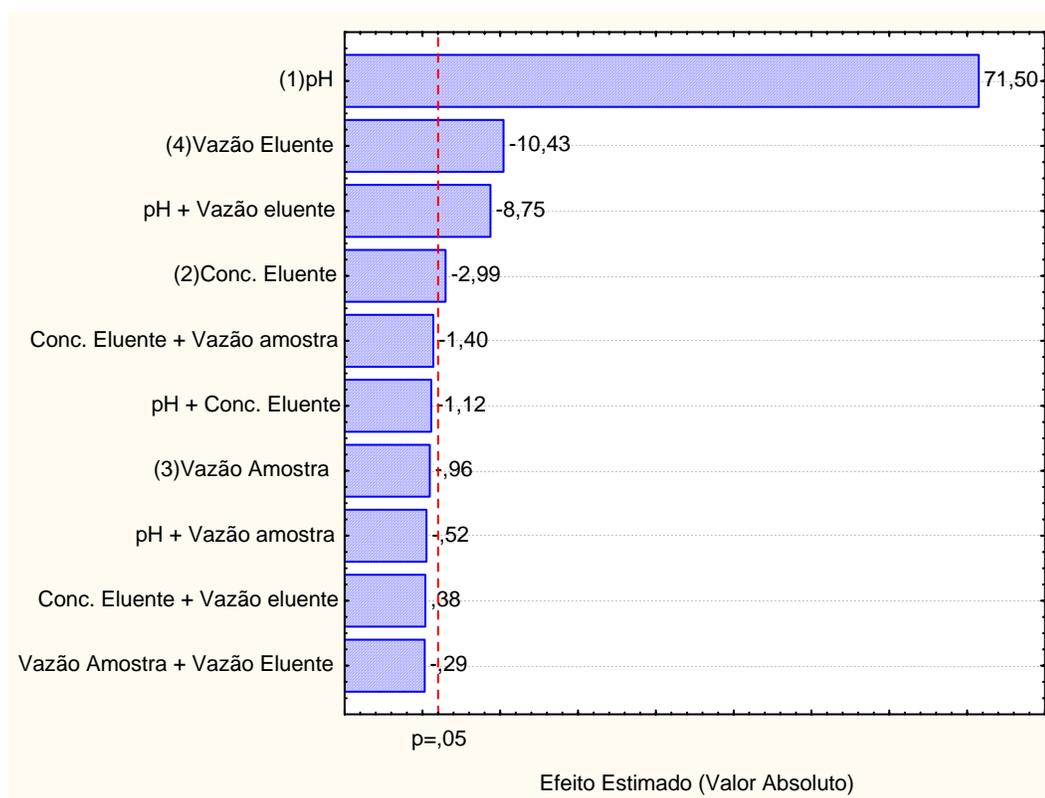
**Tabela 4** - Valores experimentais utilizados durante a otimização multivariada das variáveis envolvidas na pré-concentração do zinco.

Ensaio	pH da amostra	Concentração do eluente (mol L <sup>-1</sup> )	Vazão da amostra (mL min <sup>-1</sup> )	Vazão do eluente (mL min <sup>-1</sup> )	Absorvância integrada	Absorvância integrada
1	4	0,5	4,2	4,2	0,1602	0,1696
2	4	0,5	4,2	6,2	0,1079	0,1214
3	4	0,5	6,2	4,2	0,1527	0,1474
4	4	0,5	6,2	6,2	0,1064	0,1039
5	4	1,5	4,2	4,2	0,1026	0,1201
6	4	1,5	4,2	6,2	0,0818	0,0800
7	4	1,5	6,2	4,2	0,1037	0,0923
8	4	1,5	6,2	6,2	0,0632	0,0475
9	8,0	0,5	4,2	4,2	2,3854	2,3342
10	8,0	0,5	4,2	6,2	1,8404	1,8400
11	8,0	0,5	6,2	4,2	2,4415	2,3979
12	8,0	0,5	6,2	6,2	1,8580	1,8475
13	8,0	1,5	4,2	4,2	2,3316	2,2899
14	8,0	1,5	4,2	6,2	1,8338	1,8027
15	8,0	1,5	6,2	4,2	2,1997	2,2115
16	8,0	1,5	6,2	6,2	1,6789	1,6974
17 (Ponto Central)	6,0	1,0	5,2	5,2	0,8283	0,8379

A faixa de pH foi escolhida de acordo com estudos realizados com a resina quelante obtida pela imobilização do ligante sulfoxina via diazotização da quitosana para outros metais.

