

JOSÉ RICARDO DE CARVALHO

**OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO DE MOLIBDÊNIO
EM SOLOS E PLANTAS POR VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA
COM REDISSOLUÇÃO CATÓDICA ADSORTIVA**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação
em Agroquímica, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

JOSÉ RICARDO DE CARVALHO

**OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO DE MOLIBDÊNIO
EM SOLOS E PLANTAS POR VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA
COM REDISSOLUÇÃO CATÓDICA ADSORTIVA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 de outubro de 2008.

Prof. César Reis
(Coorientador)

Prof. José Roberto da Silveira Maia
(Coorientador)

Prof. Reinaldo Francisco Teófilo

Prof^a. Gilmare Antônia da Silva

Prof. Efraim Lázaro Reis
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que sou e por tudo que conquistei...

A minha esposa Elenice e filhas Larissa e Raissa pelo amor, pelo companheirismo, pela compreensão, pela paciência e ajuda constante.

Ao meu orientador Dr. Efraim Lázaro Reis, pelos ensinamentos, discussões, sugestões, paciência e confiança no decorrer deste trabalho.

Ao Dr. César Reis e Dr. José Roberto da Silveira Maia, pela coorientação, amizade e ensinamentos, que muito contribuíram para o fechamento deste trabalho.

À banca examinadora, por ter aceitado o convite para avaliar este trabalho.

A todos os amigos do LINQ pela amizade, companheirismo e incentivo ao longo destes meses.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química pela oportunidade e apoio incondicional, sem os quais este trabalho não teria o mesmo êxito.

Àqueles que embora não foram citados nominalmente, mas que contribuíram se não com ações, mas com exemplos e incentivo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Introdução.....	1
1.2. Objetivos.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Molibdênio.....	3
2.2. Métodos analíticos para a determinação de molibdênio.....	7
2.3. O complexante 8-hidroxiquinolina (oxina).....	9
2.4. Introdução à voltametria.....	10
2.4.1. Voltametria de onda quadrada.....	12
2.4.2. Voltametria de redissolução.....	14
2.4.3. Voltametria de redissolução adsortiva.....	17
2.4.4. Voltametria de redissolução catódica adsortiva.....	20
2.5. Interferentes em análises voltamétricas por redissolução.....	21
2.6. Quimiometria.....	22
2.6.1. Planejamento experimental.....	23
2.6.2. Planejamento fatorial.....	24
2.6.3. Metodologia de superfície de resposta.....	25
2.6.4. Significância e confiabilidade nos experimentos.....	28
2.7. Validação dos métodos analíticos – técnicas e conceitos.....	29
2.7.1. Sensibilidade.....	29
2.7.2. Limite de detecção e quantificação.....	30
2.7.3. Seletividade.....	30
2.7.4. Precisão.....	30
2.7.4.1. Repetitividade.....	30
2.7.4.2. Precisão intermediária.....	31
2.7.4.3. Precisão instrumental.....	31
2.7.5. Exatidão.....	31
2.7.5.1. Linearidade de uma curva analítica.....	31
2.7.5.2. Ensaio de recuperação.....	32

2.8. Ambiente computacional.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. Limpeza do material.....	33
3.2. Aferição de material volumétrico.....	33
3.3. Reagentes.....	34
3.4. Preparo de soluções.....	34
3.4.1. Soluções para calibração multivariada.....	35
3.4.2. Outras soluções.....	35
3.5. Instrumentação.....	35
3.5.1. Instrumentação para análises voltamétricas.....	35
3.5.2. Espectrofotômetro de absorção atômica.....	38
3.6. Aquisição e tratamento de dados.....	38
3.7. Parâmetros eletroanalíticos.....	38
3.8. Estudo Inicial da composição do eletrólito.....	39
3.9. Planejamento experimental.....	40
3.10. Estudos iniciais para determinações voltamétricas de Mo(VI).....	41
3.11. Otimização da resposta voltamétrica.....	41
3.12. Preparo das amostras.....	42
3.12.1. Solos.....	42
3.12.2. Vegetais.....	43
3.13. Aplicação da técnica de recuperação.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1. Otimização da concentração de oxina e o eletrólito para a detecção de Mo(VI).....	45
4.1.1. Estudos dos parâmetros voltamétricos.....	45
4.1.2. Planejamento fatorial – escolha dos fatores.....	45
4.2. Otimização da resposta voltamétrica.....	53
4.2.1. Metodologia para a superfície de resposta.....	53
4.2.1.1. Superfície de resposta.....	56
4.3. Aplicabilidade da técnica otimizada.....	58
4.3.1. Linearidade.....	58
4.3.2. Repetitividade.....	59
4.3.3. Limite de detecção.....	60
4.3.4. Precisão intermediária.....	60
4.4. Estudo de interferentes para a análise de Mo(VI) em solos e plantas.....	60

4.5. Aplicabilidade da técnica otimizada.....	62
4.5.1. Análise de amostras.....	62
5. CONCLUSÕES.....	67
6. RECOMENDAÇÕES FUTURAS.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
8. APÊNDICE.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de uma zona hipotética de solo e de vários processos químicos que ocorrem numa solução de solo.....	5
Figura 2. Estrutura do 8-hidroxiquinolina (oxina).....	9
Figura 3. Estrutura do complexo com molibdênio (8-hidroxiquinolinato de molibdênio).....	9
Figura 4. (A) Sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial. (B) Voltamograma típico para a determinação quantitativa de uma espécie eletroativa empregando a técnica de pulso diferencial. E_p : potencial de pico; I_p : corrente de pico.....	11
Figura 5. Sequência de pulsos (1 – 4) aplicados em determinado período de tempo, a corrente amostrada usada é sempre $i_2 - i_1$ em voltametria de onda quadrada.....	13
Figura 6. Voltamogramas de onda quadrada com pulsos direto (corrente catódica), reverso (corrente anódica) e a corrente resultante, (1) representa um processo redox de um sistema reversível e (2) de um sistema irreversível.....	14
Figura 7. (A) Forma de aplicação do potencial durante a etapa de deposição e redissolução empregando DPASV para quantificação de dois metais. (B) Voltamograma obtido para a determinação simultânea de dois metais por DPASV.....	16
Figura 8. Representação esquemática do procedimento usado na voltametria adsortiva por redissolução mostrando as etapas para a acumulação e redissolução na determinação de um metal M^{n+} em presença de um ligante(L).....	18
Figura 9. Estratégia Inicial.....	23
Figura 10. (A) planejamento composto central para dois fatores ($k=2$ e $\alpha=\sqrt{2}$). (B) planejamento composto central para três fatores ($k=3$ e $\alpha=\sqrt{3}$).....	27
Figura 11. (A) Instrumento voltamétrico 797 VA Computrace (B) Montagem completa do sistema.....	36

