

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

**DETERMINAÇÃO DE MOLIBDÊNIO EM PLANTAS**  
**COMBINANDO MICROEXTRAÇÃO E ESPECTROMETRIA DE**  
**ABSORÇÃO ATÔMICA EM CHAMA**

**Jenny Andrea Oviedo Villamizar \***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

**Orientador: Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega**

**\* Bolsista CNPq**

**São Carlos – SP**  
**2012**

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

O96dm Oviedo Villamizar, Jenny Andrea.  
Determinação de molibdênio em plantas combinando  
microextração e espectrometria de absorção atômica em  
chama / Jenny Andrea Oviedo Villamizar. -- São Carlos :  
UFSCar, 2012.  
51 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2012.

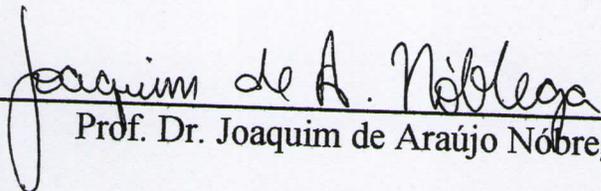
1. Química analítica. 2. Molibdênio. 3. Microextração. 4.  
Espectroscopia de absorção atômica. 5. FAAS. I. Título.

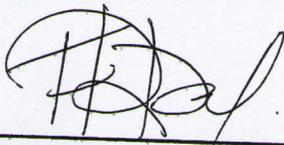
CDD: 543 (20<sup>a</sup>)

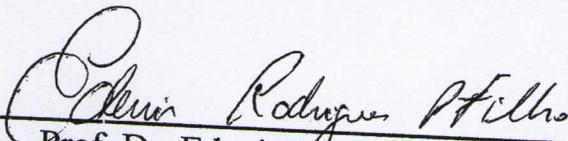
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Mestrado Acadêmico**

---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico da candidata Jenny Andrea Oviedo Villamizar, realizada em 16 de agosto de 2012:*

  
Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nobrega

  
Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha

  
Prof. Dr. Edénir Rodrigues Pereira Filho

*“La vida no es la que uno vivió,  
sino la que uno recuerda y cómo la  
recuerda para contarla”*

**Gabriel García Márquez**

*Dedicado aos meus pais, Arnulfo Oviedo e Luisa  
Villamizar e meu irmão Diego por toda ajuda e  
motivação de sempre.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as coisas maravilhosas que me foram concedidas e a todas as pessoas e amigos que ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, em especial:

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega pela orientação, confiança, conselhos e oportunidades.

Aos Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho e Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira pela ajuda, sugestões e orientação recebida.

À Dra. Lucimar Lopez Fialho pela parceria, amizade, sugestões e colaboração no decorrer deste trabalho.

Aos meus pais, Arnulfo e Luisa, meu irmão Diego e minha avó Ramona, os seres mais especiais e importantes que me apoiaram sempre.

Ao Jorge Armando Ardila Quintero pela linda amizade, paciência, compreensão, carinho e ajuda incondicional.

Aos colegas do Grupo de Análise Instrumental Aplicada (GAIA), Aline, Alex, Ana Beatriz, Carla, Carol, Clarice, Érica, George, Jozemir, Luana, Poliana, Raquel, Renata, Sidnei, Silmara e Tatiane pelo companheirismo e momentos agradáveis.

Aos meus amigos, Lady Niño e Juann pela amizade e os inesquecíveis momentos compartilhados.

Ao Dr. Kelber Miranda pela amizade, ajuda e conhecimentos recebidos com relação ao equipamento e acessórios empregados neste trabalho.

À M. Sc. Amanda Dantas pela amizade e colaboração durante todo meu trabalho de pesquisa.

Ao Dr. Gilberto Batista Souza pela ajuda e as amostras de plantas concedidas.

Aos colegas do Departamento de Química pelo companheirismo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar pelos conhecimentos e formação recebida.

Aos funcionários do DQ/UFSCar e às secretarias Ariane, Cristina e Luciani pela atenção, ajuda e paciência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

Aos membros da banca pelas correções e importantes sugestões.

Ao Brasil pela oportunidade de estudar e por todos os benefícios recebidos.

A todos os que de qualquer maneira me ajudaram nesta valiosa experiência.

A todos,  
Muito obrigada

## LISTA DE ABREVIATURAS

**[Hmim][Tf<sub>2</sub>N]** - (1-hexil-3-metilimidazolio bis (trifluorometilsulfonil) imida) [(1-hexyl-3-methylimidazolium bis (trifluormethylsulfonyl) imid)]

**AAS** - Espectrometria de Absorção Atômica (Atomic Absorption Spectrometry)

**APDC** - Pirrolidinoditiocarbamato de Amônio (Ammonium Pyrrolidinedithiocarbamate)

**BPHA** - N-benzoil-N-fenilhidroxilamina (N-benzoyl-N-phenylhydroxylamine)

**DLLME** - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction)

**ETAAS** - Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry)

**FAAS** - Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (Flame Atomic Absorption Spectrometry)

**FI - FAAS** - Espectrometria de Absorção Atômica em Chama Acoplada a Sistema de Injeção em Fluxo (Flow Injection Flame Atomic Absorption Spectrometry)

**FO - LADS** - Espectrofotômetro com fibra óptica e arranjo linear de detectores (Fiber Optic - Linear Array Detection Spectrophotometry).

**GC -  $\mu$ ECD** - Cromatografia Gasosa com Microdetector de Captura de Elétrons (Gas Chromatography Micro Electron-Capture Detector)

**GFAAS** - Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry)

**HFME** - Microextração com Fibra Oca (Hollow-Fiber Microextraction)

**HG - AFS** - Espectrometria de Fluorescência Atômica com Geração de Hidretos (Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry)

**HPLC** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High-Performance Liquid Chromatography)

**HR - CS FAAS** - Espectrometria de Absorção Atômica em Chama com Fonte Contínua e Alta Resolução (High-Resolution Continuum Source Flame Atomic Absorption Spectrometry)

**ICP OES** - Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)

**ICP - MS** - Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

**IUPAC** - União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)

**LC - MS** - Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)

**LLE** - Extração Líquido-Líquido (Liquid-Liquid Extraction)

**LOD** - Limite de Detecção (Limit of Detection)

**LOQ** - Limite de Quantificação (Limit of Quantification)

**LPME** - Microextração em Fase Líquida (Liquid Phase Microextraction)

**PAN** - 1-(2-Piridilazo)-2-Naftol (1-(2-Pyridylazo)-2-Naphthol)

**PFOS** - Ânion Sulfonato de Perfluorooctano (Perfluorooctane Sulfonate Anion)

**RSD** - Desvio Padrão Relativo (Relative Standard Deviation)

**SDME** - Microextração em gota suspensa (Single-Drop Microextraction)

**SFODME** - Microextração em Gota Orgânica Solidificada (Solidified Floating Organic Drop Microextraction)

**SME** - Microextração com Solvente (Solvent Microextraction)

**TTA** - 2-tenoiltrifluoroacetona (2-thenoyltrifluoroacetone)

**USAE** - Emulsão Assistida por Ultrassom (Ultrasound-Assisted Emulsification Extraction)

**USAE - SFODME** - Microextração em Gota Orgânica Solidificada por Emulsão Assistida por Ultrassom (Ultrasound-Assisted Emulsification Solidified Floating Organic Drop Microextraction)

**VA - SFODME** - Microextração em Gota Orgânica Solidificada Assistida por Vórtex (Vortex - assisted Solidified Floating Organic Drop Microextraction)

**VALLME** - Microextração Líquido-Líquido Assistida por Vórtex (Vortex-assisted Liquid-Liquid Microextraction)

**5-Br-PADAP** - 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol [2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5 diethylaminophenol]

**8 - HQ** - 8-hidroxiquinolina (8-hydroxyquinoline)

## LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1	Trabalhos publicados relacionados ao procedimento SFODME ..	10
TABELA 3.2	Trabalhos publicados relacionados ao procedimento USAE-SFODME .....	12
TABELA 3.3	Trabalhos reportados na literatura sobre determinação de Mo em plantas .....	14
TABELA 4.1	Condições experimentais por FAAS .....	17
TABELA 4.2	Programa de aquecimento para digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (UltraWave) .....	21
TABELA 4.3	Programa de aquecimento para digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (Ethos) .....	22
TABELA 5.1	Condições de redução de Mo e sinais de absorbância obtidos por FAAS .....	25
TABELA 5.2	Efeito da concentração de KSCN sobre os sinais de absorbância obtidos por FAAS .....	25
TABELA 5.3	Efeito da concentração de 8-HQ sobre os sinais de absorbância obtidos por FAAS .....	27
TABELA 5.4	Níveis das variáveis do planejamento fatorial $2^2$ .....	28
TABELA 5.5	Condições experimentais e resultados do planejamento fatorial $2^2$	29
TABELA 5.6	Níveis das variáveis do planejamento fatorial $2^4$ .....	30
TABELA 5.7	Condições experimentais e resultados do planejamento fatorial $2^4$	30
TABELA 5.8	Níveis das variáveis do planejamento fatorial $2^3$ .....	31
TABELA 5.9	Condições experimentais e resultados do planejamento fatorial $2^3$	32
TABELA 5.10	Condições ótimas de extração de Mo por VA-SFODME .....	32

TABELA 5.11	Parâmetros das curvas analíticas obtidas a partir de soluções em meios aquoso e orgânico e medidas por FAAS usando nebulização contínua e discreta .....	36
TABELA 5.12	Parâmetros analíticos do procedimento desenvolvido .....	38
TABELA 5.13	Teores médios e desvios padrão (n = 6) dos digeridos obtidos por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (UltraWave) ...	39
TABELA 5.14	Teores médios e desvios padrão (n = 8) dos digeridos obtidos por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (Ethos).....	39
TABELA 5.15	Procedimento oficial frente ao procedimento desenvolvido para a determinação de Mo em plantas .....	40

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1	Deficiência de Mo em fruto de uva [1] .....	8
FIGURA 3.2	Procedimento USAE-SFODME .....	11
FIGURA 3.3	Procedimento oficial para a determinação de Mo em plantas .....	15
FIGURA 4.1	Sistema de aspiração discreta .....	18
FIGURA 4.2	Complexo Mo-8-HQ [71] .....	20
FIGURA 5.1	Efeito dos tempos de complexação com KSCN (ácido ascórbico: 2% m v <sup>-1</sup> , HCl: 0,5 mol L <sup>-1</sup> , KSCN: 1 mol L <sup>-1</sup> ) sobre os sinais de absorvância obtidos por FAAS .....	26
FIGURA 5.2	Efeito dos tempos de complexação com 8-HQ (8-HQ: 0,5% m v <sup>-1</sup> , tampão acetato: pH 4,75) sobre os sinais de absorvância obtidos por FAAS .....	27
FIGURA 5.3	Absorvância integrada em função do volume discreto injetado .....	33
FIGURA 5.4	Perfis dos sinais analíticos obtidos para Mo para diferentes volumes de injeção (tempo de leitura = 10s) .....	34
FIGURA 5.5	Desvio padrão relativo em relação ao volume de injeção discreta (n = 3) .....	34
FIGURA 5.6	Curvas analíticas de calibração: (A) em meio aquoso com nebulização contínua, (B) em meio aquoso com nebulização discreta, (C) em meio orgânico com nebulização contínua e (D) em meio orgânico com nebulização discreta .....	35

## RESUMO

### DETERMINAÇÃO DE MOLIBDÊNIO EM PLANTAS COMBINANDO MICROEXTRAÇÃO E ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM CHAMA

Neste trabalho foi desenvolvido um procedimento para a determinação de baixas concentrações de molibdênio em plantas utilizando a espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS). A baixa sensibilidade típica de medidas em chama para elementos refratários e os baixos teores de molibdênio em plantas exigem uma etapa prévia de pré-concentração. O procedimento proposto foi baseado no método de microextração em gota orgânica solidificada. Esse método foi escolhido com base em sua simplicidade, o alto fator de enriquecimento que pode ser atingido e o baixo consumo de solvente extrator. Como o procedimento escolhido envolve microvolumes, foi estudado o efeito da introdução discreta de volumes no FAAS. Os seguintes parâmetros de extração foram investigados: tipo e concentração de agente complexante, tipo e volume de solvente, uso de ultrassom e vórtex no processo de extração e o efeito da nebulização discreta. Todos esses parâmetros foram avaliados considerando-se seus efeitos sobre a sensibilidade e os efeitos mais críticos foram observados para o tipo de agente complexante, uso de agitação por vórtex e uso da nebulização discreta. Previamente ao processo de microextração foram otimizadas as condições de complexação de Mo. Uma concentração de 0,5% m v<sup>-1</sup> de 8-hidroxiquinolina, pH 4,75 ajustado com tampão acetato e um tempo de 10 min foram as condições ideais de complexação. No processo de microextração, o maior fator de enriquecimento foi obtido com 60 µL de 1-undecanol sob agitação com vórtex por 2 min. Ao combinar o processo de microextração com a introdução discreta de amostra no FAAS, observou-se uma melhora na sensibilidade. Um fator de enriquecimento máximo de 67, um limite de detecção de 4,9 µg L<sup>-1</sup> e um limite de quantificação de 16,4 µg L<sup>-1</sup> foram obtidos. A partir desses resultados, a exatidão foi demonstrada usando materiais de referência certificados e efetuou-se a determinação de Mo em amostras de raiz e folhas de milho.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF MOLYBDENUM IN PLANTS COMBINING MICROEXTRACTION AND FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