A partir dos resultados obtidos e usando análise de variância (ANOVA) e probabilidade estatística ( $p= 0,05$ ) foi construído o gráfico de Pareto para determinar a significância das variáveis e suas interações no sistema. Como condições iniciais do sistema FI-F AAS utilizou-se volume de amostra igual a 10 mL com concentração de zinco igual a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $1,53 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ )

A **Figura 3** ilustra o gráfico de Pareto, onde são observadas as variáveis e suas significâncias estatísticas.



**Figura 3** - Gráfico de Pareto para otimização das condições de pré-concentração de zinco em amostras aquosas utilizando absorvância como resposta analítica; efeito padrão das diferentes variáveis.

Foi definido como sendo estatisticamente significativas as variáveis pH e vazão do eluente, assim como a interação entre o pH e a vazão do eluente. Por

possuir uma significância estatística pequena e negativa quando comparado com o pH e vazão do eluente, a concentração do eluente foi mantido constante, em seu valor mínimo ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) para aumentar o tempo de vida útil do material sorvente e também economia de eluente. A vazão da amostra foi mantida em seu valor mínimo, ( $4,2 \text{ mL min}^{-1}$ ) para uma maior estabilidade do sistema em detrimento da frequência analítica.

A otimização final das variáveis pH e vazão do eluente foi realizada através do uso de matriz Doehlert. Os 7 experimentos feitos em duplicata requeridos pela matriz Doehlert são mostrados na **Tabela 5**.

**Tabela 5** - Matriz Doehlert utilizada na otimização do pH da amostra e da vazão do eluente para obtenção da superfície de resposta na determinação de zinco em amostras aquosas por FI-F AAS.

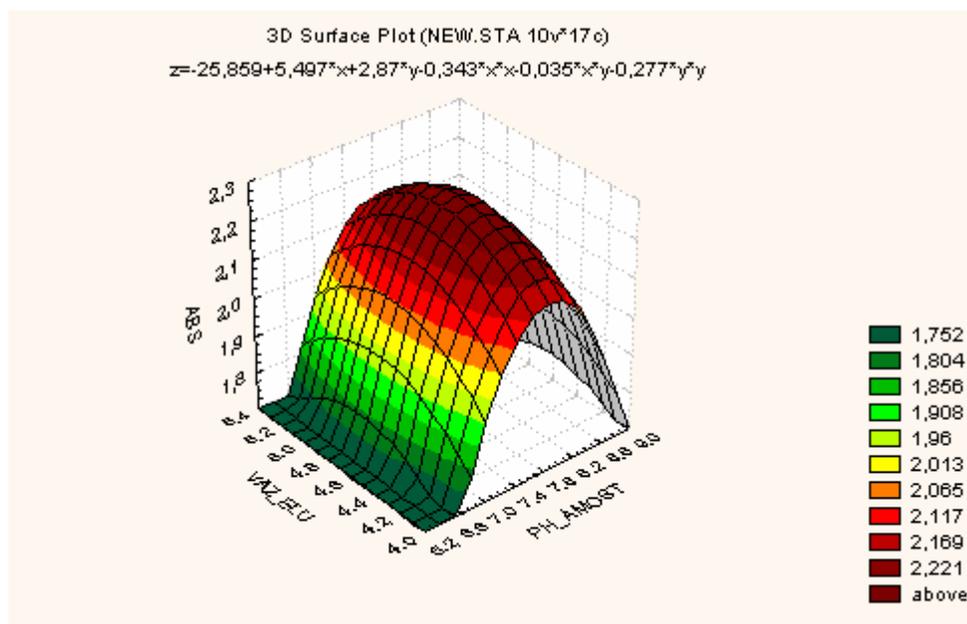
Ensaio	pH	Vazão do eluente ( $\text{mL min}^{-1}$ )	Absorvância Integrada
1	6,5	4,7	1,7538
2	7,0	5,2	1,9567
3	7,0	4,2	2,06
4	7,5	4,7	2,2711
5	8,0	5,2	2,2143
6	8,0	4,2	2,241
7	8,5	4,7	2,0512

