



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Instituto de Química

Curso de Química Tecnológica

Cromatografia em papel com detecção por imagens digitais para a determinação de íons metálicos

Elisa Mayra Barbosa dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Brasília, Junho de 2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Instituto de Química

Curso de Química Tecnológica

Cromatografia em papel com detecção por imagens digitais para a determinação de íons metálicos

Elisa Mayra Barbosa dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Monografia apresentada ao Instituto de Química – IQ,
da Universidade de Brasília – UnB,
como requisito parcial ao programa de graduação em Química Tecnológica, para
obtenção do título
de Bacharel em Química Tecnológica.

Brasília, Junho de 2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Instituto de Química

Curso de Química Tecnológica

Monografia apresentada ao Instituto de Química – IQ, da Universidade de Brasília – UnB, como requisito parcial ao programa de graduação em Química Tecnológica para obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica.

**Cromatografia em papel com detecção por imagens digitais para a determinação
de íons metálicos**

Elisa Mayra Barbosa dos Santos

Professor orientador: Dr. Alexandre Fonseca

*“Na vida, não existe nada a
temer, mas a entender.”*

(Marie Curie)

Agradecimentos

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus, por me permitir vivenciar todos esses momentos e a minha família, por sempre me proporcionar a leveza necessária para todos os momentos difíceis que passei na UnB, em especial aos meus pais, que sempre aguentaram meu mal humor e estresse, minha irmã e também melhor amiga, e meus primos, principalmente a Flávia e a Ana Luísa, por serem mais que primas e, provavelmente já saberem meu trabalho de cóp. Além disso, agradecer enormemente ao meu namorado Leandro, por confiar tão plenamente em mim como profissional e por ser minha base em muitos momentos e a todos aqueles que me ajudaram cortando os papéis nos finais de semana, como meu primo João Pedro.

Gostaria também de agradecer ao meu time de vôlei, o qual me envolvi desde o início da graduação e tenho enorme paixão. Contribuíram enormemente para minha construção pessoal dentro da universidade. Em especial, as sereias, Luiza, Júlia e Letícia, por toda a amizade construída.

Não poderia faltar os amigos de graduação, os quais passaram pelos mesmos apertos e tranqüilidades e sempre deixaram meus anos de UnB momentos mais leves e alto astral, em especial as minhas queridas amigas Elyane, Kaline e ao nosso anjo Gabrielle, que estará sempre em nossos corações. Além disso, gostaria de agradecer enormemente ao meu amigo Eduardo, que me acompanhou no período destinado a química tecnológica e não posso nem explicar com palavras o quão foi gratificante.

Por fim, agradecer toda equipe do LIAMA, em especial, ao professor Alexandre, que não consigo imaginar um orientador melhor. Obrigada por toda paciência, toda confiança e por estar sempre presente, fazendo o máximo para que o projeto corresse da melhor forma possível.

Lista de abreviaturas

CP – Cromatografia em papel

R_f – Fator de retenção

R – Coeficiente de correlação linear

PAD – *Microfluidic paper-based analytical devices*

FAAS – Espectrometria de absorção em chama

RGB – (*red, green, blue*)

LED – Diodo emissor de luz

SD – Desvio padrão

Lista de figuras

- Figura 1.** Parte da estrutura de uma macromolécula de celulose.
- Figura 2.** Ilustração do cálculo do fator de retenção (Rf).
- Figura 3.** Padrão Bayer e a construção do sinal RGB.
- Figura 4.** [A] Visão geral e dimensões da caixa usada para ambiente de luz controlada. [B] Parte interna da tampa onde foram posicionados 168 LEDs de luz branca desligados (esquerda) e ligados (direita). [C] Fundo da caixa onde é posicionado o papel usado para obtenção das medidas.
- Figura 5.** Interface do programa utilizado na obtenção dos cromatogramas onde [1] indica a imagem do papel no ambiente de luz controlada [2] indica a região dos cromatogramas resultantes das leituras. [A] a [D] são os locais de configuração da posição e tamanho dos amostradores, largura, altura, coordenada x e coordenada y, respectivamente. As configurações da corrida estão representadas por [F] número de leituras.
- Figura 6.** Esquema de dimensões do papel cromatográfico utilizado.
- Figura 7.** Foto do recorte do papel ranhudo.
- Figura 8.** Suporte para aplicação das amostras onde [A] apresenta o local de aplicação e [B] o local indicado para o término da corrida [C] representa os suportes usados.
- Figura 9.** Papel em formato cilíndrico posicionado no béquer para a corrida.
- Figura 10.** Bico adaptado para nebulização da solução reveladora.
- Figura 11.** Exemplo do posicionamento do papel para análise de níquel.
- Figura 12.** Parte do papel utilizado na corrida cromatográfica contendo os íons Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} e Co^{+2} , além da mistura dos mesmos e bandas cromatográficas explicitadas em cada canal.
- Figura 13.** Papel de corrida cromatográfica com amostras de Ni^{+2} onde os seis canais iniciais apresentam padrões com concentrações crescentes e os quatro

canais restantes amostra do íon utilizada e o tracejado apresenta a posição final de corrida do eluente.

Figura 14. Cromatograma da corrida cromatográfica obtido com padrões de imagem para análise de Cu^{+2} .

Figura 15. Espectro de absorção Ni^{+2} .

Figura 16. Cromatograma da corrida cromatográfica obtido com padrões de imagem para análise de Ni^{+2} .

Figura 17. Curva analítica obtida para determinação de Cu^{+2} .

Figura 18. Curva analítica obtida para determinação de Ni^{+2} .

Figura 19. Imagem obtida pelo programa de análise para a determinação de Ni^{+2} em amostra.

Figura 20. Imagem obtida pelo programa de análise para a determinação de Cu^{+2} em amostra.

Lista de tabelas

Tabela 1. Parâmetros de imagem usados nas medidas de amostras de Ni^{+2} e Cu^{+2} .

Tabela 2. Resultados obtidos para análise de Ni^{+2} em amostras.

Tabela 3. Resultados obtidos para análise de Cu^{+2} em amostras.

Resumo

O presente trabalho descreve o desenvolvimento e a avaliação de um método baseado em imagens digitais para a quantificação de íons metálicos separados por cromatografia em papel. Empregando-se a estratégia de separação com papel ranhudo, eluição com solução mista de acetato de etila, acetona e ácido clorídrico (9:9:2 v/v) e revelação com solução nebulizada de ácido rubeânico, foi possível separar eficientemente os íons Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} , sendo avaliada a aplicação quantitativa para os íons Cu^{2+} e Ni^{2+} em ligas metálicas. Foram observados fatores de retenção (R_f) zero para o Ni^{2+} e 0,477 para o Cu^{2+} com precisões da ordem de 2,42 % em relação a este parâmetro, o que demonstrou uma boa eficiência de separação. Para a realização das medidas com imagens digitais, foram desenvolvidos um ambiente de luz controlada e um programa específico que permitisse a obtenção de cromatogramas baseados nas imagens adquiridas por uma *webcam*. As análises realizadas, considerando as alturas dos picos para a faixa de concentração de 200 a 1200 mg.L^{-1} , proporcionaram coeficientes de correlação linear (R) de 0,9964 e 0,9982 para Cu^{2+} e Ni^{2+} , respectivamente, com limites de detecção de 99,46 mg.L^{-1} para o íon cobre e de 70,79 mg.L^{-1} para o níquel. Os resultados obtidos para a quantificação dos elementos em três ligas metálicas foram comparados com os obtidos por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) sendo observados erros relativos menores que 5,30 % para o níquel e 8,18 % para o cobre e ausência de diferenças significativas ao nível de confiança de 95% para 5 das 6 análises realizadas. Considerando os resultados obtidos, o método proposto pode ser utilizado em análises quantitativas para a determinação de íons constituintes de ligas metálicas eliminando a subjetividade de determinações visuais e proporcionando uma análise simples e de baixo custo.

Palavras-chave: Cromatografia em papel, imagens digitais, cobre, níquel.

Abstract

The following research describes the development and evaluation of a method using digital image to quantify metallic ions separated by paper chromatography. The effective separation of Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} and Co^{2+} ions and the quantification of Cu^{2+} and Ni^{2+} in metallic alloys were possible by using the separation with slotted paper, elution with a mix solution of ethyl acetate, acetone and hydrochloric acid (9:9:2 v/v) and revelation with nebulised solution of rubeanic acid. The retention factor (R_f) value to Ni^{2+} was zero while to Cu^{2+} it was 0,477 with 2,42 % of precision, what means that the separation was efficient. In order to realise measures from digital images, was built a location of controlled illumination and a computer program that would allow the construction of chromatograms based on images obtained by a webcam. Considering peak heights to a range of concentration from 200 to 1200 mg.L^{-1} could be able to obtain a linear correlation coefficient (R) of 0,9964 and limit of detection (LOD) of 99,46 mg.L^{-1} to copper and R of 0,9982 and LOD of 70,79 mg.L^{-1} to nickel. Those results obtained to three different metallic alloys were compared with flame atomic absorption spectrometric (FAAS) analysis and the errors did not exceed values of 5,30 % considering nickel results and 8,18 % to copper besides the absence of significant differences at 95 % of confidence interval to 5 of 6 analysis. Considering the result, the proposed method could be used in the future to quantitative determinations of components in copper-nickel alloys for a simple and low cost procedure, eliminating the subjective of the visual method of determination.