In this study, a procedure for the determination of low concentrations of molybdenum in plants by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) was developed. The poor sensitivity of FAAS for determination of refractory elements such as molybdenum, and the typical low levels of this micronutrient in plants require the use of a preliminary preconcentration step. The procedure was based on the solidified floating organic drop microextraction strategy (SFODME). This method was selected based on its simplicity, high enrichment factors and low consumption of organic solvents. Because of SFODME microvolume characteristics, the effect of the discrete introduction of samples in FAAS was studied. The following extraction parameters were evaluated: type and concentration of complexing agent, type of solvent, solvent volume, use of ultrasound or vortex in the extraction process, and effect of discrete nebulization. All parameters were evaluated considering their effects on sensitivity for the determination of molybdenum in plant samples by FAAS. The most critical effects were caused by the type of complexing agent, the use of vortex mixing and discrete nebulization. Prior to the microextraction procedure, Mo complexing conditions were optimized. A 0.5% m v<sup>-1</sup> 8-hydroxyquinoline solution at pH 4.75 adjusted with acetate buffer and complexing time of 10 min were the ideal experimental conditions. For the microextraction procedure, the highest enhancement factor for Mo was obtained with 60 µL of 1-undecanol and using the vortex mixer for 2 min. Appreciable sensitivity improvements were observed by combining microextraction, the introduction of discrete volumes of sample, and determination of Mo by FAAS. An enrichment factor of 67, limit of detection of 4.9 µg L<sup>-1</sup> and limit of quantification of 16.4 µg L<sup>-1</sup> were reached. The accuracy of the developed procedure was demonstrated by determining Mo in certified reference materials. Finally, the procedure was applied to samples of roots and leaves of corn.

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO .....	2
2 - OBJETIVOS.....	5
2.1 - Objetivo geral.....	5
2.2 - Objetivos específicos.....	5
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	7
3.1 - Molibdênio em plantas.....	7
3.2 - Métodos de extração.....	8
3.3 - Determinação de molibdênio.....	13
3.4 - Procedimento oficial para a determinação de molibdênio em plantas.....	14
4 - MATERIAL E MÉTODOS .....	17
4.1 - Instrumentação e condições experimentais em FAAS.....	17
4.2 - Reagentes e soluções analíticas.....	18
4.3 - Complexação de molibdênio.....	19
4.4 - Microextração de molibdênio.....	20
4.5 - Amostras .....	20
4.6 - Digestão.....	21
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	24
5.1 - Avaliação da formação do complexo.....	24
5.1.1 - Complexação com tiocianato (KSCN).....	24
5.1.2 - Complexação com 8-hidroxiquinolina (8-HQ).....	26
5.2 - Avaliação do processo de microextração.....	28
5.2.1 - Microextração assistida por ultrassom (complexante: KSCN).....	28
5.2.2 - Microextração assistida por ultrassom (complexante: 8-HQ).....	29
5.2.3 - Microextração assistida por vórtex (complexante: 8-HQ).....	31
5.3 - Avaliação da nebulização discreta.....	33

5.4 - Desempenho analítico do procedimento.....	36
5.5 - Avaliação da exatidão e determinação de molibdênio em plantas.....	38
5.6 - Procedimento desenvolvido frente ao procedimento oficial para a determinação de molibdênio em plantas.....	40
6 - CONCLUSÕES .....	43
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

# *CAPÍTULO 1*

---

## *Introdução*

## 1 - INTRODUÇÃO

Molibdênio é um elemento traço encontrado em solos que tem um papel importante no metabolismo do nitrogênio nas plantas, sendo requerido para crescimento de muitos organismos biológicos, incluindo plantas e animais. Molibdênio é um elemento de transição que pode existir em vários estados de oxidação variando do elemento metálico até o oxianion hexavalente, sendo que a forma mais oxidada é a comumente encontrada em solos agrícolas. Molibdênio é utilizado por enzimas específicas de plantas para participar em reações de redução e oxidação. Algumas características físico-químicas desse elemento são: alto ponto de fusão (2817 °C), dureza, resistência à corrosão e capacidade de conferir resistência às ligas metálicas mesmo quando presente em baixas concentrações [1].

Uma alta concentração de molibdênio em plantas pode ser prejudicial para ruminantes, causando depressão da absorção de cobre pelo fígado. Por outro lado, a deficiência de molibdênio em plantas eventualmente resulta em uma diminuição do número de flores e vários distúrbios na formação dos órgãos reprodutivos. Molibdênio também afeta o processo de autopurificação da água natural. Uma concentração de 5 mg L<sup>-1</sup> pode inibir o processo de autopurificação bioquímica e teores mais elevados podem impedir o crescimento de alguns micro-organismos [2].

Dentre os métodos mais comuns para determinações de baixas concentrações de molibdênio, reportados na literatura, têm-se a espectrofotometria ultravioleta-visível, que é utilizada em análises de rotina, e a espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS), que é comumente empregada pela simplicidade e relativo baixo custo. Contudo, a determinação direta de molibdênio em amostras ambientais e de interesse agrônomo é difícil devido à sua baixa concentração, ocorrência de interferências matriciais e formação de compostos de molibdênio de natureza refratária [3]. Porém, esses efeitos podem ser minimizados adotando etapas de separação e pré-concentração antes das medidas analíticas por FAAS. DADFARNIA *et al.* (2008) desenvolveram um método de microextração em fase líquida (LPME) para a determinação de espécies inorgânicas denominado microextração com gota orgânica

solidificada (SFODME). Nesse método, um pequeno volume de um solvente orgânico com ponto de fusão próximo à temperatura ambiente é adicionado à solução aquosa. A amostra é agitada, centrifugada e depois transferida para um banho de gelo visando à solidificação e separação do solvente orgânico. Após fusão à temperatura ambiente, a solução é utilizada para a determinação do analito [4].

Assim, considerando-se a dificuldade que existe para a determinação direta de molibdênio em matrizes complexas, esta dissertação de mestrado investigou a associação da FAAS com nebulização discreta e procedimento de microextração, como ferramentas para melhorar a sensibilidade para a determinação de molibdênio em plantas.

# *CAPÍTULO 2*

---

## *Objetivos*

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 - Objetivo Geral**

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de procedimento analítico com potencial para aplicabilidade em análises de rotina para a determinação de baixas concentrações de molibdênio em amostras de plantas empregando-se FAAS.

### **2.2 - Objetivos Específicos**

- Aperfeiçoar o método de microextração estabelecendo as melhores condições para os seguintes parâmetros: tipo e concentração de agente complexante, tipo de solvente, volume de solvente, uso de ultrassom ou vórtex no processo de extração, seletividade e fator de enriquecimento;
- Investigar o desempenho analítico da nebulização discreta em FAAS para a determinação de molibdênio em microextratos obtidos a partir de digeridos de plantas.

# *CAPÍTULO 3*

---

## *Revisão Bibliográfica*

### 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 - Molibdênio em plantas

Molibdênio é um elemento essencial requerido em baixas concentrações para o crescimento de muitos organismos, sendo que existe uma faixa estreita entre concentrações que causam deficiência ou toxicidade. Algumas publicações descreveram o papel biológico do molibdênio como uma parte integral de um complexo orgânico chamado Mo co-fator, que se une entre outros, a enzimas que participam no metabolismo do nitrogênio (nitrato redutase), biossíntese de hormônios (aldeído oxidase) e metabolismo de sulfeto (sulfito oxidase) [1,5,6].

As formas minerais de molibdênio encontradas em rochas geralmente são a molibdenita ( $\text{MoS}_2$ ), a wulfenita ( $\text{PbMoO}_4$ ) e a ferrimolibdenita [ $\text{Fe}_2(\text{MoO}_4)$ ]. Em solos agrícolas, molibdênio está presente como diferentes complexos dependendo da composição química do solo. Molibdênio dissolvido disponível para plantas é comumente encontrado na forma solúvel como o ânion molibdato [ $\text{MoO}_4$ ]<sup>2-</sup>. Essa disponibilidade depende fortemente de vários fatores como, o pH do solo, a concentração de óxidos adsorvedores, drenagem de água e compostos orgânicos. Em solos alcalinos, molibdênio torna-se mais solúvel e disponível para plantas [1].

Em casos de deficiência, as folhas e frutos têm um menor tamanho, apresentando clorose e manchas marrons em toda extensão da folha, surgindo regiões necrosadas na ponta da folha, que se estendem às bordas. Por último, ocorre queda prematura da folha (Figura 3.1). A deficiência em Mo repercute em um conteúdo anormal de nitrato em folhas e, portanto, influencia no metabolismo do nitrogênio. Por outro lado, excesso de molibdênio em folhas pode causar toxicidade no gado ao ingerir essas folhas. Nesse caso se produzem transtornos intestinais e molibdenose, um distúrbio que induz deficiências de cobre. Alguns sintomas dessa doença são: animais mais magros, com perdas de crescimento e perdas da pigmentação da pele. Essa desordem pode ser controlada mantendo uma adequada relação Mo/Cu na dieta do gado ou alterando a disponibilidade de molibdênio às plantas por ajustes do pH do solo.



FIGURA 3.1 - Deficiência de Mo em fruto de uva [1]

### 3.2 - Métodos de extração

Devido aos efeitos de matriz e à baixa sensibilidade, etapas de separação e pré-concentração frequentemente são requeridas antes das medidas analíticas por FAAS.

O método mais amplamente utilizado para separação e pré-concentração de quantidades traço de íons metálicos é a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*) [7,8]. As principais desvantagens da LLE são tempos longos de trabalho e necessidade de grandes volumes de solventes orgânicos caros e tóxicos. Visando superar essas limitações, têm sido desenvolvidos novos métodos de microextração nos quais se utilizam volumes pequenos de solventes orgânicos e, considerando-se os fatores de pré-concentração atingidos, é viável a determinação de analitos em baixas concentrações [9,10].

Idealmente, um procedimento de preparo de amostra deve ser rápido, ter fácil aplicabilidade, ter baixo custo, ser compatível com vários instrumentos analíticos, ser passível de simplificação e miniaturização das etapas necessárias para os procedimentos, com redução ou eliminação total dos solventes necessários para a extração e com possibilidades de automação. O procedimento que é comumente empregado, e tem potencial para acolher essas características é a microextração com solvente [11,12]. Na microextração com solvente (SME) ou microextração em fase

líquida (LPME), a extração normalmente ocorre em uma pequena quantidade de um solvente imiscível em água a partir de uma amostra aquosa contendo o analito [11,13-15]. Esse procedimento pode ser dividido em três categorias principais: (1) microextração em gota suspensa (SDME) [16-21], (2) microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) [22-26], e (3) microextração com fibra oca (HFME) [27].

DLLME é um dos modos mais simples de SME e sua principal vantagem é o menor tempo de extração [24]. KHALILI-ZANJANI *et al.* (2007) reportaram um novo método de microextração líquido-líquido baseado em DLLME denominado microextração com gota orgânica solidificada (SFODME, do inglês *solidified floating organic drop microextraction*), que foi usado com êxito na extração e determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Nesse método, um pequeno volume de um solvente orgânico com um ponto de fusão próximo à temperatura ambiente é adicionado à solução aquosa. A fase aquosa é agitada durante certo tempo e, em seguida, a amostra é transferida para um banho de gelo. Quando o solvente orgânico solidifica, esse é transferido para um pequeno tubo cônico e quando esse se funde à temperatura ambiente, pode ser usado para a determinação dos analitos. Esse método tem a vantagem de simplicidade, rapidez, baixo custo, reduzido consumo de solvente orgânico e alto fator de enriquecimento. O solvente orgânico utilizado para extração em SFODME deve satisfazer vários critérios: (1) baixa solubilidade em água a fim de ter uma boa eficiência de extração, (2) baixa volatilidade para impedir a perda de solvente durante a extração; (3) extração quantitativa dos analitos, (4) apresentar densidade menor que a densidade da água e (5) ter um ponto de fusão próximo à temperatura ambiente (i.e. no intervalo de 10 a 30 °C) [28].