A partir dos resultados obtidos com a matriz Doehlert gerou-se uma superfície de resposta regida pela equação 1:

$$Z = -25,859 + 5,497 \cdot \text{pH} + 2,87 \cdot \text{VE} - 0,343 \cdot \text{pH}^2 - 0,035 \cdot \text{pH} \cdot \text{VE} - 0,277 \cdot \text{VE}^2 \quad (\text{Eq 1})$$

Onde pH é o pH da amostra e VE é a vazão do eluente. As condições ótimas foram extraídas da superfície de resposta, no ponto onde a absorvância tem seu

máximo valor. O planejamento Doehlert demonstrou que as condições ótimas para um máximo de absorvância, a partir da superfície de resposta, foram pH igual a 7,8 e vazão do eluente igual a 4,7 mL min<sup>-1</sup>. A **Figura 4** mostra a superfície de resposta utilizada para otimização final do sistema FI-F AAS.



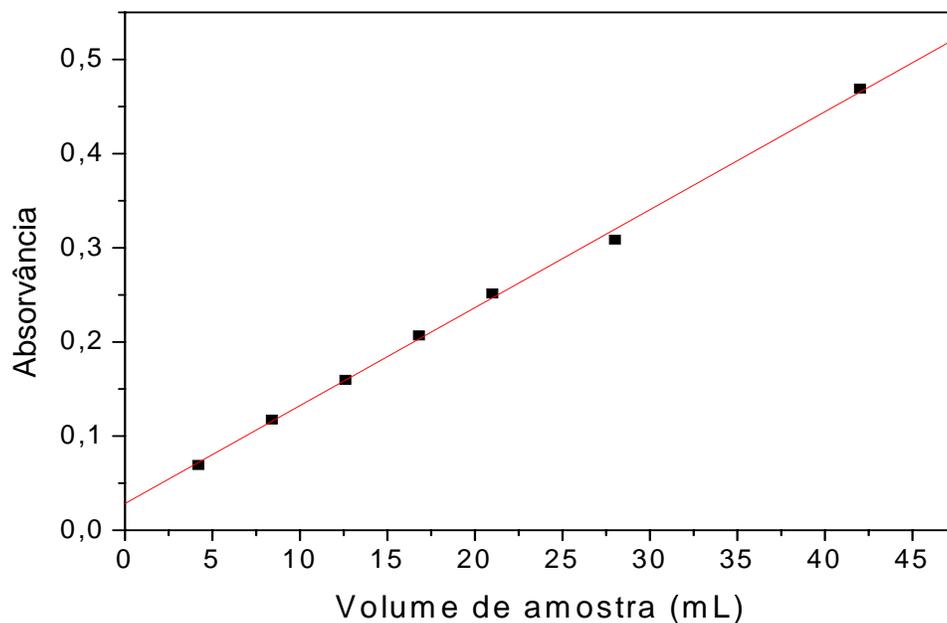
**Figura 4** – Superfície de resposta obtida a partir da matriz doehlert para a otimização do pH da amostra e da vazão do eluente na determinação de zinco em amostras aquosas por FI-F AAS.

#### 4.3- Estudo da variação do sinal versus volume de amostra

Utilizando-se as condições otimizadas fez-se um estudo da variação do sinal analítico em relação ao volume de amostra passada pela coluna durante a etapa de pré-concentração. Fixada a vazão de amostra, pode-se controlar o volume que percola através da coluna de acordo com o tempo de pré-concentração.

A variação do sinal analítico em função do volume de amostra pode ser visto na **Figura 5**. Demonstrou-se que com o aumento do volume ocorre um aumento linear do sinal analítico, na faixa de volume estudado, o que significa que a coluna ainda não está saturada e, em detrimento da frequência analítica, podemos

aumentar a sensibilidade do método apenas aumentando o volume de amostra a ser pré-concentrada.



**Figura 5** - Gráfico do estudo do volume de solução de zinco  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  a ser pré-concentrada. (Condições utilizadas: pH igual a 7,8; vazão da amostra igual a  $4,2 \text{ mL min}^{-1}$ ; vazão do eluente igual a  $4,7 \text{ mL min}^{-1}$ ; concentração do eluente igual a  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ).

