

Artigo

Determinação de Co(II) em Preparações Farmacêuticas e Estudo das Espécies Formadas Durante a Complexação por UV-Vis com o Reagente Br-TDB

Migues, V. H.;* Yamaki, R. T.

Rev. Virtual Quim., 2014, 6 (6), 1533-1548. Data de publicação na Web: 1 de dezembro de 2014<http://www.uff.br/rvq>**Determination of Co(II) in Pharmaceutical Formulations and Evaluation of Formed Species During Complexation by UV-Vis with Br-TDB**

Abstract: The goal of this work was to determine cobalt in pharmaceutical formulations and the formed species during complexation with 6-[2'-(5-bromothiazolylazo)]-1,2-dihydroxy-3,5-benzenedisulfonic reagent (Br-TDB). The log β values for the formed complex species $ML_2H_2^{4-}$, ML_2H^{5-} and ML_2^{6-} ($M = Co(II)$ and $L = Br-TDB^{4-}$) were 29.26 ± 0.03 , 25.11 ± 0.04 and 16.7 ± 0.11 . The stoichiometry of the complex is 1:2 and the time of reaction equals 10 minutes. The complex absorbs at 620 nm. The limits of quantification and detection were equal to 0.009 and 0.030 mg L⁻¹, respectively. The analytical curve presented an unusual pattern with negative angular coefficient. The pattern is intrinsic to the complexation system with Br-TDB, once the same behavior was observed in determination of manganese, lead, cadmium and iron ions by UV-Vis. The methodology was validated by ICP OES. The concentration of cobalt in analyzed drug samples was coincident with manufacturer's information. Moreover, both UV-Vis and ICP OES yielded similar results at a confidence level $p < 0.05$.

Keywords: Complexation; Cobalt; UV-Vis; Br-TDB; thiazolylazo.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo a determinação de cobalto em amostras farmacêuticas e estudo das espécies formadas durante a complexação com o reagente 6-[2'-(5-bromotiazolilazo)]-3,5-diidroxi-1,2-benzenodissulfônico (Br-TDB). Os valores de log β para as espécies complexas $ML_2H_2^{4-}$, ML_2H^{5-} e ML_2^{6-} ($M = Co(II)$ e $L = Br-TDB^{4-}$) foram $29,26 \pm 0,03$, $25,11 \pm 0,04$ e $16,7 \pm 0,11$. A estequiometria do complexo é de 1:2 e o tempo de reação para a complexação se processa é de 10 minutos. O complexo absorve em 620 nm. Os limites de quantificação e detecção foram, respectivamente, 0,009 e 0,030 mg L⁻¹. A curva analítica apresenta um padrão pouco usual com coeficiente angular negativo. Esse padrão é intrínseco do sistema de complexação com o reagente Br-TDB, uma vez que o mesmo padrão foi observado para a determinação de manganês, chumbo, cádmio e ferro por UV-Vis. A metodologia desenvolvida foi validada através de ICP OES. Os resultados obtidos, através do teste *t*, permitem avaliar que não há diferenças significativas em nível de confiança $p < 0,05$ para ambas as análises.

Palavras-chave: Complexação; Cobalto; UV-Vis; Br-TDB; tiazolilazo.

* Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Laboratório de Química Analítica, Campus de Jequié, CEP 45206-190, Jequié-BA, Brasil.

✉ yhmigues@gmail.com

DOI: [10.5935/1984-6835.20140100](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140100)

Determinação de Co(II) em Preparações Farmacêuticas e Estudo das Espécies Formadas Durante a Complexação por UV-Vis com o Reagente Br-TDB

Vitor Hugo Miguês,* Regina T. Yamaki

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Laboratório de Química Analítica, Campus de Jequié, CEP 45206-190, Jequié-BA, Brasil.

* vhmiguês@gmail.com

Recebido em 21 de março de 2014. Aceito para publicação em 26 de novembro de 2014

1. Introdução

2. Parte Experimental

- 2.1. Reagentes e Soluções
- 2.2. Determinação das constantes de formação do complexo de Co(II) - Br-TDB
- 2.3. Método da variação contínua (Job's)
- 2.4. Preparo de amostras de medicamento
- 2.5. Determinação de Co(II)
- 2.6. Estudo dos interferentes

3. Resultados e Discussão

- 3.1. Determinação espectrofotométrica
- 3.2. Determinação das constantes de formação do complexo de Co(II) com Br-TDB
- 3.3. Determinação da estequiometria do complexo
- 3.4. Cinética da reação
- 3.5. Linearidade e curva de calibração
- 3.6. Limite de detecção e limite de quantificação
- 3.7. Seletividade
- 3.8. Avaliação da temperatura
- 3.9. Validação da metodologia
- 3.10. Análise de amostras reais
- 3.11. Avaliação da metodologia desenvolvida

4. Conclusão

1. Introdução

O cobalto está agrupado na categoria de

toxinas ambientais, entretanto, é imprescindível para desempenhar as funções do organismo.¹ Em 1937, ficou evidente a importância do cobalto na dieta alimentar

animal,² além de apresentar efeito benéfico para a saúde do homem, pois está presente em algumas enzimas e faz parte do núcleo da molécula da vitamina B₁₂, encontrada nas formas de cianocobalamina, hidroxicobalamina, metilcobalamina ou 5-desoxadenosilcobalamina.¹ A hidroxicobalamina e a cianocobalamina são as formas não fisiológicas da cobalamina. Porém no organismo se transformam, espontaneamente, em metil e 5-desoxiadenosil, que são formas fisiologicamente ativas ou coenzimas da vitamina B₁₂. Por exposição à luz e a agentes redutores, a cianocobalamina passa rapidamente a forma de hidroxicobalamina.² Dessa forma, o cobalto apresenta caráter essencial para o organismo uma vez que é incapaz de sintetizar. Assim, é necessária a ingestão de alimentos que contenham vitamina B₁₂ ou suplementos.^{3,4}

A vitamina B₁₂ é sintetizada apenas algumas espécies de microrganismos.⁵ As bactérias do trato intestinal humano podem sintetizá-la em quantidade suficiente para a necessidade normal diária.⁶ Embora não haja qualquer recomendação oficial para a ingestão diária de Co, exceto em termos de vitamina B₁₂, a dieta ainda representa a principal fonte de exposição ao cobalto para a população em geral. As principais fontes de vitamina B₁₂ incluem alguns peixes (truta, arenque, cavala), ostras, ovos e leite.^{7,8}

