

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Técnicas espectroanalíticas aliadas à química verde
visando à determinação de V e Mo com procedimentos
de extração e pré-concentração

Amanda Maria Dantas de Jesus Peixoto*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho

***Bolsista Capes**

SÃO CARLOS – SP
2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

P379te

Peixoto, Amanda Maria Dantas de Jesus.

Técnicas espectroanalíticas aliadas à química verde visando à determinação de V e Mo com procedimentos de extração e pré-concentração / Amanda Maria Dantas de Jesus Peixoto. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
89 f.

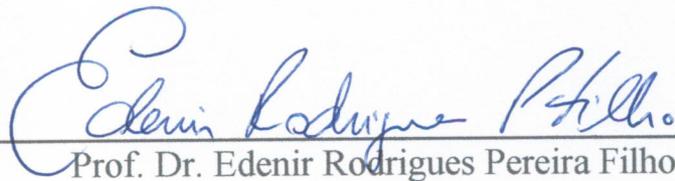
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

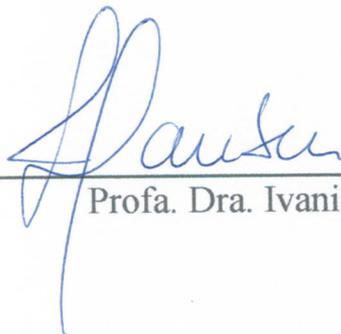
1. Química analítica. 2. Técnicas espectroanalíticas. 3. LIBS. 4. FAAS. 5. Vanádio. 6. Molibdênio. I. Título.

CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de Doutorado da candidata **Amanda Maria Dantas de Jesus Peixoto**, realizada em 14 de março de 2014:*


Prof. Dr. Edénir Rodrigues Pereira Filho


Prof. Dra. Ivanise Gaubeur


Prof. Dra. Maria das Graças Andrade Korn


Prof. Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone


Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira

“Confie no Senhor de todo o seu coração e não se apoie na sua própria capacidade e entendimento; lembre-se de colocar Deus em primeiro lugar, em todos os seus caminhos, e ele guiará os seus passos, e você andarรก pelo caminho certo.”

Provérbios 3: 5-6

Dedico este trabalho à
minha família, em especial ao
meu esposo Vinicius Carvalho
Peixoto, pelo carinho, amor,
apoio e confiança em todos os
momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre se fazer presente em todos os momentos da minha existência, a tí, Senhor, toda honra e toda glória, pois é tua toda vitória alcançada em minha vida.

Aos meus pais, que tanto amo, Maria do Carmo Dantas de Jesus e Normando Tavares de Jesus (*in memoriam*), vocês são meus heróis.

Ao professor Edenir Rodrigues Pereira Filho pela excelente orientação, amizade e confiança.

Ao meu esposo Vinicius Carvalho Peixoto, por sempre me incentivar a levantar a cabeça e a recomeçar a andar nos momentos mais difíceis. Tudo isso só foi possível por que um dia sonhamos juntos.

Aos meus irmãos Normandia, Ernando e Erlan obrigada pela força e incentivo, vocês são meu porto seguro!

Aos meus cunhados José Almeida, Jacqueline e Thiago e meus sobrinhos Matheus, Júlia e Heitor, obrigada por tudo. Amo muito vocês!

A todos os colegas do Grupo de Análise Instrumental Aplicada – GAIA, por esses 4 anos de convivência e ensinamentos;

As amigas, Amanda Augusto, Andressa, Carol, Clarice, Érica, Jenny, Luana, Luciana, Natália e Silmara que me acompanharam e apoiaram durante a realização desse trabalho. Vocês são muito especiais.

Ao Prof. Dr. Joaquim Araújo Nóbrega e Prof^a Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira juntamente com a Dra. Lucimar Lopes Fialho e Dr. Sidnei Gonçalves da Silva por toda ajuda, sugestões e conselhos no decorrer deste trabalho.

Ao Grupo de Espectrometría Atómica-Masas y Química Analítica em condiciones extremas, da Universidad de Alicante/Espanha por tornarem minha estada na Espanha inesquecível. Em especial aos professores Dr. Antonio Canals e Dra. Montserrat Hidalgo e ao M.Sc. Miguel Ángel Aguire Pastor, meu muito obrigada por toda ajuda durante o desenvolvimento dos estudos em Alicante.

Aos meus amigos do LEMON/UFS (Laboratório de estudos da Matéria Orgânica Natural) em especial a Bruno, Juliana, Tassya e Valéria, que mesmo distantes nossa amizade nunca foi abalada!

Às minhas amigas, Daniela Meneses, Tassiana Maciel, Aline Alves, Jacqueline Conceição, Jacqueline Mota pela maravilhosa amizade que tem me acompanhado durante muitos anos. Agradeço, pelos incentivos, carinhos, por estarem sempre prontas a me ajudar.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade, e especialmente às secretárias da Pós-Graduação;

Agradeço ainda à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que não foram citados, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização dessa conquista.

LISTA DE ABREVIATURAS

8-HQ	8-hidroxiquinolina
AAS	Espectrometria de absorção atômica, do inglês <i>Atomic absorption spectrometry</i>
APDC	Pirrolidinatiocarbamato de amônio, do inglês <i>Ammonium pyroldine-ditiocarbamate</i>
BPR	Vermelho bromopirogalol, do inglês <i>Bromopyrogallol red</i>
CCD	Dispositivo de carga acoplada, do inglês <i>Charge coupled device</i>
CCD	Planejamento composto central, do inglês <i>Central composite design</i>
CE	Eletroforese capilar, do inglês <i>Capillary electrophoresis</i>
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CMC	Concentração micelar crítica
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPE	Extração em ponto nuvem, do inglês <i>Cloud point extraction</i>
CRM	Material de referência certificado, do inglês <i>Certified reference material</i>
CTAB	Brometo cetil trimetil amônio, do inglês <i>Cetyltrimethylammonium bromide</i>
DDTP	O,O - dietil ditiofosfato de amônio
DLLME	Micro extração líquido-líquido dispersiva, do inglês <i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i>
DLLME-SFO	Micro extração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante, do inglês <i>Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop</i>
ET AAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, do inglês <i>Electrothermal atomic absorption spectrometric</i>
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês <i>Flame atomic absorption spectrometry</i>
FIA	Análise por injeção em fluxo, do inglês <i>Flow injection analysis</i>
GAC	Química analítica verde, do inglês <i>Green analytical chemistry</i>
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite do

	inglês <i>Graphite furnace atomic absorption spectrometric</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance, do inglês <i>High performance liquid chromatography</i>
ICCD	Detectores de carga acoplada intensificados, do inglês <i>Intensified charge-coupled device</i>
ICP MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ICP OES	Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
LIBS	Espectroscopia de emissão com plasma induzido por laser, do inglês <i>Laser induced breakdown spectroscopy</i>
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês <i>Liquid-liquid extraction</i>
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>Limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>Limit of quantification</i>
MIP OES	Emissão atômica por plasma induzido por micro-ondas, do inglês <i>Microwave-induced plasma optical emission spectrometry</i>
NC	Nebulização contínua
ND	Nebulização discreta
PAH	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, do inglês <i>Polycyclic aromatic hydrocarbon</i>
PAN	1-(2-piridilazo)-2-naftol
PC	Pré-concentração
PFA	Perfluoroalcóxido
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
PTFE	politetrafluoroetileno
QA	Quinalizarine
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>Relative standard deviation</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAN	2-tiazolilazo-2-naftol
Triton X-100	Polioxietileno (9-10) p-tercotil fenol
Triton X-114	Éter (1,1,3,3tetrametilbutil)fenil-(7-8)- polioxietilênico
TS-FF-AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno tubular na

chama, do inglês *Thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry*

UV-Vis	Ultravioleta- visível, do inglês <i>Ultraviolet-visible</i>
VA-SFODME	Micro extração em Gota Orgânica Solidificada Assistida por Vórtex, do inglês <i>Vortex - assisted solidified floating organic drop microextraction</i>
VI	Valor de Intervenção
VP	Valor de Prevenção
VRQ	Valores de referência de qualidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Condições experimentais do FAAS.....	22
Tabela 2.2. Primeiro planejamento fatorial completo 2^4 para o estudo das variáveis para o vanádio: tipo de agente complexante, volume e concentração das soluções dos agentes complexantes e pH.	29
Tabela 2.3. Segundo planejamento fatorial completo 2^4 para o estudo das variáveis para o vanádio: volume de agente surfactante, tempo de complexação, tipo e concentração do agente surfactante.	29
Tabela 2.4. Estudo da etapa de diluição da fase rica da CPE para o V.....	30
Tabela 2.5. Parâmetros de desempenho obtidos com diferentes formas de nebulização com e sem CPE para o V.....	34
Tabela 2.6. Primeiro planejamento fatorial completo 2^4 para o estudo das variáveis: tipo de agente complexante, volume e concentração das soluções dos agentes complexantes e pH para o Mo.	35
Tabela 2.7. Segundo planejamento fatorial completo 2^4 para o estudo das variáveis: volume de agente surfactante, tempo de complexação, concentração e tipo de agente surfactante para o Mo.....	35
Tabela 2.8. Estudo da etapa de diluição da fase rica da CPE para o Mo.	36
Tabela 2.9. Parâmetros de desempenho obtidos com diferentes formas de nebulização com e sem CPE para o Mo.	39
Tabela 2.10. Adição e recuperação de vanádio e molibdênio em amostras de água mineral.....	39
Tabela 2.11. Concentração de V obtida por CPE na amostra de vanádio quelato.	40
Tabela 2.12. Parâmetros de desempenho obtidos para o vanádio e o molibdênio pelo método do ponto nuvem simultâneo.	43
Tabela 2.13. Adição e recuperação de vanádio e molibdênio pelo ponto nuvem simultâneo em amostras de água mineral.....	44
Tabela 2.14. Estudo da possível interferência Fe no procedimento de extração no ponto nuvem para Mo e V.	44
Tabela 2.15. Valores estipulados pelo CONAMA para V e Mo.	45
Tabela 2.16. Concentração de V e Mo em amostras de solo da Antártica.	46

Tabela 3.1. Programa de aquecimento para digestão ácida assistida por radiação micro-ondas empregado para amostras de medicamentos e de solo.	63
Tabela 3.2. Programa de aquecimento para digestão ácida assistida por radiação micro-ondas para digestão do material de referência certificado.	64
Tabela 3.3. Variáveis e níveis estudados no planejamento Plackett-Burman..	67
Tabela 3.4. Matriz do planejamento Plackett-Burman.	68
Tabela 3.5. Variáveis e níveis estudados no planejamento composto central para otimização de processo DLLME-LIBS e as intensidades dos sinais de emissão obtidos para V e Mo.	69
Tabela 3.6. Condições otimizadas para o procedimento DLLME.	72
Tabela 3.7. Parâmetros de desempenho obtidos pela combinação DLLME-LIBS.	74
Tabela 3.8. Adição e recuperação em água mineral.....	75
Tabela 3.9. Recuperação dos elementos estudados das amostras de medicamentos e de solo com comparação com método de adição padrão em ICP OES.....	76
Tabela 3.10. Recuperação dos elementos estudados usando o material de referência certificado NCS ZC 85005 (Beef Liver).	76
Tabela 4.1. Resultados de LOD e LOQ para o V e Mo das técnicas e combinações utilizadas.	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Representação das etapas de extração em ponto nuvem: (a) Solução original com o analito em baixa concentração, (b) Adição do surfactante na solução da amostra para a formação do meio micelar e captura do analito núcleo hidrofóbico, (c) Separação da fase micelar após aquecimento e centrifugação.....	13
Figura 2.2. Esquema do processo de formação de um agregado micelar.	15
Figura 2.3. Ilustração do sistema de aspiração discreta.....	23
Figura 2.4. Fluxograma geral da extração em ponto nuvem individual para o V e Mo.	27
Figura 2.5. Perfis dos sinais analíticos obtidos para V em diferentes volumes de injeção com a extração em ponto nuvem.....	31
Figura 2.6. Curvas de calibrações sem e com a extração em ponto nuvem com nebulização contínua (NC).....	32
Figura 2.7. Curvas de calibrações sem e com a extração em ponto nuvem com nebulização discreta (ND).....	33
Figura 2.8. Perfis dos sinais analíticos obtidos para Mo em diferentes volumes de injeção com a extração em ponto nuvem.....	37
Figura 2.9. Curvas de calibrações sem e com a extração em ponto nuvem com nebulização contínua para o Mo.	38
Figura 2.10. Curvas de calibrações sem e com a extração em ponto nuvem com nebulização discreta para o Mo.....	38
Figura 2.11. Esquema do procedimento de extração em ponto nuvem simultâneo para o V e Mo.	41
Figura 2.12. Curvas de calibração obtida pelo ponto nuvem simultâneo para o vanádio na presença do molibdênio.....	42
Figura 2.13. Curvas de calibração obtida pelo ponto nuvem simultâneo para o molibdênio na presença do vanádio.....	43
Figura 3.1. Números de publicações a cada 2 anos, busca realizada no ScienceDirect em 26/11/2013 com a palavra LIBS apenas.	51

Figura 3.2. Esquema de um espectrômetro LIBS. Os lasers (a) e (b) referem-se ao laser de ablação da amostra e ao laser para visualização do local de incidência do laser de ablação, respectivamente.	53
Figura 3.3. Números de publicações por ano, busca realizada no ScienceDirect 26/11/2013 com a sigla DLLME apenas.	59
Figura 3.4. Etapas do procedimento de DLLME (1) adição da solução do complexante 8-HQ na amostra, (2) agitação em vórtex, (3) centrifugação para separação das fases e retirada da gota orgânica.	65
Figura 3.5. (a) folha de alumínio com as células de contenção; (b) suporte sendo aquecido e a fase orgânica sendo depositada.	66
Figura 3.6. Esquema geral do processo para determinação da gota orgânica. (a) deposição da gota orgânica no suporte de alumínio, (b) secagem dessas microgotas, (c) análise LIBS de microgotas depositadas em um suporte de alumínio depois da secagem.	66
Figura 3.7. Porcentagem de significância de cada variável (a) V e (b) Mo.	68
Figura 3.8. Gráfico de contorno para o modelo obtido para o V.	70
Figura 3.9. Gráfico de contorno para o modelo obtido para o Mo.	71
Figura 3.10. Gráficos de contorno dos modelos obtidos para o V e Mo sobrepostos.	71
Figura 3.11. Intensidade dos sinais de emissão para o V.	73
Figura 3.12. Intensidade dos sinais de emissão para o Mo.	73

RESUMO

TÉCNICAS ESPECTROANALÍTICAS ALIADAS À QUÍMICA VERDE VISANDO À DETERMINAÇÃO DE V E Mo COM PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO.

O objetivo desta tese de doutorado foi propor alternativas para melhorar o desempenho analítico das técnicas F AAS (Flame Atomic Absorption Spectrometry) e LIBS (Breakdown Laser Induced Spectroscopy) visando à determinação de V e Mo, empregando procedimentos analíticos que estão de acordo com os princípios da Química Verde, como a extração em ponto nuvem (CPE) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) em diferentes tipos de amostras (água mineral, medicamentos e solo). Na primeira parte do trabalho foi estudada a combinação CPE-F AAS, para isso foram realizados inicialmente planejamentos experimentais para a obtenção das melhores condições do procedimento CPE para a extração de V e Mo de forma individual e simultânea, além de um estudo sobre o volume de amostra a ser introduzida de forma discreta no F AAS. Os limites de detecção alcançados com a CPE para extração individual de V e Mo foram de 80 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Quando o procedimento CPE foi aplicado para extração simultânea, os LODs alcançados foram de 80 e 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o V e Mo. O procedimento desenvolvido foi aplicado em duas amostras reais de medicamentos onde foram obtidas as recuperações de $107 \pm 4,3\%$ para o V e $98 \pm 1,6\%$ para o Mo. A exatidão dos procedimentos foi avaliada por estudos de adição e recuperação em amostras de água mineral, onde as recuperações variaram entre 98-103% para o V e 106-115% para o Mo. Estudos de interferência foram realizados e a presença de Fe (II) em proporções maiores que 1:10 (V:Fe e Mo:Fe) provoca uma redução de 30 e 50% no sinal de V e Mo, respectivamente. Na segunda parte do trabalho foi desenvolvido um método de microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de V e Mo por LIBS em amostras de água, medicamentos e solo. Inicialmente foram realizados planejamentos experimentais para a otimização das melhores condições do procedimento DLLME. Depois com as condições otimizadas, um volume de 10 μL de amostra foi seca em uma lâmina de alumínio e submetida à determinação por LIBS. Os valores de LOD alcançados com o DLLME e determinação por LIBS foram de 5 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o V e Mo, respectivamente. O procedimento foi aplicado em amostras reais de dois medicamentos, onde as recuperações obtidas através da comparação com o método de adição padrão e determinação por ICP OES variaram de 92 a 104% para o V e 96% para o Mo. Na amostra de solo a recuperação foi de $97 \pm 15\%$ para o V e o Mo ficou abaixo do LOQ. A exatidão foi comprovada a partir de emprego de um estudo de adição e recuperação além do uso de um material de referência certificado NCS ZC 85005 (*Beef Liver*) onde a concentração de V ficou abaixo do LOQ e a recuperação obtida para o Mo foi de $102 \pm 21\%$.

ABSTRACT

SPECTROANALYTICAL TECHNIQUES COMBINED WITH GREEN CHEMISTRY FOR V AND Mo DETERMINATION IN EXTRACTION AND PRE-CONCENTRATION PROCEDURES

The goal of this PhD thesis was to propose alternatives to improve the analytical performance of F AAS (Flame Atomic Absorption Spectrometry) and LIBS (Laser Induced Breakdown Spectroscopy) aiming V and Mo determination. Some analytical procedures, in agreement with the Green Chemistry principles of, as the cloud point extraction (CPE) and dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) were evaluated in different kind of samples (mineral water, medicines and soil). First was evaluated some parameters concerning to the CPE and the instrumental parameters, using factorial design in order to obtain the better conditions for the extraction of V and Mo individually and simultaneously, as well as the minimum sample volume necessary to introduce in the nebulizer. The limits of detection (LOD) achieved with the CPE to extract individual V and Mo were 80 and 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. When the CPE procedure was applied for simultaneous extraction, the LODs were 80 and 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ to V and Mo, respectively. The developed procedure was applied in two real samples of medicines and the recoveries obtained were $107 \pm 4 \%$ and $98 \pm 2 \%$ for V and Mo, respectively. Measurements in presence of Fe (II) (possible interfering) in proportions higher than 1:10 (V: Fe and Mo: Fe) were performed and the absorbance signals of V and Mo decrease thereabout 30 and 50%, respectively. In the second work a procedure employing dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of V and Mo by LIBS was developed and applied in water, medicines and soil samples. Some factorial designs were also performed to optimize the best conditions for DLLME procedure. After the optimization, a sample volume of 10 μL was dried in a piece of aluminum foil and submitted to determination by LIBS. The combination of DLLME-LIBS is quite feasible since microextraction is fast, easy to apply, low-cost, they have the possibility of automation, generates little waste and the small volume of the final extract is sufficient for the LIBS analysis. The LOD achieved with the proposed method were 5 and 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ for V and Mo, respectively. The procedure was applied to real samples of two medicines, where the recoveries obtained by comparing with the standard addition method and determination by ICP OES ranged 92-104% for V and 96% for Mo. In the soil sample recovery was $97 \pm 15\%$ for V and Mo was below the LOQ and a reference material NCS ZC 85005 (Beef Liver) where V was below the LOQ and the recovery obtained for Mo was $102 \pm 21\%$.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO 1 . INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Motivação.....	2
1.2 Química verde.....	3
1.3 Vanádio.....	6
1.4 Molibdênio.....	8
CAPÍTULO 2 . COMBINAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM PUNTO NUVEM COM A ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA (F AAS) PARA DETERMINAÇÃO DE V E Mo.....	10
2.1. Objetivo específico.....	11
2.2. Revisão da literatura	12
2.2.1 Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS)	12
2.2.2. Extração e pré-concentração em ponto nuvem	13
2.3. Materiais e Métodos.....	22
2.3.1. Equipamentos e acessórios	22
2.3.2. Amostras	23
2.3.3. Reagentes e soluções	24
2.3.4. Preparo das amostras	25
2.3.5. Procedimentos da extração em ponto nuvem individual para o V e Mo.....	26
2.3.6. Procedimento de extração em ponto nuvem de forma simultânea para V e Mo	27
2.4. Resultados e Discussão.....	28

2.4.1. Otimização das condições experimentais do procedimento de CPE para o vanádio	28
2.4.2. Estudo do volume de injeção para o vanádio	30
2.4.3. Obtenção dos parâmetros analíticos de desempenho individual para o vanádio.	32
2.4.4. Otimização das condições experimentais do procedimento de CPE para o molibdênio.	34
2.4.5. Estudo do volume de injeção para o Mo.	36
2.4.6. Obtenção dos parâmetros analíticos de desempenho individual para o molibdênio.	37
2.4.7. Aplicação do procedimento de CPE em amostras de água mineral.	39
2.4.8. Aplicação do procedimento de CPE em amostras de medicamentos.	40
2.4.9. Condições experimentais do procedimento de CPE simultâneo para determinação de vanádio e molibdênio.	41
2.4.10. Obtenção dos parâmetros analíticos de desempenho para extração simultânea de vanádio e molibdênio após extração em ponto nuvem.....	42
2.4.11. Estudo sobre a interferência do ferro na determinação do vanádio e molibdênio.	44
2.4.12. Aplicação do procedimento de CPE em amostras de solo.....	45
2.5. Conclusões	46
CAPÍTULO 3. COMBINAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME) COM A TÉCNICA LIBS PARA DETERMINAÇÃO DE V E Mo.	48
3.1. Objetivo específico.....	49
3.2. Revisão da Literatura	50
3.2.1 Espectroscopia de Emissão com Plasma Induzido por Laser (LIBS) 50	
3.2.1.1 Desenvolvimento e fundamentação da técnica LIBS.....	50

3.2.1.2 Aplicação do LIBS.....	55
3.2.2 Técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	57
3.2.2.1 Desenvolvimento e fundamentação da DLLME	57
3.2.2.2 Aplicação da DLLME	60
3. 3. Materiais e Métodos.....	61
3.3.1. Equipamentos e acessórios.....	61
3.3.2. Reagentes e soluções	62
3.3.3. Preparo das amostras.....	63
3.3.4. Procedimento de microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de V e Mo.....	64
3. 4. Resultados e Discussão.....	67
3.4.1. Otimização das condições da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	67
3.4.2. Determinação dos parâmetros de desempenho da microextração líquido-líquido dispersiva combinada com o LIBS.....	72
3.4.3 Aplicação da combinação DLLME-LIBS em amostras.....	75
3.5. Conclusões	77
CAPÍTULO 4 . CONCLUSÃO GERAL	45
4.1 Conclusões Gerais.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

CAPÍTULO 1. Introdução geral

1.1 Motivação

A vasta utilização de compostos contendo vanádio e molibdênio na indústria química e as elevadas concentrações dos mesmos nos derivados do petróleo contribuíram para o aumento da disponibilidade desses elementos no meio ambiente. Além disso, os efeitos fisiológicos desses dois elementos são bastante diversificados, contribuindo para o aumento do interesse no estudo dos efeitos causados por eles^[1,2].

A determinação de elementos como o V e Mo pode ser realizada através de diferentes técnicas instrumentais analíticas. As que mais se destacam por suas sensibilidades e robustezes são: ICP OES (*Inductively coupled plasma optical emission spectrometry*), GF AAS (*Graphite furnace atomic Absorption spectrometric*) e ICP-MS (*Inductively coupled plasma mass spectrometry*). Entretanto, a tecnologia presente nessas técnicas está associada a um alto custo de aquisição e manutenção.

Apesar da existência de técnicas mais simples, de baixo custo operacional e de baixa complexidade, como por exemplo, a Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS, *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) e a Espectroscopia de Emissão com Plasma Induzido por Laser (LIBS, *Laser Induced Breakdown Spectroscopy*), estas têm sido deixadas em segundo plano, principalmente por apresentar limitações com relação a interferências da matriz, baixa sensibilidade principalmente para elementos refratários e o fato de ser mono elementar, no caso do F AAS. Já no caso da LIBS, suas principais limitações são a baixa precisão e os elevados limites de detecção, quando comparada com outras técnicas instrumentais analíticas já consolidadas como aquelas mencionadas no parágrafo anterior^[3,4].

Uma alternativa para contornar essas limitações é aliar essas técnicas aos novos métodos de extração e pré-concentração que substituem e diminuem de forma significativa o uso de solventes orgânicos. Além disso, esses novos métodos são simples, rápidos de baixo custo e estão de acordo com os princípios da química verde.

Os métodos de extração avaliados nesse trabalho foram a extração em ponto nuvem (CPE, *Cloud Point Extraction*) e a microextração líquido-líquido

dispersiva (DLLME, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), pois tratam-se de procedimentos analíticos limpos que estão de acordo com o princípios da química verde e possibilitam uma melhora na sensibilidade dessas técnicas instrumentais analíticas^[5].