Não houve necessidade de estudar até a saturação da coluna, pois um aumento exagerado do volume de amostra a ser pré-concentrada tornaria o método inviável devido a baixa frequência analítica.

#### 4.4- Parâmetros analíticos de mérito

Após a otimização do processo obteve-se os parâmetros analíticos de mérito. Os resultados podem ser vistos na **Tabela 6**.

**Tabela 6** - Parâmetros analíticos de mérito para determinação de zinco em amostras aquosas utilizando SPE e sistema FI-F AAS.

Limite de detecção (n=14)	0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$
Limite de quantificação (n=14)	2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$
RSD (25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ , n = 8)	2,7 %
Faixa linear*	2,5 - 75 $\mu\text{g L}^{-1}$
Coefficiente de correlação (R)	0,99951
Fator de enriquecimento (EF)	17,6
Frequência analítica**	18

\* Faixa linear de trabalho estudada \*\* amostras por hora

A curva de calibração foi obtida usando as condições ótimas de pré-concentração. A equação é dada por  $A = 0,01523 + 0,01986C$ , na qual A corresponde a absorvância e C corresponde à concentração de zinco na amostra ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). O limite de detecção (LOD) foi calculado como sendo  $3\sigma/\alpha$ , onde  $\sigma$  representa o desvio padrão do branco e  $\alpha$  representa o coeficiente angular da curva de calibração, já o limite de quantificação (LOQ) foi calculado como sendo  $10\sigma/\alpha$  enquanto que a precisão do método foi calculada como sendo o desvio padrão relativo de 8 medidas consecutivas em concentração de 25,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  de zinco.

Para o cálculo do fator de enriquecimento foi feito uma curva de calibração sem pré-concentração, a qual pode ser representada pela equação  $A = 0,07582 + 1,12778C$  ( $R = 0,99675$ ,  $N = 5$ ) obtida para uma faixa linear de 50 a 1750  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O fator de enriquecimento foi calculado como sendo a razão entre os coeficientes angulares das curvas de calibração com e sem pré-concentração.

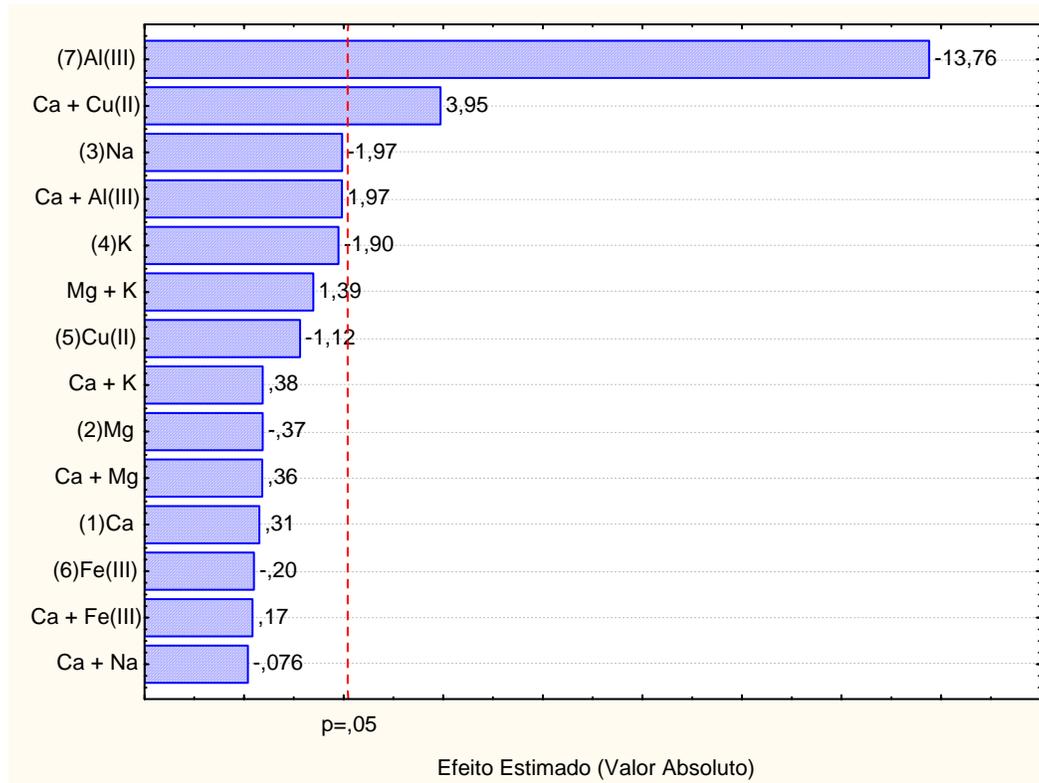
#### 4.5 - Estudo de interferentes na pré-concentração

