

CRISTIANE APARECIDA ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO INVERSO PARA  
DETERMINAÇÃO DE CITRATO E APLICAÇÃO EM SISTEMA DE LIBERAÇÃO  
CONTROLADA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS- BRASIL  
2015**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

A447d  
2015 Almeida, Cristiane Aparecida, 1988-  
Desenvolvimento de método espectrofotométrico inverso  
para determinação de citrato e aplicação em sistema de liberação  
controlada / Cristiane Aparecida Almeida. – Viçosa, MG, 2015.  
xxi, 104f. : il. ; 29 cm.

Orientador: André Fernando de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.99-104.

1. Química analítica. 2. Espectrofotometria. 3. Citrato.  
4. Cromo. 5. Fitorremediação. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-graduação  
em Agroquímica. II. Título.


CDD 22. ed. 543.45


CRISTIANE APARECIDA ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO INVERSO  
PARA DETERMINAÇÃO DE CITRATO E APLICAÇÃO EM SISTEMA DE  
LIBERAÇÃO CONTROLADA**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 24 de fevereiro de 2015.

  
\_\_\_\_\_  
Carlos Roberto Bellato

  
\_\_\_\_\_  
Ann Honor Munteer

  
\_\_\_\_\_  
Maria Eliana L.R. de Queiroz  
(Coorientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Antônio Augusto Neves  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
André Fernando de Oliveira  
(Orientador)

Dedico essa dissertação com todo meu amor aos grandes alicerces da minha existência, sem vocês nada disso seria possível. Maria Raimunda e José Mariano (*in memoriam*)...

“ Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

*(Madre Teresa de Calcuta).*

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder. Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver”

*(Martin Luther King).*

## **AGRADECIMENTOS**

Encerrando mais uma etapa com a certeza do dever cumprido, é hora de agradecer a todos que participaram dessa caminhada contribuindo com ensinamentos, dando força e me apoiando nos momentos tristes e felizes.

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar força no momento em que mais precisei me fortalecendo a encarar mais esse desafio. Por não me deixar desistir e por sempre me amparar nos momentos difíceis e quando parecia tudo perdido!!! Obrigada meu Deus!!!

Agradeço aos meus avós, Maria Raimunda e José Mariano (*in memoriam*), pela educação que me concederam, pelo apoio, pelo amparo e por sempre acreditar em meu potencial. Eu amo vocês! Mais essa vitória são por vocês!!! Mesmo você não estando mais aqui nesse mundo, Vô, tenho certeza que está orgulhoso de mim... obrigada por cuidar de mim sempre!!!

Agradeço aos meus pais por me concederem a vida!!! Embora não participem ativamente da minha trajetória, tenho certeza que sempre torceram por mim!!! Obrigada mãe!!!

Agradeço ao meu namorado Nilton por todo apoio, amor e companheirismo. Amo muito você! Obrigada por sempre acreditar que eu seria capaz e por me dar força quando achei que não tinha mais condições de continuar...

Obrigada a todos os meus familiares e aos meus amigos, em particular aos meus irmãos: Claudiane, Naiara, Junin e Carlim, pela confiança e admiração!

Agradeço imensamente ao meu orientador André Fernando, por aceitar me orientar, me incentivar e me apoiar sempre que precisei. Obrigada pelos ensinamentos e auxílios e por toda paciência. Obrigada por acreditar que eu seria capaz, por me encorajar diante dos obstáculos e pela enorme motivação...Obrigada por todo esse tempo de convivência que me proporcionaram crescimento tanto na área acadêmica quanto pessoal...Obrigada pelo apoio professor!!!

Agradeço a professora Maria Eliana e ao professor Antônio Augusto, pelos conselhos e sugestões, por todo incentivo e por me acolherem... Agradeço também ao professor Belatto pelos auxílios e por sempre procurar me ajudar quando precisei!!!

Agradeço a todos que fazem parte da família LaQuA: Renata, Fernanda, Cyntia, Nívia, Alessandra, Carlos, Bel, Raquel, Gleicy, Luiz Philip, Tháís, Alley, Adley, Camila, Mariane, Mariana, Luiz Felipe, Agatha e Francielle, pelo

companheirismo no trabalho e pelos momentos de descontração. Em especial à Isadora, Luiz Manoel, Laurence e Carlos Eduardo (Dudu), pela paciência, pelos ensinamentos e sugestões e por acolherem e se tornarem amigos que levarei pra sempre comigo...

Agradeço aos amigos do LaQuaM: Paloma, Jaderson, Zé Neto, Danilo, Renata, Junielly, Liany, Ana Paula, Marciano, pela convivência diária, pela enorme solidariedade comigo, pelos ensinamentos, pela amizade e por tornarem meus dias mais leves...Obrigada primos vizinhos!

Agradeço as amigas que fiz em Viçosa: Isa, Paloma, Kênia, Adriana, Meilene e Lorena, que me acolheram quando cheguei em Viçosa, momento em que mais precisei, momento em que me sentia sozinha...Obrigada meninas pelo apoio, ensinamentos e por me estenderem a mão amiga nos momentos difíceis...vou sentir muitas saudades!!!

Agradeço imensamente a Lorena Andrade e a Mayra por ter sido muito mais que uma amiga, por todo apoio quando precisei, por ter sido minha companheira de apartamento e me incentivado nos momentos em que mais precisei...obrigada amigas!!! Vocês fizeram toda diferença...

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela oportunidade!

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço imensamente aos membros da minha banca, professores: Ann, Belato, Maria Eliana e Totonho, pela enorme contribuição!

Na UFV não encontrei concorrentes, e sim amigos de jornada...Obrigada!

Enfim, agradeço a todos que participaram dessa trajetória, que pela presença, pela palavra ou pelo sorriso me deu coragem e determinação para traçar um caminho e buscar meus ideais, muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Nascida em 26 de janeiro de 1988 em Ubá, Minas Gerais, Brasil.

Filha de Nédia Aparecida de Almeida e de Sebastião dos Santos.

Concluiu o Ensino Médio, Escola Estadual Raul Soares em 2005.

Inicou graduação em Design de Produto – Bacharelado em 2007 na Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG) – Ubá e trancou o curso em fevereiro de 2009.

Em 2009, iniciou graduação em Química-Licenciatura na UEMG – Ubá, concluindo o curso em 2012, vindo a colar grau em fevereiro de 2013.

Em abril de 2013, iniciou o curso de mestrado em Agroquímica na Universidade Federal de Viçosa (UFV), titulando em 24 de feveferiro de 2015.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xvi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT .....	xx
JUSTIFICATIVA .....	1
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO .....	3
1. Fitoextração .....	3
2. Liberação controlada .....	4
2.1. Liberação controlada de medicamentos.....	4
2.2. Liberação controlada de insumos agrícolas .....	7
2.3. Polímeros em liberação controlada .....	8
2.4. Modelos cinéticos.....	8
3. Ligantes para fitorremediação .....	9
3.1.Ácido Cítrico .....	10
3.1.1.Determinação de ácido cítrico .....	12
4. Espectrofotometria inversa (descolorimetria) .....	13
5. Planejamento e otimização de experimentos .....	14
5.1. Matriz de Doehlert .....	15
OBJETIVOS .....	18
1.1.Objetivo geral .....	18
1.1.1.Objetivos específicos.....	18
PREPARO DE SOLUÇÕES .....	19
Soluções simples .....	19
Soluções Tampão .....	19
Soluções de Concomitantes:.....	19

Outras soluções: .....	19
CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE CITRATO BASEADO NA COMPETIÇÃO COM O COMPLEXO DE FERRO (II) -1,10-FENANTROLINA.....	23
1. Introdução .....	23
2. Materiais e Métodos .....	27
2.1. Parte Experimental .....	27
2.1.1. Medidas espectrofotométricas.....	27
2.2. Procedimento Geral .....	27
3. Resultados e Discussão .....	30
3.1. Comportamento espectrofotométrico .....	30
3.2. Otimização do método .....	41
4. Conclusões parciais .....	46
CAPÍTULO 3: MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO INVERSO BASEADO NA COMPETIÇÃO COM O COMPLEXO DE CROMO(III)-EDTA .....	47
1. Introdução .....	47
2. Procedimento geral .....	51
3. Procedimento do Método otimizado proposto .....	51
4.1. Otimização do método .....	52
4.1.1. Planejamento fatorial.....	52
4.1.2. Planejamento experimental baseado na Matriz de Doehlert .....	53
4.2. Estudo dos concomitantes .....	55
4.3. Uso de coluna quelante.....	55
4.4. Estudo de adição e recuperação .....	55
4.5. Figuras de mérito .....	56
4.6. Tratamento dos dados.....	56
5. Resultados e Discussão .....	56
5.1. Seleção do comprimento de onda ( $\lambda$ ) .....	56

5.2. Otimização do método .....	62
5.2.1. Tempo de Formação dos complexos cromo(III)-EDTA e de cromo(III) citrato	62
5.2.3. Planejamento fatorial $2^3$ com três pontos centrais.....	66
5.2.4. Superfície de Resposta .....	67
5.3. Estudo de concomitantes .....	70
5.4. Caracterização do Método Proposto - Figuras de Mérito .....	72
5.5. Ensaio de Recuperação .....	74
6. Conclusões parciais .....	78
CAPÍTULO 4: PROPOSTA DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE CITRATO.....	79
1. Introdução .....	79
2. Parte Experimental .....	79
2.1. Materiais e métodos .....	79
2.1.1. Preparo das matrizes de ágar-ágar .....	79
2.2. Sistema de liberação controlada .....	80
3. Equações químicas que descrevem a solução final .....	80
4. Monitoramento da liberação .....	81
5. Resultados e Discussão .....	82
5.1. Cinética de dissolução de sais de citrato não-encapsulados .....	82
5.2. Liberação controlada do citrato a partir de matriz de ágar-ágar .....	84
5.3. Estudo do sistema de liberação sustentado .....	86
5.4. Avaliação do ajuste dos modelos cinéticos as curvas de liberação até atingir o equilíbrio.....	89
5.5. Influência de cálcio e pH da solução de liberação no sistema de liberação modulado.....	91
6. Conclusões parciais .....	96
CONCLUSÃO GERAL .....	97
PERSPECTIVAS FUTURAS .....	98

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....99

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Diagrama esquemático da concentração de fármaco na corrente sanguínea em função do tempo para formulação convencional (1 dose e 2 doses regulares) e para liberação controlada. ....6
- Figura 2 - Vários tipos de nanocarriers farmacêuticas para administração de fármaco. (A) micro ou nanocápsula; (B) micro ou nanosfera; (C) Lipossomas; (D) Micela polimérica; (E) hidrogel, e (F) Dendrímero. (Fonte: LEE & YEO, 2015)....6
- Figura 3 – Mecanismo de liberação controlada por difusão. (A) Fertilizante encapsulado em matriz polimérica. (B) Água penetra a matriz polimérica. (C) dissolução do fertilizantes no interior da matriz. (D) Liberação controlada por difusão através da matriz. (Fonte: AZEEM *et al.*, 2014).....7
- Figura 4 - Estrutura do ácido cítrico. .... 11
- Figura 5 – Curvas de distribuição de espécies do ácido cítrico. (A) fração de equilíbrio em função do pH. (B) Log da fração de equilíbrio em função do pH do meio. (–) Espécie  $\alpha_0$ . (▲) Espécie  $\alpha_1$ . (○) Espécie  $\alpha_2$ . (■) Espécie  $\alpha_3$ . .... 11
- Figura 6 – Perfil de curva analítica típica de espectrofotometria inversa. .... 13
- Figura 7 - Planejamento Doehlert para duas variáveis: Hexágono (—) obtido pelo primeiro planejamento e hexágono (...) obtido utilizando pontos experimentais já explorados anteriormente (TEÓFILO & FERREIRA, 2006)..... 16
- Figura 8 – Representação da matriz de Doehlert para 3 variáveis. .... 16
- Figura 9 – Estrutura da 1,10-fenantrolina totalmente protonada. (Figura gerada no software ACD-Labs Chems sketch 12.0). .... 23
- Figura 10- Diagrama de distribuição de espécies do sistema ácido-base da 1,10 fenantrolina (frações de equilíbrio:  $\alpha_0$ : o-fenH<sub>2</sub><sup>2+</sup>;  $\alpha_1$ : o-fenH<sup>+</sup>;  $\alpha_2$ : o-fenH)..... 24
- Figura 11 – Diagrama de distribuição de espécies do equilíbrio de complexação do ferro(II) e 1,10 fenantrolina. Calculado para concentração nalítica de ferro(II) igual a  $2,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L..... 25
- Figura 12 – Estrutura espacial do complexo [(f<sub>3</sub>)<sup>2+</sup>]...... 25
- Figura 13 – Diagrama de distribuição de espécies do sistemas ácido-base de Bronsted para o ferro(II). .... 26
- Figura 14 - Diagrama Esquemático para o procedimento do método espectrofotométrico inverso (descolorimetria) baseado no complexo ferro(II)-1,10-fenantrolina. Os número representam etapa realizada e não estão associadas à ordem de adição dos reagentes. .... 27
- Figura 15 – Espectro da solução dos complexos [(f<sub>3</sub>)<sup>2+</sup>] ( $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ferro (II) e de 1,10-fenantrolina) em pH 6,0. .... 30
- Figura 16 – Regiões do espectro de solução equimolar de ferro(II)-1,10-fenantrolina em pH 6,0,  $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ferro(II)-1,10-fenantrolina em

diferentes concentrações de citrato: (▼) 0,0 mmol L<sup>-1</sup>; (□) 0,5 mmol L<sup>-1</sup>; (●) 1,0 mmol L<sup>-1</sup>; (△) 2,0 mmol L<sup>-1</sup>; (■) 3,0 mmol L<sup>-1</sup>; (○) 4,0 mmol L<sup>-1</sup> e (▲) 5,0 mmol L<sup>-1</sup>; (A) espectro em toda região de 190 a 1100 nm; região da banda em 201 nm; (B) em 267 nm e (D) em 512 nm.....33

Figura 17 – (A) Comportamento do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) considerando diferentes faixas analíticas de concentrações de: (□) 0,0 a 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, (●) 0,0 a 2,0 mmol L<sup>-1</sup>, (△) 0,0 a 5,0 mmol L<sup>-1</sup>. (B) Faixa analítica intermediária até 2,0 mmol L<sup>-1</sup>. (C) Curva analítica em (■)195 nm e outra em (□) 201 nm.....36

Figura 18- A caracterização da região ao redor de 267 nm. (A) Comportamento do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) em toda essa região de comprimentos de onda: (■) 0,0 a 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, (○) 0,0 a 2,0 mmol L<sup>-1</sup> e (△) 0,0 a 5,0 mmol L<sup>-1</sup>. (B) Comportamento da sensibilidade na região ao redor de 267 nm para uma faixa analítica de 0,0 a 2,0 mmol L<sup>-1</sup>.....38

Figura 19-- Curvas analíticas obtidas na região ao redor de 267 nm. (C) em 245 nm. (D) em 266 nm. ....39

Figura 20 - Comportamento do complexo com 1,10-fenantrolina na região de 512. (A) (■) comportamento do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) em toda essa região de comprimentos de onda e (□) comportamento da sensibilidade analítica de 0,0 a 5,0 mmol L<sup>-1</sup>. (B) Curvas analíticas de 0,0 a 5,0 mmol L<sup>-1</sup>:(■) 512 nm e (○) 500 nm.....40

Figura 21 - Coeficientes dos termos do modelo de regressão linear múltipla (Eq. 6): (A) Concentração de ferro (II); (B) pH; (C) Concentração de 1,10-fenantrolina. As barras de erro representam as estimativas do desvio-padrão de cada termo. ....43

Figura 22 - Coeficientes dos termos do modelo de regressão linear múltipla para a sensibilidade analítica após avaliação *Stepwise*. (A) Concentração de ferro (II); (B) pH; (C) Concentração de 1,10-fenantrolina. ....43

Figura 23 - Curva analítica obtida para concentrações de citrato variando de 0,0 a 1,0 mmol L<sup>-1</sup> em presença dos complexos de ferro (II)-1,10-fenantrolina (20,0 μmolL<sup>-1</sup> para concentrações de ferro (II) e 1,10-fenantrolina). ....44

Figura 24 – Curva analítica obtida para concentrações de citrato variando de 0,0 a 0,4 mol L<sup>-1</sup> em presença dos complexos de ferro(II)-1,10-fenantrolina (200,0 μmolL<sup>-1</sup> para concentrações de ferro (II) e 1,10-fenantrolina). ....44

Figura 25 – Curvas de distribuição de espécies do sistema ácido-base de Bronsted do cromo (III). (A) Fração de equilíbrio em função do pH. (B) Logaritmo da fração de equilíbrio em função do pH do meio. (■) Espécie  $\alpha_0$ . (○) Espécie  $\alpha_1$ . (▲) Espécie  $\alpha_2$ . (▼) Espécie  $\alpha_3$ . (◄) Espécie  $\alpha_4$ . ....47

Figura 26 – Estrutura do EDTA na forma totalmente protonada (H<sub>6</sub>EDTA<sup>2+</sup>) (Figura gerada no software ACD-Labs ChemsSketch 12.0).....48

Figura 27 – Curvas de distribuição de espécies do EDTA. (A) Fração de equilíbrio em função do pH. (B) Logaritmo da fração de equilíbrio em função do

pH do meio. (■) Espécie $\alpha_0$ . (○) Espécie $\alpha_1$ . (▲) Espécie $\alpha_2$ . (▽) Espécie $\alpha_3$ . (◀) Espécie $\alpha_4$ . (▷) Espécie $\alpha_5$ . (◆) Espécie $\alpha_6$ .....	49
Figura 28 – Proposta de coordenação pentadentada do EDTA com cromo (III) e uma molécula de água ocupando a sexta posição. Fonte: (SILVA, 2013). .....	49
Figura 29 – Diagrama de Distribuição das espécies $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})\text{EDTA}^-$ e $\text{Cr}(\text{OH})\text{EDTA}^{2-}$ .....	50
Figura 30 - Diagrama esquemático do procedimento do método otimizado proposto. Os números se referem às etapas do processo de diluição.....	52
Figura 31 – Espectro do complexo de cromo(III)-EDTA (concentrações de cromo (III) e EDTA de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). .....	57
Figura 32 – Espectro de absorção de solução de cromo (III) $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ .....	57
Figura 33 - Espectro de absorção do complexo cromo(III)- EDTA em regiões ao redor dos máximos de absorção na presença de diferentes concentrações de citrato. (A) 391 nm e (B) 543 nm. (●) $0,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; (△) $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; (■) $40,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; (○) $60,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e (▲) $80,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . .....	58
Figura 34 - Avaliação do comportamento analítico do complexo cromo(III)-EDTA na presença de citrato na região de 391 nm. (A) Função N9; (B) sensibilidade analítica. ....	59
Figura 35 - Avaliação do comportamento analítico dos complexos cromo(III)-EDTA na presença de citrato na região de 543 nm. (A) Função N9; (B) sensibilidade analítica. ....	60
Figura 36 – Curvas obtidas nos máximos de absorção para concentrações de cromo (III) e EDTA de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , concentrações de citrato variando de $0,0$ a $80,0 \text{ mmol L}^{-1}$ : (△) 391 nm e (●) 543 nm. ....	61
Figura 37 - Estudo ao longo do tempo de formação do complexo cromo(III)-EDTA, em (■) pH 3,0, (○) pH 4,0 e (▲) pH 5,0. ....	62
Figura 38-Comportamento da função $f(\text{pH})$ com o pH da solução. (■) complexo Cr(III)-EDTA; (○) complexo Cr(III)-citrato. ....	64
Figura 39 – Comportamento cinético do cromo(III)-EDTA para a concentrações analíticas de cromo (III) e EDTA igual a $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em presença de citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em soluções com valores de pH iguais a (■) 3,0; (○) 4,0 e (▲) 5,0.....	65
Figura 40 - Coeficientes dos termos do modelo de regressão linear múltipla para valores codificados. Aplicação da avaliação por <i>stepwise</i> : (A) sem avaliação (B) após avaliação. ....	66
Figura 41 – Superfície de resposta da Matriz de Doehlert sensibilidade mínima em função das concentrações de cromo (III) e EDTA.....	67
Figura 42 – Diagrama Esquemático do Planejamento da matriz de Doehlert com valores codificados das concentrações de cromo (III) e EDTA. (----) primeiro conjunto; (-.-.-) expansão da matriz. ....	68

- Figura 43 – Superfície de resposta da expansão da matriz de Doehlert, sensibilidade mínima em função das concentrações de cromo (III) e EDTA. ....69
- Figura 44 – Curva analítica para o método otimizado, com concentrações de citrato variando de 0,0 a 5,0 mmol L<sup>-1</sup>. .....73
- Figura 45 – Relação entre a concentração adicionada ao solo e a concentração encontrada .....76
- Figura 46 – Comparação entre a curva analítica (●), ou seja aquela obtida na otimização do método e a curva da adição de padrão (△), ou seja a curva construída com diferentes concentrações de citrato no solo.....77
- Figura 47 – (A) Dispositivos home-made utilizados para o corte dos *pellets* de ágar-ágar, espaçamento de 2,0 cm e espaçamento de 1,5 cm. (B) *Pellets* obtidos após corte da matriz de ágar-ágar utilizando dispositivos home-made. 80
- Figura 48 – Cinética da Dissolução de sais de citrato em 50,0 mL de água. (■) 66,0 mg de citrato de sódio em; (○) 890,0 mg citrato de cálcio.....83
- Figura 49 – Condutividade elétrica de solução formada pela adição de 66,0 mg citrato de sódio a partir (■) 6,0 *pellets* de ágar-ágar de 1,5 cm<sup>2</sup> de área; (○) do reagente sólido.....84
- Figura 50 - Ensaio de pulso de concentração para a solução formada pela adição de 66,0 mg citrato de sódio a partir 6,0 *pellets* de 1,5 cm<sup>2</sup> de área. ....85
- Figura 51 – Condutividade elétrica de solução formada pela adição de 890,0 mg citrato de cálcio a partir de, (○) 6,0 *pellets* de ágar-ágar de 1,5 cm<sup>2</sup> de área; (■) do reagente sólido.....85
- Figura 52 - Ensaio de pulso de concentração para a solução formada pela adição de 890,0 mg citrato de cálcio a partir 6,0 *pellets* de ágar-ágar de 1,5 cm<sup>2</sup> de área. ....86
- Figura 53 – Comportamento da condutividade elétrica de dois *pellets* de 6,0 cm<sup>2</sup> de área contendo 890,0 mg de citrato de cálcio, com diversos teores de ágar-ágar. (▲) ágar-ágar 1%; (○) ágar-ágar 2%; (■) ágar-ágar 3% e (△) ágar-ágar 5%. .....87
- Figura 54 – Comportamento da condutividade elétrica de 50 mL de solução contendo *pellets* de diversas áreas de ágar-ágar 2% contendo uma massa de citrato de cálcio de 890,0 mg. Áreas superficial total dos *pellets*: (●) 9,0 cm<sup>2</sup>; (△) 12,0 cm<sup>2</sup>; (■) 24,0 cm<sup>2</sup> .....87
- Figura 55 - Comportamento da condutividade elétrica de 5 mL de solução de citrato livre em comparação com o perfil de liberação de dois *pellets* de diferentes porcentagens de ágar-ágar de 6,0 cm<sup>2</sup> contendo uma massa de citrato de cálcio de 890,0 mg (▲) citrato de cálcio livre; (△) ágar-ágar 1%; (■) ágar-ágar 2%; (●) ágar-ágar 3% e (○) ágar-ágar 5%. .....88
- Figura 56 – Estudo de Pulso de Concentração em 50,0 mL de água com dois *pellets* de ágar-ágar de 6,0 cm<sup>2</sup>. O pulso foi causado pela retirada de 25,0 mL

da solução e adicionado 25,0 mL de água. (□) ágar-ágar 1%; (●) ágar-ágar 2%; (△) ágar-ágar 3% e (■) ágar-ágar 5%. .....89

Figura 57 - (A) Resíduo obtido após ajuste das curvas de liberação aos modelos cinéticos. (B) Porcentagem de resíduo obtido após o ajuste das curvas de liberação aos modelos cinéticos para seis *pellets* de ágar-ágar 2% de 1,5 cm<sup>2</sup> de área. (▲) Difusão intrapartícula, (■) Noyes – Whitney e (○) Pseudo 2<sup>a</sup> ordem. ....90

Figura 58 – (A) Resíduo obtido após ajuste das curvas de liberação aos modelos cinéticos. (B) Porcentagem de resíduos obtido após ajuste aos modelos aplicados a liberação de citrato em solução aquosa a pH 7,0 e 150,0 μmol L<sup>-1</sup> de Ca<sup>2+</sup>. (▲) Difusão intrapartícula, (■) Noyes – Whitney e (○) Pseudo 2<sup>a</sup> ordem. ....92

Figura 59 – Perfil de liberação de citrato em solução aquosa a um determinado pH e uma concentração de Ca(II). (●) Ensaio 1: pH 5,0 e Ca(II) 5,0 μmol L<sup>-1</sup>; (○) Ensaio 2: pH 7,0 e Ca(II) 5,0 μmol L<sup>-1</sup>; (△) Ensaio 3: pH 5,0 e Ca(II) 150,0 μmol L<sup>-1</sup>; (▲) Ensaio 4: pH 7,0 e Ca(II) 150,0 μmol L<sup>-1</sup>; (■) Ensaio 5: pH 6,0 e Ca(II) 77,5 μmol L<sup>-1</sup>; (□) Ensaio 6: pH 6,0 e Ca(II) 77,5 μmol L<sup>-1</sup> e (▼) Ensaio 7: pH 6,0 e Ca(II) 77,5 μmol L<sup>-1</sup>. ....93

Figura 60 – Diagrama de Pareto para avaliação da influência das variáveis sobre a concentração no equilíbrio de citrato. ....94

Figura 61 - Diagrama de Pareto para avaliação da influência das variáveis sobre a constante de velocidade “k”. ....95

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações dos compostos e das soluções para preparo das soluções simples.....	21
Tabela 2 - Informações dos compostos e das soluções para preparo das soluções tampões.....	21
Tabela 3 - Informações dos compostos e das soluções para preparo das soluções de concomitantes.....	22
Tabela 4 – Valores codificados das concentração de ferro(II) (A); pH (B) das concentração de 1,10-fenantrolina (C) utilizados no planejamento de experimentos e seus respectivos valores experimentais.....	29
Tabela 5 – Variáveis utilizadas no planejamento fatorial completo $2^3$ e seus respectivos níveis estudados, com seus valores reais e seus codes.....	52
Tabela 6 - Experimentos do planejamento fatorial completo de $2^3$ com ponto central. ....	53
Tabela 7 – Descrição dos experimentos do Planejamento Experimental baseado na Matriz de Doehlert para duas variáveis, usando valores codificados ( <i>codes</i> ) e seus respectivos valores reais. (A) Concentração de cromo (III) e (B) concentração de EDTA.....	54
Tabela 8 – Parâmetros de avaliação do ajuste da curva analítica nos comprimentos de onda de máxima absorção. Coeficiente de determinação ( $R^2$ ), desvio padrão dos resíduos ( $s_{res}$ ), sensibilidade mínima ( $S_{min}$ ).....	61
Tabela 9- Valores do logaritmo da constante condicional de estabilidade do complexo cromo(III)-EDTA, sem correção pelos coeficientes de atividade e considerando 25 °C e $\log \beta_1^T$ igual a 23,4.....	63
Tabela 10 – Logaritmo das frações de equilíbrio e da função $f(pH)$ nos pH 3,0;4,0 e 5,0.....	64
Tabela 11 – Proporção da concentração mínima do concomitante que causam interferência, em relação à concentração de cromo (III) igual a 4,25 mmol L <sup>-1</sup> , EDTA 5,1 mmol L <sup>-1</sup> para as concentrações de citrato iguais a 5,0 mmol L <sup>-1</sup> .....	70
Tabela 12 – Proporção da concentração mínima do concomitante, após passagem coluna com resina Chelex <sup>®</sup> 100 (Bio-Rad), em relação à concentração de cromo (III), para as concentrações de citrato igual a 5,0 mmol L <sup>-1</sup> .....	71
Tabela 13 – Proporção da concentração mínima do concomitante que causa interferência, em relação à concentração de citrato igual a 0,5 mmol L <sup>-1</sup> e 5,0 mmol L <sup>-1</sup> e concentrações de cromo (III) e de EDTA igual a 4,25 e 5,1 mmol L <sup>-1</sup> , respectivamente.....	72
Tabela 14 – Limite de Detecção e Limite de Quantificação calculados utilizando três maneiras distintas de estimar o desvio-padrão do branco.....	74

Tabela 15 – Valores referentes aos estudos de adição e recuperação de citrato e a porcentagem de recuperação obtida.....	75
Tabela 16 – Variáveis utilizadas no planejamento fatorial $2^2$ e seus valores para níveis.....	81
Tabela 17 - Ensaio do planejamento fatorial completo $2^2$ com três pontos centrais.....	82
Tabela 18 - Valores da constante de velocidade em função da porcentagem de ágar-ágar e área superficial de contato dos <i>pellets</i> . ....	91
Tabela 19 – Parâmetros do modelo de Noyes-Whitney em função do pH do meio e da concentração de cálcio.....	92

## RESUMO

ALMEIDA, Cristiane Aparecida. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2015. **Desenvolvimento de método espectrofotométrico inverso para determinação de citrato e aplicação em sistema de liberação controlada.** Orientador: André Fernando de Oliveira. Coorientadores: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e Antônio Augusto Neves.

O Citrato é um ligante polidentado muito importante na complexação de metais. No solo pode também ser usado como agente quelante em fitoextração. Desse modo, sua determinação em solução e em solo é muito importante para a otimização de sistemas de liberação controlada. Assim, foi desenvolvido um método espectrofotométrico inverso baseado na relação entre a concentração analítica de citrato no meio e a diminuição da absorbância do complexo. Foi estudado inicialmente o complexo de Fe(II)-ortofenantrolina. Entretanto, mesmo otimizando as condições, a sensibilidade não foi adequada. Foi necessário trabalhar em uma faixa analítica formada por concentrações mais elevadas do analito. Desse modo, julgou-se adequado a seleção de outro complexo colorido para a obtenção de um método adequado para a determinação de citrato. Para isso estudou-se o complexo cromo(III)-EDTA. As curvas analíticas apresentaram comportamento quadrático de maneira que, na otimização, foi utilizada a sensibilidade analítica mínima como resposta. Para seleção dos termos significativamente diferente de zero foram utilizadas regressões lineares múltiplas tipo *stepwise*. Um planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central foi realizado para avaliar a influência do pH, concentração de cromo(III) e EDTA no meio. Apenas as duas últimas variáveis foram significativas considerando os intervalos das variáveis. Um planejamento baseado na matriz de Doehlert, para essas duas variáveis com 3 pontos centrais foi realizado. Após aplicar uma expansão da matriz o ponto ótimo foi: concentração de Cr(III)  $4,2 \text{ mmol L}^{-1}$  e de EDTA,  $5,1 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 4,0. O método otimizado apresentou um bom ajuste  $R^2=0,998$  e desvio padrão dos resíduos igual 0,0085, na faixa analítica de  $0,29 \text{ mmol L}^{-1}$  a  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . O desvio padrão relativo (N=7) foi inferior a 1,71%. Os limites de detecção e de quantificação foram  $0,087$  e  $0,29 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente. Ensaios de adição e recuperação de citrato em amostras de solo apresentaram recuperações entre 98,0% e 122,0%. Foi proposto um sistema de liberação modulada por equilíbrio de precipitação. Foi avaliada a influência do pH e

da concentração de cálcio na solução receptora do sistema de liberação modulada. A concentração de citrato na solução desse sistema foi determinada pelo método espectrofotométrico baseado na competição do ligante com o complexo Cr(III)-EDTA. Para caracterizar o mecanismo de liberação, foram aplicados modelos cinéticos de pseudo 2ª ordem, Noyes-Whitney e difusão intrapartícula, sendo que o modelo de Noyes foi o que apresentou o melhor ajuste, constatando que a liberação ocorre por processos de difusão. Em todas as condições testadas, as concentrações de citrato atingiram o equilíbrio após 25 horas de liberação, observando-se diferentes taxas de liberação do citrato de acordo com as condições experimentais. A influência das variáveis foi avaliada por ANOVA, com nível de confiança de 95% usando a concentração de citrato no equilíbrio como resposta. O pH e a concentração de cálcio não influenciaram significativamente a taxa de liberação, assim como a interação entre os dois fatores.

## ABSTRACT

ALMEIDA, Cristiane Aparecida. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Development of spectrophotometric method for determination of citrate in the study and application of controlled release.** Adviser: André Fernando de Oliveira. Co-Advisers: Maria Eliana Ribeiro Lopes de Queiroz and Antônio Augusto Neves.

Citrate is an important polydentate ligand for complexation of metals. It can also be used as chelating agent in phytoextraction in soil. Thus, determination in solution and soil is very important for the optimization of controlled release systems. Therefore, it was developed a inverse spectrophotometric method based on the relationship between citrate concentration and decreasing absorbance of the complex. It was initially studied Fe(II)-1,10-phenantroline complex. However, even with optimization, the analytical sensitivities obtained were not high enough, it was necessary to work in an analytical range with higher concentrations of analyte. Thus, it was considered appropriate to select another colored complex to obtain an adequate method for determination of citrate. Thereby, it was studied Cr(III)-EDTA complex. In the optimization, analytical curves presented quadratic behavior, it was used the minimum analytical sensitivity. For selection of terms significantly different from zero were used linear regressions multiple *stepwise*. A  $2^3$  factorial design was made with a central point to evaluate the influence of pH, chromium(III) concentration and EDTA. Considering the ranges of the variables, only the last two variables were significant. A planning based on Doehlert matrix for these two variables with 3 central points was performed. After to apply a matrix expanding the optimum concentration was: concentration of Cr(III)  $4.2 \text{ mmol L}^{-1}$  and EDTA,  $5.1 \text{ mmol L}^{-1}$  at pH 4.0. The optimized method display a good adjustment  $R^2 = 0.998$  and standard deviation of residues equal to 0.0085, analytical range between  $0.29 \text{ mmol L}^{-1}$  to  $5.0 \text{ mmol L}^{-1}$ . The relative standard deviation (N = 7) was less than 1.71%. The limits of detection and quantification were 0.087 and  $0.29 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectively. Recovery citrate test in soil samples presented recoveries between 98,0% and 122,0%. One modulated delivery system by precipitation equilibrium has been proposed. The influence of pH and calcium concentration in the receptor solution modulated delivery system was evaluated. The concentration of citrate in the solution of the system was determined

by the spectrophotometric method based on the competition between the ligand and Cr(III)-EDTA complex. To characterize the releasing mechanism were applied kinetic models of pseudo 2nd order, Noyes-Whitney and intraparticle diffusion, and the Noyes model showed the best fitting, noting that the release occurs by diffusion processes. In all conditions tested, the citrate concentrations reached equilibrium after 25 hours of release, observing different release rates of citrate according to the experimental conditions. The influence of the variables was evaluated by ANOVA with 95% confidence level using the citrate concentration at equilibrium as a response. The pH and the calcium concentration did not influence the rate of release as well as the interaction between the two factors.