O sítio de cobalto na molécula de cianocobalamina desempenha importantes funções no corpo humano, incluindo a síntese de DNA, manutenção da função nervosa, produção de células vermelhas no sangue, sendo, por esta razão, empregada no tratamento da anemia perniciosa.⁹ Além disso, a vitamina B₁₂ é essencial em diversas reações bioquímicas funcionando como um cofator essencial para atividades enzimáticas ligadas ao metabolismo.¹⁰⁻¹²

Assim como qualquer substância que, em excesso, pode se tornar tóxica, a exposição a elevados níveis de cobalto pode ser prejudicial à saúde do homem, tais como reação alérgica na pele, irritação do nariz, boca e olhos, dor de cabeça, dor de

estômago, tonturas, vômitos, hemorragia, diarreia, dificuldade de respiração podendo causar asma, pneumonia prejudicando a absorção do ferro, além de coma e até mesmo a morte.¹³

Em análise química, os compostos tiazolilazos possuem uma vasta aplicabilidade tanto em determinações espectrofotométricas, devido à sua capacidade de formarem complexos com uma grande variedade de íon metálicos, quando em titulações complexométricas; além de sistemas de pré-concentração e extração.¹⁴ Atualmente, várias técnicas tais como cromatografia iônica,¹⁵ extração líquido-líquido com espectrometria de absorção atômica,¹⁶ espectrometria de fluorescência atômica¹⁷ e espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado,¹⁸ mostram boa sensibilidade, porém é limitada por causa da instrumentação dispendiosa e custos elevados para análises de rotina. Todavia, métodos envolvendo espectrofotometria na região do ultravioleta/visível (UV/Vis) são escassos, principalmente em formas farmacêuticas.¹⁹

Por outro lado, a espectrofotometria de UV-Vis torna-se um instrumento importante na determinação de elementos em várias amostras devido a elevada sensibilidade e precisão, simplicidade, disponibilidade e baixo custo em comparação com outros dispositivos correspondendo a uma ferramenta analítica de primeira importância.²⁰

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo a determinação de Co(II) por espectrofotometria UV-Vis utilizando o reagente 6-[2'-(5-bromotiazolilazo)]-3,5-diidróxi-1,2-benzenodissulfônico (Br-TDB) como agente complexante e o estudo das espécies complexas formadas.

2. Parte Experimental

2.1. Reagentes e Soluções

Todos os reagentes empregados no trabalho foram de grau e pureza analítica e as soluções foram preparadas com água primeiramente deionizada no purificador de água (Permuton) e posteriormente ultrapurificada através de osmose reversa pelo sistema de purificação de água da MILLIPORE SIMPLICITY 18S - 18 mΩ cm⁻¹.

2.2. Determinação das constantes de formação do complexo de Co(II) - Br-TDB

A solução do ácido Br-TDB foi preparada em água na concentração de 1,00 x 10⁻³ mol L⁻¹. Alíquotas desta solução foram diluídas com água ultrapura, para volume final de 15,00 mL, obtendo-se soluções do ácido Br-TDB nas concentrações de 3,80 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. A solução de cobalto foi preparada diariamente em água a partir da solução padrão (1000 mg L⁻¹) para AAS (FLUKA). Alíquota desta solução foi adicionada ao sistema reacional na concentração de 1,20 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ para um volume final de 15,00 mL. A força iônica foi mantida a 0,01 mol L⁻¹ em NaCl e a temperatura controlada a 25 °C. Solução de NaOH 0,9996 mol L⁻¹ foi utilizada como titulante. As medidas de pH foram realizadas utilizando o potenciômetro Digimed DM-20 equipado com eletrodo de vidro combinado com eletrodo de prata-cloro de prata. O eletrodo foi calibrado com soluções tampão Merck pH 4,00 e 7,00. Medidas espectrofotométricas e de pH foram feitas após a adição de cada alíquota do titulante, utilizando o espectrofotômetro Varian Modelo Cary 50. Os dados na faixa de 320 a 680 nm e pH 1,85 a 10,45 foram tratados com o programa SQUAD.²¹

2.3. Método da variação contínua (Job's)

Para determinação espectrofotométrica da estequiometria do complexo Co(II)-Br-TDB utilizou-se o método da variação contínua ou método de Job's.²² Alíquotas das soluções estoque do ácido Br-TDB e padrão de Co(II)

de concentrações iguais a 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ para volume total de 1000 μL foram utilizadas e variou-se a razão entre os volumes, o que acarretou na variação da fração molar das espécies entre 0,1 e 0,9. Foi adicionado 3,00 mL de tampão fosfato (pH = 8,0) e completou com água ultrapura para volume final de 10,00 mL. Em seguida, as soluções foram submetidas à análise espectrofotométrica em 620 nm.

2.4. Preparo de amostras de medicamento

As amostras de diferentes formulações farmacêuticas contendo cobalto na forma de vitamina B₁₂ foram adquiridas em farmácias sob a forma de comprimidos, drágea, suspensão em estabelecimentos da cidade de Jequié – BA. A etapa de mineralização das amostras foi realizada utilizando-se decomposição por via úmida em sistema aberto. Para cada amostra, a massa ou volume correspondente a 0,1 mg do analito foi misturada com 4,00 mL de ácido nítrico 65% (VETEC), 2,00 mL peróxido de hidrogênio PA (Êxodo) e 3,0 mL de água deionizada. A mistura foi acondicionada em béquer de 25,00 mL e digerida em chapa aquecedora Tecnal por 5 h a 120 °C de acordo com Krug.²³ O material resultante foi transferido para balão volumétrico de 10,00 mL e armazenado a 4 °C. No momento da análise, o pH foi ajustado em com hidróxido de sódio.

2.5. Determinação de Co(II)

Alíquotas de 1,00 mL do material digerido foram utilizadas para análise. Em seguida foi adicionado 500 μL do complexante Br-TDB (1,00 x 10⁻³ mol L⁻¹) e 3,00 mL do tampão fosfato pH 8,0 e água para volume final de 10,00 mL. As análises foram realizadas em triplicata.

2.6. Estudo dos interferentes

Após determinação das melhores condições para a reação de complexação entre Co(II) e Br-TDB, possíveis interferentes foram estudados variando a concentração com o intuito de verificar se a concentração desses íons influencia a determinação do analito de interesse. Para tanto, foram utilizadas concentrações dos íons metálicos variando de 0,1 a 5 mg L⁻¹ para cada sistema. Logo após, foi realizada a análise por espectrofotometria UV-Vis em 620 nm.