Keywords: Paper chromatography, digital images, copper, nickel.

Sumário

1	– INTRODUÇÃO.....	1
	1.1 - Cromatografia em papel.....	1
	1.2 – Imagens digitais.....	4
2	– OBJETIVOS.....	7
	2.1 – Objetivos específicos.....	7
3	– METODOLOGIA.....	8
	3.1 – Construção de ambiente de luz controlada.....	8
	3.2 – Programa de análise.....	9
	3.3 – Papel cromatográfico empregado.....	12
	3.4 – Reagentes e soluções.....	14
	3.5 – Procedimentos para as corridas cromatográficas.....	15
	3.6 – Estudos preliminares.....	18
	3.7 – Determinação de Cu^{+2} e Ni^{+2} em ligas metálicas.....	18
4	– RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	20
	4.1 – Estudos dos diferentes íons.....	20
	4.2 - Determinação de Ni^{+2} e Cu^{+2} em ligas metálicas.....	21
	4.3 – Determinação dos íons de interesse em amostras.....	27
5	– CONCLUSÃO.....	30
6	– BIBLIOGRAFIA.....	31

1 – INTRODUÇÃO

1.1 Cromatografia em papel

Sendo uma técnica de separação muito bem estabelecida, com trabalhos apresentados anteriores a 1900, a cromatografia recebeu atenções e difundiu-se a partir de 1930, com estudos relacionados ao isolamento de pigmentos naturais (Weil e Williams, 1950). Em 1944, Consden *et al.*, buscando uma melhor separação de aminoácidos do que a obtida em sílica gel, testaram tal separação em celulose de papel de filtro, dando início ao método cromatográfico em papel conhecido atualmente. Sendo assim, com sua ampla possibilidade de aplicação e sendo uma maneira mais prática e acessível de realização do método de separação, tal adaptação mostrou-se como uma revolução na análise química, uma vez que apresenta baixo custo e não é necessário o uso de mão de obra especializada para a sua realização (Smith, 1969).

Seguindo o conceito apresentado por Collins em 2006, cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, sendo que uma das fases permanece estacionária e a outra se move através dela. Na cromatografia em papel, a fase móvel é composta por um líquido eluente e a estacionária apresenta-se como moléculas hidrofílicas retidas nos grupos hidroxila das moléculas de celulose presentes nas fibras do papel cromatográfico utilizado (Figura 1). Para que ocorra a separação, equilíbrios de partição ocorrem entre as duas fases e, as diferentes interações dos analitos com ambas as fases resultam em diferentes tempos de eluição, ou seja, diferentes componentes vão apresentar diferentes taxas de eluição relacionadas às diferentes interações apresentadas com a fase estacionária e/ou móvel (Braithewaite, 1996).

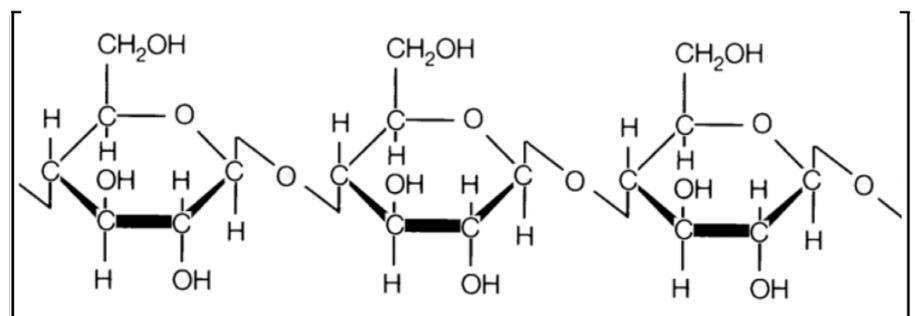


Figura 1 - Parte da estrutura de uma macromolécula de celulose.

Especificamente no caso da cromatografia em papel (CP), o papel cumpre a função de suporte para a celulose, que retém as molécula hidrofílicas (fase estacionária) que possuem grande afinidade com a componente aquosa da fase móvel e, em contrapartida, baixa afinidade com os componentes orgânicos da mesma. Os equilíbrios de partição ocorrem conforme o eluente (fase móvel) percorre as fibras do papel contendo a amostra por meio de capilaridade, uma vez que, ao ocorrer o encontro do eluente com a amostra, uma parte interage mais fortemente com a porção aquosa e celulose, enquanto outra interage de forma mais eficiente com a parte orgânica do eluente, sendo assim, parte do soluto deixa o papel e entra na fase orgânica. Quando o eluente atinge uma parte do papel que não contem amostra, o equilíbrio ocorre novamente, sendo assim, compostos com maiores interações com a fase orgânica percorrem maiores distâncias no papel (Block, 1955).

Após a separação efetivada pela corrida, são realizados processos de revelação para evidenciar a posição das bandas cromatográficas e a observação visual tornar-se possível. Entre outras formas de revelação, a química é a mais comum, que pode envolver tratamento prévio do papel com solução de fluoresceína possibilitando análise das bandas encontradas por meio da iluminação com radiação ultra violeta ou, no caso apresentado, a revelação envolve a borrifação de uma solução reveladora específica que pode ser escolhida pela descrição na literatura (Collins, 2006). Nesse caso específico, o uso de um revelador eficiente para íons

inorgânicos foi encontrado em alguns trabalhos (Vogel, 1981; Hashmi, 1965; Soyak, 2006).

Outro fator relevante para a análise realizada é a eficiência da corrida, para determinar se uma eluição foi correta e eficiente, deve-se contar com o valor retenção (R_f), o qual é representado pela função do quociente entre as distâncias percorridas pelo soluto e pela frente do solvente (Figura 2), ou seja, se $R_f = 1$, o componente elui junto com o eluente, se $R_f = 0$, o analito em questão não migra na fase estacionária (Braithwaite, 1996). Apesar de não ser uma propriedade física do soluto, o R_f pode ser utilizado para comparações, uma vez que torna-se bastante semelhante quando são empregadas as mesmas condições.

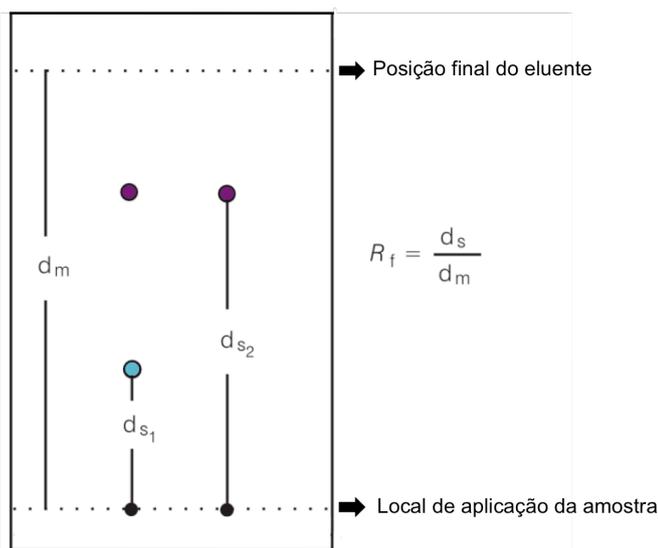


Figura 2 - Ilustração do cálculo do fator de retenção (R_f).

Muitos trabalhos indicam análises qualitativas relacionadas ao uso da cromatografia em papel (Consden, 1944; Dobbins, 1950; Burma, 1953), porém, a quantificação a partir das bandas coloridas obtidas sempre passou por processos mais laboriosos, uma desvantagem para o uso dessa técnica. Alguns métodos conhecidos são por meio do recorte da área do papel com a banda cromatográfica de interesse e

posterior lixiviação do composto por meio de lavagens específicas ou pesagem da área retirada e comparação com o logaritmo das concentrações, porém, a mais aplicada é a análise visual, na qual são feitas comparações visuais das bandas obtidas com bandas de uma curva previamente proposta, porém, tal método conta com a subjetividade de interpretações colorimétricas do analista, sendo pouco eficiente (Block, 1955).

1.2 Imagens digitais

Imagens digitais são compostas por funções matemáticas bidimensionais que se relacionam ao plano espacial. Sua primeira aplicação histórica ocorreu em 1920 na área de jornalismo quando pôde-se compartilhar uma imagem entre a Inglaterra e os Estados Unidos por meio de um cabo submarino (Gonzalez, 2002). Desde então, as aplicações foram aumentando e, nos últimos anos, suas aplicações em análises químicas tem sido amplamente estudadas (Byrne, 2000). Uma cena real é transformada em imagem digital por meio de uma forma numérica, para que seja realizada tal conversão, há a delimitação da área da imagem e sua divisão em pequenas partes da função bidimensional, cada uma dessas partes é chamada de *pixel* (van Espen, 1992), quanto mais *pixels* a imagem possui, maior é sua resolução.