Posteriormente, SFODME foi aplicada para a determinação de espécies inorgânicas utilizando diferentes agentes complexantes dependendo do analito. No primeiro trabalho, os autores utilizaram ditizona como agente complexante do chumbo e espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) para a determinação [4]. Em 2009 determinaram cobalto e níquel em amostras de água de torneira, de poço e de mar por GFAAS usando como agente complexante o 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) [29], por último, determinaram cádmio em amostras de água de torneira, de poço, de rio e de mar por espectrometria de absorção atômica em chama acoplada a sistema de

injeção em fluxo (FI-FAAS) [30]. O método também tem sido aplicado na determinação de outras espécies inorgânicas (Tabela 3.1)

TABELA 3.1 - Trabalhos publicados relacionados ao procedimento SFODME

Analito	Complexante	Solvente	Método	LOD (ng L <sup>-1</sup> )	Referência
Chumbo	Ditizona	1-Undecanol	GFAAS	0,9	[4]
Cobalto	PAN	1-Undecanol	GFAAS	0,4	[29]
Níquel				0,3	
Cádmio	MTOA	1-Undecanol	FI-FAAS	7,9	[30]
Cobre	DPC	1-Undecanol	FI-FAAS	400	[31]
Chumbo	-	Ácido	ETAAS	10	[32]
Cádmio		undecanoico		0,5	
Vanádio	8-HQ	1-Undecanol	UV - Vis	970	[33]
Cromo	TTA	1-Undecanol	GFAAS	6,0	[34]
Mercúrio	-	Ácido undecanoico	ETAAS	70	[35]
Alumínio*	Morin	1-Undecanol	ICP OES	800	[36]
Mn, Cr, Co e Cu*	TTA	1-Undecanol	ICP OES	100	[37]
				300	
Vanádio*	BPHA	1-Undecanol	ETAAS	7	[38]

\* Determinação por microextração líquido-líquido dispersiva baseada na solidificação da gota orgânica (agente dispersor: acetona)

Além disso, é bem conhecido que ultrassom pode acelerar processos de separação e extração, tais como homogeneização, formação de emulsão e transferência de massa entre fases insolúveis, devido à formação de pequenas gotas que aumentam a superfície de contato entre as fases [39]. Por isso, o método de extração por emulsão assistida por ultrassom (USAE, do inglês *ultrasound-assisted emulsification extraction*) foi utilizado com êxito como uma alternativa para LLE, viabilizando o alcance da condição de equilíbrio de extração em curto intervalo de tempo [40,41]. A vantagem dos métodos previamente descritos, USAE e SFODME, é o

uso de um pequeno volume de solvente extrator. Como uma decorrência lógica, CHANG *et al.* (2010) combinaram essas estratégias e propuseram um novo método denominado microextração por emulsão assistida por ultrassom em gota orgânica solidificada (USAE-SFODME, do inglês *ultrasound-assisted emulsification solidified floating organic drop microextraction*) (Figura 3.2) [42]. Esse método oferece vantagens tais como simplicidade de operação, baixo custo, rapidez, alto fator de enriquecimento e baixo consumo de solvente extrator.

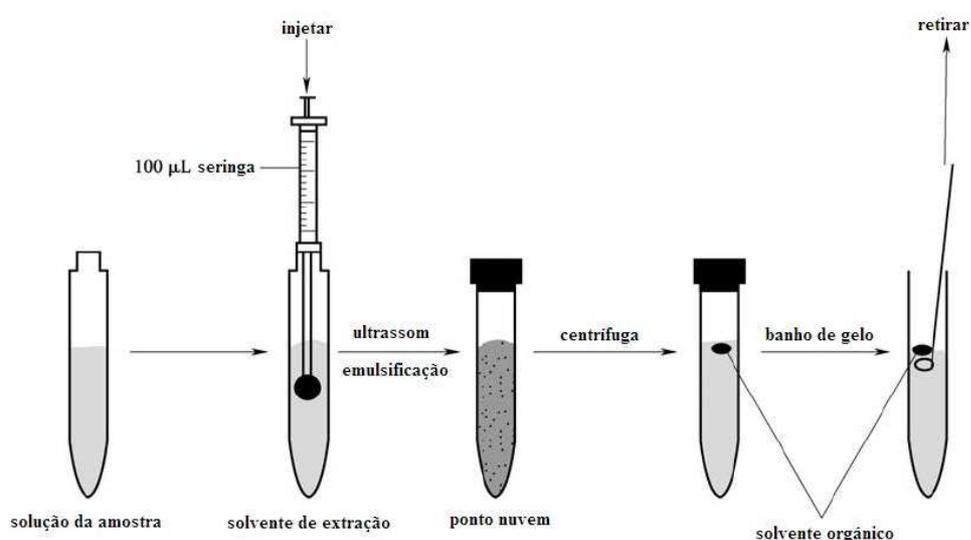


FIGURA 3.2 - Procedimento USAE-SFODME

No primeiro trabalho, os autores propuseram a determinação por FAAS de baixas concentrações de cobre utilizando PAN como agente complexante. Outro trabalho desenvolvido também por esse grupo foi a determinação de zinco por FAAS e PAN como agente complexante [43]. Paládio foi determinado por FAAS usando pirrolidinoditiocarbamato de amônio como agente complexante [44]. Nesses trabalhos, os analitos foram determinados em amostras de águas. Recentemente esse procedimento tem sido aplicado para a determinação de outros analitos (Tabela 3.2).

TABELA 3.2 - Trabalhos publicados relacionados ao procedimento USAE-SFODME

Analito	Complexante	Solvente	Método	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Referência
Cobre	PAN	1-Dodecanol	FAAS	0,76	[42]
Zinco	PAN	1-Dodecanol	FAAS	0,79	[43]
Paládio	APDC	1-Undecanol	FAAS	0,6	[44]
Cádmio	PAN	1-Dodecanol	FAAS	0,66	[45]
Selênio	APDC	1-Undecanol	HG-AFS	0,007	[46]
Telúrio	APDC	1-Undecanol	GFAAS	0,003	[47]
Manganês	5-Br-PADAP	1-Undecanol	GFAAS	0,3	[48]

A principal desvantagem do uso do ultrassom é a eventual necessidade de uma etapa longa de separação de fases. Assim, a agitação por vórtex pode ser usada como uma alternativa no processo de extração onde a dispersão do solvente na fase aquosa ocorre de forma mais rápida. Recentemente a agitação por vórtex tem sido combinada com processos de microextração [49-51]. JIA *et al.* (2010) desenvolveram um procedimento de microextração líquido-líquido assistido por vórtex (VALLME, do inglês *vortex-assisted liquid-liquid microextraction*) para a determinação de pesticidas em amostras de água por cromatografia gasosa com microdetector de captura de elétrons GC- $\mu$ ECD. Um volume de amostra de 20 mL, 30  $\mu$ L de tolueno como solvente orgânico e agitação por vórtex por 2 min a 2800 rpm foram necessários. Os limites de detecção foram menores que 0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$  e os fatores de enriquecimento estiveram na faixa de 835 a 1115 [49]. Esse procedimento também foi aplicado para a determinação de octilfenol, nonilfenol e bisfenol-A em amostras de água por HPLC [50] e na determinação de traços do ânion sulfonato de perfluorooctano (PFOS) em amostras de água por LC-MS [51]. Nesses trabalhos só foi necessário um tempo de 2 min de agitação por vórtex no processo de microextração, evidenciando um procedimento rápido com alta eficiência de extração e o uso do vórtex como uma alternativa interessante para o desenvolvimento de procedimentos de rotina.

Outra alternativa que tem como objetivo melhorar a sensibilidade nas medidas por FAAS é a introdução discreta de amostras [52-55]. A aquisição de sinal analítico com uso de aspiração contínua é realizada em altura de pico, uma vez que, a

amostra é aspirada continuamente em direção ao atomizador. Alternativamente, a introdução discreta de amostras gera sinais transientes, o que requer a aquisição do sinal analítico através da área do pico. As principais vantagens da nebulização discreta como uma alternativa de introdução de amostra são a maior sensibilidade analítica, que pode ser observada com a avaliação dos coeficientes angulares obtidos nas curvas analíticas de calibração, o menor volume de amostra necessário, diminuindo o tempo de limpeza do sistema de introdução de amostra e evitando possíveis entupimentos do capilar do nebulizador do FAAS e redução dos depósitos de carbono no queimador.

### 3.3 - Determinação de molibdênio

Alguns métodos para determinação de baixas concentrações de molibdênio, conforme descrito por IVANOV *et al.* (2002), são: espectrofotometria UV-Visível [2, 7, 25, 57], espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) [58, 59], espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) [26, 60, 61], espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) [62, 63], espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [64] e métodos voltamétricos [65, 66].

COMITRE e REIS (2003), estudaram a determinação espectrofotométrica de molibdênio em plantas usando LLE em um sistema de multicomutação em fluxo. O procedimento foi baseado na reação de molibdênio com tiocianato seguido pela redução com cloreto estanoso e posterior separação usando álcool isoamílico como solvente de extração. O limite de detecção obtido foi de  $4,6 \mu\text{g L}^{-1}$  [7]. No ano seguinte, TUNÇELI e TÜRKER (2004) determinaram molibdênio em plantas como um complexo tiocianato-Mo(VI) por espectrofotometria visível associada à extração em fase sólida. O procedimento proposto foi aplicado a amostras de plantas e solos. O limite de detecção estabelecido foi de  $38 \mu\text{g L}^{-1}$ . Tiouréia foi utilizada para a redução quantitativa de Mo(VI) a Mo(V). Vários parâmetros analíticos que afetam a porcentagem de recuperação foram avaliados, tais como acidez da solução, quantidade de agente complexante, quantidade de agente redutor, vazão de solução de amostra e íons interferentes [2]. BELLATO *et*

al. (2005) determinaram molibdênio em plantas por ICP MS com diluição isotópica após extração em ponto de nuvem. O limite de detecção atingido foi de  $0,8 \mu\text{g kg}^{-1}$  [64].

Recentemente foi reportado um procedimento de microextração líquido-líquido dispersiva com líquidos iônicos para a determinação de Mo em amostras de plantas usando FO-LADS. Previamente ao processo de microextração, cloreto de N-cetil-N-N-N-trimetilamônio foi utilizado como agente complexante. O líquido iônico [Hmim][Tf<sub>2</sub>N] foi usado como solvente de extração e acetona como agente dispersor. O limite de detecção atingido foi de  $1,43 \mu\text{g L}^{-1}$  [25].

Na Tabela 3.3 estão resumidos alguns trabalhos relacionados à determinação de Mo em plantas.

TABELA 3.3 - Trabalhos reportados na literatura sobre a determinação de Mo em plantas

Procedimento	Sistema de detecção	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Referência
Extração líquido-líquido	Espectrofotometria	4,6	[7]
Extração em fase sólida	Espectrofotometria	38	[2]
Extração em ponto nuvem (CPE)	ICP-MS	0,8	[64]
---	HR-CS FAAS	140	[59]
Microextração líquido-líquido dispersiva com líquidos iônicos	FO-LADS	1,43	[25]
Extração por micelas	Espectrofotometria	1	[67]

Como aspecto geral pode-se apontar que os procedimentos de determinação de molibdênio em plantas são dependentes de etapas prévias de separação e pré-concentração tendo em vista a baixa concentração desse micronutriente [68,69].

### 3.4 - Procedimento oficial para a determinação de molibdênio em plantas

Malavolta *et al.* (1989) reportam o procedimento oficial para a determinação de Mo em plantas empregando espectrofotometria (Figura 3.3). O princípio do método fundamenta-se na formação de um complexo colorido da reação do molibdênio com o tiocianato, na presença de cloreto estanoso como agente redutor. O complexo é solúvel e extraído em álcool isoamílico e tetracloreto de carbono. A cor desenvolvida é medida espectrofotometricamente em 470 nm. No procedimento é utilizado um elevado volume de extrato (30 mL) obtido por dissolução das cinzas geradas por incineração e também é utilizado um volume considerável de fase extratora, (3 mL). Para ajustar o pH também é necessário um elevado volume de solução, (10 mL) [70].