Figura 12. Célula voltamétrica do analisador polarográfico 797 VA <i>Computrace</i> , destacando os três eletrodos e o agitador não magnético.....	36
Figura 13. Medidor de pH adaptado ao aparelho 797 VA <i>Computrace</i> ...	37
Figura 14. Representação gráfica dos efeitos de segunda ordem.....	52
Figura 15. (A) Gráficos de valores observados vs. valores estimados. (B) Gráfico dos resíduos.....	55
Figura 16. Superfície de resposta com a variável tempo de deposição fixa no nível (0), 80 segundos. $X_1 = AM$ (V), $X_2 = FR$ (Hz) em termos de variáveis codificadas. A legenda mostra os valores da corrente em nA, obtidos no ensaio.....	57
Figura 17. Superfície de resposta com a variável tempo de deposição fixa no nível (0), 80 segundos. Amplitude = AM (V), frequência = FR (Hz) em termos de variáveis codificadas. A legenda mostra os valores da corrente em nA, obtidos no ensaio.....	57
Figura 18. (A) Voltamograma referente ao estudo do comportamento da corrente para avaliação da faixa de trabalho. (B) Curva analítica do comportamento da resposta voltamétrica em função da variação da concentração do molibdênio por SWV, na faixa de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ a $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$	59
Figura 19. Efeito da adição de interferentes sobre a corrente de pico em $-0,54$ V. Mo(VI) $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$. SWCSV, ΔE : 125 mV; Edep: 0,50 V; Tdep: 80 s; Teq: 10 s e Ev: 20 mV s^{-1} . (Unk = desconhecido, interferentes).....	61
Figura 20. Análise por adição padrão da amostra referência (1) com detecção $1,28 \mu\text{g mL}^{-1}$	62
Figura 21. Análise por adição padrão da amostra referência (2) com detecção $1,20 \mu\text{g mL}^{-1}$	63
Figura 22. Análise por adição padrão da amostra referência (3) com de detecção $1,06 \mu\text{g mL}^{-1}$	63
Figura 23. Análise por adição padrão da amostra (1) folha de banana...	64
Figura 24. Análise por adição padrão da amostra (2) folha de café.....	64
Figura 25. Análise por adição padrão da amostra (3) folha de pimentão.....	64

Figura 26. Análise por adição padrão da amostra (5) solo.....	65
Figura 27. Análise por adição padrão da amostra (6) solo.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela com os cálculos matemáticos utilizados na Análise de Variância (ANOVA).....	29
Tabela 2. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial fracionário $2^{\frac{8-4}{IV}}$ de resolução IV.....	45
Tabela 3. Planejamento fatorial fracionário saturado $2^{\frac{8-4}{IV}}$, definida por I = 1248, I = 1358, I = 2368 e I = 1237....	46
Tabela 4. Efeitos e erros para os fatores estudados no planejamento fatorial fracionário saturado $2^{\frac{8-4}{IV}}$ e para a SWV.....	46
Tabela 5. Otimização dos parâmetros utilizados na composição do eletrólito de suporte.....	47
Tabela 6. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial completo.....	48
Tabela 7. Coeficientes de contrastes para um fatorial 2^3	48
Tabela 8. Efeitos e erros para os fatores estudados no planejamento fatorial completo 2^3 para a SWV	48
Tabela 9. Otimização dos parâmetros utilizados na composição do eletrólito de suporte.....	49
Tabela 10. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial completo 2^5	49
Tabela 11. Planejamento fatorial completo e respectivas respostas instrumentais para a SWV.....	50
Tabela 12. Efeitos e erros para os fatores estudados no planejamento fatorial para a SWV.....	51
Tabela 13. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento CCD para a SWV.....	54
Tabela 14. Resultado do Planejamento CCD com k=3.....	54
Tabela 15. Coeficientes e erro puro para o modelo da superfície de resposta.....	55
Tabela 16. ANOVA do planejamento CCD.....	55

Tabela 17. Parâmetros otimizados para a análise do molibdênio por voltametria de redissolução adsortiva com onda quadrada.....	58
Tabela 18. Resultados relativos às determinações efetuadas por ICP-AES e pelo método voltamétrico para o molibdênio.....	66

RESUMO

CARVALHO, José Ricardo de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2008. **Otimização da metodologia de determinação de molibdênio em solos e plantas por voltametria de onda quadrada com redissolução catódica adsortiva.** Orientador: Efraim Lázaro Reis. Coorientadores: César Reis e José Roberto da Silveira Maia.

O molibdênio é um elemento traço essencial à vida e pode ser encontrado praticamente em toda biosfera. Presente no cofator da enzima nitrase é responsável pela redução da molécula de N_2 e sua fixação na crosta terrestre. Em outras enzimas atua nas reações de transferências de átomos de oxigênio entre os mais diversos substratos. Participa da composição de ligas metálicas e lubrificantes, é considerado essencial para a nutrição de animais e plantas, entretanto, os níveis de concentração encontrado nestas matrizes são muito baixos, o que torna difícil seu monitoramento e detecção. Neste caso, isso é possível, quando se faz uso de métodos analíticos sensíveis, associados à procedimentos que envolvem um grande número de etapas onde, a sensibilidade da técnica empregada justifica o uso de reagentes com grau de pureza analítico e, a necessidade de procedimentos contra possíveis contaminações durante as determinações. O presente trabalho descreve o desenvolvimento de um método para a determinação direta de Mo em solos e plantas utilizando a técnica de voltametria adsortiva catódica com onda quadrada. Foi utilizada a otimização multivariada dos parâmetros envolvidos na composição do eletrólito de suporte, sendo que a junção de KNO_3 e solução tampão de ácido e acetato de sódio forneceu parâmetros significativos através de gráficos de Paretos que foram otimizadas num planejamento fatorial fracionário saturado $2^{\frac{8-4}{IV}}$. Após a otimização dos parâmetros eletroanalíticos realizou-se um planejamento fatorial completo 2^3 , sendo obtidos como ótimos a quantidade e concentração do eletrólito de suporte KNO_3 , a solução tampão ácido acético/acetato de sódio e o complexante oxina. A corrente de pico de redução do Mo(VI) foi otimizado por planejamento experimentais. As variáveis envolvidas na otimização da voltametria com onda quadrada foram