Cary 50 usando cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm na faixa de comprimento de onda de 300 a 800 nm. O reagente Br-TDB livre apresenta máximo de absorção em 484 nm, enquanto que na forma complexada com Co, apresenta deslocamento batocrômico e o máximo de absorvância é observado em 620 nm, conforme o espectro de absorção mostrado na Figura 1.

3.2. Determinação das constantes de formação do complexo de Co(II) com Br-TDB

3. Resultados e Discussão

3.1. Determinação espectrofotométrica

O complexo formado foi analisado no espectrofotômetro UV-Vis modelo Varian

A proposta das espécies que se formam durante a titulação do Br-TDB em presença de Co(II) designado por M²⁺, é apresentada na Tabela 1, que apresenta, também, os valores do logaritmo das constantes de formação das espécies complexas representadas de acordo com equação a seguir.

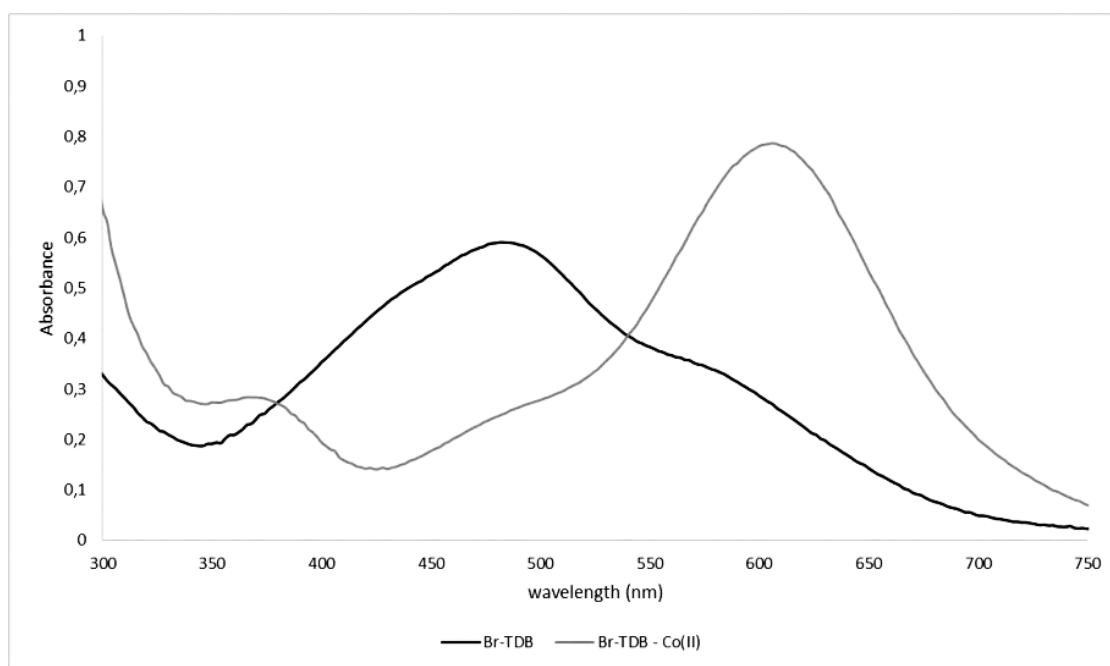


Figura 1. Espectro de absorção do Br-TDB e Br-TDB-Co(II)

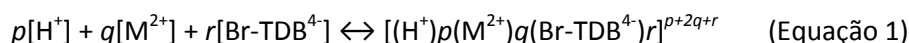


Tabela 1. Logaritmo das constantes de formação das espécies do Br-TDB e das espécies complexas do Br-TDB e Co(II)

Espécie	p, q, r	Fórmula*	Log β
1	2, 0, 1	H_2L^{2-}	$13,05 \pm 0,03$
2	1, 0, 1	HL^{3-}	$8,57 \pm 0,01$
3	2, 1, 2	$ML_2H_2^{4-}$	$35,63 \pm 0,05$
4	1, 1, 2	ML_2H^{5-}	$28,43 \pm 0,03$
5	0, 1, 2	ML_2^{6-}	$19,65 \pm 0,02$

*L= Br-TDB⁴⁻, M = Co²⁺

Para o modelo apresentado do complexo Br-TDB e Co (II) na equação 1 e os valores obtidos na Tabela 1, o desvio padrão da absorbância foi igual a $5,65 \times 10^{-3}$ e a soma dos quadrados da absorbância igual a $6,88 \times 10^{-2}$. Esses valores indicam que a um nível de confiança de 95% esses valores são aceitáveis.

Os compostos tiazolilazos formam complexos coloridos com muitos metais, formando quelatos estáveis, especialmente com alguns metais de transição. Os metais formam complexos com os ligantes na razão 1:1 ou uma mistura de complexos nas razões 1:1 e 1:2 quando estão em soluções ácidas ou levemente ácidas. Porém, quando em soluções alcalinas, o equilíbrio é frequentemente deslocado para o complexo na razão 1:2. A lenta reação complexante

com alguns elementos de transição se deve a lenta substituição dos aquo-complexos desses metais. Os elementos menos eletropositivos tendem a formar complexos mais estáveis, devido às características covalentes da ligação.²⁴⁻²⁶

Os complexos de cobalto tendem a formar estruturas na razão ligante-metal de 2:1, quando presentes com ligantes polidentados como o TADAP que possuem enxofre e nitrogênio como doadores de elétrons.²⁷ No entanto, complexos 1:1 também ocorrem com frequência.²⁸ Assim, como os valores das constantes de formação das espécies complexas apresentadas na Tabela 1 são elevados, sugere-se que o reagente Br-TDB se liga ao íon Co(II) como um quelante tridentado de acordo com a estrutura proposta na Figura 2.

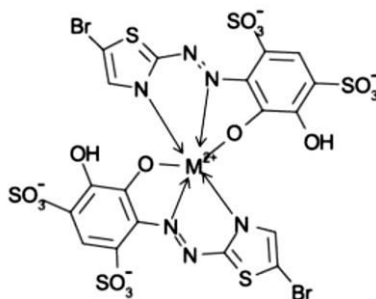


Figura 2. Estrutura proposta para o complexo $(Br-TDB)_2-Co^{2+}$

3.3. Determinação da estequiometria do complexo

Considerando um equilíbrio onde vários complexos podem ser formados, é importante que se conheça a relação molar para metal/ligante. Vários processos podem

ser utilizados para se determinar tal relação, destacando-se o método das variações contínuas atribuído a Job e modificado por Vosburgh e Cooper.²⁹ A Tabela 2 lista os valores referentes aos volumes do ligante e do metal em volume final de 10,00 mL, os valores de X_{Ligante} .