1.2 Química verde

Nas últimas décadas os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais críticos e frequentes, devido principalmente ao crescimento desordenado e ao aumento na atividade industrial não preocupada com o impacto de suas ações. Políticas públicas que visavam regulamentar a adequada destinação e tratamento dos resíduos industriais e esgoto doméstico surgiram no início da década de 1990 e com elas um novo conceito de desenvolvimento sustentável e de proteção do meio ambiente, a chamada Química Verde^[6].

Química verde, química limpa, química ambientalmente benigna ou química autossustentável são as diferentes formas que essa nova tendência vem sendo chamada na literatura científica^[7]. O conceito de química verde consiste no desenvolvimento de processos e metodologias que reduzem ou eliminam o uso ou geração de substâncias danosas ao meio ambiente e a saúde humana^[6,7].

Na busca pela implementação do conceito de química verde na indústria, pesquisa e educação, 12 princípios de prática química devem ser seguidos^[8,9] como mostra a lista a seguir:

- 1- Prevenção: evitar a formação de resíduos e/ou subprodutos tóxicos é mais barato que trata-los após serem produzidos.
- 2- Economia de átomos: devem-se buscar métodos sintéticos que maximizem a incorporação dos átomos dos reagentes no produto final.
- 3- Sínteses de compostos de menor toxicidade: a síntese de produtos químicos deve ser realizada com substâncias que gerem pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao meio ambiente.

- 4- Desenvolvimento de compostos seguros: devem-se desenvolver produtos químicos que sejam capazes de atingir suas funções de forma eficaz e que depois do seu uso não causem danos ao ambiente;
- 5- Diminuição do uso de solventes e auxiliares: sempre que possível evitar o uso de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação e secantes);
- 6- Eficiência energética: processos químicos devem ser realizados sempre que possível à temperatura e pressão ambiente, assim a energia gasta no processo é reduzida juntamente com o impacto ambiental e econômico.
- 7- Uso de matéria-prima de fontes renováveis: no desenvolvimento de novas tecnologias e processos o uso de matérias-primas de fontes renováveis (como biomassas) deve ser incentivado.
- 8- Redução de derivativos: evitar ou minimizar a derivatização (uso de reagentes bloqueadores, de proteção ou desproteção e modificadores temporários) por que essas etapas reacionais requerem reagentes adicionais e podem gerar resíduos.
- 9- Catálise: Catalisadores (tão seletivos quanto possível) devem ser usados em substituição aos reagentes estequiométricos;
- 10- Produtos degradáveis: produtos químicos deverão ser desenvolvidos de tal forma que, após sua utilização, não persistam no ambiente se degradando e formando compostos inócuos.
- 11- Análise em tempo real para a prevenção da poluição: controle e monitorização dentro do processo (em tempo real) devem ser desenvolvidos, a fim de detectar substâncias tóxicas antes de sua formação.
- 12- Química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes: a escolha das substâncias, bem como sua forma de uso deve procurar minimizar os riscos de acidentes em potencial, como explosões e incêndios e vazamentos.

Dentro desses 12 princípios da química verde surgiu recentemente um novo campo de atividades chamado química analítica verde (*green analytical chemistry* - GAC)^[10] o qual está voltado particularmente para o papel dos químicos analíticos no laboratório, buscando procedimentos e métodos instrumentais analíticos cada vez mais eficientes, a fim de melhorar a qualidade das análises químicas com menor geração de resíduos e reduzido dano ambiental^[11].

GAŁUSZKA et al. em 2013 selecionaram dentro dos 12 princípios da química verde quatro tópicos que se adequavam a química analítica (princípios 1, 5, 6 e 8) e os complementaram com mais oito novos princípios voltados para a aplicação em química analítica^[12].

Esses 8 princípios são:

- 1- Técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas para evitar o tratamento exaustivo da amostra;
- 2- Devem ser utilizados quantidade e tamanho mínimos de amostras;
- 3- Devem ser utilizadas medidas *in situ*;
- 4- Integração entre processos analíticos devem ser realizados, a fim de reduzir o consumo de energia e reagentes;
- 5- Seleção de métodos automatizados e miniaturizados;
- 6- Redução da geração de resíduo por análise e uma adequada destinação dos mesmos;
- 7- Métodos multi-elementares ou multi-parâmetros devem ser utilizados;
- 8- A segurança do operador deve ser aumentada.

Os autores ainda sugerem estratégias para atender esses princípios, como por exemplo, o uso de ferramentas quimiométricas para a redução do número de amostras e maximização da obtenção das informações^[12].

Essas novas tendências ganham força a cada dia e a maioria dos métodos analíticos apresentam sérias limitações no que diz respeito aos requisitos da química analítica verde. Uma forma de alcançar esses princípios

é aliar esses métodos já conceituados a diferentes alternativas, desde a amostragem até a etapa de tratamento dos resíduos analíticos.

1.3 Vanádio

Em 1801, Andrés Manuel del Rio, relatou pela primeira vez a ocorrência de um metal que apresentava compostos de cor vermelha e foi chamado de “*erythronium*”. Mais tarde o seu descobridor pensou que o encontrado era na verdade um composto impuro de cromo e somente em 1830 esse elemento foi redescoberto pelo químico sueco Gabriel Sefström que descreveu um novo elemento encontrado em um minério de ferro em Taberg (Suécia). Esse novo elemento recebeu o nome de “*vanadium*”, em homenagem a *Vanadis*, deusa escandinava da juventude e da beleza^[13].

Em 1831 Friedrich Wöhler constatou que o “*erythronium*” descoberto em 1801 e o “*vanadium*” descoberto em 1830 se tratavam do mesmo elemento. Em 1867, o químico inglês Henry Enfield Roscoe, reduziu cloreto de vanádio (VCl_2) com hidrogênio gasoso e conseguiu isolar pela primeira vez o vanádio. Em 1870 esse elemento foi inserido na tabela periódica^[14].

O vanádio é um metal de transição pertencente à família 5, tem número atômico 23 e massa atômica $50,9415 \text{ g mol}^{-1}$. Esse elemento apresenta estados de oxidação de (+II) a (+V), sendo mais estável no estado (+IV) e ligeiramente oxidante no estado (+V). Sua abundância na crosta terrestre é em média de $0,14 \text{ mg kg}^{-1}$, estando presente em rochas, solos, plantas e animais de forma não uniforme. O minério vanadinite e o carvão são duas importantes fontes de vanádio, além do petróleo que apresenta complexos orgânicos desse metal na forma de porfirinas^[15,16].

Os níveis desse elemento no meio ambiente vêm crescendo a cada ano, pois além das fontes naturais como erosão da crosta terrestre e as atividades vulcânicas, as interferências antrópicas tem contribuído para esse aumento. Compostos de vanádio são amplamente aplicados em processos industriais, incluindo a produção de ligas, de aços especiais (mais resistentes a altas temperaturas) e na fabricação de pigmentos e tintas. Além disso, esses

compostos também estão presentes em combustíveis fósseis e a queima dos mesmos libera grande quantidade desse elemento na atmosfera^[17, 18].

A guerra do Golfo em 1991, por exemplo, contribuiu para o aumento da concentração de vanádio no ambiente, devido aos incêndios nos poços de petróleo, grandes quantidades deste elemento foram lançadas na atmosfera^[19].

Os efeitos fisiológicos do vanádio são bastante diversificados e em níveis traço ($\mu\text{g kg}^{-1}$) são essenciais para plantas e animais. Entretanto, em concentrações um pouco mais elevadas são potencialmente tóxicos^[20].

Alguns compostos de vanádio são irritantes das vias aéreas e dos olhos. A exposição aguda e crônica provoca conjuntivite, rinite e doenças mais graves como bronquite e asma. A toxicidade do vanádio tem sido descrita principalmente em termos dos seus efeitos neurológicos e cardiovasculares^[21].

Casos de toxicidade aguda por vanádio (principalmente pelo pó de pentóxido de vanádio V_2O_5) em seres humanos foram observadas em mineradores, bem como em outros trabalhadores expostos a altas concentrações do elemento^[22].

Por outro lado, já existem evidências que o vanádio pode induzir a mineralização dos dentes e ossos em animais^[23]. Além disso, o vanádio é responsável pela redução da biossíntese do colesterol e os níveis de triglicerídeos no plasma; estimula o consumo de glicose e aumenta a produção de glicogênio, mimetizando os efeitos da insulina^[24].

Estudos realizados por CARMIGNANI et al.^[25] mostraram efeitos toxicológicos do vanádio no sistema cardiovascular indicando que este induz a vaso constrição em vários órgãos e modificações cardiovasculares fisiológicas.

KANNA et al.^[26] avaliaram o vanádio como supressor de tumores, como por exemplo, no desenvolvimento de substâncias com atividade espermicida e anti-HIV.

Embora haja alguns estudos a respeito da toxidez do vanádio, ainda há pouca informação a respeito do seu comportamento e seus efeitos bioacumulativos. Por esta razão, é necessária uma maior investigação sobre a ocorrência e a distribuição deste metal no ambiente.

1.4 Molibdênio

Em 1778, o químico farmacêutico Carl Wilhelm Scheele observando uma amostra de molibdenita pensou está estudando um minério de chumbo e o nomeou de "*molybdos*", palavra grega que significa chumbo. Mais tarde após análise mais detalhada, Scheele percebeu que estava enganado e seus estudos o levaram a concluir que a amostra de minério não continha chumbo, mas um novo elemento, que ele chamou de molibdênio obtido a partir da molibdenita mineral. Em 1781 o químico Peter Hjelm foi o primeiro a isolar a substância elementar na forma de pó metálico^[13, 14].

O Mo é um metal de transição da família 6, tem número atômico 42 e massa atômica $95,96 \text{ g mol}^{-1}$ ^[15]. Na natureza o molibdênio é encontrado sempre ligado a outros elementos, principalmente na forma de MoS_2 , conhecido como molibdenita. Diversos compostos de molibdênio são utilizados como agentes catalisadores no refino do petróleo (para remover compostos orgânicos de enxofre) e na produção de gasolina de elevada octanagem^[27].

O molibdênio é um elemento essencial às várias formas de organismos vivos, principalmente vegetais, atuando ativamente nos metabolismos do nitrogênio (nitrato redutase) e do sulfeto (sulfito oxidase), além de estar relacionado ao transporte de elétrons em diversas reações bioquímicas e na fixação de nitrogênio nas plantas^[28, 29].

O excesso de molibdênio nos animais pode levar a transtornos intestinais e molibdenose (distúrbio que induz a deficiência de cobre). Em seres humanos tem-se pouca informação sobre os efeitos toxicológicos desse metal. Entretanto, um aumento na concentração de ácido úrico no sangue e sintomas semelhantes a gota foi observado em uma população que vivia em uma área com alto teores de molibdênio e cobre no solo e em legumes^[30, 31].

HOLZINGER et al. em 1998 realizaram um estudo no qual comprovaram que uma ingestão diária de Mo na concentração de $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ (peso corporal) podem ser tóxicos para os seres humanos^[32].

Esta diversidade de funcionamento biológico torna de grande importância a determinação de molibdênio em baixas concentrações em várias matrizes^[33].

SUNG et al. determinaram cobre e molibdênio em amostras de água do mar, com pré-concentração em uma microcoluna de resina e determinação por GF AAS^[34]. Os limites de detecção alcançados para o cobre e molibdênio foram de 0,05 ppb e 0,25 ppb, respectivamente.

ANDRADE et al. realizaram a determinação espectrofotométrica de Mo (VI) em amostras de aço com um sistema ternário homogêneo (água, etanol e clorofórmio) de solventes após extração monofásica. A precisão do método proposto foi avaliada comparando com amostras padrão analisadas por medidas por espectrometria de absorção atômica com chama e correção de fundo^[35].

CAPÍTULO 2. Combinação do procedimento de extração em ponto nuvem com a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) para determinação de V e Mo

2.1. Objetivo específico

Este segundo capítulo da tese de doutorado tem por objetivo alcançar a melhoria do desempenho analítico da espectrometria de absorção atômica com chama na determinação de metais refratários como V e Mo através do emprego do procedimento de extração e pré-concentração em ponto nuvem.

2.2. Revisão da literatura

2.2.1 Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS)

No início dos anos 50 Alan Walsh propôs o conceito da espectrometria de absorção atômica (AAS) que tem como princípio fundamental que átomos no estado fundamental são capazes de absorver energia luminosa de um comprimento de onda específico, alcançando um estado excitado^[3].

Ao longo de vários anos a técnica foi se desenvolvendo e a espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) se tornou um dos métodos espectroanalíticos mais utilizados em laboratórios de rotina e indústrias devido à sua simplicidade, robustez, seletividade, ampla faixa linear e baixo custo (de aquisição e operacional)^[36].

Os componentes principais do F AAS são uma fonte de radiação, normalmente uma lâmpada de cátodo oco, um nebulizador, o qual introduz a amostra na forma de aerossol até a chama, um monocromador, usado para isolar o comprimento de onda desejado e um sistema apropriado para medir a potência do sinal que alcança o detector fotossensível.

O funcionamento do equipamento é simples e consiste na aspiração da amostra em solução para dentro do nebulizador (essa solução não precisa ser necessariamente aquosa). Esse líquido se dissipa como uma fina névoa a qual é misturada aos gases combustível e oxidante e é formado um aerossol que chega até a chama. Uma desvantagem da técnica nesse momento é que somente 5% da amostra líquida aspirada inicialmente chegam até a chama, isso é decorrente da baixa eficiência na introdução da amostra e do processo de nebulização pneumático^[37].

Outras limitações da técnica se referem ao reduzido tempo que o analito atomizado permanece no caminho óptico e a diluição da nuvem atômica na chama o que tem como consequência a baixa sensibilidade da técnica, que normalmente é da ordem de mg L^{-1} .

A fim de contornar essas limitações, diversas estratégias vêm sendo estudadas visando o incremento da sensibilidade, como por exemplo,

aumentando o tempo disponível para a atomização do analito e concentrando a nuvem atômica no caminho óptico^[38]. A combinação dessa técnica com procedimentos de extração/pré-concentração também tem sido uma estratégia muito utilizada^[39]. Aliar a F AAS com esses procedimentos de extração e pré-concentração se mostra viável, podendo ser aplicados à determinação de muitos metais e em diferentes amostras^[40, 41].

2.2.2. Extração e pré-concentração em ponto nuvem

Esse método baseia-se na propriedade que uma solução aquosa de alguns surfactantes (tensoativos) possui de tornar-se turva com a adição de uma substância apropriada ou por alteração de algumas propriedades, como por exemplo, a temperatura e pressão. Esta turvação ocorre por um decréscimo da solubilidade do surfactante na água. Neste ponto a solução separa-se em duas fases: a primeira é aquosa e possui um grande volume, denominada fase pobre, a segunda, de menor volume, a qual é denominada de fase rica, é extremamente concentrada em surfactante e contém o analito orgânico ou inorgânico desejado^[42, 43]. A Figura 2.1. mostra as etapas desse método.

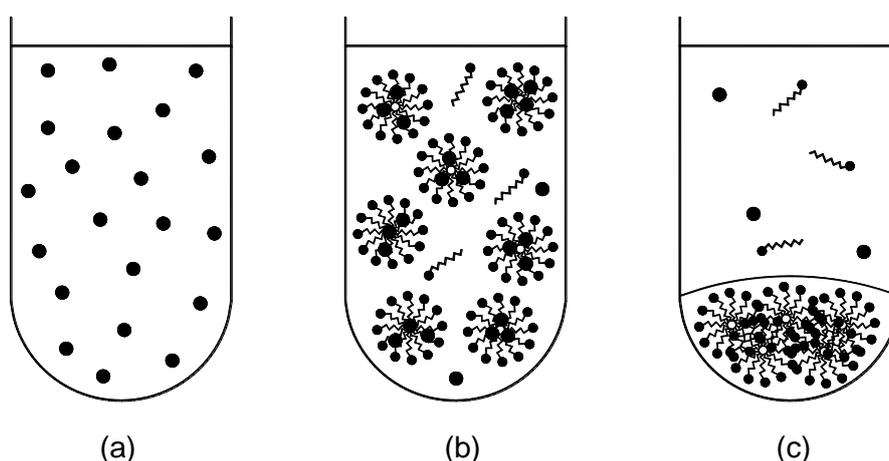


Figura 2.1. Representação das etapas de extração em ponto nuvem: (a) Solução original com o analito em baixa concentração, (b) Adição do surfactante na solução da amostra para a formação do meio micelar e captura do analito núcleo hidrofóbico, (c) Separação da fase micelar após aquecimento e centrifugação^[42].

Os surfactantes são formados por moléculas orgânicas com uma longa cadeia que apresenta uma extremidade hidrofílica (polar) e outra hidrofóbica (apolar). A classificação dos surfactantes é realizada de acordo com a estrutura molecular, principalmente pelo grupo hidrofílico (polar) podendo ser aniônicos, que suportam uma carga negativa como os grupos carboxila (R-COO^-); catiônicos que suportam uma carga positiva, como por exemplo, haletos de amônia quaternário; anfóteros que possuem ambos os grupos (catiônico e aniônico) e dependendo do pH da solução uma ou outra espécie pode prevalecer, e por fim os surfactantes não-iônicos, no qual o grupo hidrofílico não tem carga, mas apresenta grupos altamente polares como as hidroxilas (OH^-)^[42].

Os surfactantes possuem a capacidade de modificar algumas propriedades reacionais, pois uma de suas principais característica é a formação de ambientes organizados, também conhecidos como ambientes micelares, o que possibilita a melhora da sensibilidade e/ou seletividade do método analítico^[43, 44].

As micelas são agregados moleculares de dimensões coloidais, formadas a partir de moléculas individuais de surfactantes, também conhecidos como monômeros, que se associam espontaneamente em solução aquosa a partir de certa Concentração Micelar Crítica (CMC).

Enquanto a CMC não é alcançada os monômeros permanecem no meio na forma não associada, porém quando a CMC é atingida o processo de formação dos agregados micelares é favorecido, como mostra o esquema da Figura 2.2.^[42]

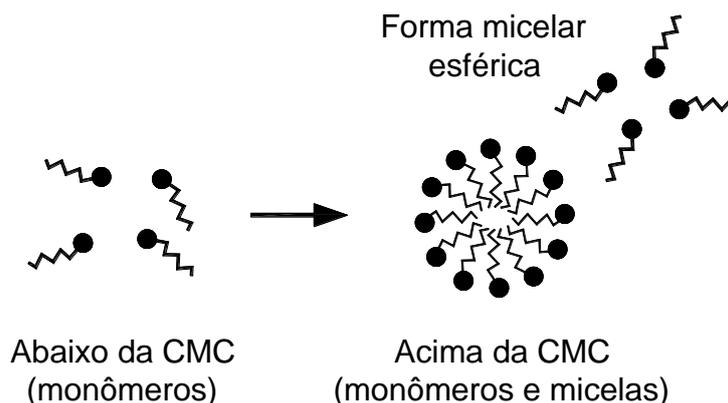


Figura 2.2. Esquema do processo de formação de um agregado micelar.

O método de extração/pré-concentração em ponto nuvem apresenta ainda como principais vantagens à segurança operacional, baixa inflamabilidade do surfactante, baixa toxicidade para o analista e para o ambiente, além do fácil acesso e baixo custo dos surfactantes, por esses motivos essa técnica torna-se bastante viável do ponto de vista analítico ao atender os preceitos da química analítica verde^[42].

Em 2006, SILVA et al.^[45] mostraram a evolução contemporânea da técnica de extração em ponto nuvem (CPE) sobre a especiação e determinação de metais e sua aplicação em diferentes ambientes, o crescente interesse da comunidade científica na utilização da CPE como procedimentos de pré-concentração e as diferentes possibilidades de acoplamento dessa técnica a diferentes métodos instrumentais de análise. Como por exemplo, as técnicas espectrométricas: UV-Vis, F AAS e GF AAS, ICP OES, ICP-MS e Eletroforese capilar (CE). Esse elenco de possibilidades de combinações da CPE evidencia a grande diversidade dessa técnica.

PINO et al.^[46] propuseram um novo procedimento de pré-concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) extraídos de sedimento marinho. Os autores estabeleceram as condições ótimas para a pré-concentração e determinação dos PAH por HPLC com detecção UV. Os resultados experimentais mostraram que esta metodologia é uma alternativa simples como técnica de separação e / ou pré-concentração. As principais vantagens foram o fato de não ser necessário o uso de solventes orgânicos e

os extratos podem ser determinados sem posterior *clean-up*, o que reduz consideravelmente o tempo de análise.

A grande diversidade da técnica de extração em ponto nuvem se estende ainda em relação ao uso de diferentes surfactantes e complexantes.

MANZOORI E KARIM-NEZHAD^[47] utilizaram Ditizona (difeniltiocarbazona) como agente complexante e Triton X-114 como surfactante na extração por ponto nuvem, em pH < 1, para determinação de Ag em amostras de água. As vantagens combinadas da metodologia do ponto nuvem e da utilização de ditizona como um ligante para Ag, resultou em um método bastante seletivo, levando a uma separação efetiva, um limite de detecção de 0,56 ng mL⁻¹ e um fator de enriquecimento de 43 vezes. Assim, o procedimento proposto constitui-se como uma alternativa eficaz e de baixo custo quando comparado com outros métodos de pré-concentração.

NASCENTES E ARRUDA^[48] desenvolveram uma nova fase micelar de separação de íons metálicos, empregando Triton X-100 e dodecil sulfato de sódio (SDS), aplicados para pré-concentração em níveis de traço de cobalto em amostras farmacêuticas com determinação por F AAS. A eficiência da extração foi investigada em diferentes concentrações de cobalto (40 / 185 µg L⁻¹) e boa recuperação (98 / 102%) foram obtidos utilizando NaCl como eletrólito. O fator de enriquecimento encontrado foi de 28 vezes e os resultados obtidos foram comparados com os observados com GF AAS.

Este estudo mostrou uma inovação no uso de surfactantes para aplicações analíticas. Além disso, o método abrange a aplicação da F AAS permitindo uma ampliação no poder de detecção desta técnica, possibilitando deste modo a determinação com precisão de cobalto em concentrações da ordem de µg L⁻¹. Esse procedimento pode ser adaptado, com pequenas modificações, para diferentes amostras e outros metais. Entretanto, é necessário investigar a afinidade do agente complexante pelo analito em estudo.

A extração em ponto nuvem possibilita ainda sua aplicação em diferentes matrizes. Em 2006 BEZERRA et al.^[49] desenvolveram um procedimento de extração em ponto nuvem para a determinação de manganês

em efluentes salinos por F AAS. O fator de enriquecimento obtido foi de 84 vezes, o limite de detecção de $0,60 \mu\text{g L}^{-1}$ e a boa precisão confirmada pela análise do CRM de água (NIST 1643d), mostram que a determinação de manganês na presença de vários outros íons metálicos foi satisfatória e que este procedimento pode ser aplicado para a análise desse tipo de amostra.

BORGES et al.^[50] empregaram o fenômeno da separação de fases de surfactantes não iônico para realizar a extração de Cd, Pb e Pd em amostras de digeridos de sangue, utilizando como agente complexante o DDTP em meio de ácido clorídrico e como surfactante o Triton X-114 e foi realizada a determinação por ET AAS. A extração em ponto nuvem com o Triton X-114 e DDTP demonstrou ser um procedimento versátil e relativamente simples de extração e pré-concentração desses metais em baixas concentrações em matrizes complexas como o sangue. A separação ocorreu de forma eficiente, resultando em bons fatores de enriquecimento (Cd = 71, Pb = 34 e Pd = 100 vezes) e baixos LODs (Cd = $0,02$, Pb = $0,08$ e Pd = $0,014 \mu\text{g L}^{-1}$).

DONATI et al.^[51] utilizaram o método de pré-concentração em ponto nuvem para determinação de cobalto em materiais biológicos (tecidos vegetais e animais) utilizando como agente complexante o pirrolidinaditiocarbamato de amônio (APDC) e como agente surfactante o Triton X-114 e a determinação foi realizada pela técnica de espectrômetro de absorção atômica com forno tubular na chama (TS-FF-AAS). O emprego desta técnica permitiu a determinação de Co com um LOD de $2,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e um RSD de 5,8%. Assim o método proposto apresenta boa sensibilidade para a determinação do cobalto no controle de qualidade dos alimentos. O fator de enriquecimento alcançado foi de cerca de 200 vezes.

Em 2006 WU et al.^[52] também utilizaram a técnica TS-FF-AAS aliada a CPE para a separação / pré-concentração de traços de cádmio em amostras de água e urina. Os autores utilizaram como agente complexante o APDC e como agente surfactante o Triton X-114. O LOD alcançado foi de $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ e um fator de enriquecimento de 13 vezes. Segundo os autores, o surfactante favorece a limpeza do capilar durante a análise evitando efeito de memória. O método proposto foi promissor para aplicações na análise ambiental e biológica para determinação de analitos ao nível de traços.