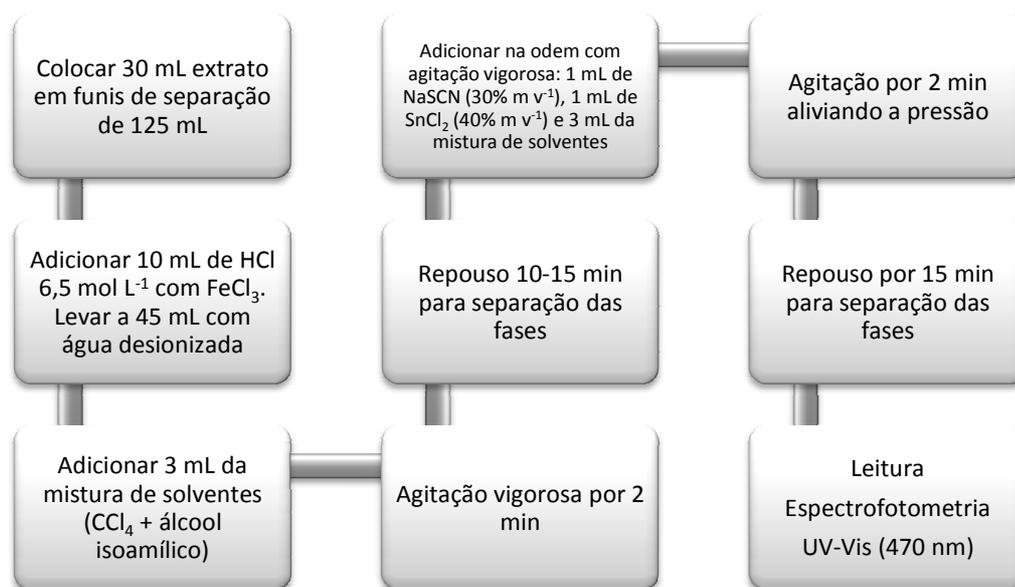


FIGURA 3.3 - Procedimento oficial para a determinação de Mo em plantas

Devido a esses grandes volumes de soluções utilizadas e a conseqüente geração de resíduos, torna-se necessário o desenvolvimento de novos procedimentos rápidos, simples, de baixo custo, seguros, com elevada sensibilidade e com exatidão aceitável para a determinação de Mo em plantas.

# *CAPÍTULO 4*

---

## *Materiais e Métodos*

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 - Instrumentação e condições experimentais em FAAS

As determinações de molibdênio foram feitas com uso de um espectrômetro de absorção atômica em chama (Varian AA240FS, Mulgrave, Austrália) equipado com uma lâmpada de arco de deutério para a correção da radiação de fundo e alimentado com acetileno e óxido nítrico (White Martins, Sertãozinho, SP, Brasil). Como fonte de radiação, foi usada uma lâmpada de cátodo oco de molibdênio. As condições experimentais empregadas nas determinações estão apresentadas na Tabela 4.1.

TABELA 4.1 - Condições experimentais por FAAS

Parâmetro	
Corrente elétrica (mA)	7
Altura do atomizador (mm)	10
Resolução espectral (nm)	0,5
Comprimento de onda (nm)	313,3
Vazão N <sub>2</sub> O (L min <sup>-1</sup> )	11,0
Vazão acetileno (L min <sup>-1</sup> )	7,6

Altura e área de pico foram utilizadas para monitorar os sinais analíticos para os sistemas de introdução da amostra por nebulização contínua ou por nebulização discreta, respectivamente. Um tempo de leitura do sinal de 5 s foi suficiente para obter o sinal analítico com nebulização discreta.

Para a aspiração discreta por FAAS uma ponteira de micropipeta com capacidade de 1000 µL foi conectada à tubulação do nebulizador pneumático através de um capilar de politetrafluoroetileno (PTFE) e fixada em um suporte universal (Figura

4.1). As microinjeções manuais foram realizadas com o auxílio de uma micropipeta de volume variável de 100 a 1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Alemanha).



FIGURA 4.1 - Sistema de aspiração discreta

No procedimento de microextração foi utilizado um pHmetro (PHS-3B, Phtek, China), um agitador tipo vórtex (Thermolyne type 37600 Mixer, Dubuque, IA, EUA) e um banho termostaticado (AquaWave 9374, Barnstead|Lab-Line, Alemanha) para a dispersão do solvente orgânico na fase aquosa e formação de emulsão. Uma centrífuga (Hermle/Labnet Z200A, Alemanha) foi necessária para o processo de separação de fases.

## **4.2 - Reagentes e soluções analíticas**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água ultrapura obtida de um sistema de purificação Milli-Q<sup>®</sup> (Millipak-40 Filter Unit 0,22  $\mu\text{m}$  NPT, Bedford, MA, EUA) com resistividade mínima de 18,2  $\text{M}\Omega$

cm. O material de vidro e polipropileno foi previamente lavado e mantido em banho de ácido nítrico 10% v v<sup>-1</sup> por 24 h e lavado posteriormente com água ultrapura. As soluções de Mo foram preparadas por diluições sucessivas com água ultrapura a partir de uma solução estoque de Mo de 1000 mg L<sup>-1</sup> (Qhemis High Purity, EUA).

Foram utilizadas soluções preparadas diariamente de 8-hidroxiquinolina (8-HQ) (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), soluções de tiocianato de potássio (KSCN) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), soluções de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), solução tampão em pH 4,75 preparada a partir do acetato de sódio (Labsynth, São Paulo, SP, Brasil) e ácido acético glacial (Quemis, Joinville-SC, Brasil) em concentrações apropriadas para ajuste do pH para a formação do complexo com 8-HQ e soluções de HCl para dissolução da 8-HQ e ajuste do pH para a formação do complexo com KSCN.

Para os testes de microextração foram utilizados 1-undecanol 99% v v<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich) e 1-dodecanol 98% v v<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich) como solventes orgânicos e etanol 99,5% v v<sup>-1</sup> (Tec Lab, São Paulo, SP, Brasil) para diluição da fase rica que continha o analito.

### 4.3 - Complexação de molibdênio

Em um frasco de polipropileno com capacidade de 15 mL foi adicionado 120 µL de solução estoque de Mo contendo 100 mg L<sup>-1</sup> para ajustar a concentração final de Mo em 5 mg L<sup>-1</sup>. Em seguida, visando a complexação com 8-hidroxiquinolina (Figura 4.2), foi adicionado 1 mL de tampão acetato pH 4,75 e 2,5 mL de 8-HQ 0,5% m v<sup>-1</sup>. Para complexação com tiocianato de potássio, foi adicionado 3 mL de ácido ascórbico 2% m v<sup>-1</sup>, 1 mL de HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> e 3 mL de KSCN 1 mol L<sup>-1</sup>. O volume final foi ajustado para 8 mL. Para a formação dos complexos foram necessários 10 min.

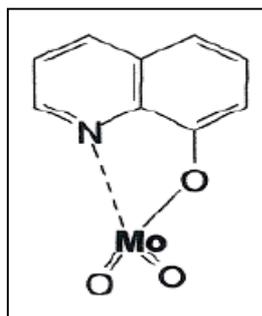


FIGURA 4.2 - Complexo Mo-8-HQ [71]

#### 4.4 - Microextração de molibdênio

Após a formação do complexo, 60  $\mu\text{L}$  de 1-undecanol foram adicionados. A mistura foi agitada com o uso do agitador vórtex por 2 min para assegurar a completa extração. A mistura foi centrifugada por 2 min a 2000 rpm. Após esse processo o solvente orgânico permaneceu na superfície da solução. O tubo foi transferido para um banho de gelo e o solvente orgânico solidificou na parede do tubo após 10 min, formando um anel na superfície do mesmo. A solução aquosa (fase pobre) foi descartada e o solvente orgânico foi liquefeito no mesmo tubo quando mantido à temperatura ambiente. Finalmente, a fase que continha o analito foi diluída com 500  $\mu\text{L}$  de etanol para posterior determinação por FAAS.

#### 4.5 - Amostras

As amostras de raízes e folhas de milho foram coletadas de um experimento hidropônico. Após a coleta, as amostras foram lavadas agitando-as por alguns segundos em água destilada contendo um pouco de detergente, em seguida foram enxaguadas com água destilada em porções sucessivas para remover todo o detergente e depois colocadas sobre papel absorvente. Na secagem, as amostras foram colocadas em sacos de papel perfurados e secas em estufa com circulação forçada de ar, com temperatura variando de 65 a 70°C. A moagem foi feita utilizando o

moinho de aço inoxidável e passando a amostra em peneiras de 1 mm de malha. As amostras foram armazenadas em frascos de polietileno de alta densidade sob temperatura ambiente.

O tratamento das amostras prévio as análise foi feito seguindo o procedimento proposto por Malavolta *et al.* (1989) [70].

#### 4.6 - Digestão

O emprego de digestão assistida por radiação micro-ondas [72-74] foi investigado utilizando dois equipamentos diferentes.

Usando um forno de micro-ondas com câmara de reação pressurizada (Ultrawave, Milestone, Itália), foram digeridas 500 mg de amostra, adicionando 5 mL de HNO<sub>3</sub> subdestilado 2 mol L<sup>-1</sup> e 3 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m v<sup>-1</sup>. Depois de concluído o programa de digestão, os frascos foram resfriados e as soluções digeridas foram transferidas para frascos de polipropileno com capacidade de 15 mL e diluídas com água ultrapura até um volume de 13 mL. O programa de aquecimento é mostrado na Tabela 4.2. O pH do digerido foi ajustado entre 4 e 5 com uma solução de NaOH 1,5 mol L<sup>-1</sup>.

TABELA 4.2 - Programa de aquecimento para digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (UltraWave)

Tempo (min)	Potência (W)	Temperatura (°C)	Pressão (bar)
14	1500	120	100
11 (rampa)	1500	250	100
8 (patamar)	1500	250	100

A digestão assistida por radiação micro-ondas também foi conduzida em um forno Ethos (Milestone), sendo que nesse caso foram digeridas 250 mg de amostra, adicionando 6 mL de HNO<sub>3</sub> subdestilado 3,5 mol L<sup>-1</sup> e 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m v<sup>-1</sup>. Depois

de concluído o programa de digestão, os frascos foram resfriados e as soluções digeridas foram transferidas a frasco de polipropileno com capacidade de 15 mL e diluídas com água ultrapura até um volume de 13 mL. O programa de aquecimento está apresentado na Tabela 4.3. O pH do digerido foi ajustado entre 4 e 5 com uma solução de NaOH 6,5 mol L<sup>-1</sup>.

TABELA 4.3 - Programa de aquecimento para digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (Ethos)

Tempo (min)	Potência (W)	Temperatura (°C)
12	900	120
6 (rampa)	1100	180
10 (patamar)	1100	180

# *CAPÍTULO 5*

---

## *Resultados e Discussão*

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Avaliação da formação do complexo

A separação de íons metálicos por USAE-SFODME e VA-SFODME requer a formação prévia de um complexo suficientemente hidrofóbico que possa ser extraído em um pequeno volume da fase orgânica, no qual a pré-concentração desejada pode ser obtida. Antes de avaliar as variáveis que afetam o procedimento de microextração, foi estudado o efeito da complexação de molibdênio no sinal analítico por FAAS utilizando um agente complexante inorgânico (KSCN) e um agente complexante orgânico (8-HQ).

#### 5.1.1 - Complexação com tiocianato (KSCN)

As condições estudadas para a formação do complexo foram: concentração de agente redutor (ácido ascórbico), concentração de HCl e concentração de agente complexante (KSCN). Inicialmente foi necessário reduzir Mo(VI) a Mo(V) para possibilitar a formação do complexo  $[\text{MoO}(\text{NCS})_5]^{2-}$ , estudando o efeito da variação das concentrações de ácido ascórbico e de HCl (Tabela 5.1). O ácido ascórbico foi utilizado para evitar a forte redução de Mo(VI) a Mo(III), e assim garantir somente a presença de Mo(V) para uma determinação quantitativa. Adição de solução de ácido clorídrico é necessária para realizar o ajuste do pH da solução para obter um meio reacional ácido para a redução e formação do complexo. A condição 4, HCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e ácido ascórbico  $2,0\% \text{ m v}^{-1}$ , proporcionou o maior incremento no sinal analítico e foi escolhida como uma condição adequada de redução de Mo(VI). Esse incremento no sinal é devido à formação do complexo de Mo que evita a formação de compostos refratários de Mo na chama sendo mais eficiente o processo de atomização.

TABELA 5.1 - Condições de redução de Mo e sinais de absorvância obtidos por FAAS

	Condição*	Absorvância	Incremento Sinal (%)
1	Solução padrão estoque Mo 5,0 mg L <sup>-1</sup>	0,0708	-
2	HCl 0,5 mol L <sup>-1</sup> ; Ácido ascórbico 1,0% m v <sup>-1</sup>	0,1075	52
3	HCl 1,0 mol L <sup>-1</sup> ; Ácido ascórbico 1,0% m v <sup>-1</sup>	0,0965	36
4	HCl 0,5 mol L <sup>-1</sup> ; Ácido ascórbico 2,0% m v <sup>-1</sup>	0,1420	100
5	HCl 1,0 mol L <sup>-1</sup> ; Ácido ascórbico 2,0% m v <sup>-1</sup>	0,1161	64

\*KSCN: 3 mol L<sup>-1</sup>, tempo de complexação: 30 min

Após escolhidas as condições para reduzir o Mo, o estudo sobre o efeito de diferentes concentrações de KSCN foi realizado. Da Tabela 5.2 pode ser observado que não há uma variação significativa no sinal analítico com as concentrações estudadas. Foi escolhida a menor concentração de KSCN, 1,0 mol L<sup>-1</sup>, para posteriores testes de microextração. Esses resultados evidenciam que há uma quantidade em excesso de KSCN e a completa complexação de Mo está ocorrendo.