Tabela 2. Soluções para o método de Jobs e seus valores de absorvância máximo para a obtenção dos gráficos A_L (Br-TDB livre), A_{ML} (complexo $(CoL_2)^{2-}$) e $Abs_{\text{corrigida}}$ versus X_{Ligante} (fração molar do Br-TDB)

Amostra	Vol. Br-TDB	Vol. Metal	X_{Ligante}	A_L	A_{ML}	$Abs_{\text{corrigida}}$
Ligante livre	1000 μL	0	1	0,9809	0	0
L:M (1:9)	100 μL	900 μL	0,100	0,9574	0,9041	0,0533
L:M (1:4)	200 μL	800 μL	0,200	0,7512	0,6650	0,0862
L:M (1:3)	250 μL	750 μL	0,250	0,6391	0,5004	0,1387
L:M (1:2)	333 μL	667 μL	0,333	0,6050	0,4314	0,1736
L:M (1:1,5)	400 μL	600 μL	0,400	0,6208	0,4010	0,2198
L:M (1:1)	500 μL	500 μL	0,500	0,6445	0,3774	0,2671
L:M (1,5:1)	600 μL	400 μL	0,600	0,6562	0,3276	0,3286
L:M (2:1)	667 μL	333 μL	0,667	0,5777	0,2163	0,3614
L:M (3:1)	750 μL	250 μL	0,750	0,4530	0,1574	0,2956
L:M (4:1)	800 μL	200 μL	0,800	0,3791	0,1628	0,2163
L:M (9:1)	900 μL	100 μL	0,900	0,1893	0,0769	0,1124
Metal livre	0	1000 μL	0	0	-0,0146	0

A Figura 3 ilustra o diagrama de Job's para o complexo Co-Br-TDB. A absorvância corrigida obteve valor máximo em 0,4618, o qual corresponde a $X_L = 0,667$. Se esse valor de fração molar do ligante livre for usado no cálculo utilizando a equação $X_L = n/(n+1)$, encontrará uma quantidade de números de moles (n) igual a 2. O resultado obtido é concordante com a estequiometria típica dos complexos do tipo ML_2 , ou seja, a relação estequiométrica 1:2 metal:ligante.²²

3.4. Cinética da reação

Os espectros na região do visível obtidos e o gráfico da cinética da reação em 620 nm são mostrados na Figura 4a e na Figura 4b, respectivamente. Os espectros evidenciam que a complexação entre o reagente Br-TDB e o íon Co(II) ocorre por completo a partir de 10 minutos.

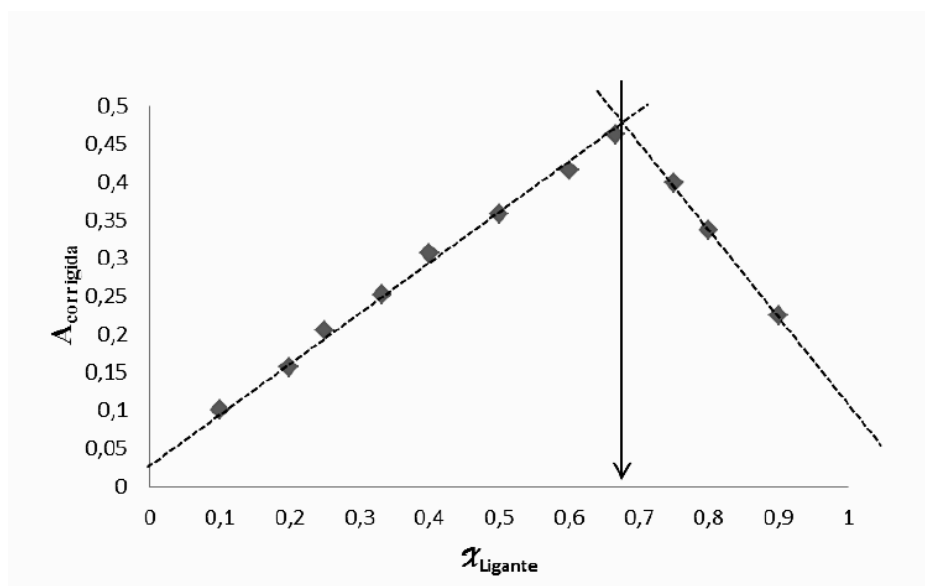


Figura 3. Determinação da estequiometria do complexo formado entre o reagente Br-TDB e Co(II)

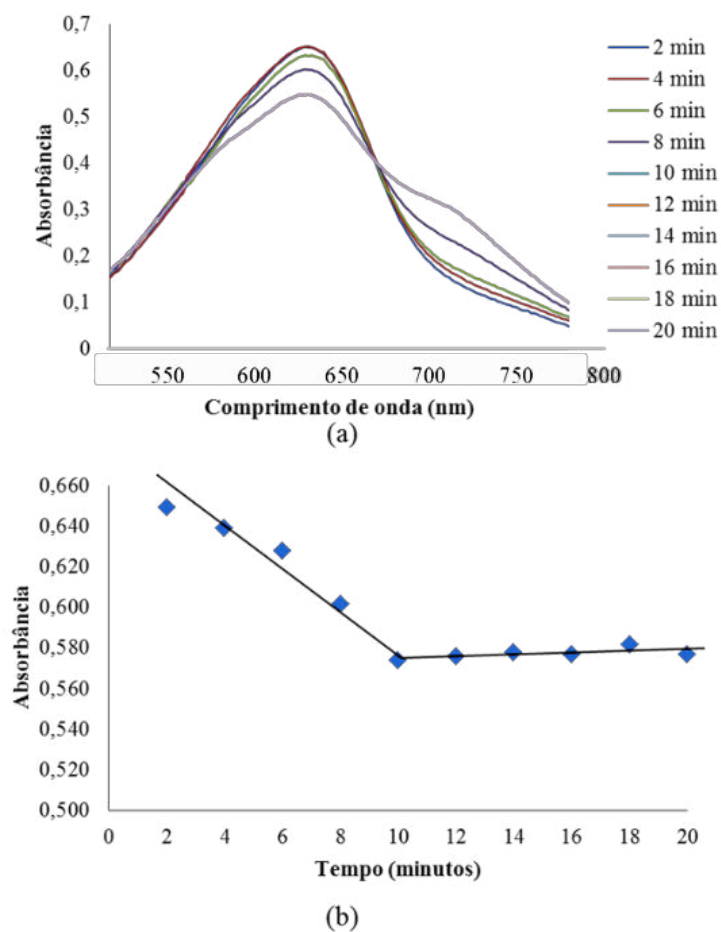


Figura 4. Cinética da reação. Em (a) espectros de absorção na região do visível do complexo Br-TDB-Co(II) nos intervalos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 minutos. Em (b) gráfico da absorbância do complexo em 620 nm

3.5. Linearidade e curva de calibração

A linearidade corresponde à capacidade de o método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da espécie de interesse dentro de uma determinada variação.³⁰ Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA³¹ recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO³² um valor acima de 0,90.