Em 2009 MATOS et al.^[53] através da pré-concentração por ponto nuvem realizaram a especiação de Cr (VI) e Cr (III) em amostras de água de rio. Foram utilizados como agente complexante o 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) e como agente surfactante o Triton X-114. O LOD foi de $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$ e o fator de enriquecimento foi de 48 vezes. O procedimento permitiu recuperações de 84-115% e um desvio padrão relativo inferior a 4,2%. Os resultados analíticos de cromo total nas amostras de águas fluviais estudadas foram concordantes com os resultados encontrados por F AAS. Assim, provou-se que o procedimento pode ser empregado com êxito como uma alternativa para a pré-concentração e especiação comumente usadas em técnicas analíticas.

OHASHI et al.^[54] estudaram o comportamento da extração em ponto nuvem de ferro (III) e vanádio (V), utilizando derivados de 8-quinolinol (HA) e Triton X-100 com determinação por GF AAS em material de referência de água fluvial. A proposta do método pode ser aplicada a um pré-tratamento eficaz simples de várias técnicas analíticas, tais como AAS, ICP MS, cromatografia de troca iônica e CE. O limite de detecção e a seletividade do analito podem ser melhorados, alterando a concentração do surfactante e quelante. O método proposto pode ser aplicado para a determinação de traços de diferentes íons metálicos (Co, Ni, Cu, Zn e Al) em várias amostras de águas. O fator de enriquecimento mais elevado para o Fe (III) (102,4 vezes) foi alcançado quando se utilizou 0,1% de Triton X-100 (v / v). Já para o V (V) a melhor resposta em relação ao fator de enriquecimento (57,7 vezes) foi alcançada quando se utilizou 0,4% de Triton X-100 (v / v).

SHEMIRANI et al.^[55] determinaram arsênio (III) e arsênio (V) em água de torneira e arsênio total em amostras biológicas por extração em ponto nuvem e GF AAS. Após a reação de As (V) com o molibdato para formação de um complexo de ácido heteropoliácido amarelo em meio de ácido sulfúrico a temperatura a $55 \text{ }^\circ\text{C}$, os analitos foram quantitativamente extraídos para a fase rica não iônica (Triton X-114). O arsênio inorgânico total foi extraído da mesma forma após a oxidação de As (III) para As (V) com KMnO_4 . A concentração de As (III) foi calculada pela diferença da concentração total e do As (V). A separação ocorreu de forma eficiente, resultando num fator de enriquecimento da ordem de 52 vezes e LOD de $0,01 \text{ ng L}^{-1}$. O uso de modificador químico no

extrato orgânico simplificou todo o processo e o uso de altas temperaturas de pirólise melhorou a forma do sinal e a sensibilidade.

A metodologia de pré-concentração utilizando o fenômeno do ponto nuvem também foi estudada por GIOKAS et al.^[56] na determinação do ferro, cobalto e níquel por F AAS. O método proposto empregou a formação de complexos de espécies metálicas com APDC, que são posteriormente extraídos no interior das micelas do surfactante Triton X-114. A fase rica em surfactante foi diluída em uma solução metanólica acidificada, e determinadas por F AAS acoplado a um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA), permitindo injeções reproduzíveis de pequenos volumes da amostra. Esse trabalho mostrou que a extração em ponto nuvem pode superar vários problemas e interferências encontradas na determinação destes metais, criando uma micela estável num microambiente, que permite maior reprodutibilidade dos resultados. Além disso, o método permitiu um efetivo controle das interferências. O fator de pré-concentração foi de 20 vezes.

CHEN & TEO^[57] estudaram a extração em ponto nuvem para pré-concentração de cobalto e níquel, utilizando 1-(2 thiazolilazo)-2-naftol (TAN) como agente complexante, Triton X-114 como surfactante e posteriormente determinação por espectrometria de absorção atômica. Esse trabalho destaca o Triton X-114 como um excelente surfactante devido suas características físico-químicas: baixa temperatura para atingir o fenômeno do ponto nuvem; alta densidade da fase rica em surfactante, o que facilita a separação de fases por centrifugação; disponibilidade comercial e preços relativamente baixos, falta de grupos eletroativos em sua molécula e baixa toxicidade. TAN é um complexante muito estável e bastante seletivo. Além da fase rica em surfactante poder ser diretamente introduzida no nebulizador da F AAS após a diluição com metanol. O método proposto pode ser aplicado para determinação de metais em várias amostras de água e outras amostras ambientais. Os limites de detecção alcançados para o cobalto e o níquel foram de 0,24 e 0,44 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente e os fatores de enriquecimento foram de 57 vezes para o cobalto e de 65 vezes para o níquel.

Em 2008 MADRAKIAN & GHAZIZADEH^[58] utilizaram o processo de extração em ponto nuvem para determinação de molibdênio (VI) em amostras

de aço e de água. No processo de extração em ponto nuvem foi usado tensoativo CTAB para extrair Mo (VI) das soluções aquosas investigadas. O método foi baseado na reação colorimétrica do molibdênio com vermelho bromopirogalol na presença de iodeto de potássio em pH 1,0. O limite de detecção alcançado foi de $0,1 \text{ ng L}^{-1}$ com um fator de enriquecimento de 20 vezes. A comparação entre o método proposto de extração em ponto nuvem com outros métodos de pré-concentração como a extração em fase sólida para determinação de molibdênio indicam que o método proposto tem um limite de detecção mais baixo e é um método conveniente, seguro, simples, rápido e barato para determinações de traços de molibdênio em amostras reais.

Em 2010 SILVA et al.^[59] propuseram um procedimento analítico limpo baseado em extração em ponto nuvem para a determinação de cobre e ferro em materiais vegetais. Os autores utilizaram como agente complexante TAN e Triton X-114 ea determinação foi realizada por F AAS. Os fatores de enriquecimento alcançado foram em torno de 30 vezes. Os autores mostraram uma diminuição no consumo de reagentes e a redução significativa da geração de resíduos quando se utilizou o procedimento de extração em ponto nuvem.

FILIK et al. em 2008^[60] realizaram uma determinação seletiva de vanádio total em amostras de água por extração em ponto nuvem do complexo ternário de vanádio. Esse elemento foi complexado com 1 - (2-piridilazo) - 2-naftol (PAN) e peróxido de hidrogênio em meio ácido (ácido fosfórico) usando como agente surfactante o Triton X-100. As determinações foram realizadas por F AAS. Os autores realizaram testes de seletividade e não foram observadas interferência dos elementos/espécies Na, K, Ca (II), Mg (II), cloreto, sulfato e nitrato, Al (III), Mn (II), Zn (II), Cr (III), Co (II), Ni (II), Cd (II), Cu (II) e Pb (II) quando em até 2000 vezes em excesso. Um papel importante do ácido fosfórico foi a sua utilização como agente mascarante de ferro (III) e o fator de enriquecimento foi de 33 vezes.

Em 2009 FILIK et al.^[61] propuseram em um novo trabalho, a extração seletiva por ponto nuvem e determinação por GF AAS de íons de Mo (VI) em amostras de água do mar após complexação com Quinalizarine (QA) e seguida da extração com Triton-X 114. O QA se mostrou altamente seletivo para Mo (VI) em pH 3,0 e somente Fe (III) e Al (III) foram extraídos juntamente com

molibdênio. Para diminuir a interferência do Fe e Al nas determinações, os autores empregaram 1 mL de fluoreto de amônio [NH₄F]. O NH₄F se mostrou um agente mascarante eficiente mesmo quando o Fe e Al estavam em um excesso de 1000 vezes. O fator de enriquecimento alcançado foi de 25 vezes e a proposta do procedimento se mostrou versátil e adequada para a determinação de concentrações muito pequenas de molibdênio em amostras de água do mar.

Em 2011 MADRAKIAN et al.^[62] desenvolveram um método espectrofotométrico para determinação simultânea de V (V) e Mo (VI) depois de uma extração em ponto nuvem em amostras de alimentos. O CTAB foi utilizado como agente surfactante e o complexante foi o vermelho bromopirogalol (BPR). Os limites de detecção do método foram de 0,5 e 1,0 ng mL⁻¹ para V (V) e Mo (VI), respectivamente. O fator de enriquecimento foi de 20 vezes.

2.3. Materiais e Métodos

2.3.1. Equipamentos e acessórios

No desenvolvimento da parte experimental foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com chama (Varian AA240FS, Mulgrave, Austrália) equipado com uma lâmpada de arco de deutério para a correção da radiação de fundo. Para a determinação do V e Mo foram utilizadas como fonte de radiação lâmpadas de catodo oco. Os parâmetros instrumentais empregados estão descritos na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Condições experimentais do FAAS.

Parâmetros	Vanádio	Molibdênio
Resolução espectral (nm)	0,5	0,5
Comprimento de onda (nm)	318,5	313,3
Vazão de acetileno (L min ⁻¹)	7,6	7,6
Vazão de oxido nitroso (L min ⁻¹)	11,0	11,0
Correntes das lâmpadas de catodo oco (mA)	20	7
Altura do queimador (mm)	10	10
Taxa de aspiração	2,5	2,5

Devido ao pequeno volume obtido na fase rica foi necessário construir um aparato adequado para introdução da amostra no F AAS. Essa introdução foi realizada com o auxílio de uma ponteira de micropipeta com capacidade de 1000 μL que foi diretamente conectada à tubulação do nebulizador pneumático através de um capilar de politetrafluoroetileno (PTFE) e fixada em um suporte universal. As microinjeções manuais (aspiração discreta) foram realizadas com o auxílio de uma micropipeta de volume variável de 100 a 1000 μL (Eppendorf, Alemanha). Conforme apresentado na Figura 2.3. Volumes de cerca de 50 a 400 μL foram diretamente inseridas na ponteira acoplada na saída do sistema de nebulização.



Figura 2.3. Ilustração do sistema de aspiração discreta.

Os sinais analíticos foram monitorados de duas diferentes formas: pela altura dos picos (quando a introdução da amostra foi realizada de forma contínua) e pela área dos picos (quando a introdução da amostra foi de forma discreta).

Um pHmetro (PHS-3B, Phtek, China) foi utilizado para medir valores de pH. Um banho termostatizado (AquaWave 9374, Barnstead/Lab-Line, Alemanha) e uma centrífuga (Hermle/Labnet Z200A, Alemanha) foram necessárias para os processos de extração e separação.

2.3.2. Amostras

Neste capítulo foram empregadas as seguintes amostras:

Complexo vitamínico: é um medicamento composto por diversos elementos químicos e é recomendado como suplemento alimentar, com a finalidade de suprir as necessidades de micronutrientes da dieta humana.

Vanádio quelato: é um medicamento de manipulação fabricado de forma personalizada prescrito na dose e quantidade exatas para o tratamento do paciente. É recomendado para o tratamento dos diabéticos não insulino-dependentes. Suas propriedades agem sobre os principais tecidos sensíveis à insulina. Em atletas, promove o aumento do transporte de glicose, o

metabolismo e a síntese de glicogênio nos músculos, melhora o sistema imunológico e assegura o depósito de cálcio nos ossos e dentes.

Amostras de solo da Antártica: que foram coletadas no ano de 2008 na Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz na Ilha Rei George, Antártica Marítima. Essas amostras foram utilizadas pelo Dr. Marcelo Braga Bueno Guerra no desenvolvimento de sua tese de doutoramento, e dentre as várias amostras por ele coletadas 4 foram selecionadas para este trabalho, sendo 2 coletadas em áreas com evidente impacto antrópico, próximas aos tanques de óleo diesel que abastecem a estação (amostras A e B) e 2 coletadas distantes até quatro quilômetros da estação (amostras C e D).

E por fim uma amostra de água mineral adquirida no comércio local da cidade de São Carlos – SP.

No preparo da amostra de complexo multivitamínico foi utilizado um bloco digestor (Q-327M242, Quimis, São Paulo, SP, Brasil). Para o procedimento de extração do medicamento Vanádio Quelato foi usado um agitador de bancada (Barnsteady, Iowa, EUA) e um ultra-som (Barnstead / Lab-Line do Aqua Onda 9374). E no preparo das amostras de solo foi utilizado um forno de radiação micro-ondas com cavidade modelo Ethos (Milestone, Sorisole, Itália).

Os digeridos das amostras de solo foram analisados por um ICP OES (Vista AX – CCD Simultaneous, Varian, Mulgrave, Austrália) equipado com detector de estado sólido (CCD – dispositivo de carga acoplada). Esses resultados foram empregados como referência.

2.3.3.Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico e água ultrapura obtida de um sistema de purificação Milli-Q® (Millipak-40 Filter Unit 0,22 µm NPT, Bedford, MA, EUA) com resistividade de 18,2 MΩ cm. As soluções analíticas de V e Mo foram preparadas por diluições sucessivas a partir de uma solução estoque de 1000 mg L⁻¹ (Qhemis High Purity, São Paulo, Brasil) destes elementos.

A solução tampão de ácido acético/acetato de sódio 2 mol L^{-1} foi preparada a partir de acetato de sódio (Labsynth, São Paulo, SP, Brasil) e ácido acético glacial (Qhemis, São Paulo, Brasil) em concentrações e proporções apropriadas para o ajuste do pH em 3,75 e 4,50.

Os agentes complexantes 8-hidroxiquinolina (8-HQ) (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 1 - (2-piridilazo) 2-naftol (PAN) (Sigma Aldrich, St Louis, EUA), foram preparados diariamente dissolvendo a quantidade apropriada dos reagentes em 10 mL de etanol e armazenada num frasco âmbar. Os surfactantes não-iônicos Triton X-114 e Triton X-100 (Sigma Aldrich) foram preparados por diluição do produto disponível comercialmente.

Para as diluições das fases ricas que continham o analito foram utilizados etanol 99,5% (Tec Lab, São Paulo, SP, Brasil) e metanol (Tedia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

2.3.4.Preparo das amostras

A amostra de complexo multivitamínico adquirida no comércio local de São Carlos - SP passou por um processo de digestão total. Neste procedimento, a amostra foi moída manualmente utilizando almofariz e pistilo de ágata até homogeneização. Em seguida, foram pesados cerca de 0,100 g de amostra e transferidos quantitativamente para tubos do bloco digestor. Posteriormente foram adicionados ao tubo 3 mL de HNO_3 concentrado e em seguida as amostras foram aquecidas sob temperatura de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h. Após o resfriamento dos tubos, foi adicionado 1 mL de H_2O_2 e a temperatura do bloco foi aumentada lentamente até atingir $180 \text{ }^\circ\text{C}$. Os tubos foram retirados do bloco digestor quando o volume da amostra foi de aproximadamente 0,5 mL e transferidos para tubos de polipropileno com capacidade de 15 mL e o volume final ajustado com água deionizada até 10 mL para posterior extração e determinação de $\text{Mo}^{[63]}$.

A amostra do medicamento Vanádio Quelato foi adquirida numa farmácia de manipulação localizada na cidade de São Carlos – SP. A amostra foi moída da mesma forma que o complexo multivitamínico. Antes do procedimento de extração em ponto nuvem, 0,100 g de amostra foram pesados

e transferidos para tubos de polipropileno de 15 mL, a seguir foi adicionado 5 mL de HNO_3 a 1 mol L^{-1} . Esses tubos foram colocados num agitador de mesa horizontal durante 10 min e, em seguida, eles foram colocados num banho de ultrassom por mais 10 min. Após o processo de extração, a amostra foi centrifugada durante 5 min a 3000 rpm e o sobrenadante foi submetido ao procedimento de extração em ponto nuvem^[64].

O procedimento para o preparo das amostras de solo consistiu em promover a digestão ácida utilizando um forno de radiação micro-ondas com frascos fechados de PFA, onde foram adicionados água régia (6 mL de HCl e 2 mL de HNO_3 ambos concentrados) mais 1 mL de HF (40% m/m) para uma massa de amostra de aproximadamente 0,250 g. O programa de aquecimento foi realizado em 3 etapas: (1) temperatura de $160 \text{ }^\circ\text{C}$ e potência de 800 W por 8 min (2) temperatura de $160 \text{ }^\circ\text{C}$ e potência de 800 W por 10 min e (3) ventilação por 10 min. Aos digeridos foram acrescentados 12 mL de H_3BO_3 a fim de neutralizar o HF remanescente, e só então o volume final foi ajustado para 25 mL com água desionizada.

As amostras de água mineral foram submetidas diretamente ao procedimento de extração em ponto nuvem sem nenhum tratamento prévio.

2.3.5. Procedimentos da extração em ponto nuvem individual para o V e Mo.

Para o procedimento de extração em ponto nuvem individual para o V e Mo, foi realizado inicialmente um planejamento fatorial 2^4 independente para cada analito, com o intuito de identificar as variáveis relevantes dentre as quais: tipo de agente complexante (PAN e 8-HQ), volume (0,5 e 1 mL) das soluções dos agentes complexantes, concentração (0,1 e 0,5% m v^{-1}), e o pH (4,5 e 3,75). Posteriormente, foi realizado outro planejamento fatorial 2^4 , no qual foram analisadas as variáveis: tempo de complexação (10 e 20 min), concentração (5 e 10% v v^{-1}), volume (0,5 e 1 mL) e tipo do agente surfactante (Triton X-100 e Triton X-114). Após a identificação das melhores condições, foi realizado um estudo sobre o tipo (etanol, metanol e uma mistura 1:1 de etanol e HNO_3 concentrado) e o volume (200 e 400 μL) de solvente utilizado para

diluição da fase rica. Toda a otimização dos procedimentos de extração em ponto nuvem foram realizados com uma solução padrão de 5 mg L^{-1} para ambos os analitos e o volume final da amostra foi igual a 10 mL. O procedimento geral da extração em ponto nuvem individual para o V e Mo está representado na Figura 2.4.

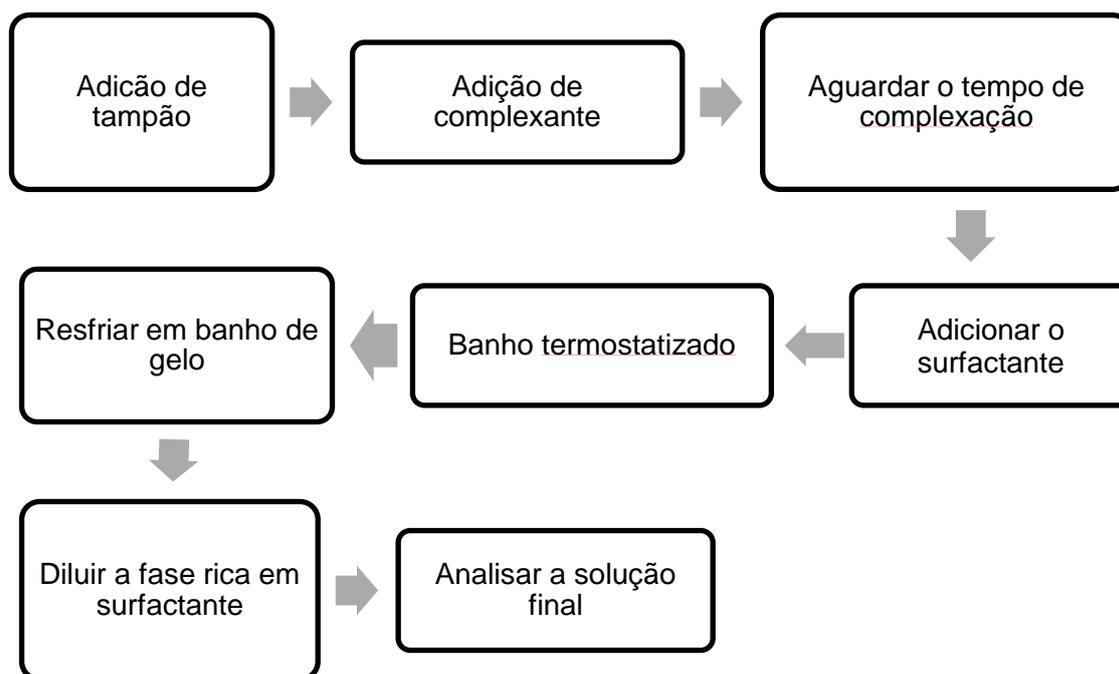


Figura 2.4. Fluxograma geral da extração em ponto nuvem individual para o V e Mo.

2.3.6. Procedimento de extração em ponto nuvem de forma simultânea para V e Mo

O procedimento de extração em ponto nuvem de forma simultânea para o V e Mo foi realizado levando em consideração as melhores condições da extração em ponto nuvem para esses elementos de forma individual.

No procedimento de CPE, 10 mL de uma solução contendo V e Mo, em diferentes concentrações (de $0,5$ a 4 mg L^{-1}) foram colocados em um tubo de plástico de 15 mL. Em seguida, 1 mL de tampão de acetato ($\text{pH} = 3,75$) e 0,5 mL de PAN, utilizado como agente quelante para V, foram adicionados à solução. Após 10 min de complexação, 1 mL de tampão de acetato ($\text{pH} = 4,5$)

e 0,5 mL de 8-HQ agente quelante para Mo foram adicionados. Depois de mais 10 min de complexação, 0,5 mL Triton X-114 a 5% (v m⁻¹) foi adicionado e os tubos de plástico foram colocados em um banho termostático durante 20 min a uma temperatura de 45 ° C. Subsequentemente, os tubos foram centrifugados a 3500 rpm durante 10 min. Após a separação, a fase contendo predominantemente água (fase pobre) foi removida com uma micropipeta e a fase rica em surfactante contendo os analitos de interesse foi diluída com 400 µL de etanol, uma vez que era necessário 200 µL de fase rica para medidas sequenciais de cada elemento no F AAS, a escolha do etanol como solvente para diluição foi por se tratar de um solvente menos tóxico em comparação com o metanol.

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Otimização das condições experimentais do procedimento de CPE para o vanádio

Devido ao grande número de variáveis estudadas no procedimento de extração em ponto nuvem a realização de planejamentos experimentais foi necessária para viabilizar os experimentos e facilitar a compreensão dos resultados obtidos.

Em todos os estudos para otimização das condições do procedimento de extração em ponto nuvem, a resposta monitorada foi o fator pré-concentração (PC) o qual foi calculado pela relação das absorvâncias médias da solução padrão antes e após a extração. As Tabelas 2.2 e 2.3 apresentam as respostas para os dois planejamentos fatoriais completos 2⁴ realizados para o vanádio.

Tabela 2.2. Primeiro planejamento fatorial completo 2^4 para o estudo das variáveis para o vanádio: tipo de agente complexante, volume e concentração das soluções dos agentes complexantes e pH.

Experimento	Complexante	Vol _{compl.}	[Complexante]	pH	P.C.
1	-1 (8-QH)	-1 (0,5 mL)	-1 (0,1 % m v ⁻¹)	-1 (3,75)	1,00
2	1 (PAN)	-1	-1	-1	3,27
3	-1	1 (1 mL)	-1	-1	0,85
4	1	1	-1	-1	0,39
5	-1	-1	1 (0,5 % m v ⁻¹)	-1	0,77
6	1	-1	1	-1	3,95
7	-1	1	1	-1	0,89
8	1	1	1	-1	2,40
9	-1	-1	-1	1 (4,5)	0,80
10	1	-1	-1	1	0,49
11	-1	1	-1	1	3,20
12	1	1	-1	1	0,29
13	-1	-1	1	1	1,47
14	1	-1	1	1	2,07
15	-1	1	1	1	0,81
16	1	1	1	1	3,06

Tabela 2.3. Segundo planejamento fatorial completo 2^4 para o estudo das variáveis para o vanádio: volume de agente surfactante, tempo de complexação, tipo e concentração do agente surfactante.

Experimento	Vol _{surf.}	Tempo _{compl.}	Tipo de surfactante	[surfactante]	PC
1	-1(0,5mL)	-1 (10 min)	-1 (Triton X-114)	-1 (10% v v ⁻¹)	1,88
2	1 (1 mL)	-1	-1	-1	5,05
3	-1	1 (20 min)	-1	-1	2,68
4	1	1	-1	-1	5,66
5	-1	-1	1 (Triton X-100)	-1	1,70
6	1	-1	1	-1	4,77
7	-1	1	1	-1	2,35
8	1	1	1	-1	4,70
9	-1	-1	-1	1 (5% v v ⁻¹)	1,38
10	1	-1	-1	1	6,90
11	-1	1	-1	1	2,63
12	1	1	-1	1	5,13
13	-1	-1	1	1	1,45
14	1	-1	1	1	5,13
15	-1	1	1	1	2,54
16	1	1	1	1	5,46

Podemos notar que as melhores condições encontradas no primeiro planejamento foram observadas no experimento 6, onde o melhor complexante foi o PAN na concentração 0,5%, e volume de 0,5 mL do agente complexante e 1,0 mL da solução tampão ácido acético/acetato de sódio com pH = 3,75.

A partir dessa melhor resposta foi realizado um segundo planejamento fatorial 2^4 (Tabela 2.3.). As melhores condições para a pré-concentração foram observadas no experimento 10 no qual se deu pela adição de 1,0 mL de surfactante Triton X-114 a 5% (m/v) e 10 min de complexação. Nessas condições a pré-concentração foi de aproximadamente 7 vezes.