## JUSTIFICATIVA

Algumas substâncias em elevadas concentrações tanto no organismo, quanto no meio ambiente podem ser tóxicos ocasionando problemas. A remediação de ambientes contaminados, por exemplo por metais em concentrações tóxicas é um problema bastante atual, seja devido ao passivo ambiental existente devido à excessos do passado ou mesmo à contaminação atual por fontes diversas. Dentre os diversos tipos de remediação, fitoextração é um processo brando, não exigindo remoção do solo ou destruição de sua microbiota do solo. Ela é baseada na absorção mais eficiente de metais tóxicos, na forma de complexos, por plantas chamadas de hiperacumuladoras. Entretanto, a presença de ligantes polidentados, em particular aqueles sintéticos, têm sido motivo de preocupação, pois seu excesso no solo pode levar à solubilização mais rápida do que a absorção dos complexos por plantas. Assim, esses metais tóxicos poderiam contaminar lençóis freáticos ou aquíferos com a percolação da solução do solo rica nesses metais.

Desta forma, os ácidos orgânicos de baixa massa molar, por serem biodegradáveis, constituem uma alternativa potencialmente viável como ligante. Além disso, a liberação controlada do ligante polidentado no solo surge como uma alternativa de evitar essa disponibilização de quantidades excessivas do metal, visto que a liberação ocorre lentamente, mantendo a concentração de ligante em um valor baixo o suficiente para que a taxa de absorção por plantas seja similar à taxa de dissolução dos metais evitando assim superdosagens e possibilitando economia do produto.

Entretanto, devido à variações no volume de solução de solo associado à chuvas, irrigações, etc., é desejável que o sistema de liberação controlada tenha uma característica adicional em relação a sistemas de liberação controlada, por exemplo em organismos, ou seja, é necessário a liberação seja interrompida quando uma concentração limite de ligante esteja no meio.

Dentre os ácidos orgânicos de baixa massa molar, o ácido cítrico, na sua forma totalmente desprotonada (citrato) foi escolhido devida ao comportamento adequado do citrato como ligante, com elevadas constantes de estabilidade. Além disso, é um produto biodegradável e com baixos riscos no manuseio, sendo inclusive utilizado na indústria farmacêutica e de alimento.

A determinação de citrato em baixas concentrações é um desafio, devido às suas características químicas. Entretanto, para o seu estudo de liberação controlada foi necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para sua determinação. Para a determinação por espectrofotometria inversa foram testados dois sistemas químicos, o sistema ferro(II)-fenantrolina e o sistema cromo(III)-EDTA.

## CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

### 1. Fitoextração

Os metais estão presentes nos solos como componentes naturais, devido, por exemplo, ao intemperismo de rochas, ou como poluentes, a atividades antrópicas tais como: a queima de combustíveis fósseis, mineração, decomposição de resíduos domésticos e industriais, adição de fertilizantes ao solo (GARBUSU & ALKORTA, 2001; MEERS *et al.*, 2009).

De acordo com suas concentrações no solo e exigência em processos metabólicos, os metais podem ser considerados tóxicos, nutrientes ou inertes para as plantas (ALLEN *et al.* 1994; KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 2001; SURRIYA *et al.*, 2015). Muitos metais, em concentrações adequadas são nutrientes para as plantas e em concentrações excessivas podem ser tóxicos, enquanto que outros não participam de nenhum processo metabólico.

A fitorremediação é um processo no qual se utiliza plantas para remover poluentes do meio ambiente ou para torná-los inofensivos, promovendo a recuperação do solo ou de águas naturais (CUNNINGHAM & BERTI, 1993; CUNNINGHAM *et al.*, 1995; SURRIYA *et al.*, 2015). Há vários anos vem sendo considerada uma estratégia promissora para a recuperação de ambientes poluídos (GARBUSU & ALKORTA, 2001; SURRIYA *et al.*, 2015).

Dentre os processos de fitorremediação, podem ser citados: a fitoextração, fitofiltração, fitoestabilização, fitovolatilização e fitodegradação (GARBUSU & ALKORTA, 2001; SURRIYA *et al.*, 2015). A fitoextração é uma técnica que visa a remoção de metais tóxicos do solo utilizando espécies de plantas capazes de acumular esses metais, sendo chamada de plantas hiperacumuladoras (LAMBRECHTS *et al.*, 2011; BHARGAVA *et al.*, 2012; SURRIYA *et al.*, 2015). Essas plantas absorvem os metais, que usualmente são acumulados em seus vacúolos, desintoxicando suas raízes. Possuem como características, crescimento lento e produzem uma menor quantidade de biomassa, o que não supre a necessidade do processo (SURRIYA *et al.*, 2015).

Em muitos casos, a biodisponibilidade desses metais para fitoextração é limitado, ou seja, suas concentrações são baixas na solução do solo, de modo que para melhorar a absorção dos mesmos pelas raízes das plantas, uma das alternativas é o uso de quelantes nos solos que aumentarão a concentração total do

metal na solução do solo, deslocando equilíbrios de precipitação (LAMBRECHTS *et al.*, 2011; BENNERDSEN *et al.*, 2012). Assim, o sucesso da utilização dos quelantes para absorver metais depende de fatores como a disponibilidade de metal para a absorção e a capacidade da planta absorver e acumular metais nas suas partes aéreas (BHARGAVA *et al.*, 2012).

Entretanto, a adição de quelantes no solo pode ter impactos negativos (LAMBRECHTS *et al.*, 2011, BENNERDSEN *et al.*, 2012), podendo assim aumentar a lixiviação de metais tóxicos, ou seja aumentam a concentração analítica dos metais na solução do solo de modo que possam ser transportados até o lençol freático ou aquíferos (VANGRONSVELD *et al.*, 2009; BENNERDSEN *et al.*, 2012; YUAN & VANBRIESEN., 2006). Além disso, por exemplo, o EDTA, que é um ótimo ligante, mas que possui uma elevada persistência ambiental em solos, sendo considerado recalcitrante, pode, portanto, permanecer no solo indefinidamente, e assim, continuar a dissolver e aumentar a concentração dos metais mesmo após a remoção das plantas hiperacumuladoras (MEERS *et al.*, 2005; SCHMIDT *et al.*, 2004).

Desta maneira, para a utilização de quelantes em fitoextração devem levar em consideração os impactos causados pelo mesmo, de modo que a utilização de quelantes biodegradáveis pode ser uma alternativa viável do ponto de vista ambiental.

## **2. Liberação controlada**

### **2.1. Liberação controlada de medicamentos**

Os primeiros estudos de liberação controlada foram realizados com fármacos, com objetivo de minimizar os efeitos colaterais relacionados com a administração de doses excessivas do medicamento, assim como diminuir os custos (FOLKMAN & LONG, 1964).

As aplicações convencionais de fármacos visam manter os medicamentos em uma faixa de concentração no corpo em que sejam eficazes, porém o fármaco, após aplicado (via oral, intradérmica, etc.) apresenta um aumento da concentração na corrente sanguínea, atingindo um máximo e após algum tempo há seu declínio, uma vez que, devido ao processos fisiológicos que consomem o fármaco através sua modificação química e a sua excreção em taxas constantes, sendo necessárias

doses em intervalos regulares para manter o nível do composto na faixa considerada eficaz (FREIBERG & ZHU, 2004; LEE & YEO, 2015). Dessa forma, a liberação controlada surge como uma alternativa para manter a concentração do fármaco em níveis eficazes, uma vez que a liberação do fármaco é prolongada, requerendo administrações menos frequentes do medicamento em relação às formas convencionais (LYRA *et al.*, 2007).

Na Figura 1 é apresentado a comparação entre a liberação convencional e a liberação controlada de medicamento, associados as taxas terapêuticas (ou seja, concentração ótima para o fármaco). Assim, no tratamento convencional, onde não há controle da liberação do medicamento (eventualmente apenas na sua dissolução, no caso de aplicação oral), é aplicada uma dose elevada para que, com a taxa de consumo e de degradação do fármaco, a concentração ótima do fármaco na corrente sanguínea seja mantida durante o tempo de tratamento. Se o tempo de ação (tempo em que a concentração ótima é mantida) não for suficiente, outras doses, em tempos regulares são aplicadas. A figura considera também a existência de um período em que a concentração na corrente sanguínea pode ser maior que a ótima (aumentando os riscos de efeitos colaterais) e períodos onde a concentração está abaixo da ótima.

Na liberação controlada, devido a uma taxa menor de liberação do fármaco, a faixa de concentração ótima é atingida, e, por ser similar à taxa de consumo, essa concentração é mantida por um tempo mais prolongado, não exigindo aplicações de novas doses.

Na liberação controlada, a espécie química de interesse é incorporada à uma matriz, contendo um ou mais polímeros, dentre outros compostos. A taxa de liberação da espécie química de interesse é função da estrutura, composição e propriedades químicas dessa matriz e as propriedades químicas da espécie de interesse (FREIBERG & ZHU, 2004). Os perfis de liberação são, em muitos casos, caracterizado inicialmente por uma liberação mais acentuada devido à presença de compostos de interesse nas parte externa do polímero (processo de dissolução simples) e posteriormente com liberação mais constante com taxas dependentes da difusão do composto pela matriz (GHADERI *et al.*, 1996; FREIBERG & ZHU, 2004). Em alguns casos, a liberação ocorre com a degradação da matriz (FREIBERG & ZHU, 2004; CRUZ *et al.*, 2006).

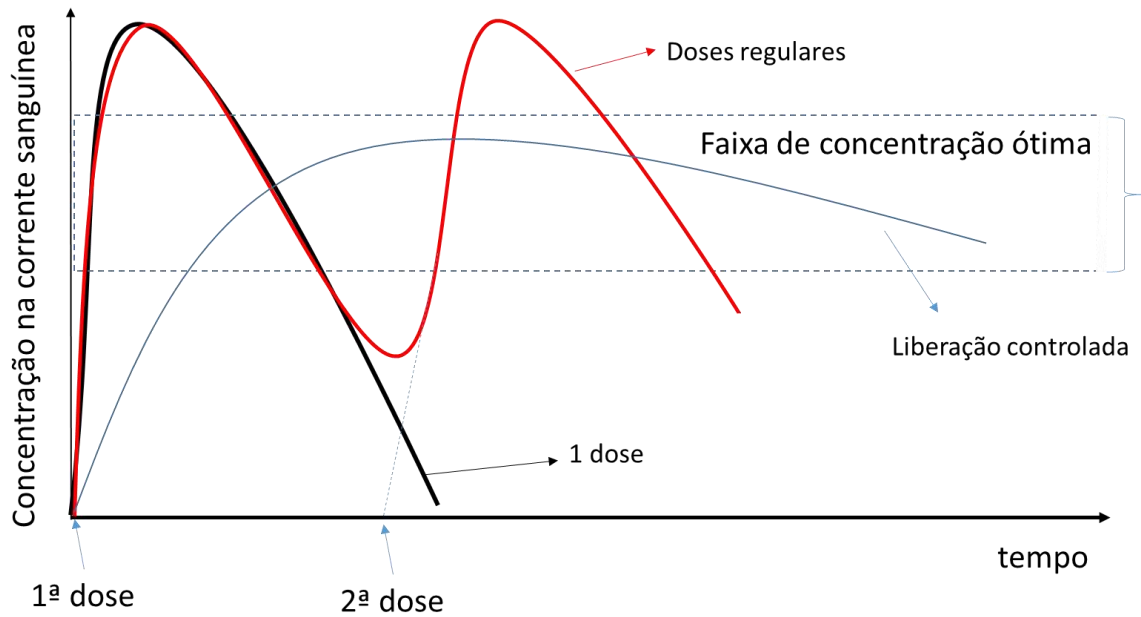


Figura 1 - Diagrama esquemático da concentração de fármaco na corrente sanguínea em função do tempo para formulação convencional (1 dose e 2 doses regulares) e para liberação controlada.

A Figura 2 mostra alguns tipos de estruturas mais utilizados para liberação controlada de medicamentos.

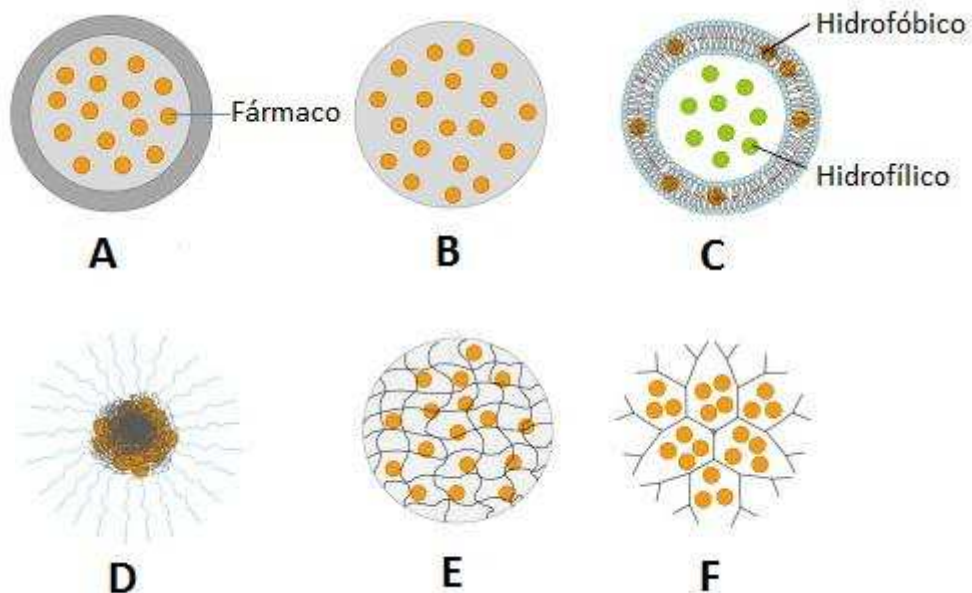


Figura 2 - Vários tipos de estruturas farmacêuticas para administração de fármaco. (A) micro ou nanocápsula; (B) micro ou nanosfera; (C) Lipossomas; (D) Micela polimérica; (E) hidrogel, e (F) Dendrímero (Fonte: LEE & YEO, 2015).

## 2.2. Liberação controlada de insumos agrícolas

Grande parte dos nutrientes adicionados ao solo através da aplicação de insumos agrícolas, são perdidos por lixiviação e apenas uma pequena quantidade é absorvida pelas plantas, sendo portanto, necessárias aplicações de doses extras para suprir a carência das mesmas, levando a um alto custo de produção e desperdício de fertilizantes (LYRA *et al.*, 2007; AZEEM *et al.*, 2014), além da potencial contaminação de aquíferos e/ou lençóis freáticos, assim como a contaminação do próprio solo, uma vez que os fertilizantes podem estar contaminados por metais tóxicos, como cádmio.

Dessa forma, uma alternativa viável é promover a liberação controlada dos fertilizantes, de modo a disponibilizar de forma gradual os nutrientes para o solo, e, assim como no caso dos fármacos, visam manter os compostos dentro de uma faixa de concentração ótima (FREIBERG & ZHU, 2004; LYRA *et al.*, 2007; AZEEM *et al.*, 2014). A liberação controlada também têm sido proposta para liberação de agrotóxicos.

Na liberação controlada de insumos agrícolas, ao colocar a matriz polimérica contendo o composto ativo em contato com o meio receptor (solo, por exemplo), a água penetra na matriz polimérica e o processo de difusão ocorre, obtendo-se um perfil similar à liberação controlada de fármacos no organismo (FREIBERG & ZHU, 2004; AZEEM *et al.*, 2014; LEE & YEO, 2015). Na Figura 3 o processo é apresentado esquematicamente.

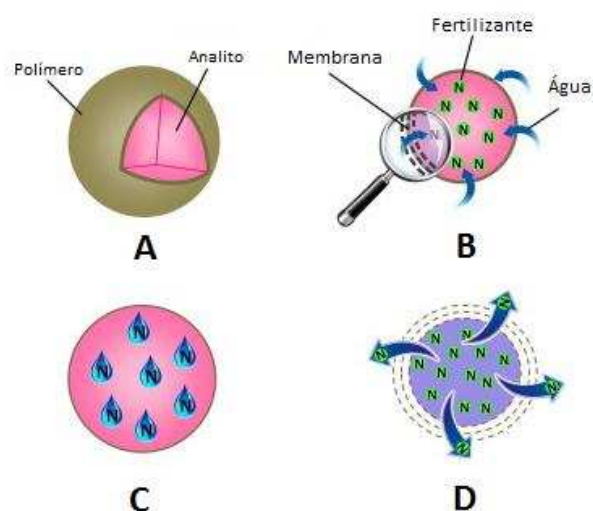


Figura 3 – Mecanismo de liberação controlada por difusão. (A) Fertilizante encapsulado em matriz polimérica. (B) Água penetra a matriz polimérica. (C) dissolução do fertilizantes no interior da matriz. (D) Liberação controlada por

difusão através da matriz (Fonte: AZEEM *et al.*, 2014).

### 2.3. Polímeros em liberação controlada

A melhoria no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada depende da seleção de um agente apropriado capaz de controlar a liberação do composto, mantê-lo dentro de uma faixa eficaz ao longo do tempo e de disponibilizá-lo ao meio receptor (FREIBERG & ZHU, 2004; LOPES *et al.*, 2005). Dentre as várias opções, os polímeros demonstram ser agentes versáteis e promissores para exercer essa função (LOPES *et al.*, 2005; FREIBERG & ZHU, 2004; CRUZ *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2010). Além de serem aplicáveis a uma ampla variedade de substâncias, podem ser alterados visando melhorar suas propriedades químicas e minimizar os impactos ambientais (OURIQUE *et al.*, 2008).

As matrizes poliméricas podem controlar a liberação das espécies de interesse através de mecanismos tais como a erosão, intumescimento, degradação e difusão (AZEEM *et al.*, 2014).

### 2.4. Modelos cinéticos

Para descrever o mecanismo no qual ocorre a liberação da espécie química de interesse, do interior da matriz polimérica para o meio receptor, são utilizados modelos cinéticos. Vários modelos cinéticos têm sido empregados, tais como pseudo-primeira ordem; pseudo segunda ordem e difusão intrapartícula.

A forma linearizada da equação da pseudo segunda ordem pode ser descrita pela Equação 1.

$$\frac{1}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e} + \frac{1}{q_e} t \quad \text{Equação 1}$$

Onde,  $k_2$  é a constante de velocidade de pseudo-segunda ordem ( $\text{g mg}^{-1} \text{ minutos}^{-1}$ ),  $q_e$  e  $q_t$  são as quantidades adsorvidas ( $\text{mg g}^{-1}$ ) no equilíbrio e no tempo  $t$  (minutos).

O modelo de difusão intrapartícula é descrito de acordo com a Equação 2.

$$q = R t^{0,5} \quad \text{Equação 2}$$

Em que,  $q$  é a quantidade adsorvida em  $\text{mg g}^{-1}$  no tempo ( $t$ ) e  $R$  é a constante de transporte intrapartícula ( $\text{mg g}^{-1} \text{ min}^{-1/2}$ ).

O modelo proposto por Noyes e Whitney (1897), apresenta uma equação similar à equação cinética de pseudo primeira ordem, entretanto, é conceitualmente distinta (Equação 3).

$$C = A + Be^{-kt} \quad \text{Equação 3}$$

O modelo foi proposto para explicar a cinética de dissolução de sólidos, onde a taxa de dissolução de um composto em solução é proporcional à diferença entre a concentração da solução num dado tempo e a concentração da solução no equilíbrio. Posteriormente, esse modelo foi explicado por Nernst a partir das primeira e segunda lei de difusão de Fick (Equação 4).

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS_w}{Vh}(C_s - C) \quad \text{Equação 4}$$

Onde,  $C$  representa a concentração da espécie dissolvida em um tempo dado tempo  $t$ ,  $C_s$  a concentração da substância no equilíbrio, respectivamente.  $D$ , o coeficiente de difusão da substância,  $S_w$ , área da superfície exposta do sólido,  $V$ , o volume da solução e a  $h$ , espessura da camada de difusão, respectivamente.

### 3. Ligantes para fitorremediação

Conforme já apresentado, a absorção de metais do solo por plantas é importante tanto para fins de fertilização quanto para a fitorremediação e ocorre principalmente na forma de complexos de metais.

A formação de um complexo ocorre quando um íon metálico, agindo como ácido de Lewis, é coordenado por ligantes, que, sendo espécies químicas com grupos doadores de elétrons, agem como base de Lewis (SKOOG, 2007; OLIVEIRA, 2009; HARRIS, 2012). Quanto maior o número de grupos doadores de elétrons no ligante, maior a estabilidade do complexo, devido ao chamado efeito quelante. O ligante, dessa maneira é chamado de ligante polidentado ou de quelato (OLIVEIRA, 2009; TOMA, 2013).

A utilização dos ligantes polidentados é uma das formas mais eficazes de prevenir e corrigir a maioria das carências de micronutrientes em uma ampla variedade de culturas, pois, forma complexos estáveis com metais, mantendo-os em solução e apresentando cargas elétricas favoráveis à absorção (EVANGELOU *et al.*, 2007).

Os ligantes sintéticos têm sido utilizados para melhorar a eficiência de absorção de nutrientes (BRADY,1979), porém em concentrações elevadas pode apresentar efeitos deletérios pela solubilização excessiva do metal e seu transporte para lençóis freáticos ou aquíferos (EVANGELOU *et al.*, 2007; VANGRONSVELD *et al.*, 2009; BENNERDSEN *et al.*, 2012). Desta forma, uma grande preocupação para a aplicação de processos de fitoextração é o uso de doses elevadas do ligante, que pode solubilizar uma quantidade de metais maior do que as plantas podem absorver antes que esses metais complexados e em solução sejam lixiviados ao longo da coluna do solo, podendo contaminar lençóis freáticos ou aquíferos. Além disso, é possível também a persistência dos quelantes no solo após a remoção das plantas, e que continuarão a solubilizar os metais, como por exemplo, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), um ótimo quelante, mas é recalcitrante, ou seja, não é biodegradado (MEERS *et al.*, 2009).

Os ligantes usados em fitoextração devem ser capazes de formar complexos altamente estáveis em diversos valores de pH, possuam baixa toxicidade e custo e uma grande aplicabilidade (MEERS *et al.*, 2009).

Os ácidos orgânicos de baixa massa molar (AOLMM) são compostos solúveis em água, que apresentam grupos carboxílicos em suas estruturas, e participam, no solo, de processos químicos (como a formação de complexos) ou biológicos, sendo consumidos e metabolizados por microrganismos (MIN & WU *et al.*, 2014). Nos organismos participam do ciclo de Krebs e do ciclo de glioxilato, em catabolismo e anabolismo de aminoácido (PINHEIRO *et al.*, 2013). Dentre eles, o ácido cítrico é interessante do ponto de vista de remediação, uma vez que o citrato é um ligante tridentado, com constante de estabilidade elevada, é biodegradável e não tóxico, estando presente em frutas cítricas e utilizado como acidulante na indústria alimentícia (KELEBEK *et al.*, 2009).

### **3.1. Ácido Cítrico**

O ácido cítrico (Figura 4) é um ácido orgânico predominante de frutas cítricas, sendo muito comum relacionar a sua concentração com a qualidade dos alimentos (KELEBEK *et al.*, 2009). Também é um agente antibacteriano, muito utilizado na indústria farmacêutica devido a suas propriedades anticoagulantes e “anti-ácidas” (ou seja, tamponante) e para prevenção de cálculos renais (RIBEIRO *et al.*, 2002). É

muito utilizado para controle de pH na indústrias de alimentos (HASHEMINEJAD & NEZANZADEH-EJHIEH, 2015).

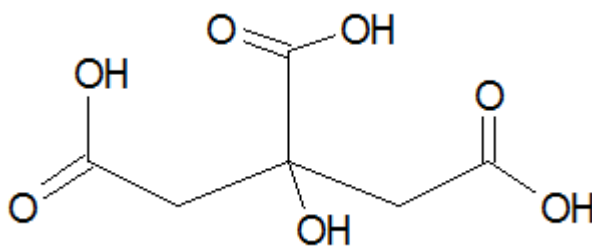
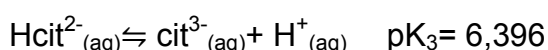
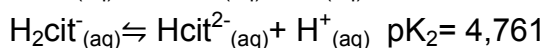
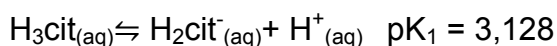


Figura 4 - Estrutura do ácido cítrico.

(Figura gerada no software ACD-Labs ChemsSketch 12.0).

O sistema ácido-base de Bronsted do ácido cítrico/citrato apresenta três hidrogênios ionizáveis provenientes dos seus grupos carboxílicos.



A Figura 5 apresenta a curva de distribuição de espécies do sistema ácido cítrico/citrato, onde a fração de equilíbrio ( $\alpha$ ) de cada espécie do sistema é apresentado (OLIVEIRA, 2009).

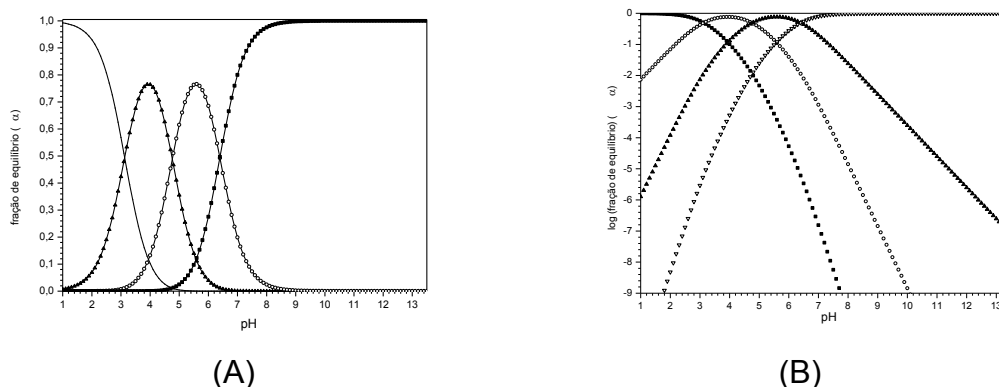


Figura 5 – Curvas de distribuição de espécies do ácido cítrico. (A) fração de equilíbrio em função do pH. (B) Log da fração de equilíbrio em função do pH do meio. (–) Espécie  $\alpha_0$ . (▲) Espécie  $\alpha_1$ . (○) Espécie  $\alpha_2$ . (■) Espécie  $\alpha_3$ .

Das quatro espécies que compõem o sistema ácido-base de Bronsted do ácido cítrico, para fins de fitoremediação, a espécie de interesse é o citrato, pois como já apresentado, é um ligante tridentado, ou seja pode complexar o íon metálico através de três posições de coordenação.

Esse íon existe em solução em qualquer valor de pH, porém predomina em valores de pH acima de 6,4 (ou seja, sua fração de equilíbrio é maior que aquelas das demais espécies) (Figura 5A) e para valores de pH inferiores a 5,5, representa menos de 10% da concentração analítica do ácido cítrico (Figura 5B). Isto significa que, para soluções de solo com valores de pH acima de 5,5, o que usual, grande parte da concentração analítica estará na forma de citrato, aumentando a eficiência de complexação dos metais.

### 3.1.1. Determinação de ácido cítrico

Devido a importância do ácido cítrico, vários métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a determinação de ácidos orgânicos, dentre eles podem ser citados: eletroforese capilar (PERES *et al.*, 2009), espectrofotometria (KRUG & KELNNER, 1994), quimiluminescência (ZHANG & JIURI, 2009), espectrometria de emissão atômica com chama (YEBRA & BOLLAÍN, 2010) e eletrodo de íons seletivos (HASHEMINEJAD & NEZANZADEH-EJHIEH, 2015).

Peres *et al.* (2009), desenvolveram um método de eletroforese capilar para especiação de ácidos orgânicos em 23 vinhos brasileiros de consumo popular, com detecção UV indireta, utilizando o ácido 3,5-dinitrobenzóico (DNB) em pH 3,6 contendo o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), que por sua vez tem uma mobilidade efetiva similares para os ácidos orgânicos investigados e boas características cromóforas para detecção indireta por UV a 254 nm. Dentre os ácidos orgânicos investigados, o método apresentou para o ácido cítrico coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,9901, LOD de  $1,55 \text{ mg L}^{-1}$ , LOQ de  $5,15 \text{ mg L}^{-1}$  e recuperação de  $(102 \pm 1) \%$ , demonstrando um bom desempenho do método.

Kelebek *et al.* (2009) determinaram ácidos orgânicos, açúcares, fenóis e atividade antioxidante de sucos de laranja e vinhos. Os ácidos orgânicos foram quantificados e separados por um sistema de HPLC com detector espectrofotométrico em 210 nm.

#### 4. Espectrofotometria inversa (descolorimetria)

O método espectrofotométrico baseado na diminuição da absorvância da solução com o aumento da concentração do analito tem sido chamado de descolorimetria, ainda que, do ponto de vista semântico, não é adequado, pois não há, realmente a medida da cor (sendo possível inclusive o uso da luz ultravioleta, que não apresenta cor), mas da absorvância em um dado comprimento de onda. Desta maneira, foi adotado o uso do termo espectrofotometria inversa devido à diferença no perfil da curva analítica.

Assim, na espectrofotometria inversa, a absorvância da solução, devido à presença de um reagente, diminui com o aumento da concentração de analito no meio (KOLLOF *et al.*, 1960; KRUG & KELNNER,1994; CLESCERI *et al.*, 1998), conforme representado na Figura 6.

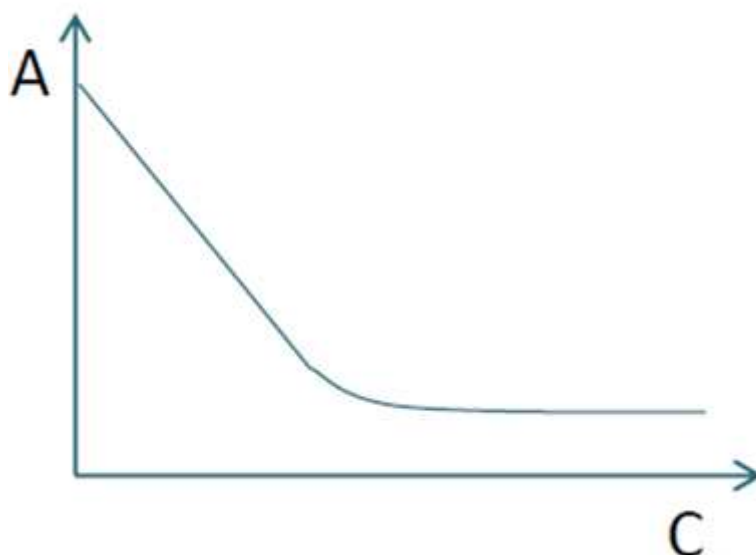


Figura 6 – Perfil de curva analítica típica de espectrofotometria inversa.

Kolloff *et al.*(1960) desenvolveram um método para determinação de pirofosfatos em presença de complexos de tiocianato de ferro (III) (que apresenta uma coloração vermelho-alaranjado) baseado na formação de complexos do ferro (III) com o pirofosfato, que não absorvem na região do visível.

Krug e Kelnner.(1994), desenvolveram um método para determinação de citrato por sistema de injeção em fluxo com base na capacidade do citrato de formar complexos com os íons ferro (III) em presença do complexo colorido de  $[\text{Fe}(\text{SCN})_2]^+$ .

Ao incorporar o ligante ao complexo, há uma diminuição da absorbância deste em 460 nm.

O método para determinação de fluoreto com SPADNS baseia-se na reação entre o fluoreto e o complexo de zircônio com SPADNS, que é colorido. O flúor ao ser adicionado em presença da solução de Zr-SPADNS, ocorre a formação de complexo sem cor  $ZrF_n^{4-n}$  (onde n pode variar de 1 a 6) diminuindo a concentração do complexo colorido. Assim, à medida que aumenta a concentração de fluoreto na solução, diminui a absorbância da solução devido à diminuição da concentração de Zr-SPADNS (CLESCERI *et al.*, 1998).

Outro método baseado em espectrofotometria inversa, é para determinação de sulfato em presença do complexo de bário(II)-azul de metiltimol. Ao adicionar o sulfato na solução contendo o complexo de bário(II)-azul de metiltimol, acarreta a formação do complexo de sulfato de bário, levando a uma descoloração da solução. A medida que aumenta a concentração de sulfato no meio, acarreta em uma diminuição linear da concentração do complexo (CLESCERI *et al.*, 1998).

## 5. Planejamento e otimização de experimentos

Um bom planejamento de experimentos é aquele capaz de permitir que o conjunto de experimentos forneça as informações procuradas, de modo que é uma etapa muito importante no trabalho experimental. Para isso, é necessário uma correta seleção das variáveis a serem estudadas, dos melhores valores a serem estudados para cada variável e quais as respostas a serem analisadas (VALKÓ, 2000; NETO *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2004; ARAÚJO & JANAGAP, 2012).

No planejamento de experimentos, os métodos utilizados para a interpretação das variáveis do sistema são: o método univariado e os métodos multivariáveis (também chamados de multivariados, embora, do ponto de vista semântico não seja adequado, pois há o estudo envolvendo várias variáveis, mas apenas uma resposta é avaliada por vez).

Modelos experimentais multivariáveis podem ser divididos como de primeira ordem, segunda ordem, etc.. Essa divisão está associada como os modelos estatísticos que podem ser obtidos com os experimentos. Se o modelo estatístico for composto por apenas termos lineares, são chamados de primeira ordem. Se contém termos quadráticos, de segunda ordem, e assim por diante.

Os modelos experimentais multivariáveis de primeira ordem, como por exemplo, os planejamentos fatoriais com dois níveis ( $2^n$ ) são indicados quando há a necessidade de avaliar as variáveis independentes mais importantes e suas interações sobre a resposta (FERREIRA *et al.*, 2004). Em contrapartida, os modelos de segunda ordem, também chamados de métodos de superfície de respostas, são utilizados para se explicar melhor as respostas ou otimizar um processo (FERREIRA *et al.*, 2004). Otimizar nesse caso, significa encontrar as condições ótimas para cada variável. Do ponto de vista matemático, as condições experimentais podem ser vista como um espaço, onde cada variável é uma dimensão (eixo), assim como a resposta. Dessa maneira, o comportamento da resposta nesse espaço pode ser considerado uma superfície (para duas variáveis, formando o espaço 3D junto com a resposta) ou uma hipersuperfície (para dimensões maiores que 3). Os modelos de ordem 2 ou superiores permitem obter essas superfícies (ou hipersuperfícies) e assim, localizar a região (ou ponto) ótima (NETO *et al.*, 2001; MASSART *et al.*, 2003; BRERETON, 2005; TEÓFILO & FERREIRA, 2006; MONTGOMERY, 2009). O métodos de superfície de resposta mais utilizado em química analítica talvez seja o planejamento composto central, ainda que o uso do Box-Behnken e a Matriz de Doehlert também sejam utilizados.

### **5.1. Matriz de Doehlert**

O planejamento Doehlert ou Matriz Doehlert é um tipo de planejamento experimental de segunda ordem. Os pontos da matriz Doehlert correspondem aos vértices de um hexágono regular, para duas variáveis (FERREIRA *et al.*, 2004; TEÓFILO & FERREIRA, 2006; ARAÚJO & JANAGAP, 2012).