TABELA 5.2 - Efeito da concentração de KSCN sobre os sinais de absorvância obtidos por FAAS

	Condição*	Absorvância	Incremento Sinal (%)
1	Solução padrão estoque Mo 5,0 mg L <sup>-1</sup>	0,0740	-
2	KSCN 1,0 mol L <sup>-1</sup>	0,1320	78
3	KSCN 3,0 mol L <sup>-1</sup>	0,1353	83
4	KSCN 5,0 mol L <sup>-1</sup>	0,1242	68

\*ácido ascórbico: 2% m v<sup>-1</sup>, HCl: 0,5 mol L<sup>-1</sup>, tempo de complexação: 30 min

Intervalos de tempo inferiores a 30 min foram estudados para confirmar o efeito dessa variável sobre a formação do complexo. Um intervalo de 10 min foi escolhido como o tempo de complexação aplicado no procedimento de microextração (Figura 5.1).

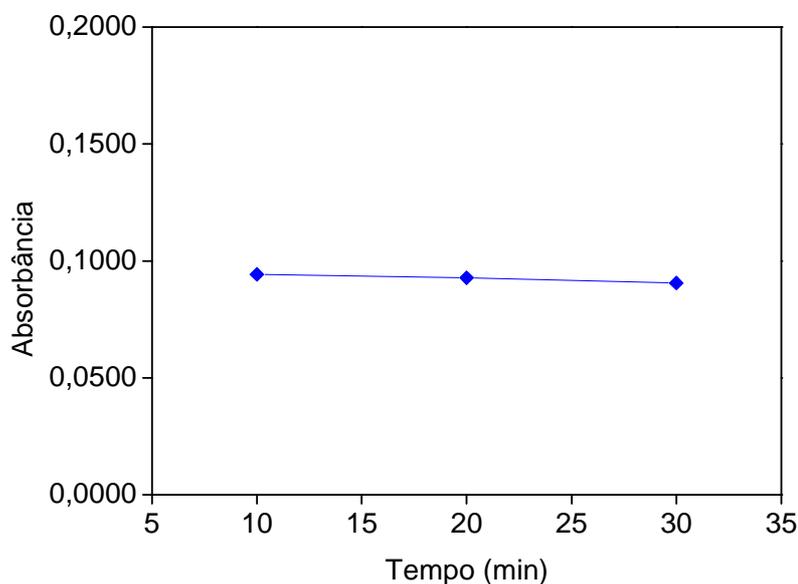


FIGURA 5.1 - Efeito dos tempos de complexação com KSCN (ácido ascórbico: 2% m v<sup>-1</sup>, HCl: 0,5 mol L<sup>-1</sup>, KSCN: 1 mol L<sup>-1</sup>) sobre os sinais de absorbância obtidos por FAAS

### 5.1.2 - Complexação com 8-hidroxiquinolina (8-HQ)

Foi estudado o efeito da variação da concentração de 8-HQ na faixa de concentração de 0,25 a 1,0% m v<sup>-1</sup> e pode ser observado da Tabela 5.3 que não ocorreu significativa variação nos valores dos sinais de absorbância obtidos. A concentração de 0,5% m v<sup>-1</sup> foi escolhida como a condição a ser utilizada no estudo do processo de microextração por apresentar o maior incremento do sinal analítico. Essa concentração em excesso escolhida garante que o molibdênio seja completamente complexado e qualquer elemento que possa competir com a formação de um complexo com 8-HQ não afetará na determinação de molibdênio por FAAS considerando-se a própria seletividade desse método. O pH de 4,75 ajustado com tampão acetato foi estabelecido no procedimento uma vez que há um estudo prévio no qual os melhores resultados para a formação do complexo Mo-8-HQ foram obtidos na faixa de pH de 3 a 6 [64].

TABELA 5.3 - Efeito da concentração de 8-HQ sobre os sinais de absorbância obtidos por FAAS

	Condição*	Absorbância	Incremento Sinal
1	Solução padrão estoque 5,0 mg L <sup>-1</sup>	0,0854	-
2	8-HQ 0,25% m v <sup>-1</sup>	0,1043	22%
3	8-HQ 0,5% m v <sup>-1</sup>	0,1146	34%
4	8-HQ 1,0% m v <sup>-1</sup>	0,0954	12%

\*tampão acetato: pH 4,75, tempo de complexação: 30 min

A partir da Figura 5.2 pode-se observar que tempos menores a 30 min não influenciaram a formação do complexo. Um intervalo de tempo de 10 min foi escolhido como o tempo de complexação aplicado no procedimento de microextração.

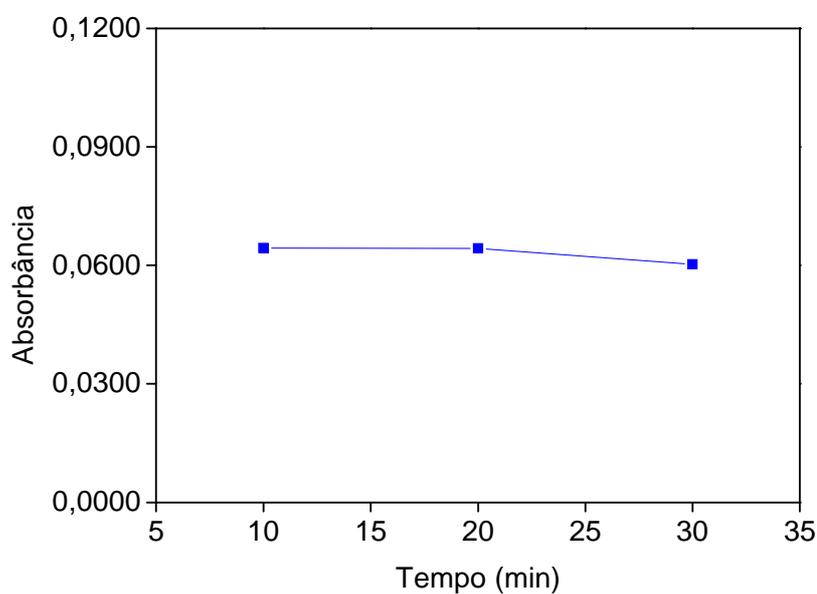


FIGURA 5.2 - Efeito dos tempos de complexação com 8-HQ (8-HQ: 0,5% m v<sup>-1</sup>, tampão acetato: pH 4,75) sobre os sinais de absorbância obtidos por FAAS

## 5.2 - Avaliação do processo de microextração

Todos os estudos de microextração com gota foram realizados em soluções contendo  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de Mo. Foi utilizada análise multivariada para avaliar o efeito de algumas variáveis do procedimento sobre a eficiência de extração de molibdênio.

### 5.2.1 - Microextração assistida por ultrassom (complexante: KSCN)

Na microextração em gota assistida por ultrassom com KSCN como agente complexante foram avaliadas as variáveis tipo de solvente e volume de solvente (Tabela 5.4) empregando um planejamento experimental  $2^2$  com um total de quatro experimentos.

TABELA 5.4 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial  $2^2$

Variável	Nível (-)	Nível (+)
Solvente	1-undecanol	1-dodecanol
Volume de solvente ( $\mu\text{L}$ )	60	90

A resposta estudada foi o fator de pré-concentração (F.P). Pode-se observar na Tabela 5.5 os baixos fatores de pré-concentração obtidos, não havendo uma pré-concentração de Mo utilizando o KSCN como agente complexante. Isto pode ser explicado pelo maior caráter hidrofílico do complexo formado e, portanto, pela pouca afinidade com o solvente extrator.

TABELA 5.5 - Condições experimentais e resultados do planejamento fatorial 2<sup>2</sup>

Condição	Solvente	Volume (µL)	Absorbância Média (n = 3)	RSD %	F.P*
1	1-undecanol	60	0,0281	27,0	1,1
2	1-dodecanol	60	0,0201	13,4	0,8
3	1-undecanol	90	0,0359	36,5	1,5
4	1-dodecanol	90	0,0233	21,0	0,9

\* F.P foi calculado pela relação das absorbâncias médias antes e após a microextração.

### 5.2.2 - Microextração assistida por ultrassom (complexante: 8-HQ)

Na microextração em gota assistida por ultrassom com 8-HQ como agente complexante, foram avaliadas as seguintes variáveis (Tabela 5.6): tipo de solvente, volume de solvente, tempo e temperatura do banho de ultrassom através de um planejamento experimental 2<sup>4</sup> com um total de 16 experimentos. A resposta estudada foi o fator de pré-concentração (F.P). A análise dos resultados obtidos mostrou que nenhuma variável foi significativa a um nível de confiança de 95%. Pode-se observar na Tabela 5.7 que para a maioria dos experimentos foram obtidos altos valores de desvio padrão relativo (RSD) e baixos fatores de pré-concentração, entre 1,8 e 9,2. Esses valores obtidos para o procedimento de extração podem ser devidos a problemas decorrentes do uso dos banhos de ultrassom. Esses equipamentos de produção de ondas mecânicas apresentam distribuição espacial heterogênea das ondas geradas e têm tendência para o declínio na potência com o tempo. Além disso, a degradação do analito pode ocorrer sob baixas frequências e tempos de aplicação relativamente curtos através de gradientes de pressão e temperatura ou por geração de radicais livres [75,76].

Ao comparar os resultados obtidos com a microextração empregando 8-HQ, com os resultados da microextração empregando KSCN, pode ser observado que há um aumento no fator de pré-concentração dos sinais obtidos quando 8-HQ é utilizado.

TABELA 5.6 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2<sup>4</sup>

Variável	Nível (-)	Nível (+)
Solvente	1-undecanol	1-dodecanol
Volume de solvente (μL)	60	90
Tempo (min)	10	20
Temperatura (°C)	ambiente	45

TABELA 5.7 - Condições experimentais e resultados do planejamento fatorial 2<sup>4</sup>

Condição	Solvente	Volume (μL)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	RSD (%) n = 3	F.P*
1	1-undecanol	60	10	ambiente	26,4	6,1
2	1-dodecanol	60	10	ambiente	31,8	5,7
3	1-undecanol	90	10	ambiente	26,6	2,9
4	1-dodecanol	90	10	ambiente	52,9	5,1
5	1-undecanol	60	20	ambiente	34,1	9,2
6	1-dodecanol	60	20	ambiente	12,4	6,9
7	1-undecanol	90	20	ambiente	4,7	7,4
8	1-dodecanol	90	20	ambiente	25,7	5,7
9	1-undecanol	60	10	45	19,0	3,9
10	1-dodecanol	60	10	45	31,0	2,5
11	1-undecanol	90	10	45	50,2	5,5
12	1-dodecanol	90	10	45	69,2	5,4
13	1-undecanol	60	20	45	27,2	8,5
14	1-dodecanol	60	20	45	33,6	2,6
15	1-undecanol	90	20	45	88,1	1,8
16	1-dodecanol	90	20	45	14,7	4,8

\* F.P foi calculado pela relação das absorvâncias médias antes e após a microextração.

O maior caráter hidrofóbico do complexo Mo(VI)-8-HQ (Figura 4.2) quando comparado com o complexo  $[\text{MoO}(\text{NCS})_5]^{2-}$ , faz com que o primeiro complexo tenha

uma afinidade maior com os solventes orgânicos utilizados, 1-undecanol e 1-dodecanol. Geralmente, os complexos formados entre Mo(V) e o  $\text{SCN}^-$  são extraídos facilmente com solventes mais polares como o álcool isoamílico (1-pentanol).

### 5.2.3 - Microextração assistida por vórtex (complexante: 8-HQ)

O objetivo deste estudo foi desenvolver um procedimento de microextração em gota mais rápido no qual a dispersão da fase extratora na fase aquosa é promovida utilizando um agitador vórtex. Foram avaliadas as seguintes variáveis: tipo de solvente, volume de solvente e tempo de agitação através de um planejamento experimental  $2^3$  com um total de 8 experimentos (Tabela 5.8). A resposta estudada foi o fator de enriquecimento (F.E). Uma análise dos resultados obtidos (Tabela 5.9) evidencia que a interação entre as variáveis solvente e volume de solvente é significativa a um nível de confiança de 95%. Os valores de RSD desses experimentos foram mais baixos e foram obtidos melhores fatores de enriquecimento entre 6,3 e 16,1. Uma vez que o intervalo de tempo não teve um efeito significativo escolheu-se trabalhar somente com 2 min de agitação no vórtex para simplicidade e rapidez do procedimento desenvolvido.