A imagem digital carrega informações matemáticas que podem ser interpretadas por meio de computadores ou programas específicos, as informações relacionadas à cor são, majoritariamente, relacionadas ao Padrão Bayer, obtido por um pesquisador da Kodak, que utiliza de três filtros organizados com as cores vermelho, verde e azul (Figura 3) que, quando processados por um *software* geram um sinal red-green-blue (RGB), convertido em uma imagem visível (Stafford, 2008), tal combinação, considerando o armazenamento restrito, possui 256 níveis (0 a 255) no espectro visível e, permitem a aquisição de 16 milhões de cores (Gomes, 2008).

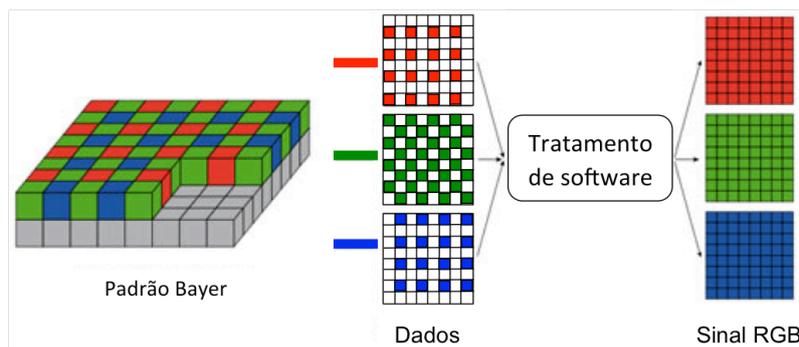


Figura 3 - Padrão Bayer e a construção do sinal RGB

As aplicações do uso de imagens digitais passaram a ser de amplo interesse uma vez que sua realização é simples e de baixo custo, entre as aplicações na química analítica, as colorimétricas são as que merecem destaque (Askim, 2013) sendo possíveis análises quantitativas simples por meio de aparatos muito difundidos atualmente, como *smartphones* (Salles, 2013), scanners (Gomes, 2008), câmeras digitais (Byrne, 2000) ou *webcams* (Gaiao, 2006).

Sendo um método não destrutivo e uma maneira prática e eficiente de análise colorimétrica, pode-se relacionar suas vantagens à aplicação de quantificação em cromatografia em papel, minimizando os erros subjetivos de interpretação do analista e ao gasto de reagentes para tratamento do papel.

É importante destacar que embora este tipo de detecção esteja sendo utilizado de forma plenamente eficiente para a determinação colorimétrica em dispositivos microfluídicos de papel, os chamados μ PAD (Martinez, 2007), há ainda poucos trabalhos aplicados à cromatografia em papel quantitativa. De fato, os poucos trabalhos presentes na literatura sobre o tema costumam empregar o escaneamento do papel revelado e ferramentas quimiométricas relativamente elaboradas para as aplicações quantitativas (Marcelo, 2016). Desse modo, o presente trabalho propõe o uso de uma estratégia mais simples de detecção em que imagens obtidas por uma webcam a partir de um programa de computador desenvolvido pelo grupo de

pesquisas possa ser aplicado com a mínima manipulação na determinação quantitativa de espécies químicas.

2 – OBJETIVOS

Avaliar o sistema de detecção baseado em imagens digitais para medidas quantitativas em cromatografia em papel para determinação de íons metálicos e aplicação em amostras de ligas metálicas.

2.1 – Objetivos específicos

- Desenvolver sistema para aquisição das imagens digitais com uma *webcam*.
- Estimar as figuras de mérito analítico para o método proposto.
- Otimizar as condições de separação e detecção para determinação de íons metálicos.
- Determinar a concentração de elementos metálicos em amostras de ligas através da estratégia proposta.

3 – METODOLOGIA

3.1 – Construção de ambiente de luz controlada

Para a realização do presente trabalho, foi necessária a construção de um ambiente de luz controlada e uniforme para minimizar as variações nas análises. Tal sistema foi constituído por uma caixa de madeira com tampa abaulada medindo 26,5 cm de comprimento, 17,4 cm de largura e 17,0 cm de altura considerando a parte mais alta da tampa, como pode ser visto na Figura 4. No interior da tampa, foram fixadas fitas de LED branco, totalizando 168 emissores que posteriormente foram recobertos por um anteparo branco fosco, utilizado para proporcionar um maior espalhamento da radiação. No centro da tampa foi feito um furo de diâmetro 1,7 cm para posicionamento da *webcam* de alta definição (Logitech c270) e fixadores de elástico foram posicionados para evitar sua movimentação.

Os papéis cromatográficos utilizados, após a revelação, foram posicionados ao fundo da caixa sobre um fundo branco, feito com papel A4. Para melhor aquisição dos sinais analíticos, procurou-se posicionar o papel cromatográfico de modo que todas as bandas cromatográficas pudessem ser observadas com nitidez. A distância entre a *webcam* e o papel era de 17 cm.

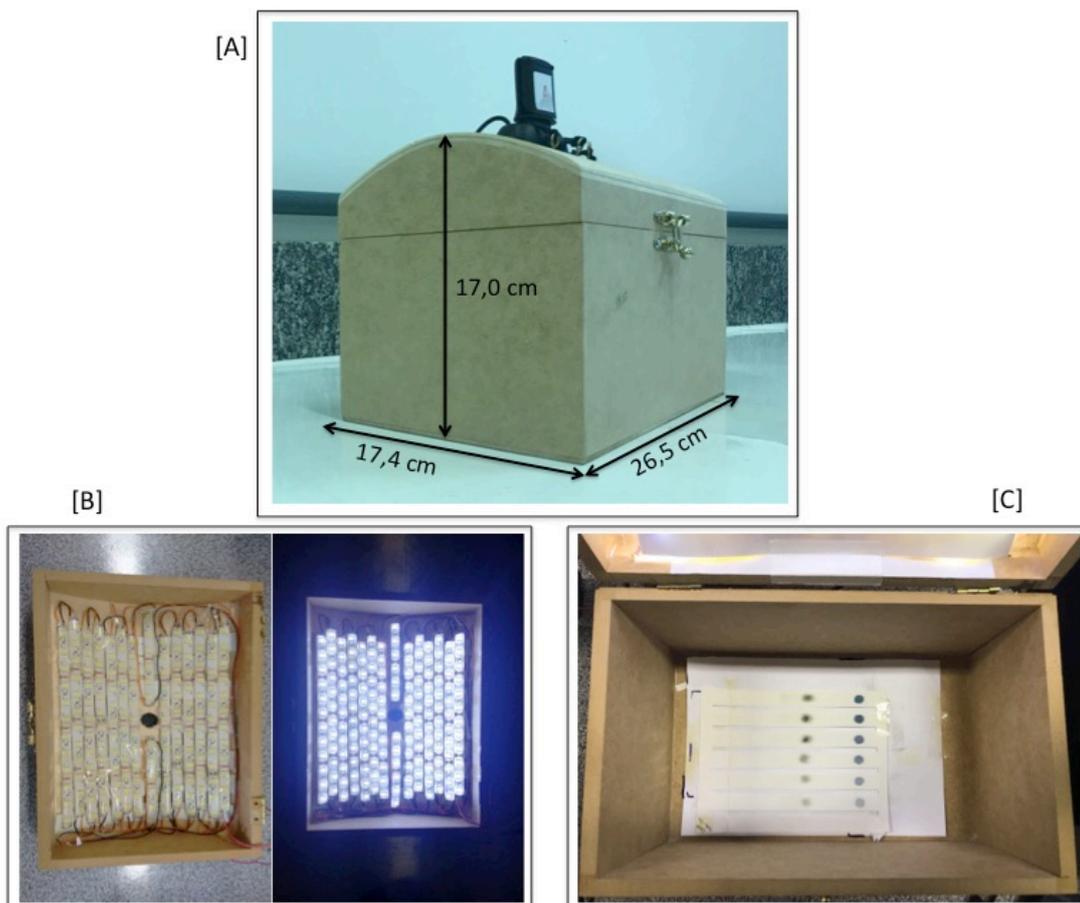


Figura 4 - [A] Visão geral e dimensões da caixa usada para ambiente de luz controlada. [B] Parte interna da tampa onde foram posicionados 168 LEDs de luz branca desligados (esquerda) e ligados (direita). [C] Fundo da caixa onde é posicionado o papel usado para obtenção das medidas.

3.2 – Programa de análise

Para a realização das medidas foi desenvolvido um programa que permite a análise de imagens digitais obtidas pela webcam em tempo real baseadas no sistema de medidas RGB. Tal programa foi escrito em *VisualStudio* 2013 e utiliza seis amostradores retangulares (Figura 5) que definem as áreas específicas do papel em que os sinais RGB serão obtidos. Dessa forma, o usuário visualiza a imagem de todo o papel na janela superior esquerda do programa e posiciona os amostradores de forma alinhada aos canais em que foram desenvolvidas as corridas cromatográficas.