A curva padrão para o método foi construída a partir das seis concentrações

variando de 0,1-2 mg L⁻¹. A equação da reta obtida através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ($y = -0,0997x + 0,6106$, $R^2 = 0,9987$) indicaram a existência de relação entre as áreas obtidas e a concentração dos íons metálicos analisados, ou seja, existe evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.³³

A validade estatística dos valores experimentais obtidos para a curva padrão foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), cujo resultado é apresentado na Tabela 3. Observa-se que o valor de $F_{\text{calculado}}$ é menor que F_{tabelado} e o complexo entre Co e Br-TDB é estável.

Tabela 3. Análise da variância (ANOVA) das absorbâncias obtidas para a determinação de Co(II)

Fonte de variação	gl	SQ	MQ	F	P - Valor	F de significação
Regressão	1	0,143094	0,028619	0,000619*	0,999999	2,75871
Resíduo	29	0,000077	3,19x 10 ⁻⁰⁶			
Total	30	0,1431				

* Significativo para $p < 0,05$

Em alguns casos em análise química, a absorbância é inversamente proporcional a mudanças na concentração do analito.³⁴ Alguns trabalhos na determinação de flúor pelo método SPADNS apresenta o mesmo padrão de perda de absorvidade com o aumento da concentração do analito.³⁵⁻³⁶

O padrão da curva de calibração possuir coeficiente angular negativo é encontrado, também, em algumas análises químicas tais como na quantificação de α -polilisina,³⁷ que apresenta excelente correlação entre a absorbância e a concentração da amostra em análise. Nesta metodologia o corante carregado negativamente interage com um policatiônico formando o complexo α -PDL conduzindo a uma precipitação quantitativa e levando a diminuição na intensidade da cor azul do sobrenadante da solução.³⁸

3.6. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada com certo grau de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental.³⁹ O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser quantificado com certo grau de confiabilidade, utilizando uma marcha analítica específica.³⁸ O LQ e LD é definido como três e dez vezes, respectivamente, o desvio padrão do valor do sinal analítico correspondente ao branco (SBr) dividido pelo coeficiente angular (b) da curva de calibração.

Para a determinação do limite de quantificação e detecção para a análise dos analitos em estudo, foram realizadas dez leituras do branco. O LD e LQ para a

determinação de íon Co(II) foi igual a 0,009 e 0,030 mg L⁻¹, respectivamente, e RSD de 0-1,2%.

3.7. Seletividade

O efeito dos íons metálicos estrangeiros (interferentes) como Na(I), K(I), Fe(II), Mn(II), Ni(II), Al(III), Cd(II), Cr(VI), Cr(III), P(V), Zn(II), Cu(II), S(II), Ca(II), Pb(II), V(IV) e V(V) foi avaliado. Os outros excipientes que compõem os medicamentos analisados não foram testados uma vez que durante o processo de mineralização das amostras, essas substâncias são degradadas e não interferem na determinação do analito em estudo. Soluções sintéticas contendo de 1 ppm do analito de interesse e várias quantidades de substâncias estranhas foram realizados em triplicata com variação da concentração do possível interferente de 0,1 a 5,0 mg L⁻¹ e a absorvidade foi observada no comprimento de onda de 620 nm. O limite de tolerância foi considerado como a concentração do íon externo provocando um erro abaixo de 5 % nos resultados da determinação dos estudado concentração de íons. As Figuras 5 (a e b) apresenta o resultado do estudo de seletividade. Os resultados apontam que, dentre os elementos testados para a determinação de íons cobalto por complexação, não há interferência significativa para a maioria. A exceção observada é para a presença de íons ferro, cobre, cádmio e manganês. O cobre é o metal que mais ocasiona interferência (0,2

mg L⁻¹) seguido pelo ferro e manganês (0,5 mg L⁻¹) e cádmio (2 mg L⁻¹).

Tais resultados demonstram que a reação de complexação entre cobalto e o reagente Br-TDB é pouco seletiva. Assim, o Br-TDB não pode ser utilizado na determinação de cobalto em polivitamínicos e poliminerais. No entanto, dependendo das condições adotadas para a reação, esse reagente pode ser utilizado para técnicas multielementares envolvendo esses íons metálicos, como no caso desse estudo, onde o pH de trabalho reduz o erro e a interferência espectral dos íons complexos.

Reagentes derivados do tiazolilazo, como o Br-TACl mostraram o mesmo aspecto quanto à seletividade frente a íons cobalto em determinação por extração em ponto nuvem e determinação por FAAS.⁴⁰

3.8. Avaliação da temperatura

O comportamento espectral da solução contendo a mistura de Br-TDB-Co(II) (5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹) foi observado em diferentes temperaturas. A solução foi lida nas temperaturas de 5 a 55°C, com intervalos de 5°C entre as medidas. Os resultados são apresentados na tabela 4. Observa-se que a temperatura do sistema não ocasiona erros entre 20 e 55 °C, porém em valores acima, podem ocorrer e em temperaturas mais baixas, ocorre precipitação do complexo, diminuindo a absorbância e perdendo a natureza da amostra.