A condição 1, 60  $\mu\text{L}$  de 1-undecanol com agitação no vórtex por 2 min, foi escolhida como a condição ótima do processo de microextração. A condição 4 também apresentou alto fator de enriquecimento, mas tem a dificuldade do solvente solidificar antes da extração sob a temperatura de trabalho no laboratório sendo uma desvantagem para fins práticos e determinações de rotina.

TABELA 5.8 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial  $2^3$

Variável	Nível (-)	Nível (+)
Solvente	1-undecanol	1-dodecanol
Volume de solvente ( $\mu\text{L}$ )	60	90
Tempo (min)	2	4

TABELA 5.9 - Condições experimentais e resultados do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>

Condição	Solvente	Volume (µL)	Tempo (min)	RSD (%), n=3	F.P*
1	1-undecanol	60	2	12,1	16,1
2	1-dodecanol	60	2	10,1	10,8
3	1-undecanol	90	2	12,3	7,2
4	1-dodecanol	90	2	14,6	15,2
5	1-undecanol	60	4	1,4	15,2
6	1-dodecanol	60	4	8,6	8,2
7	1-undecanol	90	4	8,0	6,3
8	1-dodecanol	90	4	14,1	15,0

\* F.P foi calculado pela relação das absorvâncias médias antes e após a microextração.

TABELA 5.10 - Condições ótimas de extração de Mo por VA-SFODME

VA-SFODME	
Complexante	8-hidroxiquinolina
[8-HQ]	0,5% m v <sup>-1</sup>
pH (tampão acetato)*	4,75
Intervalo de tempo para complexar Mo	10 min
Solvente orgânico	1-undecanol
Volume de solvente orgânico	60 µL
Agitação em vórtex	2 min
Centrifugação*	2 min, 2000 rpm
Banho de gelo*	10 min
Diluição com etanol*	500 µL

\* condições não otimizadas neste trabalho

Na Tabela 5.10 estão resumidas as condições ótimas de extração pelo procedimento de microextração em gota orgânica solidificada assistida por vórtex (VA-SFODME). Essas condições foram aplicadas no estudo do efeito da nebulização

discreta sobre as medidas analíticas por FAAS e serão utilizadas para a determinação de Mo nas amostras de milho e materiais certificados.

### 5.3 - Avaliação da nebulização discreta

Avaliou-se o efeito do volume introduzido de amostra por nebulização discreta no FAAS. Foram testados volumes entre 50 e 300  $\mu\text{L}$ . A solução testada continha  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  Mo. Na Figura 5.3 observa-se um aumento gradual na absorbância integrada para maiores volumes injetados, isso devido ao fato de aquisição de sinal ter sido feita em área de pico (Figura 5.4). Para esses volumes, os desvios padrão relativos variaram de 1,6 a 20% ( $n = 3$ ), os volumes de 150 e 200  $\mu\text{L}$  apresentaram a melhor repetibilidade entre as medidas (Figura 5.5). O volume de amostra escolhido para a microinjeção manual foi de 200  $\mu\text{L}$ , que apresentou um sinal mensurável com boa repetibilidade entre injeções e se mostrou adequado para a obtenção das curvas analíticas de calibração.

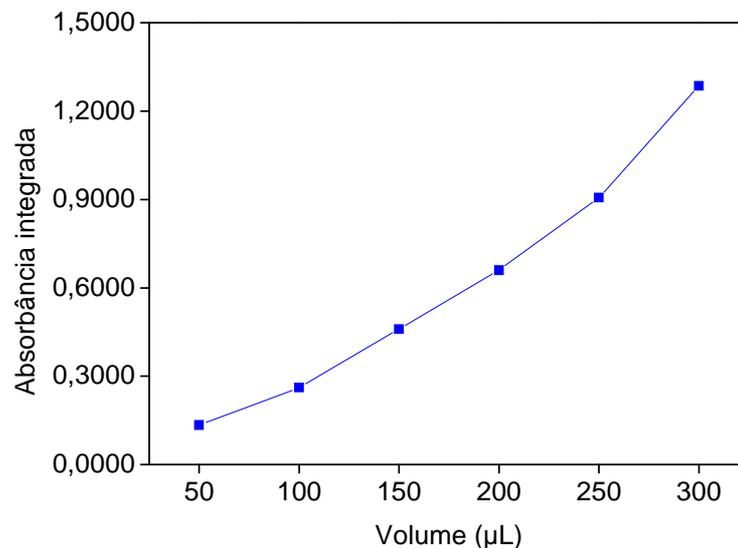


FIGURA 5.3 - Absorbância integrada em função do volume discreto injetado

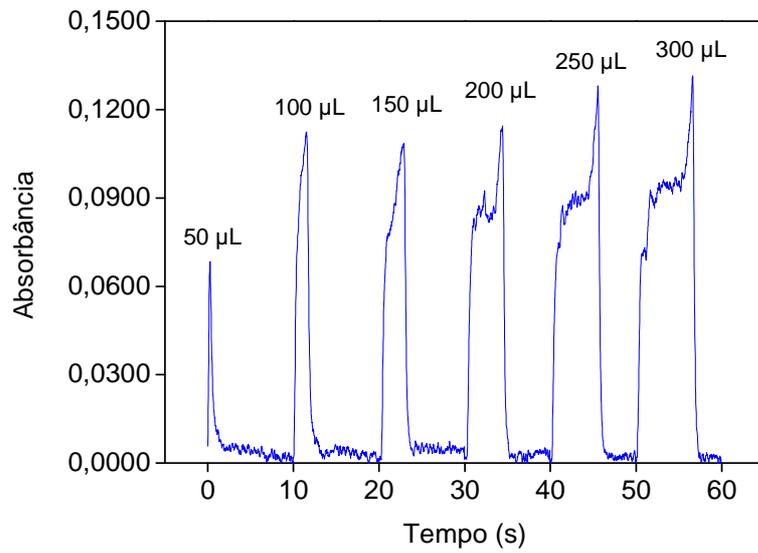


FIGURA 5.4 - Perfis dos sinais analíticos obtidos para Mo para diferentes volumes de injeção (tempo de leitura = 10s)

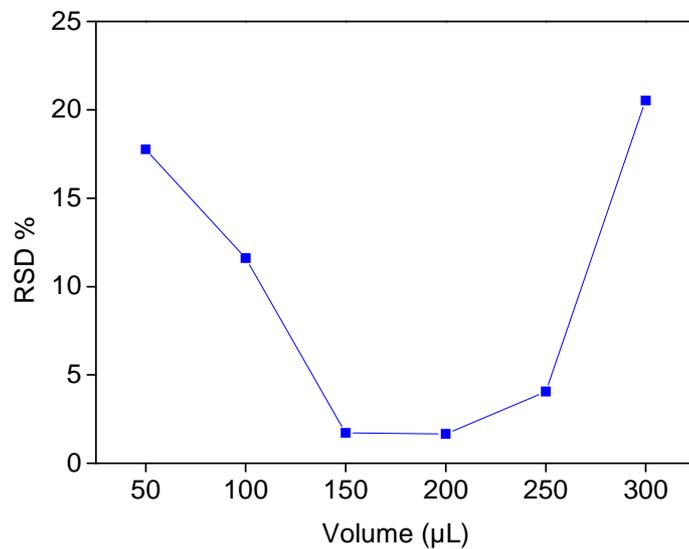


FIGURA 5.5 - Desvio padrão relativo em relação ao volume de injeção (n = 3)

Para estudar o aumento na sensibilidade após o método de microextração com gota na determinação de Mo por FAAS proporcionado pela nebulização discreta,

compararam-se os coeficientes angulares obtidos para as curvas analíticas de calibração para Mo com soluções em meio ácido (curva em meio aquoso) e meio orgânico (após a microextração com gota), introduzindo a solução no nebulizador de forma discreta e contínua (Figura 5.6).

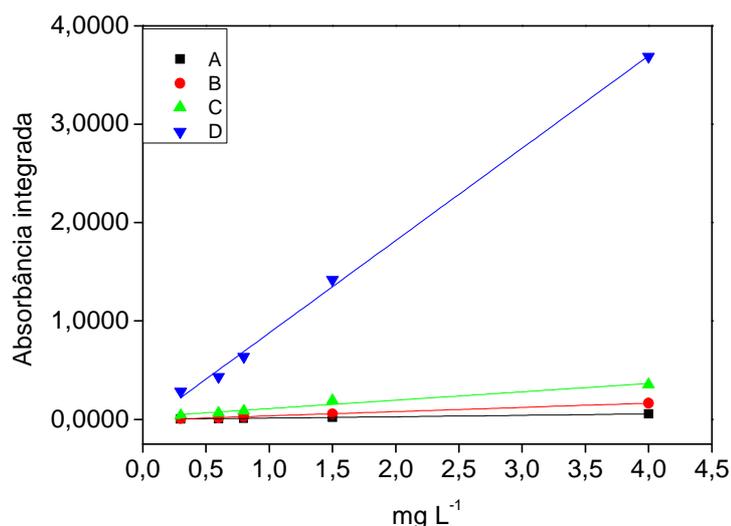


FIGURA 5.6 - Curvas analíticas de calibração: (A) em meio aquoso com nebulização contínua, (B) em meio aquoso com nebulização discreta, (C) em meio orgânico com nebulização contínua e (D) em meio orgânico com nebulização discreta

Na Tabela 5.11 estão apresentados os parâmetros de desempenho obtidos para as curvas analíticas de calibração com soluções em meio aquoso e em meio orgânico para soluções contendo de 0,3 a 4,0 mg L<sup>-1</sup>. Pode-se observar quando comparam os coeficientes angulares que há um aumento na sensibilidade quando a introdução da solução é feita de forma discreta, sendo que esse aumento é mais significativo quando se faz a determinação após a microextração do molibdênio.

O limite de detecção para a curva analítica obtida com soluções em meio aquoso com aspiração discreta é maior quando comparado com a aspiração contínua; contudo observa-se que a sensibilidade aumentou, mas o desvio do branco analítico é maior devido às injeções manuais. Para as curvas de calibração com soluções em meio orgânico observou-se que quando se combinou a VA-SFODME com a introdução

discreta de amostra, teve-se um ganho de sensibilidade de 11 vezes comparado com o obtido por nebulização contínua, o que leva à obtenção de baixos limites de detecção que viabilizariam a determinação de baixas concentrações de molibdênio. O fator de enriquecimento do procedimento desenvolvido combinando microextração e nebulização discreta foi de 67. Esse ganho de sensibilidade obtido da combinação do processo de microextração com a nebulização discreta por FAAS pode ser devido à melhora da eficiência de nebulização do extrato. Os extratos obtidos por microextração apresentam uma matriz complexa e viscosa dificultando sua introdução por nebulização pneumática mesmo quando diluídos com etanol. Quando são aspirados continuamente por FAAS, outra desvantagem é a diluição da amostra pelos gases combustíveis e oxidante que transportam o aerossol da amostra em direção ao atomizador.

TABELA 5.11 - Parâmetros das curvas analíticas obtidas a partir de soluções em meios aquoso e orgânico e medidas por FAAS usando nebulização contínua e discreta

Condição	Sensibilidade (L mg <sup>-1</sup> s)	R	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	F.E
Meio aquoso com NC	0,014	0,999	0,165	-
Meio aquoso com ND	0,043	0,998	0,236	-
Meio orgânico com NC	0,085	0,999	0,237	6
Meio orgânico com ND	0,939	0,998	0,005	67

\* Nebulização discreta (ND), Nebulização contínua (NC) e Fator de Enriquecimento (F.E) calculado pela relação dos coeficientes angulares das curvas analíticas de calibração em meio orgânico com ND e NC com a curva analítica de calibração em meio aquoso com NC.

#### 5.4 - Desempenho analítico do procedimento

O desempenho analítico do procedimento desenvolvido foi avaliado utilizando alguns parâmetros tais como limite de detecção (LOD), limite de quantificação

(LOQ), faixa linear, sensibilidade, RSD (%) e fator de enriquecimento (F.E). Os limites de detecção e quantificação foram calculados segundo a IUPAC:

$$LOD = \frac{3 \times std_{branco}}{m} \qquad LOQ = \frac{10 \times std_{branco}}{m}$$

onde  $m$  é o coeficiente angular da curva analítica de calibração e  $std_{branco}$  é o desvio padrão de 10 medidas do branco.

O F.E foi calculado pela relação dos coeficientes angulares da curva analítica de calibração em meio orgânico com nebulização discreta com a curva analítica de calibração em meio aquoso com nebulização contínua.