A etapa de diluição da fase rica em surfactante é uma das mais importantes no procedimento, pois deve-se buscar uma condição de compromisso a qual diminua a viscosidade dessa fase sem alterar significativamente o fator de pré-concentração com uma grande diluição. Então, foi realizado um estudo sobre o tipo e volume de solvente utilizado nesse momento do procedimento. A Tabela 2.4 apresenta as respostas para esse estudo.

Tabela 2.4. Estudo da etapa de diluição da fase rica da CPE para o V.

Solvente	Volume (μL)	P.C.
Etanol	200	7,3
	400	4,9
Etanol + HNO_3	200	7
	400	4,8
Metanol	200	6,2
	400	8,7

Quando se utilizou 400 μL de metanol o fator de pré-concentração chegou a aproximadamente 9 vezes.

2.4.2. Estudo do volume de injeção para o vanádio

O estudo do efeito do volume sobre os sinais analíticos das soluções introduzidas por nebulização discreta foi necessário devido à dificuldade de

introduzir pequenos volumes no nebulizador do F AAS, pois a formação de microbolhas de ar na amostra pode alterar o perfil dos sinais transientes.

O procedimento CPE foi aplicado em soluções contendo 5 mg L^{-1} de V e utilizando uma ponteira de micropipeta conectada diretamente ao tubo de aspiração do nebulizador. Volumes variáveis entre 50 a 400 μL dessa solução foram inseridos. Quando a introdução da amostra foi feita de forma discreta, a aquisição do sinal analítico através da área do pico gerou sinais transientes e quanto maior o volume de injeção, maior o valor de absorvância integrada. A Figura 2.5 apresenta os perfis dos sinais analíticos obtidos para V empregando diferentes volumes de injeção.

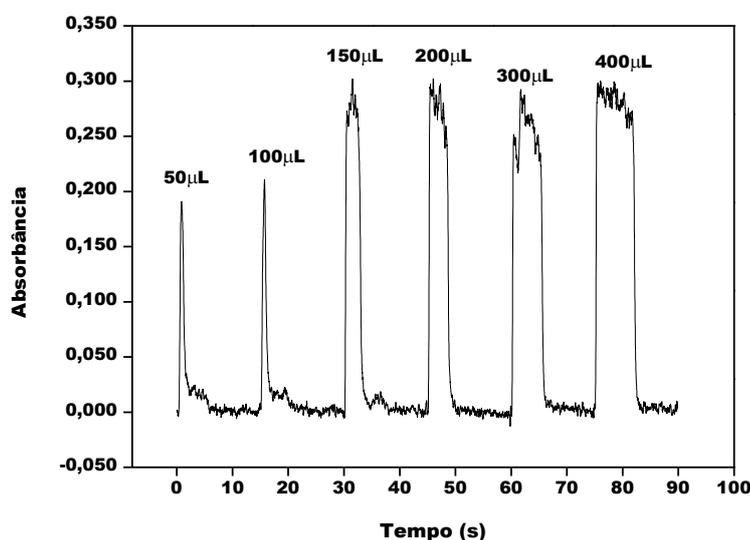


Figura 2.5. Perfis dos sinais analíticos obtidos para V em diferentes volumes de injeção com a extração em ponto nuvem.

Para os volumes estudados os desvios padrão relativos variaram de 3 a 12% ($n = 4$). Nesse trabalho, a introdução de 200 μL foi mais adequada considerando um sinal mensurável com boa repetibilidade e com o menor desvio padrão relativo igual a 3 ($n = 4$).

2.4.3. Obtenção dos parâmetros analíticos de desempenho individual para o vanádio.

Depois das condições otimizadas, curvas de calibração com e sem o procedimento de extração em ponto nuvem foram realizadas em duas diferentes formas de introdução da amostra, com nebulização contínua, onde o monitoramento dos sinais analíticos foi através da altura de pico (Figura 2.6.) e com nebulização discreta, onde o monitoramento dos sinais analíticos foi realizado pela área dos picos (Figura 2.7.).

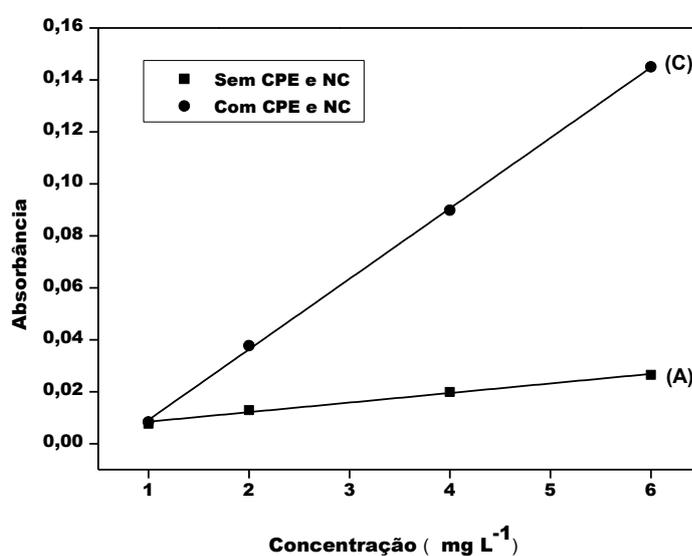


Figura 2.6. Curvas de calibrações sem e com a extração em ponto nuvem com nebulização contínua (NC).

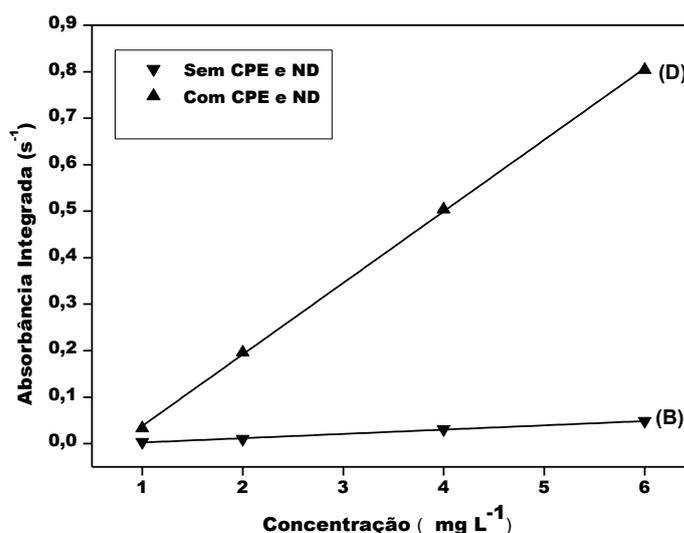


Figura 2.7. Curvas de calibrações sem e com a extração em ponto nuvem com nebulização discreta (ND).

A sensibilidade foi estudada através do cálculo do limite de detecção (LOD) e do limite de quantificação (LOQ) definidos como: $LOD = 3\sigma / s$ e $LOQ = 10\sigma / s$, onde s é o coeficiente angular das curvas analíticas, e σ é o desvio padrão de 10 medidas consecutivas do branco.

A extração em ponto nuvem aliada à nebulização discreta possibilitou uma melhora ainda maior na sensibilidade, isso foi comprovado observando as curvas analíticas de calibração obtidas com soluções padrão inorgânicas (soluções aquosas convencionais) e orgânicas (fase rica diluída em metanol) para o vanádio e introduzindo as soluções no nebulizador do F AAS de forma discreta e contínua. Na Tabela 2.5 estão apresentados os parâmetros de desempenho obtidos das curvas analíticas de calibração dentro da faixa linear de 1,0 a 6,0 mg L⁻¹.

Nesta etapa foi necessária a utilização da mesma faixa linear para todas as curvas tendo em vista a comparação das diferentes formas de nebulização com e sem o procedimento de extração em ponto nuvem.

Tabela 2.5. Parâmetros de desempenho obtidos com diferentes formas de nebulização com e sem CPE para o V.

Tipos de curvas	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coefficiente angular (L mg^{-1})s	r^2
(1) Sem CPE e NC	693	2309	0,004	0,992
(2) Sem CPE e ND	122	406	0,009	0,996
(3) Com CPE e NC	127	424	0,027	0,992
(4) Com CPE e ND	77	257	0,154	0,999

NC: Nebulização contínua

ND: Nebulização discreta

Ao compararmos os coeficientes angulares obtidos pela curva obtidas com a nebulização discreta sem e com CPE, curvas 2 e 4, respectivamente, podemos observas um aumento na sensibilidade em torno de 17 vezes.

Se formos mais além e compararmos os coeficientes angulares da combinação proposta nesse trabalho (Com CPE e ND) que está representada na curva 4 com a forma que normalmente é realizada as determinações de vanádio no F AAS (curva 1) podemos observar um aumento na sensibilidade ainda maior, em torno de 38 vezes.

2.4.4. Otimização das condições experimentais do procedimento de CPE para o molibdênio.

Assim como para o vanádio, foram realizados dois planejamentos fatoriais completos 2^4 para otimização das melhores condições para extração em ponto nuvem de molibdênio. As Tabelas 2.6 e 2.7 apresentam as respostas para os dois planejamentos.

Tabela 2.6. Primeiro planejamento fatorial completo 2^4 para o estudo das variáveis: tipo de agente complexante, volume e concentração das soluções dos agentes complexantes e pH para o Mo.

Experimento	Complexante	Vol _{compl.}	[Complexante]	pH	P.C.
1	-1 (PAN)	-1 (0,5 mL)	-1 (0,1 % m v ⁻¹)	-1 (4,5)	0,6
2	1 (8-HQ)	-1	-1	-1	8,9
3	-1	1 (1 mL)	-1	-1	0,4
4	1	1	-1	-1	3,9
5	-1	-1	1 (0,5 % m v ⁻¹)	-1	0,5
6	1	-1	1	-1	20,4
7	-1	1	1	-1	0,0
8	1	1	1	-1	14,1
9	-1	-1	-1	1 (3,75)	0,4
10	1	-1	-1	1	7,9
11	-1	1	-1	1	0,4
12	1	1	-1	1	0,2
13	-1	-1	1	1	0,7
14	1	-1	1	1	8,4
15	-1	1	1	1	0,0
16	1	1	1	1	0,8

Tabela 2.7. Segundo planejamento fatorial completo 2^4 para o estudo das variáveis: volume de agente surfactante, tempo de complexação, concentração e tipo de agente surfactante para o Mo.

Experimento	Vol _{surf.}	Tempo _{compl.}	[surfactante]	Tipo de surfactante	P.C.
1	-1(0,5 mL)	-1 (10 min)	-1 (5% v v ⁻¹)	-1 (Triton X-100)	11,8
2	1 (1 mL)	-1	-1	-1	13,8
3	-1	1 (20 min)	-1	-1	3,6
4	1	1	-1	-1	10,6
5	-1	-1	1(10% v v ⁻¹)	-1	10,8
6	1	-1	1	-1	5,8
7	-1	1	1	-1	7,3
8	1	1	1	-1	6,9
9	-1	-1	-1	1 (Triton X-114)	15,1
10	1	-1	-1	1	11,9
11	-1	1	-1	1	13,8
12	1	1	-1	1	9,5
13	-1	-1	1	1	15,1
14	1	-1	1	1	15,0
15	-1	1	1	1	12,0
16	1	1	1	1	12,6

Avaliando os resultados obtidos no primeiro planejamento (Tabela 2.6.), podemos perceber que os maiores efeitos observados foram para o tipo de complexante (efeito = 8) e o pH (efeito = -4). Desta forma, a situação ideal seria utilizar a 8-HQ (nível 1) e o pH 4,5 (nível -1). No segundo planejamento as variáveis mais importantes foram o tipo de surfactante (efeito = 4) e tempo de complexação (efeito = -3). Novamente a melhor condição de trabalho foi obtida ao utilizar o Triton X-114 (nível 1) e o tempo de 10 min (nível -1). As demais variáveis de ambos planejamentos não apresentaram efeitos significativos nas faixas estudadas.

A Tabela 2.8 apresenta as respostas para o estudo sobre o tipo e volume de solvente utilizado na etapa de diluição.

Tabela 2.8. Estudo da etapa de diluição da fase rica da CPE para o Mo.

Solvente	Volume (μL)	P.C.
Etanol	200	30,9
	400	21,6
Etanol + HNO_3	200	23,9
	400	18,4
Metanol	200	29,1
	400	21,3

A melhor condição da diluição da fase rica foi quando se utilizou 200 μL de etanol. Com esse estudo o fator de pré-concentração foi de aproximadamente 31 vezes.

2.4.5. Estudo do volume de injeção para o Mo.

Assim como para o vanádio, o efeito do volume introduzido por nebulização discreta sobre os sinais analíticos foi estudado. O procedimento empregado foi o mesmo, só que os volumes injetados variaram entre 50 e 200 μL como mostrado na Figura 2.8.

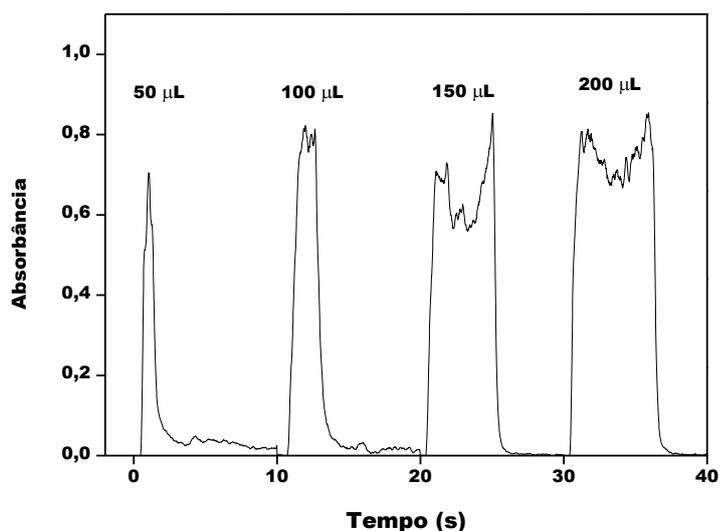


Figura 2.8. Perfis dos sinais analíticos obtidos para Mo em diferentes volumes de injeção com a extração em ponto nuvem.

Da mesma forma que para o vanádio a aquisição do sinal analítico foi através da área do pico e a introdução de 200 µL foi mais adequada considerando-se a boa repetibilidade e o menor desvio padrão relativo de 7,5 (n = 4).

2.4.6. Obtenção dos parâmetros analíticos de desempenho individual para o molibdênio.

A comparação das curvas de calibração obtidas com soluções padrão inorgânicas (soluções aquosas convencionais) e orgânicas (fase rica diluída em etanol) para o molibdênio, assim como para o vanádio também comprovou a melhora da sensibilidade aliada à nebulização discreta.

Com essas melhores condições obtidas até então foram realizadas curvas de calibração com e sem o método de CPE (Figura 2.9 e 2.10.).

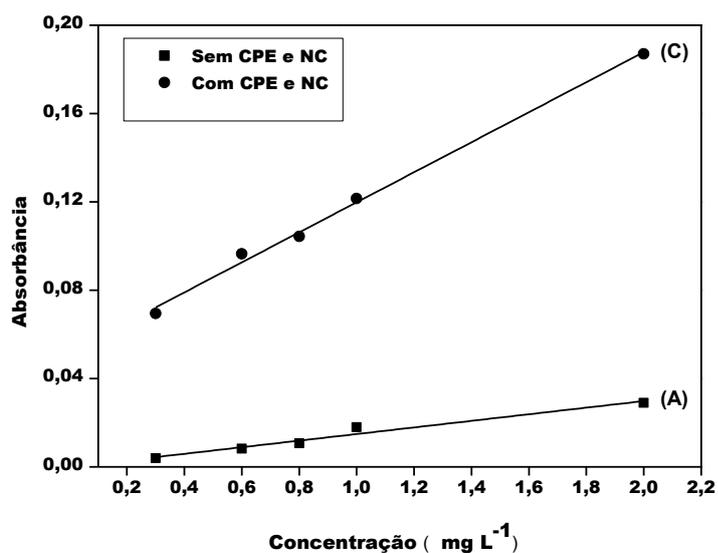


Figura 2.9. Curvas de calibrações sem e com a extração em ponto nuvem com nebulização contínua para o Mo.

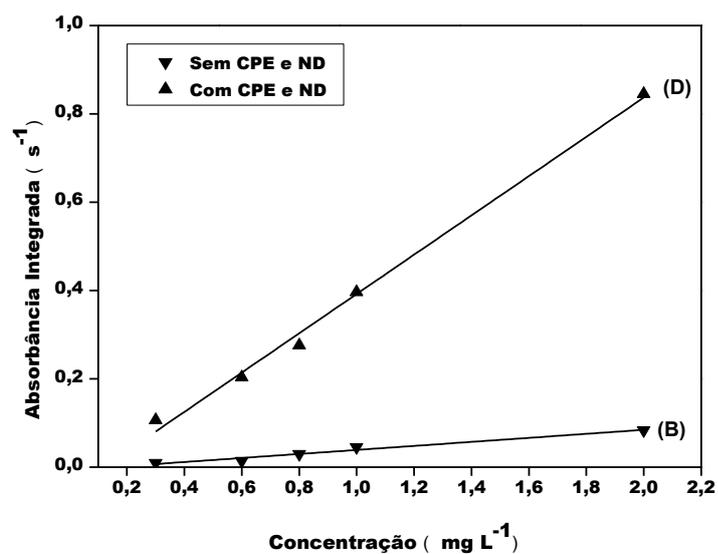


Figura 2.10. Curvas de calibrações sem e com a extração em ponto nuvem com nebulização discreta para o Mo.

Na Tabela 2.9 estão apresentados os parâmetros de desempenho obtidos das curvas analíticas de calibração dentro da faixa linear de 0,3 a 4,0 mg L⁻¹.

Tabela 2.9. Parâmetros de desempenho obtidos com diferentes formas de nebulização com e sem CPE para o Mo.

Tipos de curvas	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coefficiente angular ($\text{L mg}^{-1}\text{s}$)	r^2
(A) Sem CPE e NC	300	900	0,014	0,967
(B) Sem CPE e ND	200	700	0,043	0,976
(C) Com CPE e NC	100	200	0,068	0,996
(D) Com CPE e ND	20	80	0,445	0,995

A mesma comparação dos coeficientes angulares feita para as curvas do vanádio pode ser realizada para o molibdênio. A comparação entre os coeficientes angulares das curvas 2 e 4 mostra um aumento na sensibilidade em torno de 10 vezes. Se a comparação for realizada entre os coeficientes angulares das curvas 1 (como normalmente é realizada a medida no F AAS) e 4 (método proposto) o aumento na sensibilidade é em torno de 32 vezes.

2.4.7. Aplicação do procedimento de CPE em amostras de água mineral.

Após aperfeiçoar o processo de injeção discreta e adotando as melhores condições de extração para o vanádio e o molibdênio individualmente foram escolhidas três amostras de água mineral e feitos testes de adição-recuperação (Tabela 2.10.). Concentrações de 0,83 de vanádio e 1,66 mg L^{-1} de molibdênio foram previamente adicionadas nas amostras antes da extração em ponto nuvem. As recuperações obtidas variaram de 93 a 109% evidenciando que não há presença do efeito matriz.

Tabela 2.10. Adição e recuperação de vanádio e molibdênio em amostras de água mineral.

Amostra	V (n=3)		Mo (n=3)	
	Valor encontrado (mg L^{-1})	Recuperações (%)	Valor encontrado (mg L^{-1})	Recuperações (%)
1	0,84 \pm 0,01	101	1,61 \pm 0,19	97
2	0,82 \pm 0,04	99	1,71 \pm 0,18	103
3	0,77 \pm 0,02	93	1,82 \pm 0,20	109

2.4.8. Aplicação do procedimento de CPE em amostras de medicamentos.

A determinação desses elementos nesse tipo de amostra é importante por que os efeitos fisiológicos do vanádio e molibdênio são bastante diversificados, sendo essenciais em níveis traços e potencialmente tóxico em uma concentração mais elevada.

Uma dieta animal pobre em vanádio, por exemplo, pode refletir em várias deficiências, como má formação óssea e crescimento retardado. Atualmente, a ingestão diária recomendada de V é estimada de 10 a 60 mg. Embora o V tenha aplicação em procedimentos terapêuticos, pouco se sabe sobre seus efeitos em humanos quando administrado por longos períodos, dessa forma, mais estudos são necessários para elucidar completamente o mecanismo molecular desses efeitos benéficos^[65, 66].

A deficiência de molibdênio na dieta humana inibe o crescimento celular e aumenta a susceptibilidade à cárie. A concentração de molibdênio no sangue humano é de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, entretanto, um aumento dessa concentração está associado com o risco de gota e esclerose^[67].

O digerido de complexo vitamínico foi submetido ao procedimento de extração em ponto nuvem, essa amostra apresentava concentração de Mo rotulada igual a $15 \mu\text{g g}^{-1}$ e o valor determinado foi de $15 \pm 2 \mu\text{g g}^{-1}$ obtendo uma recuperação de 98% (n=6). Para o vanádio, a concentração deste elemento nos digeridos foi menor que o LOQ.

Na aplicação do CPE no medicamento vanádio quelato a recuperação do vanádio foi obtida comparando-se com o valor de referência de $9,0 \text{ mg L}^{-1}$. A Tabela 2.11 mostra a concentração e a porcentagem de recuperação encontrada.

Tabela 2.11. Concentração de V obtida por CPE na amostra de vanádio quelato.

Analito	Valor determinado (mg L^{-1})	Recuperação (%)
V (n = 3)	$9,5 \pm 2,4$	107
Mo (n = 3)	<LOQ	-

2.4.9. Condições experimentais do procedimento de CPE simultâneo para determinação de vanádio e molibdênio.

Adotando as melhores condições experimentais para a extração de V e Mo de forma individual, foi realizado um procedimento visando à extração simultânea para esses elementos. A Figura 2.11 apresenta o procedimento seguido.

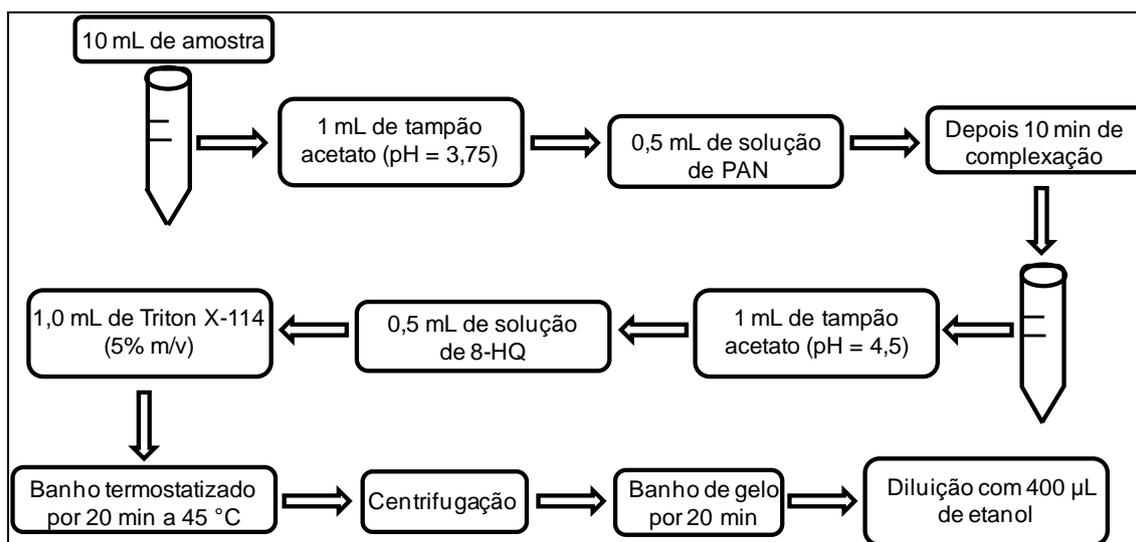


Figura 2.11. Esquema do procedimento de extração em ponto nuvem simultâneo para o V e Mo.

A diferença principal desse procedimento de extração em ponto nuvem simultâneo frente ao procedimento de extração em ponto nuvem realizado de forma individual para cada metal foram a adição de dois complexantes e o valor de pH final igual a 4,1. Além disso, na etapa da diluição da fase rica foi necessária a diluição com 400 µL de solvente, pois seriam usados no mínimo 200 µL da fase rica para determinação de forma sequencial para cada elemento. O solvente utilizado foi o etanol uma vez que se trata de um solvente menos nocivo ao meio ambiente.

2.4.10. Obtenção dos parâmetros analíticos de desempenho para extração simultânea de vanádio e molibdênio após extração em ponto nuvem.

Os parâmetros analíticos de desempenho do procedimento de extração em ponto nuvem para extração simultânea de V e Mo foram obtidos da mesma forma que aqueles obtidos de forma individual.

As curvas de calibração com o procedimento CPE simultâneo para o vanádio e molibdênio são apresentadas nas Figuras 2.12 e 2.13.