o incremento de voltagem, a amplitude, a frequência, o tempo de deposição e o tamanho da gota de mercúrio. Um estudo dos níveis de fatores foi realizado anteriormente à etapa de triagem, então foi empregado neste último um planejamento fatorial 2^5 completo para a voltametria de onda quadrada. Das respostas obtidas foram selecionados os três fatores mais significativos, as variações selecionadas foram estudadas com o planejamento composto central (Central Composite Design – CCD) para o estudo da superfície de resposta. Os resultados obtidos nas condições otimizadas, apresentaram uma resposta linear no intervalo entre 1,0 a 6,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e limites de detecção e de quantificação, respectivamente iguais a 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$ (20 ppt) e 0,08 $\mu\text{g L}^{-1}$ (80 ppt). Valores de recuperação entre 96% e 102% foram encontrados para amostras de solos e plantas enriquecidas com molibdênio (VI). As condições ideais encontradas para se chegar a melhor resposta voltamétrica foram para a SWV foram 1,0 mVs^{-1} , 110 mV e 100 Hz para os fatores: incremento de voltagem, amplitude e frequência. A voltametria de redissolução catódica de Mo(VI) no complexante 8-hidroquinoleína (oxina) em solução tampão ácido acético/acetato de sódio em pH 4,65 e KNO_3 2,0 mol L^{-1} como eletrólito suporte possibilitou a determinação de molibdênio em solos e plantas sem qualquer tratamento prévio das amostras. A otimização de parâmetros voltamétricos para a determinação de metais traços em solos e plantas, através de técnicas de redissolução, foi planejada neste trabalho, considerando fatores como custo de equipamentos, sensibilidade, seletividade e baixos limites de detecção.

ABSTRACT

CARVALHO, Jose Ricardo de. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, October of 2008. **Optimization of the molybdenum determination in soils and plant methodology by cathodic adsorptive stripping square-wave voltammetry.** Adviser: Efraim Lazaro Reis. Co-advisers: Cesar Reis and José Roberto da Silveira Maia.

Molybdenum is an element essential to life that can be found practically in the whole biosphere. It is present in the nitrase enzyme cofactor and is responsible for the reduction of the N_2 molecule and its fixation in the terrestrial crust. In other enzymes, molybdenum acts in reactions of transference of atoms of oxygen to a lot of sub-stratums. Molybdenum also participates in the composition of metallic alloys and lubricating, and it is considered essential to the nutrition of animals and plants. However, the concentration levels found in these matrices are very low, what makes difficult for monitoring and detection and is possible when sensitive analytical methods associated to procedures that involve a great number of stages are used. The sensibility of the employed technique justifies the use of reagents with analytical grade and procedures against possible contaminations during the determinations. This present work describes the development of a method used for the direct determination of Mo in soils and plant using the cathodic adsorptive stripping square-wave voltammetry technique. The multivariate optimization of the parameters involved in the support electrolyte composition was used, and the use of KNO_3 and acetic acid/sodium acetate buffer solution provided significant parameters through the Pareto graphics that were optimized in a factorial planning $2^{\frac{8-4}{IV}}$. After the optimization of the eletroanalytical parameters, a complete factorial planning 2^3 was used, where the support electrolyte KNO_3 , the acetic acid/sodium acetate buffer solution and the complexant oxine concentrations with best results were obtained. The Mo(VI) reduction stream peak was optimized by experimentals planning. The parameters involved in the optimization of the square-wave voltammetry were: increment of voltage, amplitude, frequency and the deposition time and mercury drop size. A study of the factor levels was

accomplished previously to the selection phase, and then a complete factorial planning 2^5 was used for the square-wave voltammetry. Three most significant factors were selected and the selected variations were studied with the central composite design (CCD) to obtain the response surface. The results obtained in the optimized conditions showed a linear response in the range of 1.0 to 6.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, the detection and quantification limit were 0.02 $\mu\text{g L}^{-1}$ (20 ppt) and 0.08 $\mu\text{g L}^{-1}$ (80 ppt), respectively. Recovery values within 96% and 102% were obtained to Mo enriched samples of soil and plant. The optimum conditions found to achieve the best voltammetric answer were 1.0 mVs^{-1} , 110 mV and 100 Hz, to increment of voltage, amplitude and frequency, respectively. The Mo(VI) cathodic stripping voltammetry of in the complexant 8-hydroquinoline (oxine) in acetic acid/sodium acetate buffer solution with pH 4.65 and KNO_3 2.2 mol L^{-1} as support electrolyte made possible the molybdenum determination in soils and plants without any previous treatment of the samples. The optimization of voltammetric parameters for the determination of trace metals in soils and plants by stripping techniques was planned in this present work and factors as equipments cost, sensibility, selectivity and low detection limits were considered.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Introdução

O nome do elemento químico molibdênio (Mo) vem do grego molybdos “como o chumbo”, o qual não é encontrado na natureza na forma livre e está sempre ligado a outros elementos, principalmente, na forma de molibdenita (MoS_2), powellita $\text{Ca}(\text{MoW}_4)\text{O}_4$, molibdita ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{MoO}_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) e a wulfenita (PbMoO_4). Essencial na nutrição de diferentes formas de organismos vivos, principalmente, vegetais nos quais é encontrado na faixa de $0,1$ a $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de matéria seca (AGRI-FAX, 1998).

O molibdênio contribui no transporte de elétrons, nos processos bioquímicos e é indispensável no metabolismo das plantas, pois favorece a fixação do nitrogênio atmosférico. A falta deste elemento no solo em que a concentração adequada deve estar entre $0,01$ a $0,70 \text{ mg kg}^{-1}$, acarreta menor síntese da enzima nitrogenase nas plantas, reduzindo a fixação biológica do nitrogênio, conseqüentemente, tornando o solo menos produtivo (ALMEIDA, 2003).