Deve-se ressaltar ainda que o usuário pode ajustar as dimensões dos amostradores, delimitando o número de pixels a serem avaliados.

Após esses ajustes, os amostradores são deslocados automaticamente, pixel a pixel, da região direita para a esquerda da imagem sendo obtidos os valores de RGB médio para os pixels contidos no amostrador a cada deslocamento. A distância total percorrida pelos amostradores na imagem é definida pelo chamado número de leituras (Figura 5) e os cromatogramas obtidos para cada canal e para cada componente de cor (RGB) são apresentados na janela superior direita do programa (Figura 5).

Para o seguinte trabalho, foram usados valores de 5 pixels para largura do amostrador e 34 pixels para altura além de 250 leituras para permitir a obtenção dos cromatogramas completos. As coordenadas x e y eram configuradas conforme a necessidade.

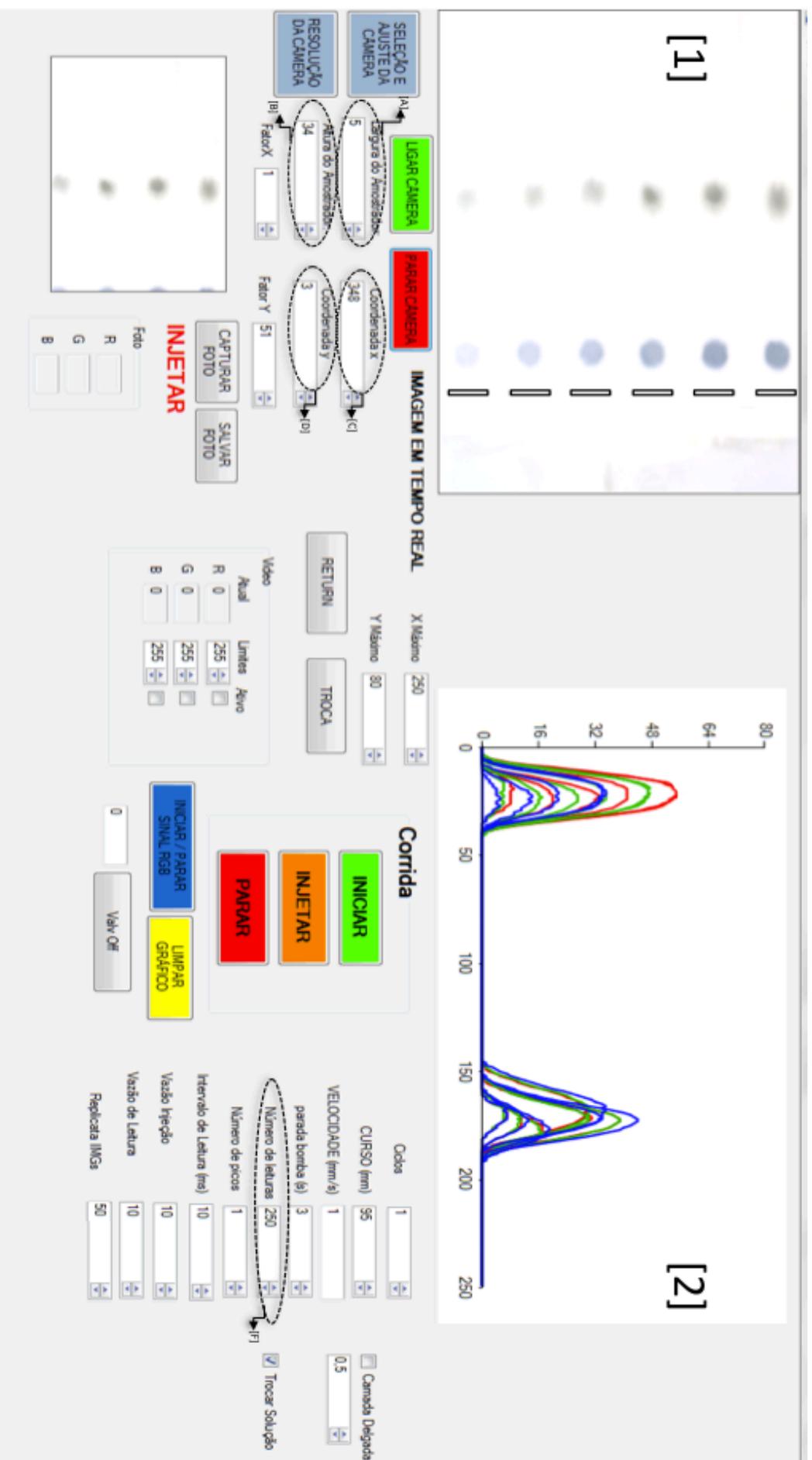


Figura 5 - Interface do programa utilizado na obtenção dos cromatogramas onde [1] indica a imagem do papel no ambiente de luz controlada [2] indica a região dos cromatogramas resultantes das leituras. [A] a [D] são os locais de configuração da posição e tamanho dos amostradores, largura, altura, coordenada x e coordenada y, respectivamente. As configurações da corrida estão representadas por [F] numero de leituras.

Para as realizações das medidas de cada metal estudado, foi definido um padrão de configuração de imagem que resultasse em um melhor resultado analítico, tais mudanças são realizadas ajustando-se as configurações destacadas na Tabela 1 no próprio programa desenvolvido.

Tabela 1 - Parâmetros de imagem usados nas medidas de amostras de Ni⁺² e Cu⁺².

	Ni ⁺²	Cu ⁺²
Exposição	57,1 %	57,1 %
Ganho	17,2 %	21,9 %
Brilho	50,4 %	16,8 %
Contraste	18,8 %	65,6 %
Intensidade de cor	12,5 %	0,0 %
Equilíbrio de branco	34,0 %	40,0 %

3.3 – Papel cromatográfico empregado

O papel da marca Whatman e modelo CHR1 foi empregado para tal pesquisa. Inicialmente, cortou-se a folha de papel cromatográfico em tamanhos A4 observando-se a direção de manufatura do papel indicada pelo fabricante, a qual permite manter a uniformidade das fibras para todos os papéis cromatográficos utilizados. Sobre esses papéis foram impressas demarcações que auxiliaram no corte de regiões específicas para a obtenção do chamado papel ranhudo para cromatografia (Vogel, 1981).

Os moldes impressos foram recortados com auxílio de estiletes de modo que obtivéssemos 10 canais independentes com 1,0 cm de largura, onde cada uma das soluções das amostras/padrões eram aplicadas. As dimensões do papel são mostradas na Figura 6. Deve-se destacar que as regiões escuras indicadas na figura são retiradas durante o corte caracterizando a independência dos canais. A imagem de um papel devidamente recortado é mostrada na Figura 7.

A aplicação da amostra é feita a aproximadamente 1,5 cm da base do papel, na entrada de cada canal, possibilitando corridas independentes para cada um dos canais.

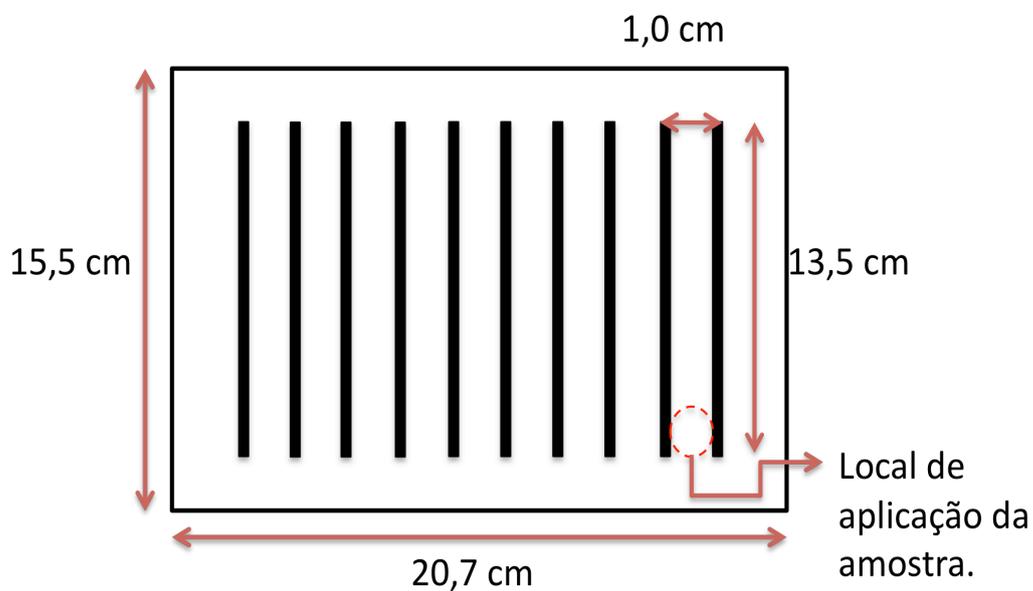


Figura 6 – Esquema de dimensões do papel cromatográfico utilizado.