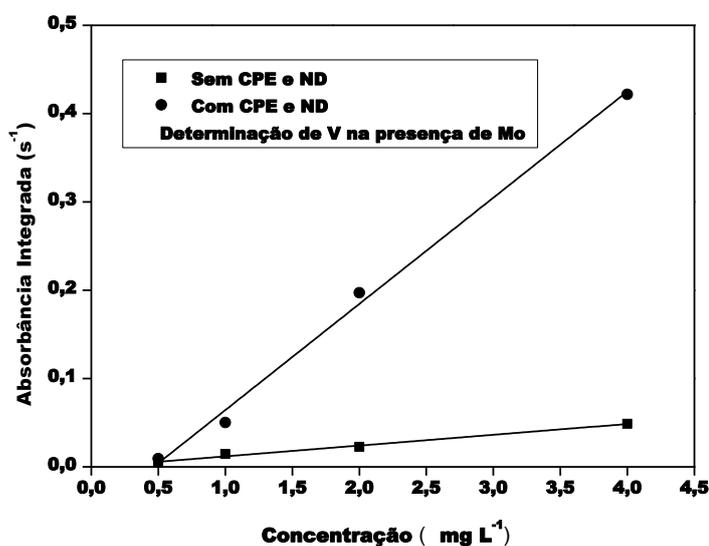


Figura 2.12. Curvas de calibração obtida pelo ponto nuvem simultâneo para o vanádio na presença do molibdênio.

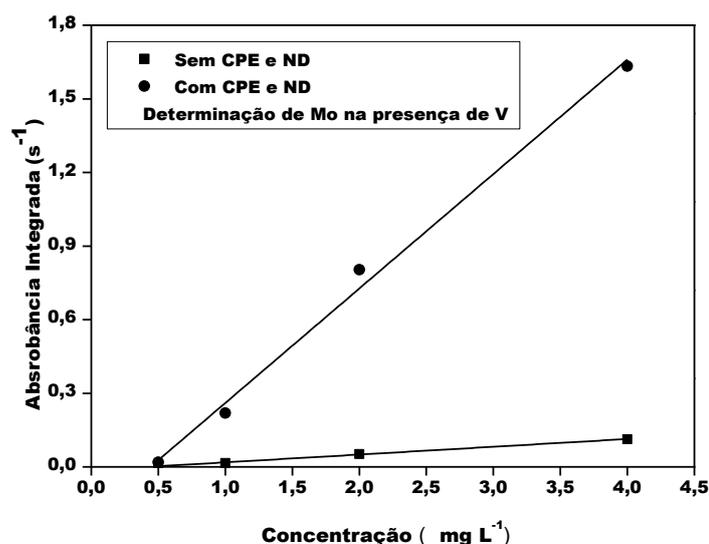


Figura 2.13. Curvas de calibração obtida pelo ponto nuvem simultâneo para o molibdênio na presença do vanádio.

Os limites de detecção e quantificação são apresentados na Tabela 2.12.

Tabela 2.12. Parâmetros de desempenho obtidos para o vanádio e o molibdênio pelo método do ponto nuvem simultâneo.

Analito	Curva de calibração	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coefficiente angular ($\text{L mg}^{-1}\text{s}$)	r^2
Vanádio	Com CPE e ND	80	268	0,112	0,989
Molibdênio	Com CPE e ND	70	240	0,466	0,996

O procedimento foi aplicado para a determinação destes elementos em amostras de água mineral e a precisão foi avaliada através da adição e recuperação $1,63 \text{ mg L}^{-1}$ de uma solução padrão desse dois elementos (Tabela 2.13.). As recuperações variaram 98-103% para V e 106-115% para Mo.

Tabela 2.13. Adição e recuperação de vanádio e molibdênio pelo ponto nuvem simultâneo em amostras de água mineral.

Amostras	V (n=4)		Mo (n=4)	
	Valor encontrado (mg L ⁻¹)	Recuperações (%)	Valor encontrado (mg L ⁻¹)	Recuperações (%)
1	1,69 ± 0,12	104	1,79 ± 0,12	110
2	1,68 ± 0,04	103	1,87 ± 0,21	115
3	1,60 ± 0,20	98	1,70 ± 0,17	106

Esses resultados mostraram que o método do ponto nuvem aplicado para a extração simultânea de V e Mo não sofreu interferência cruzada dos analitos, ou seja, os metais não competiram entre si pela extração.

2.4.11. Estudo sobre a interferência do ferro na determinação do vanádio e molibdênio.

Um estudo sobre a interferência do ferro na determinação do vanádio e molibdênio foi realizado. O Fe é um dos principais interferentes em estudos relativos à extração em ponto nuvem, pois esse elemento pode reagir com o complexante, comprometendo a eficiência da extração^[68, 69, 70]. Além disso, o Fe também tem sido extensivamente estudado como potencial interferente em amostras de formulações farmacêuticas^[71, 72]. O estudo foi realizado em 3 proporções analito:Fe diferentes (1:1, 1:10 e 1:100). A Tabela 2.14 apresentamos resultados obtidos quando as concentrações de V e Mo foram de 10,0 mg L⁻¹.

Tabela 2.14. Estudo da possível interferência Fe no procedimento de extração no ponto nuvem para Mo e V.

Analito	Taxa do analito + Fe	Recuperação (%)
Mo	1:1	99 ± 8
	1:10	51 ± 8
	1:100	24 ± 6
V	1:1	90 ± 9
	1:10	68 ± 6
	1:100	34 ± 6

Observou-se que a presença de Fe causa interferência no processo de pré-concentração de V e Mo acima da proporção de 1:10 (V: Fe e Mo: Fe), e observou-se cerca de 30 e 50% de redução no sinal de V e Mo, respectivamente.

2.4.12. Aplicação do procedimento de CPE em amostras de solo.

A determinação de elementos como o vanádio e o molibdênio em amostras de solos tem sido alvo de grande interesse^[73, 74], pois a vasta utilização desses compostos pela indústria química e as elevadas concentrações desses elementos presentes nos derivados do petróleo contribuíram para o aumento da disponibilidade dos mesmos no meio ambiente e para o crescente interesse em estudar os efeitos causados por eles.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) na resolução 357 classifica os valores orientadores para solo como: (1) Valores de Referência de Qualidade (VRQ); (2) Valor de Prevenção (VP) e (3) Valor de Intervenção (VI) que se subdivide em agrícola (área de proteção máxima), residencial e industrial [74]. Os valores estipulados para o V e Mo, de acordo com o CONAMA estão descritos na Tabela 2.15.

Tabela 2.15. Valores estipulados pelo CONAMA para V e Mo.

Substância	Solo (mg kg ⁻¹ de peso seco)				
	Referência de qualidade	Prevenção	Intervenção		
			Agrícola	Residencial	Industrial
Vanádio	275	-	-	-	-
Molibdênio	< 4	30	50	100	120

O valor máximo permitido no Estado de São Paulo pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) para molibdênio em água é 70 µg L⁻¹, a CETESB não faz menção ao V em água^[76].

As amostras de solo provenientes da Antártica passaram pelo procedimento de digestão e os teores de V determinados por ICP OES são

apresentados na Tabela 2.16. As concentrações de Mo nesses solos ficaram abaixo do LOQ da técnica.

Tabela 2.16. Concentração de V e Mo em amostras de solo da Antártica.

Amostras	Resultado observado (mg kg^{-1})	
	V	Mo
A	361 ± 14	<LOQ
B	325 ± 8	<LOQ
C	243 ± 7	<LOQ
D	245 ± 30	<LOQ

Todas as amostras apresentaram elevados teores de V o que pode estar associado com contaminação por derivados de petróleo (amostras A e B), embora elevadas concentrações de vanádio também tenham sido observadas em solos distantes da estação (amostras C e D).

A aplicação dessas amostras no procedimento de extração em ponto nuvem não foi possível uma vez que os elevados teores de Fe presentes nas amostras competiram com o V e Mo pelo complexante^[77].

A afinidade geoquímica do vanádio por óxido de Fe encontrado nesse solo também pode ter interferido de forma significativa no procedimento^[78].

Diversas alternativas foram realizadas no sentido de mascarar a interferência do Fe, como por exemplo o uso de Fenantrolina e EDTA porém os mesmos não surtiram resultados positivos.

2.5. Conclusões

A utilização da nebulização discreta como alternativa de introdução da amostra na F AAS foi eficiente e sensível para a determinação vanádio e molibdênio em diferentes amostras.

Foi possível a extração em ponto nuvem simultânea do V e Mo e a combinação da nebulização discreta com a extração em ponto nuvem promoveu menores limites de detecção.

CAPÍTULO 3. Combinação do procedimento de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) com a técnica LIBS para determinação de V e Mo.

3.1. Objetivo específico

Aplicar o procedimento de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) seguido da detecção com LIBS para a determinação de V e Mo em diferentes tipos de amostras.

3.2. Revisão da Literatura

3.2.1 Espectroscopia de Emissão com Plasma Induzido por Laser (LIBS)

3.2.1.1 Desenvolvimento e fundamentação da técnica LIBS

A teoria necessária para construção do primeiro laser foi proposta em 1958, por SHAWLOW & TOWNES^[79]. Em 1960, com a construção do primeiro laser de rubi foi possível estudar o potencial do uso de pulsos de laser na geração de pequenos plasmas^[4, 80]. Em 1962 BRECH^[81] utilizou um laser para produzir vapores na superfície de materiais metálicos e não metálicos. Esse experimento é considerado uma das primeiras técnicas analíticas a utilizar o laser como fonte de energia. Em 1963, DEBRAS-GUÉDON & LIODEC estudaram o primeiro uso do laser em análise espectroquímica de superfície^[4, 82].

Nas décadas de 60 e 70 as pesquisas com LIBS declinaram devido ao elevado custo da instrumentação e o baixo desempenho analítico, comparadas com outras técnicas tais como, GF AAS e ICP OES. Entre as décadas de 80 e 90 com o desenvolvimento dos lasers e de outros componentes da LIBS fez com que o interesse pela técnica reaparecesse e promoveu um grande avanço na adaptação da LIBS para análises qualitativa e quantitativa de diferentes amostras^[83].

Do ano 2000 até 2013 o interesse pela técnica tem crescido bastante como mostrado na Figura 3.1.

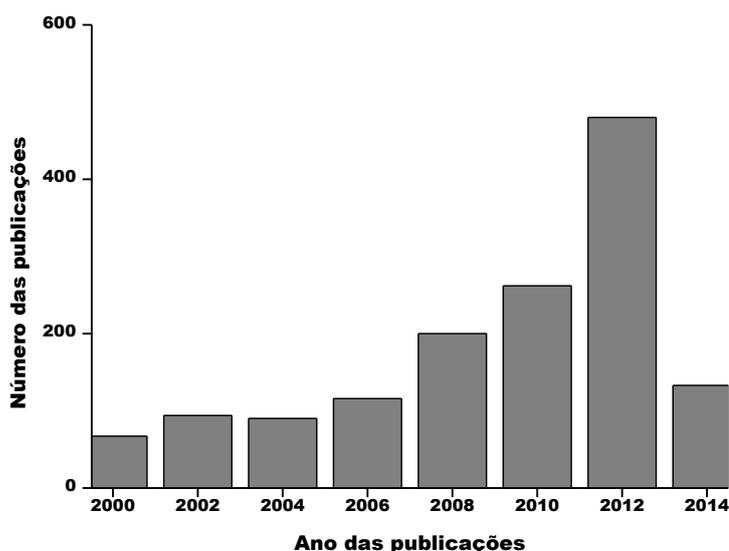


Figura 3.1. Números de publicações a cada 2 anos, busca realizada no ScienceDirect em 26/11/2013 com a palavra LIBS apenas.

A popularidade da técnica LIBS na área de análises química é devida principalmente à sua versatilidade e simplicidade da estrutura operacional. Dentre as principais características da técnica destacam-se: a aplicação direta em amostras sólidas, líquidas ou gasosas, com o mínimo ou nenhum pré-tratamento da amostra; as massas amostradas variam de 0,1 a 100 μg ou mais, dependendo das características do laser e da amostra; é considerada uma técnica pouco destrutiva, pois o efeito de um único pulso de laser sobre a amostra compromete pouco sua integridade; permite a portabilidade do equipamento, podendo ser levado para análises em campo e possibilita fazer medidas à distância, permitindo a aplicação da técnica em ambientes insalubres, garantindo maior segurança ao operador^[84].

Apesar de todas essas vantagens a técnica LIBS apresenta sensibilidade e reprodutibilidade inferior, quando comparada com outras técnicas instrumentais analíticas já consolidadas como o GF AAS, ICP OES, ICP MS, principalmente quando se refere a amostras líquidas^[84].

Entretanto, diversas aplicações têm demonstrado a habilidade da técnica LIBS para a determinação de vários elementos em diferentes tipos de amostras

como, por exemplo, em materiais biológicos^[85, 86], ligas metálicas^[87, 88], polímeros^[89, 90], solos e minerais^[91, 92], amostras geológicas^[93], entre outros.

Em 2011, o laboratório de ciências de Marte (MSL, *Mars Science Laboratory*) da NASA (*National Aeronautics and Space Administration*), construiu o ChemCam, o primeiro LIBS para exploração planetária com o objetivo de investigar a diversidade geoquímica e a composição elementar do solo e das rochas fora do planeta terra. Cousin e colaboradores^[94] desenvolveram um trabalho para criar ferramentas de suporte para a interpretação dos resultados obtidos pelo ChemCam.

A técnica LIBS tem como princípio fundamental a análise de emissões atômicas, iônicas e moleculares de espécies presentes em um plasma que é gerado por pulso de um laser de alta energia (a partir de 10 mJ a centenas de mJ). Esse laser é focalizado por lentes na superfície da amostra. A amostra se dissocia no plasma e as espécies excitadas emitem radiação nos comprimentos de onda característicos de cada elemento. A radiação emitida é recolhida por um espectrômetro e a intensidade da mesma é utilizada como resposta analítica^[95].

Esses princípios são semelhantes aos de outras técnicas espectrométricas de emissão atômica de plasma convencional, por exemplo ICP OES ou MIP OES. Entretanto, em LIBS não há necessidade de transportar a amostra para o plasma pois este é formado na/ou sobre a amostra *in situ* pela utilização de um feixe de laser focalizado. Um ajuste no sincronismo temporal entre os disparos do laser e a aquisição do sinal é necessário a fim de evitar a emissão do contínuo.

Os componentes principais de um LIBS são um laser com energia suficiente para gerar o plasma, um conjunto óptico, um sistema de detecção e um computador para controle, processamento e armazenamento dos dados^[95]. A Figura 3.2 ilustra um esquema típico de um espectrômetro LIBS.

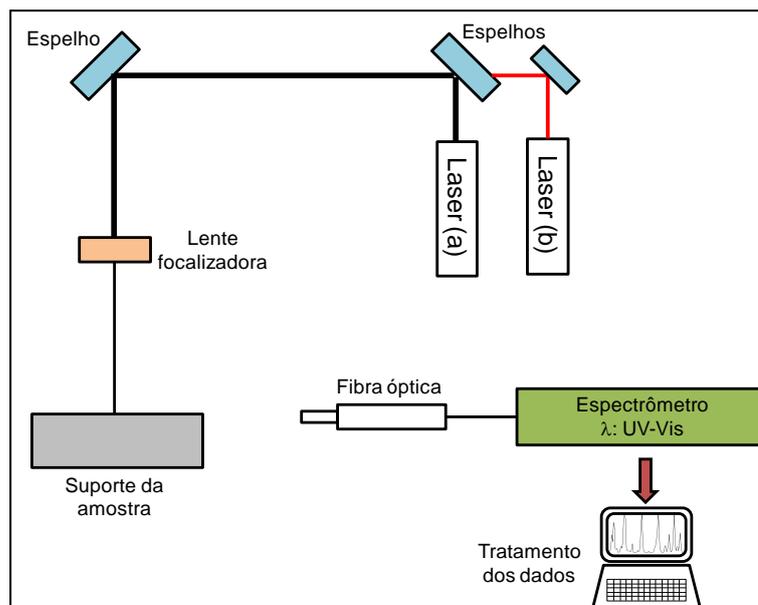


Figura 3.2. Esquema de um espectrômetro LIBS. Os lasers (a) e (b) referem-se ao laser de ablação da amostra e ao laser para visualização do local de incidência do laser de ablação, respectivamente.

Existe uma grande variedade de tipos de lasers que podem ser utilizados na técnica LIBS, cada tipo tem os seus parâmetros de operação e comprimentos de ondas específicos de trabalho.

Lasers de excímeros, por exemplo, são lasers pulsados cujo meio ativo é gasoso e emite radiação luminosa na região do ultravioleta. Para cada tipo de mistura gasosa obtém-se um determinado comprimento de onda da radiação, sendo as misturas gasosas características ArF (193 nm), KrF (248 nm), XeCl (308 nm) e XeF (351nm)^[96].

Outro tipo de laser também formado num meio gasoso é o laser de CO₂ que emitem radiação na região do infravermelho. Entretanto, a aplicação desses tipos de lasers em LIBS tem como desvantagem o frequente reabastecimento dos gases ou o uso de um fluxo de gás.

O tipo de laser mais comumente usado em aplicações com LIBS é o laser de Nd:YAG (íon Nd⁺³ incorporado no cristal de YAG - granada de ítrio e alumínio, do inglês *yttrium aluminum garnet*) (Y₃Al₅O₁₂-YAG). Esse laser proporciona uma fonte viável, compacta e fácil de usar. Ele tem um pulso de laser de alta densidade de energia concentrada e o plasma formado tem altas

temperaturas (8000 - 12000 K). Além disso, o comprimento de onda fundamental (1064 nm) pode ser facilmente deslocado para gerar pulsos com comprimento de onda fixos que variam nas regiões espectrais do infravermelho ao ultravioleta (266 nm, 355 nm e 532 nm)^[4].

Para a focalização dos pulsos do laser sobre a amostra faz-se o uso de lentes (plano-convexo, biconvexa, e convexo). Outra maneira para focalizar o pulso do laser é o uso de microscópios, permitindo uma melhor observação da superfície da amostra e conseqüentemente um foco mais preciso.

Para recolher a radiação emitida pelo plasma e dirigi-la para o seletor de comprimento de onda normalmente se utiliza fibras ópticas. Elas são muito utilizadas principalmente em aplicações em que o sistema de detecção não pode ser posicionado próximo do alvo. As fibras ópticas são simples e flexíveis, entretanto se ocorrer pequenas alterações na posição do plasma isso pode afetar a intensidade de luz observada^[4].

Telescópios também podem ser usados para focalizar e recolher a radiação emitida pelo plasma, permitindo que a amostra seja colocada a vários metros de distância do instrumento viabilizando análises de forma remota^[97].

A radiação amostrada pelo sistema óptico é direcionada para um monocromador/policromador que separa e seleciona os comprimentos de onda a serem monitorados. Um dos tipos de seletores de comprimento de onda mais utilizados são os do tipo Czerny-Turner com resolução óptica que podem resultar em resoluções menores que 0,1 nm e o policromador do tipo Echelle, esse último apesar do seu custo mais elevado, apresenta um ótimo desempenho devido principalmente a sua alta resolução e capacidade de cobrir simultaneamente uma grande faixa de comprimento de onda produzida pelos espectros do LIBS^[98].

A escolha do detector a ser usado na técnica LIBS depende de fatores como, por exemplo, o número de elementos a ser determinado e o tipo de método espectral^[4]. Detectores de carga acoplada (*charge coupled device-CCD*) são um dos mais utilizados principalmente por seu custo e capacidade multielementar. Entretanto, a intensificação desse tipo de detector tem ganhado espaço nos últimos anos, são os chamados detectores de carga acoplada

intensificados (ICCD). Eles são mais sensíveis, tem uma maior velocidade de resposta e tem capacidade de registrar sinais em janelas temporais da ordem de nano a microssegundos^[98,99].

Vale ressaltar que os processos envolvidos na formação de um plasma na superfície de um material ainda não estão bem estabelecidos. De forma geral quando um pulso focalizado de um laser incide sobre a superfície de um material, esse pulso promove a interação entre os elétrons que se recombinam com os íons para liberar energia. Depois ocorre a relaxação, onde os átomos, íons e fragmentos de moléculas excitados no plasma emitem um espectro de emissão característico do material volatilizado na amostra^[100].

Condições de funcionamento do laser como comprimento de onda (λ), duração do pulso (T) e energia (E) afetam significativamente as características e a natureza do plasma formado. Além disso, diversos outros fatores podem afetar a natureza do plasma formado tais como, a combinação da composição e pressão da atmosfera que rodeia a amostra além das propriedades mecânicas, físicas e químicas da matriz no qual o analito a ser determinado se encontra. Por esses motivos os processos envolvidos na formação de um plasma na superfície de um material são de difícil descrição^[95, 97].

3.2.1.2 Aplicação do LIBS

A grande maioria das aplicações com LIBS se dá em amostras no estado sólido, isso é devido principalmente à baixa necessidade de preparação da amostra nessa técnica.

SAMEK et al.^[101] em 2006 realizaram a determinação direta de Fe em folhas de plantas utilizando um laser de femtosegundos (fs), sendo que o procedimento sugerido pelos autores fornece informações sobre a distribuição do analito na folha.

Em 2009, SANTOS JR. et al.^[102] determinaram cádmio em amostras de solo moídas criogenicamente e posteriormente transformadas em pastilhas. Para diminuir a incerteza relacionada a heterogeneidade da amostra os autores realizaram uma amostragem com mais pontos e maior área.

DELL'AGLIO et al. 2011^[103] fizeram o monitoramento de Cr, Cu, Pb, V e Zn em amostra de solos poluídos utilizando LIBS para determinação desses elementos. Os resultados foram comparados com os obtidos por ICP-OES. Os autores obtiveram um LOD de 29 mg kg⁻¹ para o V.

As aplicações da LIBS em amostras com algum meio líquido ou em aerossóis têm sido menos estudadas. A existência de diversas técnicas instrumentais analíticas com superioridade ao LIBS nos quesitos sensibilidade e reprodutibilidade para amostras líquidas pode explicar esse menor interesse na aplicação dessa técnica nesse tipo de amostra^[104].

De forma geral a baixa sensibilidade e reprodutibilidade da LIBS em amostras líquidas estão relacionadas a problemas na formação do plasma. Se a medida for realizada em grandes quantidades de líquido a intensidade de emissão será muito baixa, já que parte da energia do laser é consumida pelo meio aquoso. Entretanto, se a análise é realizada na superfície do líquido isso pode provocar salpicos com a incidência do laser na amostra, consequentemente a perda do analito e aumento da incerteza^[105]. Uma alternativa que pode ser usada para contornar essas limitações em aplicações de amostras líquidas é o uso do duplo pulso de laser. Nesse método podem ser utilizados pulsos de dois lasers ou dois pulsos de um único laser, separados por um intervalo de tempo.

O primeiro pulso produz uma bolha de cavitação na amostra líquida, depois o pulso subsequente produz um plasma no interior dessa cavitação e consequentemente, esse segundo pulso, auxilia o processo de ionização iniciado pelo primeiro^[106].

A sensibilidade e a eficiência de amostragem com esse método de duplo pulso aumentam devido aos processos de excitação múltipla. Entretanto, o desvio dentre as medidas e o sinal de fundo também aumentam.

Outras estratégias experimentais têm sido estudadas para contornar essas limitações presentes em análises de amostras líquidas por LIBS. Como por exemplo, análise da amostra em fluxo^[107], a adsorção da amostra de líquida em filtros^[108, 109], uso de gotas^[110], ou a conversão da amostra líquida para um sólido (secagem)^[111].

CHEN et al. em 2008 estudaram a eletrodeposição de seis analitos (Cr, Mn, Cu, Zn, Cd e Pb) numa superfície de alumínio e a determinação foi realizada por LIBS com único pulso. Nesse trabalho foi demonstrado que o método de deposição elétrica aumentou significativamente a sensibilidade de detecção de pré-concentração e eliminação da interferência da água da matriz^[112].

Aliado a essa alternativa de secagem da amostra líquida para aumentar a sensibilidade e diminuir os limites de detecção no LIBS pode-se realizar também o uso de procedimentos de extração e pré-concentração^[113].

3.2.2 Técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

3.2.2.1 Desenvolvimento e fundamentação da DLLME

Durante muitos anos uma das formas mais utilizadas para extração e pré-concentração de analitos em amostras líquidas foi o método de extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*), que consiste na separação dos analitos da matriz pela partição da amostra entre dois líquidos imiscíveis. Entretanto, esse método apresenta inúmeras desvantagens, como várias etapas no procedimento (pode levar a perda de analito) e uso de grandes volumes de solventes orgânicos (normalmente, de custo elevado, alta toxicidade e difícil tratamento dos resíduos gerados)^[114].

Visando superar essas limitações tem crescido cada vez mais a busca por métodos rápidos (poucas etapas no procedimento), eficientes e ambientalmente corretos (que eliminem ou utilizam pequenos volumes de solventes). Desta forma, a miniaturização dos métodos clássicos de extração vêm sendo desenvolvida como alternativa para contornar essas limitações.

Os métodos de microextração são normalmente de fácil aplicabilidade, tem baixo custo, são compatíveis com vários instrumentos analíticos e possuem a possibilidade de automação^[5].