O estabelecimento de metodologias apropriadas de alta sensibilidade e seletividade para quantificação deste elemento a níveis traço são necessárias, tendo em vista que os níveis de concentração do mesmo nas várias matrizes ambientais são muito baixos.

A espectroscopia de absorção atômica (Atomic Absorption Spectroscopy – AAS) tem sido um dos métodos analíticos mais indicados na literatura para a determinação de molibdênio em amostras de solo (YAGODIN, 1982; TISDALE et al., 1985; HOENIG et al., 1986; SASHALSCHA et al., 1987). Esta técnica é recomendada pela elevada sensibilidade, baixo limite de detecção e alta qualidade analítica (BAUCELLS et al., 1985), porém, uma das desvantagens de maior relevância é que em forno de grafite tem-se necessidade de uma elevada temperatura de atomização que pode gerar maior desgaste e consumo de tubos de grafite. Devido a estas questões torna-se importante o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas e métodos que permitam a determinação de molibdênio em variados tipos de matrizes.

A química eletroanalítica compreende um conjunto de métodos analíticos quantitativos baseados nas propriedades elétricas de uma solução do analito quando ele faz parte de uma célula eletroquímica. Envolve medidas de parâmetros elétricos tais como: corrente, potencial e carga, têm ampla faixa de aplicação em áreas de conhecimento tão distintas como na medicina, bioquímica, biologia molecular, química ambiental e físico-química. (SKOOG et al., 1992).

As técnicas eletroanalíticas são capazes de fornecer limites de detecção excepcionalmente baixos e uma abundância de informações que caracterizam e descrevem eletroquimicamente determinados sistemas. Uma de suas mais importantes características relaciona-se com o fato destas técnicas possibilitarem o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do analito e alguma propriedade elétrica como: corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga (SOUZA et al., 2003).

A técnica escolhida para o desenvolvimento desse trabalho foi à voltametria de onda quadrada.

1.2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi a otimização de uma metodologia eletroanalítica, para a determinação direta do molibdênio em solos e plantas, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada com redissolução catódica adsortiva e planejamentos experimentais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Molibdênio

Em 1778 o químico sueco Carl Wilhelm Scheele estudava as propriedades de um mineral conhecido como molibdenita (do grego *molybdos* – “como o chumbo”). Fazendo reagir este mineral com ácido nítrico observou o aparecimento de uma nova substância, um composto branco e insolúvel em água que se dissolvia em soluções alcalinas e poderia ser re-precipitado destas soluções mediante a adição de ácido nítrico. Ele denominou esta nova substância de ácido molíbdico, reconhecendo-o como um derivado de um elemento até então desconhecido, o qual denominou de *Molybdenum*. Quatro anos depois, em 1782, Peter Jacob Hjelm isolou pela primeira vez o elemento na sua forma metálica através da redução do ácido molíbdico com grafite. Após esta descoberta o elemento foi pouco estudado, talvez pela sua inércia (VRUBEL, 2007).

O molibdênio é um elemento traço encontrado na crosta terrestre com estimada abundância na escala de 0,05 a 40,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ com valor médio de 1,5 $\mu\text{g g}^{-1}$. O teor de molibdênio na litosfera situa-se em torno de 2,0 mg g^{-1} , enquanto que nos solos, o molibdênio total encontra-se na faixa de 0,11 a 5,0 $\mu\text{g g}^{-1}$. O molibdênio tem sete ocorrências naturais de isótopos, Mo^{92} , Mo^{94} , Mo^{95} , Mo^{96} , Mo^{97} , Mo^{98} e Mo^{100} com relativa abundância (9,2 a 24,2 %) (ARABINDA et al., 2007).

Um enorme interesse em se obter uma forma de monitoramento deste elemento se dá pela grande necessidade das plantas em retirar o molibdênio do solo garantindo à agricultura o desenvolvimento satisfatório das lavouras. Há um aumento na demanda por alimentos no mundo e uma crescente competição pelo uso das terras agricultáveis; por isso o aumento da produtividade das culturas e a melhoria da eficiência de produção com a preservação dos recursos naturais são aspectos importantes na agricultura moderna. A quantidade de molibdênio requerida pelas plantas é pequena e sua aplicação via semente no plantio constitui-se uma das formas mais práticas e eficazes de adubação (MARCONDES et al., 2005). Para aumentar

a concentração de molibdênio nas próprias sementes é necessário que as plantas cresçam em solos com alta disponibilidade do elemento.

No Brasil há o predomínio de solos ricos em óxidos de ferro e de alumínio, mas com pouca disponibilidade de molibdênio. A adição direta do adubo contendo Mo ao solo é muitas vezes ineficaz devido a sua adsorção à matéria orgânica e aos óxidos de ferro e de alumínio, tornando-se assim indisponível às plantas. Isto faz com que a produção de sementes quase sempre seja com baixo teor de molibdênio. Os nutrientes boro e molibdênio adicionados à solução de cobertura da semente contribuem para desenvolvimento das plantas (BATISTA et al., 2005). A aplicação de molibdênio e cobalto nas sementes tem sido uma prática comum para o cultivo de soja no Brasil (PRESTES et al., 2005), pois sendo associado ao nitrogênio, às bactérias diazotróficas, e à bactéria *Herbaspirillum seropedicae* em diferentes cultivares de arroz proporcionam aumento de 33 a 37% na produção de grãos, dependendo da cultivar utilizada bem como maior acúmulo de nitrogênio nos grãos (GUIMARÃES et al., 2007).

Na realização do processo de fixação biológica de nitrogênio o molibdênio é um micronutriente essencial (ENSAFI et al., 2005) cujas funções nas plantas estão relacionadas com o sistema de transferência de elétrons para a redução do nitrato e na fixação biológica de nitrogênio. Está também relacionado ao transporte de elétrons em diversas reações bioquímicas e na fixação de nitrogênio pelas plantas no processo das enzimas nitrogenase, redutase de nitrato e oxidase de sulfato (ALMEIDA, 2003).

A concentração de minerais como o molibdênio nas plantas, depende de quatro fatores básicos inter-relacionados: genéticos (gênero, espécie e variedade de planta), tipo de solo, clima e, por fim, estágio de maturidade das forrageiras e sua inter-relação com o clima (PRADA et al., 1998).

