

UM NOVO MÉTODO SIMPLES E RÁPIDO PARA DETERMINAÇÃO DE COBALTO EM AMOSTRAS DE VITAMINA B12 E ÁGUA USANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA E ANÁLISE DE IMAGEM

Andréia Cruz de Sousa², Luana Bastos Santos³, Jeferson Alves Barreto ⁴, Valfredo Azevedo Lemos⁵

RESUMO:

Neste trabalho, um método simples e rápido para a determinação de cobalto em amostras de vitamina B12 e água foi desenvolvido. O procedimento é baseado na pré-concentração, do elemento usando microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e subsequente detecção por colorimetria digital de imagem. DLLME foi realizado com tricloroetileno (solvente de extração) e etanol (solvente dispersivo). O elemento foi extraído na forma de seu complexo com 2-(2-tiazolilazo)-p-cresol. As condições ótimas de trabalho foram obtidas por meio de otimização uni variada. As variáveis estudadas foram pH, volume de solvente de extração e volume de solvente dispersivo. Em condições ótimas, o método apresentou um limite de detecção de $0,9 \mu\text{g L}^{-1}$ e precisão (desvio padrão relativo) de 4,0%, para soluções de cobalto de $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$. O procedimento foi aplicado à determinação de cobalto em amostras de vitamina B12 e água. O método apresenta um procedimento simples, rápido e de baixo custo, apresentando-se como uma excelente alternativa para a determinação de cobalto nas amostras analisadas.

PALAVRAS-CHAVE: Cobalto, imagem digital, DLLME, água, vitamina B12.

A NEW SIMPLE AND FAST METHOD FOR DETERMINATION OF COBALT IN VITAMIN B12 AND WATER SAMPLES USING DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION AND DIGITAL IMAGE ANALYSIS

ABSTRACT

In this work, a simple and fast method for the determination of cobalt in vitamin B12 and water samples was developed. The procedure is based on the preconcentration of the element using dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and subsequent detection by digital image colorimetry. DLLME was performed with trichloroethylene (extraction solvent) and ethanol (dispersive solvent). The element was extracted in the form of its complex with 2-(2-thiazolylazo)-p-cresol. The optimal working conditions were obtained through univariate optimization. The variables studied were pH, the volume of extraction solvent, and the volume of dispersive solvent. Underoptimal conditions, the method presented a limit of detection of $0.9 \mu\text{g L}^{-1}$ and precision (relative standard deviation) of 4.0%, for $25.0 \mu\text{g L}^{-1}$ cobalt solutions. The procedure was applied to the determination of cobalt in vitamin B12 and water samples. The method presents a

1. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia

2. Bolsista de Iniciação Científica, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Laboratório de Química Analítica, Campus de Jequié, 45206-190, Jequié Bahia.

3. Coorientadora, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Laboratório de Química Analítica, Campus de Jequié, 45206-190, Jequié Bahia.

4. Coorientador, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Laboratório de Química Analítica, Campus de Jequié, 45206-190, Jequié Bahia.

5. Orientador, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Laboratório de Química Analítica, Campus de Jequié, 45206-190, Jequié Bahia. E-mail: vlemos@uesb.edu.br

simple, fast, and low-cost procedure, presenting itself as an excellent alternative to the determination of cobalt in the samples analyzed.

KEYWORDS: Cobalt, digital image, DLLME, water, vitamin B12

INTRODUÇÃO

O cobalto tem sido usado em todo o mundo para vários fins, incluindo a fabricação de ligas metálicas, vidro e pigmentos; a produção de aço; e o tratamento radioterápico de tumores cancerígenos do isótopo radioativo ^{60}Co . Em seres vivos, o cobalto está presente em algumas enzimas e na estrutura química da vitamina B12 (cianocobalamina) (Simonsen, Harbak and Bennekou 2012). A deficiência de cobalto no corpo humano pode causar anemia perniciosa e hipofunção da tireoide com risco aumentado de anormalidades do desenvolvimento (Bhattacharya, Misra and Hussain). A contaminação por exposição em altas concentrações causa efeitos adversos que podem afetar o trato respiratório superior, a árvore brônquica ou o parênquima pulmonar. Assim, devido à importância nutricional e toxicológica do cobalto, é essencial quantificar este elemento em diversas matrizes, como alimentos, fluidos biológicos e águas naturais.