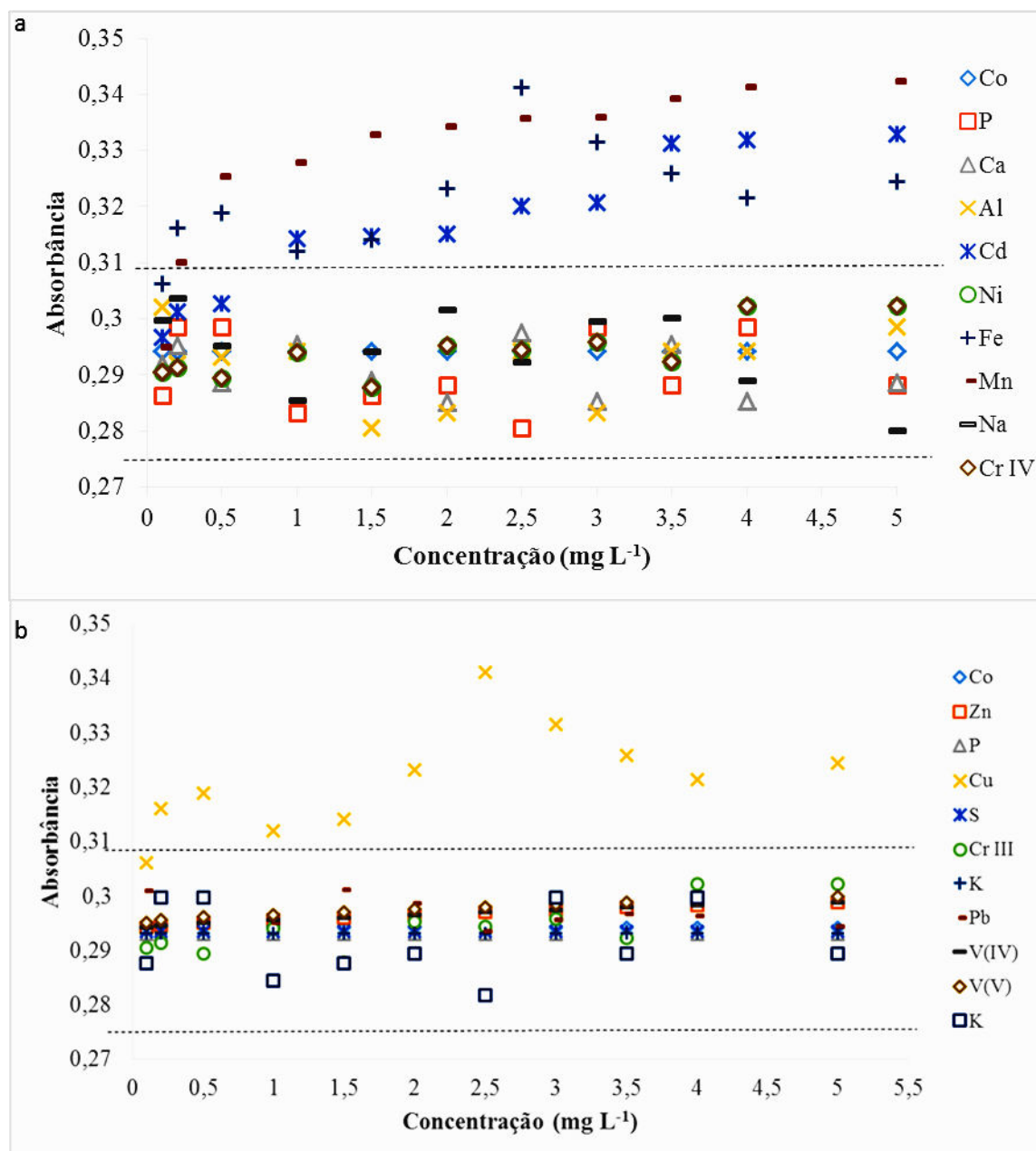


Figura 5. Estudo dos interferentes na determinação de íons Co(II) por complexação com o reagente Br-TDB. Em (a) na presença dos íons Na(I), Fe(II), Mn(II), Ni(II), Al(III), Cd(II), Cr(VI), P(V), Ca(II), e (b) K(I), Cr(III), Zn(II), Cu(II), S(II), Pb(II), V(IV) e V(V). As linhas pontilhadas representam a variação de $\pm 5\%$.

Tabela 4. Resultados obtidos na determinação da mistura Br-TDB ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e Co(II) ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) em diferentes temperaturas

Valor Real	Valor Obtido	Erro Relativo %	Temperatura (°C)
$1,0 \text{ mg L}^{-1}$	$1,097 \text{ mg L}^{-1}$	-9,7%	5
$1,0 \text{ mg L}^{-1}$	$1,096 \text{ mg L}^{-1}$	-9,6%	10
$1,0 \text{ mg L}^{-1}$	$1,040 \text{ mg L}^{-1}$	-4,0%	15
$1,0 \text{ mg L}^{-1}$	$1,037 \text{ mg L}^{-1}$	-3,7%	20
$1,0 \text{ mg L}^{-1}$	$1,003 \text{ mg L}^{-1}$	-0,3%	25
$1,0 \text{ mg L}^{-1}$	$1,010 \text{ mg L}^{-1}$	-1,0%	30
$1,0 \text{ mg L}^{-1}$	$1,009 \text{ mg L}^{-1}$	-0,9%	35
$1,0 \text{ mg L}^{-1}$	$0,999 \text{ mg L}^{-1}$	0,1%	40
$1,0 \text{ mg L}^{-1}$	$0,998 \text{ mg L}^{-1}$	0,2%	45
$1,0 \text{ mg L}^{-1}$	$0,987 \text{ mg L}^{-1}$	1,3%	50
$1,0 \text{ mg L}^{-1}$	$0,973 \text{ mg L}^{-1}$	2,7%	55

3.9. Validação da metodologia

A validação da metodologia foi realizada através da análise de íons cobalto por espectro espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado através da leitura direta das amostras após digestão. Para a curva de calibração foi obtida a seguinte equação $y = 1,1579x + 0,006$, $R^2 = 0,9988$ com linearidade entre 0 e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ($N = 6$). Os valores obtidos são apresentados na Tabela 5.

3.10. Análise de amostras reais

O sistema desenvolvido foi aplicado para determinação de Co(II) em amostras de medicamentos. Os resultados (Tabela 5) mostraram que este método não é afetado por efeitos de matriz e pode ser aplicado satisfatoriamente para análise de medicamentos.