Em 2006 RAZAEE et al.^[115] desenvolveram a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*). O princípio básico dessa técnica é a utilização de dois solventes: um solvente

extrator imiscível na amostra (fase aquosa) e um outro solvente dispersor, que seja tanto miscível no solvente extrator (fase orgânica) como na amostra (fase aquosa).

O procedimento normalmente é realizado em 3 etapas: (1) uma mistura com proporções apropriadas do solvente extrator e do solvente dispersor é inserida de forma rápida na solução aquosa que contém o analito de interesse, a injeção dessa mistura normalmente é feita com o auxílio de uma microseringa, a rápida dispersão do solvente extrator na fase aquosa é favorecida graças ao solvente dispersor, que é solúvel nas fases aquosa e orgânica. Nesse momento a solução torna-se turva. (2) Como o equilíbrio é atingido quase que de imediato, por causa da grande área superficial entre o solvente extrator e a amostra aquosa, não é necessário tempo de espera para complexação e a solução turva pode ser centrifugada proporcionando a separação das fases. (3) a última etapa consiste na retirada da fase orgânica, que a depender do tipo de solvente extrator pode ser depositada no fundo do tubo ou na superfície, mas de forma geral essa fase é removida com o auxílio de uma seringa^[114, 116].

As principais vantagens da DLLME são o menor tempo operacional, a maior eficiência de extração e o baixo custo e consumo de reagentes, além disso, os fatores de pré-concentração obtidos são superiores àqueles obtidos pelos métodos clássicos de extração líquido-líquido. A Figura 3.3 apresenta a evolução no número de publicações sobre DLLME desde seu surgimento.

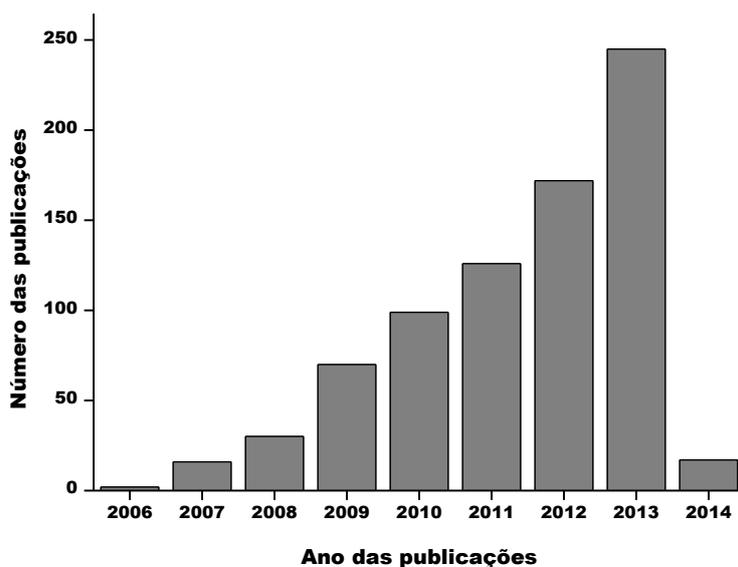


Figura 3.3. Números de publicações por ano, busca realizada no ScienceDirect 26/11/2013 com a sigla DLLME apenas.

A partir da DLLME surgiram várias outras técnicas baseadas nos mesmos princípios. Em 2007 KHALILI-ZANJANI et al.^[117] reportaram uma nova técnica denominada microextração com gota orgânica solidificada (SFODME, do inglês *solidified floating organic drop microextraction*), esse método segue o mesmo princípio da DLLME, tendo como principais diferenças a escolha de um solvente orgânico com um ponto de fusão próximo à temperatura ambiente e a necessidade de um banho de gelo para congelamento da gota orgânica.

Em 2013 OVIEDO et al.^[118] aplicaram a técnica de Microextração em Gota Orgânica Solidificada Assistida por Vórtex (VA-SFODME do inglês *vortex - assisted solidified floating organic drop microextraction*) para pré-concentração de molibdênio em amostras de plantas e determinação por F AAS. As melhores condições experimentais foram identificadas quando os autores utilizaram como agente complexante a 8-hidroxiquinolina 0,5% m/v, 60 µL de 1-undecanol como extrator, 2 minutos de tempo de extração em vórtex, centrifugação durante 2 min a 2000 rpm e 10 min em um banho de gelo. O limite de detecção de 4,9 mg L⁻¹ e um fator de enriquecimento de 67 vezes.

Em 2011 Chang et al.^[119] fizeram o uso da DLLME, para determinação de pesticidas organoclorados (POPs) em amostras de água de torneira. A DLLME foi empregada sem a etapa do banho de gelo e consistiu em retirar a gota flutuante com um pouco da fase aquosa com auxílio de uma seringa e

depositá-la em um microtubo, no qual a separação ocorre imediatamente. O método apresentou recuperações entre 73 e 119% e LOD entre 0,7 e 9,4 ng L⁻¹.

GHAREHBAGHI & SHEMIRANI em 2011^[120] desenvolveram um novo método baseado na microextração líquido-líquido dispersiva com líquidos iônicos para determinação de molibdênio (VI) em amostras de água. Os autores empregaram uma pequena quantidade de [Hmim] [Tf₂N] (1-hexil-3-methylimidazolium bis (trifluormethylsulfonyl) imid) como um solvente de extração e como agente complexante foi utilizado o vermelho de pirogalol. O fator de enriquecimento foi de 72,6 vezes e o LOD igual a 1,43 µg L⁻¹.

3.2.2.2 Aplicação da DLLME

Em 2010 FARAJZADEH et al.^[121] otimizaram as condições de extração da DLLME para determinação de Cu(II) e Zn (II) em amostras de água empregando HPLC. A 8-hidroxiquinolina foi utilizado como agente complexante e clorofórmio e metanol foram escolhidos como solventes de extração e de dispersão, respectivamente. As variáveis otimizadas foram: tipo e volume dos solventes de extração e de dispersão, pH da amostra, concentração do agente complexante, e adição de sal. Os LOD e LOQ encontrados foram de 3 e 10 µg L⁻¹, respectivamente para ambos os analitos.

ASADOLLAHI et al. em 2010^[122] realizaram a separação e pré-concentração de vanádio com microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante (DLLME-SFO) e a determinação por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS). Os autores otimizaram os volumes dos solventes dispersor e extrator e o volume de amostra. O LOD obtido foi de 7 ng L⁻¹ e o fator de enriquecimento foi de 184. O método foi aplicado em amostras de água e salsa.

SHAMSIPUR & HABIBOLLAHI em 2010^[123] utilizaram DLLME para extração e pré-concentração de molibdênio em amostra de água e determinação por GF AAS. Os autores otimizaram diferentes parâmetros, incluindo o tipo e o volume de solventes extrator e dispersor, pH da solução, tempo de extração, o volume e a concentração do agente complexante e o

volume de amostra. O limite de detecção alcançado foi de $0,007 \text{ ng mL}^{-1}$ e o fator de enriquecimento foi de 362 vezes.

DADFARNIA et al. 2011^[124] usaram a DLLME-SFO como um método de preparação de amostras antes da determinação espectrofotométrica de vestígios de vanádio em amostras de água. Os autores utilizaram 8-hidroxiquinolina (oxina) como agente complexante e otimizaram parâmetros como pH, concentração de oxina, tempo de extração, volume de amostra e do solvente orgânico, temperatura de extração, bem como a natureza do solvente orgânico. Eles obtiveram um fator de enriquecimento de 38 vezes e o limite de detecção foi de $0,97 \mu\text{g L}^{-1}$.

3. 3. Materiais e Métodos

3.3.1. Equipamentos e acessórios

O sistema LIBS disponível no Departamento de Química Analítica, Nutrição e Bromatologia da Universidade de Alicante – Espanha era composto por um laser de Nd:YAG (modelo HYL Handy-YAG, Q-switched, Quanta System S.P.A., Varese, Itália). O comprimento de onda do laser é de 1064 nm e os pulsos de emissão possuíam energia de 180 mJ. O laser foi operado em modo de pulso único e o feixe de laser era focado nas amostras por uma lente biconvexa com um comprimento focal de 100 mm. A radiação emitida foi coletada por uma fibra óptica e detectada por um espectrômetro de cinco canais (modelo AvaSpec-2048-SPU, Avantes, Apeldoorn, Holanda), cobrindo comprimentos de onda de 197,146 a 852,190 nm.

Um sistema de atraso que consiste em dois geradores de pulsos (gerador de atraso / pulso digital, modelo DG 535, Stanford Research Systems, Inc. e 1 Hz-50 MHz gerador de impulsos, modelo PM-5715, Philips) foi usado para a sincronização do disparo do laser e a aquisição de dados. Um laptop LG (processador Intel Core 2, 1,00 GB de RAM e Windows Vista) equipado com AvaSoft. - Avantes, versão do software 7.5.3 completo foi utilizado para visualização e aquisição de dados.

Um ICP OES (Perkin Elmer, modelo Optima 4300DV, Norwalk, CT, EUA) que trabalhava no modo de vista axial foi utilizado como técnica comparativa ao LIBS. A introdução da amostra foi realizada através de um nebulizador OneNeb (Ingeniatrics Technologies Division SL) acoplado a uma câmara de nebulização (Modelo Tracy, 50 mL de volume interno, Vidro Expansão Ptr. Ltd, West Melbourne, Victoria, Austrália). A vazão do gás de nebulização foi de 0,7 (L/min) e a potência de rádio-frequência de 1400W. Para as determinações por ICP OES as amostras digeridas não passaram pelo procedimento de DLLME, porém foi utilizado o procedimento de adição de padrão a fim de confirmar a concentração dos analitos nas amostras estudadas.

Para o ajuste do pH foi utilizado um pHmetro (modelo Basic20+, Crison Instruments S.A., Barcelona, Espanha), para a dispersão do solvente extrator foi utilizado um agitador vórtex (modelo Reax top, Heildolph Instruments, Alemanha) e para separação da fases foi utilizado uma centrífuga (modelo 2690/5, Nahita, Japão).

A retirada da fase orgânica foi realizada com o auxílio de uma microseringa de 25 μ L (modelo 1702, Hamilton, Reno, EUA) e a secagem dessa fase foi realizada em uma placa aquecedora (modelo 501, Darlab Egara S.L, Espanha).

3.3.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico e água ultrapura obtida de um sistema de purificação Milli-Q[®] (Millipak-40 Filter Unit 0,22 μ m NPT, Bedford, MA, EUA) com resistividade de 18,2 M Ω cm. As soluções analíticas de V e Mo foram preparadas por diluições sucessivas a partir de uma solução estoque de 1000 mg L⁻¹ (Charleston, Reino Unido).

O ajuste do pH foi realizado com adição de quantidades apropriadas de diferentes concentrações de ácido nítrico (60% w/w, Scharlau Chemie S.A., Sentrenat, Espanha) e de hidróxido de amônia (32% w/w, Scharlab S.L., Sentrenat, Espanha).

O agente complexante 8-hidroxiquinolina (8-HQ) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA) foi preparado diariamente dissolvendo a quantidade apropriada do reagente em 10 mL de etanol e armazenada num frasco âmbar. O solvente extrator utilizado foi o 1-undecanol (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA) sem nenhuma diluição do produto comercialmente disponível.

3.3.3. Preparo das amostras

A amostra de água mineral foi adquirida no comércio local de Alicante e não foi necessária nenhuma preparação adicional antes do procedimento de DLLME.

As mesmas amostras de medicamentos utilizadas no procedimento de extração em ponto nuvem (ver detalhes no Capítulo 2) foram aplicadas no procedimento de DLLME. Entretanto, nessa parte do trabalho ambas passaram pelo processo de digestão total por micro-ondas, onde foi utilizado um forno de micro-ondas Ethos (Milestone, Itália). No procedimento de preparação das amostras foi pesado cerca de 0,500 g de amostra diretamente em frascos de digestão e em seguida, foram adicionados 7 mL de HNO₃ 65% e 1 mL de H₂O₂ 30%. Para a amostra do solo foi pesado ca. 0,250 g de amostra e adicionando 6 mL de HNO₃ a 65% (m/m), 1 mL de H₂O₂ a 30% (m/m) e 1 mL de HClO₄ a 65% (m/m). O programa de aquecimento utilizado tanto para as amostras de medicamento como para de solo é mostrado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Programa de aquecimento para digestão ácida assistida por radiação micro-ondas empregado para amostras de medicamentos e de solo.

Tempo (min)	Potência (W)	T (°C)
10	1000	200
20	1000	200

Depois de concluído o programa de digestão, os frascos foram resfriados e as soluções digeridas foram transferidas para frascos de polipropileno com capacidade de 50 mL e diluídas com água ultrapura até um volume de 25 mL.

Com o objetivo de verificar a exatidão do procedimento proposto foi utilizado um material de referência certificado, NCS ZC 85005 (Beef Liver). Nesta parte foi pesado ca. 1 g desse material de referência e adicionado 10 mL de HNO₃ 65%. O programa de aquecimento dessa digestão está apresentado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Programa de aquecimento para digestão ácida assistida por radiação micro-ondas para digestão do material de referência certificado.

Tempo (min)	Potência (W)	T (°C)
10	1000	180
10	1000	180

Os digeridos do material de referência certificado também foram transferidos para frascos de polipropileno com capacidade de 50 mL e diluídas até um volume final de 25 mL.

3.3.4. Procedimento de microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de V e Mo.

O procedimento desenvolvido foi realizado em 3 etapas: (1) Em tubos contendo 10 mL de amostra ou soluções analíticas de referência contendo 0,5 mg L⁻¹ V e Mo foi adicionado 166 µL de uma solução de 8-hidroxiquinolina (6%) e em seguida o pH ajustado com soluções de HNO₃ e NH₄OH para pH igual a 3,6. Em seguida foi adicionado 50 µL de solvente orgânico extrator (1-undecanol). (2) Os tubos foram agitados em vórtex durante 2 min. (3) A solução foi centrifugada por 8 min a 4000 rpm para acelerar a separação das duas fases, como o solvente utilizado neste trabalho é menos denso que a fase aquosa, a fase orgânica contendo os analitos permaneceu na parte superior do tubo após a centrifugação. Com o auxílio de uma microsseringa extraiu-se 10 µL da fase orgânica. A Figura 3.4 apresenta as etapas do procedimento de DLLME.

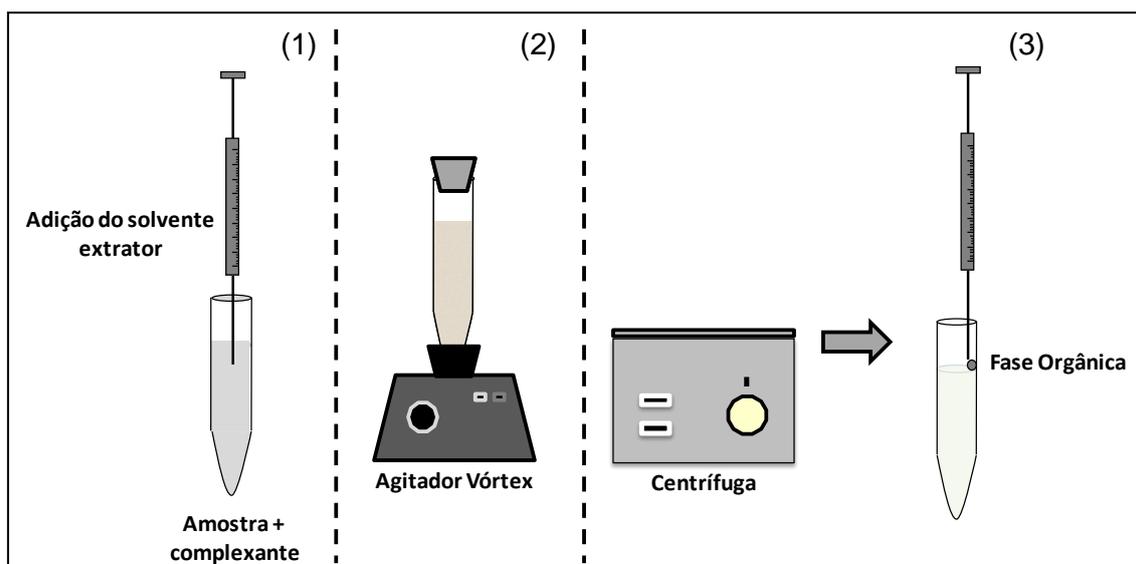


Figura 3.4. Etapas do procedimento de DLLME (1) adição da solução do complexante 8-HQ na amostra, (2) agitação em vórtex, (3) centrifugação para separação das fases e retirada da gota orgânica.

3.3.5. Análise dos extratos da DLLME por LIBS

Para a análise dos extratos da microextração por LIBS foi necessária a construção de um suporte adequado. Esse suporte consistia de uma folha fina de alumínio onde foram previamente moldadas "células" para conter e evitar a expansão desordenada da gota. Essa folha de alumínio foi posta sobre uma placa também de alumínio. Posteriormente 10 μL da fase orgânica da microextração foi depositada nesse suporte o qual era aquecido sobre uma chapa aquecedora por 5 min para secagem da fase orgânica. As medidas do LIBS foram efetuadas quando o suporte estava em temperatura ambiente.

A Figura 3.5. mostra o suporte de alumínio (a) no momento da construção das células, (b) no momento em que o suporte já está aquecido e a deposição da fase orgânica.

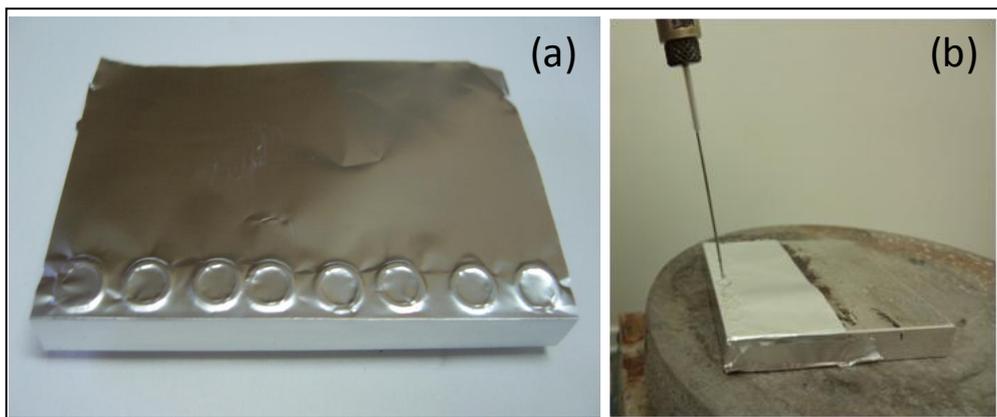


Figura 3.5. (a) folha de alumínio com as células de contenção; (b) suporte sendo aquecido e a fase orgânica sendo depositada.

A Figura 3.6 apresenta o esquema do processo envolvendo a deposição da gota orgânica, secagem e análise por LIBS.

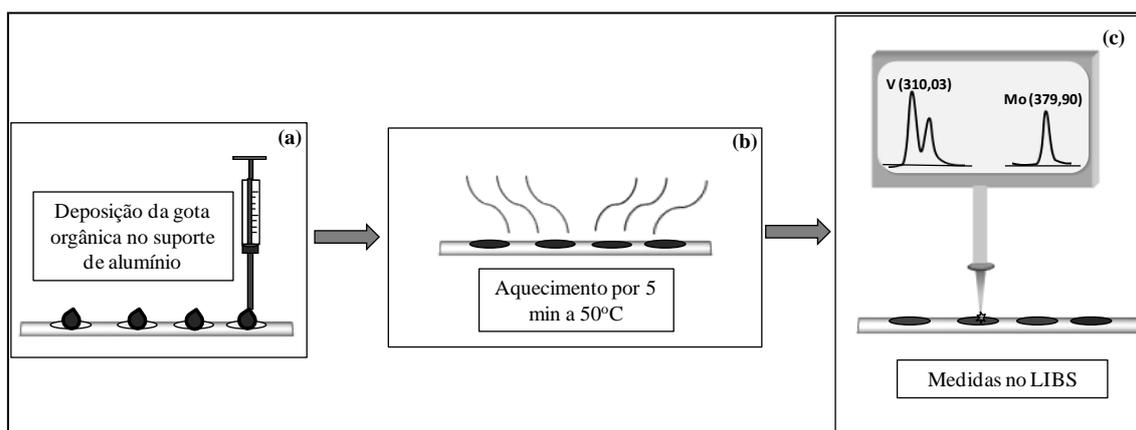


Figura 3.6. Esquema geral do processo para determinação da gota orgânica. (a) deposição da gota orgânica no suporte de alumínio, (b) secagem dessas microgotas, (c) análise LIBS de microgotas depositadas em um suporte de alumínio depois da secagem.

3. 4. Resultados e Discussão

3.4.1. Otimização das condições da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Para a etapa de otimização das condições experimentais do procedimento DLLME foram utilizadas soluções padrão multielementares de V e Mo na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$.

Inicialmente foi realizado um planejamento experimental multivariado do tipo Plackett-Burman. Esse tipo de delineamento experimental é eficiente em situações que envolvem uma grande quantidade de variáveis a serem exploradas e quando apenas os efeitos principais são importantes. Os efeitos secundários nesse planejamento são confundidos com os principais. As variáveis do procedimento de DLLME estudadas foram: (A) concentração do agente complexante (8-HQ), (B) volume de solvente extrator (1-undecanol), (C) tempo de centrifugação, (D) tempo de agitação no vórtex, (E) pH, (F) presença ou ausência de NaCl e (G) velocidade da centrifugação. As variáveis foram estudadas em dois níveis (-1 e +1) e a Tabela 3.3 mostra mais detalhes sobre as condições utilizadas.

Tabela 3.3. Variáveis e níveis estudados no planejamento Plackett-Burman.

Variável	Valor mínimo (-)	Valor máximo (+)
A: Concentração 8-HQ (%)	0,05	0,1
B: Volume de solvente extrator (μL)	30	60
C: Tempo centrifugação (min)	4	8
D: Tempo de agitação em vórtex (min)	2	4
E: pH	2	5
F: Concentração NaCl (%)	0	3
G: Velocidade Centrifugação (rpm)	2000	4000

A matriz proposta pelo planejamento Plackett-Burman é mostrada na Tabela 3.4 e foram realizados 12 experimentos.

Tabela 3.4. Matriz do planejamento Plackett-Burman.

Ensaio	A	B	C	D	E	F	G
1	+	+	-	+	+	+	-
2	-	+	+	-	+	+	+
3	+	-	+	+	-	+	+
4	-	+	-	+	+	-	+
5	-	-	+	-	+	+	-
6	-	-	-	+	-	+	+
7	+	-	-	-	+	-	+
8	+	+	-	-	-	+	-
9	+	+	+	-	+	-	+
10	-	+	+	+	-	-	-
11	+	-	+	+	+	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-

Dois variáveis mostraram efeitos significativos após o delineamento experimental Plackett Burman: pH (variável E) e volume de solvente extrator (variável B). As Figuras 3.7. (a) e (b) mostram a porcentagem de significância de cada variável para o V e Mo, respectivamente.

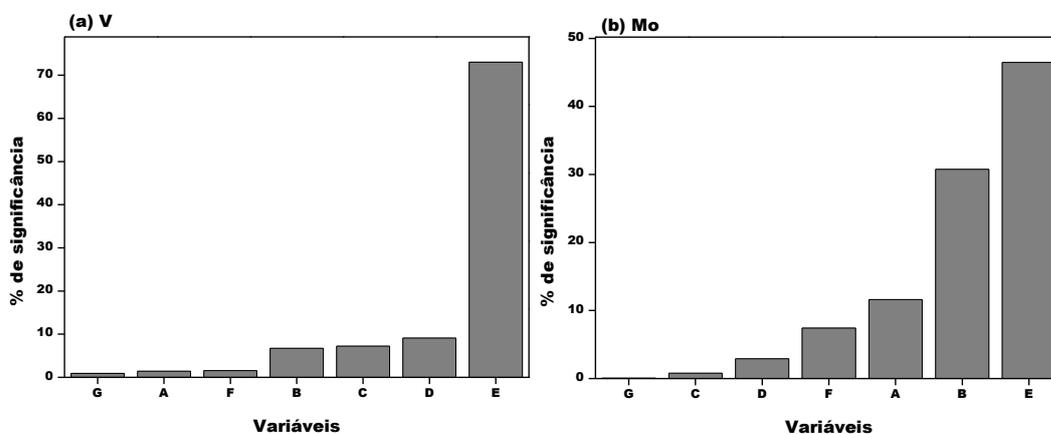


Figura 3.7. Porcentagem de significância de cada variável (a) V e (b) Mo.

As variáveis que se apresentaram mais significativas foram o pH sendo usado no maior nível (efeito positivo) e o volume do agente extrator usado no menor nível (efeito negativo). Posteriormente um planejamento composto central (CCD) foi realizada a fim de otimizar essas variáveis que se mostraram mais significativas. Agora as variáveis foram investigadas em cinco níveis e os valores codificados são apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Variáveis e níveis estudados no planejamento composto central para otimização de processo DLLME-LIBS e as intensidades dos sinais de emissão obtidos para V e Mo.