Procedimentos de pré-concentração têm sido amplamente utilizados em métodos para quantificação de elementos traços. Esses métodos empregam principalmente técnicas baseadas em extração em fase sólida (SPE) (Camel 2003), coprecipitação (Soylak, Kaya and Tuzen 2007), extração em ponto de turvação (CPE) (Bahar and Babamiri 2015) e microextração em fase líquida (LPME) (Barreto, de Assis et al. 2019). Várias técnicas derivadas de LPME têm sido usadas em procedimentos de pré-concentração, como microextração de gota única (SDME), microextração de gota orgânica flutuante solidificada (SFODME), microextração de agregação induzida por frio (CIAME), microextração supramolecular baseada em solvente (Ss-ME) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (Aydin et al. 2015; Eisapour et al. 2012; Findikoğlu et al. 2018; Sousa et al. 2020).

O DLLME é baseado na diferença de polaridade e solubilidade entre solventes que formam um sistema ternário. Este sistema consiste em um solvente imiscível em água (solvente de extração), um solvente miscível em água (solvente dispersivo) e a solução aquosa contendo o analito (Bahar and Babamiri 2015, Beikzadeh and Sarrafi 2017) (Bahar e Babamiri 2015; Barreto et al. 2019; Beikzadeh e Sarrafi 2017; Chaiyamate et al. 2018). As principais vantagens do DLLME são simplicidade, uso reduzido de solventes orgânicos, baixo custo, velocidade e altos fatores de recuperação e enriquecimento (Chaiyamate, Seebunrueng and Srijaranai 2018)

A colorimetria digital de imagens ganhou destaque nos últimos anos, permitindo o desenvolvimento de metodologias analíticas rápidas, precisas e de baixo custo. Ferramentas computacionais como scanner, câmera digital, smartphone, computador, tablet e webcam têm sido associadas a softwares que permitem o tratamento e a manipulação de dados. A imagem é o resultado da combinação de um número finito de pontos, definidos como pixels, compostos por uma matriz de X linhas e Y colunas. A posição e a cor de cada ponto dessa matriz estão associadas a cada pixel. Uma imagem pode ser classificada basicamente como binária, em tons de cinza, RGB e indexada. Essa classificação depende de como a informação é organizada numericamente na matriz de formação de pixels (Capitan-Vallvey, Lopez-Ruiz et al. 2015, Fındıkoğlu, Firat et al. 2018)

O modelo RGB (vermelho, verde e azul) é representado por um sistema de coordenadas cartesianas composto por três cores primárias em três eixos perpendiculares, três cores secundárias (ciano, magenta e amarelo) e três eixos distintos (Capitan-Vallvey et al. 2015). O preto está localizado na origem do plano e o branco no lado oposto ao preto. O cubo RGB em 3D comumente representa essa ideia. Por convenção, a imagem colorida consiste em três canais de cores primárias, tendo entre 0 e 255 pixels de valores unitários, que variam de acordo com o matiz (Mahato and Chandra 2019). Este sistema tricromático pode representar todo o espectro eletromagnético na região visível (Li, Zhang et al. 2016).

Neste trabalho, uma nova metodologia analítica baseada em DLLME foi desenvolvida para a determinação de Co (II) por colorimetria de imagem digital direta. O procedimento foi aplicado à determinação rápida e direta de cobalto em amostras de vitamina B12 e água.

MATERIAIS E MÉTODOS

O instrumento utilizado para obtenção das imagens foi o microscópio multifuncional portátil Supereyes (Shenzhen, China), modelo B007, conectado a uma caixa branca iluminada com luz branca de uma lâmpada LED (7 W). Um smartphone foi utilizado para conectar a microcâmera via porta USB, possibilitando a recepção das informações. Uma centrífuga SP Labor (modelo SP-32 T, Presidente Prudente, Brasil) foi utilizada em uma das etapas do procedimento DLLME. A técnica utilizada para comparação dos resultados foi a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), utilizando um equipamento Perkin Elmer (Norwalk, EUA), modelo AAnalyst 200.

A pré-concentração foi realizada seguindo os princípios do DLLME. Em um tubo de ensaio, 5,0mL de uma solução contendo tampão de cobalto e borato pH 8,0 foram

adicionados. Em seguida, com o auxílio de uma seringa de vidro, uma mistura contendo 30 μL de solução de TAC a $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol}^{-2} \text{ L}^{-1}$, 50 μL de tricloroetileno e 600 μL de etanol foram injetados na solução aquosa. O sistema tornou-se turvo imediatamente e foi então submetido à centrifugação por 5 min. O sobrenadante foi descartado e a fase rica foi fotografada diretamente no tubo de ensaio. O aparelho é mostrado na Figura 1. As imagens foram obtidas diretamente no tubo de ensaio sem a necessidade de remover a fase enriquecida, tornando o procedimento bastante rápido. Os dados foram registrados como sinais de pixel usando o canal vermelho do modelo RGB e processados usando o software Chemostat.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH controla a interação entre o analito e o reagente complexante, que é aumentada em uma faixa de pH específica. Conseqüentemente, essa variável influencia diretamente na quantidade do componente extraído. A Figura 2 mostra os resultados de experimentos realizados variando o pH de 5,0 a 11,0. De acordo com os resultados, o pH para uma melhor extração é bem definido, pois, em meio levemente alcalino, o TAC reage com os íons Co (II), que são facilmente oxidados a Co (III) pelo oxigênio dissolvido presente em soluções aquosas. Os resultados do estudo do volume do solvente de extração. Neste estudo, o volume de tricloroetileno foi variado entre 30 e 70 μL . Observa-se que as maiores absorvâncias foram registradas quando uma quantidade de 50 μL foi utilizada. O volume do solvente de extração para os outros estudos foi fixado em 50 μL . Volumes menores do solvente de extração não são suficientes para extrair adequadamente o complexo em solução. Quando quantidades de tricloroetileno maiores que 50 μL são utilizadas, há uma diluição significativa do composto colorido no solvente, o que diminui a intensidade da cor e, conseqüentemente, o sinal medido.