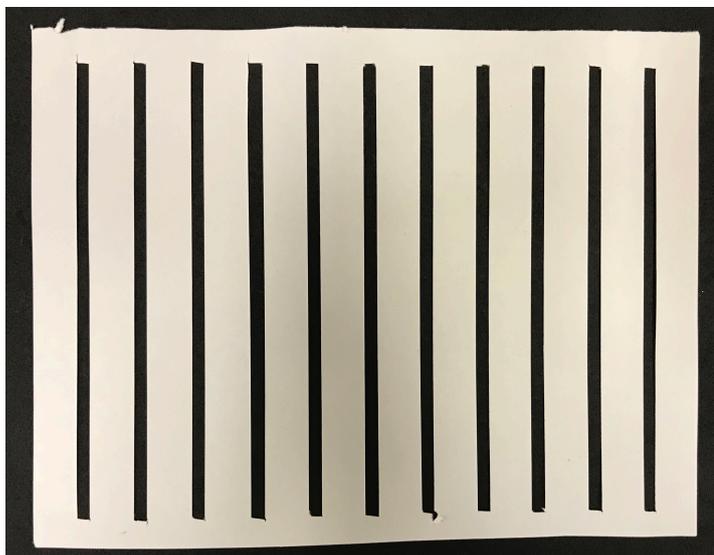


Figura 7 - Foto do recorte do papel ranhudo.

3.4 – Reagente e soluções

A maioria das soluções utilizadas no trabalho foi preparada em água destilada. Quando outro solvente foi utilizado há a indicação no texto.

3.4.1 – Soluções dos íons metálicos

Foram preparadas soluções estoques dos íons metálicos Cu^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} e Co^{+2} na concentração de 2000 mg.L^{-1} a partir da dissolução das massas adequadas dos sais $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Vetec, 98%), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haën, 97%), $\text{Zn}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Isopar, 99%) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Vetec, 98%).

Para testes iniciais, uma solução padrão contendo os quatro íons metálicos na concentração de 250 mg.L^{-1} cada foi preparada pela dissolução da solução estoque em água.

Para a determinação de íons Ni^{+2} e Cu^{+2} foi preparada uma solução estoque contendo ambos os íons na concentração de 2000 mg.L^{-1} cada a partir da dissolução da massa adequada dos sais $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Vetec, 98%), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haën, 97%).

As soluções padrões para a construção das curvas analíticas utilizadas na cromatografia de papel foram preparados com a diluição da solução estoque para obter concentrações de 200 mg.L^{-1} a 1200 mg.L^{-1} , com intervalos de 200 mg.L^{-1} entre cada padrão.

3.4.2 – Solução eluente

Para a preparação da solução eluente foram adotados os procedimentos de separação propostos por Vogel, em 1981. Tal solução foi composta por acetato de etila, acetona e ácido clorídrico (6 mol/L) na proporção em volume de 9:9:2 respectivamente, totalizando os 20 mL usados nas corridas.

3.4.3 – Solução reveladora

Uma solução de ditioniamida (ácido rubeânico) na concentração de 0,1% m/v foi preparada pela dissolução da massa apropriada da substância (Carlo Erba, 90%) em etanol.

3.4.4 – Preparo da amostra

Como amostras foram usadas três moedas dos anos 1970 compostas por liga cupro-níquel. Tais moedas foram partidas em 3 frações de aproximadamente 220 mg e cada fração foi dissolvida em solução de HNO₃ concentrada e aquecida. Quantidades de HCl foram também adicionadas para auxiliar a dissolução. Posteriormente, as soluções foram avolumadas para 50,00 mL com água. Para as corridas cromatográficas, foram realizadas as diluições necessárias das soluções das amostras de forma que as concentrações dos íons atendessem a faixa de concentração estabelecida nas curvas analíticas.

3.4.5 – Preparação dos padrões usados na espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS)

Para as análises comparativas realizadas em FAAS foram preparados padrões mais diluídos de Cu⁺² (1 mg.L⁻¹ a 5 mg.L⁻¹) e Ni⁺² (2 mg.L⁻¹ a 10 mg.L⁻¹) separadamente. Para as amostras, foram utilizadas diluições suficientes para adequação nas curvas analíticas.

3.5 – Procedimentos para as corridas cromatográficas

Para a aplicação das soluções das amostras/padrões no papel observou-se a necessidade de não apoiar a região de aplicação sobre uma superfície, uma vez que isso poderia ocasionar na perda de solução que eventualmente atravessasse o papel. Nesse sentido, utilizou-se a estratégia ilustrada na Figura 8, em que a porção do papel que recebe a amostra é suspensa entre dois suportes de madeira evitando o contato dessa região com a superfície de apoio. Dessa forma, nos estudos realizados, 1,5 µL

das soluções eram aplicadas na região indicada na Figura 8 com o auxílio de uma micropipeta.

Após a aplicação, o papel era seco com o auxílio de um secador de cabelos e as extremidades eram unidas de maneira que o mesmo obtivesse um formato cilíndrico (Figura 9) e, então, posicionado em um béquer, de altura suficiente para cobrir todo papel, cujo o fundo continha a solução eluente já descrita. Com o início da corrida, o béquer era tampado com uma placa de vidro e aguardava-se a frente do solvente atingir aproximadamente 1 cm do final do papel.

Terminada a corrida, o cilindro de papel era seco ao ambiente e então posicionado em um béquer contendo pequena quantidade de solução concentrada de amônia a fim de neutralizar resquícios de ácido do papel. É importante citar que o papel não entrava em contato com a solução de amônia, apenas com seu vapor.

Por fim, ao retirar do vapor de amônia, o cilindro de papel cromatográfico era aberto e fixado em um suporte para que fosse pulverizado com a solução reveladora de ácido rubeânico e as bandas cromatográficas fossem explicitadas. Para isso, foi utilizado um nebulizador hospitalar com um bico adaptado (Figura 10) para a geração de um aerossol do revelador, tornando o processo mais eficiente e evitando grandes gastos de volume para tal processo.

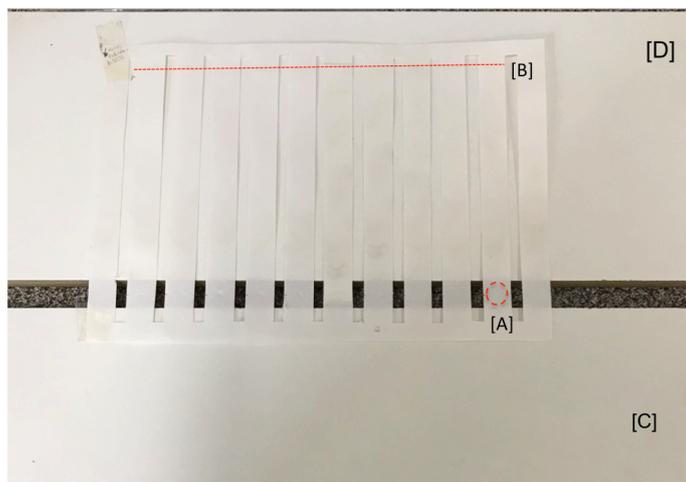


Figura 8 - Suporte para aplicação das amostras onde [A] apresenta o local de aplicação e [B] o local indicado para o término da corrida [C] e [D] representam os suportes usados.

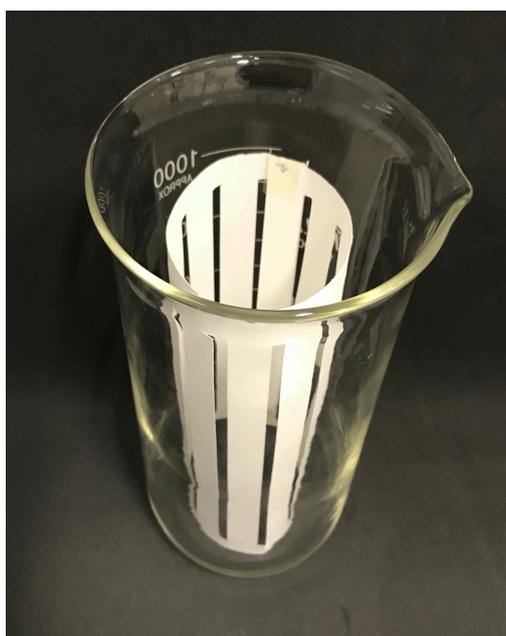


Figura 9 - Papel em formato cilíndrico posicionado no béquer para a corrida.



Figura 10 – Bico adaptado para nebulização da solução reveladora.

3.6 – Estudos preliminares

Inicialmente foi avaliada a eficiência de separação e de revelação das bandas cromatográficas a partir do procedimento descrito por Vogel (1981). Dessa forma, procurou-se realizar a separação dos metais Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} e Co^{+2} em uma mistura contendo aproximadamente 250 mg.L^{-1} de cada elemento. Para fins de comparação, foram aplicados também soluções dos íons individuais em canais separados.