Com as condições ótimas de trabalho e um volume de 10 mL de uma solução de zinco 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  foi estudado o efeito da presença dos íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,

$Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  e  $Al^{3+}$ , na concentração de  $10^{-4} mol L^{-1}$ , sobre a pré-concentração de zinco.

Geralmente o estudo de ions interferentes é feito univariadamente, adicionando à solução de trabalho uma concentração conhecida de apenas um cátion de cada vez. Desta forma o efeito de cada cátion é medido individualmente. Esse estudo, além de laborioso, não representa a realidade, onde diversos cátions estão presentes simultaneamente. Por essa razão nesse trabalho o estudo de interferentes foi realizado através de análise multivariada com planejamento fatorial fracionado,  $(2^{7-3} + 1)$  resultando um total de 17 experimentos.

A **Figura 6** ilustra o gráfico de pareto, onde são observadas os efeitos dos interferentes estudados, bem como o efeito de suas interações no sinal analítico.



**Figura 6** - Gráfico de Pareto para determinação da influência dos íons interferentes estudados usando absorvância como resposta analítica.

O gráfico de Pareto sugere que os íons  $\text{Ca}^{2+}$  ( $4,00\text{mgL}^{-1}$ ),  $\text{Mg}^{2+}$  ( $2,43\text{mgL}^{-1}$ ),  $\text{Na}^+$  ( $2,30\text{mgL}^{-1}$ ),  $\text{K}^+$  ( $3,91\text{mgL}^{-1}$ ),  $\text{Cu}^{2+}$  ( $6,35\text{mgL}^{-1}$ ), e  $\text{Fe}^{3+}$  ( $5,58\text{mgL}^{-1}$ ) não interferem sobre a pré-concentração de zinco. O resultado deste estudo mostrou que os mesmos não interferem no sinal analítico na concentração estudada ( $10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ ). Também sugere que, embora os íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  não interfiram isoladamente, quando presentes simultaneamente os mesmos geram um incremento significativo no sinal analítico.

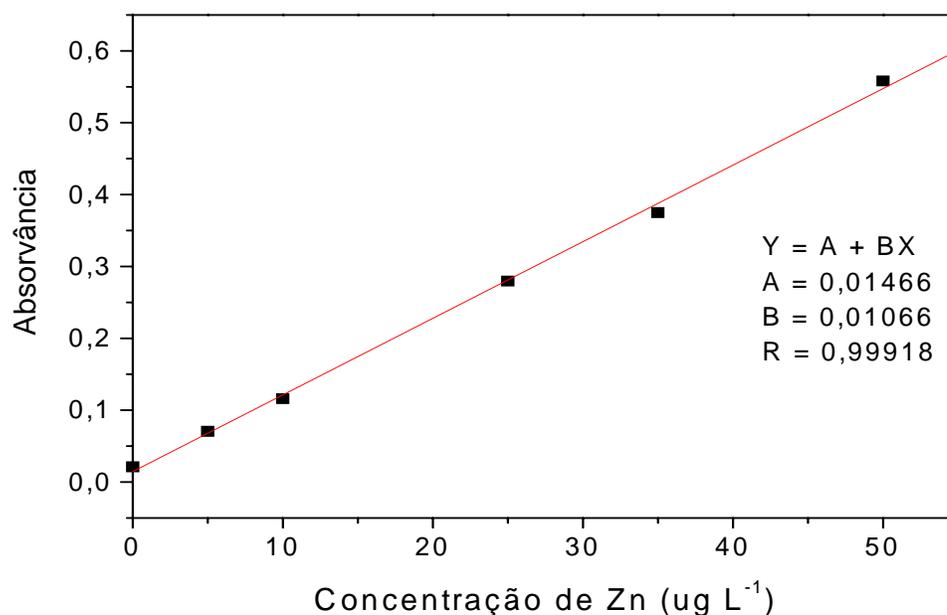
Foi verificado que o íon  $\text{Al}^{3+}$  ( $2,70\text{mgL}^{-1}$ ) exerce uma grande influência sobre a pré-concentração de zinco. O sinal analítico é severamente suprimido na presença deste íon, na concentração estudada. Entretanto as concentrações do íon  $\text{Al}^{3+}$  em amostras reais são muito inferiores ao valor estudado<sup>21,22</sup> e logo o íon não deve interferir na pré-concentração de zinco nas mesmas. O valor máximo de  $\text{Al}^{3+}$  em águas naturais, segundo a resolução 357 do CONAMA é de  $1,0\text{ mgL}^{-1}$ .