Neste estudo, o volume de etanol foi variado entre 200 e 1000 μL . As maiores absorvâncias foram observadas quando uma quantidade de 600 μL de solvente dispersivo foi utilizada. Quantidades de etanol inferiores a 600 μL não são suficientes para dispersar adequadamente o tricloroetileno, prejudicando a extração. Por outro lado, quantidades maiores de solvente dispersor aumentam a solubilidade do complexo e do solvente de extração na solução aquosa, o que diminui a quantidade de cobalto extraído. A Figura 1 mostra os resultados de experimentos realizados na otimização.

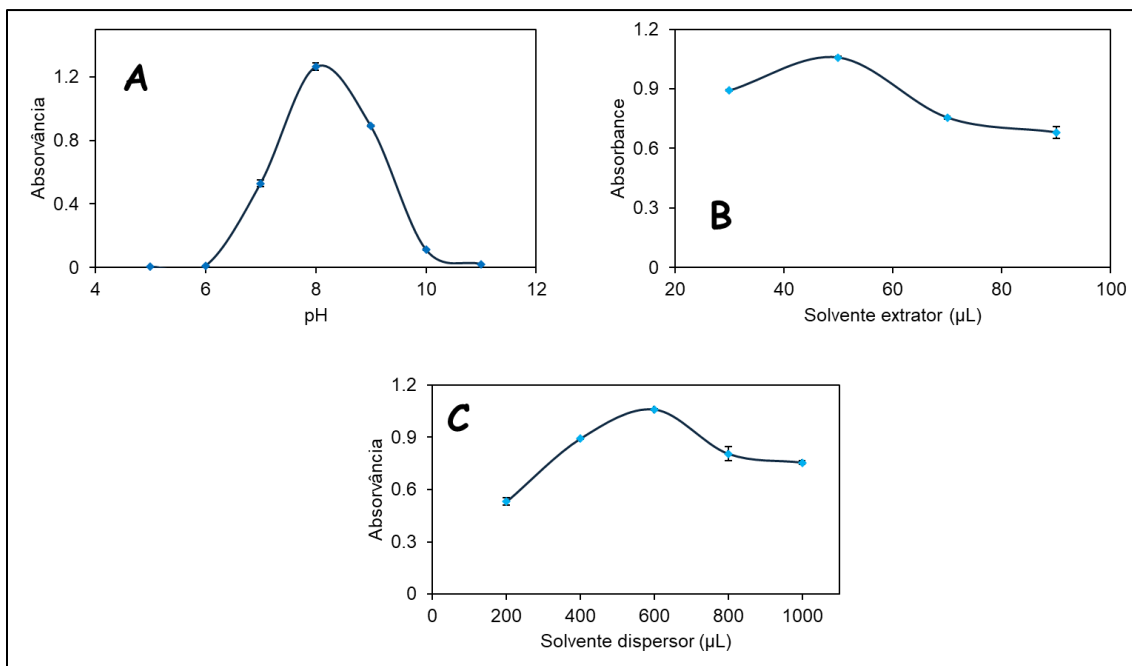


Figura 1. Efeito das variáveis no sistema de pré-concentração do Co (II). **A:** pH; **B:** solvente extrator; **C:** solvente dispersor.

O limite de detecção (LD) foi calculado usando a expressão $LOD = 3,3\delta / s$, onde δ é o desvio padrão de dez medições do branco analítico, e s é a inclinação da curva analítica. Da mesma forma, o limite de quantificação foi calculado utilizando a expressão $LOQ = 10\delta / s$. Assim, o LOD e o LOQ obtidos foram $0,9$ e $2,7 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A precisão do método, calculada em termos de desvio padrão relativo (DPR), foi de $4,0\%$, correspondendo a $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de soluções de cobalto.