3.7 – Determinação de Cu^{+2} e Ni^{+2} em ligas metálicas

Seguindo os procedimentos descritos na seção 3.5, foram realizadas corridas cromatográficas para a determinação dos íons Cu^{+2} e Ni^{+2} nas ligas metálicas de interesse. Para isso, foram utilizados os seis padrões de 200 mg.L^{-1} a 1200 mg.L^{-1} em diferentes canais e, nos quatro canais restantes, foram adicionadas as soluções de

amostra, cuja diluição foi realizada de maneira a adequar as concentrações na curva analítica produzida em cromatografia de papel.

Após os procedimentos, as análises foram realizadas com o auxílio do programa em *VisualStudio* e nele foram adquiridos os cromatogramas que possibilitaram, por meio da altura dos picos, a obtenção das curvas analíticas, além dos sinais para cada amostra.

Para a realização das medidas, foi necessário dividir o papel em duas partes, sendo uma constituída de seis canais correspondentes aos padrões e a outra com os outros quatro canais contendo as bandas das amostras. Para evitar erros, os papéis foram posicionados estrategicamente um sobre o outro de modo que as dez bandas de interesse ficassem aparentes e a leitura dos dez canais fosse realizada em uma única medida, como apresentado na Figura 11.



Figura 11 – Exemplo do posicionamento do papel para análise de níquel.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Estudos dos diferentes íons

As soluções contendo os íons bivalentes previamente citadas na seção 3.6 foram analisadas pelo método proposto em cromatografia de papel, onde, após a adequação do tamanho do papel para a corrida, obteve-se o resultado ilustrado na Figura 12.

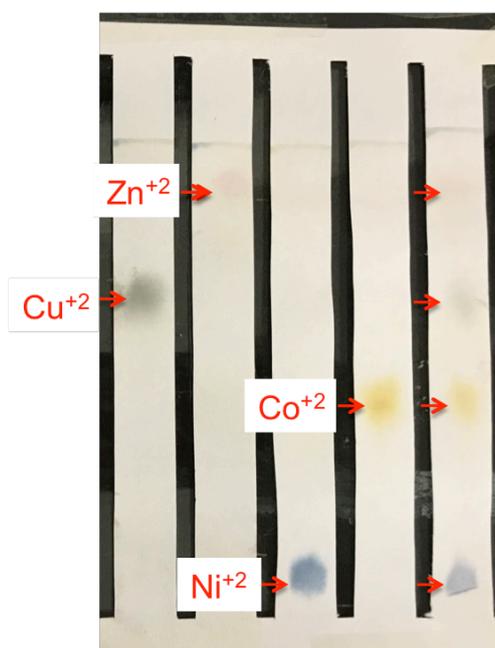


Figura 12 – Parte do papel utilizado na corrida cromatográfica contendo os íons Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} e Co^{+2} , além da mistura dos mesmos e bandas cromatográficas explicitadas em cada canal.

Observa-se que nas condições empregadas houve a separação dos íons propostos presentes na mistura, o que pode ser confirmado pelas corridas individuais. Na Figura 12, as setas indicam cada banda relacionada a um íon específico, sendo bem diferenciado por suas cores. A coloração cinza-esverdeada da primeira banda explicitada é característica do cobre, assim como a rosa, a azul e a amarela são específicas para zinco, níquel e cobalto, respectivamente. Outro aspecto relevante é a aparição das bandas em colorações mais claras no canal destinado à mistura, sendo

essa resultante da menor concentração de íons em solução, sendo assim, a quantificação torna-se viável.

É importante ressaltar que não é possível revelar o íon de Zn^{+2} com o mesmo revelador usado em outros casos. Para esse caso específico, utiliza-se uma solução diluída de 1,5-difeniltiocarbazona (ditizona) em clorofórmio. Porém, tal revelação não possui duração tão prolongada quanto a realizada em outros metais pelo uso de ácido rubeânico, o que pode ser explicado pela pouca estabilidade da solução dado pela oxidação a um composto não reativo ou ao deslocamento do equilíbrio tautomérico ceto-enol para a forma enólica, que produz o ditizonato de zinco que não apresenta a detecção desejável (Fischer, 1934).

Uma vez que os estudos quantitativos para zinco são dificultados devido a instabilidade do produto revelado e não foram encontradas amostras com quantidades apreciáveis de cobalto quando em ligas contendo, também, níquel e cobre, optou-se por escolher ligas de cupro-níquel para a realização das análises.

4.2 – Determinação de Ni^{+2} e Cu^{+2} em ligas metálicas

Na Figura 12 é apresentada a imagem do papel cromatográfico revelado após a separação das misturas padrão de Cu^{+2} e Ni^{+2} e também para as soluções das amostras. Observa-se que as bandas referentes a cada íon apresentaram fatores de retenção visualmente reprodutíveis e eficientes, além do escurecimento gradual das bandas cromatográficas com o aumento da concentração dos padrões. Os quatro últimos canais apresentam diluições das soluções de amostra que, no caso da Figura 13, foi diluída para a determinação de Ni^{+2} .

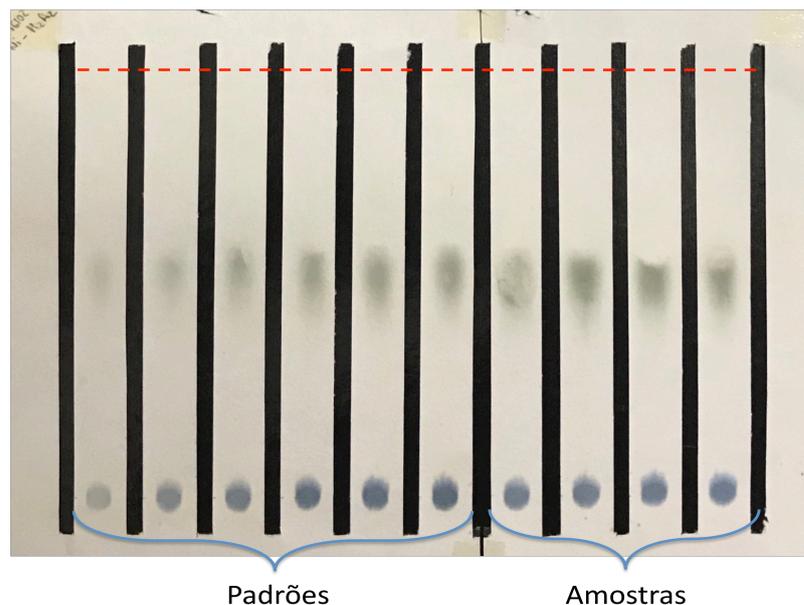


Figura 13 - Papel de corrida cromatográfica com amostras de Ni^{+2} onde os seis canais iniciais apresentam padrões com concentrações crescentes e os quatro canais restantes amostra do íon utilizada e o tracejado apresenta a posição final de corrida do eluente.

Tendo obtido a separação dos dois íons e observado visualmente a variação de intensidade de cores para as diferentes concentrações, procurou-se estabelecer as melhores condições de imagem para a obtenção de sinais RGB que pudessem ser relacionados com as concentrações dos íons. Como pode ser observado na Figura 13 as bandas referentes ao íon Cu^{+2} apresentaram uma coloração cinza-esverdeada, o que acarretou em uma resposta insatisfatória ao se utilizar uma imagem colorida para a aquisição do sinal analítico. Em outras palavras, não foi possível obter uma relação linear dos sinais R, G ou B individuais com a concentração de Cu^{+2} quando a imagem era colorida. Nesse sentido, optou-se por utilizar uma imagem em escala de cinza, o que proporcionou a obtenção do cromatograma mostrado na Figura 14, na qual observa-se o aumento proporcional da altura dos picos referentes aos padrões de cobre com o aumento das concentrações. Nota-se, entretanto, que a resposta em escala de cinza não é linear para os padrões de Ni^{+2} .

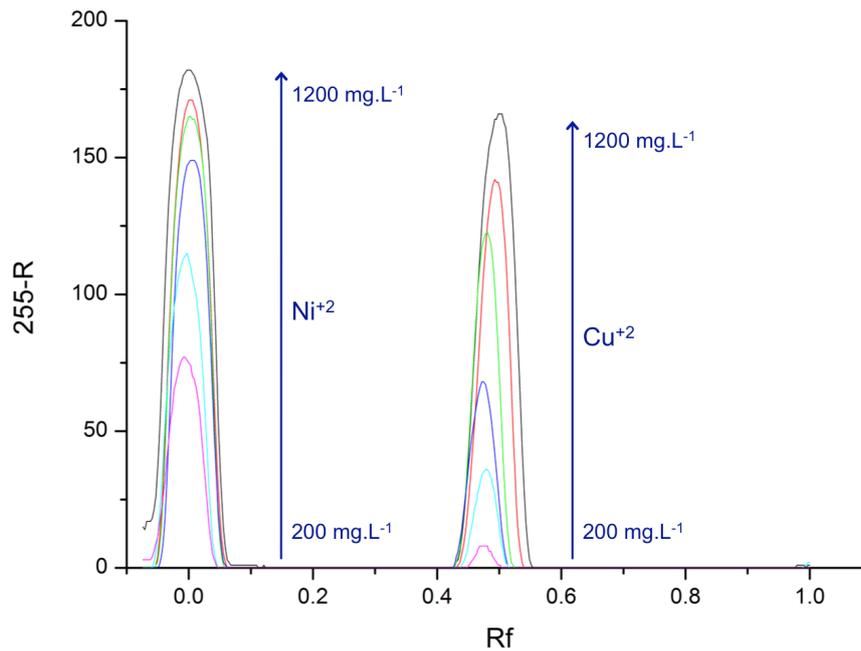


Figura 14 – Cromatograma da corrida obtido com padrões de imagem para análise de Cu⁺².