A água do solo contém pequenas e variáveis quantidades de sais minerais, oxigênio e gás carbônico, formando uma solução diluída, sendo que o tipo e as quantidade dos elementos que se encontram dissolvidos nesta chamada 'solução do solo', dependem diretamente dos elementos que estão adsorvidos nos colóides, os quais funcionam como reservatório. Entre estes e a solução do solo existe um equilíbrio que é mantido graças à capacidade de troca de cátions (LEPSCH, 1977).

Os colóides têm origem orgânica e inorgânica e “são superfícies carregadas eletricamente, tais como as argilas” (REICHARDT, 1985).

Os elementos minerais e orgânicos constituintes da fração coloidal do solo possuem cargas de superfície, as quais são neutralizadas por íons. Dependendo do pH do solo e do tipo de material as cargas das partículas podem ser negativas ou positivas. Na neutralização de cargas eletrostáticas os íons são trocados por outros da solução, em processos físico-químicos que dependem da concentração relativa dos íons, carga elétrica, raio iônico hidratado, etc. (TEDESCO, 1995).

O molibdênio pode ser encontrado dissolvido na solução do solo (Figura 1), adsorvido na fração coloidal, retido na rede cristalina de minerais, ou ainda complexado com a matéria orgânica.

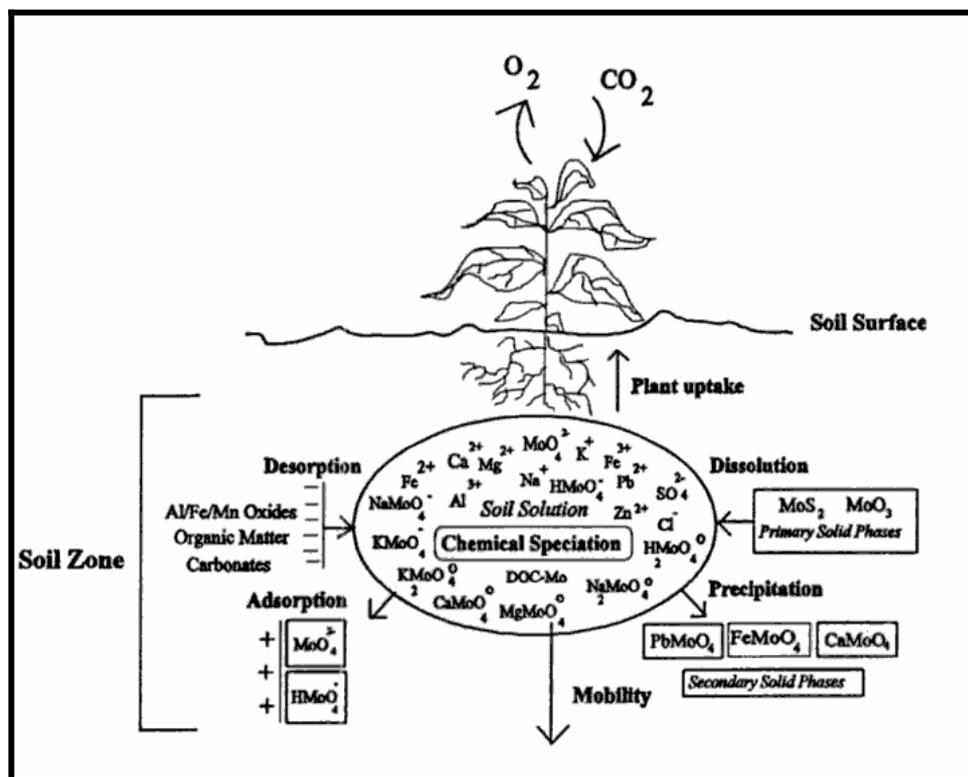
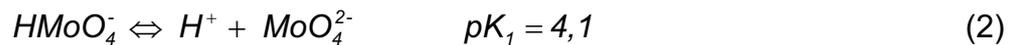


Figura 1. Representação esquemática de uma zona hipotética de solo e de vários processos químicos que ocorrem numa solução de solo. (GUPTA, 1997).

O molibdênio existente na solução do solo encontra-se predominantemente como molibdato (MoO_4^{2-}). Considerando um valor médio de pH para a solução do solo de 5,5 e as sucessivas ionizações do ácido molibídico (H_2MoO_4), temos as equações 1, 2 e 3.



$$Kr = \frac{[MoO_4^{2-}] \times [H^+]}{[HMoO_4^-]} \Rightarrow \frac{[MoO_4^{2-}]}{[HMoO_4^-]} = \frac{10^{-4,1}}{10^{-5,5}} \approx 25 \quad (3)$$

Portanto, a concentração da forma desprotonada é de aproximadamente 25 vezes a da forma protonada.

O comportamento do molibdato assemelha-se mais ao dos fosfatos e sulfatos (macronutrientes), do que aos micronutrientes. Normalmente as concentrações de molibdênio no tecido das plantas decrescem à medida que aumentam as concentrações de sulfato no solo, pois ocorre uma competição direta entre os íons sulfato e molibdato por sítios de absorção da raiz devido aos seus tamanhos semelhantes (ANDRADE, 2005).

O tipo de material originário do solo também pode afetar a concentração de molibdênio na solução do solo. O molibdênio ocorre normalmente em feldspatos e minerais ferro-magnesianos como a biotita e a olivina. As rochas sedimentares por serem formadas após a intemperização e transporte do material originário retêm uma pequena fração de molibdênio originalmente existente na rocha matriz. O molibdênio é facilmente liberado dos minerais primários pela intemperização e comparado com outros macronutrientes, é relativamente móvel como molibdato solúvel, entretanto, esses molibdatos são adsorvidos nas superfícies de minerais primários e da fração coloidal fazendo com que a disponibilidade do molibdênio no solo seja dependente do pH (ANDRADE, 2005). O molibdênio é também usado em diversos processos industriais sendo empregado na produção de aços e ligas especiais à base de níquel com elevada resistência a altas temperaturas e à corrosão (JIANGUO et al., 1999). Aços de elevada resistência em quase sua totalidade têm molibdênio em proporções de 0,25 a 8,00%. A produção mundial de molibdênio gira em torno de 100000 toneladas por ano (ARABINDA et al., 2007), em média a indústria do aço consome 75% da produção (VRUBEL, 2007).