Neste planejamento, o número de níveis para cada variável não é o mesmo, o que permite analisar as variáveis mais significativas com níveis maiores para obter mais informações do sistema (FERREIRA *et al.*, 2004; ARAÚJO & JANAP, 2012). Esse planejamento é mais adequado quando uma das variáveis é o pH da solução e uma faixa ampla deve ser estudada. Isso porque o comportamento dos sistemas químicos em relação ao pH pode não ser monótono ou seja, pode aumentar em uma faixa e diminuir em outra (OLIVEIRA, 2009; OLIVEIRA, 2014; OLIVEIRA *et al.* 2015).

Outra vantagem da Matriz de Doehlert é a utilização de um menor número de experimentos em relação ao planejamento composto central sendo, portanto, mais eficiente. Além disso, para expandir a região dos valores das variáveis estudadas

(domínio experimental) são necessário poucos pontos adicionais (COSTA *et al.*, 1999, VALKÓ, 2000; FERREIRA, *et al.*, 2004, TEÓFILO & FERREIRA, 2006). Por exemplo, o acréscimo de três pontos experimentais permite a formação de um novo hexágono, utilizando pontos já explorados no hexágono anterior (Figura 7).

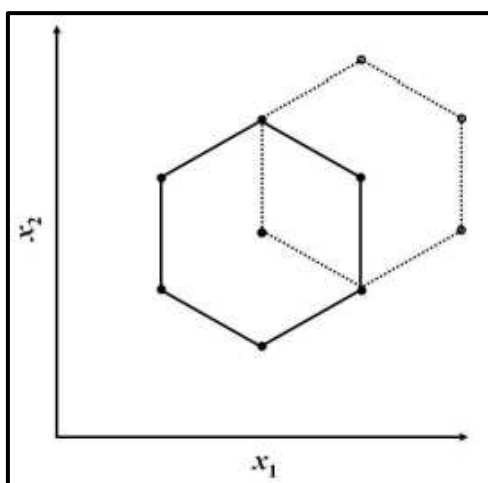


Figura 7 - Planejamento Doehlert para duas variáveis: Hexágono (—) obtido pelo primeiro planejamento e hexágono (...) obtido utilizando pontos experimentais já explorados anteriormente (TEÓFILO & FERREIRA, 2006).

Uma matriz de Doehlert com três variáveis é formada por 13 experimentos, de modo que a sua distribuição espacial está localizado nos vértices de cuboctaedro e um hexágono localizado em seu centro (ARAÚJO & JANAGAP, 2012), conforme representado na Figura 8.

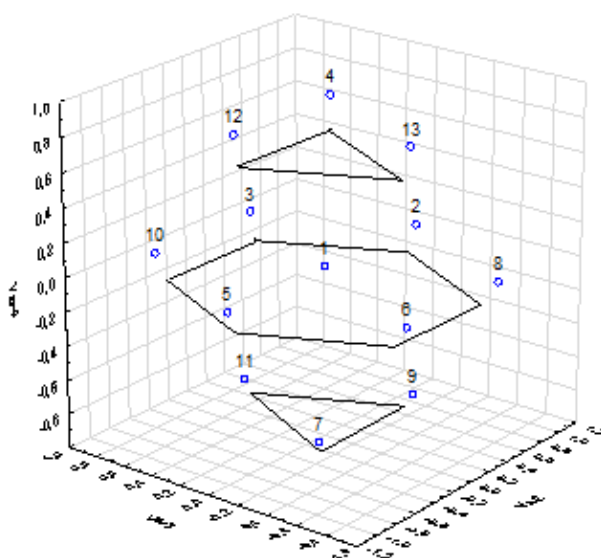


Figura 8 – Representação da matriz de Doehlert para 3 variáveis.

Um indicativo de que a Matriz de Doehlert está pouco difundida entre os pesquisadores é o fato de que a maioria dos pacotes comerciais disponíveis não disponibilizam algoritmos para cálculos de planejamentos Doehlert (TEÓFILO & FERREIRA, 2006).

Em contrapartida nos últimos anos vêm sendo publicados alguns trabalhos utilizando a Matriz de Doehlert, como por exemplo, otimização das condições: para determinar chumbo (BARBOSA *et al.*, 2007), selênio (LIMA *et al.*, 2013), neomicina (FRUGERI *et al.*, 2014), otimização das condições para sistema de análise por injeção em fluxo para determinação de sulfeto (LIMA *et al.*, 2011), entre outros.

## OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo geral

Desenvolvimento de um método espectrofométrico inverso para determinação de citrato e aplicação em sistema de liberação controlada.

#### 1.1.1 Objetivos específicos

- Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico inverso para determinação de citrato baseado no complexo ferro(II)-1,10-fenantrolina (Capítulo 2)
- Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico inverso para determinação de citrato baseado no complexo cromo(III)-EDTA (Capítulo 3)
- Proposta e estudo de um sistema de liberação sustentada para liberação de citrato a partir do citrato de cálcio em matriz de ágar (Capítulo 4)

## PREPARO DE SOLUÇÕES

Neste tópico são apresentadas todas as soluções utilizadas ao longo de todo trabalho experimental descrito ao longo dos capítulos seguintes.

As soluções foram preparadas utilizando água tipo 1 (Milli Q® Reference A+).

### Soluções simples

Algumas soluções foram preparadas pela dissolução (ou diluição) de massas (ou volumes) dos compostos em água em um béquer, transferidos quantitativamente para um balão volumétrico e o volume completado, conforme informações descritas na Tabela 1.

### Soluções Tampão

Para o preparo da solução tampão foi pesada uma massa do composto adequado (Tabela 2) e dissolvida em um volume de água. O pH foi ajustado utilizando-se soluções de NaOH  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e HCl  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . A solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50,0 mL e o volume completado. O pH da solução foi confirmado utilizando pHmetro (MPA-210, TecnoPON).

### Soluções de Concomitantes:

Para o preparo da solução de concomitantes no estudo de interferência, foi pesada uma massa (ou diluído um volume do composto adequado) (Tabela 3) e dissolvida em água. A solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50,0 mL e o volume completado.

### Outras soluções:

*Soluções estoque de Fe(II)  $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ :* Para o preparo da solução de ferro (II) foi pesada uma massa igual a 392,0 mg de sulfato ferroso amoniacal  $((\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Vetec), qual foi dissolvida em uma solução de ácido nítrico  $0,014 \text{ mol L}^{-1}$ . O volume final da solução foi de 100,0 mL, completado com a solução de ácido nítrico.

*Soluções padrão (de referência) de citrato:* As soluções diluídas de citrato foram preparadas pela diluição de volumes adequados da solução de citrato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$

com auxílio de micropipeta de volume variável em balão volumétrico de 50,0 mL e o volume completado com água tipo 1.

Tabela 1 - Informações dos compostos e das soluções para preparo das soluções simples.

Solução	Composto					Solução Volume/mL
	Nome	Fórmula	Marca	Massa /g	Volume /mL	
1,10 – fenantrolina 10 mmol L <sup>-1</sup>	1,10 – fenantrolina	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> *	Vetec	0,20	-	100,0
EDTA 0,5 mol L <sup>-1</sup>	EDTA (sal dissódico)	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O**	Vetec	0,93	-	50,0
Cr(III) 0,2 mol L <sup>-1</sup>	cloreto de cromo hexahidratado	CrCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	Vetec	2,66	-	50,0
citrato 0,2 mol L <sup>-1</sup>	citrato de sódio	Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ***	Vetec	2,58	-	50,0
NaOH 0,1 mol L <sup>-1</sup>	hidróxido de sódio	NaOH	Vetec	1,0	-	250,0
NaOH 1,0 mol L <sup>-1</sup>	hidróxido de sódio	NaOH	Vetec	2,0	-	50,0
HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup>	ácido clorídrico	HCl	Vetec	-	0,8	100,0
HCl 1,0 mol L <sup>-1</sup>	ácido clorídrico	HCl	Vetec	-	8,3	100,0
Cálcio 7,5.10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup>	nitrato de cálcio	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	Impex	0,09	-	500,0
HNO <sub>3</sub> 0,014 mol L <sup>-1</sup>	ácido clorídrico	HNO <sub>3</sub>	Vetec	-	1,0	100,0

\*estrutura da 1,10 – fenantrolina apresentada na Figura 9.

\*\* estrutura do EDTA apresentada na Figura 26.

\*\*\* estrutura do citrato apresentada na Figura 4.

Tabela 2 - Informações dos compostos e das soluções para preparo das soluções tampões.

Solução	Faixa de pH	Composto				Ajuste do pH*		Solução Volume/mL
		Fórmula	Marca	Massa / g	Volume /mL	Volume HCl 1,0 mol L <sup>-1</sup> /μL	Volume NaOH 1,0 mol L <sup>-1</sup> /μL	
Tampão fosfato	2,0	Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Vetec	2,84	-	3800,00	-	100,0
Tampão Carbonato 0,20 mol L <sup>-1</sup>	6,0 -7,0	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Vetec	2,12	-	-	0,16	50,0
Tampão Acetato 0,18 mol L <sup>-1</sup>	3,5 -5,0	CH <sub>3</sub> COONa.3H <sub>2</sub> O	Vetec	6,12	-	-	1600,00	250,0
Tampão Ácido Bórico 0,2 mol L <sup>-1</sup>	8,0 - 11,0	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Vetec	1,24	-	0,90	-	50,0

\* estimado pelo balanço de carga no pH da solução (Oliveira, 2013 – Funções de Interesse Químico). Valores aproximados.

Tabela 3 - Informações dos compostos e das soluções para preparo das soluções de concomitantes.

Solução	Composto				Solução Volume/mL
	Fórmula	Marca	Massa / g	Volume /mL	
Fe(III) 0,25 mol L <sup>-1</sup>	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	Vetec	3,30	-	50,0
Cu(II) 0,25 mol L <sup>-1</sup>	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Vetec	3,12	-	50,0
Mn(II) 0,25 mol L <sup>-1</sup>	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Reagen	2,11	-	50,0
Fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup>	Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Vetec	0,71	-	50,0
Etilenodiamina 0,1 mol L <sup>-1</sup>	NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	Vetec	-	0,33	50,0
Oxalato 0,1 mol L <sup>-1</sup>	K <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Vetec	0,92	-	50,0

## CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE CITRATO BASEADO NA COMPETIÇÃO COM O COMPLEXO DE FERRO (II) - 1,10-FENANTROLINA

### 1. Introdução

O ferro (II) forma complexos solúveis com a 1,10-fenantrolina (até 3 ligantes) que possuem uma coloração vermelho-alaranjado intensa. Esses complexos são utilizados para a determinação de ferro(II), ao redor de 510 nm (CLESCERI *et al.*, 1998), sendo o principal método espectrofotométrico para determinação de ferro(II).

A Figura 9 apresenta estrutura da 1,10-fenantrolina totalmente protonada (o-fenH<sub>2</sub><sup>2+</sup>).

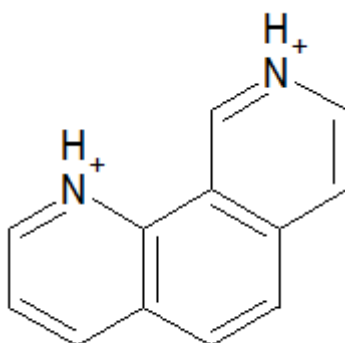


Figura 9 – Estrutura da 1,10-fenantrolina totalmente protonada.  
(Figura gerada no software ACD-Labs Chems sketch 12.0).

A 1,10 fenantrolina, portanto, participa de equilíbrio ácido base de Bronsted, lembrando que a espécie totalmente protonada é considerada forte (pKa menor que 1,0) e assim, usualmente não é apresentada participando de equilíbrios em solução aquosa.



Na Figura 10 é apresentado o diagrama de distribuição de espécies do sistema ácido-base de Bronsted a 1,10 fenantrolina. Observa-se que a espécie neutra, que atua como ligante, está presente no meio em concentrações acima de pH ao redor de 4,0 (acima de cerca de 10% da concentração analítica).

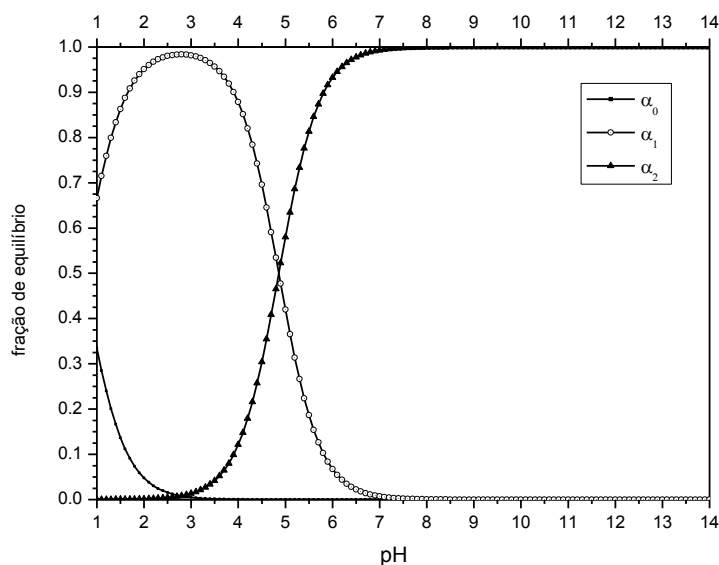
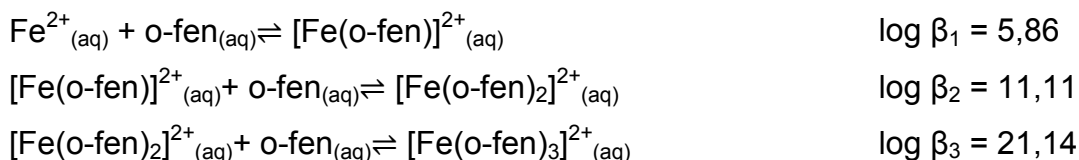


Figura 10 - Diagrama de distribuição de espécies do sistema ácido-base da 1,10-fenantrolina (frações de equilíbrio:  $\alpha_0$ : o-fenH<sub>2</sub><sup>2+</sup>;  $\alpha_1$ : o-fenH<sup>+</sup>;  $\alpha_2$ : o-fenH).

As constantes de equilíbrio de complexação do ferro(II) com 1,10-fenantrolina são bastante estáveis (Harris 2009; Martell *et al.*, 2004).



Na Figura 11 é apresentado um diagrama de distribuição de espécies desse equilíbrio, calculado para a concentração analítica de ferro (II) igual  $1,8 \cdot 10^{-4}$  mol/L ( $10 \text{ mg Fe L}^{-1}$ ). Devido aos valores elevados, principalmente da terceira constante de estabilidade, pode-se observar que a espécie  $[\text{Fe}(\text{o-fen})_3]^{2+}$  é praticamente única, em relação aos complexos do ferro(II) ligado a um ou dois 1,10-fenantrolina.

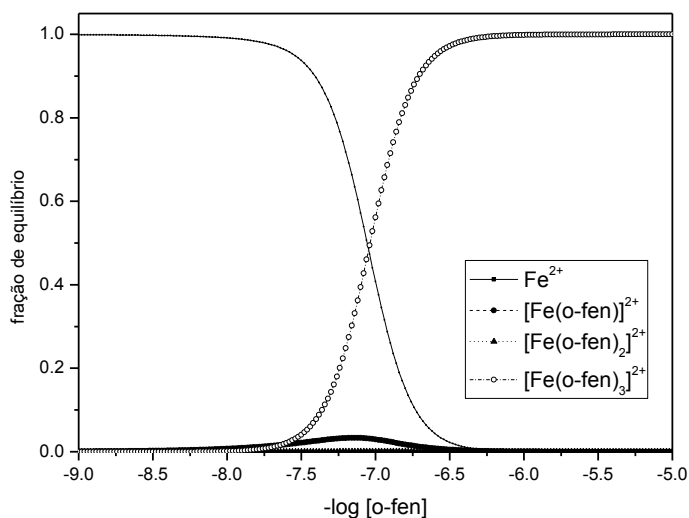


Figura 11 – Diagrama de distribuição de espécies do equilíbrio de complexação do ferro(II) e 1,10-fenantrolina. Calculado para concentração molar de ferro(II) igual a  $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

A estrutura espacial do complexo de ferro (II) com o máximo de ligações com a 1,10-fenantrolina é apresentada na Figura 12.

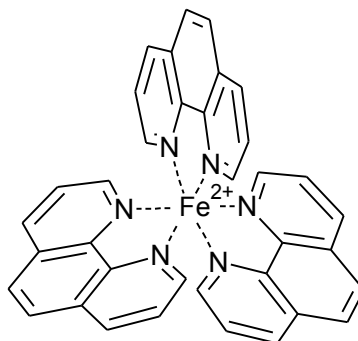
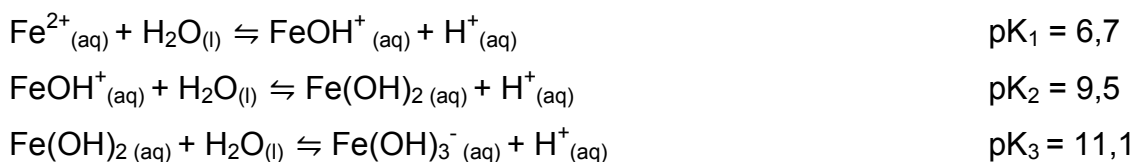
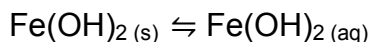


Figura 12 – Estrutura espacial do complexo  $[(\text{fena})_3]^{2+}$ .  
(Figura gerada no software ACD-Labs ChemsSketch 12.0).

Entretanto, o íon ferro(II), por sua vez, também participa de equilíbrios ácido-base de Bronsted, sendo classificado como ácido de Bronsted. As moléculas de água apresentadas se referem às moléculas de água de solvatação que são desprotonadas.





$$-\log s_o = 3,3$$

O ferro (II) não apresenta hidroxocomplexos polinucleares (BAES & MESMER, 1976) e não estão sendo consideradas as semi-reações de oxi-redução de nenhuma espécie química.

Dessas espécies, duas são mais importantes para o método espectrofotométrico, o íon ferro(II) livre, que será complexado pela 1,10-fenantrolina e o hidroxocomplexo neutro ( $\text{Fe(OH)}_2(aq)$ ), que, ao atingir sua concentração de saturação ( $5,01 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ), formará o precipitado de hidróxido de ferro(II), que pode interferir pelo espalhamento de luz.

Assim, pode-se observar na Figura 13 que o íon ferro(II) será praticamente a única espécie do seu sistema ácido-base de Bronsted em valores de pH menores que 5,7 (quando sua fração de equilíbrio é superior a 0,9) (Oliveira, 2009).

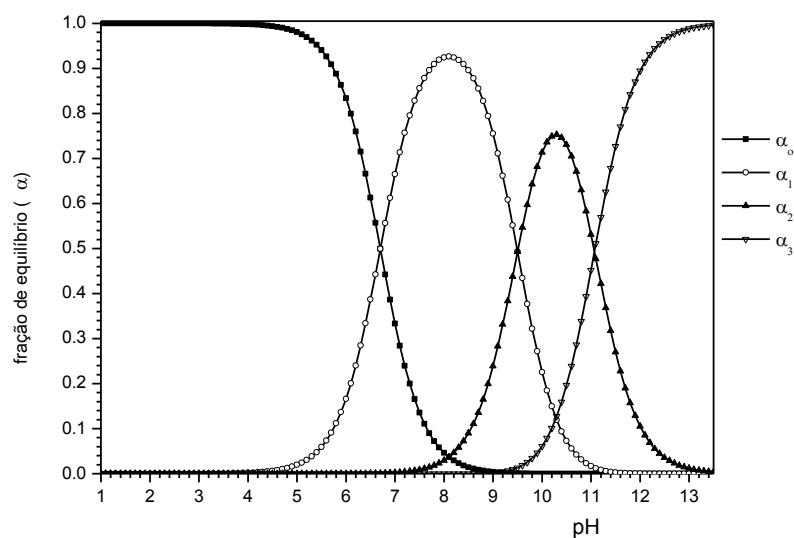


Figura 13 – Diagrama de distribuição de espécies do sistemas ácido-base de Bronsted para o ferro(II).

A estratégia para a determinação de citrato envolve o deslocamento do equilíbrio dos complexos de ferro(II)–1,10-fenantrolina, pelo citrato e a medida da diminuição da absorvância como o aumento da concentração de citrato no meio.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Parte Experimental

#### 2.1.1. Medidas espectrofotométricas

Os espectros de absorção na região do ultravioleta – visível do espectro eletromagnético foram obtidos em um espectrofotômetro *diode array* Agilent 8453. Foi utilizada uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e volume de cerca de 3,0 mL.

### 2.2. Procedimento Geral

Em um frasco de vidro com rosca de 10,0 mL foi adicionado um volume da solução de 1,10-fenantrolina  $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , solução tampão  $0,18 \text{ mol L}^{-1}$ , solução padrão de citrato na concentração adequada, um volume de ferro (II)  $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e um volume de água totalizando  $10,0 \text{ mL}$  de solução. Após homogeneização, foi aguardado 20 minutos e a solução foi medida em triplicata, no comprimento de onda selecionado, conforme apresentado esquematicamente na Figura 14. O espectrofotômetro foi zerado com uma solução tampão. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

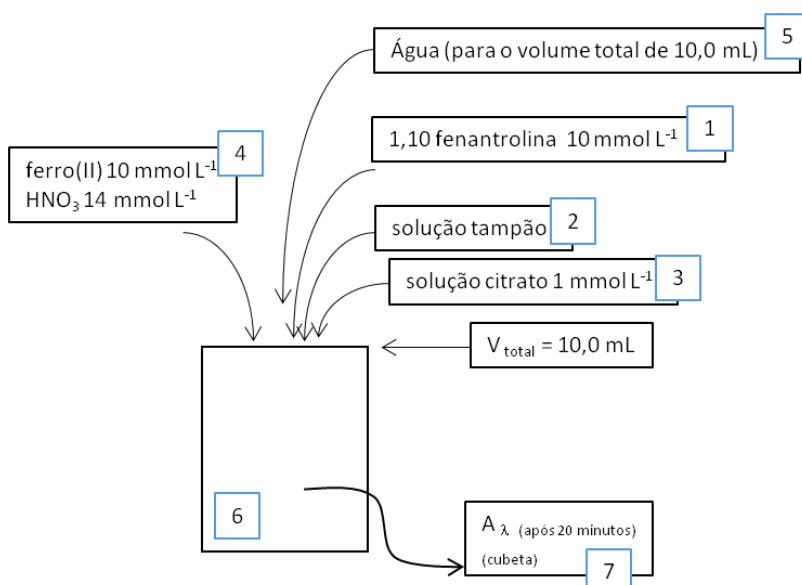


Figura 14 - Diagrama Esquemático para o procedimento do método espectrofotométrico inverso (descolorimetria) baseado no complexo ferro(II)-1,10-fenantrolina. Os números representam as etapas realizadas e não estão associadas à ordem de adição dos reagentes.

### 2.3. Otimização do método

Foi realizada a otimização multivariáveis com auxílio de uma Matriz Doehlert de 3 variáveis. Os experimentos envolveram a obtenção de curvas analíticas de citrato em combinações de 7 níveis de pH: 2,0; 3,5; 5,0; 6,5; 8,0; 9,5 e 11,0 e concentrações de ferro (II) em 5 níveis: 5,0; 8,75; 12,5; 16,25 e 20,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 1,10-fenantrolina em 3 níveis: 5,0; 12,5 e 20,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . As concentrações de citrato variaram de 0,0 a 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$ . Para o planejamento dos experimentos, os valores das variáveis foram normalizados para valores entre -1 e 1 (chamados *codes*).

A normalização foi realizada com auxílio da equação da reta entre os *codes* máximos e mínimos previstos na matriz de Doehlert e os valores das variáveis para esses pontos (Equação 5).

$$C_i = S(X_i - X^o) + C^o \quad \text{Equação 5}$$

S é a inclinação da reta (Equação 6).

$$S = \left( \frac{C_{Max} - C_{Min}}{X_{Max} - X_{Min}} \right) \quad \text{Equação 6}$$

$C_i$  é o valor do código para o nível do fator  $i$  em um experimento,  $X_i$  é o valor real,  $X^o$  é o valor real em relação ao ponto central e  $C^o$  é valor do código em relação ao ponto central.

A Tabela 4 apresenta, para cada experimento, incluindo o ponto central em triplicata, os valores codificados e seus respectivos valores da Matriz Doehlert para o pH e as concentrações de ferro (II) e 1,10-fenatrolina.

Tabela 4 – Valores codificados das concentração de ferro(II) (A); pH (B) das concentração de 1,10-fenantrolina (C) utilizados no planejamento de experimentos e seus respectivos valores experimentais.

Nº de experimentos	Variáveis experimentais					
	Valores Codificados			Valores Reais		
	A	B	C	A / $\mu\text{mol L}^{-1}$	B	C / $\mu\text{mol L}^{-1}$
1	0,000	0,000	0,000	12,500	6,500	12,500
2	1,000	0,000	0,000	20,000	6,500	12,500
3	0,500	0,866	0,000	16,250	11,000	12,500
4	0,500	0,289	0,817	16,250	8,000	5,000
5	-1,000	0,000	0,000	5,000	6,500	12,500
6	-0,500	-0,866	0,000	8,750	2,000	12,500
7	-0,500	-0,289	-0,817	8,750	5,000	20,000
8	0,500	-0,866	0,000	16,250	2,000	12,500
9	0,500	-0,289	-0,817	16,250	5,000	20,000
10	-0,500	0,866	0,000	8,750	11,000	12,500
11	0,000	0,577	-0,817	12,500	9,500	20,000
12	-0,500	0,289	0,817	8,750	8,000	5,000
13	0,000	-0,577	0,817	12,500	3,500	5,000
14	0,000	0,000	0,000	12,500	6,500	12,500
15	0,000	0,000	0,000	12,500	6,500	12,500
16	0,000	0,000	0,000	12,500	6,500	12,500

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Comportamento espectrofotométrico

A Figura 15 apresenta o espectro de uma solução de ferro (II) e de 1,10-fenantrolina ( $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em pH 6,0.

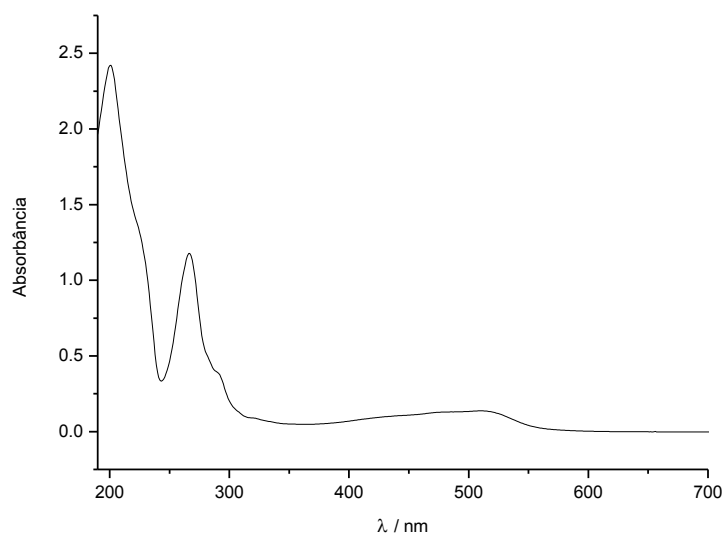


Figura 15 – Espectro da solução dos complexos  $[(\text{fepn}_3)^{2+}]$  ( $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ferro (II) e de 1,10-fenantrolina) em pH 6,0.

O espectro dessa solução contendo predominantemente os complexos de ferro(II)-1,10-fenantrolina apresentou comprimentos de onda de máxima absorbância ( $\lambda_{\text{max}}$ ) em 201 nm, 267 nm e 512 nm, além de um ombro em 292 nm. Esses máximos obtidos são comparáveis com aqueles observados por Xu *et al.* (1996) em 226 nm, 270 nm e 508 nm.

Foram estimadas as absorvidades molares para cada máximo, encontrando os seguintes valores  $1,2 \cdot 10^4 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $5,9 \cdot 10^3 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $1,9 \cdot 10^3 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e  $684,9 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para os máximos 201, 267, 292 e 512 nm respectivamente.

É importante ressaltar que essas absorvidades molares são “aparentes”, ou seja, foram calculadas como se existisse apenas uma espécie química absorvente da radiação (chamada neste texto de espécie cromófora) e os valores numéricos se referem ao cálculo considerando apenas essa condição experimental. Esses valores de absorvidade molar aparente auxiliam na seleção do comprimento de onda para o desenvolvimento do método, uma vez que busca-se a maior sensibilidade analítica

(OLIVEIRA, 2014; OLIVEIRA, *et al.*, 2015) de maneira a possibilitar uma faixa analítica em concentrações tão baixas quanto possível.

O espectro dos complexos de ferro(II)-1,10-fenantrolina na presença de citrato ( $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) é apresentada na Figura 16A. Não foi observado o aparecimento de nenhuma banda de absorção adicional, apenas a diminuição da absorbância (quando comparado com espectro similar à Figura 15).

Considerando que a presença de uma espécie que absorva a radiação em comprimento de onda e que segue a lei de Beer, e que sua concentração é função do concentração do analito (Equação 7) e que na espectrofotometria inversa, essa espécie seja consumida (direta ou indiretamente) pelo analito, a absorbância da solução pode ser descrita pela Equação 8.

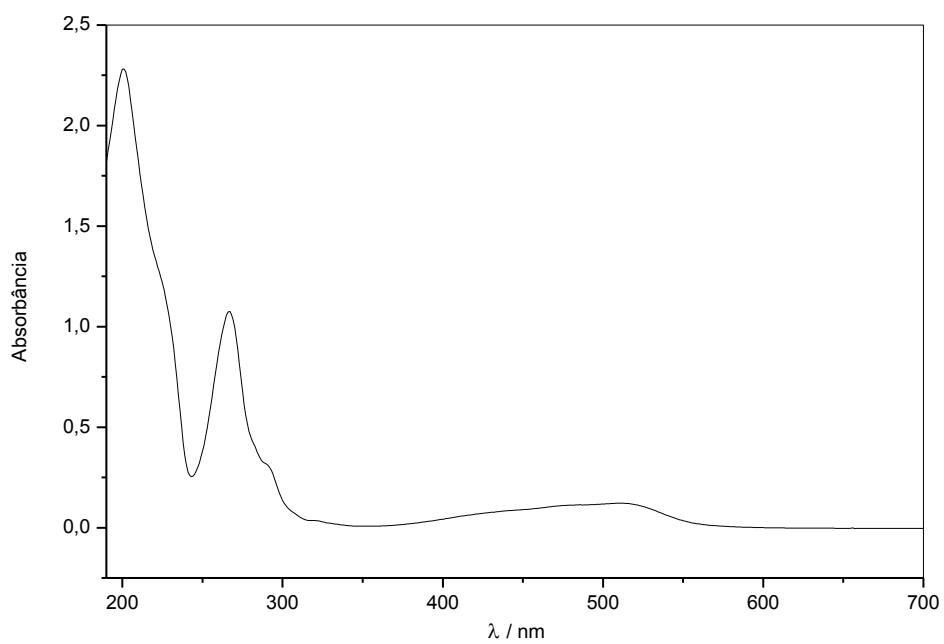
$$A = B + Sc(\text{analito}) \quad \text{Equação 7}$$

$$A = B' + I.(c(\text{Crom}) - rf[\text{analito}]) \quad \text{Equação 8}$$

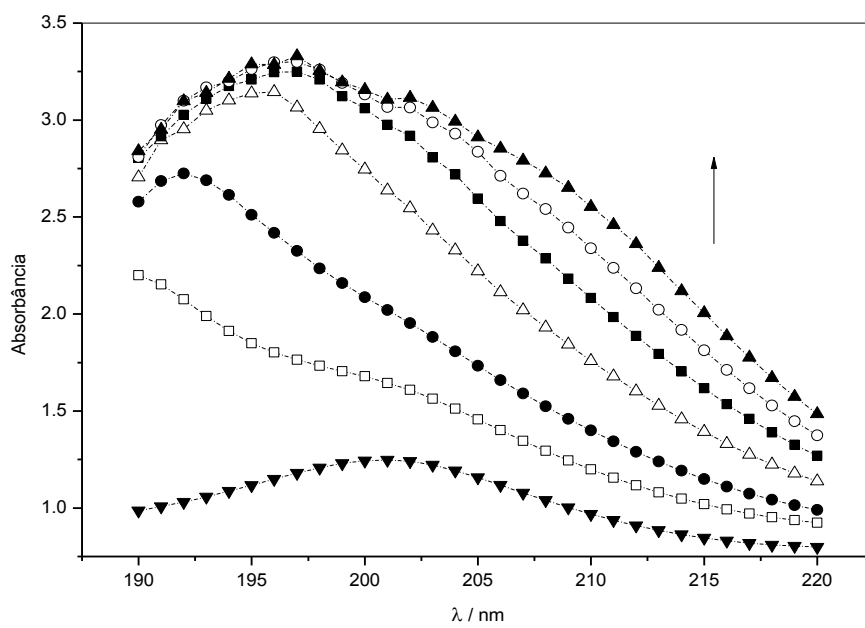
Onde  $r$  é a razão molar entre o cromóforo e o analito e  $f$ , a eficiência global da reação entre ambos. O fator  $I$  é uma função da absorvidade molar das diversas espécies do sistema em equilíbrio do cromóforo (no caso de um complexo), de a fatores de diluição e do caminho óptico. A sensibilidade analítica é o produto  $I.f.r$ .

Além disso na busca por elevadas sensibilidade analítica deve-se considerar que em baixos comprimentos de ondas da região do espectro do ultravioleta, onde um número elevado de compostos absorvem a radiação e métodos utilizando essa faixa de comprimento de onda poderá haver uma maior interferência pelo número maior de espécies que absorvem nesse região e assim, talvez ser necessária uma etapa prévia eficiente para eliminar interferentes. É possível também que, com o aumento de espécies químicas que são formadas e destruídas nos métodos de espectrofotometria inversa, que o comportamento das absorbâncias com a variação da concentração do analito não possam ser descritas pela lei de Beer-Lambert-Bouget.

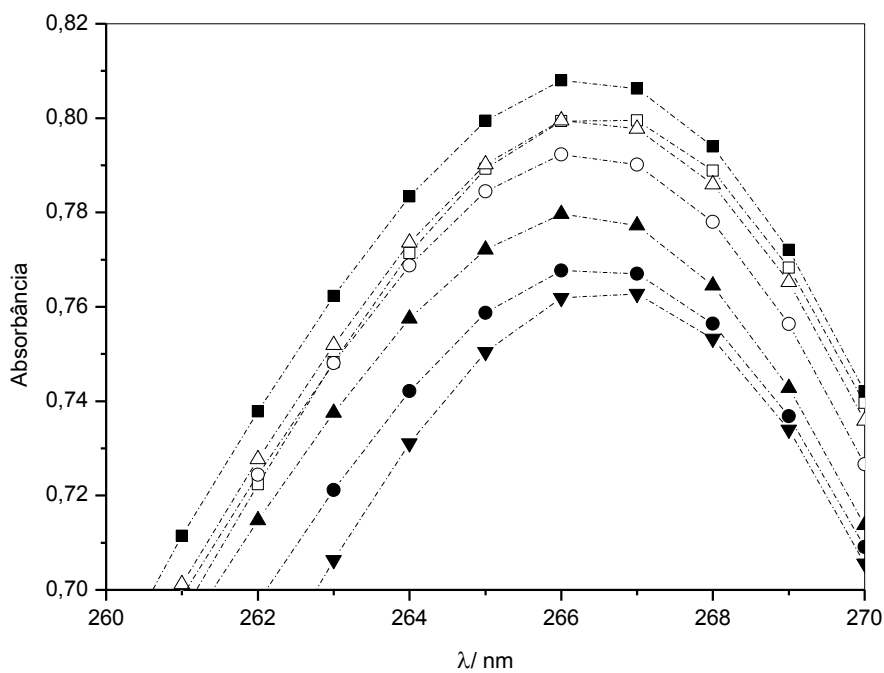
Assim, as regiões de absorção máximas foram ampliadas (Figura 16B, Figura 16C e Figura 16D).