Experimentos	pH		Volume de solvente extrator (SE)		Intensidade de sinal de emissão	
	Valor em código	Valor real	Valor em código	Valor real (μL)	V	Mo
1	-1	3,1	-1	40,0	53314	12758
2	1	5,1	-1	40,0	22019	11299
3	-1	3,1	1	80,0	40304	9812
4	1	5,1	1	80,0	3456	2140
5	$-\sqrt{2}$	2,6	0	60,0	25022	16888
6	0	4,1	$-\sqrt{2}$	31,7	28557	13247
7	$\sqrt{2}$	5,5	0	60,0	314	10
8	0	4,1	$\sqrt{2}$	88,2	35677	3305
9	0	4,1	0	60,0	32244	18073
10	0	4,1	0	60,0	38734	14505
11	0	4,1	0	60,0	37493	15008
12	0	4,1	0	60,0	44844	15707

Nesse planejamento CCD foram realizados 12 experimentos, sendo 4 deles no ponto central (variáveis codificadas em 0, ver ensaios 9-12 na Tabela 3.5.), a fim de calcular a soma dos quadrados do erro puro e avaliar os modelos propostos para V e Mo.

Os modelos de regressão propostos para V e Mo são apresentados nas equações 1 e 2 , respectivamente:

$$V (\text{Intensidade do sinal}) = 38328 - 12886\text{pH} - 10985(\text{pH}^2) \quad \text{eq. 1}$$

$$Mo (\text{Intensidade do sinal}) = 15823 - 4125\text{pH} - 3270\text{SE} - 3527(\text{pH}^2) - 3614 (\text{SE}^2) \quad \text{eq. 2}$$

No caso da análise do V somente os coeficientes linear e quadrático para pH apresentaram valores significativos no nível de confiança de 95%. Neste caso, qualquer volume de solvente extrator na faixa de 31-88 μL pode ser utilizado (Figura 3.8). Para Mo ambos os coeficientes linear e quadrático de pH e volume de solvente extrator (SE) foram significativas (Figura 3.9). A Figura 3.10 mostra os gráficos de contorno para os modelos obtidos para V (Figura 3.8) e Mo (Figura 3.9) sobrepostos.

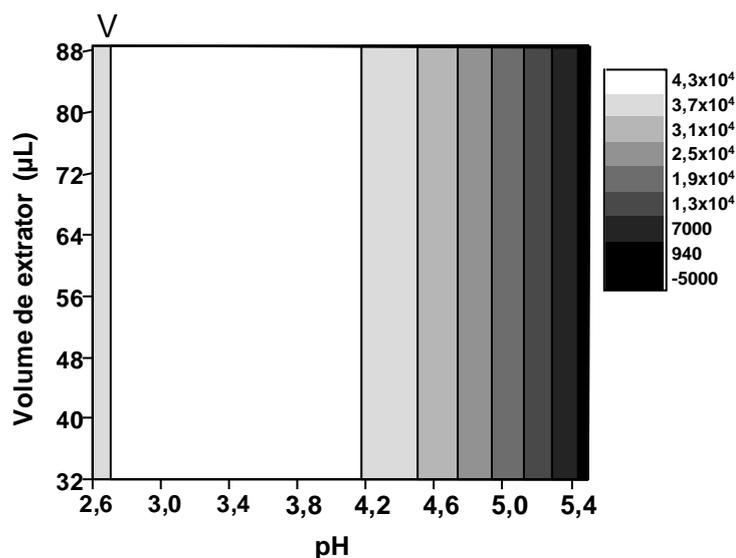


Figura 3.8. Gráfico de contorno para o modelo obtido para o V.

Como pode ser observado na Figura 3.8 os sinais mais altos podem ser obtidos quando o pH se encontra no intervalo de 3,0 e 3,8 e o volume de solvente extrator é indiferente para o V no intervalo de valores avaliados (31,7 - 88,2 μL).

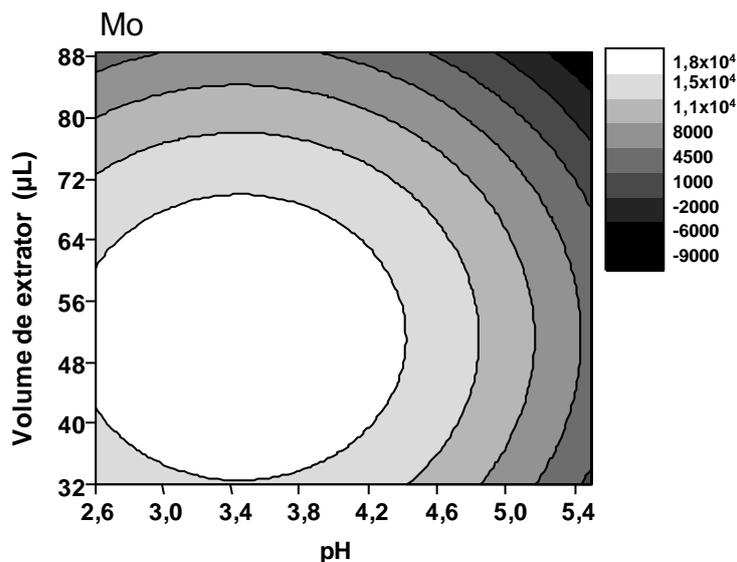


Figura 3.9. Gráfico de contorno para o modelo obtido para o Mo.

Na Figura 3.9 a condição ótima pode ser observada quando o pH está no intervalo entre 3,0 e 3,8 e o volume de solvente extrator está na faixa de 48 e 56 µL. Por outro lado, uma condição de compromisso é necessária, a fim de determinar os analitos no mesmo procedimento de microextração.

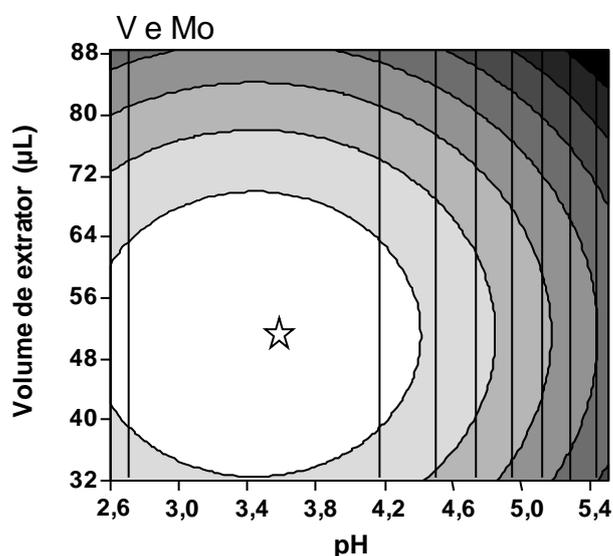


Figura 3.10. Gráficos de contorno dos modelos obtidos para o V e Mo sobrepostos.

Neste caso, os gráficos de contorno foram sobrepostos (Figura 3.10), e definida as condições operacionais práticas. Assim, optou-se em trabalhar em pH de 3,6 e volume de solvente extrator de 50 µL para as duas variáveis estudadas e ambos os analitos (ver estrela na Figura 3.10).

A Tabela 3.6 apresenta de forma resumida as condições otimizadas que foram utilizadas no procedimento DLLME.

Tabela 3.6. Condições otimizadas para o procedimento DLLME.

Variável	Valor otimizado
Solvente	1-undecanol
Volume solvente extrator (μL)	50
pH	3,6
[8-HQ] (%)	0,1
Tempo de agitação em vortex (min)	2
Tempo centrifugação (min)	8
[NaCl] (%)	-
Velocidade de centrifugação (rpm)	4000

3.4.2. Determinação dos parâmetros de desempenho da microextração líquido-líquido dispersiva combinada com o LIBS

As figuras de méritos obtidas da combinação DLLME-LIBS foram calculadas com curvas de calibração com concentrações iguais a 0 (branco da microextração), 250, 500, 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ambos os analitos de acordo com as condições otimizadas.

Estes resultados foram comparados com os obtidos a partir das medições de 10 μL de soluções padrão aquosas secas sobre uma placa de alumínio e subsequente análise usando somente o LIBS com um intervalo linear de 5 a 40 mg L^{-1} .

A potencialidade, aumento no sinal de emissão, da combinação proposta (DLLME-LIBS) frente à análise de solução padrão medida na LIBS apenas é mostrada nas Figuras 3.11. e 3.12. onde são comparados sinais de emissão obtidos para o V e Mo respectivamente.

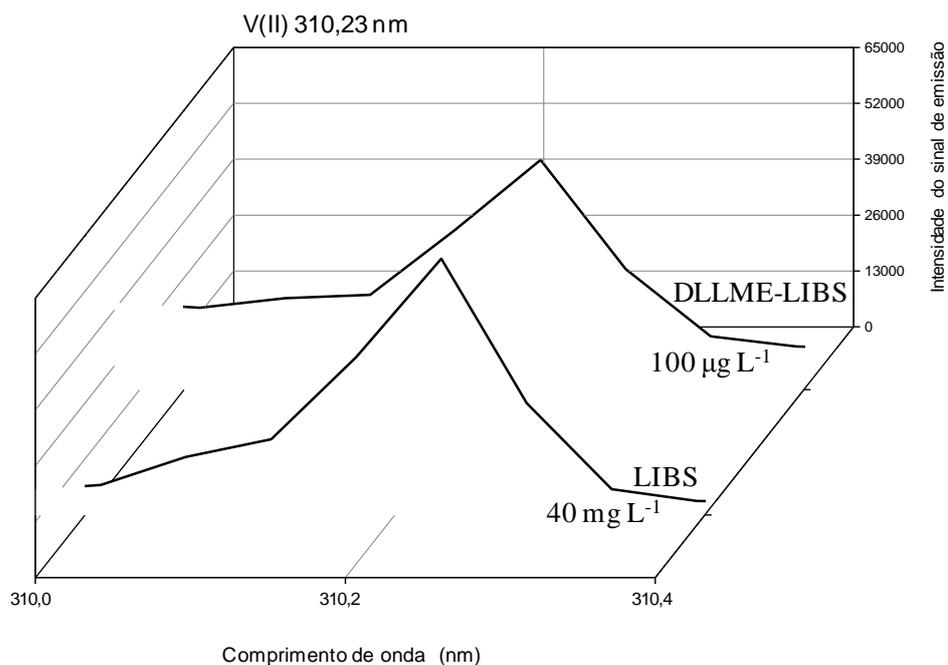


Figura 3.11. Intensidade dos sinais de emissão para o V.

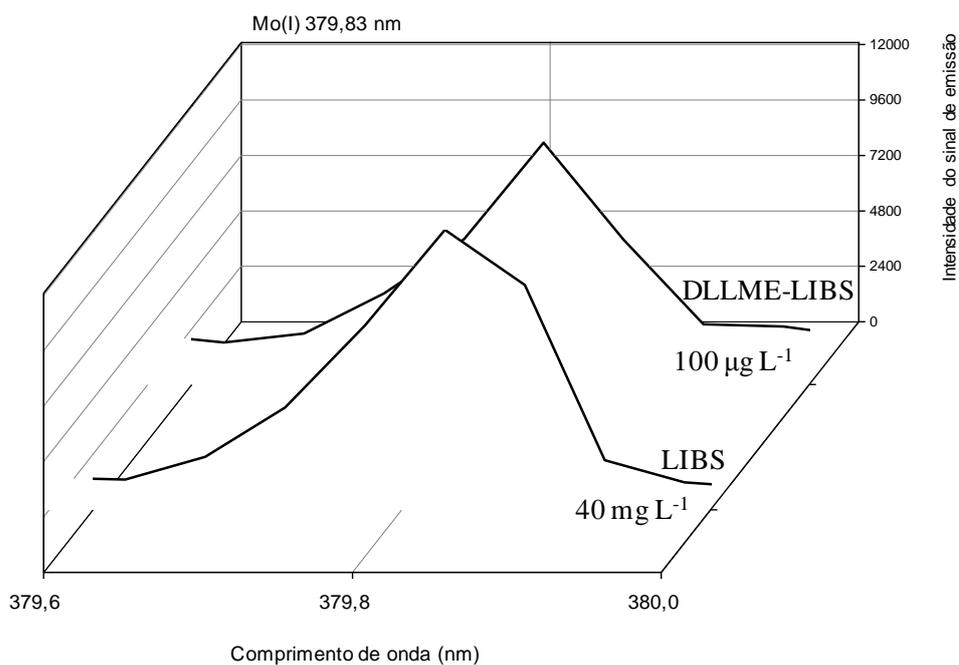


Figura 3.12. Intensidade dos sinais de emissão para o Mo.

As características analíticas do método proposto foram avaliadas por meio do cálculo dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) definidos como: $LOD = 3\sigma/s$ e $LOQ = 10\sigma/s$, onde s é o coeficiente angular (sensibilidade) das curvas analíticas, e σ é o desvio padrão de 10 medidas

consecutivas do branco. A Tabela 3.7 apresenta todos parâmetros de desempenho obtidos.

Tabela 3.7. Parâmetros de desempenho obtidos pela combinação DLLME-LIBS.

Parâmetros	V (II) 310,23 nm		Mo(I) 379,83 nm	
	LIBS	DLLME-LIBS	LIBS	DLLME-LIBS
Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,2 – 40 (mg L^{-1})	20 - 750 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,5 – 40 (mg L^{-1})	70 - 750 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Coefficiente de correlação (r^2)	0,995	0,994	0,966	0,966
Sensibilidade (L mg^{-1})s	7575	82901	1407	9810
LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	60	5	300	30
LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	200	20	500	70
Sinal do branco	145 ± 24	158 ± 39	387 ± 213	245 ± 73
Repetibilidade (RSD %) ^(a)	-	6%	-	9%
Sensibilidade relativa ^(b)	11		7,0	
LOD relativo ^(c)	12		8,5	

^a10 replicatas

^bSensibilidade DLLME-LIBS / Sensibilidade LIBS

^cLOD LIBS / LOD DLLME-LIBS

Com a razão das duas curvas de calibração com (DLLME-LIBS) e sem (LIBS) microextração foi possível determinar o fator de enriquecimento que foi igual a 11 e 7,0 vezes para o V e Mo respectivamente.

As principais vantagens da DLLME proposta foram o uso do vórtex como agente dispersor, dessa maneira foi possível eliminar o uso de outro solvente orgânico na dispersão da solução, a eliminação da etapa de congelamento da gota orgânica, uma vez que logo após a centrifugação um microvolume pode ser retirado com a ajuda de uma microseringa. Além da melhora na sensibilidade em 12 e 8,5 vezes para o V e Mo, respectivamente.

Essas vantagens levam a um menor tempo para a execução de todo o procedimento, uma maior eficiência de extração, já que a gota não sofre uma etapa a mais de manipulação, um custo mais reduzido, uma vez que só se faz uso de um solvente orgânico além de um menor impacto ambiental.

3.4.3 Aplicação da combinação DLLME-LIBS em amostras

O procedimento foi aplicado em amostras de água, solo e alimentos. Na amostra de água mineral foi aplicado o procedimento de adição e recuperação, no qual foram adicionados dois diferentes valores de concentração de V e Mo (250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$). A Tabela 3.8 apresenta os valores reais adicionados e os valores de recuperação alcançados.

Tabela 3.8. Adição e recuperação em água mineral.

Elemento	Valor adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valor determinado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Vanádio	252	235	94±14
	506	492	97±11
Molibdênio	240	265	105±17
	489	508	104±15

Todas as amostras digeridas, inclusive a do material de referência certificado, passaram pelo procedimento de DLLME. A Tabela 3.9 apresenta os resultados da determinação de V e Mo por LIBS nos extratos da microextração nas amostras de medicamento e em sedimento de rio. A comparação desses resultados foi realizada mediante o método de adição padrão em ICP OES.

Os medicamentos utilizados foram os mesmos aplicados no procedimento de extração em ponto nuvem. Já a amostra de sedimento de rio foi cedida Prof. Dr. Pedro Sérgio Fadini e utilizada na tese de doutoramento pelo Dr. Enelton Fagnani. Essa amostra foi coletada na Foz do rio Jundiáí no ano de 2007.

Tabela 3.9. Recuperação dos elementos estudados das amostras de medicamentos e de solo com comparação com método de adição padrão em ICP OES.

Amostras	Concentração do analito (mg kg^{-1})			
	ICP OES		DLLME-LIBS (recuperação %)	
	V	Mo	V	Mo
Vanádio quelato	3210 ± 92	-	3352 ± 748 (104)	<LOQ
Complexo multivitamínico	$10,7 \pm 2,4$	$13,7 \pm 2,7$	$9,9 \pm 2,7$ (92)	$13,2 \pm 4,9$ (96)
Solo	$12,3 \pm 3,0$	<LOQ	$12,0 \pm 5,0$ (97)	<LOQ

Amostra de Vanádio Quelato não contém Mo e nas amostras de solo, este elemento ficou abaixo do limite de quantificação das técnicas.

A Tabela 3.10 apresenta os resultados da determinação de V e Mo por LIBS nos extratos da microextração no material de referência certificado.

Tabela 3.10. Recuperação dos elementos estudados usando o material de referência certificado NCS ZC 85005 (Beef Liver).

Elemento	Valor determinado (mg kg^{-1})	Valor certificado (mg kg^{-1})	Recuperação (%)
Molibdênio	$4,1 \pm 0,8$	$3,97 \pm 0,28$	103 ± 21
Vanádio	*	$0,267^{**}$	-

* Não foi possível efetuar o procedimento de pré-concentração devido às dificuldades para ajustar o pH e presença de interferentes da amostra

**valor informativo (não certificado)

A determinação do V no material de referência certificado NCS ZC 85005 (Beef Liver) não foi possível, pois a concentração desse elemento depois das sucessivas diluições necessárias ao procedimento se encontrou abaixo do LOD que era igual a $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$. Entretanto, a porcentagem de

recuperação de Mo nesse material foi de 103% evidenciando uma boa exatidão do procedimento.

3.5. Conclusões

O procedimento de DLLME é simples, rápido e usa menos reagentes tóxicos que os procedimentos de extração convencionais. Além disso, a técnica LIBS possui grande possibilidade para o desenvolvimento de sistemas portáteis podendo ser aplicada em análises *in situ*, o que atende vários princípios da Química Verde.

A combinação proposta DLLME-LIBS juntamente com a estratégia de secagem da gota orgânica possibilitou a determinação de V e Mo em diferentes amostras e a sensibilidade obtida com DLLME-LIBS é de aproximadamente 11 e 7 vezes superior para o V e Mo, respectivamente, do que a obtida sem DLLME.

CAPÍTULO 4. CONCLUSÃO GERAL

4.1 Conclusões Gerais

Devido à grande necessidade de uma maior visão crítica a muitos procedimentos em química analítica. A busca por atender os princípios da química verde é algo eminente nos dias atuais.

As estratégias apresentadas nesse trabalho de doutorado que visavam alcançar a melhoria do desempenho analítico de uma técnica analítica versátil, robusta e tão difundida como a FAAS e outra técnica ainda em desenvolvimento, mas que apresenta grande potencialidade e ascensão como a LIBS, fazendo o uso de procedimentos simples, rápidos, de baixo custo, que não oferecem riscos para o analista ou ao ambiente se apresentou viável para determinação de V e Mo em diferentes amostras.

Os valores de LOD e LOQ obtidos com as combinações propostas foram menores que sem as combinações como mostrado na Tabela 3.11.

Tabela 4.1. Resultados de LOD e LOQ para o V e Mo das técnicas e combinações utilizadas.

Técnicas	Vanádio		Molibdênio	
	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
FAAS	700	2000	300	900
FAAS + CPE	80	300	70	100
LIBS	60	200	300	500
LIBS + DLLME	5	20	30	70

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SUN, Y.; MIERZWA, J. & CHI-REN, L. "Direct determination of molybdenum in seawater by adsorption cathodic stripping square wave voltammetry". *Talanta*, **52**: 417, 2000.
2. SOLDI, T.; RIOLO, C.; ALBERTI, G.; GALLORINI, M. & PELOSO, G. F. "Environmental vanadium distribution from an industrial settlement". *Sc. Total Environ.*, **181**: 45, 1996.
3. WELZ, B. & SPERLING, M. "Atomic Absorption Spectrometry. 3ª ed. Weinheim", Wiley-VCH, p. 941, 1999.
4. CREMERS D. A. & RADZIEMSKI L. J., Handbook of Laser – Induced Breakdown Spectroscopy. John Wiley & Sons, Ltd. 2006.
5. RAYNIE, D.E. "Modern extraction techniques", *Anal. Chem.*, **78**: 3997, 2006.
6. LENARDÃO, E. J.; FREITA G. R. A.; DABDOUB M. J.; BATISTA, A. C. F. & SILVEIRA C. D. C. "Green chemistry: os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa." *Quim. Nova*. **26**: 123, 2003.
7. ANASTAS, P. T. "Green Chemistry and the role of analytical methodology development", *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **29**:167, 1999.
8. PRADO, A. G. S. "Química verde, os desafios da química do novo milênio". *Quím. Nova*. **26**: 738, 2003.
9. WINTERTON N. "Twelve More Green Chemistry Principles", *Green Chem.* **3**, 73, 2001.
10. ARMENTA, S., GARRIGUES S., & DE LA GUARDIA M. "Green analytical chemistry". *TrAC, Trends Anal. Chem.* 27(6): 497, 2008.
11. TOBISZEWSKI, M.; MECHLINSKA A. & NAMIESNIK J. "Green analytical chemistry-theory and practice". *Chem. Soc. Rev.* 39(8): 2869, 2010.
12. GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI Z. & NAMIEŚNIK J. "The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices". *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **50**: 78, 2013.
13. GREENWOOD N. N. & EARNSHAW, A. - Chemistry of the Elements - Second Edition.
14. EEKS, M. E. & LEICESTER, H. M. – Discovery of the Elements – Journal of Chemical Education, 7th edition, Easton, 1968.
15. LEE, J. D. – Química Inorgânica Não Tão Concisa – 5ª ed., São Paulo, Edgard Blucher, 1999.
16. AMORIM, F.A.C.; WELZ B.; COSTA A. C.S.; LEPRI F. G.; GORETI M.; VALE R. & FERREIRA S. L.C. "Determination of vanadium in petroleum and petroleum products using atomic spectrometric techniques". *Talanta*. **72**(2): 349, 2007.

17. PYRZYŃSKA, K. & WIERZBICKI T., "Determination of vanadium species in environmental samples". *Talanta*. 64(4): 823, 2004.
18. DOMINGO, J. L., "Vanadium: A review of the reproductive and developmental toxicity". *Reprod. Toxicol.* 10(3): 175, 1996.
19. NRIAGU, J. History, occurrence and uses of vanadium. *In: Nriagu J. "Vanadium in the Environment". Part 1: Chemistry and Biochemistry*, John Wiley & Sons, 1,1998.
20. TENG, Y.; YANG J.; SUN Z.; WANG J.; ZUO R. & ZHENG J. "Environmental vanadium distribution, mobility and bioaccumulation in different land-use Districts in Panzhuhua Region, SW China". *Environ. Monit. Assess.*, 176(1-4): 605, 2011.
21. ŽEMBERYOVÁ, M.; JANKOVIČ R.; HAGAROVÁ I. & KUSS H.-M. "Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of vanadium in extracts of soil and sewage sludge certified reference materials after fractionation by means of the Communities Bureau of Reference modified sequential extraction procedure". *Spectrochim. Acta, Part B.*, 62(5): 509, 2007.
22. MUKHERJEE, B.; PATRA B.; MAHAPATRA S.; BANERJEE P.; TIWARI A. & CHATTERJEE M. "Vanadium - an element of atypical biological significance". *Toxicol. Lett.*, 150(2): 135, 2004.
23. CHASTEEN, N. "The biochemistry of vanadium". *Struct. Bonding*, **53**, 105, 1983.
24. SHECHTER, Y.; GOLDWASER, I.; MIRONCHIK, M.; FRIDKIN, M. & GEFEL, D. "Historic perspective and recent developments on the insulin-like actions of vanadium; toward developing vanadium-based drugs for diabetes". *Coord. Chem. Rev.*, **237**: 3, 2003.
25. CARMIGNANI, M.; BOSCOLO, P.; VOLPE, A.; TOGNA, P.; MASCIOTTO, L. & PREZIOSI, P. "Cardiovascular system and kidney as specific targets of chronic exposure to vanadate in the rat: functional and morphological findings". *Arch. Toxicol.*, **14**: 124, 1991.
26. KANNA, P. S.; MAHENDRAKUMAR, C. B.; CHAKRABORTY, T.; HEMALATHA, P.; BANERJEE, P. & CHATTERJEE, M. "Effect of vanadium on colonic aberrant crypt foci induced in rats by 1,2 dimethyl hydrazine". *World J. Gastroenterol.*, 9(5): 1020, 2003.
27. THOMAS, J, E, *Fundamentos de Engenharia de Petróleo*, Rio de Janeiro, Editora Interciência, 271, 2001.
28. TEJADA-JIMENEZ, M.; CHAMIZO-AMPUDIA A.; GALVÁN A.; FERNÁNDEZ E. & LLAMAS A. "Molybdenum metabolism in plants". *Metallomics*. 5(9): 1191, 2013.
29. SAUER, P.; FRÉBORTOVÁ, J.; SEBELA, M.; GALUSZKA, P.; JACOBSEN, S.; PEC, P. & FRÉBORT, I. "Xanthine dehydrogenase of pea seedlings: a member of the plant molybdenum oxidoreductase family". *Plant Physiol. Biochem.*, 40(5), 393, 2002.
30. VYSKOČIL, A. & VIAU C. "Assessment of molybdenum toxicity in humans". *J. Appl. Toxicol.*, 19(3): 185, 1999.