Diversos compostos de molibdênio são também utilizados como agentes catalisadores no refino do petróleo (para remover compostos orgânicos de enxofre) e na produção de gasolina de elevada octanagem (SERAFIM et al., 2008). Assim como, são utilizados em camadas condutivas

de alguns tipos de transistores, eletrodos para fornos de aquecimento elétrico, em filamentos para componentes elétricos e eletrônicos, em reatores nucleares, em partes de aviões e mísseis. O molibdênio é ainda muito utilizado na indústria de corantes e pigmentos inorgânicos (ANDRADE, 2005).

Complexos contendo molibdênio são também ministrados no tratamento de algumas doenças como a do mal de Wilson, que se caracteriza pelo aumento de cobre no organismo devido a ausência da enzima ATPase que atua na eliminação de cobre (ALMEIDA et al., 2006).

O molibdênio é um componente da sulfito-oxidase, uma enzima do fígado humano e de outros órgãos de animais e pássaros. A enzima catalisa a oxidação do íon sulfito (SO_3^{2-}), que é tóxico, para o íon sulfato (SO_4^{2-}) que não é tóxico, logo é um agente desintoxicante importante. A deficiência da sulfito-oxidase pode causar no ser humano perturbações neurológicas, retardamento mental e morte (GÁMEZ et al., 2005).

Nos últimos 20 anos, várias técnicas de voltametria de redissolução catódica adsortiva têm sido desenvolvidas para determinação de molibdênio (ADELOJU et al., 1995) (SAFAVI, et al.1999; SUN et al., 2000; ENSAFI et al., 2002; ENSAFI et al., 2004; ENSAFI et al., 2005; SANTOS et al., 2008). Todos estes métodos são baseados na acumulação adsortiva de molibdênio no complexo.

2.2. Métodos analíticos para a determinação de molibdênio

Embora exista um número considerável de métodos que possibilitam a determinação de molibdênio nos mais diferentes tipos de matrizes, o desenvolvimento de métodos para quantificar metais traços é relevante e desafiador, pois em procedimentos comuns para determinar baixas concentrações de metais, a etapa de pré-concentração é necessária, além disso, a maioria dos métodos mais sensíveis recentemente avaliados como espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma induzido (Ion Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy – ICP-AES), espectrometria de massas com fonte de plasma induzido (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry – ICP-MS) e espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (Graphite Furnace Atomic Absorption

Spectrometry – GFAAS), têm custos elevados para serem utilizados em análises rotineiras. (ALMEIDA et al., 2006) (PYZYNSKA, 2007).

Outros métodos de determinação de molibdênio são os que utilizam a propriedade catalítica do metal para uma dada reação em que a reação entre iodeto e peróxido de hidrogênio é catalisada por molibdênio e pode-se proceder por determinação espectrofotométrica (IVANOV et al., 2002) (ALMEIDA et al., 2006). Tais métodos catalíticos rendem alta sensibilidade, contudo necessitam de uma separação prévia do metal por não serem seletivos, além disso, o tempo de medida deve ser muito bem controlado, daí o interesse no uso de métodos por injeção em fluxo para a execução da metodologia.

Valores de concentração em diferentes tipos de matrizes são da ordem de ppm ou ppb (IVANOV et al., 2002), a maioria destes métodos requer etapas de separação e pré-concentração por diversos meios. Alguns casos fazem uso de reagentes complexantes específicos e grande parte dos métodos espectroanalíticos utiliza mascarantes para evitar a ação de íons interferentes (STADLOBER et al., 1997) (ALMEIDA et al., 2006). Essas etapas tornam os métodos espectrofotométricos muito trabalhosos.

Dentre os métodos eletroquímicos destacam-se os voltamétricos que englobam um conjunto de métodos, nos quais a informação sobre as características do analito é obtida através da medida de intensidade da corrente em função do potencial aplicado. Dentre os métodos voltamétricos, destacam-se as técnicas voltamétricas de redissolução ("*Stripping*"), que podem ser efetuadas de três formas: anódica, catódica e adsortiva, sendo que a adsortiva é a que mais se adapta às determinações para elementos que se apresentam em baixos teores, em diferentes matrizes, como é o caso do molibdênio (ALMEIDA et al., 2006).

A análise de amostras com matrizes complexas ou com material orgânico como plantas e solos, exige pré-tratamento para destruir a matriz, pois há componentes que podem interferir na análise. Já a análise de amostras aquosas é mais simples pela ausência de interferentes e pode ser realizada em dois passos (oxidação/destruição da matriz e quantificação).

As separações são importantes sempre que existirem interferentes, que podem interferir na etapa de quantificação como o que ocorre quando o

cobalto interfere na determinação voltamétrica de molibdênio quando não há adição de complexantes.

2.3. O complexante 8-hidroxiquinolina (oxina)

O complexante 8-hidroxiquinolina (oxina) (Figura 2) tem sido extensivamente estudado e largamente utilizado em química analítica como complexante de íons metálicos em solução. A oxina forma complexos com vários íons metálicos em solução, pois possui dois pontos de coordenação. Isto confere aos complexos metálicos formados grande inércia e estabilidade devido ao forte efeito quelante. É um reagente seletivo para o molibdênio, sendo utilizado por vários pesquisadores na extração de molibdênio em águas (SUN et al., 2000) solos (GIROUSI et al., 2001) plantas (NAVRÁTILOVÁ et al., 1991) e alimentos (GAO et al., 1996).

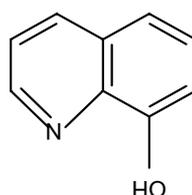


Figura 2. Estrutura do 8-hidroxiquinolina (oxina).

A oxina é o complexante mais comumente utilizado para a determinação voltamétrica de molibdênio, pois apresenta uma faixa linear mais ampla nas curvas analíticas (STADLOBER et al., 1997; GAO et al., 1996; SUN et al., 2000). A figura 3 apresenta a estrutura 8-hidroxiquinolina e a estrutura do complexo formado com molibdênio (VI).