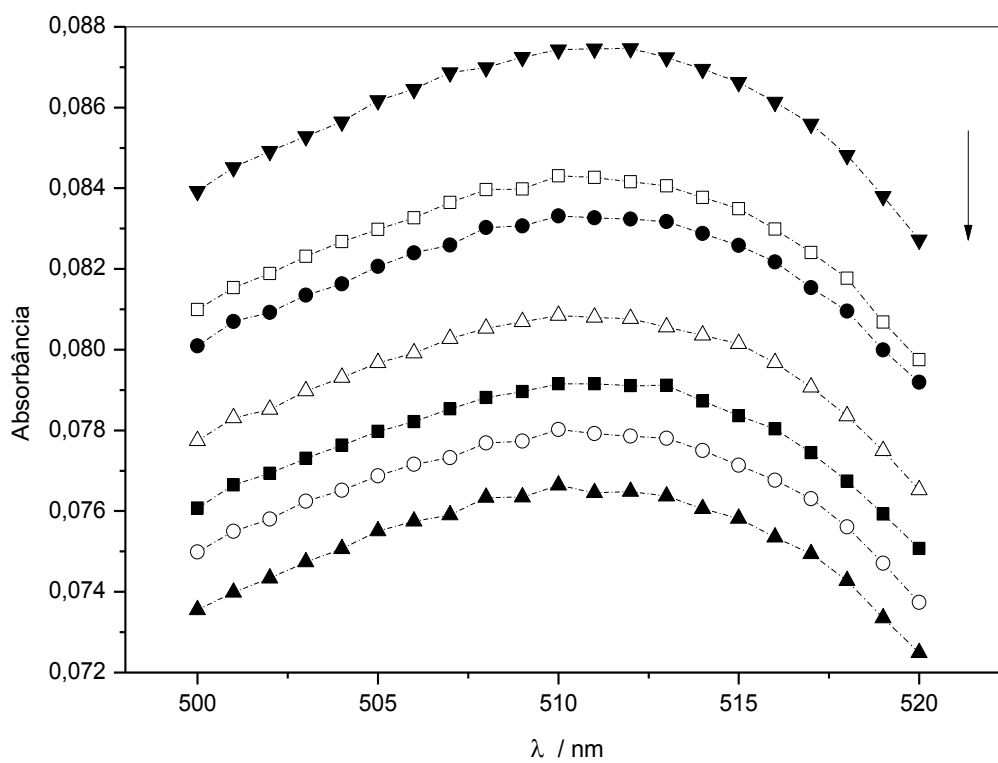
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 16 – Regiões do espectro de solução equimolar de ferro(II)-1,10-fenantrolina em pH 6,0,  $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ferro(II)-1,10-fenantrolina em diferentes concentrações de citrato: ( $\blacktriangledown$ )  $0,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; ( $\square$ )  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ; ( $\bullet$ )  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ;

( $\Delta$ ) 2,0 mmol L<sup>-1</sup>; ( $\blacksquare$ ) 3,0 mmol L<sup>-1</sup>; ( $\circ$ ) 4,0 mmol L<sup>-1</sup> e ( $\blacktriangle$ ) 5,0 mmol L<sup>-1</sup>.; (A) espectro em toda região de 190 a 1100 nm; região da banda em 201 nm; (B) em 267 nm e (D) em 512 nm.

Tradicionalmente, a interpretação dos resultados associados aos máximos envolve a avaliação do máximo de absorção. O aumento da concentração de citrato aparentemente não alterou os comprimentos de onda de absorbância máximos 267 e 512 nm (Figura 16B e Figura 16C), sendo usualmente um indício de que não houve alteração na espécie cromófora ou a proporção entre as espécies cromóforas (complexos ferro(II)-1,10-fenantrolina e a fenantrolina, por exemplo). Dessa maneira, não seria esperado alterações na faixa analítica ou na linearidade da curva analítica devido a fatores espectroscópicos. Por outro lado, há uma variação bastante acentuada nos comprimentos de onda máximos na região de 190 a 210 nm, sugerindo, portanto, curvas analíticas não lineares.

É importante, considerando os potenciais efeitos anteriormente, avaliar as regiões do espectro que apresentem um comportamento linear da absorbância com a concentração do analito e assim poder determinar o comprimento de onda máximo onde a sensibilidade seja adequada (apresentem qualidade suficiente para o problema analítico, que é a determinação de citrato no estudo de liberação controlada e sustentada).

Foi proposto um novo procedimento para avaliar o comportamento da absorbância de todos comprimentos de onda em relação à concentração do analito.

Para cada comprimento de onda foram obtidos os modelos de regressão linear para as curvas analíticas do citrato, considerando diferentes faixas analíticas.

Para um dado comprimento de onda, quanto maior a linearidade de uma curva analítica em uma dada faixa analítica (qualidade do ajuste do modelo de regressão), o valor de  $R^2$  se aproxima do valor numérico um. Assim, se o método apresentar uma ampla faixa analítica, os coeficientes de determinação para modelos obtidos com faixas analíticas menores apresentarão valores próximos entre si.

Na Figura 17A é apresentada o comportamento do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) dos modelos de regressão para cada comprimento de onda para avaliar indiretamente a faixa analítica em cada comprimento de onda.

Pode ser observado que para uma faixa analítica estreita (até 1,0 mmol L<sup>-1</sup>), o sistema apresenta boa linearidade em todos comprimentos de onda ( $R^2$  maior que 0,9) sendo que a partir de 193 nm, esse valor é superior a 0,99. Para a faixa

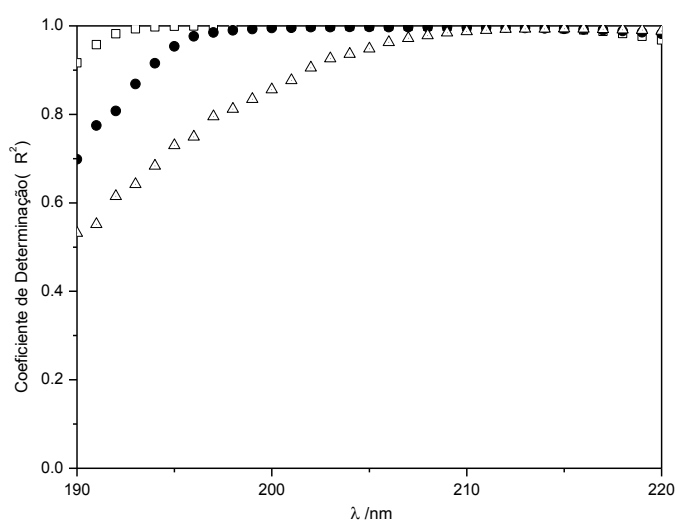
analítica mais ampla (até  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), esse valor alto é atingido apenas a partir de  $209 \text{ nm}$ .

Mudanças na faixa analítica sugerem alterações nos equilíbrios envolvidos, que podem determinar a alteração na eficiência global da reação entre o cromóforo e o analito ou nas proporções (Equação 7), que pode ser devido a alteração nas proporções dos complexos e do ligante livre devido à concentração do analito além de uma faixa ótima.

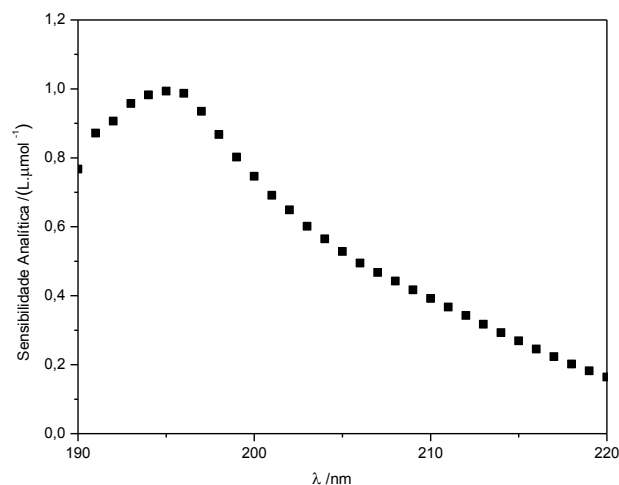
Por outro lado, a sensibilidade analítica (supondo uma curva analítica linear) obtida para a faixa analítica considerada mais linear (até  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) apresentou um máximo em  $195 \text{ nm}$  (Figura 17B). Além disso, pode-se observar que a sensibilidade foi positiva em toda faixa de comprimento de onda.

Este resultado sugere que, nessa região de comprimento de onda observada as espécies químicas cromóforas estão aumentando com a concentração do analito, não caracterizando uma espectrofotometria inversa. Por exemplo, a 1,10-fenantrolina livre pode estar sendo gradualmente liberada no meio, conforme sugere Xu *et al.* (1996), que observaram que a 1,10-fenantrolina absorve nas regiões de  $226$  e  $270 \text{ nm}$  (absortividade molar ao redor  $2,4 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

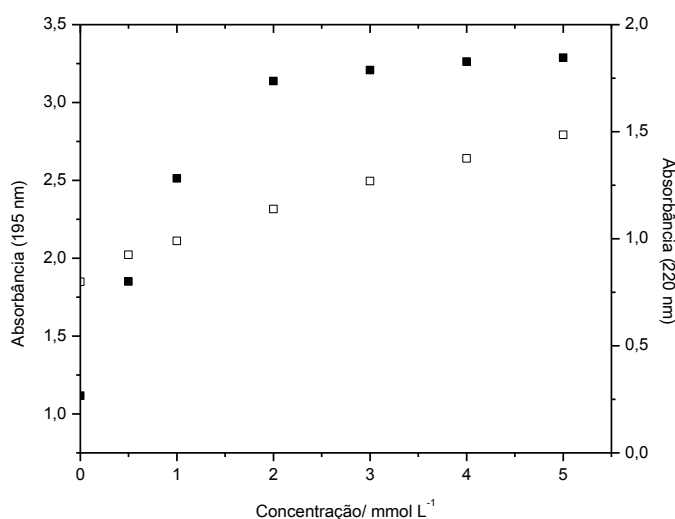
Desse modo, na Figura 17C, é apresentada uma curva analítica em  $195 \text{ nm}$ , com elevada sensibilidade analítica, mas faixa analítica mais estreita e outra em  $201 \text{ nm}$ , com menor sensibilidade analítica, mas faixa analítica mais ampla.



(A)



(B)

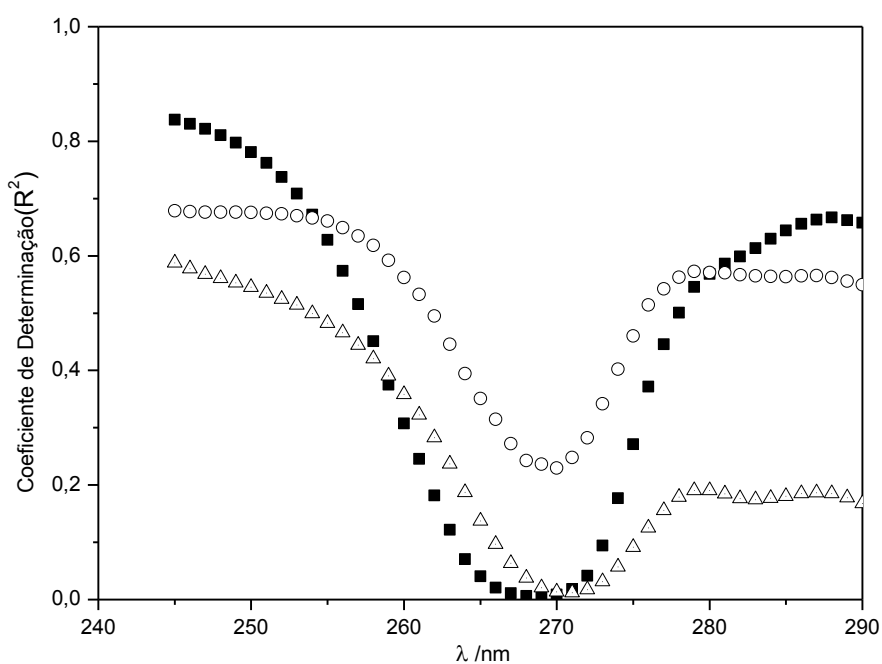


(C)

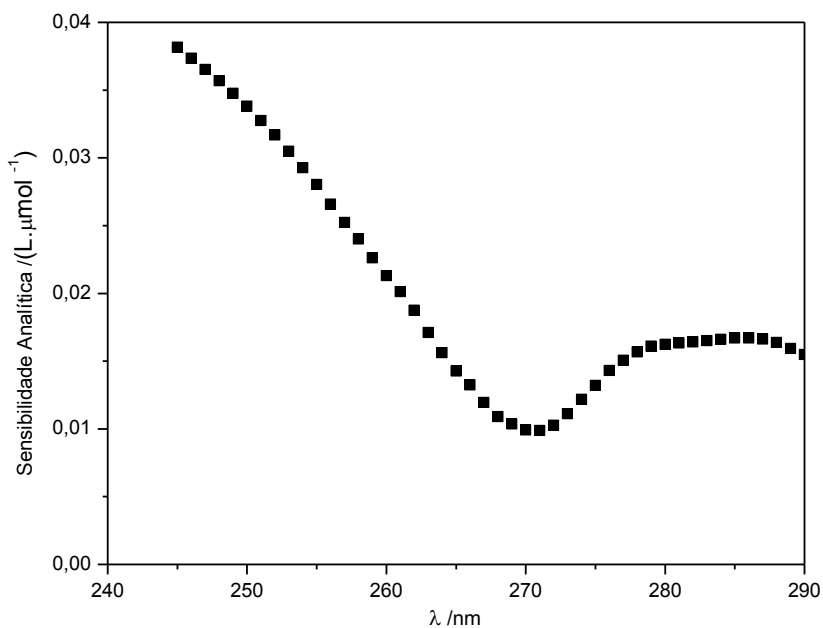
Figura 17 – (A) Comportamento do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) considerando diferentes faixas analíticas de concentrações de: (□) 0,0 a 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, (●) 0,0 a 2,0 mmol L<sup>-1</sup>, (△) 0,0 a 5,0 mmol L<sup>-1</sup>. (B) Faixa analítica intermediária até 2,0 mmol L<sup>-1</sup>. (C) Curva analítica em (■) 195 nm e outra em (□) 201 nm.

A caracterização da região ao redor de 267 nm é apresentada na Figura 18. Observa-se um comportamento bastante irregular com baixos valores de  $R^2$  (abaixo de 0,85) em toda essa região de comprimentos de onda, incluindo uma região com valores próximos de zero (Figura 18A). Este resultado indica que não há um comprimento de onda nessa faixa onde seja possível encontrar uma relação linear (ou próxima de um comportamento linear) entre a absorbância e a concentração do analito adequada para o desenvolvimento de um método analítico.

As sensibilidades analíticas também foram positivas em toda essa região, apresentando um mínimo em 266 nm e um máximo em 245 nm (Figura 18B). Esse comportamento pode estar associado ao fato da 1,10-fenantrolina apresentar uma absorvidade molar da mesma ordem de grandeza do que os complexos de ferro(II)-1,10 fenantrolina, de maneira que diminuição da absorbância devido aos complexos consumidos é compensada pelo aumento daquela devido à 1,10-fenantrolina livre formada, assim como o complexo de Fe(II)-1,10 fenantrolina que também absorve em 270 nm.



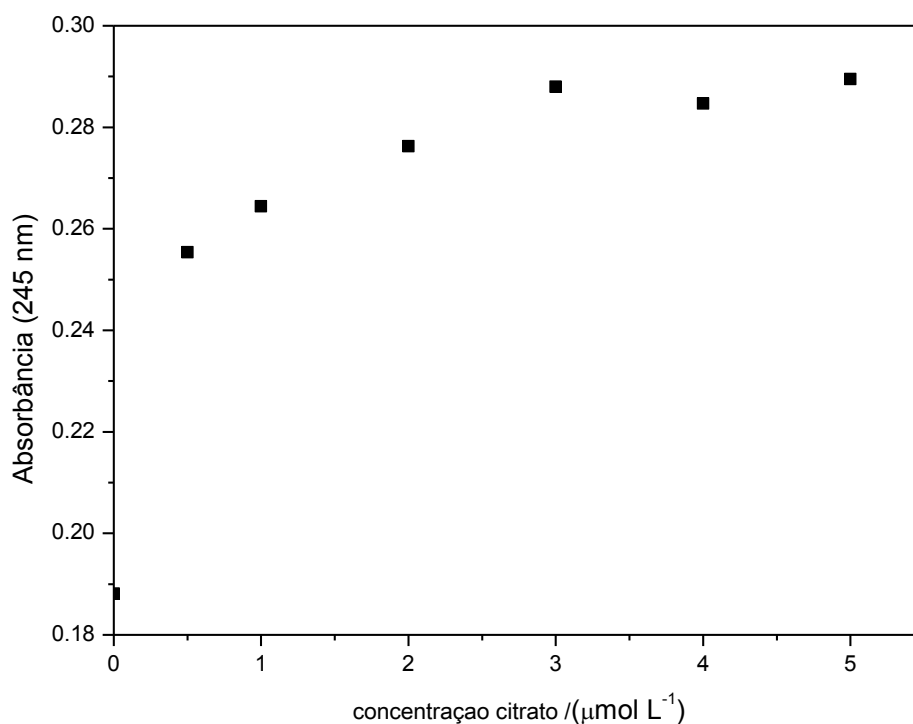
(A)



(B)

Figura 18- A caracterização da região ao redor de 267 nm. (A) Comportamento do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) em toda essa região de comprimentos de onda: (■) 0,0 a 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, (○) 0,0 a 2,0 mmol L<sup>-1</sup> e (△) 0,0 a 5,0 mmol L<sup>-1</sup>. (B) Comportamento da sensibilidade na região ao redor de 267 nm para uma faixa analítica de 0,0 a 2,0 mmol L<sup>-1</sup>.

O comportamento das curvas analíticas no comprimento de onda com menor e com maior sensibilidades, são apresentadas na Figura 19.



(A)

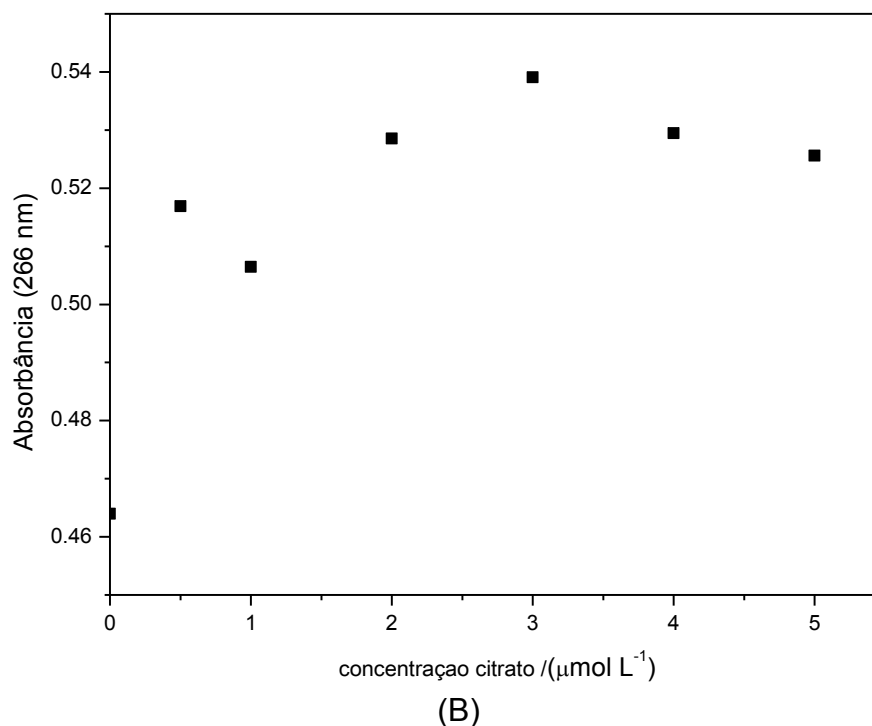
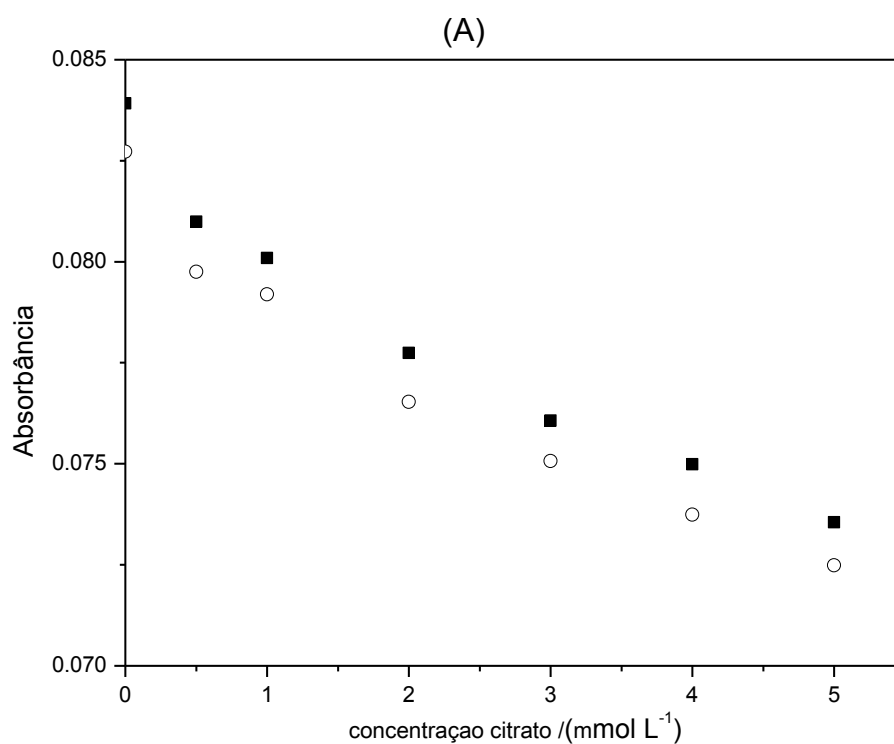
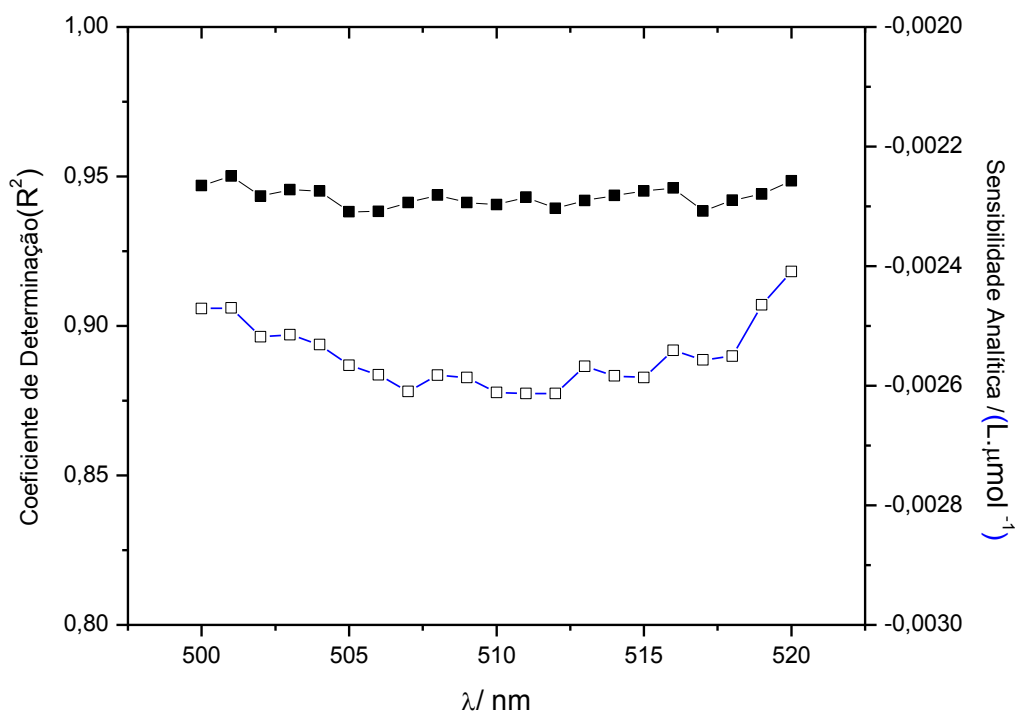


Figura 19- Curvas analíticas obtidas na região ao redor de 267 nm. (C) em 245 nm. (D) em 266 nm.

O comportamento da região de 512 nm, é apresentado na Figura 20. Os elevados valores de  $R^2$  (ao redor de 0,95) e constantes em toda faixa de comprimento de onda, assim como a sensibilidade analítica negativa constantes (Figura 20A) sugere a diminuição razoavelmente linear da concentração dos complexos de ferro(II)-1,10-fenantrolina, com o aumento da concentração de citrato. A similaridade do comportamento em diferentes comprimentos de onda dessa região é compatível com o fato de apenas os complexos absorverem nessa região e portanto, o comportamento da espectrofotometria inversa ocorrer de acordo com a Equação 7. Essa similaridade é ilustrada com as curvas analíticas em 500 e 512 nm (Figura 20B), sendo que nesse último valor observou-se a maior sensibilidade.



(B)

Figura 20 - Comportamento do complexo com 1,10-fenantrolina na região de 512. (A) (■) comportamento do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) em toda essa região de comprimentos de onda e (□) comportamento da sensibilidade analítica de 0,0 a 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$ . (B) Curvas analíticas de 0,0 a 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$ : (■) 512 nm e (○) 500 nm.

Essa banda de absorção ao redor de 512 nm é aquela usualmente utilizada para determinação de ferro (II) com a formação do complexo com 1,10-fenantrolina, pois, embora apresente uma menor sensibilidade em relação às duas sensibilidades aparentes das regiões anteriormente descritas.

Do ponto de vista de desenvolvimento de método analítico, embora o valor de sensibilidade em 195 nm seja muito elevado ( $1,0 \text{ L } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), essa região do espectro é muito suscetível à interferência de concomitantes, pois duplas ligações, carbonilas, dentre outros grupos funcionais presentes em inúmeras espécies químicas orgânicas, além de grupos inorgânicos, tais como fosfato (SILVERSTEIN *et al.*, 2006; HARRIS, 2012) absorvem fortemente nessa região. Seu uso está restrito a soluções onde existam poucos concomitantes e que suas potenciais interferências sejam previamente avaliadas, diminuindo seu valor analítico.

O comprimento de onda de 512 nm, por outro lado, é bastante robusto considerando a linearidade e sensibilidade constantes em uma ampla faixa de comprimento de onda. Por outro lado, a sensibilidade mais baixa observada determinará o uso de faixas analíticas em valores de concentração mais elevados. Assim, esse comprimento de onda foi selecionado para o desenvolvimento do método.

### 3.2. Otimização do método

Considerando que a dependência entre as variáveis e o pH, concentrações de 1,10-fenantrolina e de ferro (II), com a sensibilidade analítica ou outra resposta analítica não são facilmente explicadas por modelos simples, a otimização multivariáveis utilizando um planejamento experimental (DOE) baseado na matriz de Doehlert foi escolhida (FERREIRA *et al.*, 2004). O pH, foi a variável escolhida para ser estudada em 7 níveis. A resposta utilizada para a otimização foi a sensibilidade analítica em 512 nm, ou seja, a inclinação da curva analítica linear. No domínio do planejamento, ou seja, considerando os intervalos das variáveis estudadas, a sensibilidade variou entre - 0,026 e 0,009  $\text{L mol}^{-1}$ .

Foram obtidos modelos de regressão linear múltipla visando explicar as respostas obtidas em função das variáveis nas formas codificadas (Equação 9).

$$\hat{S} = b_9C^2 + b_8B^2 + b_7A^2 + b_6CB + b_5CA + b_4BA + b_3C + b_2B + b_1A + b_0 \quad \text{Equação 9}$$

Como muitos dos termos da Equação 9 podem não auxiliar na explicação da resposta, ou seja, alguns dos fatores ( $b_i$ ) podem não ter diferença significativa em relação ao zero, foi utilizado um procedimento tipo *stepwise* (DRAPER & SMITH, 1966) para obter o modelo mais simples que explique a influência das variáveis sobre a resposta estudada. Os termos  $b_i$  que não diferem significativamente de zero eram eliminados do modelo e nova regressão linear múltipla era obtida (e assim a variância do sistema era redistribuída entre os termos de acordo com o método dos quadrados mínimos), até que apenas termos significativamente diferentes de zero estivessem presentes no modelo. Assim, para avaliar os termos da Equação 9 que são significativamente diferentes de zero, e, portanto auxiliam na explicação da resposta, foi aplicado um teste t-Student a cada termo, utilizando a sua estimativa de desvio padrão (Equação 10). Se o valor do parâmetro  $t$  calculado é menor que o valor de  $t$  crítico ou tabelado (95% confiança), o termo não difere significativamente de zero (MEIER & ZUND, 1993).

$$t_{calc} = \frac{b_i}{s_i} \quad \text{Equação 10}$$

Onde  $s_i$  é a estimativa do desvio padrão do coeficiente  $b_i$ .

Uma planilha no Microsoft Excel foi desenvolvida para facilitar o procedimento de obtenção dos modelos de regressão e avaliação *stepwise* (Doehlert 3-variáveis.xls).

Os valores dos coeficientes e suas estimativas do desvio padrão para todos os termos da Equação 9 estão apresentados na Figura 21. Mesmo avaliando apenas as estimativas dos desvios-padrão dos termos, apresentadas como barras de erro, ao invés do intervalo de confiança (a 95% e que são mais amplos que as estimativas dos desvios-padrão), pode-se observar, por exemplo, que os termos quadráticos não diferem significativamente de zero assim como alguns termos de interação e termos lineares.

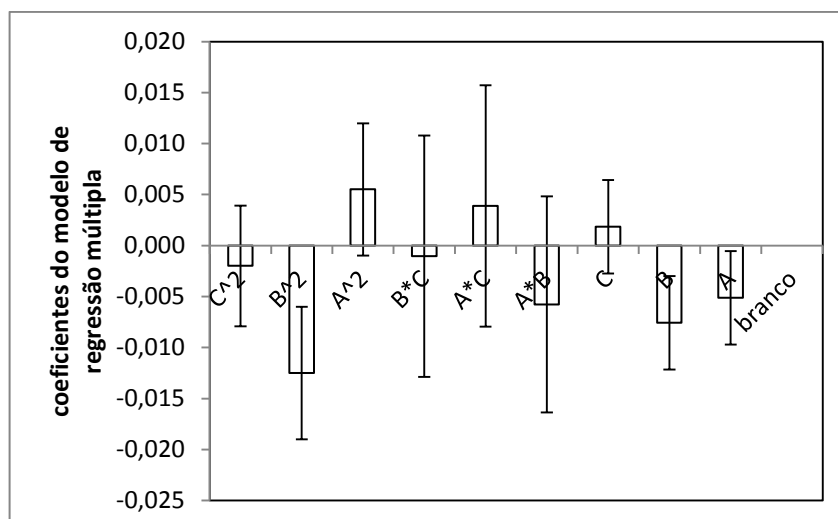


Figura 21 - Coeficientes dos termos do modelo de regressão linear múltipla (Eq. 6): (A) Concentração de ferro (II); (B) pH; (C) Concentração de 1,10-fenantrolina. As barras de erro representam as estimativas do desvio-padrão de cada termo.

Entretanto, mesmo após a avaliação *stepwise*, os coeficientes dos termos avaliados não foram significativamente diferentes de zero, conforme são apresentados na Figura 22.

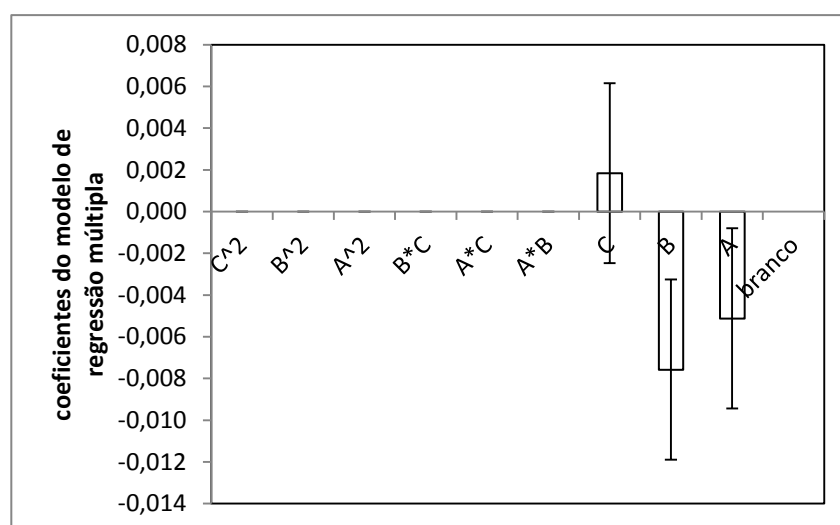


Figura 22 - Coeficientes dos termos do modelo de regressão linear múltipla para a sensibilidade analítica após avaliação *Stepwise*. (A) Concentração de ferro (II); (B) pH; (C) Concentração de 1,10-fenantrolina.

A curva analítica do método otimizado (Equação 11) apresentou um  $R^2$  de 0,75, LOD de  $0,21 \text{ mmol L}^{-1}$  e LOQ de  $0,68 \text{ mmol L}^{-1}$ , calculados a partir da Equação 13. A faixa analítica foi de  $0,68$  a  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ .

$$\hat{A} = (-0,026 \pm 0,004) c / (\text{mmol L}^{-1}) + (0,050 \pm 0,002)$$

Equação 11

A Figura 23 apresenta a curva analítica obtida para o método otimizado.