#### 4.6 - Determinação de zinco em amostra real

Na seqüência determinou-se a quantidade de zinco em uma amostra de água mineral proveniente de Rio dos Bugres, Rancho Queimado-SC. A concentração de zinco estava abaixo do limite de detecção do método proposto. A amostra foi fortificada com  $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  e a recuperação resultou em uma faixa de 85-93%.

#### 4.7 - Validação da metodologia

A análise de amostra certificada foi feita para que o método proposto pudesse ser validado. A **Figura 7** representa a curva de calibração utilizada para análise de material de referência certificado de pó de músculo bovino.



**Figura 7** - Curva de calibração para determinação de Zinco em material de referência certificado de pó de músculo bovino.

Os valores de absorvância obtidos na leitura da amostra certificada são mostrados na **Tabela 7**.

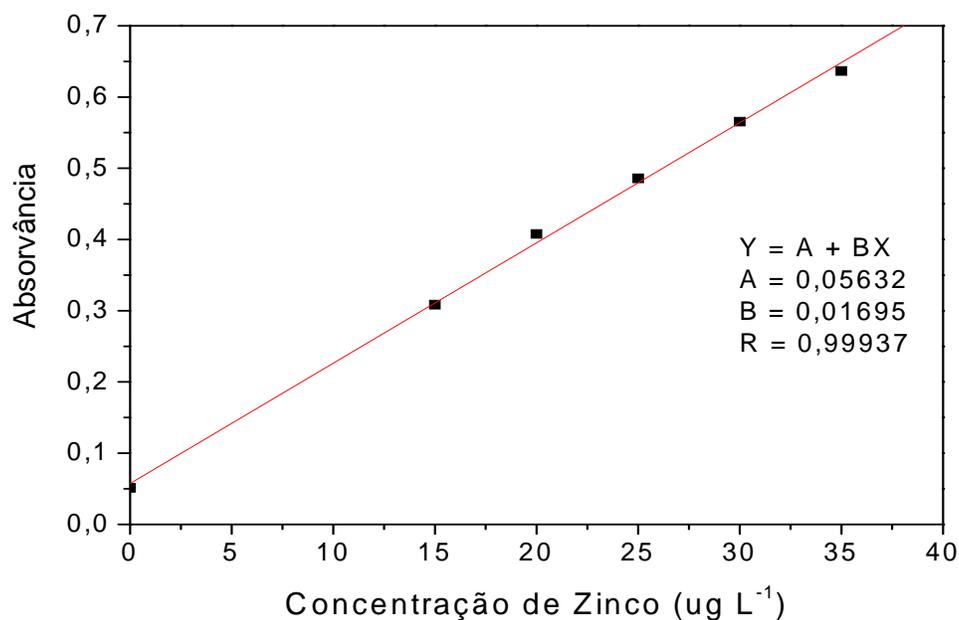
**Tabela 7** - Valores de absorvância obtidos para material de referência certificado de pó de músculo bovino

Ensaio	Absorvância
1	0,1244
2	0,1257
3	0,1297
4	0,1338

Os resultados foram submetidos ao teste  $Q_{90\%}$  sendo todos aceitos. O próximo passo foi converter o valor encontrado no valor real, considerando as

diluições feitas na amostra. Os resultados obtidos com intervalo de confiança da média de 95% foram comparados com os valores do material de referência certificado, NIST 8414 Bovine Powder Muscle, com concentração de zinco igual a  $142 \pm 14 \mu\text{g g}^{-1}$ , obtendo-se  $131,28 \pm 14 \mu\text{g g}^{-1}$ .