A precisão do procedimento, determinado como desvio padrão relativo (RSD), foi baseada em 10 replicatas independentes para concentrações de Mo de 0,05 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>. Esses valores de desvio obtidos são devidos principalmente ao fato das injeções de amostra utilizando nebulização discreta serem feitas de forma manual já que o controle de todas as etapas durante o processo de microextração é maior. Quando a concentração de Mo é maior, o desvio aumenta porque no extrato obtido das microextrações forma-se material particulado podendo eventualmente ocorrer espalhamento de radiação nas medidas analíticas por FAAS

A equação de calibração na faixa de concentração de 0,3 a 4 mg L<sup>-1</sup> do procedimento de pré-concentração foi  $A = 0,939 C - 0,060$  (onde  $A$  é a absorbância integrada e  $C$  é a concentração de Mo em mg L<sup>-1</sup> na fase orgânica) com um coeficiente de correlação linear de 0,998.

Na Tabela 5.12 estão apresentados os parâmetros analíticos do procedimento desenvolvido.

TABELA 5.12 - Parâmetros analíticos do procedimento desenvolvido

Parâmetros analíticos	
Faixa linear (mg L <sup>-1</sup> )	0,02 - 4,0
Sensibilidade (L mg <sup>-1</sup> s)	0,939
Coeficiente de correlação linear	0,998
LOD (µg L <sup>-1</sup> )	4,9
LOQ (µg L <sup>-1</sup> )	16,5
RSD % (n = 10; 0,05 mg L <sup>-1</sup> )	6
RSD % (n = 10; 1,0 mg L <sup>-1</sup> )	14,5
Volume de solvente orgânico (µL)	60
Volume de amostra (mL)	8
Fator de enriquecimento (F.E)	67

### 5.5 - Avaliação da exatidão e determinação de molibdênio em plantas

Na Tabela 5.13 se encontram os resultados da determinação de molibdênio nos digeridos obtidos com o equipamento UltraWave para os materiais certificados de farinha de arroz e repolho e nas amostras de raiz e folhas de milho.

Com base nos resultados obtidos para os materiais de referência certificados e comparando com os valores de referência,  $1,59 \pm 0,35 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $14,8 \pm 1,4 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente para farinha de arroz e repolho, foi realizado o teste *t*-student não pareado. Assim, os dois materiais de referência em estudo ficaram a um nível de 95% de confiança, não apresentando diferenças significativas entre os resultados obtidos e os teores certificados. As porcentagens de recuperação foram de 100% e 109% para repolho e farinha de arroz, respectivamente. Dessa forma, pode-se confirmar a exatidão do procedimento proposto para a determinação de Mo em plantas.

A concentração determinada para a amostra de raiz de milho foi de  $5,08 \text{ mg kg}^{-1}$  sendo maior que a concentração determinada na folha,  $1,17 \text{ mg kg}^{-1}$ .

TABELA 5.13 - Teores médios e desvios padrão (n = 6) dos digeridos obtidos por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (UltraWave)

Amostra	Teor determinado (mg kg <sup>-1</sup> )	Teor certificado (mg kg <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
Farinha de arroz (1568a)	1,59 ± 0,35	1,46 ± 0,08	109
Repolho (BCR-679)	14,8 ± 1,4	14,8 ± 0,5	100
Milho (Raíz) 1	5,08 ± 1,23		
Milho (Folha) 1	1,17 ± 0,66		

Na Tabela 5.14 estão apresentados os resultados da determinação de Mo nos digeridos obtidos com o equipamento Ethos. Devido a que a digestão foi feita com uma menor massa de amostra, 250 mg, a concentração final de Mo nos digeridos foi mais baixa e a posterior quantificação de Mo no material de referência de farinha de arroz e na amostra de folhas de milho não foi possível.

TABELA 5.14 - Teores médios e desvios padrão (n = 8) dos digeridos obtidos por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (Ethos)

Amostra	Teor determinado (mg kg <sup>-1</sup> )	Teor certificado (mg kg <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
Farinha de arroz (1568a)	< 0,68*	1,46 ± 0,08	-
Repolho (BCR-679)	15,2 ± 2,8	14,8 ± 0,5	102
Milho (Folha) 1	< 0,68*		
Milho (Raíz) 1	4,83 ± 1,09		
Milho (Raíz) 2	1,96 ± 0,44		
Milho (Raíz) 3	< 0,68*		
Milho (Raíz)	< 0,68*		

\* Valores abaixo do limite de detecção.

A porcentagem de recuperação de Mo no material certificado de repolho foi de 102% evidenciando novamente uma boa exatidão do procedimento após a realização do teste *t*-student não pareado a um nível de confiança de 95%. Para essa digestão, foi feita a determinação de Mo em quatro amostras de raízes de milho. Só nas amostras 1 e 2 foi possível a determinação desse elemento e nas amostras 3 e 4, a concentração no digerido ficou abaixo do limite de detecção.

## 5.6 - Procedimento desenvolvido frente ao procedimento oficial para a determinação de molibdênio em plantas

Comparando o procedimento desenvolvido neste trabalho com o procedimento oficial para a determinação de Mo em plantas (Figura 3.3), podem ser observadas várias vantagens da aplicação de um procedimento de microextração para a determinação de um micronutriente em plantas, tal como o molibdênio.

TABELA 5.15 - Procedimento oficial frente ao procedimento desenvolvido para a determinação de Mo em plantas

PROCEDIMENTO OFICIAL		PROCEDIMENTO DESENVOLVIDO	
<b>Colorimetria do tiocianato</b>		<b>VA-SFODME</b>	
Espectrofotometria UV-Vis		FAAS	
Reagente	Volume (mL)	Reagente	Volume (µL)
EXTRATO (incineração)	30	EXTRATO (micro-ondas)	3000
CCl <sub>4</sub>	3	1-undecanol	60
álcool isoamílico	3	Tampão acetato pH=4,75	1000
HCl 6,5 mol L <sup>-1</sup> com FeCl <sub>3</sub>	10	8-HQ (0,5 %m v <sup>-1</sup> )	2500
NaSCN (30 % m v <sup>-1</sup> )	1	NaOH (1,5 mol L <sup>-1</sup> )	ca. 1000
SnCl <sub>2</sub> (40 % m v <sup>-1</sup> )	1	Etanol	500

Algumas vantagens considerando-se os reagentes e resíduos gerados são: a necessidade de uma quantidade menor de amostra após digestão para fazer a análise, 3 mL frente a 30 mL, o uso de um menor volume de solvente de extração, 60  $\mu\text{L}$  de 1-undecanol frente a 6 mL da mistura  $\text{CCl}_4$  - álcool isoamílico, um ajuste do pH com 1 mL de tampão acetato frente a 10 mL da mistura  $\text{HCl}$   $6,5 \text{ mol L}^{-1}$  -  $\text{FeCl}_3$  e a geração de uma quantidade menor de resíduos tal como prescrito pela química verde.

# *CAPÍTULO 6*

---

## *Conclusões*

## 6 - CONCLUSÕES

Nesta dissertação de mestrado foi desenvolvido um procedimento simples para a determinação quantitativa de molibdênio em plantas combinando microextração em gota orgânica solidificada assistida por vórtex e espectrometria de absorção atômica em chama com injeção de volumes discretos de amostra.

A avaliação do procedimento de microextração mostrou o efeito significativo das variáveis, tipo de agente complexante e uso de ultrassom ou vórtex no processo de extração. O complexo orgânico 8-HQ teve mais afinidade pelos solventes de extração utilizados e teve uma maior eficiência de extração quando comparado com KSCN que não foi efetivo para a pré-concentração de Mo com os solventes utilizados.

O uso de agitação por vórtex no procedimento de microextração como ferramenta para a dispersão da fase orgânica na fase aquosa mostrou-se mais eficiente e rápido e atingiu fatores de enriquecimento maiores quando comparado com o uso de ultrassom.

A nebulização discreta como uma alternativa de introdução de amostra na chama mostrou-se eficiente e sensível para a determinação de molibdênio em plantas. As vantagens mais importantes da combinação da nebulização discreta com o procedimento de microextração são a obtenção de menores limites de detecção e a necessidade de menores quantidades de amostra para a determinação de Mo.

O limite de detecção atingido neste trabalho foi compatível com outros trabalhos reportados na literatura para a determinação de molibdênio em plantas mostrados na Tabela 3.3. A maioria desses trabalhos utilizaram métodos sensíveis para a determinação de molibdênio, tais como espectrofotometria e ICP-MS.

O procedimento desenvolvido é simples comparativamente ao procedimento oficial e é potencialmente aplicável para análises de rotina. As vantagens são as menores quantidades de reagentes utilizados e a menor geração de resíduos.

# *CAPÍTULO 7*

---

## *Referências Bibliográficas*

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KAISER, B.N.; GRIDLEY, K.L.; BRADY, J.N.; PHILLIPS, T. & TYERMAN, S.D. "The role of molybdenum in agricultural plant production". *Annals of Botany*, **96**: 745, 2005.
2. TUNÇELI, A. & TÜRKER, A.R. "Solid-phase extraction and spectrophotometric determination of molybdenum (VI) in soil and plant samples as a Mo(V)-thiocyanate complex", *Microchim. Acta*, **144**: 69, 2004.
3. ŞENDİL, O.; TÜRKER, A.R. & SOMER, G. "Systematic investigation of some metal cation interferences on the determination of molybdenum by flame atomic absorption spectrometry", *J. Anal. Chem.*, **63(8)**: 734, 2008.
4. DADFARNIA, S.; SALMANZADEH, A.M. & HAJI-SHABANI, A.M. "A novel separation/preconcentration system based on solidification of floating organic drop microextraction for determination of lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, **623**: 163, 2008.
5. IDE, Y.; KUSANO, M.; OIKAWA, A.; FUKUSHIMA, A.; TOMATSU, H.; SAITO, K.; HIRAI, M.Y. & FUJIWARA, T. "Effects of molybdenum deficiency and defects in molybdate transporter MOT1 on transcript accumulation and nitrogen/sulphur metabolism in *Arabidopsis thaliana*", *J. Exp. Bot.*, **1**, 2010.
6. MENDEL, R.R. "Molybdenum cofactor of higher plants: biosynthesis and molecular biology", *Planta*, **203**: 399, 1997.
7. COMITRE, A.L. & REIS, B.F. "Liquid-liquid extraction procedure exploiting multicommutation in flow system for the determination of molybdenum in plants", *Anal. Chim. Acta*, **479**: 185, 2003.
8. SHIJO, Y.; SUZUKI, M.; SHIMIZU, T.; ARATAKE, S. & UEHARA, N. "Determination of trace amounts of molybdenum in rainwater and snow by graphite-furnace atomic absorption spectrometry after solvent extraction and micro-volume back-extraction", *Anal. Sci.*, **953**: 12, 1996.
9. RAYNIE, D.E. "Modern extraction techniques", *Anal. Chem.*, **78**: 3997, 2006.
10. PEREIRA, M.G. & ARRUDA, M.A. "Trends in preconcentration procedures for metal determination using atomic spectrometry techniques", *Microchim. Acta*. **141**: 115, 2003.
11. SARAFRAZ-YAZDI, A. & AMIRI, A. "Liquid-phase microextraction", *Trends in Analytical Chemistry*, **29(1)**: 1, 2010.
12. KOKOSA, J.M.; PRZYJAZNY, A. & JEANNOT, M.A. *Solvent microextraction: theory and practice*. John Wiley & Sons, 2009. cap. 1.
13. PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I. & BENDICHO, C. "Liquid-phase microextraction approaches combined with atomic detection: A critical review", *Anal. Chim. Acta*, **669**: 1, 2010.