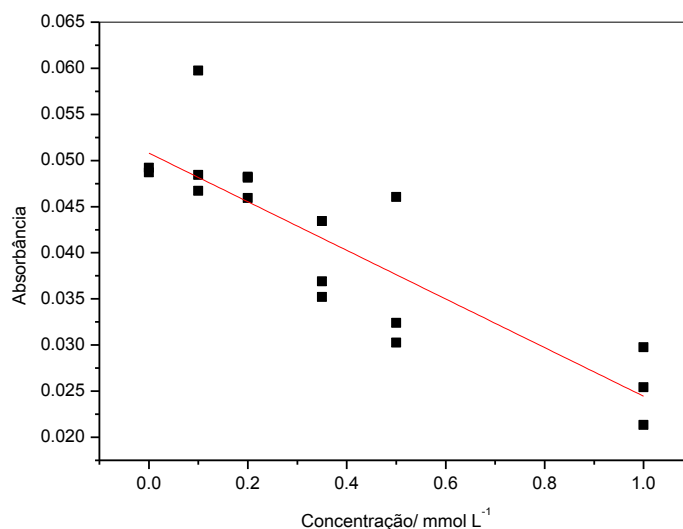


Figura 23 - Curva analítica obtida para concentrações de citrato variando de 0,0 a 1,0 mmol L<sup>-1</sup> em presença dos complexos de ferro (II)-1,10-fenantrolina (20,0 μmol L<sup>-1</sup> para concentrações de ferro (II) e 1,10-fenantrolina).

Uma vez que, mesmo com a otimização, as sensibilidades analíticas obtidas não foram elevadas o suficiente para a aplicação de interesse, valores de R<sup>2</sup> baixos e a faixa analítica obtida foi estreita, foi necessária trabalhar em uma faixa analítica formada por concentrações mais elevadas do analito, como pode ser observado na Figura 24.

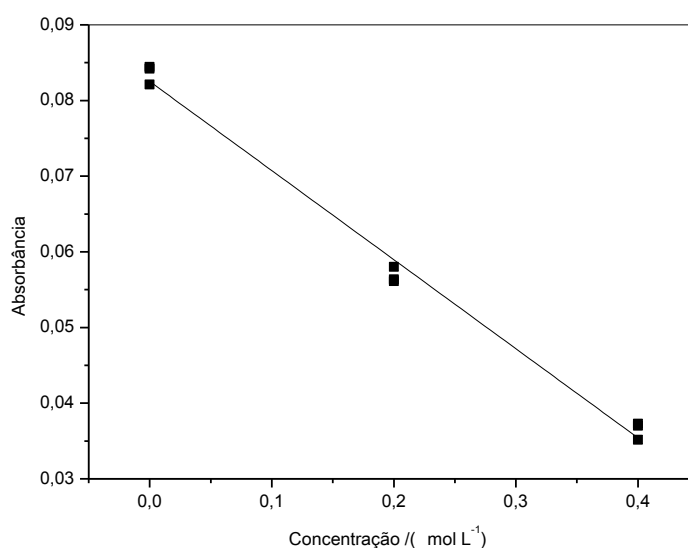


Figura 24 – Curva analítica obtida para concentrações de citrato variando de 0,0 a 0,4 mol L<sup>-1</sup> em presença dos complexos de ferro(II)-1,10-fenantrolina (200,0 μmol L<sup>-1</sup> para concentrações de ferro (II) e 1,10-

fenantrolina).

A curva analítica obtida (Equação 12) apresentou uma boa qualidade do ajuste com  $R^2$  igual a 0,9914 e desvio padrão dos resíduos igual a 0,0020.

$$\hat{A} = (0,0825 \pm 0,0011) - (0,1178 \pm 0,0041) c(\text{citrato}) \quad \text{Equação 12}$$

O limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados a partir dos parâmetros da curva analítica (Equação 12) (MILLER & MILLER, 1993). Os valores foram iguais a 0,027 e 0,091 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente.

$$LOD = -3 \frac{s_B}{S} \quad LOQ = -10 \frac{s_B}{S} \quad \text{Equação 13}$$

Onde  $s_B$  é a estimativa do branco (termo constante) e  $S$ , a sensibilidade analítica (inclinação).

A faixa analítica selecionada foi de 0,091 a 0,4 mol L<sup>-1</sup> sendo que o limite inferior dessa faixa analítica se refere a um valor estimado do LOQ nessa condição.

Desse modo, julgou-se adequado a seleção de outro complexo colorido para a obtenção de um método adequado para a determinação de citrato.

#### 4. Conclusões parciais

Foi realizado um novo procedimento para avaliar a linearidade nos comprimentos de onda de máximas absorvância, sendo possível verificar a região mais adequada para realização do estudo. O procedimento utilizado foi simples e permite identificar o comportamento analítico ao longo de todo espectro de absorção.

Embora os sistema ferro(II)-1,10-fenantrolina apresente sensibilidades aparentes maiores na região do ultravioleta, apenas a banda de absorção no visível apresentou qualidades suficiente para o desenvolvimento do método, sendo que o comprimento de onda mais adequado foi o de 512 nm, apresentando uma faixa de trabalho mais ampla em termos de sensibilidade e coeficiente de determinação constantes em toda faixa estudada.

Foi realizada uma otimização multivariável baseado na matriz de Doehlert com 3 variáveis. A região estudada não apresentou influência significativa das variáveis estudadas. Na condição otimizada, a curva analítica apresentou  $R^2$  de 0,75; LOD de  $0,21 \text{ mmol L}^{-1}$  e LOQ de  $0,68 \text{ mmol L}^{-1}$ . A faixa analítica estudada foi de  $0,68$  a  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , porém, considerando a sensibilidade máxima obtida, a faixa analítica de  $0,091$  a  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  foi utilizada, com boa qualidade do ajuste com  $R^2$  igual a 0,9914 e desvio padrão dos resíduos igual a 0,0020.

Uma vez que a faixa analítica adequada está em uma região muito superior àquela desejada para a determinação de citrato no sistema de liberação controlada, decidiu-se não utilizar o método proposto e desenvolver um segundo método analítico utilizando o complexo colorido de Cr(III)-EDTA.

## CAPÍTULO 3: MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO INVERSO BASEADO NA COMPETIÇÃO COM O COMPLEXO DE CROMO(III)-EDTA

### 1. Introdução

O cromo (III) possui número de coordenação igual a 6, podendo, assim se ligar a seis átomos doadores de elétrons, de modo que seus complexos possuem geometria octaédrica (SILVA, 2013; TOMA, 2013). O cromo (III) também apresenta um comportamento ácido-base de Bronsted, podendo formar até o quarto hidroxocomplexo (Figura 25).

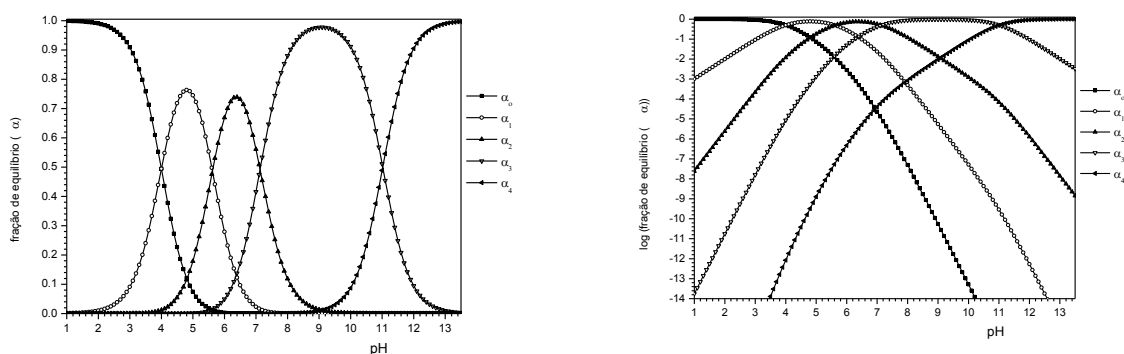
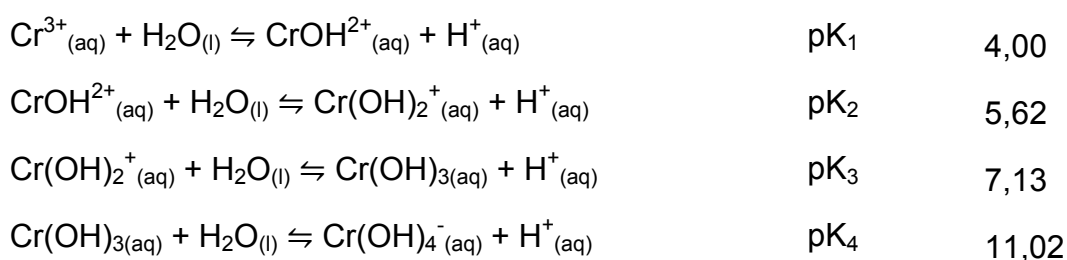


Figura 25 – Curvas de distribuição de espécies do sistema ácido-base de Bronsted do cromo (III). (A) Fração de equilíbrio em função do pH. (B) Logaritmo da fração de equilíbrio em função do pH do meio. (■) Espécie  $\alpha_0$ . (○) Espécie  $\alpha_1$ . (▲) Espécie  $\alpha_2$ . (▽) Espécie  $\alpha_3$ . (◀) Espécie  $\alpha_4$ .

O hidroxocomplexo neutro, como todos hidroxocomplexos neutros de metais, é pouco solúvel, com uma solubilidade intrínseca ( $s_0$ ) igual a  $1,12 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e complexos polinucleares também podem ser formar em solução (OLIVEIRA, 2009; GREENWOOD & EARSHAN, 1997; BAES & MESMER, 1976).



O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é um sólido cristalino, que atua como um ligante forte para um grande número de metais. É utilizado como quelante nas indústrias farmacêuticas, nas indústrias de produtos de limpeza, na indústria alimentar, nas indústrias de cosméticos, entre outras (CHIUMINENTO *et al.*, 2015).

A Figura 26 apresenta a estrutura do EDTA em sua forma mais protonada, ainda que, devido ao  $pK_1$  abaixo de 1,0, essa espécie praticamente não existe em solução aquosa (OLIVEIRA, 2009).

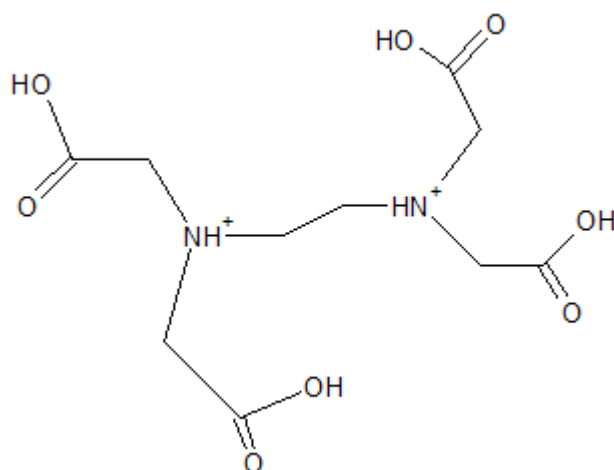


Figura 26 – Estrutura do EDTA na forma totalmente protonada ( $H_6EDTA^{2+}$ ) (Figura gerada no software ACD-Labs ChemsSketch 12.0).

A Figura 27 apresenta as curvas de distribuição de espécies do EDTA, com as frações de equilíbrio e com o logaritmo das frações de equilíbrio em função do pH. É importante observar que a espécie mais importante é aquela totalmente desprotonada.



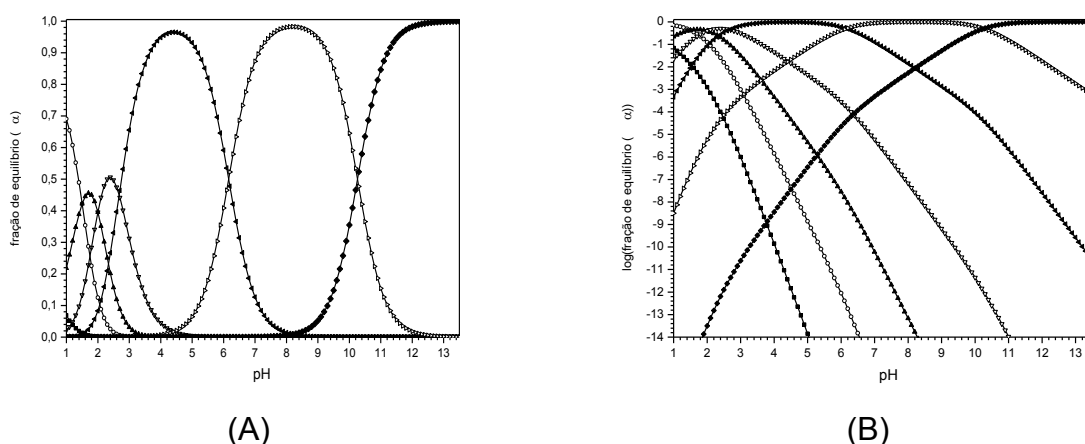


Figura 27 – Curvas de distribuição de espécies do EDTA. (A) Fração de equilíbrio em função do pH. (B) Logaritmo da fração de equilíbrio em função do pH do meio. (■) Espécie  $\alpha_0$ . (○) Espécie  $\alpha_1$ . (▲) Espécie  $\alpha_2$ . (▽) Espécie  $\alpha_3$ . (◄) Espécie  $\alpha_4$ . (▷) Espécie  $\alpha_5$ . (◆) Espécie  $\alpha_6$ .

Silva (2013) sugeriu que o íon cromo (III) interage com o EDTA através de cinco sítios de coordenação e uma molécula de água ocupa a sexta posição, apresentado na Figura 28. Essa proposta é bem comum na literatura, embora, o carboxilato livre possa não estar protonado, uma vez que o complexo é aniônico em pH 5,5. De acordo com Martell & Smith (2004), o complexo Cr(III)-EDTA apresenta um pKa igual a 7,4 (em força iônica  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), referente à liberação de um próton da molécula de água ligada.

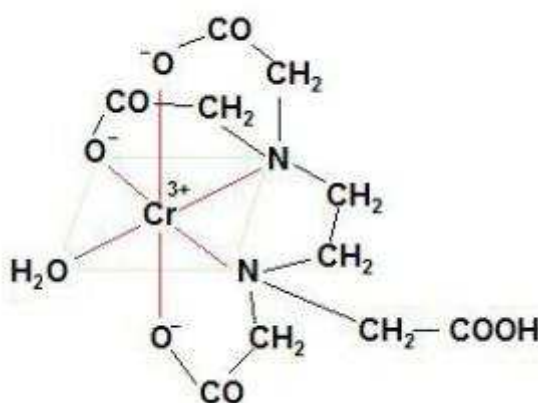
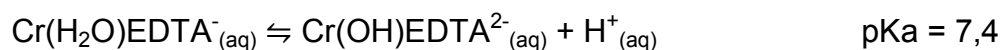


Figura 28 – Proposta de coordenação pentadentada do EDTA com cromo (III) e uma molécula de água ocupando a sexta posição. Fonte: (SILVA, 2013).

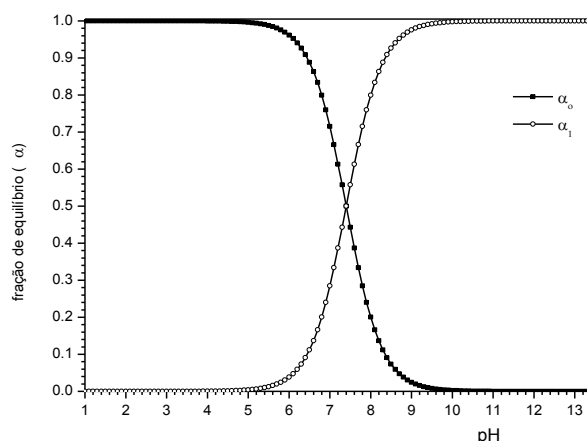


Figura 29 – Diagrama de Distribuição das espécies  $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})\text{EDTA}^-$  e  $\text{Cr}(\text{OH})\text{EDTA}^{2-}$ .

A química do cromo (III) e ferro (III) apresentam grandes semelhanças, tais como raios e energias de hidratação dos íons similares; geralmente formam complexos com constantes de estabilidade próximos, com os mesmos ligantes. A principal diferença é, como já dito, a grande inércia química dos íons cromo (III), ou seja, suas reações ocorrem uma velocidade muito mais lenta do que o ferro (III), cujas reações são quase instantâneas (YEATES & HEALY, 1975).

A reatividade dos íons de metais de transição pode ser explicada pelas energias de ativação do campo ligante (ou do orbital molecular). O mecanismo de troca de água, solvatação em aquocomplexo, também permite avaliar essa reatividade. A taxa de troca de água de solvatação de um aquocomplexo de um íon de metal de transição aumenta com aumenta os elétrons do orbital d e diminui com o raio iônico.

O cromo (III) é bastante inerte a temperatura ambiente (COSTA *et al.*, 1999), devido a sua grande energia de ativação do campo ligante que reflete em elevados valores de entalpia ( $\Delta H$ ) (HELM & MERBACH, 1999). Além disso, o cromo (III) possui três elétrons nos orbitais  $t_{2g}$ , que podem ser representados por ser  $(t_{2g})^3$  e nenhum elétron nos orbitais  $e_g$  para uma configuração octaédrica, que confere ao íon trivalente grande estabilidade, sendo considerado o seu estado redox mais estável (SILVA, 2013; CARBONARO *et al.*, 2008).

Não foram encontradas no banco de dados valores referentes as constantes de formação do cromo (III) com o citrato. Entretanto, como a constante de formação de complexo do ferro (III) com o citrato é alta, portanto infere-se que o cromo (III)

também possui uma constante de formação relativamente alta para complexação com esse ligante.



O EDTA forma um complexo violeta, muito estável com o cromo (III), ( $\log \beta_1$  igual a 24,3). Alguns métodos foram propostos para a determinação espectrofotométrica do cromo utilizando essa reação, porém com diferentes métodos de aquecimento (COSTA *et al.*, 1999). Por exemplo, Costa *et al.* (1999), utilizou a energia de microondas para acelerar a formação do complexo de cromo (III) com EDTA. O complexo foi formado em 3 minutos e apresentou um máximo de absorção em 542 nm.

Similarmente ao método utilizando os complexos ferro(II)-1,10-fenantrolina como espécies cromóforas, este método baseia na relação entre a concentração analítica do citrato com a diminuição da absorbância do complexo de cromo (III) com EDTA devido tanto à competição deste com o EDTA pelo cromo (III), como também ao controle cinético na formação dos complexos.

## 2. Procedimento geral

Devido à cinética lenta das reações de complexação do cromo (III), as soluções desse metal e soluções padrão de citrato foram mantidas em frascos de 10,0 mL fechados, em banho-maria a 80° C por um tempo definido, sendo posteriormente resfriados em banho de gelo. Após a adição de EDTA, o sistema foi novamente aquecido e resfriado e então a absorbância medida. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro *diode array* Agilent 8453. Foi utilizada uma cubeta de quartzo da marca StarnaCells, de 1,0 cm de caminho óptico.

## 3. Procedimento do Método otimizado proposto

Para determinação de citrato, foram adicionados 2,0 mL de solução de cromo (III) 0,02 mol L<sup>-1</sup> e 2,0 mL de amostra e 2,0 mL de água. A solução foi aquecida por 30 minutos a 80 °C e resfriada em banho de gelo. Em seguida foram adicionados 1,0 mL de solução de EDTA 0,05 mol L<sup>-1</sup> e 1,0 mL de solução tampão acetato 0,18 mol L<sup>-1</sup> e novamente realizado o aquecimento por 30 minutos e resfriamento. A absorbância foi medida em comprimento de onda adequado.

A Figura 30 apresenta o diagrama esquemático do procedimento do método otimizado proposto.

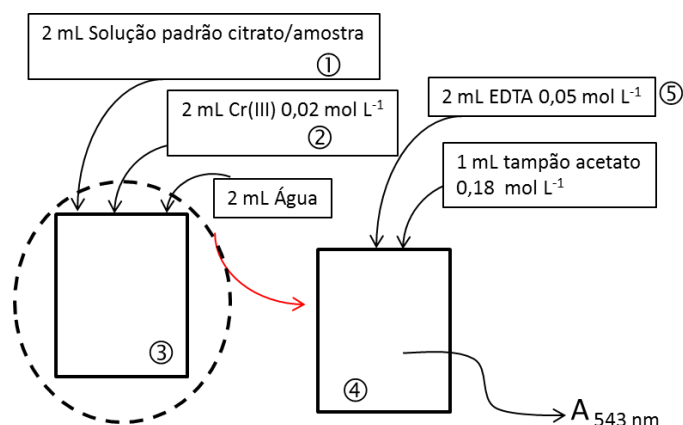


Figura 30 - Diagrama esquemático do procedimento do método otimizado proposto. Os números se referem às etapas do processo de diluição.

#### 4.1. Otimização do método

##### 4.1.1. Planejamento fatorial

A otimização do método desenvolvido foi realizada inicialmente com o auxílio de um planejamento fatorial completo de  $2^3$  com três pontos centrais conforme apresentado na Tabela 5. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

Tabela 5 – Variáveis utilizadas no planejamento fatorial completo  $2^3$  e seus respectivos níveis estudados, com seus valores reais e seus codes.

Parâmetro	Nível (-)		Nível (+)		Nível (0)	
	Valor	Code	Valor	Code	Valor	Code
	real		real		real	
pH	4,0	-1	5,0	+1	4,5	0
Concentração cromo(III)/(mmol L <sup>-1</sup> )	2,0	-1	5,0	+1	3,5	0
Concentração EDTA */ %	80,0	-1	120,0	+1	100,0	0

\* porcentagem em relação àquela do cromo

Na Tabela 6 são apresentados o planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central utilizando valores codificados e seus valores reais.

Tabela 6 - Experimentos do planejamento fatorial completo de  $2^3$  com ponto central.

Experimento	Valores Codificados			Valores Reais		
	pH	Cr(III)	EDTA	pH	Cromo(III)/ (mmol L <sup>-1</sup> )	EDTA/%
1	-1	-1	-1	4,0	2,0	80,0
2	+1	-1	-1	5,0	2,0	80,0
3	-1	+1	-1	4,0	5,0	80,0
4	+1	+1	-1	5,0	5,0	80,0
5	-1	-1	+1	4,0	2,0	120,0
6	+1	-1	+1	5,0	2,0	120,0
7	-1	+1	+1	4,0	5,0	80,0
8	+1	+1	+1	5,0	5,0	120,0
9	0	0	0	4,5	3,5	100,0
10	0	0	0	4,5	3,5	100,0
11	0	0	0	4,5	3,5	100,0

Foram obtidas curvas analíticas de citrato na faixa de concentração de 0,0 a 5,0 mmol L<sup>-1</sup> para cada experimento do planejamento fatorial nas combinações com pH e concentrações de cromo (III) e EDTA. Todos os pontos das curvas analíticas foram realizados em triplicatas.

#### 4.1.2. Planejamento experimental baseado na Matriz de Doehlert

A superfície de resposta e a condição ótima foram obtidas com o auxílio da Matriz de Doehlert para duas variáveis. A Tabela 7 apresenta o planejamento considerando níveis codificados de cada variável, (A, concentrações de cromo (III) e B, concentrações de EDTA) e seus respectivos valores reais. A partir do experimento 9 são apresentados os experimentos para a expansão da matriz. Os cálculos dos codes foram apresentados no item 2.4 do Capítulo 2.

Tabela 7 – Descrição dos experimentos do Planejamento Experimental baseado na Matriz de Doehlert para duas variáveis, usando valores codificados (*codes*) e seus respectivos valores reais. (A) Concentração de cromo (III) e (B) concentração de EDTA.

Experimentos	Variáveis Codificados		Valores Reais	
	A	B	A /mmol L <sup>-1</sup>	B (% A)
1	-1,000	0,000	2,000	100,000
2	-0,500	-0,870	2,750	80,000
3	-0,500	0,870	2,750	120,000
4	0,500	-0,870	4,250	80,000
5	0,500	0,870	4,250	120,000
6	1,000	0,000	5,000	100,000
7	0,000	0,000	3,500	100,000
8	0,000	0,000	3,500	100,000
9	0,000	0,000	3,500	100,000
10	-1,000	0,000	2,000	100,000
11	-0,500	-0,866	2,750	120,000
12	-0,500	0,866	2,750	80,000
13	0,500	-0,866	4,250	120,000
14	0,500	0,866	4,250	80,000
15	1,000	0,000	5,000	100,000
16	0,000	0,000	5,000	100,000
17	1,500	0,866	5,750	120,000
18	0,000	1,732	3,500	140,000
19	1,000	1,732	5,000	140,000

## 4.2. Estudo dos concomitantes

Foram realizados estudos para avaliar uma possível interferência de concomitantes no solo, tais como os cátions ferro (II), ferro (III), manganês (II) e cobre (II), assim como os ligantes fosfato, oxalato e etilenodiamina, na proporção de 1, 10, 100 e 1000 vezes.

Para avaliar a concentração mínima dos possíveis concomitantes na matriz que podem interferir na determinação do citrato, foram adicionados às amostras nas condições ótimas, soluções de ferro (II), ferro (III), manganês (II) e cobre (II), oxalato, fosfato e etilenodiamina, para concentração de citrato igual a  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . Os íons metálicos e ligantes foram considerados interferentes quando foi observada uma diminuição de 10% no valor da absorbância.

Adicionou-se os concomitantes juntamente com o citrato e o cromo (III), realizou-se o aquecimento por 30 minutos e resfriamento em banho de gelo. Em seguida foi adicionado o EDTA, solução tampão e aquecido e resfriado novamente. Posteriormente foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro.

## 4.3. Uso de coluna quelante

No estudo de remoção de metais de transição, utilizou-se uma coluna preenchida com resina quelante Chelex® 100 (Bio-Rad), com 5,0 cm de comprimento e 1,8 cm de largura. A coluna foi condicionada passando solução tampão de acetato pH 4,0. No experimento, um volume de 5,0 mL de solução contendo os metais foi percolada pela coluna na vazão de cerca de 10 gotas/min, e lavada com 5,0 mL de solução tampão. Após utilizada, a coluna foi lavada com solução de HCl  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  e acondicionada em solução tampão para posterior utilização.

## 4.4. Estudo de adição e recuperação

Para a realização desse estudo foi utilizado um solo Gleissolo Háplico Tb Distrófico previamente peneirado pelo Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

O solo foi colocado em um recipiente e deixado para secar durante 3 dias em temperatura ambiente a sombra, obtendo-se assim amostra conhecida por Terra Fina Seca ao Ar (TFSA).

Sobre 10,00 g da TFSA para cada ensaio, foram adicionados 1,0 mL de solução de citrato em diferentes concentrações. A mistura foi homogeneizada com o auxílio do bastão de vidro e deixada secar a temperatura ambiente. Todos os estudos foram realizados em triplicatas.

Após secagem das amostras, foram adicionados 100,0 mL de água Milli Q e a mistura foi novamente homogeneizada com o auxílio do bastão de vidro. Em seguida, as misturas foram colocadas sob agitação magnética de 200 rpm durante uma hora e posteriormente deixadas em repouso por 2 horas para decantação. Decorrido esse tempo, foi necessário a centrifugação por 30 min a 100 rpm.

O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e 5,0 mL foi percolado na coluna Chelex<sup>®</sup> 100 (Bio Rad) e o volume recuperado foi diluído para 12,5 vezes e então o teor de citrato foi determinado de acordo com o item 3.0. As concentrações finais recuperadas foram: 0,5; 1,0; 1,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>.

#### **4.5. Figuras de mérito**

Para a caracterização e validação do método proposto, foram avaliadas as figuras de mérito: sensibilidade mínima do método (OLIVEIRA, 2014; OLIVEIRA, *et al.*, 2015); qualidade do ajuste do modelo; faixa analítica; limite de detecção (LOD); limite de quantificação (LOQ), estudo de concomitantes, precisão (através de medidas de repetibilidade) e exatidão (através do método de adição e recuperação).

#### **4.6. Tratamento dos dados**

Todos os dados foram tratados em planilhas eletrônicas Microsoft Excel (2003-2010) ou no software OriginPro 8.0 (LabOrigin). Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do Statistica 8.0.

### **5. Resultados e Discussão**

#### **5.1. Seleção do comprimento de onda ( $\lambda$ )**

Para a determinação do comprimento de onda adequado para o desenvolvimento do método analítico, foram obtidos espectros de absorção na região do ultravioleta e do visível tanto para soluções contendo complexos de cromo(III)-EDTA quanto de cromo(III)-citrato. Foram utilizadas concentrações de EDTA e de cromo (III) iguais a 2,0 mmol L<sup>-1</sup> e as concentrações de citrato variavam de 0,0 a 0,08 mol L<sup>-1</sup>.

O complexo de cromo(III)-EDTA apresenta maiores valores de absorção em 391 nm e 543 nm, conforme apresentado na Figura 31.

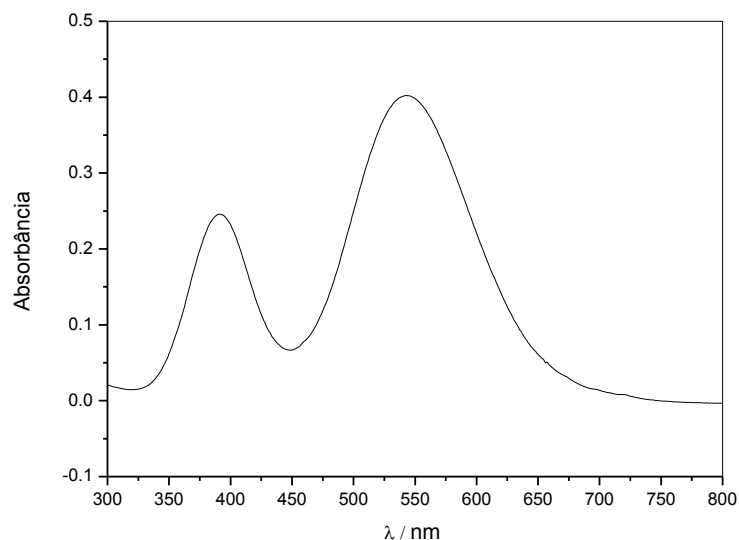


Figura 31 – Espectro do complexo de cromo(III)-EDTA (concentrações de cromo (III) e EDTA de  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

As absorvidades molares (aparentes) para cada máximo de absorção foram estimadas considerando-se a formação completa do complexo, obtendo-se os valores  $122,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e  $201,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para os comprimentos de onda de 391 e 543 nm, respectivamente.

Na Figura 32 é apresentado o espectro de absorção da solução de cromo (III) livre  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ .

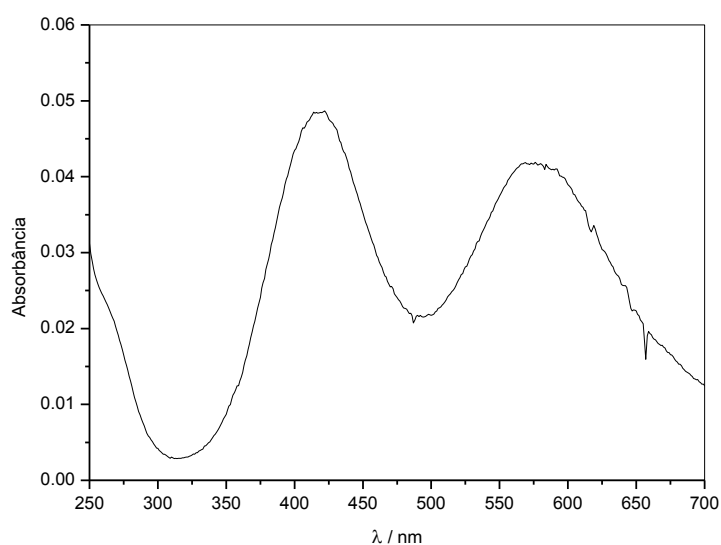


Figura 32 – Espectro de absorção de solução de cromo (III)  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ .

O cromo (III) livre apresentou máximos de absorção em 422 nm e 569 nm, as absorptividades molares estimadas foram de  $24,3 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e  $20,9 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Esses valores são similares àqueles descritos na literatura (CLESCERI *et al.*, 1998), com  $25,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  em 426 nm e  $50,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  em 604 nm. Essa variação das absorptividades nos comprimentos de onda pode ocorrer pois além do aquocomplexo desse metal (também chamado de íon livre), outros complexos pouco estáveis com esse íon podem ser formados, tais como sulfato, cloreto, etc, no meio descrito por Clesceri *et al.*(1998). É importante lembrar que as cinéticas das reações envolvendo esse metal são muito lentas devido à inércia química do cromo (III), usualmente atribuído a presença de orbitais  $d^3$  (TOMA, 2013). Essa inércia também influencia a distribuição de complexos desse íon em solução. Entretanto, a baixa absorptividade molar e constantes de equilíbrio de estabilidade desses complexos permitem a presença dos mesmos sem grande influência no método analítico proposto.

A fim de avaliar o comprimento de onda mais adequado para o desenvolvimento do método analítico, obteve-se o espectro de absorção do complexo de cromo(III)-EDTA na presença de diversas concentrações de citrato, após aquecimento da solução em banho-maria a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 min (Figura 33).

A Figura 33 apresenta o espectro do complexo de cromo(III)-EDTA, para concentrações de cromo (III) e EDTA  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em presença de diferentes concentrações de citrato.

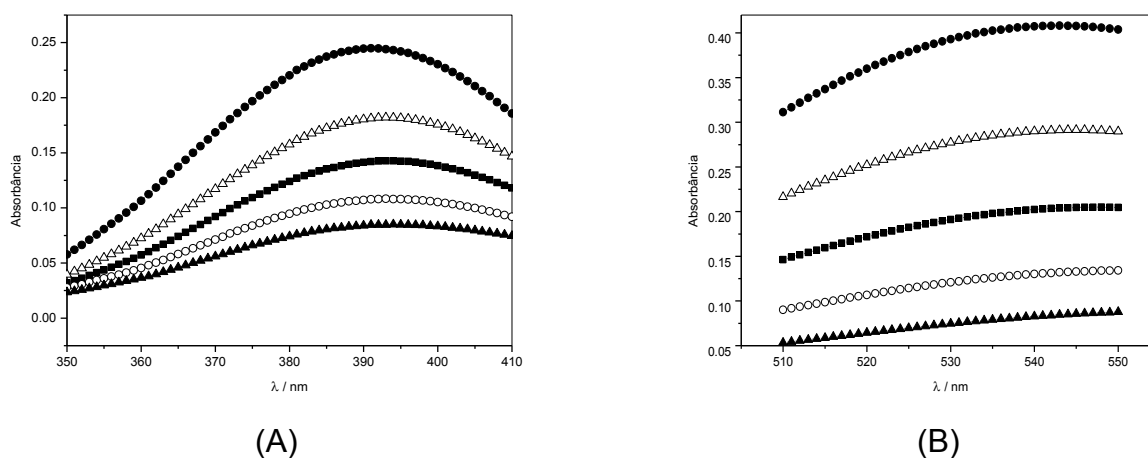


Figura 33 - Espectro de absorção do complexo cromo(III)- EDTA em regiões ao redor dos máximos de absorção na presença de diferentes concentrações de citrato. (A) 391 nm e (B) 543 nm. (●)  $0,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; (△)  $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; (■)  $40,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; (○)  $60,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e (▲)  $80,0 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Utilizando a mesma estratégia descrita para o método de determinação de citrato com auxílio do complexo ferro(II)-1,10-fenantrolina (capítulo 2), é apresentada a linearidade do sistema para cada comprimento de onda. Entretanto, ao invés de apresentar valores de  $R^2$  foi proposta a função N9 (Equação 14)

$$N9 = -\log(1 - R^2) \quad \text{Equação 14}$$

Essa função N9 foi construída para a avaliação da linearidade em cada comprimento de onda, baseado no “número de noves” que o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) contém. Por exemplo, um  $R^2$  com valor igual a 0,9 contém “um nove”, enquanto que 0,999 contém “três noves”, e tem uma qualidade muito mais elevada.