A Análise de um segundo material de referência certificado, desta vez de água natural foi também realizada. A **Figura 8** mostra a curva de calibração utilizada para determinar zinco no material de referência certificado de água natural.



**Figura 8** - Curva de calibração para determinação de Zinco em material de referência certificado de água natural.

Os valores de absorvância obtidos na leitura da amostra certificada são mostrados na **Tabela 8**.

**Tabela 8** - Valores de absorvância obtidos para material de referência certificado de água natural.

<b>Ensaio</b>	<b>Absorvância</b>
1	0,5292
2	0,5295
3	0,5371
4	0,5418

Os resultados foram submetidos ao teste  $Q_{90\%}$  sendo todos aceitos. Em seguida considerou-se a diluição feita na amostra para encontrar o valor real da amostra. Os resultados obtidos com intervalo de confiança da média de 95% foram comparados com os valores do material de referência certificado, elementos traços em água natural, NIST (SRM 1643e), com concentração de zinco igual a  $78,5 \pm 2,2 \mu\text{g L}^{-1}$ , obtendo-se  $70,52 \pm 1,4 \mu\text{g L}^{-1}$ .

## 5. CONCLUSÃO

O uso do sistema FI-F AAS mostrou-se eficaz, aumentando a sensibilidade sem onerar a frequência analítica, que é uma das principais vantagens do F AAS. O método de otimização multivariada apresentou bons resultados, fornecendo as condições ótimas de trabalho em um número reduzido de experimentos quando comparado com a otimização univariada, poupando reagentes e tempo.

O método apresentou frequência analítica adequada. O limite de detecção e o RSD obtidos são comparáveis aos valores encontrados na literatura<sup>7</sup> (tabela 1).

Observando a tabela 6 verifica-se um fator de enriquecimento menor que o da média da literatura. Entretanto para se comparar a sensibilidade de dois métodos temos que levar em conta, além do fator de pré-concentração, o erro entre as medidas. O parâmetro que fornece uma relação entre o sinal analítico e o erro é o LOD, e este apresentou-se comparável à literatura.

O sorvente apresentou estabilidade e tempo de vida suficiente para realização de todo o trabalho sem que ocorresse perda de eficiência.

Por fim, os resultados obtidos em análises de materiais de referência certificados indicam que a metodologia proposta para determinação de zinco em amostras aquosas apresenta boa exatidão.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. R. L. Dutra, H. F. Maltez, E. Carasek. **Development of an on-line preconcentration system for zinc determination in biological samples.** *Talanta* 69 (2006) 488–493.
2. Prasad A. S. **Zinc: An Overview.** *Nutrition* 1995;11:93-99.
3. P. Trumbo, A. A. Yates, Schlicker, M. Poos. *J Am Diet Assoc* 2001; 101:294-301.
4. P. Trumbo, A. A. Yates, Schlicker, M. Poos. **Reference Intakes: Vitamin A, vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and zinc.** *J Am Diet Assoc* 2001; 101:294-301.
5. P. L. Hooper, L. Visconti, P. J. Garry, G. E Johnson. **Zinc lowers high density lipoprotein cholesterol levels.** *J Am Med Assoc* 1980; 244:1960-1.
6. C. Terrés-Martos, M. Navarro-Alarcón, F. Martín-Lagos, R. Giménez-Martínez, H. López-García, M. C. López-Martínez. **Determination of zinc levels in waters from southeastern Spain by electrothermal atomic absorption spectrometry: relationship with industrial activity.** *Water Research* 36 (2002) 1912–1916, Granada, Spain.
7. V. A. Lemos, W. N. L. dos Santos, J. S. Santos, M. B. de Carvalho. **On-line preconcentration system using a minicolumn of polyurethane foam loaded with Me-BTABr for zinc determination by Flame Atomic Absorption Spectrometry.** *Analytica Chimica Acta* 481 (2003) 283–290.
8. V. Camel. **Solid phase extraction of trace elements.** *Spectrochimica Acta Part B* 58 (2003) 1177-1233.