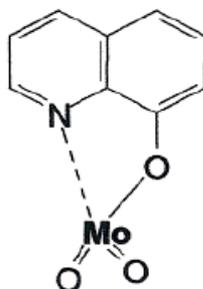


Figura 3. Estrutura do complexo com molibdênio (8-hidroxiquinolinato de molibdênio).

O complexo molibdato-oxina apresenta um sinal característico utilizado em determinações de íons metálicos em quantidades traço na adsorção de

redissolução catódica (SUN et al., 2000), por este motivo, escolheu-se a oxina para ser o agente complexante utilizado no decorrer deste trabalho.

A etapa de quantificação de molibdênio pode ser efetuada com utilização de diversas técnicas analíticas, tais como: a eletroquímica, espectroscopia, fluorescência de raios-X, por serem sensíveis e de alta precisão atingindo um nível de detecção de mg Mo/kg amostra. As técnicas de espectrometria de absorção atômica e voltametria são as mais utilizadas (ARABINDA et al., 2007).

2.4. Introdução à voltametria

A voltametria é um método analítico fundamentado em medidas de corrente e potencial em células eletroquímicas. Permite a obtenção de informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química. Para a obtenção das medidas de corrente utiliza-se um sistema potenciostático de três eletrodos, um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um auxiliar, estes são posicionados na célula voltamétrica e imersos em um eletrólito de suporte contendo o analito. O potencial aplicado e a corrente resultante são registrados, concomitantemente, obtendo-se uma curva corrente versus potencial, chamada de voltamograma. O sinal analítico é a corrente faradaica que flui pela célula durante a reação do analito em um eletrodo de trabalho com uma pequena superfície (SOUZA et al., 2003).

Dentre as técnicas voltamétricas a polarografia é aquela em que uma curva de corrente *versus* potencial é obtida usando um eletrodo de trabalho líquido, cuja superfície pode ser renovada periodicamente ou continuamente, que é o clássico eletrodo gotejante de mercúrio (Dropping Mercury Electrode - DME) e o eletrodo de gota estática de mercúrio (Static Mercury Drop Electrode – SMDE) (SANTOS et al., 2008).

A voltametria inclui todos os métodos nos quais as medidas de corrente e potencial são realizadas em eletrodos de trabalho estacionários e fixos de acordo com o material de sua composição. Estes incluem o eletrodo de mercúrio de gota pendente (Hanging Mercury Drop Electrode – HMDE) que apresenta a vantagem de evitar os chamados envenenamentos de superfícies por ser um eletrodo de superfície renovável (JAIN et al., 2007), bem como o eletrodo de filme fino de mercúrio (Thin Mercury Film Electrode – TMFE). É empregado também o eletrodo de carbono vítreo (Glassy

Carbon Electrode – GCE) o eletrodo de pasta de carbono (Carbon-Paste Electrode – CPE) e eletrodos de trabalho feitos de metais nobres.

Entre as técnicas voltamétricas utilizadas pode-se citar a polarografia clássica de corrente contínua, sendo esta uma técnica muito limitada, pois não é satisfatória para determinar espécies com concentrações abaixo de $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (SOUZA et al., 2003).

Para a voltametria de pulso diferencial aplicam-se pulsos de potencial de amplitude definida sobre uma rampa de potencial linearmente crescente. O pulso aplicado é de pequena amplitude, 10 a 100 mV durante 50 a 60 ms (Figura 4 A). De modo geral, recomenda-se 25 mV de amplitude para sistemas com transferência de um elétron e 50 mV para sistema com dois elétrons (SOUZA et al., 2003). A corrente é amostrada em dois tempos (cerca de 15 ms cada um) S_1 corrente amostrada no início do pulso e S_2 corrente amostrada no fim do pulso, $S_F = S_2 - S_1$ durante o tempo de vida dos pulsos nos quais a corrente capacitiva é mínima. O valor final da corrente é a diferença entre esses valores medidos.

Um voltamograma típico para voltametria de pulso está representado na figura 4 B onde a corrente de pico ou limite é proporcional à concentração da espécie eletroativa do meio. O potencial de pico é característico da substância eletroativa, geralmente independente da concentração do analito, e das características do eletrodo.

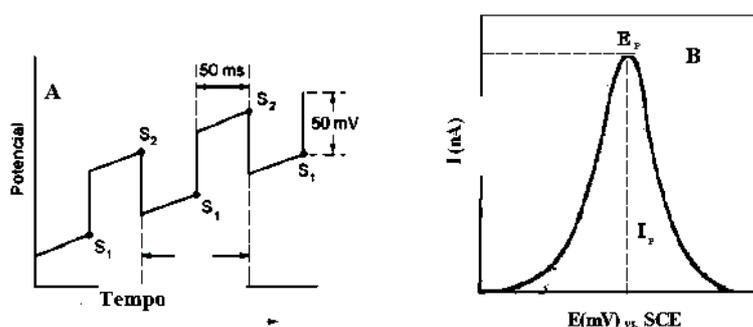


Figura 4. (A) Sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial. (B) Voltamograma típico para a determinação quantitativa de uma espécie eletroativa empregando a técnica de pulso diferencial. E_p : potencial de pico; I_p : corrente de pico (SKOOG et al., 1992).

O limite de detecção em diferentes tipos de matrizes com a aplicação das técnicas de pulso são da ordem de 10^{-7} a $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. A maior sensibilidade da voltametria de pulso diferencial pode ser atribuída a duas

fontes. A primeira é a corrente faradaica e a segunda é um decréscimo na corrente de carga capacitiva (SKOOG et al., 1992).

2.4.1. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (Square Wave Voltammetry – SWV) é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápida e sensível entre todas as técnicas de pulso. Os limites de detecção obtidos com sua utilização podem ser comparados ao obtido pela técnica espectroscópica. Foi desenvolvida em 1953 por Geoffery Barker quando estudava uma maneira de compensar a corrente capacitiva obtida nas análises polarográficas. Barker aplicou pulsos de potencial em um eletrodo gotejante de mercúrio e chegou à polarografia de onda quadrada (SOUZA et al., 2003), entretanto, a técnica desenvolvida por Barker possuía uma sensibilidade limitada pela reversibilidade do sistema e, principalmente, pelos ruídos originários de várias fontes captadas pelo capilar de mercúrio, influenciando intensamente as respostas de corrente.