Tabela 5. Concentração de cobalto (mg g^{-1}) determinada em várias amostras de medicamentos utilizando o reagente Br-TDB e por ICP OES. Os valores referem-se ao teor de cobalamina encontrado pela correlação do teor de cobalto e comparação com os valores rotulados em preparações farmacêuticas

Amostra	Valor Declarado	Br-TDB	ICP OES	Erro Relativo %
A	6,3751	$6,3870 \pm 0,0008$	$6,3757 \pm 0,0001$	-0,18
B	5,5053	$5,5152 \pm 0,0007$	$5,5048 \pm 0,0004$	-0,19
C	23,8345	$23,9346 \pm 0,0012$	$23,7015 \pm 0,0021$	-0,98
D	0,9715	$0,9720 \pm 0,0005$	$0,9723 \pm 0,0008$	0,03

* (A) Metilcobalamina; (B) Cianocobalamina; (C) Hidroxicobalamina; (D) desoxiadenosilcobalamina

3.11. Avaliação da metodologia desenvolvida

A determinação de íons metálicos por espectrofotometria UV-Vis é uma técnica que depende da formação do complexo para quantificar o analito de interesse. Essa técnica foi utilizada com o intuito de monitorar a formação de espécies complexadas segundo o pH. De modo geral, observou-se que na medida em que o pH da solução foi aumentado, as regiões de absorções por transferência de carga que são as regiões de interesse, diminuíram a intensidade de absorção, demonstrando que os elétrons responsáveis por essas transições não se encontram disponíveis. Além disso, foi possível perceber algumas diferenças nos espectros obtidos do material complexado em relação ao não complexado, o que comprova a complexação dos metais como reagente Br-TDB. Os resultados obtidos corroboram com os valores declarados pelos fabricantes de medicamentos.

O Teste *t* de Student foi aplicado para estabelecer a comparação entre o método proposto presumindo variâncias equivalentes. Em ambos os casos, a correlação entre a metodologia proposta foi elevada (0,999). O resultado do Teste *t* de Student demonstrou não haver diferença significativa entre a metodologia proposta para determinação de Co(II) por espectrofotometria UV-Vis utilizando o reagente Br-TDB quanto por ICP OES para um nível de confiança $p < 0,05$.

4. Conclusão

O reagente Br-TDB, além de ser solúvel em água, mostrou-se eficiente na determinação de íons Co(II) por complexometria, permitindo compreender a razão estequiométrica da reação. Comparando os resultados para determinação de cobalto em preparações farmacêuticas e em outras matrizes,⁴¹⁻⁴⁸ observa-se que embora o limite de detecção

da metodologia proposta seja mais elevado, a determinação de cobalto nas formulações farmacêuticas estudadas apresentou resultado satisfatório e livre de interferentes. Além disso, as amostras apresentaram a quantidade do analito declarado pelo fabricante estando de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA.

Agradecimentos

À CAPES, UESB e FAPESB pela bolsa e financiamento da pesquisa.

Referências Bibliográficas

- ¹ Mallah, S. H.; Mohammed, H. J. Spectrophotometric determination of micro amount of Cobalt (II) by using (antipyriylazo 1-nitroso-2-naphthol) as the new reagent in raw milk. *International Journal of Engineering & Technology* **2014**, *14*, 102. [Link]
- ² Neal, W. M.; Ahmann, C. F. Cobalt as an essential element in animal nutrition. *Science* **1937**, *86*, 225. [CrossRef]
- ³ Barrios, M. F.; Hernández, I. G.; Gómez, H. G. G. Vitamina B₁₂: metabolismo y aspectos clínicos de su deficiencia. *Revista Cubana de Hematología e Inmunología y Hemoterapia* **1999**, *15*, 159. [Link]
- ⁴ Belitz, H. D.; Grosch, W.; *Food Chemistry*, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 1987.
- ⁵ Gillham, B.; Papachristodoulou, D. K.; Thomas, J. H.; *Wills: biochemical basis of medicine*, 3a. ed., Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltd, 1997.
- ⁶ Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Princípios de bioquímica de Lehninger*, 5a. ed., Artmed: Porto Alegre, 2011.
- ⁷ Fairbanks, V. F.; Klee, G. G.; *Aspectos bioquímicos da hematologia*. In: Burtis, C. A.; Ashwood, E. R. Tietz: fundamentos de química clínica, 4a. ed., Guanabara Koogan S. A.: Rio de Janeiro, 1998.
- ⁸ Lorenzi, T. F.; *Manual de hematologia: propedêutica e clínica*, 4a. ed., Guanabara Koogan S. A.: Rio de Janeiro, 1992.

- ⁹ Kennedy, D. G.; Young, P. B.; Kennedy, S.; Scott, J. M.; Molloy, A. M.; Weir, D. G.; Price, J. Cobalt - vitamin B₁₂ deficiency and the activity of methylmalonyl CoA mutase and methionine synthase in cattle. *International Journal for Vitamin & Nutrition Research* **1995**, *65*, 241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁰ Barrios, M. F.; Hernández, I. G.; Gómez, H. G. D. Vitamina B₁₂: metabolismo y aspectos clínicos de su deficiencia. *Revista Cubana de Hematología e Inmunología y Hemoterapia* **1999**, *15*, 159. [[Link](#)]
- ¹¹ Herrmann, W.; Schorr, H.; Purschwitz, K.; Rassoul, F.; Richter, V. Total homocysteine, vitamin B(12), and total antioxidant status in vegetarians. *Clinical Chemistry* **2001**, *47*, 1094. [[PubMed](#)]
- ¹² Obeid, R.; Kuhlmann, M.; Kirsch, C. M.; Herrmann, W. Cellular uptake of vitamin B₁₂ in patients with chronic renal failure. *Nephron Clinical Practice* **2005**, *99*, 42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹³ Underwood, E. J.; *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, 4a. ed., Academic Press: New York, 1977.
- ¹⁴ Vandercasteele, C.; Block, C. B.; *Modern methods for trace elements determination*, John Wiley & Sons: New York, 1993.
- ¹⁵ Caprioli, R.; Torcini, S. Determination of copper, nickel, zinc, cobalt and manganese in seawater by chelation ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **1993**, *640*, 365. [[CrossRef](#)]
- ¹⁶ Garcia-Vargas, M.; Hernandez-Artiga, M. P.; Perez-Bustamante, J. A. Liquid-liquid extraction with 2-acetylpyridinebenzoylhydrazone in the determination of traces of copper, nickel, cobalt and zinc by atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **1984**, *157*, 363. [[CrossRef](#)]
- ¹⁷ Jones, M.; Kirkbright, G. F.; Ranson, L.; West, T. S. The simultaneous determination of traces of cobalt, chromium, copper, iron, manganese and zinc by atomic fluorescence spectrometry with preconcentration by an automated solvent extraction procedure. *Analytica Chimica Acta* **1973**, *63*, 210. [[CrossRef](#)]
- ¹⁸ Rao, K. S.; Balaji, T.; Rao, T. P.; Babu, Y.; Naidu, G. R. K. Determination of iron, cobalt, nickel, manganese, zinc, copper, cadmium and lead in human hair by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy* **2003**, *57*, 1333. [[CrossRef](#)]
- ¹⁹ Kumar, S. S.; Chouhan, R. S.; Thakur, M. S. Trends in analysis of vitamin B₁₂. *Analytical Biochemistry* **2010**, *398*, 139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁰ Dantas Filho, H. A.; Souza, E. S. O. N.; Visani, V.; Barrosa, S. R. R. C.; Saldanha, T. C. B.; Araújo, M. C. U.; Galvão, R. K. H. Simultaneous spectrometric determination of Cu²⁺, Mn²⁺ and Zn²⁺ in polivitaminic/polimineral drug using SPA and GA algorithms for variable selection. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2005**, *16*, 58. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Leggett, D. J.; McBryde, W. A. E. General computer program for the computation of stability constants from absorbance data. *Analytica Chimica Acta* **1975**, *47*, 1065. [[CrossRef](#)]
- ²² Harris, D. C.; *Quantitative Chemical Analysis*, 8a. ed., W. H. Freeman, 2010.
- ²³ Krug, J. F.; *Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre o preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*, 1a. ed., Luiz de Queiroz: Piracicaba, 2010.
- ²⁴ Sommer, L.; Ivanov, V. M. Spectrophotometric study of the reaction of the uranyl ion with 4-(2-thiazolylazo) resorcinol. *Talanta* **1967**, *14*, 171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁵ Kojima, I. Compleximetric determination of nickel with copper(II)-EDTA-TAR as indicator. *Analytica Chimica Acta* **1971**, *57*, 460. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Hnilicková, M.; Sommer, L. Spectrophotometric determination of thallium with 4-(2-pyridylazo) resorcinol and 4-(2-thiazolylazo) resorcinol. *Talanta* **1969**, *16*, 83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁷ Shriver, D. F.; Atkins, P. W.; *Inorganic chemistry*, 3a. ed., Oxford University Press.: New York, 1999.