Para o Ni⁺² observa-se na Figura 13 bandas com coloração azul mais nítidas que aquela obtidas para o cobre, o que permitiu o uso da imagem colorida para a obtenção dos sinais analíticos referentes a esse íon. De fato, a componente R do sistema RGB foi a que proporcionou a melhor resposta linear para as diferentes concentrações de níquel. Conforme mostra o espectro na Figura 15, o máximo de absorção para o produto azul se dá em torno de 650 nm, comprimento de onda que corresponde a coloração vermelha no espectro. o que pode ser constatado ao se observar os cromatogramas obtidos a partir dessa componente apresentados na Figura 16.

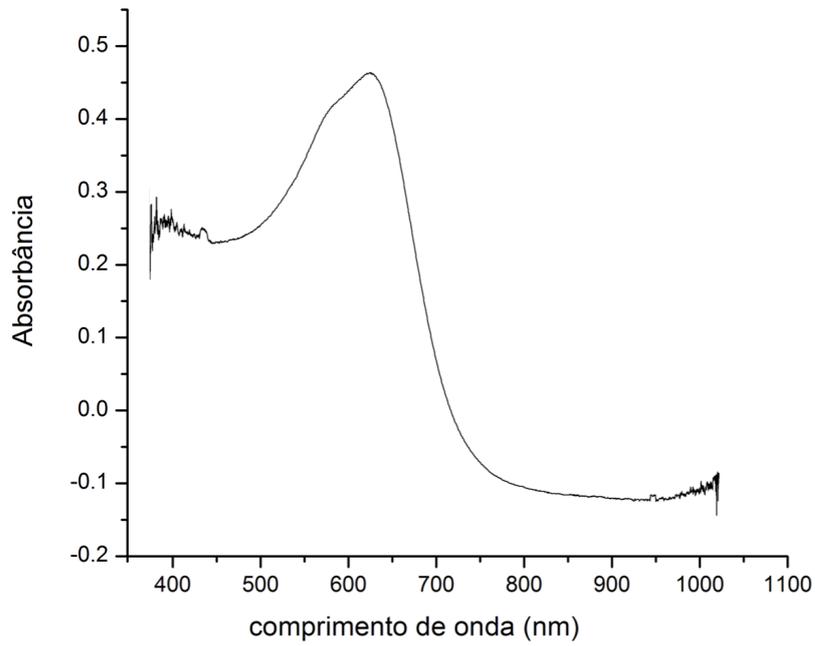


Figura 15 – Espectro de absorção Ni^{+2} .

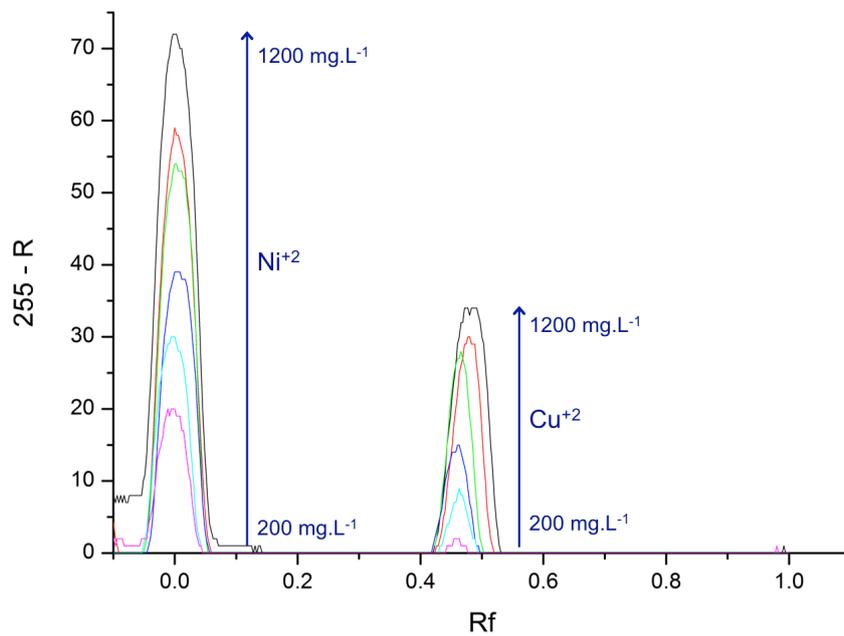


Figura 16- Cromatograma da corrida obtido com padrões de imagem para análise de Ni^{+2} .

Outra constatação importante dos cromatogramas obtidos é que o programa desenvolvido possibilitou a aquisição de sinais analíticos com boa razão sinal/ruído para a faixa de concentração estudada, indicando a possibilidade de uso do mesmo para determinações quantitativas. Baseado nas alturas dos picos obtidos, foi possível construir curvas analíticas com elevadas correlações lineares para os dois íons. Para o íon cobre a curva analítica é apresentada na Figura 17 com $R = 0,9964$, sendo estimado um limite de detecção de $99,46 \text{ mg.L}^{-1}$. Para o níquel, a curva analítica com $R = 0,9982$ e limite de detecção estimado de $70,79 \text{ mg.L}^{-1}$ é apresentada na Figura 18. Considerando a simplicidade das medidas, pode-se afirmar que os limites de detecção obtidos são plenamente satisfatórios para a determinação dos íons em ligas metálicas nas quais as concentrações costumam ser relativamente elevadas.

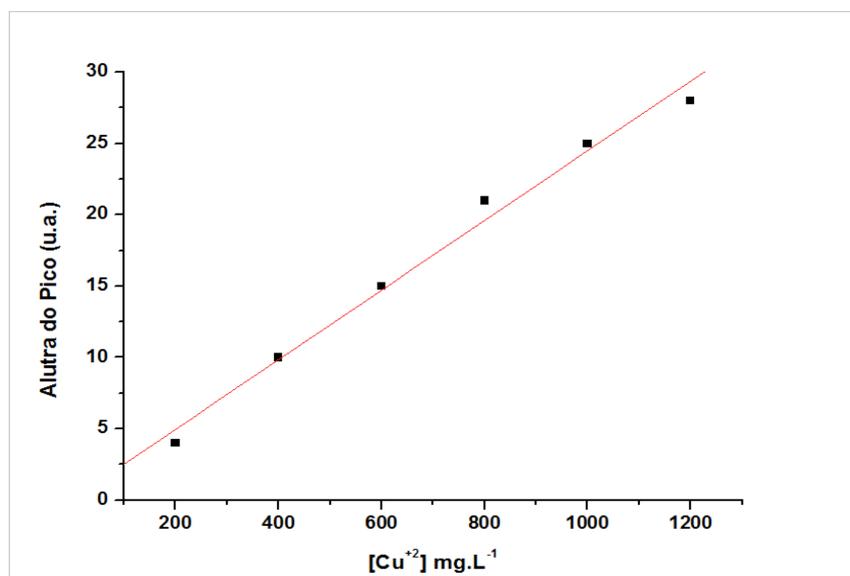


Figura 17 – Curva analítica obtida para determinação de Cu^{+2} .

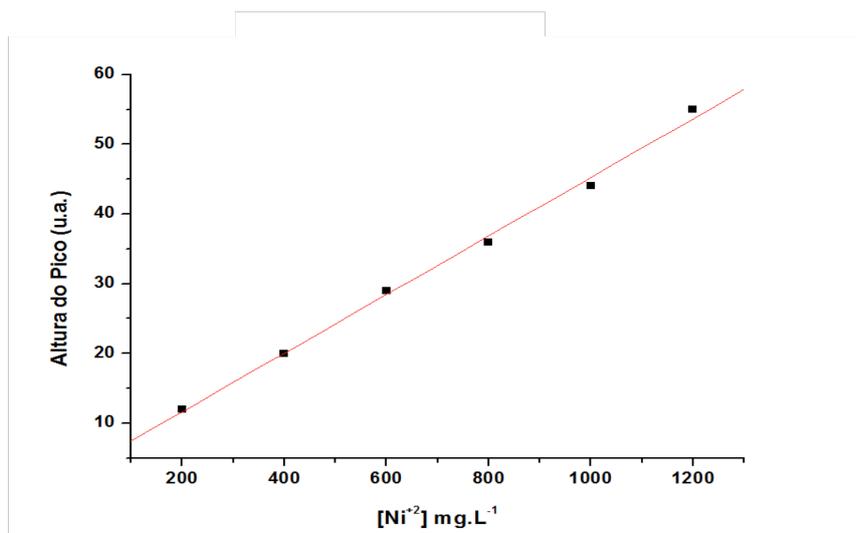


Figura 18 - Curva analítica obtida para determinação de Ni⁺².