A Figura 34 apresenta o comportamento do complexo de cromo(III)-EDTA na presença de citrato em função do N9 e da sensibilidade analítica.

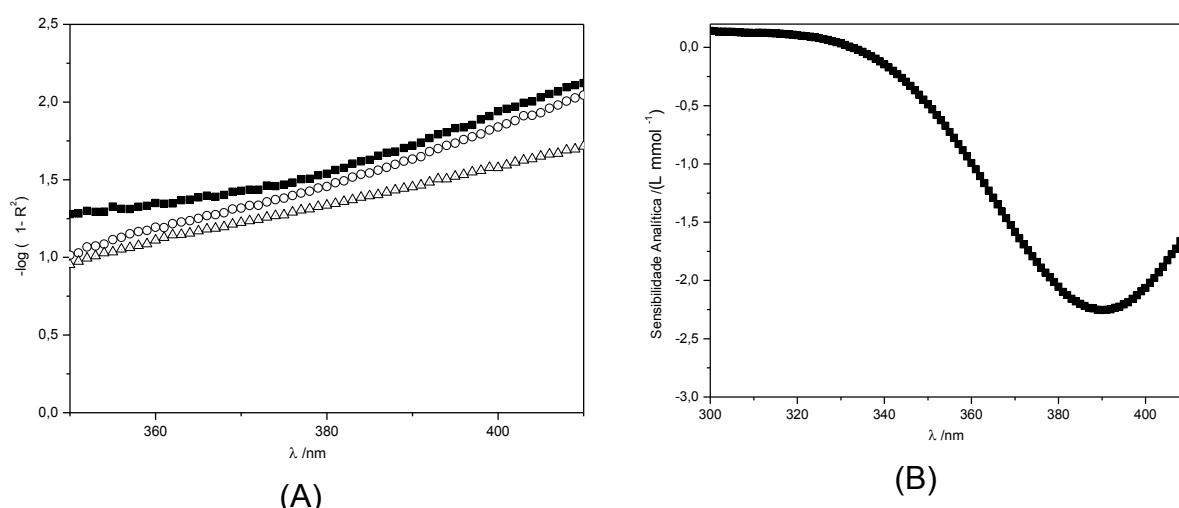


Figura 34 - Avaliação do comportamento analítico do complexo cromo(III)-EDTA na presença de citrato na região de 391 nm. (A) Função N9. (B) sensibilidade analítica. Faixa analítica: (■) até 40,0 mmol L<sup>-1</sup>; (○) até 60,0 mmol L<sup>-1</sup>; (△) 80,0 mmol L<sup>-1</sup>.

Pode-se observar através da Figura 34A que o ajuste melhora com o aumento do comprimento de onda (aumento do número de noves (N9)). Entretanto há uma diminuição do seu valor com o aumento da faixa analítica, indicando um comportamento não-linear. A sensibilidade analítica foi negativa em toda região ao redor de 391 nm, com mínimo (ou seja, maior sensibilidade em módulo) coincidindo com o comprimento de onda de máxima absorção.

O comportamento espectrofotométrico na região ao redor de 543 nm (Figura 35) apresentou valores constantes do coeficiente de determinação em cada faixa analítica, com valores maiores que 0,99 na faixa analítica mais estreita (N9 maior

que 2,0). A sensibilidade máxima (valores absolutos) também ocorreu no máximo de absorção.

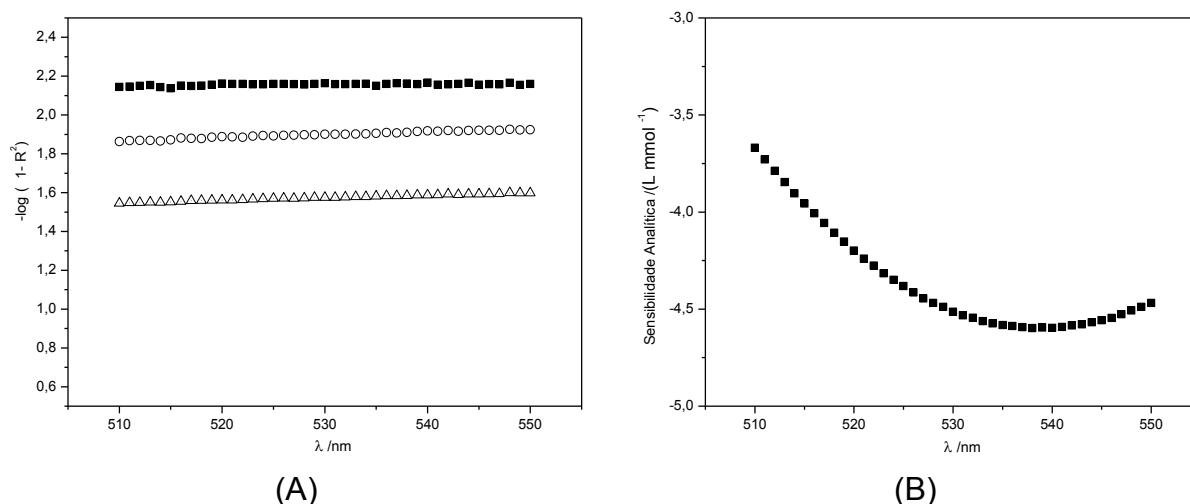


Figura 35 - Avaliação do comportamento analítico dos complexos cromo(III)-EDTA na presença de citrato na região de 543 nm. (A) Função N9. (B) sensibilidade analítica.

Ainda que ambas regiões tenham características adequadas, ambas apresentaram curvas analíticas não-lineares (Figura 36), sendo ajustados modelos quadráticos.

Para facilitar a comparação das curvas não-lineares, foram calculadas as sensibilidades mínimas, uma vez que, para modelos quadráticos a sensibilidade analítica depende da concentração do analito (Equação 15). Portanto, para espectrofotometria inversa, a menor sensibilidade ocorre para valores máximos de concentração, no ponto superior da curva analítica quadrática.

$$S = \frac{dA}{dc} = \frac{d(B + Ic + Qc^2)}{dc} = I + 2Qc \quad \text{Equação 15}$$

Onde B, branco (termo constante) da curva analítica, I, a inclinação (termo linear) e Q, a curvatura (ou termo quadrático).

A sensibilidade mínima em curvas analíticas quadráticas são necessárias para estabelecer a região onde a curva analítica quadrática tenha carácter mais linear, a fim de evitar sensibilidades no ponto superior da curva analítica muito baixa (OLIVEIRA, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

As equações da curva analítica obtidas nos comprimentos de onda de 391 nm e 543 nm são apresentadas na Equação 16 e Equação 17 respectivamente.

$$\hat{A} = (14,6 \pm 2,2) c^2 - (3,13 \pm 0,18) c + (0,2425 \pm 0,0031) \quad \text{Equação 16}$$

$$\hat{A} = (27,6 \pm 1,5) c^2 - (6,24 \pm 0,13)c + (0,4073 \pm 0,0021) \quad \text{Equação 17}$$

A curva analítica em 543 nm, comparada aquela obtida em 391 nm apresentou maior sensibilidade analítica mínima, considerando a concentração de citrato igual 80,0 mmol L<sup>-1</sup> (Tabela 8) e parâmetros de qualidade de ajustes, tais como o R<sup>2</sup> igual a 0,9997 e desvio padrão dos resíduos de 0,0023.

A Figura 36 apresenta a absorvância do complexo de cromo(III)-EDTA em presença de citrato nos comprimentos de onda de máxima absorvância, para a concentrações de cromo (III) e EDTA igual a 2,0 mmol L<sup>-1</sup>.

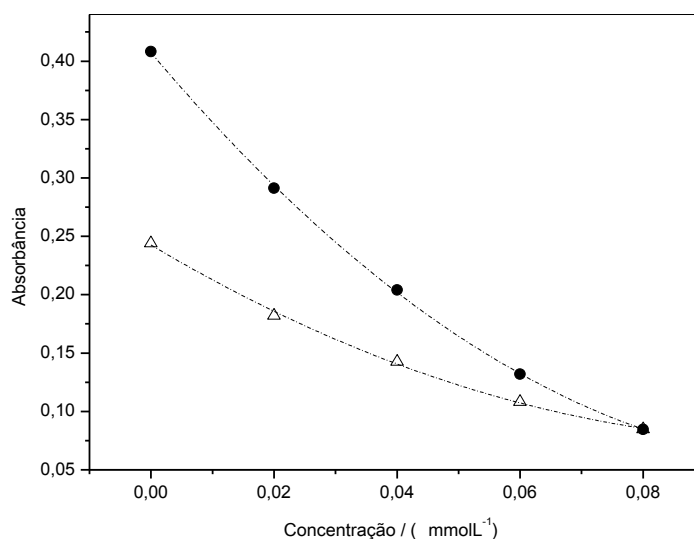


Figura 36 – Curvas obtidas nos máximos de absorção para concentrações de cromo (III) e EDTA de 2,0 mmol L<sup>-1</sup>, concentrações de citrato variando de 0,0 a 80,0 mmol L<sup>-1</sup>: (Δ) 391 nm e (●) 543 nm.

Para todos os máximos de absorção, foram obtidos os coeficientes de determinação, o desvio padrão de resíduos e a inclinação de maneira selecionar a região mais adequada. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Parâmetros de avaliação do ajuste da curva analítica nos comprimentos de onda de máxima absorção. Coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>), desvio padrão dos resíduos (s<sub>res</sub>), sensibilidade mínima (S<sub>min</sub>).

λ /nm	R <sup>2</sup>	N9	S <sub>min</sub> /(L mol <sup>-1</sup> )	%S <sub>min</sub> *	s <sub>res</sub> **
391	0,9979	2,8	1,97	62,0%	0,0035
543	0,9998	3,8	4,03	64,0%	0,0023

\*%S<sub>min</sub> =  $\frac{S_{min}100}{I}$ ; \*\* unidades de absorvância

Desta maneira, o método foi desenvolvido utilizando o comprimento de onda de 543 nm.

## 5.2. Otimização do método

### 5.2.1. Tempo de Formação dos complexos cromo(III)-EDTA e de cromo(III) citrato

Devido à conhecida inércia química do íon cromo (III), foi realizado um estudo para avaliar o tempo necessário para a formação dos complexos até atingirem o equilíbrio, à temperatura 80 °C, em banho maria.

Na Figura 37 é apresentada o estudo ao longo do tempo para formação do complexo cromo(III)-EDTA para as concentrações de cromo (III) e EDTA igual a 2,0 mmol L<sup>-1</sup>, em diferentes pH.

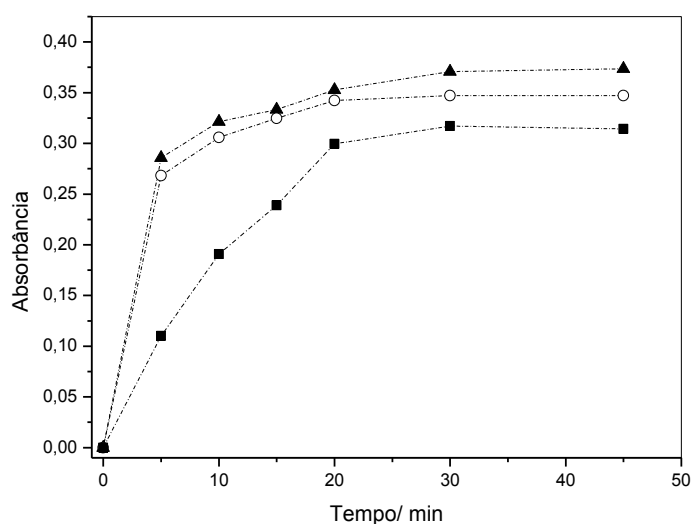


Figura 37 - Estudo ao longo do tempo de formação do complexo cromo(III)-EDTA, em (■) pH 3,0, (○) pH 4,0 e (▲) pH 5,0.

Observa-se um comportamento cinético mais lento para a formação do complexo com EDTA em pH 3,0, atingindo o equilíbrio após 30 minutos. O comportamento nos pH 4,0 e 5,0 foram similares entre si, mas com taxas mais elevadas de formação, ainda que o equilíbrio tenha sido atingido no mesmo tempo que o pH 3,0.

A diferença observada entre as absorbâncias após o equilíbrio para as soluções com valores distintos de pH está associada ao efeito desse parâmetro sobre as concentrações no equilíbrio das espécies livres de EDTA e cromo (III), que

pode ser explicada pela influência da fração de equilíbrio sobre a constante condicional de formação ( $\beta_1^{cond}$ ) (SKOOG, 2007; OLIVEIRA, 2009; HARRIS, 2012).

$$\beta_1 = \frac{[CrEDTA^-]}{[Cr^{3+}][EDTA^{4-}]} = \frac{[CrEDTA^-]}{\alpha_o(Cr^{3+})c^{AB}(Cr^{3+})\alpha_6(EDTA^{4-})c^{AB}(EDTA^{4-})} \quad \text{Equação 18}$$

Onde  $c^{AB}$  é a concentração analítica do sistema ácido-base de Bronsted e  $\alpha_i$ , a fração de equilíbrio (razão entre a concentração no equilíbrio e concentração analítica de uma espécie química) da espécie com  $i$  prótons a menos que a espécie mais protonada do sistema ácido-base de Bronsted.

$$\log \beta_1^{cond} = \log \beta_1 + \log(\alpha_o(Cr^{3+})) + \log(\alpha_6(EDTA^{4-})) \quad \text{Equação 19}$$

Assim, para concentrações analíticas constantes, à medida que a constante de estabilidade condicional diminui (devido à alteração do pH), a concentração do complexo tende a diminuir (Tabela 9).

Tabela 9- Valores do logaritmo da constante condicional de estabilidade do complexo cromo(III)-EDTA, sem correção pelos coeficientes de atividade e considerando 25 °C e  $\log \beta_1^T$  igual a 23,4.

pH	$\log \beta_1^{cond} *$
5	8.9
4	5.7
3	1.9

\*Valores calculados com auxílio da add-on Alfa® para Microsoft Excel (Oliveira, 2013).

A influência do pH pode ser avaliada para o complexo Cr(III)-citrato, mesmo não havendo valor da constante de estabilidade termodinâmica, como pode ser vista na Equação 20, através do comportamento do termo  $f(pH)$ .

$$\begin{aligned} \log \beta_1^{cond} &= \log \beta_1 + f(pH) \\ f(pH) &= \log(\alpha_o(Cr^{3+})) + \log(\alpha_6(EDTA^{4-})) \end{aligned} \quad \text{Equação 20}$$

A Tabela 10 apresenta os valores do log da fração de equilíbrio ( $\alpha$ ) das espécies de cromo (III), EDTA e citrato nos pH: 3,0; 4,0 e 5,0.

Tabela 10 – Logaritmo das frações de equilíbrio e da função  $f(\text{pH})$  nos pH 3,0; 4,0 e 5,0.

Espécies	log da fração de equilíbrio ( $\alpha$ )		
	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0
EDTA	-10,60	-8,44	-6,45
Citrato	-5,53	-3,27	-1,60
Cromo	-0,04	-0,30	-1,12
$f(\text{pH})$			
Cr(III)-EDTA	-10,64	-8,74	-7,57
Cr(III)-citrato	-5,57	-3,57	-2,72

Quanto menores as frações de equilíbrio, mais negativa a função  $f(\text{pH})$ , e portanto, menor o logaritmo da constante de estabilidade condicional. Pode-se observar que os valores de pH 4,0 e 5,0, apresentaram constantes de equilíbrio condicional mais elevadas do que no pH 3,0.

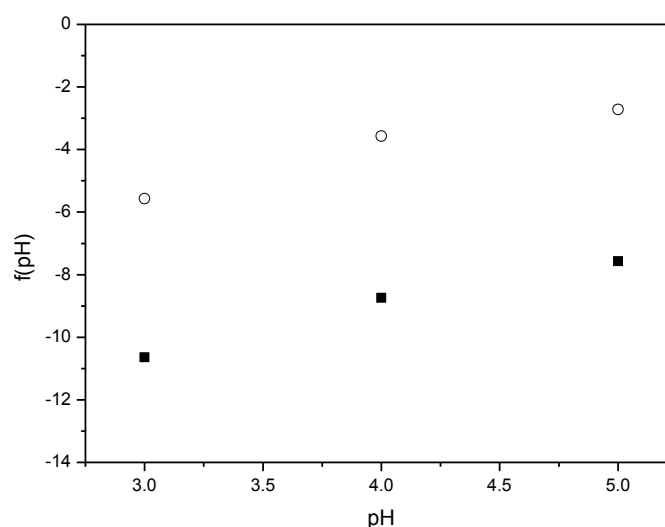


Figura 38-Comportamento da função  $f(\text{pH})$  com o pH da solução. (■) complexo Cr(III)-EDTA; (○) complexo Cr(III)-citrato.

Devido à baixa absorção do complexo de cromo(III)-citrato, o estudo do comportamento cinético da formação desse complexo foi realizado indiretamente pelo acompanhamento da absorção de luz pelo complexo cromo(III)-EDTA em 543 nm (espectrofotometria inversa). Assim, sobre as soluções contendo citrato e cromo (III), que foram mantidas a cerca de 80 °C por 30 minutos, de maneira a formar o

complexo. Após esse tempo, o EDTA é adicionado e então, novamente aquecido a 80°C para estudo da formação do complexo Cr(III)-EDTA (Figura 39).

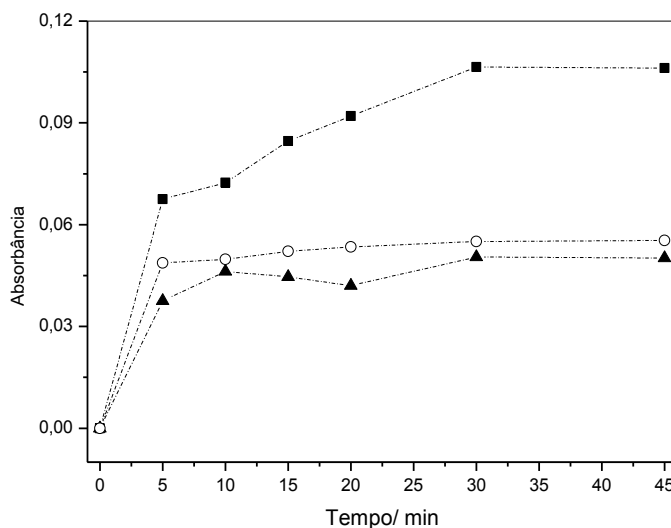


Figura 39 – Comportamento cinético do cromo(III)-EDTA para a concentrações analíticas de cromo (III) e EDTA igual a 2,0 mmol L<sup>-1</sup> em presença de citrato 0,1 mol L<sup>-1</sup> em soluções com valores de pH iguais a (■) 3,0; (○) 4,0 e (▲) 5,0.

Pode-se observar que nos valores de pH 4,0 e 5,0, houve uma rápida formação do complexo Cr(III)-EDTA, observado pela absorvância medida em 543 nm. Além disso, a concentração desse complexo foi menor do que a absorvância no equilíbrio no estudo da cinética de formação do cromo(III)-EDTA, concluindo-se portanto que o complexo Cr(III)-citrato não foi destruído ou por efeitos cinéticos ou termodinâmicos.

É interessante lembrar que a constante de estabilidade do complexo cromo(III)-citrato não é apresentada na literatura. Devido ao caráter duro do cromo(III) (no sistema HSAB de Pearson), similar ao ferro (III) e alumínio, as constantes de estabilidade dos complexos com esses três íons devem ser similares. Uma vez que os valores de constantes de estabilidade para os íons ferro (III) e alumínio com citrato, são elevados ( $\log \beta_1$  acima de 20), pode-se supor que o valor  $\log \beta_1$  estará próximo a 20. Apenas por curiosidade as constantes para lantanídeos com esse ligante está, ao redor de 9,5 e para divalentes, ao redor de 13 (MARTEL *et al.*, 2004).

### 5.2.3. Planejamento fatorial $2^3$ com três pontos centrais

Um planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central foi desenhado para avaliar a importância do pH, das concentrações de cromo (III) e de EDTA na sensibilidade analítica. Uma vez que a curva analítica apresentou um comportamento quadrático, a resposta utilizada no planejamento foi a sensibilidade mínima que represente 70,0% da sensibilidade máxima.

Os resultados foram modelados por regressão linear múltipla e refinados pelo método *stepwise* (descrito no item 3.2 do Capítulo 2). Os coeficientes de cada termo do modelo de regressão linear múltipla antes e após a aplicação do método *stepwise* ao método obtido e suas estimativas do desvio padrão foram obtidos e são apresentados na Figura 40.

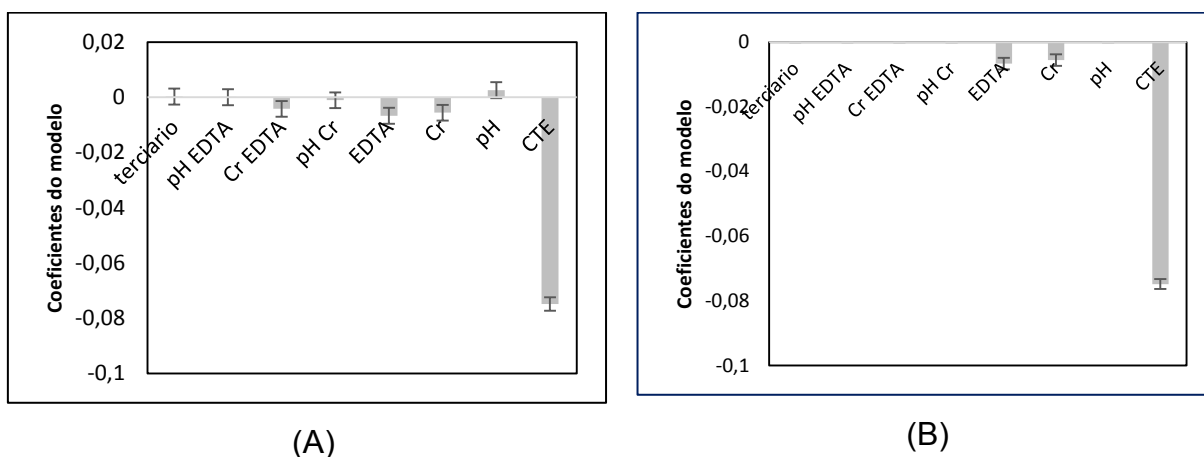


Figura 40 - Coeficientes dos termos do modelo de regressão linear múltipla para valores codificados. Aplicação da avaliação por *stepwise*: (A) sem avaliação (B) após avaliação.

Apenas os termos lineares (ou efeitos principais) para a concentração de EDTA e cromo (III) foram significativos para explicar a sensibilidade mínima observada. O elevado valor do termo constante (CTE) do modelo sugere que todo experimento foi realizado em uma condição próxima a um ótimo (ao menos local) e que a faixa utilizada para cada parâmetro não foi suficiente para que fossem observadas diferenças significativas entre os extremos dessas faixas.

Foi utilizado planejamento de experimentos baseado na matriz de Doehlert de duas variáveis para obtenção de uma superfície de resposta para esse sistema.

#### 5.2.4. Superfície de Resposta

Após a obtenção do modelo de regressão linear múltipla com avaliação tipo *stepwise*, obteve-se o modelo (Figura 41).

$$S_{\min} = - (84,61 \pm 0,84) - (15,4 \pm 1,5)A^2 - (13,3 \pm 1,5)B^2 \quad \text{Equação 21}$$

O modelo apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,9858 e uma estimativa do desvio-padrão do resíduo igual  $2,53 \text{ L mol}^{-1}$ .

E dessa maneira, o ponto ótimo foi obtido para a concentração de cromo(III) foi de  $4,25 \text{ mmol L}^{-1}$  e a concentração de EDTA de  $5,1 \text{ mmol L}^{-1}$ , de maneira que sensibilidade mínima obtida foi de  $0,1087 \text{ Lmol}^{-1}$ .

Uma vez que a condição ótima foi observada em um extremo da matriz de Doehlert, (Figura 41), foi realizada a sua expansão, com a introdução de outras três condições experimentais.

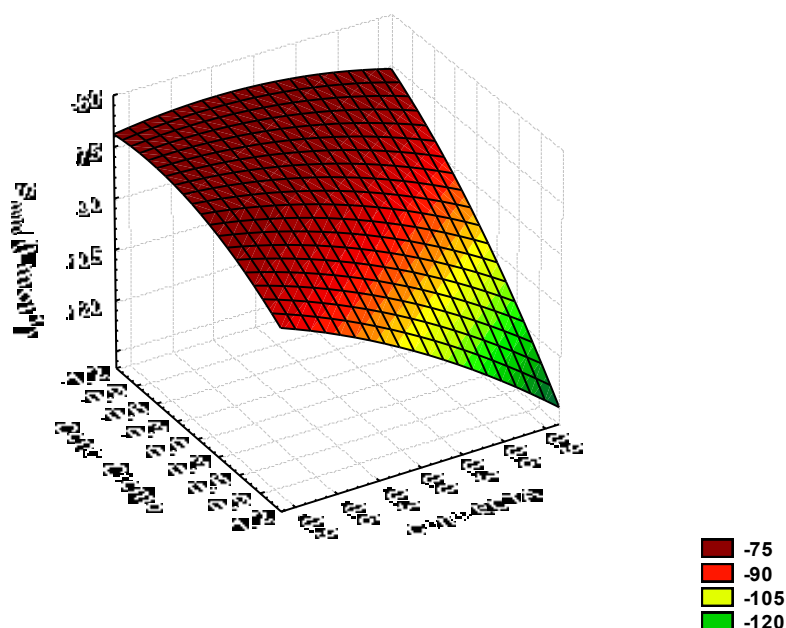


Figura 41 – Superfície de resposta da Matriz de Doehlert sensibilidade mínima em função das concentrações de cromo (III) e EDTA.

A representação esquemática do Planejamento da matriz de Doehlert com sua expansão é mostrada na Figura 42.

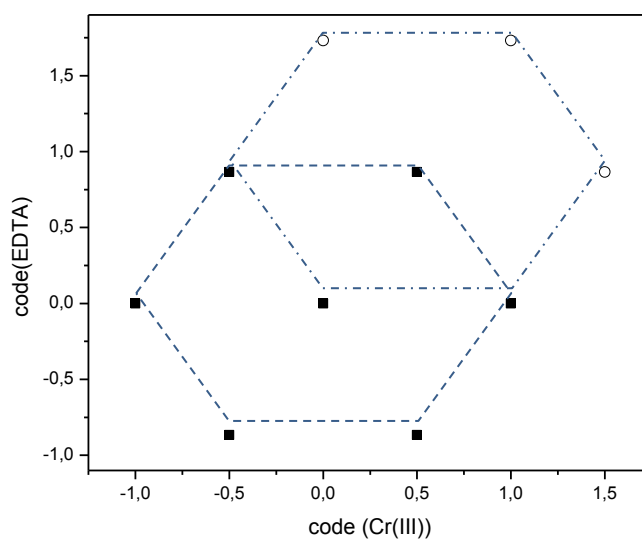


Figura 42 – Diagrama Esquemático do Planejamento da matriz de Doehlert com valores codificados das concentrações de cromo (III) e EDTA. (----) primeiro conjunto; (-.-.-) expansão da matriz.

Com a expansão da matriz de Doehlert, foi possível confirmar que a condição ótima encontrada foi a concentração de cromo (III) igual a  $4,25 \text{ mmol L}^{-1}$  e a concentração de EDTA igual a  $5,1 \text{ mmol L}^{-1}$ .

A Figura 43 apresenta a superfície de resposta obtida para a expansão da matriz de Doehlert, de modo que a sensibilidade mínima varia em função das concentrações de cromo (III) e EDTA no meio.

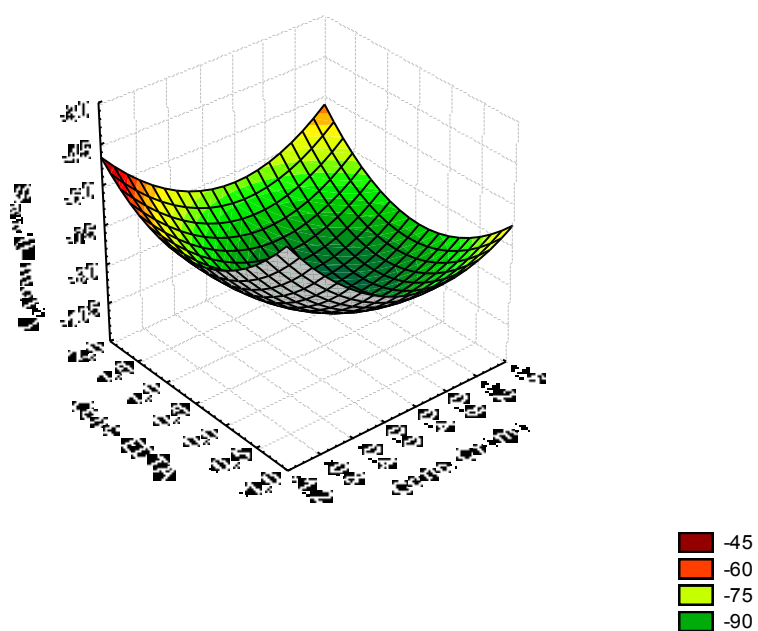


Figura 43 – Superfície de resposta da expansão da matriz de Doehlert, sensibilidade mínima em função das concentrações de cromo (III) e EDTA.

### 5.3. Estudo de concomitantes

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos da concentração mínima de concomitante que causam interferência em relação às concentrações de cromo (III), EDTA e citrato.

Tabela 11 – Proporção da concentração mínima do concomitante que causam interferência, em relação à concentração de cromo (III) igual a 4,25 mmol L<sup>-1</sup>, EDTA 5,1 mmol L<sup>-1</sup> para as concentrações de citrato iguais a 5,0 mmol L<sup>-1</sup>.

ÍONS METÁLICOS	PROPORÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA	CONSTANTE DE FORMAÇÃO DOS ÍONS METÁLICOS COM OS LIGANTES PRESENTES NA SOLUÇÃO	
		Concentração de citrato igual a 5,0 mmol L <sup>-1</sup>	EDTA
Fe (II)	1:1	14,33	3,08
Fe (III)	1:1	24,23	12,5
Mn (II)	10:1	13,80	3,67
Cu (II)	1:1	18,7	4,35

Observou-se que, com exceção do Mn (II) todos os íons metálicos começam a interferir na determinação de citrato quando suas concentrações são iguais a 4,25 mmol L<sup>-1</sup>. O Mn (II) começa a interferir quando sua concentração corresponde a 42,5 mmol L<sup>-1</sup>.

Esses resultados estão associados as constantes de formação de complexos dos íons metálicos estudados com os ligantes presentes na solução, uma vez que quanto menor a constante de formação do complexo menor a sua formação. Desta forma, a menor interferência do íon Mn (II) se justifica pelo baixo valor da constante de formação dos seus complexos com citrato e EDTA.

Para eliminar a interferência observada, foi utilizada uma resina quelante Chelex<sup>®</sup> 100 (Bio-Rad), que possui grupos amiacéticos responsáveis por complexar com íons metálicos, que por sua vez ficam retidos nessa resina.

Os primeiros estudos com essa resina foram realizados buscando a remoção de íons metálicos de soluções aquosas (RILEY & TAYLOR, 1968) e especiação de

metais (FLORENCE & TAYLOR, 1974), mostrando a grande eficiência da Chelex<sup>®</sup> 100. Desde então muitos estudos vêm sendo publicados para remoção de íons metálicos utilizando essa resina.

Após a passagem da amostra pela resina, foi realizado o estudo dos concomitantes novamente (Tabela 12).

Tabela 12 – Proporção da concentração mínima do concomitante, após passagem coluna com resina Chelex<sup>®</sup> 100 (Bio-Rad), em relação à concentração de cromo (III), para as concentrações de citrato igual a 5,0 mmol L<sup>-1</sup>.

ÍONS METÁLICOS	PROPORÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA QUE CAUSA INTERFERÊNCIA	
	Sem a utilização da Chelex <sup>®</sup>	Com a utilização da Chelex <sup>®</sup>
	Fe (II)	1:1
Fe (III)	1:1	10:1
Mn (III)	10:1	100:1
Cu(II)	1:1	100:1

A resina Chelex<sup>®</sup> 100 (Bio-Rad) é formada por grupos iminoacéticos e mostrou-se muito eficiente na eliminação da interferência dos metais, em pH 4,0. A Chelex<sup>®</sup> 100 (Bio-Rad) foi utilizada para eliminar os interferentes na etapa de aplicação de método.

Com a utilização da Chelex<sup>®</sup> 100 (Bio-Rad) para os íons Fe (II), Mn (II) e Cu (II), foi possível diminuir a interferência pra uma proporção de 100:1. Já o Fe (III) a interferência foi eliminada pra uma proporção de 10:1.

Na Tabela 13 é apresentada a proporção da concentração mínima dos possíveis concomitantes que causam interferência na análise, em relação à concentração de citrato igual a 5,0 mmol L<sup>-1</sup>.

Tabela 13 – Proporção da concentração mínima do concomitante que causa interferência, em relação à concentração de citrato igual a 0,5 mmol L<sup>-1</sup> e 5,0 mmol L<sup>-1</sup> e concentrações de cromo (III) e de EDTA igual a 4,25 e 5,1 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente.

LIGANTES	PROPORÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA QUE CAUSA INTERFERÊNCIA
	Concentração de citrato igual a 5,0 mmol L <sup>-1</sup>
Oxalato	1:1
Fosfato	10:1
Etilenodiamina	10:1

A interferência do oxalato foi observada para a mesma concentração de citrato, enquanto que o fosfato e a etilenodiamina interferem em concentrações 10 vezes maior.

#### 5.4. Caracterização do Método Proposto - Figuras de Mérito

Realizada a otimização, as figuras de mérito do método desenvolvido usando citrato em água foram obtidas.

A precisão foi avaliada a partir de medidas de repetibilidade. A repetibilidade foi medida para sete amostras com as seguintes concentrações de citrato de 0,0; 1,5; 2,5 e 3,5 mmol L<sup>-1</sup>. O coeficiente de variação, ou desvio padrão relativo (%RSD) variou de 0,78 a 2,12 %.

A Figura 44 apresenta a curva analítica para o método otimizado.

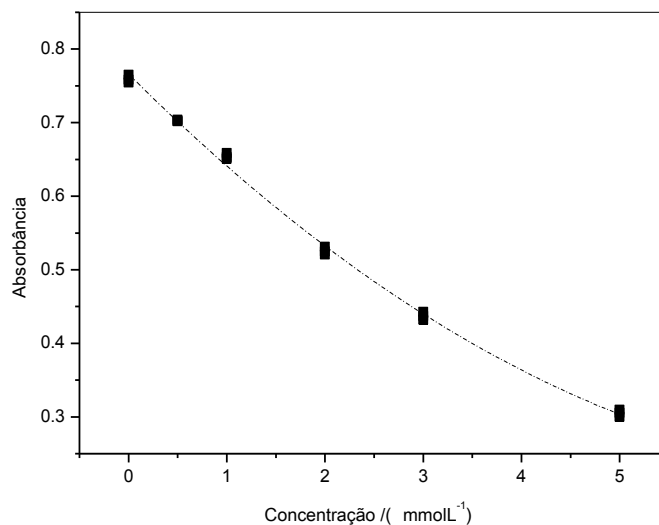


Figura 44 – Curva analítica para o método otimizado, com concentrações de citrato variando de 0,0 a 5,0 mmol L<sup>-1</sup>.