Amostras de vitamina B12 e água foram as matrizes utilizadas para aplicação do método. Os resultados são apresentados na Tabela 1. Os valores de recuperação para as amostras variaram entre 94 e 111% . O teor de cobalto nos comprimidos de vitamina B12 foi determinado utilizando o método proposto e FAAS, para comparação. Os valores expressos na Tabela 1 indicam que existe uma boa correlação entre os resultados obtidos pelos dois métodos.

Amostra	Quantidade de cobalto		Recuperação (%)
	Adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
Água do rio 1	0	< LOQ	111
	20	$22,2 \pm 0,3$	
Água do rio 2	0	< LOQ	94
	20	$18,7 \pm 0,2$	
Água do rio 3	0	< LOQ	98
	20	$19,6 \pm 0,1$	
	Método proposto (mg g^{-1})	FAAS (mg g^{-1})	Erro (%)
Vitamina B12	228 ± 12	218 ± 10	+ 4,6

Tabela 1. Determinação de cobalto em amostras de água e vitamina B12 pelo método proposto.

CONCLUSÕES

Um novo método rápido e direto para a determinação de cobalto em amostras de vitamina B12 e água foi desenvolvido. O método foi baseado em DLLME e subsequente medição de cobalto por colorimetria de imagem digital. A obtenção da imagem diretamente dentro do tubo de ensaio elimina a necessidade de transferência da fase sedimentada, o que promoveu uma redução significativa no tempo total de análise. Além disso, a exclusão da etapa de transferência suprimiu o risco de perdas do analito, favorecendo maior precisão das medidas. Versatilidade, simplicidade, rapidez, eficiência e baixo custo também podem ser mencionados como vantagens apresentadas pelo método. O método proposto segue os princípios da química verde, pois utiliza poucas quantidades de solventes e amostras e produz pouco resíduo. A combinação de DLLME e detecção de imagem digital provou ser uma alternativa excelente e promissora para a determinação de elementos em níveis de traços. Nessa perspectiva, novas pesquisas podem ser desenvolvidas para aprimorar e expandir ainda mais o uso de imagens digitais como ferramenta analítica para determinações em diversas matrizes após procedimentos de microextração. O uso de acessórios, como microcâmeras ou microscópios, pode permitir o uso de imagens digitais em sistemas de microextração, como alternativa às técnicas convencionais de detecção.

REFERENCIAS

Bahar, S. and B. Babamiri (2015). "Preconcentration and determination of low amounts of cobalt in black tea, paprika and marjoram using dispersive liquid-liquid microextraction and flame atomic absorption spectrometry." Journal of the Iranian Chemical Society **12**(1): 51-56.

Barreto, J. A., et al. (2019). "A novel strategy based on in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of nickel in chocolate samples." Talanta **193**: 23-28.

Beikzadeh, E. and A. H. Sarrafi (2017). "Determination of trace levels of cobalt ion in different real samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by flame atomic absorption spectrometry." Journal of Food Measurement and Characterization **11**(3): 994-1002.

Bhattacharya, P. T., et al. (2016). "Nutritional aspects of essential trace elements in oral health and disease: an extensive review." Scientifica **2016**: 1-12.

Camel, V. (2003). "Solid phase extraction of trace elements." Spectrochimica Acta. Part B, Atomic Spectroscopy **58**(7): 1177-1233.

Capitan-Vallvey, L. F., et al. (2015). "Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review." *Analytica Chimica Acta* **899**: 23-56.

Chaiyamate, P., et al. (2018). "Vortex-assisted low density solvent and surfactant based dispersive liquid-liquid microextraction for sensitive spectrophotometric determination of cobalt." *RSC Advances* **8**(13): 7243-7251.

Findıkođlu, M. S., et al. (2018). "Determination of Cadmium in Tap, Sea and Waste Water Samples by Vortex-Assisted Dispersive Liquid-Liquid-Solidified Floating Organic Drop Microextraction and Slotted Quartz Tube FAAS After Complexation with a Imidazole Based Ligand." *Water, Air, & Soil Pollution* **229**(2): 37.

Li, W., et al. (2016). "Digital image colorimetry coupled with a multichannel membrane filtration-enrichment technique to detect low concentration dyes." *Analytical Methods* **8**(14): 2887-2894.

Mahato, K. and P. Chandra (2019). "based miniaturized immunosensor for naked eye ALP detection based on digital image colorimetry integrated with smartphone." *Biosensors and Bioelectronics* **128**: 9-16.

Simonsen, L. O., et al. (2012). "Cobalt metabolism and toxicology—a brief update." *Science of the Total Environment* **432**: 210-215.

Soylak, M., et al. (2007). "Copper (II)-8-hydroxquinoline coprecipitation system for preconcentration and separation of cobalt (II) and manganese (II) in real samples." *Journal of hazardous materials* **147**(3): 832-837.