31. GOLDHABER, S. B. "Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity". *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 38(2): 232, 2003.
32. HOLZINGER S.; ANKE M.; RÖHRIG B. & GONZALEZ D., "Molybdenum intake of adults in Germany and Mexico". *Analyst*, **123**: 447, 1998.
33. MADRAKIAN, T. & GHAZIZADEH, F. "Cloud-point preconcentration and spectrophotometric determination of trace amounts of molybdenum(VI) in steels and water samples". *J. Hazard. Mater.*, 153 (1-2): 695, 2008.
34. SUNG, Y.-H.; LIU, Z.-S. & HUANG, S.-D. "Use of Muromac A-1 chelating resin for determination of copper and molybdenum in seawater by atomic absorption with on-line preconcentration". *Spectrochim. Acta Part B.*, 52 (6): 755, 1997.
35. ANDRADE J. C.; CUELBAS C. J. & EIRAS S. P. "Spectrophotometric determination of Mo (VI) in steel using a homogeneous ternary solvent system after single-phase extraction". *Talanta*, **47**: 719, 1998.
36. AMORIM, F. A. C.; LOBO, I. P.; SANTOS, V. L. C. S. & FERREIRA, S. L. C. "Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multielementares". *Quím. Nova*, 31 (7): 1784, 2008.
37. HARRIS, D. C.; BONAPACE, J. A. P. & BARCIA, O. E. *Análise Química Quantitativa*, 6ª ed. Trad. Rio de Janeiro, LTC Livros Técnicos e Científicos, 2005.
38. PEREIRA, M. G.; PEREIRA-FILHO, E.R.; BERNDT, H. & ARRUDA M. A. Z., "Determination of cadmium and lead at low levels by using preconcentration at fullerene coupled to thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Spectrochim Acta Part B.*, **59**: 515, 2004.
39. WU, P.; GAO Y.; CHENG G.; YANG, W.; LV Y, & HOU X., "Selective determination of trace amounts of silver in complicated matrices by displacement-cloud point extraction coupled with thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *J. Anal. At. Spectrom.*, 23(5): 752, 2008.
40. TAVALLALI H.; ASRARI E.; ATTARAN A. M. & TABANDEH M., "Sensitive determination of Lead in Soil and Water samples by Cloud Point Extraction-Flame Atomic Absorption Spectrometry Method", *Int. J. ChemTech Res.*, 2(3): 1731, 2010.
41. ULUSOY, H.İ.; GÜRKAN R.; AKSO & AKÇAY M. "Development of a cloud point extraction and preconcentration method for determination of trace aluminum in mineral waters by FAAS". *Microchem. J.*, 99(1): 76, 2011
42. BEZERRA, M. A. & FERREIRA, S. L. C., *Extração em ponto nuvem: princípios em química analítica*. Vitória da Conquista: Ed. Edições Uesb, 2006.
43. NASCENTES C. C.; ARRUDA M. A. Z. & MANIASSO N. "Experimentos didáticos em química analítica envolvendo separação de fases e pré-concentração". *Quim. Nova*, 25(3): 483, 2002.
44. MANIASSO N., "Ambientes micelares em química analítica". *Quim. Nova*, 24(1): 87, 2001.

45. SILVA M. F.; CERUTTI E. S. & MARTINEZ L. D., "Coupling Cloud Point Extraction to Instrumental Detection Systems for Metal Analysis. Review". *Microchim. Acta*, **155**: 349, 2006.
46. PINO V.; AYALA J. H.; AFONSO A. M. & GONZÁLEZ V., "Cloud-point preconcentration and HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments". *J. Anal. Chem.*, **371**: 526, 2001.
47. MANZOORI J. L. & KARIM-NEZHAD G., "Selective cloud point extraction and preconcentration of trace amounts of silver as a dithizone complex prior to flame atomic absorption spectrometric determination". *Anal. Chim. Acta*, **484**: 155, 2003.
48. NASCENTES C. C. & ARRUDA M. A. Z., "Cloud point formation based on mixed micelles in the presence of electrolytes for cobalt extraction and preconcentration". *Talanta*, **61**: 759, 2003.
49. BEZERRA M. A.; CONCEIÇÃO A. L. B. & FERREIRA S. L. C. A "Pre-Concentration Procedure Using Cloud Point Extraction for the Determination of Manganese in Saline Effluents of a Petroleum Refinery by Flame Atomic Absorption Spectrometry". *Microchim. Acta*, **154**: 149, 2006.
50. BORGES D. L. G.; VEIGA M. A. M. S.; FRESCURA V. L. A.; WELZ B. & CURTIUS A. J. "Cloud-point extraction for the determination of Cd, Pb and Pd in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry, using Ir or Ru as permanent modifiers". *Journal J. Anal. At. Spectrom.*, **18**: 501, 2003.
51. DONATI, G. L.; NASCENTES, C.C.; NOGUEIRA, A. R. A.; ARRUDA, M. A. Z. & NÓBREGA, J. A. "Acid extraction and cloud point preconcentration as sample preparation strategies for cobalt determination in biological materials by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Microchem. J.*, **82**(2): 189, 2006.
52. WU P.; ZHANG Y.; LV Y.; HOU X.; WU P.; ZHANG Y.; LV Y. & HOU X. "Cloud point extraction–thermospray flame quartz furnace atomic absorption spectrometry for determination of ultratrace cadmium in water and urine". *Spectrochim. Acta Part B.*, **61**: 1310, 2006.
53. MATOS, G. D.; DOS REIS, E. B.; COSTA, A. C. S. & FERREIRA, S. L. C. "Speciation of chromium in river water samples contaminated with leather effluents by flame atomic absorption spectrometry after separation/preconcentration by cloud point extraction". *Microchem. J.*, **92**(2): 135, 2009.
54. OHASHI A.; ITO H.; KANAI C.; IMURA H. & OHASHI K., "Cloud point extraction of iron(III) and vanadium(V) using 8-quinolinol derivatives and Triton X-100 and determination of 10^{-7} mol dm⁻³ level iron(III) in riverine water reference by a graphite furnace atomic absorption spectroscopy". *Talanta*, **65**: 525, 2005.
55. SHEMIRANI, F.; BAGHDADI, M. & RAMEZANI, M. "Preconcentration and determination of ultra trace amounts of arsenic(III) and arsenic(V) in tap water and total arsenic in biological samples by cloud point extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry". *Talanta*, **65**(4): 882, 2005.

56. GIOKAS D. L.; PALEOLOGOS E. K.; TZOUWARA-KARAYANNI S. M. & KARAYANNIS M. I., "Single-sample cloud point determination of iron, cobalt and nickel by flow injection analysis flame atomic absorption spectrometry - application to real samples and certified reference materials". *J. Anal. At. Spectrom.*, **16**: 521, 2001.
57. CHEN J. & TEO K. C., "Determination of cobalt and nickel in water samples by flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction". *Anal. Chim. Acta*, **434**: 325, 2001.
58. MADRAKIAN, T. & GHAZIZADEH F., "Cloud-point preconcentration and spectrophotometric determination of trace amounts of molybdenum(VI) in steels and water samples". *J. Hazard. Mater.*, 153(1-2): 695, 2008.
59. SILVA, S. G.; OLIVEIRA P. V. & ROCHA F. R. P. "A green analytical procedure for determination of copper and iron in plant materials after cloud point extraction". *J. Braz. Chem. Soc.*, 21(2): 234, 2010.
60. FILIK, H.; YANAZ Z. & APAK R. "Selective determination of total vanadium in water samples by cloud point extraction of its ternary complex". *Anal. Chim. Acta*. 620(1-2): 27, 2008.
61. FILIK, H.; ÇENGEL T. & APAK R. "Selective cloud point extraction and graphite furnace atomic absorption spectrometric determination of molybdenum (VI) ion in seawater samples". *J. Hazard. Mater.* 169(1–3): 766, 2009.
62. MADRAKIAN, T.; AFKHAMI, A.; SIRI, R. & MOHAMMADNEJAD, M. "Micelle mediated extraction and simultaneous spectrophotometric determination of vanadium(V) and molybdenum(VI) in plant foodstuff samples". *Food Chem.*, 127(2): 769, 2011.
63. RUGANI, K. S.; SEMAAN F. S.; LUCCAS P. O. & PEREIRA-FILHO, E. R. "Optimization of sample preparation using statistical methods spectrophotometric determination of Fe and Co in pharmaceutical samples". *Microchem. J.*, **78**: 187, 2004.
64. MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A. & BLOCH, M. F. M. "Determination of Ca, Mg, K, Mn, Cu, Zn, Fe and P in coffee, soybean, corn, sunflower, and pasture grass leaf tissues by a HCl extraction method". *Commun. Soil Sci. Plant. Anal.*, 15(2): 141-147, 1984.
65. DOMINGO J. L. "Vanadium and diabetes. What about vanadium toxicity?". *Mol. Cell. Biochem.*, **203**: 185, 2000.
66. OZTURK N.; OLGAR Y. & OZDEMIR S. "Trace elements in diabetic cardiomyopathy: An electrophysiological overview". *World J. Diabetes*, 4(4): 92, 2013.
67. IVANOV, V. M.; KOHELAEVA G. A. & PROKHOROVA G. V. "Methods for Determining Molybdenum". *J. Anal. Chem.*, 57(9): 758, 2002.
68. WUILLOUD G. M.; DE WUILLOUD J. C. A.; WUILLOUD R. G.; SILVA M.F.; OLSINA R. A. & MARTINEZ L. D. "Cloud point extraction of vanadium in parenteral solutions using a nonionic surfactant (PONPE 5.0) and determination by flow injection-inductively coupled plasma optical emission spectrometry". *Talanta*, 58(4): 619, 2002.

69. ZHU X.; ZHU Z. & WU S. "Determination of trace vanadium in soil by cloud point extraction and graphite furnace atomic absorption spectroscopy". *Microchim. Acta*, **161**: 143, 2008.
70. OHASHI A.; ITO H.; KANAI C., IMURA H. & OHASHI K. "Cloud point extraction of iron(III) and vanadium(V) using 8-quinolinol derivatives and Triton X-100 and determination of 10^{-7} mol dm⁻³ level iron(III) in riverine water reference by a graphite furnace atomic absorption spectroscopy", *Talanta*, **65**: 525, 2005.
71. KAZI T. G.; KHAN S.; BAIG J. A.; KOLACHI N. F.; AFRIDI H. I.; KANDHRO G. A.; KUMAR S. & SHAH A. Q. "Separation and preconcentration of aluminum in parenteral solutions and bottled mineral water using different analytical techniques". *J. Hazard. Mater.* **172**: 780, 2009.
72. KHAN, S.; KAZI T. G.; BAIG J. A.; KOLACHI N.F.; AFRIDI H. I.; WADHWA S. K.; SHAH A. Q.; KANDHRO G. A. & SHAH F. "Cloud point extraction of vanadium in pharmaceutical formulations, dialysate and parenteral solutions using 8-hydroxyquinoline and nonionic surfactant". *J. Hazard. Mater.*, **182**: 371, 2010.
73. CAMPILLO, N.; LOPEZ-GARCIA I.; VINAS P.; ARNAU-JEREZ I. & HERNANDEZ-CORDOBA M., "Determination of vanadium, molybdenum and chromium in soils, sediments and sludges by electrothermal atomic absorption spectrometry with slurry sample introduction". *J. Anal. At. Spectrom.*, 17(10): 1429, 2002.
74. LECHOTYCKI, A., "Factors affecting the determination of molybdenum and vanadium in aqua regia digests of soil by graphite furnace atomic absorption spectrometry". *J. Anal. At. Spectrom.*, 5(1): 25, 1990.
75. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, Resolução n° 420, de 28 de dezembro de 2009,
76. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB; Decisão de Diretoria N° 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005.
77. GUERRA, M. B. B.; ROSA, P. F. & PEREIRA FILHO, E. R., "Chemometric and Analytical Strategies for the Study of Soils from Maritime Antarctica". *BrJAC-Braz. J. Anal. Chem. (Print)*, **3**: 148, 2011.
78. POLEDNIOK, J. & BUHL, F. "Speciation of vanadium in soil". *Talanta*. **59**(1): 1, 2003.
79. SCHAWLOW, A. L. & TOWNES C. H., "Infrared and Optical Masers". *Phys. Rev.*, 112(6): 1940, 1958.
80. MAIMAN, T. H., "Optical and Microwave-Optical Experiments in Ruby". *Phys. Rev. Lett.*, 4(11): 564, 1960.
81. BRECH, F. & CROSS, L., "Optical micro emission stimulated by a ruby laser". *Appl. Spectrosc.*, **16**: 59, 1962.
82. DEBRAS-GUÉDON, J. & LIODEC N., "De l'utilisation du faisceau d'un amplificateur a ondes lumineuses par émission induite de rayonnement (laser á rubis), comme source énergétique pour l'excitation des spectres d'émission des éléments". *C. R. Acad. Sci.* **257**: 3336, 1963.

83. GAUDIUSO, R.; DELL'AGLIO M.; PASCALE O. D.; SENESI G. S. & GIACOMO A. D. "Laser Induced Breakdown Spectroscopy for Elemental Analysis in Environmental, Cultural Heritage and Space Applications: A Review of Methods and Results". *Sensors*, 10(8): 7434, 2010.
84. HAHN, D. W. & OMENETTO N. "Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part II: Review of Instrumental and Methodological Approaches to Material Analysis and Applications to Different Fields". *Appl. Spectrosc.*, 66(4): 347, 2012.
85. GALIOVÁ, M.; KAISER J.; NOVOTNÝ K.; NOVOTNÝ J.; VACULOVIC T.; LISKA M.; MALINA R.; STEJSKAL K.; ADAM V. & KIZEK R., "Investigation of heavy-metal accumulation in selected plant samples using laser induced breakdown spectroscopy and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry". *Appl. Phys. A*, 93(4): 917, 2008.
86. DIXON, P. B. & HAHN D. W., "Feasibility of Detection and Identification of Individual Bioaerosols Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy". *Anal. Chem.*, 77(2): 631, 2004.
87. CANEVE, L.; COLAO F.; FANTONI R. & SPIZZICHINO V. "Laser ablation of copper based alloys by single and double pulse laser induced breakdown spectroscopy". *Appl. Phys. A*, 85(2): 151, 2006.
88. CRAVETCHI, I.; TASCHUK M.; TSUI Y. & FEDOSEJEVS R. "Evaluation of femtosecond LIBS for spectrochemical microanalysis of aluminium alloys". *Anal. Bioanal. Chem.*, 385(2): 287, 2006.
89. LASHERAS, R. J.; BELLO-GÁLVEZ C. & ANZANO J., "Identification of polymers by LIBS using methods of correlation and normalized coordinates" *Polym. Test.*, 29, 1057, 2010.
90. SANTOS, K. M.; CORTEZ, J.; RAIMUNDO JUNIOR, I. M.; PASQUINI, C.; MORTE, E. S. B. & KORN, M. G. A. "An assessment of the applicability of the use of a plasticised PVC membrane containing pyrochatecol violet complexing reagent for the determination of Cu^{2+} ions in aqueous solutions by LIBS". *Microchemical Journal*, 110, 435, 2013.
91. DELL'AGLIO, M.; GAUDIUSO, R.; SENESI G, S.; DE GIACOMO, A.; ZACCONE, C.; MIANO, T. M. & DE PASCALE O. "Monitoring of Cr, Cu, Pb, V and Zn in polluted soils by laser induced breakdown spectroscopy (LIBS)". *J. Environ. Monit.*, 2011, 13, 1422.
92. ALVEY, D. C.; MORTON, K.; HARMON, R. S.; GOTTFRIED, J. L.; REMUS, J. J.; COLLINS, L. M. & WISE, M. A., "Laser-induced breakdown spectroscopy-based geochemical fingerprinting for the rapid analysis and discrimination of minerals: the example of garnet". *Appl. Optics*, 49:168, 2010.
93. HARMON, R. S.; DELUCIA, F. C.; MCMANUS, C. E.; MCMILLAN, N. J.; JENKINS, T. F.; WALSH, M. E. & MIZIOLEK, A., "Laser-induced breakdown spectroscopy – An emerging chemical sensor technology for real-time field-portable, geochemical, mineralogical, and environmental applications". *Appl. Geochem.*, 21: 730, 2006.

94. COUSIN, A.; FORNI, O.; MAURICE, S.; GASNAULT, O.; FABRE, C.; SAUTTER, V.; WIENS, R. C. & MAZOYER, J. "Laser induced breakdown spectroscopy library for the Martian environment". *Spectrochim. Acta, Part B.*, **66**: 805, 2011.
95. FORTES, F. J.; MOROS J.; LUCENA P.; CABALÍN L. M. & LASERNA J. J. "Laser-Induced Breakdown Spectroscopy". *Anal. Chem.*, **85**(2): 640, 2012.
96. DUARTE, J. P. & PEÇAS, P., "Limpeza com laser de excímeros de papéis e pergaminhos com lama" *Revista de Metalurgia*, **34**(2): 1998.
97. PASQUINI, C.; CORTEZ J.; SILVA L. M. C. & GONZAGA F. B., "Laser Induced Breakdown Spectroscopy". *J. Braz. Chem. Soc.*, **18**: 463, 2007.
98. FLOREK, S.; HAISCH C.; OKRUSS M. & BECKER-ROSS H. "A new, versatile echelle spectrometer relevant to laser induced plasma applications". *Spectrochim. Acta, Part B.*, **56**(6): 1027, 2001.
99. DETALLE, V.; HEON, R.; SABSABI, M. & ST-ONGE, L., "An evaluation of a commercial Echelle spectrometer with intensified charge-coupled device detector for materials analysis by laser-induced plasma spectroscopy". *Spectrochim. Acta. Part B*, **56**: 795, 2001.
100. HARMON, R. S.; DELUCIA, F. C.; MCMANUS, C. E.; MCMILLAN, N. J.; JENKINS, T. F.; WALSH, M. E. & MIZIOLEK, A. "Laser-induced breakdown spectroscopy - An emerging chemical sensor technology for realtime field-portable, geochemical, mineralogical, and environmental applications". *Appl. Geochem.*, **21**(5): 730, 2006.
101. SAMEK, O.; LAMBERT J.; HERGENRÖDER R.; LIŠKA M.; KAISER J.; NOVOTNÝ K. & S. KUKHLEVSKY, "Femtosecond laser spectrochemical analysis of plant samples". *Laser Phys. Lett.*, **3**(1): 21, 2006.
102. SANTOS Jr. D.; NUNES L. C.; TREVIZAN L. C.; GODOI. Q.; LEME F. O.; BRAGA J. W. B. & KRUG F. J., "Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for cadmium determination in soils". *Spectrochim. Acta, Part B.*, **64**(10): 1073, 2009.
103. DELL'AGLIO M.; GAUDIUSO R.; SENESI G. S.; GIACOMO A. D.; ZACCONE C.; MIANOD T. M. & PASCALE O. D. "Monitoring of Cr, Cu, Pb, V and Zn in polluted soils by laser induced breakdown spectroscopy (LIBS)". *J. Environ. Monit.*, **13**: 1422, 2011.
104. SAMEK, O.; BEDDOWS D. C. S.; KAISER J.; KUKHLEVSKY S. V.; LISKA M.; TELLE H. H. & YOUNG J. "Application of laser-induced breakdown spectroscopy to in situ analysis of liquid samples". *Opt. Eng.*, **39**(8): 2248, 2000.
105. RAI V. N.; YUEH F. Y. & SINGH J. P., "Laser-Induced Breakdown Spectroscopy of Liquid Samples in: *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*" Jagdish P Singh, Surya N Thakur (Editors)[©] 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.
106. LAZIC, V.; JOVICEVIC S.; FANTONI R. & COLAO F., "Efficient plasma and bubble generation underwater by an optimized laser excitation and its

- application for liquid analyses by laser-induced breakdown spectroscopy". *Spectrochim. Acta, Part B.*, 62(12): 1433, 2007.
107. FENG, Y.; YANG J.; FAN J.; YAO G.; JI X.; ZHANG X.; ZHENG X. & CUI Z., "Investigation of laser-induced breakdown spectroscopy of a liquid jet". *Appl. Opt.*, 49(13): 2010.
108. ZHU, D.; WU L.; WANG B.; CHEN J.; LU J. & NI X. "Determination of Ca and Mg in aqueous solution by laser-induced breakdown spectroscopy using absorbent paper substrates". *Appl. Opt.*, 50(29): 5695, 2011.
109. SARKAR, A.; ALAMELU D. & AGGARWAL S.K., "Determination of thorium and uranium in solution by laser-induced breakdown spectrometry". *Appl. Opt.*, 47(31): 58, 2008.
110. JANZEN, C.; FLEIGE R. D.; NOLL R.; SCHWENKE H.; LAHMANN W.; KNOTH J.; BEAVEN P.; JANTZEN E.; OEST A. & KOKE P., "Analysis of small droplets with a new detector for liquid chromatography based on laser-induced breakdown spectroscopy". *Spectrochim. Acta, Part B.*, **60**: 993, 2005.
111. AYYALASOMAYAJULA, K. K.; DIKSHIT V.; YUEH F.; SINGH J. & SMITH L. "Quantitative analysis of slurry sample by laser-induced breakdown spectroscopy". *Anal. Bioanal. Chem.*, 400(10): 3315, 2011.
112. CHEN, Z.; LI H.; ZHAO F. & LI R. "Ultra-sensitive trace metal analysis of water by laser-induced breakdown spectroscopy after electrical-deposition of the analytes on an aluminium surface". *J. Anal. At. Spectrom.*, 23(6): 871, 2008.
113. AGUIRRE, M. A.; LEGNAIOLI S.; ALMODÓVAR F.; HIDALGO M.; PALLESCI V. & CANALS A., "Elemental analysis by surface-enhanced Laser-Induced Breakdown Spectroscopy combined with liquid-liquid microextraction". *Spectrochim. Acta, Part B.*, 79-80(0): 88, 2013.
114. CALDAS, S. S.; GONÇALVES F. B. F.; PRIMEL E. G.; PRESTES O. D.; MARTINS M. L. & ZANELLA R. "Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas". *Quím. Nova*, **34**: 1604, 2011.
115. REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M. R. M.; AGHAEE, E.; AHMADI, F. & BERIJANI, S. "Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction". *J. Chromatogr., A*, **1116**: 1, 2006.
116. MARTINS M. L.; PRIMEL E. G.; CALDAS S. S.; PRESTES O. D.; ADAIME M. B. & ZANELLA R. "Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações". *Scientia Chromatographica*; 4(1): 35, 2012.
117. KHALILI-ZANJANI, M. R.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S. & JÖNSSON, J. "A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop". *Anal. Chim. Acta*, **585**: 286, 2007.
118. OVIEDO, J. A.; FIALHO L. L. & NÓBREGA J. A., "Determination of molybdenum in plants by vortex-assisted emulsification solidified floating

- organic drop microextraction and flame atomic absorption spectrometry". *Spectrochim. Acta, Part B.*, **86**: 142, 2013.
119. CHANG, C.-C.; WEI S.-Y. & HUANG S.-D., "Improved solvent collection system for a dispersive liquid-liquid microextraction of organochlorine pesticides from water using low-density organic solvent". *J. Sep. Sci.*, **34**(7): 837, 2011.
120. GHAREHBAGHI, M. & SHEMIRANI F., "Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction and enhanced spectrophotometric determination of molybdenum (VI) in water and plant leaves samples by FO-LADS". *Food Chem. Toxicol.*, **49**(2): 423, 2011.
121. FARAJZADEH, M. A.; BAHRAM M. & VARDAST M. R., "Central Composite Design Applied to Optimization of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction of Cu(II) and Zn(II) in Water Followed by High Performance Liquid Chromatography Determination". *CLEAN – Soil, Air, Water*, **38**(5-6): 466, 2010.
122. ASADOLLAHI, T.; DADFARNIA S. & SHABANI A. M. H. "Separation/preconcentration and determination of vanadium with dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop (DLLME-SFO) and electrothermal atomic absorption spectrometry". *Talanta*, **82**(1): 208, 2010.
123. SHAMSIPUR, M. & HABIBOLLAHI S. "A highly sensitive procedure for determination of ultra trace amounts of molybdenum by graphite furnace atomic absorption spectrometry after dispersive liquid-liquid microextraction". *Microchim. Acta*, **171**(3-4): 267, 2010.
124. DADFARNIA, S.; SHABANI A.M.H. & MIRSHAMSI A. "Solidified floating organic drop microextraction and spectrophotometric determination of vanadium in water samples". *Turk. J. Chem.*, **35**(4): 625, 2011.