O modelo de regressão da curva analítica apresentou um bom ajuste ( $R^2 = 0,998$ ) e estimativa do desvio padrão dos resíduos igual a 0,0085 (Equação 20).

$$\hat{A} = (0,008110 \pm 0,0080) c^2 - (0,1330 \pm 0,0042) c + (0,7660 \pm 0,0039) \quad \text{Equação 20}$$

Onde  $\hat{A}$  é a absorbância da amostra e  $c$  é a concentração de citrato.

Assim, a inclinação foi igual a  $-0,133 \text{ L mol}^{-1}$  e a sensibilidade mínima foi igual a  $-0,0925 \text{ L mol}^{-1}$ , que corresponde a 69,5% da sensibilidade máxima, inclinação.

Essa sensibilidade mínima foi, em módulo, quatro vezes maior que aquela observada para o método utilizando ferro(II)-1,10-fenantrolina.

O Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ) foram calculados de acordo com a Equação 13, porém foram utilizadas três maneiras distintas de calcular o desvio padrão do branco. A primeira foi considerando o branco experimental, ou seja, pela determinação da absorbância para amostras isentas do analito. A segunda foi considerando o branco da curva analítica, ou seja, estimativa do desvio padrão do branco da curva analítica calculado a partir do modelo de regressão) e pelos resíduos da curva analítica (ou seja, pela estimativa do desvio padrão dos resíduos do modelo de regressão) (Tabela 14).

Tabela 14 – Limite de Detecção e Limite de Quantificação calculados utilizando três maneiras distintas de estimar o desvio-padrão do branco.

Tipo de Estimativa do Desvio Padrão	LOD/ (mmol L <sup>-1</sup> )	LOQ <sub>min</sub> /( mmol L <sup>-1</sup> )
Branco da curva analítica	0,087	0,288
Resíduos da curva analítica	0,227	0,756
Branco experimental	0,191	0,638

O resultado apresentado demonstra a necessidade de estudar melhor a estimativa do LOD e LOQ. A priori, o uso do branco experimental parece mais adequado quando a determinação ocorrer pelo uso direto da curva analítica, ou seja, a absorbância da amostra após aplicação do método é obtida com replicatas. No caso de adição de padrão, o branco estimado pela curva parece mais eficiente. Além disso, o uso dos resíduos deveria fornecer valores de LOD similares se o sistema fosse homocedástico. Uma vez que essa questão não pode ser resolvida com os dados apresentados, optou-se, arbitrariamente no uso do LOD e LOQ calculados pelo branco da curva analítica, como sugerido por Miller e Miller, (1993).

Desta maneira, a faixa analítica foi de 0,29 mmol L<sup>-1</sup> a 5,0 mmol L<sup>-1</sup>.

### 5.5. Ensaio de Recuperação

O método foi aplicado em amostras de solo fortificado com diferentes concentrações de citrato. Para avaliar a exatidão a partir do ensaio, foram utilizados três métodos: eficiência de recuperação; gráfico de comparação de métodos e sobreposição das curvas analíticas.

A eficiência da recuperação obtida foi calculada de acordo com a Equação 22 e é apresentada na Tabela 15. Não foram encontrados valores significativos de citrato no solo sem fortificação.

$$\text{Recuperação}\% = \frac{C(i)}{C(\text{padrão})} \times 100 \quad \text{Equação 22}$$

Onde  $c_i$  é a concentração de citrato calculado para cada replicata e  $C_{\text{padrão}}$  o valor nominal da solução padrão utilizada para obtenção da replicata.

Os ensaios de recuperação apresentaram valores entre 98,0% e 122,0%.

Tabela 15 – Valores referentes aos estudos de adição e recuperação de citrato e a porcentagem de recuperação obtida.

Concentração adicionada/ (mmol L <sup>-1</sup> )	Concentração Encontrada/ (mmol L <sup>-1</sup> )	Recuperação/%
0,50	0,52	103,40
0,50	0,58	115,30
0,50	0,74	147,00*
1,00	1,07	106,90
1,00	1,04	104,10
1,00	1,22	122,00
1,50	1,60	106,60
1,50	1,74	115,70
1,50	1,64	109,30
3,00	2,94	97,96
3,00	3,25	108,60
3,00	3,06	102,00

\* considerado um *outlier*, a partir dos métodos

Os resultados obtidos na Tabela 15 foram lançados em gráfico (Figura 45), permitindo a avaliação de efeitos aditivos ou sistemáticos (matriz) no método proposto.

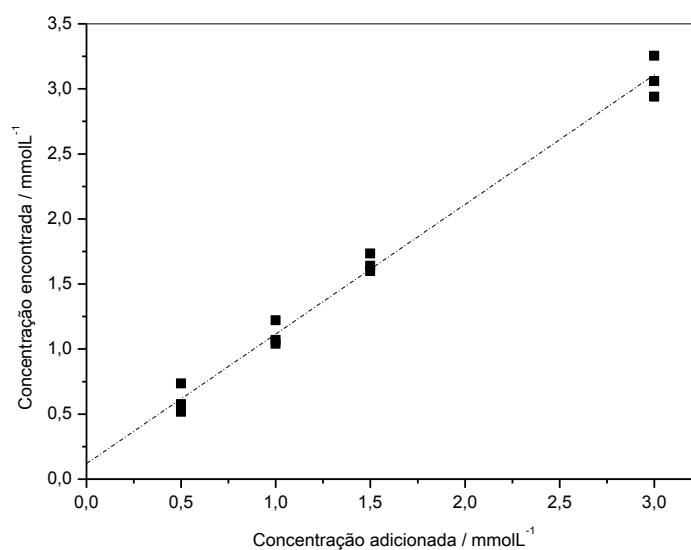


Figura 45 – Relação entre a concentração adicionada ao solo e a concentração encontrada.

A Equação 23 apresenta o modelo de regressão linear obtido para a concentração de citrato adicionado ao solo ( $c_{ad}$ ) e a concentração determinada pelo método proposto ( $c_{rec}$ ) (Figura 45).

$$c_{rec} = (0,131 \pm 0,058) + (0,988 \pm 0,033)c_{ad} \quad \text{Equação 23}$$

O termo linear não é significativamente diferente de zero (teste t-Student com 95% de confiança), de maneira que não foi observada a presença de erros aditivos, assim como a inclinação não é significativamente diferente de um, ou seja, não são observados erros matriciais no método.

Na Figura 46, os resultados são apresentados em outro tipo de gráfico, permitindo a comparação da curva analítica e da curva de adição de padrão.

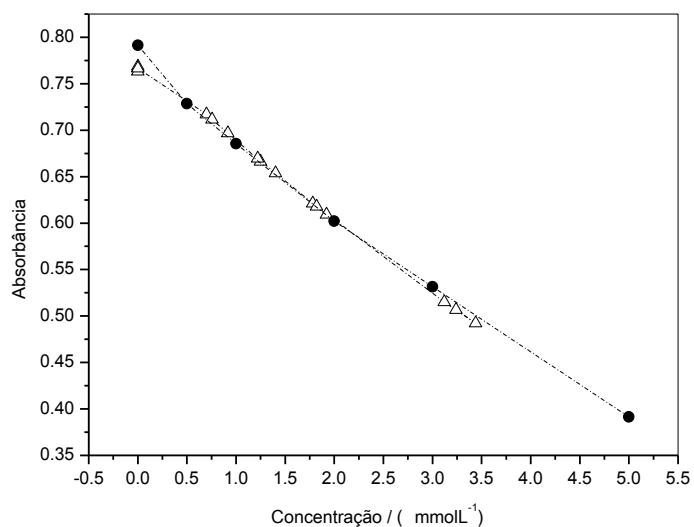


Figura 46 – Comparação entre a curva analítica (●), ou seja aquela obtida na otimização do método e a curva da adição de padrão (△), ou seja a curva construída com diferentes concentrações de citrato no solo.

Essa comparação representa uma outra forma de avaliação do efeito de matriz, uma vez que não foram observadas diferenças entre as inclinações sugerindo que não há efeitos sistemáticos com a presença do solo para determinação de citrato.

## 6. Conclusões parciais

Foi estudado e otimizado um método espectrométrico inverso (descolorimetria) para a determinação de citrato em solo utilizando a destruição do complexo Cr(III)-EDTA. Foi proposto a função N9 para avaliar a linearidade em diversos comprimentos de onda que avalia o “número de nove” contidos no coeficiente de determinação, sendo que quanto maior o número de nove mais linear e quanto mais próximo o número de nove para faixas analíticas diferentes, mais ampla (linear) é a faixa.

O comprimento de onda considerado mais adequado foi o de 543 nm, embora apresenta-se um modelo quadrático, com maior valor de N9, maior sensibilidade mínima e desvio padrão dos resíduos menor.

O método proposto apresentou figuras de mérito adequadas para determinação de citrato. A otimização foi realizada em função da sensibilidade mínima. A condição ótima foi concentração de cromo (III) 4,2 mmol L<sup>-1</sup> e de EDTA, 5,1 mmol L<sup>-1</sup> em pH 4,0.

O modelo de regressão da curva analítica apresentou um bom ajuste ( $R^2 = 0,998$ ) e estimativa do desvio padrão dos resíduos igual a 0,0085. A inclinação foi igual a -0,133 L mol<sup>-1</sup> e a sensibilidade mínima foi igual a -0,0925 L mol<sup>-1</sup>, que corresponde a 69,5% da sensibilidade máxima, inclinação. O LOD e LOQ foram respectivamente de 0,087 e 0,288 mmol L<sup>-1</sup>. A faixa analítica foi de 0,29 mmol L<sup>-1</sup> a 5,0 mmol L<sup>-1</sup>. O coeficiente de variação, ou desvio padrão relativo (%RSD) variou de 0,78 a 2,12 %. No estudo de interferentes com íons metálicos e ligantes, todos apresentaram interferência considerando uma concentração 10 vezes maior que o citrato. Para os íons metálicos a interferência foi minimizada utilizando uma coluna quelante Chelex<sup>®</sup> 100 (Bio Rad), de maneira que a interferência ocorreu apenas para concentração de metais 100 vezes maiores que a concentração de citrato.

Os ensaios de recuperação mostraram que não há erros aditivos ou sistemáticos, pelo gráfico de comparação dos métodos, utilizando o teste t-Student com 95% de confiança.

O método foi considerado adequado para a determinação de citrato em solo e para a determinação de citrato na solução do estudo de liberação controlada.

## CAPÍTULO 4: PROPOSTA DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE CITRATO

### 1. Introdução

A proposta desse trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada que permita a liberação de ligantes para a solução do solo até concentrações pré-definidas pelo sistema e que essa concentração seja mantida mesmo que o ligante seja consumido na complexação de metais, diluído ou percolado. Dessa maneira, o sistema tem uma característica adicional, comparado ao sistema de liberação controlada, de maneira que será então chamado de sistema de liberação sustentada.

### 2. Parte Experimental

#### 2.1. Materiais e métodos

##### 2.1.1. Preparo das matrizes de ágar-ágar

Diferentes massas de ágar-ágar (Kanten) foram pesadas em uma balança analítica (resolução 0,1 mg), e umidificadas com gotas de água antes de ser adicionado todo o volume de água de maneira a obter 50,0 g de solução final. A dispersão foi aquecida em uma chapa aquecedora até a formação de uma massa pastosa e massas adequadas do material ativo (citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{cit}$ ) ou de citrato de cálcio ( $\text{Ca}_3(\text{cit})_2$ )) também foram adicionadas à solução e dispersas. A solução foi transferida para formas plásticas de formato quadrangular de volume de 25,0 mL e mantidas em geladeira a 4 °C até que houvesse a formação do gel. Os géis foram cortados na forma de *pellets* de diferentes tamanhos (0,5; 1,0 e 2,0 cm) utilizando dispositivos *home-made*, construídos a partir de lâminas de estilete colados com resina epóxi sobre uma superfície plástica, conforme apresentado na Figura 47. Os *pellets* obtidos foram armazenados em geladeira até a utilização.



Figura 47 – (A) Dispositivos home-made utilizados para o corte dos *pellets* de ágar-ágar, espaçamento de 2,0 cm e espaçamento de 1,5 cm. (B) Pellets obtidos após corte da matriz de ágar-ágar utilizando dispositivos home-made.

## 2.2. Sistema de liberação controlada

Para o estudo da liberação controlada do citrato, massas de 2,5 g de *pellets* de diferentes áreas superficiais de 9,0 a 24,0 cm<sup>2</sup> e porcentagens de ágar de 1,0 a 5,0 % contendo o material ativo foram colocadas em contato com 50,0 mL de água em béqueres isolados termicamente com isopor e mantidos sob agitação constante com auxílio de um agitador magnético.

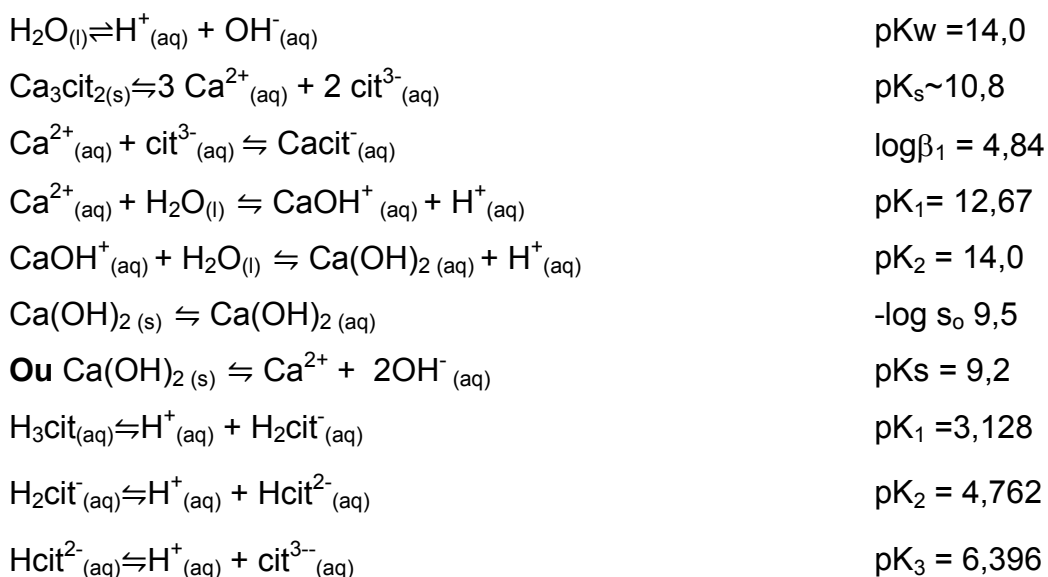
As alíquotas foram recolhidas de tempo em tempo e a liberação de citrato foi monitorada por condutividade elétrica e por espectrofotometria.

Após a estabilização da concentração no meio, cerca de 50% da solução foi retirada e colocada a mesma quantidade de água Milli Q e novamente acompanhada a cinética de liberação. A liberação de citrato foi monitorada ao longo do tempo por condutivimetria. Este experimento foi realizado com a finalidade de estudar um sistema de liberação de sustentação da concentração, uma vez que a medida que o analito é consumido essa quantidade é repostada no meio, afim de manter as concentrações do sistema por um tempo maior em relação a liberação controlada convencional.

## 3. Equações químicas que descrevem a solução final

As equações químicas que descrevem a solução final são apresentadas juntamente com suas constantes de equilíbrio. Essas equações apenas expressam a relação existente entre as espécies químicas e não sobre suas concentrações.

Não foram consideradas as semi-reações de oxi-redução de nenhuma espécie química.



#### 4. Monitoramento da liberação

A liberação do citrato foi estudada monitorando-se a condutividade elétrica com um condutivímetro (AZ modelo 86503), contendo uma célula de condutividade com constante de célula igual a  $0,1 \text{ cm}^{-1}$ , calibrado com soluções padrão de cloreto de potássio (CLESCERI *et al.*, 1998).

Foram recolhidas alíquotas de 5,0 mL em tempos definidos até que a liberação de citrato atingisse o equilíbrio. Os tempos de coleta foram de 1 em 1 minutos nos 20 primeiros minutos, após de 10 em 10 minutos e posteriormente de 30 em 30 minutos. Após a medida da condutividade elétrica das alíquotas, estas foram devolvidas para o sistema receptor de liberação.

O monitoramento da liberação de citrato por espectrofotometria inversa foi realizado utilizando um sistema contendo 25,0 mL da solução de liberação, cuja composição variou de acordo com um planejamento fatorial  $2^2$  com três pontos centrais (Tabela 16).

Tabela 16 – Variáveis utilizadas no planejamento fatorial  $2^2$  e seus valores para os respectivos níveis.

Parâmetro	Nível (+)	Nível (-)	Nível (0)
pH	7,0	5,0	6,0
Concentração cálcio/ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	150,0	5,0	77,5

Na Tabela 17 são apresentados os ensaios para a realização dos experimentos com os seus respectivos valores codificados e reais.

Tabela 17 - Ensaios do planejamento fatorial completo  $2^2$  com três pontos centrais.

Ensaio	pH		Ca(II)/ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	
	Code	Valores reais	Code	Valores reais
1	-1	5,0	-1	5,0
2	+1	7,0	-1	5,0
3	-1	5,0	+1	150,0
4	+1	7,0	+1	150,0
5	0	6,0	0	77,5
6	0	6,0	0	77,5
7	0	6,0	0	77,5

Para cada tempo de cada ensaio foi realizado um experimento. A solução de cada experimento foi filtrada em papel de filtro (papel de filtro qualitativo, Qualy 14  $\mu\text{m}$ ) e realizado o método espectrofotométrico inverso proposto baseado no complexo de cromo(III) e EDTA. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro *diode array* Agilent 8453, utilizando uma cubeta de quartzo (StarnaCells) com 1,0 cm de caminho óptico e volume de cerca de 3,0 mL.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Cinética de dissolução de sais de citrato não-encapsulados

Foram estudadas a cinética de dissolução do citrato a partir de dois sais sólidos, de sódio, muito solúvel e de cálcio, pouco solúvel, monitorando a condutividade elétrica do experimento (Figura 48). Foi adicionada sobre 50,0 mL de água uma massa de sal de citrato que contivesse a mesma quantidade de citrato que foi usada para os testes posteriores com a matriz de ágar-ágar.

A temperatura manteve-se constante e igual a  $(21,2 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ .

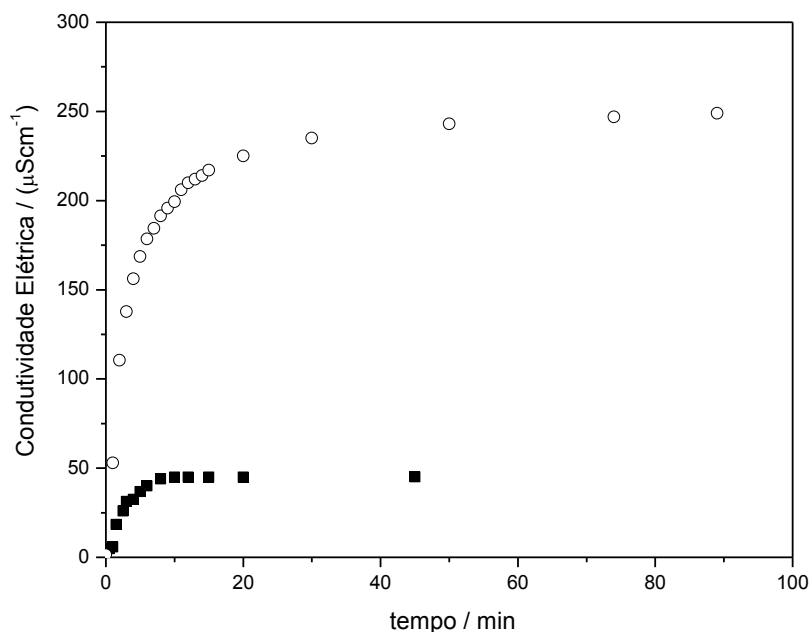


Figura 48 – Cinética da Dissolução de sais de citrato em 50,0 mL de água. (■) 66,0 mg de citrato de sódio. (○) 890,0 mg citrato de cálcio.

Os perfis de liberação do citrato livre observados para ambos sais foram similares. Um modelo de regressão linear semi-empírico foi utilizado para explicar os dados obtidos (Equação 24). Foi utilizada a rotina de cálculo de regressão não linear do programa Origin 8.0, SWeibull1. Esse modelo é semelhante ao modelo de dissolução de Noyes-Whitney, porém com alguns fatores empíricos de ajuste ( $t_0$  e  $d$ ). Os modelos apresentaram ótimo ajuste e permitiram calcular a condutividade quando o equilíbrio da solução foi atingido ( $R_\infty$ ), ou seja, não houve mais alteração macroscópica das concentrações das espécies no meio e o tempo para atingir o equilíbrio ( $t_{95\%}$ ), ou seja, aquele necessário para que 95% da condutividade fosse atingida (Equação 25).

$$\hat{R} = R_\infty(1 - e^{(k(t-t_0)^d)}) \quad \text{Equação 24}$$

$$t_{95\%} = \frac{-(\ln(0,05))^{1/d} - t_0}{k} \quad \text{Equação 25}$$

A condutividade elétrica da solução de citrato de sódio quando o estado de equilíbrio foi estabelecido, foi de 45,1  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . O tempo para atingir o equilíbrio, ou seja, aquele necessário para que 95% da condutividade fosse atingida, ( $t_{95\%}$ ) foi cerca de 9,4 minutos. Por outro lado, para a solução contendo o sal de cálcio, a

condutividade elétrica no equilíbrio foi de  $250,6 \mu\text{S cm}^{-1}$ , e o tempo para atingir o equilíbrio ( $t_{95\%}$ ) foi 32,6 minutos.

## 5.2. Liberação controlada do citrato a partir de matriz de ágar-ágar

Na Figura 49 é apresentado o perfil de liberação de citrato de sódio disperso em 6,0 *pellets* de 1,5 cm de lado totalizando uma área superficial de contato de  $9,0 \text{ cm}^2$  de área e matriz de ágar-ágar 2%.

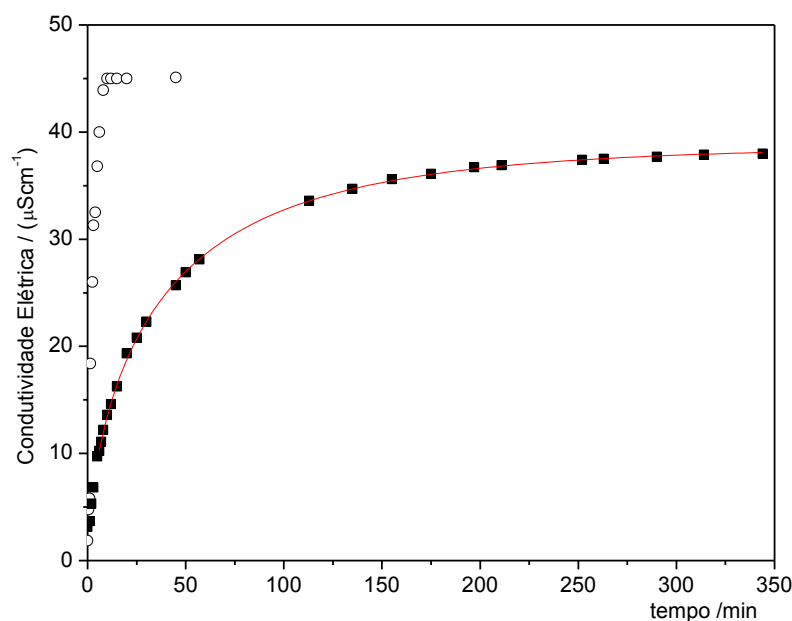


Figura 49 – Conduktividade elétrica de solução formada pela adição de 66,0 mg citrato de sódio a partir (■) 6,0 *pellets* de ágar-ágar de  $1,5 \text{ cm}^2$  de área; (○) do reagente sólido.

O tempo de equilíbrio ( $t_{95\%}$ ) foi atingido em 224,5 minutos, e a conduktividade elétrica no equilíbrio foi  $38,8 \mu\text{S min}^{-1}$ . Pode-se concluir, portanto, que a matriz de ágar-ágar permitiu uma elevação mais gradual da concentração de citrato na solução devido à difusão pela matriz de ágar

Para avaliar a característica do efeito de sustentação do sistema de liberação, foi realizado o pulso de concentração, ou seja, após o equilíbrio ser atingido, metade da solução foi retirada e o mesmo volume de água adicionado. A conduktividade diminuiu e manteve-se estável, mostrando que o sistema, como esperado, não permite a sustentação do sistema conforme apresentado na Figura 50.

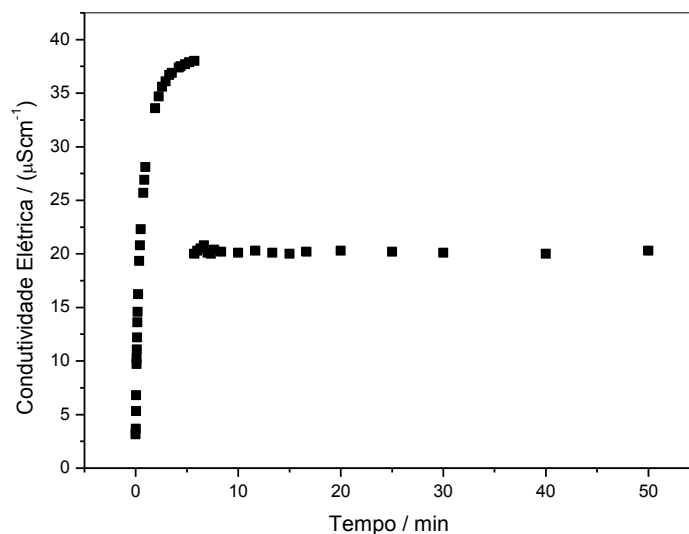


Figura 50 - Ensaio de pulso de concentração para a solução formada pela adição de 66,0 mg citrato de sódio a partir 6,0 *pellets* de 1,5  $\text{cm}^2$  de área.

Buscando essa modulação foi selecionado o sal de citrato de cálcio, que, devido à baixa solubilidade ( $\text{pKs}=10,4$ ), pode ocorrer o equilíbrio de precipitação no meio, controlando, portanto, a concentração do citrato no meio (Figura 51).

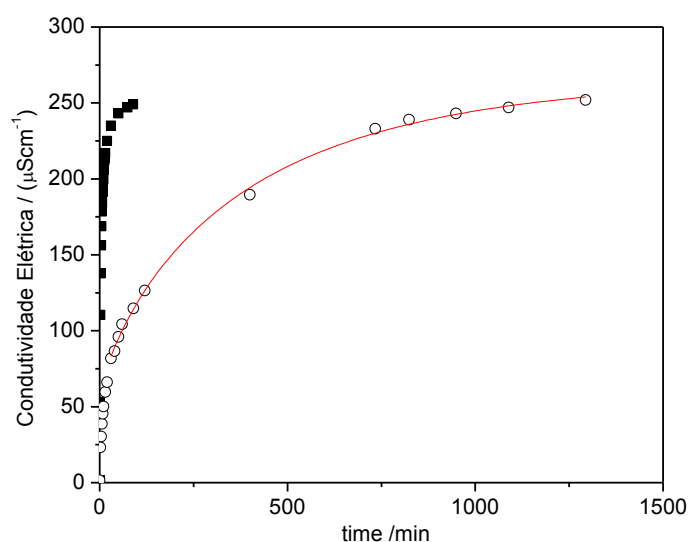


Figura 51 – Conduividade elétrica de solução formada pela adição de 890,0 mg citrato de cálcio a partir de, (○) 6,0 *pellets* de ágar-ágar de 1,5  $\text{cm}^2$  de área; (■) do reagente sólido.

Para esse sistema de liberação, o tempo de equilíbrio ( $t_{95\%}$ ) foi 21,8 horas (1305,9 minutos). Esse tempo foi bastante superior a aquele observado para o sólido livre adicionado à água (cerca de 0,5 hora).

Dois processos cinéticos distintos devem estar ocorrendo dentro da matriz de ágar: (i) o processo de difusão através da matriz polimérica e (ii) o processo de dissolução do sal pouco solúvel. Devido ao pequeno volume de solução dentro da matriz, o equilíbrio de precipitação pode ter se estabelecido e portanto, mantendo grande parte do citrato de cálcio na forma sólida, que pode garantir uma grande capacidade do sistema.

A condutividade elétrica da solução no equilíbrio foi de  $267,5 \mu\text{S cm}^{-1}$ . Não há diferença significativa entre este e o valor observado para o citrato de cálcio livre em solução (pelo teste t-Student com 95% de confiança).

O ensaio de pulso de concentração mostrou a sustentação do sistema (Figura 52).

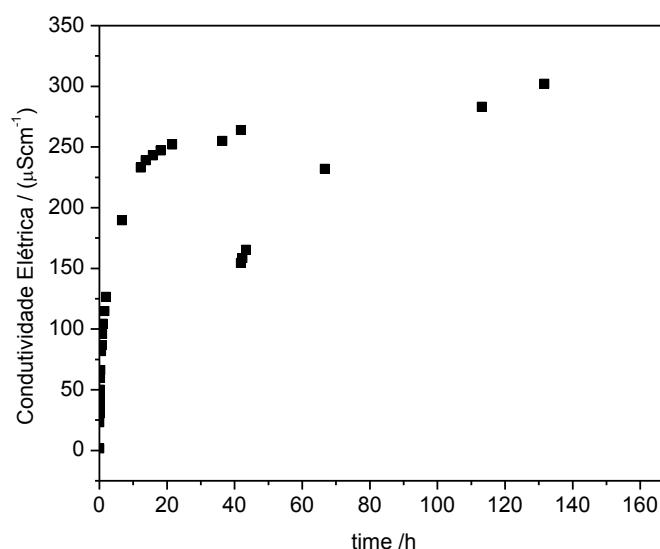


Figura 52 - Ensaio de pulso de concentração para a solução formada pela adição de 890,0 mg de citrato de cálcio a partir 6,0 *pellets* de ágar-ágar de  $1,5 \text{ cm}^2$  de área.

Através do experimento de pulso, foi possível a modulação do sistema utilizando o citrato de cálcio, uma vez que ao atingir o equilíbrio a liberação se mantém estável e só haverá mais liberação de ligante caso esse seja consumido no meio.

### 5.3. Estudo do sistema de liberação sustentado

Diferentes porcentagens de ágar-ágar (1 e 5 % (m/m)) no *pellet* não apresentaram comportamento distinto e não foi possível obter *pellets* com teores de

ágar-ágar mais baixos ou superiores. Esse resultado indica a ausência de interação entre os íons e a estrutura polimérica ou na difusão dos íons (Figura 53).

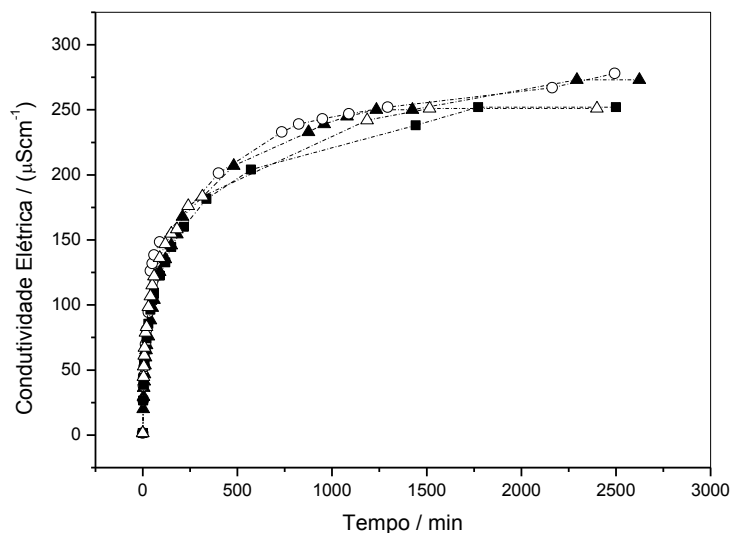


Figura 53 – Comportamento da condutividade elétrica de dois *pellets* de 6,0 cm<sup>2</sup> de área contendo 890,0 mg de citrato de cálcio, com diversos teores de ágar-ágar. (▲) ágar-ágar 1%; (○) ágar-ágar 2%; (■) ágar-ágar 3% e (△) ágar-ágar 5%.

O efeito da área superficial total dos *pellets*, mantendo-se a massa total de *pellets* constante é apresentado na Figura 54. As áreas superficiais totais, ou seja, considerando todos os *pellets* dispersos em solução foram: 9,0 cm<sup>2</sup>, 12,0 cm<sup>2</sup> e 24,0 cm<sup>2</sup>, respectivamente, utilizando 6,0 *pellets* de 1,5 cm<sup>2</sup>; 2,0 *pellets* de 6,0 cm<sup>2</sup> e 1,0 *pellet* de 24,0 cm<sup>2</sup>.

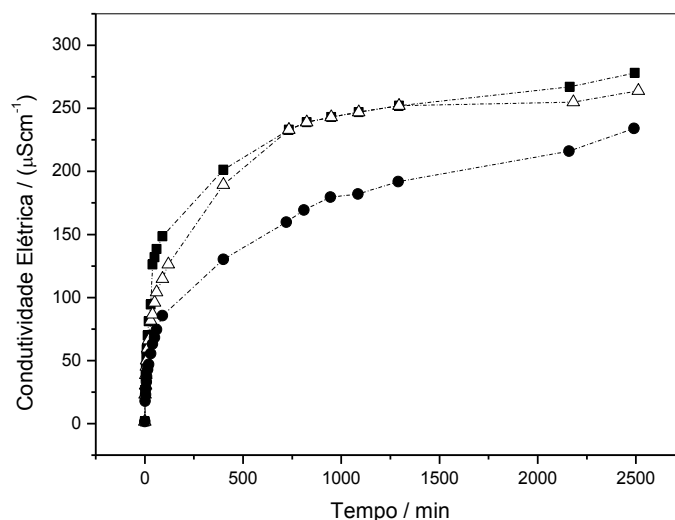


Figura 54 – Comportamento da condutividade elétrica de 50 mL de solução

contendo *pellets* de diversas áreas de ágar-ágar 2% contendo uma massa de citrato de cálcio de 890,0 mg. Áreas superficial total dos *pellets*: (●) 9,0 cm<sup>2</sup>; (△) 12,0 cm<sup>2</sup>; (■) 24,0 cm<sup>2</sup>.

Os *pellets* de superfícies total de contato de 12,0 e 24,0 cm<sup>2</sup> apresentaram comportamento similar, enquanto que para *pellets* de 1,5 cm<sup>2</sup> de área a taxa de liberação foi menor do que para aqueles de 6,0 cm<sup>2</sup> e 24,0 cm<sup>2</sup>. Como esperado, o aumento de área superficial total de contato determina uma maior taxa de liberação de citrato no meio.