Esses resultados indicaram que a metodologia proposta permite obter uma resposta analítica não subjetiva para a determinação quantitativa dos metais. De fato, como já discutido na parte introdutória do texto, essas medidas são normalmente baseadas na observação visual pelo analista, o que pode levar ao aumento da incerteza nas medidas.

Ainda em relação aos índices de retenção exibidos nas Figuras 14 e 16, observa-se que, visualmente, os valores obtidos para os diferentes padrões são muito parecidos. De fato, a média do valor de R_f para o íon de cobre foi de 0,477 com coeficiente de variação de 2,42 %, o que comprova a boa precisão para esse parâmetro de separação. Deve-se destacar que, para o níquel, o R_f obtido é muito próximo de zero com média e desvio padrão também muito baixos e relacionados a pequenas variações na posição de aplicação, confirmando a precisão com relação ao R_f.

Já para o cálculo de repetibilidade relacionada aos sinais analíticos obtidos, foi realizada uma medida a partir de uma corrida cromatográfica específica contendo oito canais com o mesmo padrão de 600 mg.L⁻¹, sendo adquiridos um valor de coeficiente

de variação de 6,56% para as análises de níquel e 6,16% para as respostas obtidas para o íon de cobre. Esses valores mostram que as medidas apresentam uma precisão adequada para a realização de medidas quantitativas, haja vista que o procedimento de análise envolve a aplicação de volumes muito pequenos de amostra (1,5 µL) e que a própria exatidão da micropipeta (aprox. 2 %) assim como sua precisão (aprox. 2,1 %) podem causar variações significativas no resultado final. Além disso, é importante destacar que a medida é realizada com uma instrumentação bastante simples, baseada em cromatografia em papel e imagens digitais obtidas por uma *webcam* para aquisição do sinal analítico.

Deve-se relatar também que os resultados descritos acima foram obtidos com base na altura dos picos cromatográficos e não com relação a sua área, o que é comumente empregado em análises cromatográficas. De fato, estudos empregando-se as áreas não levaram a resultados significativamente diferentes daqueles obtidos com base nas alturas dos picos. Dessa forma, optou-se pela altura como parâmetro analítico a ser relacionado com a concentração, uma vez que esse é mais facilmente obtido a partir dos cromatogramas brutos, tornando a análise mais rápida e simples.

4.3 – Determinação dos íons de interesse em amostras

Para a determinação das amostras, usaram-se as imagens padrões determinadas na Tabela 1, obtendo-se as Figuras 19 e 20 para determinação de Ni^{+2} e Cu^{+2} respectivamente. A partir de tais parâmetros, foi possível a obtenção de resultados relacionados ao percentual de cada metal na liga metálica de cupro-níquel estudada, os resultados obtidos em cromatografia de papel foram comparados aos obtidos em espectrometria de absorção atômica em chama e os erros relativos estimados e apresentados nas Tabelas 2 e 3.

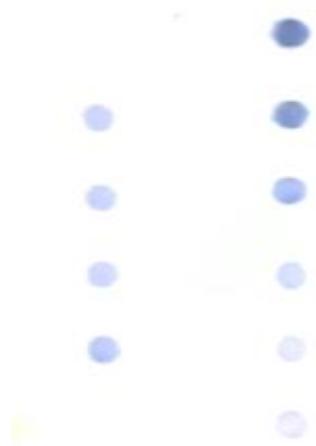


Figura 19 - Imagem obtida pelo programa de análise para a determinação de Ni^{+2} em amostra.



Figura 20 - Imagem obtida pelo programa de análise para a determinação de Cu^{+2} em amostra.

Observa-se que os erros encontrados para as medidas propostas, quando em comparação com espectrometria atômica, não ultrapassam 5,30 % para amostras de níquel e 8,18 % para análises de cobre. Tais valores são considerados satisfatórios devido à simplicidade de instrumentação do método proposto. Além disso, considerando nível de confiança de 95 %, não foram encontradas diferenças significativas entre os resultados obtidos para cinco das seis análises realizadas, foi

encontrada diferença significativa apenas para a determinação de cobre na amostra da moeda de 50 centavos.

Tabela 2 - Resultados obtidos para análise de níquel em amostras.

%Ni ⁺²			
	FAAS Teor (%) ± Sd	CP Teor (%) ± Sd	Erro Relativo (%)
Moeda 10 centavos	26,09 ± 1,87	25,15 ± 2,72	-5,30
Moeda 20 centavos	26,22 ± 4,72	25,74 ± 4,55	-1,83
Moeda 50 centavos	26,14 ± 1,78	26,53 ± 2,51	1,49

Tabela 3 – Resultados obtidos para análises de cobre em amostras.

%Cu ⁺²			
	FAAS Teor (%) ± Sd	CP Teor (%) ± Sd	Erro Relativo (%)
Moeda 10 centavos	75,72 ± 2,68	74,17 ± 4,78	-5,54
Moeda 20 centavos	74,04 ± 1,81	73,31 ± 5,12	-5,60
Moeda 50 centavos	82,02 ± 1,46	74,52 ± 4,77	-8,18

5 – CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos, pode-se concluir que o método de análise proposto é uma alternativa viável e prática para a separação e quantificação de elementos metálicos em ligas por cromatografia em papel, minimizando os erros de subjetividade das análises visuais e proporcionando um desempenho analítico adequado. As imagens digitais, aliadas a cromatografia de papel, empregando-se a estratégia proposta de detecção poderá ser aplicada a outros tipos de amostras e analitos fornecendo uma alternativa de baixo custo para análises preliminares,

6 – BIBLIOGRAFIA

- [1] ASKIM, J.; MAHMOUDI, M.; SUSLICK, K. Optical sensor arrays for chemical sensing: the optoelectronic nose. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 22, p. 8649, 2013.
- [2] BLOCK, R.; DURRUM, E.; ZWEIG, G. *Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*. 2. ed. [s.l.] Elsevier Science, 1955.
- [3] BRAITHWAITE, A.; SMITH, F. *Chromatographic methods*. 5. ed. Londres [u.a.]: Blackie Acad. & Professional, 1996.
- [4] BURMA, D. Partition Mechanism of Paper Chromatography. *Analytical Chemistry*, v. 25, n. 4, p. 549-553, 1953.
- [5] BYRNE, L. et al. Digital imaging as a detector for generic analytical measurements. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 19, n. 8, p. 517-522, 2000.
- [6] COLLINS, C. *Fundamentos de cromatografia*. Tradução. Campinas: Editora Unicamp, 2006.
- [7] CONSDEN, R.; GORDON, A.; MARTIN, A. Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. *Biochemical Journal*, v. 38, n. 3, 1944.
- [8] DOBBINS, J.; NORMAN, J. An improved qualitative test for the zinc ion. *Journal of Chemical Education*, v. 27, n. 11, p. 604, 1950.
- [9] FISCHER, H. Dithizon als Reagens in der qualitativen und quantitativen Mikroanalyse. *Angewandte Chemie*, v. 47, n. 40, p. 685-692, 1934.
- [10] GAIAO, E. et al. Digital image-based titrations. *Analytica Chimica Acta*, v. 570, n. 2, p. 283-290, 2006.
- [10] GOMES, M. et al. Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. *Química Nova*, v. 31, n. 6, p. 1577-1581, 2008.
- [11] GONZALEZ, R.; WOODS, R. *Digital image processing*. Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall, 2002.
- [12] HASHMI, M. Application of circular thin-layer chromatography to inorganic qualitative analysis. *Talanta*, v. 12, n. 8, p. 713-719, 1965.
- [13] MARCELO, M. et al. Scott test evaluation by multivariate image analysis in cocaine samples. *Microchemical Journal*, v. 127, p. 87-93 (Supplement C), 2016.

- [14] MARTINEZ, A. et al. Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 46, n. 8, p. 1318-1320, 2007.
- [15] SMITH, I. *Chromatographic and electrophoretic techniques*. 3. ed. Londres: Heinemann Medical Books, 1969.
- [16] SALLES, M. et al. Explosive colorimetric discrimination using a smartphone, paper device and chemometrical approach. *Anal. Methods*, v. 6, n. 7, p. 2047-2052, 2013.
- [17] SOYLAK, M.; ERDOGAN, N. Copper(II)-rubeanic acid coprecipitation system for separation-preconcentration of trace metal ions in environmental samples for their flame atomic absorption spectrometric determinations. *Journal of Hazardous Materials*, v. 137, n. 2, p. 1035-1041, 2006.
- [18] STAFFORD, S. *Nikon D60*. New York: Lark Books, 2008.
- [19] VAN ESPEN, P.; JANSSENS, G.; VANHOOLST, W.; GELADI, P.; *Analysis* 1992, 20, 81
- [20] VOGEL, A. *A text-book of quantitative inorganic analysis: theory and practice*. Tradução. London: Longman, 1981.
- [21] WEIL, H.; WILLAMS, T. History of Chromatography. *Nature*, v. 166, n. 4232, 1950.