14. DADFARNIA, S. & SHABANI, A.M. "Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals - A review", *Anal. Chim. Acta*, **658**: 107, 2010.
15. PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I. & BENDICHO, C. "Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review", *Spectrochim. Acta, Part B*, **64**: 1, 2009.
16. PATEL, K.; MEHTA, P.; SAHOO, U.; SEN, A.K. & DHANYA, B. "A single drop micro extraction and future trends", *International Journal of ChemTech Research*, **2(3)**: 1638, 2010.
17. PSILLAKIS, E. & KALOGERAKIS, N. "Developments in single-drop microextraction", *Trends in Anal. Chem.*, **21(1)**: 53, 2002.
18. MINGYUAN, G.; YANGCHENG, L. & GUANGSHENG, L. "Directly suspended droplet microextraction in a rotating vial", *Anal. Chim. Acta*, **648**: 123, 2009.
19. YANGCHENG, L.; QUAN, L.; GUANGSHENG, L. & YOUYUAN, D. "Directly suspended droplet microextraction", *Anal. Chim. Acta*, **566**: 259, 2006.
20. HE, Y. & LEE, H.K. "Liquid-phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe", *Anal. Chem.*, **69**: 4634, 1997.
21. JAIN, A. & VERMA, K.K. "Recent advances in applications of single-drop microextraction: A review", *Anal. Chim. Acta*, **706**: 37, 2011.
22. ZANG, X.H.; WU, Q.H.; ZHANG, M.Y.; XI, G.H. & WANG, Z. "Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique", *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **37(2)**: 161, 2009.
23. LÓPEZ-DARIAS, J.; HERNÁNDEZ, M.G.; PINO, V. & AFONSO, A.M. "Dispersive liquid-liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters", *Talanta*, **80**: 1611, 2010.
24. REZAAE, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M.R.M.; AGHAE, E.; AHMADIA, F. & BERIJANI, S. "Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction", *J. Chromatogr., A*, **1116**: 1, 2006.
25. 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**: 423, 2011.
26. 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**: 267, 2010.
27. SARAFRAZ-YAZDI, A. & ES'HAGHI, Z. "Comparison of hollow fiber and single-drop liquid-phase microextraction techniques for HPLC determination of Aniline derivatives in water", *Chromatographia*, **63**: 563, 2006.

28. 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.
29. BIDABADI, M.S.; DADFARNIA, S. & SHABANI, A.M.H. "Solidified floating organic drop microextraction (SFODME) for simultaneous separation/preconcentration and determination of cobalt and nickel by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS)", *J. Hazard. Mater.*, **166**: 291, 2009.
30. DADFARNIA, S.; SHABANI, A.M.H. & KAMRANZADEH, E. "Separation/preconcentration and determination of cadmium ions by solidification of floating organic drop microextraction and FI-AAS", *Talanta*, **79**: 1061, 2009.
31. ŞAHİN, Ç.A. & TOKGÖZ, İ. "A novel solidified floating organic drop microextraction method for preconcentration and determination of copper ions by flow injection flame atomic absorption spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, **667**: 83, 2010.
32. RIVAS, R.E.; LÓPEZ-GARCÍA, I. & HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. "Microextraction based on solidification of a floating organic drop followed by electrothermal atomic absorption spectrometry for the determination of ultratracés of lead and cadmium in waters", *Anal. Methods*, **2**: 225, 2010.
33. 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**: 625, 2011.
34. MOGHADAM, M.R.; DADFARNIA, S. & SHABANI, A.M.H. "Speciation and determination of ultra trace amounts of chromium by solidified floating organic drop microextraction (SFODME) and graphite furnace atomic absorption spectrometry", *J. Hazard. Mater.*, **186**: 169, 2011.
35. LÓPEZ-GARCÍA, I.; RIVAS, R. E. & HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. "Liquid-phase microextraction with solidification of the organic floating drop for the preconcentration and determination of mercury traces by electrothermal atomic absorption spectrometry", *Anal. Bioanal. Chem.* **396**: 3097, 2010.
36. REZAEAA, M.; YAMINIA, Y.; KHANCHIB, A.; FARAJI, M. & SALEHA, A. "A simple and rapid new dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop combined with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry for preconcentration and determination of aluminium in water samples", *J. Hazard. Mater.*, **178**: 766, 2010.
37. YAMINIA, Y.; REZAEAA, M.; KHANCHIB, A.; FARAJI, M. & SALEHA, A. "Dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic drop followed by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry as a fast technique for the simultaneous determination of heavy metals", *J. Chromatogr., A*, **1217**: 2358, 2010.
38. 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**: 208, 2010.
39. CAPOTE, F.P. & LUQUE DE CASTRO, M.D. “Ultrasound in analytical chemistry”, *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**: 249, 2007.
  40. MA, J.J.; DU, X.; ZHANG, J.W.; LI, J.C. & WANG, L.Z. “Ultrasound-assisted emulsification-microextraction combined with flame atomic absorption spectrometry for determination of trace cadmium in water samples”, *Talanta*, **80**: 980, 2009.
  41. MOHAMMADI, S.Z.; AFZALI, D.; BAGHELANI, Y.M. & KARIMZADEH, L. “Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of trace amounts of Co and Mn ions to flame atomic absorption spectrometry”, *J. Braz. Chem. Soc.*, **22(1)**: 104, 2011.
  42. CHANG, Q.; ZHANG, J.; DU, X.; MA, J. & LI, J. “Ultrasound-assisted emulsification solidified floating organic drop microextraction for the determination of trace amounts of copper in water samples”, *Front. Environ. Sci. Engin.*, **4(2)**: 187, 2010.
  43. MA, J.; ZHANG, J.; DU, X.; LEI, X. & LI, J. “Solidified floating organic drop microextraction for determination of trace amounts of zinc in water samples by flame atomic absorption spectrometry”, *Microchim. Acta*, **168**: 153, 2010.
  44. MOHAMMADI, M. & MOSTAFAVI, A. “A novel solidified floating organic drop microextraction based on ultrasound-dispersion for separation and preconcentration of palladium in aqueous samples”, *Talanta*, **81**: 309, 2010.
  45. ZHANG, J.W.; WANG, Y.K.; DU, X.; LEI, X.; MA, J.J. & LI, J.C. “Ultrasound-assisted emulsification solidified floating organic drop microextraction for the determination of trace cadmium in water samples by flame atomic absorption spectrometry”, *J. Braz. Chem. Soc.*, **22(3)**: 446, 2011.
  46. WANG, Y.; LUO, X.; TANG, J. & HU, X. “Determination of Se(IV) using solidified floating organic drop microextraction coupled to ultrasound-assisted back-extraction and hydride generation atomic fluorescence spectrometry”, *Microchim. Acta*, **173**: 267, 2011.
  47. FATHIRADA, F.; AFZALI, D.; MOSTAFAVIA, A. & GHANBARIANA, M. “Ultrasound-assisted emulsification solidified floating organic drops microextraction of ultra trace amount of Te (IV) prior to graphite furnace atomic absorption spectrometry determination”, *Talanta*, **88**: 759, 2012.
  48. MOHADESI, A. & FALAHNEJAD, M. “Ultrasound-assisted emulsification microextraction based on solidification floating organic drop trace amounts of manganese prior to graphite furnace atomic absorption spectrometry determination”, *The Scientific World Journal*, **1**, 2012
  49. JIA, C.; ZHU, X.; WANG, J.; ZHAO, E.; HE, M.; CHEN, L. & YU, P. “Extraction of pesticides in water samples using vortex-assisted liquid-liquid microextraction”, *J. Chromatogr., A*, **1217**: 5868, 2010.

50. YIANTZI, E.; PSILLAKIS, E.; TYROVOLA, K. & KALOGERAKIS, N. "Vortex assisted liquid-liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A", *Talanta*, **80**: 2057, 2010.
51. PAPADOPOULOU, I.; ROMÁN, I.P.; CANALS, A.; TYROVOLA, K. & PSILLAKIS, E. "Fast screening of perfluorooctane sulfonate in water using vortex-assisted liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, **691**: 56, 2011.
52. GUISI, M.; RIBEIRO, A.S.; VIEIRA, M.A. & CURTIUS, A.J. "Avaliação de diferentes formas de introdução de amostra biológica tratada com hidróxido de tetrametilamônio em espectrometria de absorção atômica com chama", *Revista Analytica*, **28**: 58, 2007.
53. SARICA, D.Y.; AKIM, D. & OZDEN, T. "Determination of zinc in aerosol samples by discrete nebulization flame atomic absorption spectrometry", *Turk. J. Chem.*, **26**: 263, 2002.
54. KMETOV, V.; STEFANOVA, V.; HRISTOZOV, D.; GEORGIEVA, D. & CANALS, A. "Determination of calcium, iron and manganese in moss by automated discrete sampling flame atomic absorption spectrometry as an alternative to the ICP/MS analysis", *Talanta*, **59**: 123, 2003.
55. AMAIS, R.S.; GARCIA, E.E.; MONTEIRO, M.R. & NÓBREGA, J.A. "Determination of Ca, Mg, and Zn in biodiesel microemulsions by FAAS using discrete nebulization", *Fuel*, **93**: 167, 2012.
56. IVANOV, V.M.; KOCHELAEVA, G.A. & PROKHOROVA, G.V. "Methods for determining molybdenum", *J. Anal. Chem.*, **57(9)**: 758, 2002.
57. BARAKAT, S.A & MAHMOUD, T.Y. "Determination of molybdenum by flow-injection analysis", *Acta Chim. Slov.*, **50**: 799, 2003.
58. CANFRANC, E.; ABARCA, A.; SIERRA, I. & MARINA, M.L. "Determination of iron and molybdenum in a dietetic preparation by flame AAS after dry ashing", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **25**: 103, 2001.
59. OLIVEIRA, S.R.; GOMES NETO, J.A.; NÓBREGA, J.A. & JONES, B.T. "Determination of macro- and micronutrients in plant leaves by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry combining instrumental and sample preparation strategies", *Spectrochim. Acta, Part B*, **65**: 316, 2010.
60. MATSUSAKI, K.; NOMI, M.; HIGA, M. & SATA, T. "Determination of vanadium, chromium and molybdenum by atomic spectrometry using a graphite furnace coated with boron", *Anal. Sci.*, **15**: 145, 1999.
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**: 766, 2009.
62. LIANG, P.; LIU, Y. & GUO, Li. "Determination of molybdenum in steel samples by ICP-AES after separation and preconcentration using nanometre-sized titanium dioxide", *J. Anal. At. Spectrom.*, **19**: 1006, 2004.

63. AGRAWAL, Y.K. & SHARMA, K.R. "Speciation, liquid-liquid extraction, sequential separation, preconcentration, transport and ICP-AES determination of Cr(III), Mo(VI) and W(VI) with calix-crown hydroxamic acid in high purity grade materials and environmental samples", *Talanta*, **67**: 112, 2005.
64. BELLATO, A.C.S.; GERVASIO, A.P. & GINÉ, M.F. "Cloud-point extraction of molybdenum in plants and determination by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry", *J. Anal. At. Spectrom.*, **20**: 535, 2005.
65. ANDRADE, J.C.; ALMEIDA, A.M.; ALEIXO, L.M.; COSCIONE, A.R. & ABREU, M.F. "Direct voltammetric determination of Mo(VI) in plants: the need for a multivariate study of interferences", *Anal. Chim. Acta*, **487**: 243, 2003.
66. ANDRADE, J.C.; ALMEIDA, A.M. COSCIONE, A.R. & ALEIXO, L.M. "Determination of molybdenum in steel by adsorptive stripping voltammetry in a homogeneous ternary solvent system", *Analyst*, **126**: 892, 2001.
67. 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**: 769, 2011.
68. PYRZYNSKA, K. "Determination of molybdenum in environmental samples", *Anal. Chim. Acta*, **590**: 40, 2007.
69. DAS, A.K.; CHAKRABORTY, R.; CERVERA, M.L. & GUARDIA, M. "A review on molybdenum determination in solid geological samples", *Talanta*, **71**: 987, 2007.
70. MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C. & OLIVEIRA, S.A. de. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba, Brasil, 1989. 201 p.
71. CARVALHO, J.R. de. Otimização da metodologia de determinação de molibdênio em solos e plantas por voltametria de onda quadrada com redissolução catódica adsortiva. Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Agroquímica - Universidade Federal de Viçosa, 2008. Dissertação de mestrado, 9 p.
72. NOVOZAMSKY, I.; VAN DER LEE, H.J. & HOUBA, V.J.G. "Sample digestion procedures for trace element determination", *Mikrochim. Acta*, **119**: 183, 1995.
73. ARAÚJO, G.C.L.; GONZALEZ, M.H.; FERREIRA, A.G.; NOGUEIRA, A.R.A. & NÓBREGA, J.A. "Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials", *Spectrochim. Acta, Part B*, **57**: 2121, 2002.
74. GONZALEZ, M.H.; SOUZA, G.B.; OLIVEIRA, R.V.; FORATO, L.A.; NÓBREGA, J.A. & NOGUEIRA, A.R.A. "Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: identification of reaction products", *Talanta*, **79**: 396, 2009.
75. PSILLAKIS, E.; MANTZAVINOS, D. & KALOGERAKIS, N. "Monitoring the sonochemical degradation of phthalate esters in water using solid-phase microextraction", *Chemosphere*, **54**: 849, 2004.
76. SANCHEZ-PRADO, L.; BARRO, R.; GARCIA-JARES, C.; LLOMPART, M.; LORES, M.; PETRAKIS, C.; KALOGERAKIS, N.; MANTZAVINOS, D. &

PSILLAKIS, E. "Sonochemical degradation of triclosan in water and wastewater", *Ultrason. Sonochem.*, **15**: 689, 2008.