A Figura 55 apresenta o perfil de liberação do citrato de cálcio livre em comparação com os perfis de liberação de citrato dispersos em diferentes porcentagens de ágar-ágar com área superficial total de 12,0 cm<sup>2</sup>. O perfil apresentado é típico da curva da cinética de liberação controlada, ou seja a liberação do analito é disponibilizada aos poucos para o meio.

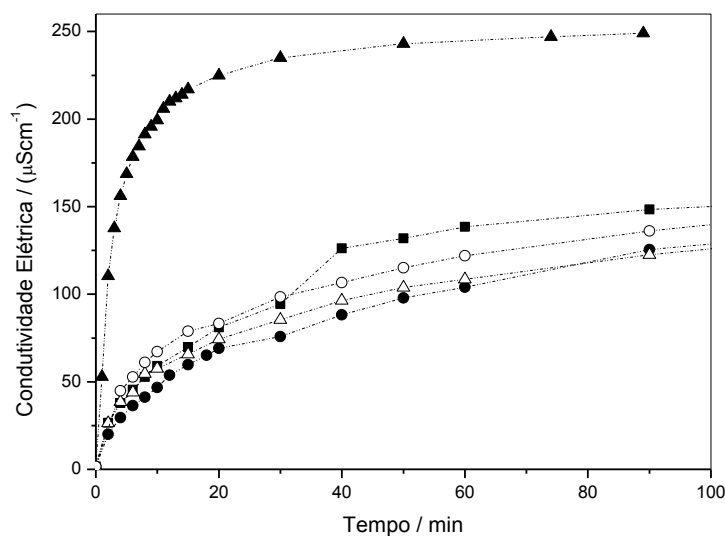


Figura 55 - Comportamento da condutividade elétrica de 5,0 mL de solução de citrato livre em comparação com o perfil de liberação de dois *pellets* de diferentes porcentagens de ágar-ágar de 6,0 cm<sup>2</sup>, contendo uma massa de citrato de cálcio de 890,0 mg. (▲) citrato de cálcio livre; (△) ágar-ágar 1%; (■) ágar-ágar 2%; (●) ágar-ágar 3% e (○) ágar-ágar 5%.

A Figura 56 apresenta um experimento de pulso de concentração, ou seja, a comparação entre o tempo de dissolução do citrato liberado ao longo do tempo disperso em matriz ágar-ágar, e o momento que ocorre a retirada de 50% de solução e são colocados a mesma quantidade de água.

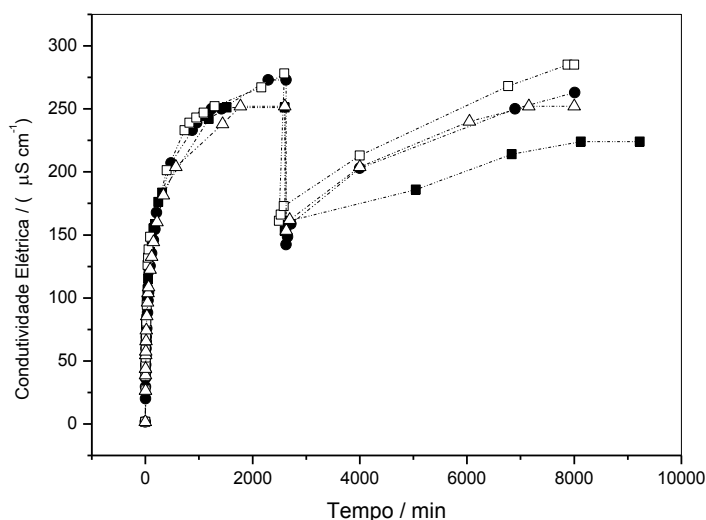


Figura 56 – Estudo de pulso de concentração em 50,0 mL de água com dois *pellets* de ágar-ágar de 6,0 cm<sup>2</sup>. O pulso foi causado pela retirada de 25,0 mL da solução e adicionado 25,0 mL de água. (□) ágar-ágar 1%; (●) ágar-ágar 2%; (△) ágar-ágar 3% e (■) ágar-ágar 5%.

Em todas as condições estudadas, o equilíbrio é atingido em cerca de 2,0 dias (2500 min) e a medida que o citrato é consumido a liberação continua até atingir o equilíbrio novamente, constituindo-se de um sistema promissor pois além de estabelecer uma concentração máxima no meio evita liberação de quantidades excessivas de ligante.

Observou-se também no experimento de pulso para diferentes concentrações de ágar-ágar, que quanto menor a concentração de ágar-ágar dos *pellets* mais facilmente o analito se difunde através da matriz para o meio, conforme apresentado na figura acima.

#### 5.4. Avaliação do ajuste dos modelos cinéticos as curvas de liberação até atingir o equilíbrio

Foram avaliados modelos cinéticos para explicar os dados experimentais: (1) 2<sup>a</sup> ordem, (2) difusão intrapartícula e (3) Noyes-Whitney. Foi utilizada regressão não-linear para todos o modelo, com exceção ao modelo de 2<sup>a</sup> ordem.

A Figura 57 apresenta os resíduos e a porcentagem dos resíduos dos modelos de regressão obtido após o ajuste das curvas de liberação aos modelos cinéticos para *pellets* de ágar-ágar 2% e área de 9,0 cm<sup>2</sup>.

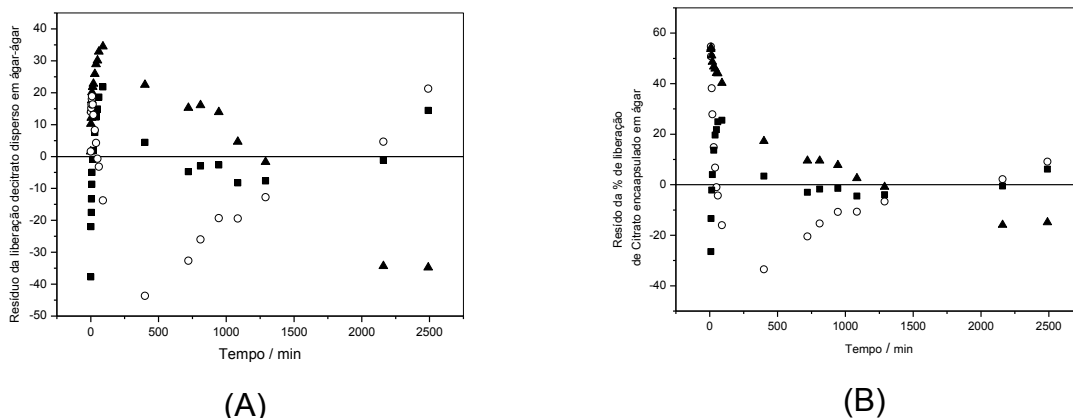


Figura 57 - (A) Resíduo obtido após ajuste das curvas de liberação aos modelos cinéticos. (B) Porcentagem de resíduo obtido após o ajuste das curvas de liberação aos modelos cinéticos para seis *pellets* de ágar-ágar 2% de 1,5 cm<sup>2</sup> de área. (▲) Difusão intrapartícula, (■) Noyes – Whitney e (○) Pseudo 2<sup>a</sup> ordem.

Observa-se uma maior dispersão dos resíduos dos modelos aplicados (Figura 57) nos primeiros minutos do experimento. Este fato se relaciona a liberação ser mais rápida devido ao citrato presente na superfície dos *pellets* e portanto não apresenta uma cinética mais rápida e provavelmente não associada à difusão. Após algum tempo, o equilíbrio é deslocado e assim o citrato presente na matriz polimérica é liberado por o meio por processos de difusão.

Para todos os ensaios, o modelo de Noyes-Whitney foi o que apresentou melhor ajuste, menor porcentagem de dispersão dos resíduos, constantando que a liberação ocorre por processos de difusão corroborando com os resultados encontrados por Grillo *et al.* (2011), que sugeriu a utilização do modelo de Peppas para descrever o mecanismo de liberação da ametrina.

A Tabela 18 apresenta os valores de constante de velocidade 'k' em função da porcentagem de ágar-ágar e da área total de *pellets*.

Tabela 18 - Valores da constante de velocidade em função da porcentagem de ágar-ágar e área superficial de contato dos *pellets*.

Ensaio	Porcentagem de ágar-ágar/%	Área Superficial Total /cm <sup>2</sup>	k.10 <sup>3</sup> /min <sup>-1</sup>
1	1	24	4,78
2	1	12	2,80
3	1	9	3,98
4	2	24	11,0
5	2	12	1,10
6	2	9	1,59
7	3	24	4,88
8	3	12	2,86
9	3	9	3,56
10	5	24	4,88
11	5	12	4,28
12	5	9	4,18

### 5.5. Influência de cálcio e pH da solução de liberação no sistema de liberação modulado

Foi avaliada a influência do pH e da concentração de cálcio na solução receptora no sistema de liberação modulado. A concentração de citrato na solução em sistemas de liberação sustentada foi determinada pelo método espectrofotométrico proposto baseado no complexo cromo(III)-EDTA.

Os modelos cinéticos foram novamente aplicados para confirmar os resultados obtidos com medidas de condutividade elétrica (Figura 57) e o modelo de Noyes-Whitney foi novamente selecionado. Na Figura 58 são apresentados os resíduos e a porcentagem dos resíduos dos modelos para uma condição experimental, como exemplo.

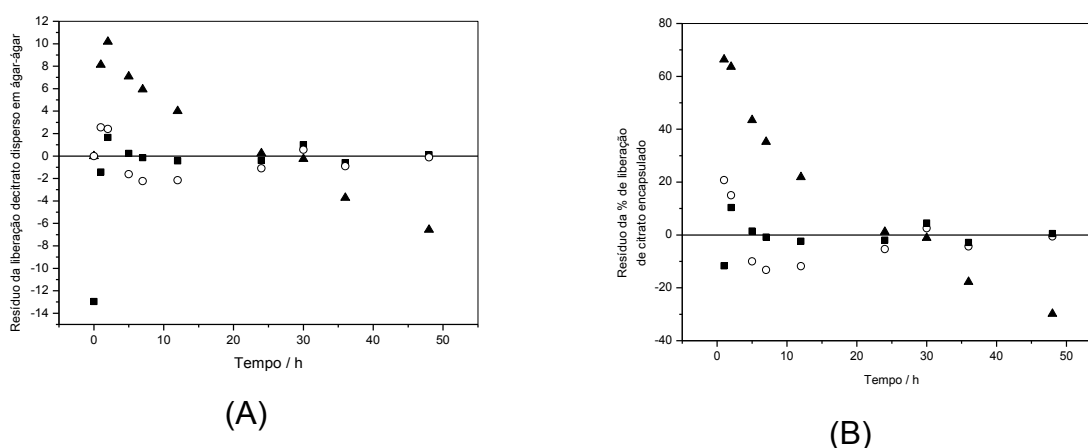


Figura 58 – (A) Resíduo obtido após ajuste das curvas de liberação aos modelos cinéticos. (B) Porcentagem de resíduos obtido após ajuste aos modelos aplicados a liberação de citrato em solução aquosa a pH 7,0 e 150,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ . ( $\blacktriangle$ ) Difusão intrapartícula, ( $\blacksquare$ ) Noyes – Whitney e ( $\circ$ ) Pseudo 2<sup>a</sup> ordem.

A Tabela 19 apresenta os parâmetros do modelos de Noyes-Whitney em função do pH do meio e da concentração de cálcio.

Tabela 19 – Parâmetros do modelo de Noyes-Whitney em função do pH do meio e da concentração de cálcio

Ensaio	pH	$\text{Ca}^{2+}$	$C_s$	$k \cdot 10^3 / \text{h}^{-1}$
		$/( \mu\text{mol L}^{-1} )$	$/( \text{mmol L}^{-1} )$	
1	5,0	5,0	9,70	0,080
2	7,0	5,0	18,96	0,160
3	5,0	150	13,32	0,055
4	7,0	150	21,99	0,084
5	6,0	77,5	12,71	0,136
6	6,0	77,5	15,94	0,060
7	6,0	77,5	15,52	0,083

A Figura 59 apresenta a comparação entre os perfis de liberação de citrato em todas as condições estudadas.

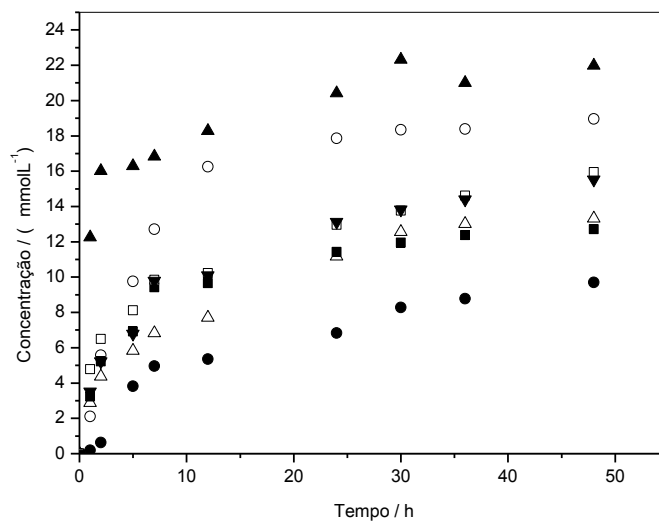


Figura 59 – Perfil de liberação de citrato em solução aquosa a um determinado pH e uma concentração de Ca(II). (●) Ensaio 1: pH 5,0 e Ca(II) 5,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (○) Ensaio 2: pH 7,0 e Ca(II) 5,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (△) Ensaio 3: pH 5,0 e Ca(II) 150,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (▲) Ensaio 4: pH 7,0 e Ca(II) 150,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (■) Ensaio 5: pH 6,0 e Ca(II) 77,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (□) Ensaio 6: pH 6,0 e Ca(II) 77,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e (▼) Ensaio 7: pH 6,0 e Ca(II) 77,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Em todas as condições testadas, as concentrações de citrato atingiram o equilíbrio após 25 horas de liberação. Observa-se diferentes taxas de liberação do citrato de acordo com as condições experimentais.

A influência das variáveis foi avaliada por ANOVA, com nível de confiança de 95% usando a concentração de citrato no equilíbrio e a constante de velocidade “k” como resposta.

A Figura 60 apresenta a influência de cada variável sobre a concentração no equilíbrio a um nível de confiança de 95%.

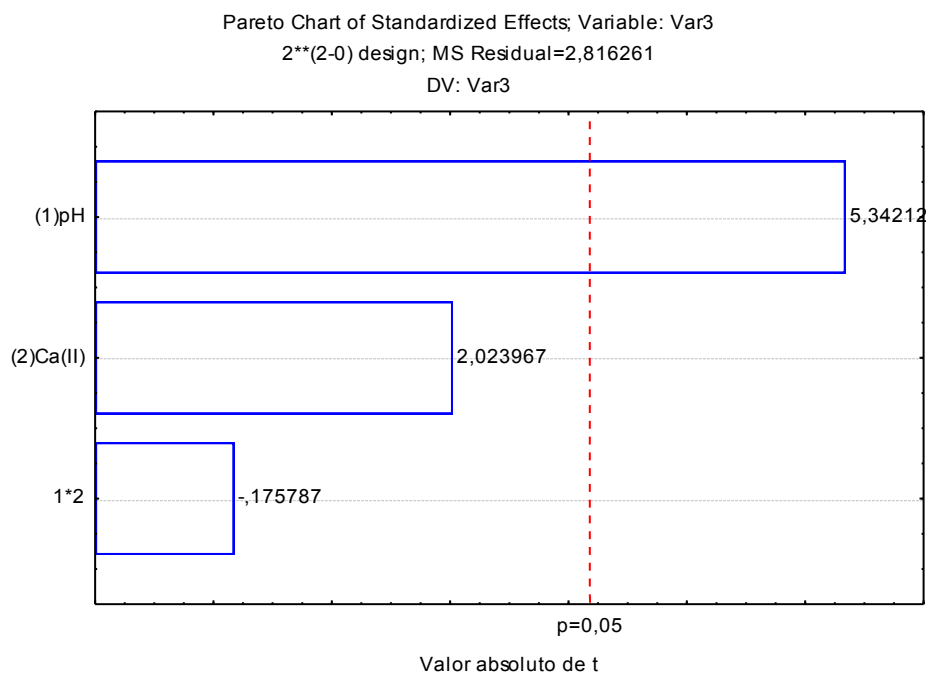


Figura 60 – Diagrama de Pareto para avaliação da influência das variáveis sobre a concentração no equilíbrio de citrato.

O pH influenciou significativamente a taxa de liberação a nível de 95% de confiança. Já a concentração de cálcio, assim como a interação entre os dois fatores não foram significativos.

A Figura 61 apresenta a influência de cada variável sobre a constante de velocidade “k” a nível de confiança de 95%.

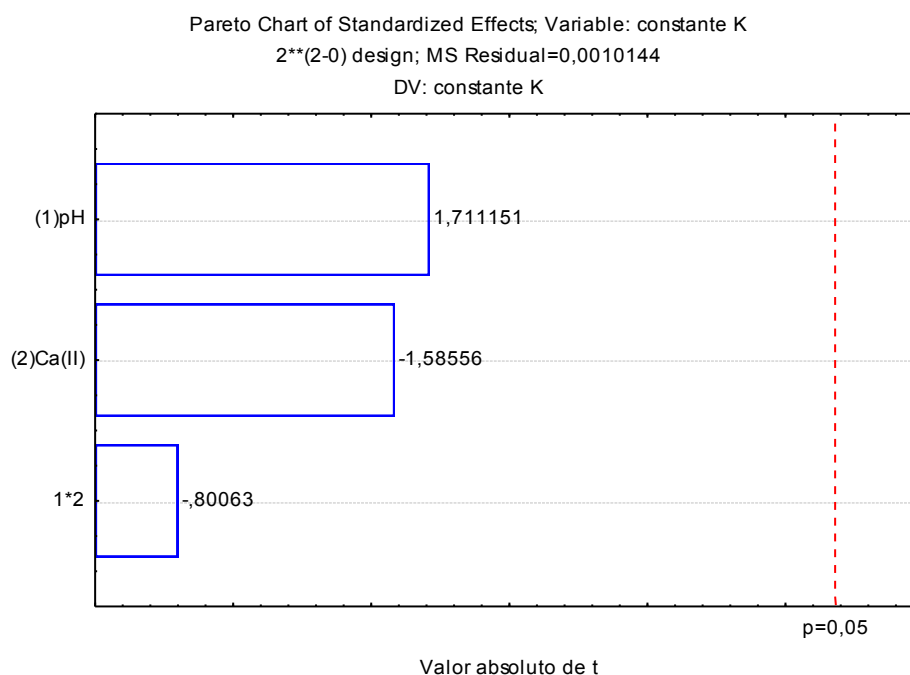


Figura 61 - Diagrama de Pareto para avaliação da influência das variáveis sobre a constante de velocidade “k”.

O pH, a concentração de cálcio (II), assim como as interações entre os dois fatores a um nível de confiança de 95% não influenciaram significativamente a constante de velocidade “k”.

Devido ao uso de um sistema em equilíbrio de precipitação aliado ao processo de liberação controlada, foi possível obter um sistema que, além da liberação controlada, também estabelece uma concentração máxima na solução do solo. Esse mecanismo é promissor pois evita a liberação de grandes quantidades de ligante no meio. Após atingir essa concentração, só haverá mais liberação quando o citrato for consumido. Além disso, é possível aumentar a capacidade dos *pellets*, ou seja, colocar grande quantidade de citrato sem que isso implique em um aumento na sua concentração na solução do solo.

## 6. Conclusões parciais

O citrato de cálcio disperso em matriz de ágar-ágar possibilitou o desenvolvimento de um sistema de liberação sustentada por equilíbrio de precipitação, constituindo-se de um sistema promissor, de modo que ao atingir o equilíbrio, só haverá mais liberação de citrato caso o analito seja consumido. Esse sistema é muito útil para processos de fitoextração.

Na caracterização do mecanismo de liberação, o modelo de Noyes foi o que apresentou o melhor ajuste, constatando que a liberação ocorre por processos de difusão, sem interação com a matriz polimérica.

As concentrações de citrato liberadas atingiram o equilíbrio após 25 horas, sendo observadas diferentes taxas de liberação do citrato de acordo com as condições experimentais.

As concentrações de cálcio, assim como a interação entre os fatores na liberação de citrato no sistema de liberação sustentada proposto, não influenciaram significativamente a taxa de liberação a nível de confiança de 95%. Já o pH foi significativo na liberação de citrato para o meio receptor.

O pH, a concentração de cálcio (II), assim como a interação entre os fatores não influenciam a constante de velocidade “k” a um nível de confiança de 95%.

## **CONCLUSÃO GERAL**

Foram desenvolvidos métodos analíticos para determinação de citrato e a proposta de um sistema de liberação sustentada de citrato.

O método espectrofométrico inverso para determinação de citrato foi aplicado em sistema de liberação controlada sustentada.

O método desenvolvido apresentou figuras de mérito adequadas para determinação de citrato em solo e em estudos de liberação controlada.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando o sucesso no desenvolvimento do sistema de liberação controlada e do método de espectrofotometria inversa para a determinação de citrato, sugere-se como futuros trabalhos:

- Avaliação da eficiência da dispersão do citrato em outras matrizes poliméricas, como quitosana e gelatina;
- Aplicação dos pellets ou micropartículas contendo o analito em solos contaminados;
- Determinar as constantes de formação do complexo cromo(III) e citrato;
- Verificar o comportamento de outros ligantes em presença do complexo de cromo(III)-EDTA - determinação da capacidade complexante do solo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, P., JANAGAP, S. Doehlert uniform shell designs and chromatography. **Journal of Chromatography B**.v.910, pag-14-21, 2012.

AZEEM, B., KUSHAARI, K., MAN, Z.B., BASIT, A., THANH, T.H. Review on materials & methods to produce controlled release coated urea fertilizer. **Journal of controlled release**.v.181, pag.11-21, 2014.

BAES, C, F., MESMER, R.E. **The Hydrolysis of Cations**. Wiley-Interscience, New York, 1976.

BARAJ, B., MARTINEZ, M., SASTRE, A., AGUILAR, M. Simultaneous determination of Cr(III), Fe(III), Cu(II) and Pb(II) as UV-absorbing EDTA complexes by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**. v.1, pag-103-11,1995. DOI: 10.1016/0021-9673(94)01078-S.

BARBOSA, A.F., SEGATELLI, M.G., PEREIRA, A.C., SANTOS, A. de S., KUBOTA, L.T., LUCCAS, P.O., TARLEY, C.R.T. Solid-phase extraction system for Pb(II) ions enrichment based on multiwall carbon nanotubes coupled on-line to flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**. v. 71, pag.1512-1519, 2007.

BENNERDSEN, L.R., HRICHNER, M., JORGENSEN, T.H., SOGAARD, E.G. Mobilization of metals during treatment of contaminated soils by modified fenton's reagent using different chelating agents. **Journal of Hazardous Materials**.v.199-200, pag.128-134, 2012.

BHARGAVA, A., CARMONA, F.F., BHARGAVA, M., SRIVASTAVA, S. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. **Journal of Environmental Management**. v.105, pag. 103-120, 2012.

BRADY, N.C. **Natureza e propriedades dos solos**. 5ed. Rio de Janeiro: Freitas, BRASIL, 2007.

BRERETON, R. G. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**. John Wiley & Sons, 2003.

CARBONARO, R. F., CINZA, B.N., WHITEHEAD, C.F., PEDRA, A.T. Carboxylate-containing chelating agent interactions with amorphous chromium hydroxide: Adsorption and dissolution. **Geochimica et Cosmochimica Acta**. v. 72, n. 13, pag. 3241- 3257, 2008.

COSTA, A.C.S., ASSIS, J.C.R., TORRES, A.L.C., FERREIRA, S.L.C., KORN, M.G.A., TEIXEIRA, L.S.G. Uso de irradiação de microondas na determinação espectrofotométrica de cromo com EDTA. **Química Nova**. v.22, nº2, 1999.

CLESCERI, L.S., GREENBERG, A.E., EATON, A.D. **Standard methods for examination of water and wastewater**. APHA: American Public Health Association, 1998.

CHIEN, S., PROCHNOW, L., CANTARELLA, H. Recent developments of fertilizer production and use to improve nutrient efficiency and minimize environmental impacts. **Adv. Agron**.v.102, pag. 267–322, 2009.

- CHIUMIENTO, F., D'ALOISE, A., MARCHEGANI, F., MELAI, V. Determination of EDTA in food formulations and pre-mixture by HPLC-DAD. **Food Chemistry**.v.175, pag. 452-456, 2015.
- CRUZ, L.U., SOARES, T.D., COSTA, G., MEZZALIRA, N.P., DA SILVEIRA S.S., GUTERRES, A.R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **Int. J. Pharm.**v.313, pag. 198–205, 2006.
- CUNNINGHAM, S.D., BERTI, W.R. Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**.v.29, pag. 207–212, 1993.
- DRAPER, N.R., SMITH, H. **Applied Regression Analysis (Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics**, 1966.
- EVANGELOU, M.W.H., EBEL, M., ACHAEFFER, A. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agentes. **Chemosphere**.v. 68, pag.989-1003, 2007.
- FERREIRA, S. L. C., SANTOS, W.N.L., QUINTELLA, C.M., NETO, B.B., SENDRA, J.M.B. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. **Talanta**. v.63, pag. 1061-1067, 2004.
- FOLKMAN, J., LONG, D.M. The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy. **Journal of Surgical Research**.v.4, pag.139-142, 1964.
- FLORENCE, T.M., BATLEY, G.E. Trace metals species in sea-water-I. **Talanta**. V.23, pag.179-186, 1976.
- FREIBERG, S., ZHU, X.X. Polymer microspheres for controlled drug release. **Int.J.Pharm.** v.282, pag.1, 2004.
- FRUGERI, P.M., MARCHIONI, C., GONZAGA, R.G.,LAGO, A.C., WISNIEWSKI, C., LUCCAS, P.O. An application of Doehlert matrix optimization on developing of flow injection analysis of neomycin in pharmaceutical samples. **J. Flow. Injection Anal**.v. 31, n.2. pag.107-110, 2014.
- GHADERI, R., ATRUSSION, C., CARLFORS, J. Effect of preparative parameters on the characteristics of poly(D,L-lactide-co-glicolide) microspheres made by the double emulsion method. **Int.J.Pharm.** v.141, pag.205-216, 1996.
- GALGANO, P.D. **Líquidos iônicos tensoativos: correlação entre estrutura molecular e propriedades micelares de cloretos de 1,3-dialquilimidazólio**. Tese (doutorado), USP, 2012.
- GARBISU, C., ALKORTA, I. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. **Bioresour Technology**. v.77, Pag. 229–236, 2001.
- GRILLO, R.; PEREIRA, A.E.S.; DE MELO, N.F.S.; PORTO, R.M.; FEITOSA, L.O.; TONELLO, P.S.; FILHO, N.L.D.; ROSA, A.H.; LIMA, R.; FRACETO, L.F. Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: Preparation, characterization and release kinetics in water. **Journal of Hazardous Materials**. v.186, pag. 1645-1651, 2011.

GREENWOOD, N.N.; EARSHAW, A. **Chemistry of Elements**, 2<sup>nd</sup> ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, 1997.

HARRIS, D.C. **Análise Química quantitativa**. Ltc Análise Química Quantitativa - 8<sup>a</sup> Edição. Rio de Janeiro, 2012.

HASHEMINEJAD, M., EJHIEH, A.N. A novel citrate selective electrode based on surfactant modified nano-clinoptilolite. **Food Chemistry**.pag. 794-80, 2015.

HERBERT E. ALLEN, CHIN-PAO HUANG, GEORGE W. BAILEY, ALAN R. BOWERS **Metal speciation and contamination of soil**. Boca Raton, Lewis,1994.

HELM, L., MERBACK, A.E. Water exchange in metal ions: experiments and simulation. **Coordination Chemistry Reviews**.v.187, pag. 151-181, 1999.

KABATA-PENDIAS, A.; **Trace Elements in Soils and Plants**. 3<sup>rd</sup>ed., Boca Raton, CRC, 2001.

KELEBEK, H., SELLI, S., CANBAS, A., CABAROGLU, T. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. **Microchemical Journal**. v.91, pag. 187–192, 2009.

KOLLOFF, R.H., WARD, H.K., ZIEMBA, V.F. Precise determination of traces of pyrophosphate in orthophosphates. **Analytical Chemistry**, v.32, pag.1687-1690, 1960.

KRUG, A., KELLNER, R. Determination of citric acid by means of competitive complex formation in a flow injection system.**Microchimica Acta**.v.113, pag. 203-210, 1994.

LAMBRECHTS, T., GUSTOL, Q., COUDER, E., HOUBEN, D., ISERENTANT, A., LUTTS, S. Comparison of EDTA-enhanced phytoextraction and phytostabilisation strategies with lolium perenne on a heavy metal contaminated soil.**Chemosphere**.v. 85, pag.1290–1298, 2011.

LEE, J.H., YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. **Chemical Engineering Science**. v.125, pag.75-84, 2015.

LIMA, G.F., BRONDI, A.M., PAIVA, S.F., TARLEY, C.R.T., OLIVEIRA, A.F., WISNIEWKI, C., LUCCAS, P.O. Direct introduction of water sample in multisegmented flow-injection analysis for sulfide determination. **Analytical Sciences**.v.27, 2011.

LOPES, C. M.; LOBO J. M. S.; COSTA P.; Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.41, n.2, pag.143-154, 2005.

LYRA, M.A.M., SOBRINHO, J.L.S., BRASILEIRO, M.T., LA ROCA, M.F.de., BARRAZA, J.A., VIANA, O.S., ROLIM-NETO, P.J. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**.v.26, pag.784-93, 2007.

MARTELL, A.E.; SMITH, R.M.; MOTEKAITIS, R.J. **NIST critically selected stability constants of metal complexes database**. National Institute of Standards and Technology, U.S. Dept. of Commerce, 2004, Gaithersburg.

MASSART, D.L., VANDEGINSTE, B.G. M., DEMING, S.N., MICHOTTE, Y., KAUFMAN, L. **Chernometrics: a textbook Amsterdam**. The Netherlands. Elsevier Science B.V. All, 2003.

MEERS, E., RUTTENS, A., HOPGOOD, M.J., SAMSON, D., TACK, F.M.G. Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. **Chemosphere**. v.58, pag. 1011–1022, 2005.

MEERS, S.E., QADIR, M., CARITAT, P., TACK, F.M.G., LAING, G.D., ZIA, M.H. EDTA-assisted Pb phytoextraction. **Chemosphere**. v. 74. pag.1279-1291, 2009.

MEIER, P.C., ZUND, R.E. **Statistical Methods in Analytical Chemistry**. 2ª edição, 1993.

MILLER, J.C., MILLER, J.N. **Statistics for Analytical Chemistry**, 1993.

MIN, X., WU, F. A review of environmental characteristics and effects of low-molecular weight organic acids in the surface ecosystem. **Journal of Environmental Sciences**. v. 26, pag. 935–954, 2014.

MONTGOMERY, D.C., RUNGER, G.C. **Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros**. 4ª edição, 2009.

NETO, B. DE B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**, 1995.

NOYES, A. A., WHITNEY, W.R. **Journal of the American Chemical Society**. v.19, p. 930, 1987.

OLIVEIRA, A.F. **Equilíbrio em Solução Aquosa orientado à Aplicação**. Ed. Átomo. Campinas, 2009.

OLIVEIRA, N.S. **Desenvolvimento de método não titulométrico para determinação de acidez em amostras de vinagre**. Dissertação (mestrado). UFV, 2014.

OLIVEIRA, N. S., OLIVEIRA, A. F., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R. Desenvolvimento de método não titulométrico para determinação de acidez em vinagre. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Sanitária**, submetido, 2015.

OURIQUE, A.F., POHLMANN, S.S., GUTERRES, R.C.R. Tretionoin-loaded nanocapsules: preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **Int. J. Pharm.** v.352, pag.1–4, 2008.

PERES, R.G., MORAES, E.P., MICKE, G.A., TONIN, F.G., TAVARES, M.F.M., AMAVA, D.B.R. Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Food Control**. v.20, pag. 548–552, 2009.

PINHEIRO, G.L., SILVA, C.A., LIMA, J.M., COSTA, A.L. Ácidos orgânicos de baixa massa molar em solos e materiais orgânicos. **Química Nova**.v.36, n.3.pag.413-418, 2013.

RIBEIRO, C.M.F., MATOS, C.D.,GORETI, M.,SALES, F. citrate selective electrodes for the flow injection analysis of soft drinks, beers and pharmaceutical products. **Analytica Chimica Acta**, v.47, pag. 41–49, 2002.

RILEY, J.P., TAYLOR, D. Chelating resins for the concentration of trace elements from sea water and their analytical use in conjunction with atomic absorption spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**. v.40, pag.479-485, 1968.

SCHMIDT, C.K., FLEIG, M., SACHER, F., BRAUCH, H.E. Occurrence of aminopolycarboxylates in the aquatic environment of Germany.**Environmental Pollution**.,v.131, pag. 107–124, 2004.

SILVA, T.I. **Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro e resposta SERS do ácido etilenodiaminotetraacético e seu complexo de Cromo (III) adsorvidos em sua superfície**. Dissertação (mestrado), PUC-Rio, 2013.

SILVERSTEIN, R. M., KIEMLE, D.J., WEBSTER, F.X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª edição. LtC Rio de Janeiro,2006.

SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J., STANLEY, R.C. **Fundamentos da Química Analítica**. São Paulo, Ed.Thomson, 2007.

TEÓFILO, F. R.; FERREIRA, M. M.; Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos Experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, pag.338-350, 2006.

TOMA, H. E. **Coleção de Química Conceitual 4 - Química de Coordenação, Organometálica e Catálise**. Edgar blucher, 2013.

VANGRONSVELD, J., HERZIG, R., WEYENS, J., BOULET, K., ADRIAENSEN, A., RUTTENS, T., THEWYS, A., VASSILEV, E., MEERS, E., NEHNEVAJOVA, D., MENCH, M. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. **Environmental Science and Pollution Research**. v.16, pag. 765–794, 2009.

VALKÓ,K. **Handbook of Analytical Separations: Separation Methods in Drug Synthesis and Purification**. Elsevier Science B.V, Amsterdam, The Netherlands, 2000.

XU,J., CHE, P., MA, Y. More sensitive way to determine iron using an iron (II)-1,10-phenanthroline complex and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**. v. 749, pag. 287-294, 1996.

YATES, D.E., HEALY, T.W. Mechanism of Anion Adsorption at the Ferric and Chromic Oxide/Water Interfaces.**Journal of Colloid and interface Science**.v.52, pag. 222-228, 1975.

YEBRA, M.C., BOLLAÍN, M.H.A simple indirect automatic method to determine total iodine in milk products by flame atomic absorption spectrometry.**Talanta**.v.82, pag. 828–833, 2010.

YUAN, Z.W., VANBRIESEN, J.M. The formation of intermediates in EDTA and NTA biodegradation. **Environmental Engineering Science**. v.23, pag. 533–544, 2006.

ZHANG, H., JIURU, N.L. Flow injection chemiluminescence method for the determination of pentoxifyverine citrate based on NCS-dichlorofluorescein post-chemiluminescence reaction. **Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v.72, pag. 858–862, 2009.