9. A. Goswami, A. K. Singh. **1,8-Dihydroxyanthraquinone anchored on silica gel: synthesis and application as solid phase extractant for lead(II), zinc(II) and cadmium(II) prior to their determination by flame atomic absorption spectrometry.** *Talanta* 58 (2002) 669.
  
10. I.L. de Alcântara, P.S. Roldan, M.A.L. Margionte, G.R. Castro, C.C.F. Padilha, A.O. Florentino, P.M. Padilha, **Determination of Cu, Ni and Pb in Aqueous Medium by FAAS After Pre-Concentration on 2-Aminothiazole Modified Silica Gel.** *J. Braz. Chem. Soc.* 15 (2004) 366-371.
  
11. S. Saracoglu, L. Elci. **Column solid-phase extraction with Chromosorb-102 resin and determination of trace elements in water and sediment samples by flame atomic absorption spectrometry.** *Anal. Chim. Acta* 452 (2002) 77-83.
  
12. W. Ngeontae, W. Aeungmaitrepirom, T. Tuntulani. **Chemically modified silica gel with aminothioamidoanthraquinone for solid phase extraction and preconcentration of Pb(II), Cu(II), Ni(II), Co(II) and Cd(II)** *Talanta*, In Press, Corrected Proof, Available online 20 July 2006,
  
13. K. Pyrzynska, M. Cheregi, **Lead determination with on-line enrichment system** *Water Res.* 34 (2000) 4215.
  
14. R.S. Praveen, S. Daniel, T. P. Rao, S. Sampath, K. S. Rao. **Flow injection on-line solid phase extractive preconcentration of palladium(II) in dust and rock samples using exfoliated graphite packed microcolumns and determination by flame atomic absorption spectrometry.** *Talanta*, Volume 70, Issue 2, 15 September 2006, Pages 437-443.

15. A. O. Martins, E. L. da Silva, E. Carasek, M. C.M. Laranjeira, V. T. de Fávère. **Sulphoxine immobilized onto chitosan microspheres by spray drying: application for metal ions preconcentration by flow injection analysis.** *Talanta* 63 (2004) 397–403.
16. V. A. Lemos, P. X. Baliza, J. S. Santos, L.S. Nunes, A. A. de Jesus, M. E Rocha. **A new functionalized resin and its application in preconcentration system with multivariate optimization for nickel determination in food samples.** *Talanta* 66 (2005) 174–180
17. R. E. Santelli, M. A. Bezerra, O. D. de Santana, R. J. Cassella, S. L. C. Ferreira. **Multivariate technique for optimization of digestion procedure by focussed microwave system for determination of Mn, Zn and Fe in food samples using FAAS.** *Talanta* 69 (2006) 488–493.
18. W. N. L. dos Santos, C. M. C. Santos, S. L. C. Ferreira. **Application of three-variables Doehlert matrix for optimisation of an on-line pre-concentration system for zinc determination in natural water samples by flame atomic absorption spectrometry.** *Microchemical Journal* 75 (2003) 211–221.
19. S. L. C. Ferreira, H. C. dos Santos, M. S. Fernandes, M. S. de Carvalho. **Application of Doehlert matrix and factorial designs in optimization of experimental variables associated with preconcentration and determination of molybdenum in sea-water by inductively coupled plasma optical emission spectrometry.** *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 115-120.
20. M. Zougagh, P. C. Rudner, A. G. de Torres, M. C. Pavón. **Application of Doehlert matrix and factorial designs in the optimization of experimental variables associated with on-line preconcentration and determination of zinc by flow injection inductively coupled plasma optical emission spectrometry.** *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 1589-1594.

21. R. M. Tripathi, S. Mahapatra, R. Raghunath, A. V. Kumar, S. Sadasivan. **Daily intake of aluminium by adult population of Mumbai, India.** The Science of the Total Environment 299 (2002) 73–77

22. A. B. Tabrizi. **Cloud point extraction and spectrophotometric determination of aluminium and zinc in foodstuffs and water samples.** Food Chemistry 100 (2007) 1698–1703.