- ²⁸ Shraydeh, B. F.; Abu, Z. A. Z.; Hannoun, M. A. Spectrophotometric determination of trace amounts of cobalt and copper with 3-(2-thiazolylazo)-2,6-diaminopyridine. *Spectroscopy Letters* **1992**, *25*, 1049. [CrossRef]
- ²⁹ Vosburgh, W. C.; Cooper, G. R. The identification of complex ions in solution by spectrophotometric measurements. *Journal of the American Chemical Society* **1941**, *63*, 437. [CrossRef]
- ³⁰ Green, J. M. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 305. [CrossRef]
- ³¹ ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. Regulamento que estabelece guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília: Diário Oficial da União, 02 de fevereiro de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03.htm>. Acesso em: 5 março 2013.
- ³² Instituto Nacional de Metrologia. Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos; DOQ-CGCRE-008, Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/cgcre/doq/doq-cgcre-8_03.pdf>. Acesso em: 5 março 2013.
- ³³ Shabir, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. *Journal of Chromatography A* **2003**, *987*, 57. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁴ Marczenko, Z.; Balcerzak, M.; *Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis, Series: Analytical Spectroscopy Library Book 10*, 1a. ed., Elsevier Science, 2000.
- ³⁵ Motter, J.; Moyses, S. T.; França, B. H. S.; Carvalho, M. L.; Moisés, S. J. Análise da concentração de flúor na água em Curitiba, Brasil: comparação entre técnicas. *Revista Panamericana de Saúde Pública* **2011**, *29*, 120. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁶ *Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22a. ed., 2013.
- ³⁷ Grotzky, A.; Manaka, Y.; Fornera, S.; Willeke, M.; Walde, P. Quantification of α -polylysine: a comparison of four UV/Vis spectrophotometric methods. *Analytical Methods* **2010**, *2*, 1448. [CrossRef]
- ³⁸ FAO. Validation of analytical methods for food control. A report of a joint FAO / IAEA Expert Consultant. Rome, FAO, 1998.
- ³⁹ Shen, W.; Yang, D.; Ryser, H. J. P. Colorimetric determination of microgram quantities of polylysine by trypan blue precipitation. *Analytical Biochemistry* **1984**, *2*, 521. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁰ Yamaki, R. T.; Nunes, L. S.; Oliveira, H. R.; Araújo, A. S.; Bezerra, M. A.; Lemos, V. A. Synthesis and application of a new thiazolylazo reagent for cloud point extraction and determination of cobalt in pharmaceutical preparations. *Journal of AOAC International* **2011**, *94*, 1304. [PubMed]
- ⁴¹ Krishna, D. G.; Devi, K. Determination of Iron (II) and Iron (III) in presence of micellar medium using *ortho*-hydroxybenzamide by spectrophotometry. *International Journal of Inorganic and Bioinorganic Chemistry* **2013**, *3*, 5. [Link]
- ⁴² Krishna, D. K.; Devanna, N.; Chandrasekhar, K. B. A comparative study of cobalt (II) using 4-hydroxy 3, 5 dimethoxy benzaldehyde 4-hydroxy benzoyl hydrazone and cinnamaldehyde 4-hydroxy benzoylhydrazone in presence of micellar medium by spectrophotometry. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **2011**, *2*, 341. [Link]
- ⁴³ Modawe, N. M.; Eltayeb, M. A. Z. H-Point Standard Addition Method for Simultaneous Spectrophotometric Determination of Cobalt(II) and Nickel(II). *Advances in Analytical Chemistry* **2013**, *3*, 1. [CrossRef]
- ⁴⁴ Nassir, A. N. Spectrophotometric Determination of Cobalt (II) Using 4-(6-Nitro-2-benzothiazolylazo) resorcinol. *National Journal of Chemistry* **2007**, *26*, 263. [Link]
- ⁴⁵ Rohilla, R.; Gupta, U. Simultaneous determination of Cobalt (II) and Nickel (II) by first order derivative spectrophotometry in micellar media, *E-Journal of Chemistry* **2012**, *9*, 1357. [CrossRef]
- ⁴⁶ Shar, G. A.; Soomro, G. A. Spectrophotometric determination of cobalt(II) as complexes with bromopyrogallol red in micellar media of tween 80. *Journal of*

Chemical Society of Pakistan, **2006**, 28, 444.

[[Link](#)]

⁴⁷ Ahmed, M. J.; Hossan, K. J. A rapid spectrophotometric method for the determination of cobalt in industrial, environmental, biological, pharmaceutical and soil samples using bis(5-bromosalicylaldehyde)orthophenylenediamin

e. *Journal of the Iranian Chemical Society* **2008**, 5, 677. [[Link](#)]

⁴⁸ Ahmed, M. J.; Roy, U. K. A simple spectrophotometric method for the determination of iron (II) aqueous solutions. *Turkey Journal of Chemistry* **2009**, 33,709. [[Link](#)]