Em 1969, Ramaley e Krause utilizaram eletrodos estacionários eliminando a influência dos ruídos intensificados pelo uso do capilar de mercúrio; além disso, eles substituíram a rampa linear de potencial por uma variação na forma de escada, assim surgiu a SWV que utilizava uma variação de potencial na forma de onda aliada a uma rampa de potencial na forma de escada, gerando um pico simétrico que poderia ser utilizado com sucesso para determinações analíticas (SOUZA et al., 2003), contudo, com esta forma de aplicação de potencial, a medida de corrente era realizada próximo ao centro do pulso e as varreduras de potenciais eram limitadas para pequenos valores de amplitude, conseqüentemente eram obtidas baixas velocidades de varredura, o que provocava uma perda de sensibilidade analítica (SKOOG et al., 1992; SOUZA et al., 2003).

Em 1977 Christie, Turner e Osteryoung desenvolveram um estudo no qual a medida de corrente era feita ao final do pulso de potencial; isso possibilitou que as varreduras de corrente em função dos pulsos de potenciais aplicados fossem efetuadas em velocidades superiores a 100 mV s^{-1} , chegando ao modelo atual da SWV (SOUZA et al., 2003).

Com o progresso da tecnologia analógica e digital, a SWV passou a ser incorporada aos polarógrafos a partir dos anos 80, principalmente, na

sua forma de varredura rápida. Nessa forma ela é também chamada de voltametria de onda quadrada de Osteryoung, atribuída ao nome da pesquisadora americana, Janet G. Osteryoung (SOUZA et al., 2003). Esta técnica pode ser usada para realizar experimentos de um modo bem mais rápido se comparado à técnica de pulso diferencial, com sensibilidade semelhante ou um pouco melhor, pois neste caso também ocorrem compensações da corrente capacitiva. Um experimento típico que requer cerca de três minutos para ser feito pela voltametria de pulso diferencial pode ser executado em segundos pela voltametria de onda quadrada (ALEIXO, 2007).

Na SWV independente do sentido da varredura a corrente é amostrada duas vezes, uma ao final do pulso direto quando a direção do pulso é igual à direção da varredura e outra ao final do pulso reverso, onde a direção do pulso é contrária à direção da varredura (SOUZA et al., 2003). Isto resulta em corrente determinada a partir da diferença entre valores obtidos nos dois pontos (Figura 5).

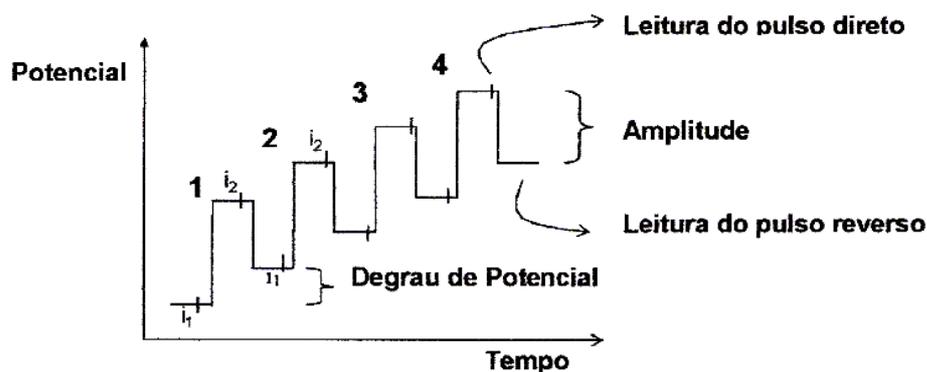


Figura 5. Sequência de pulsos (1 – 4) aplicados em determinado período de tempo, a corrente amostrada usada é sempre $i_2 - i_1$ em voltametria de onda quadrada (ALEIXO, 2007).

O processo de amostragem de corrente apresenta a vantagem de eliminar a corrente capacitiva considerando a corrente de fundo não faradaica. De modo semelhante à técnica de pulso diferencial, a voltametria de onda quadrada produz picos para processos faradaicos cuja altura é proporcional à concentração da espécie eletroativa.

A partir da aplicação destes pulsos pode ocorrer uma resposta catódica ou anódica correspondente a reação redox de caráter reversível ou quase reversível, dependendo do sentido da varredura de potencial quando

a reação apresenta caráter de irreversibilidade (SKOOG et al., 1992; SOUZA et al., 2003; SOUZA et al., 2004; HENZE, 2003).

Alternativamente, pode-se colocar em gráfico a diferença entre as correntes anódica e catódica como função da rampa linear de potencial. Neste caso, como as correntes possuem sinais opostos os picos se sobrepõem gerando um sinal maior de corrente denominada de resultante, o que pode ser observado na figura 6. A subtração da corrente catódica (-) e corrente anódica (+) é responsável pela maior sensibilidade da técnica quando aplicada a sistemas reversíveis (SOUZA et al., 2003).

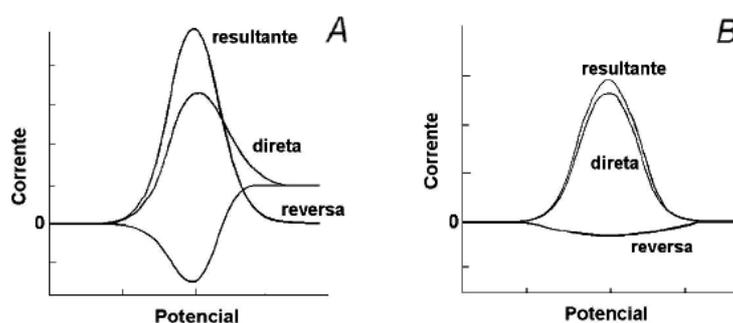


Figura 6. Voltamogramas de onda quadrada com pulsos direto (corrente catódica), reverso (corrente anódica) e a corrente resultante, (A) representa um processo redox de um sistema reversível e (B) um sistema irreversível (SOUZA et al., 2003).

Os voltamogramas obtidos em forma de picos oferecem excelente sensibilidade e rejeição às correntes residuais. Embora a sensibilidade diminua com a diminuição da reversibilidade do processo, a SWV é mais sensível do que a voltametria de pulso diferencial.

2.4.2. Voltametria de redissolução

A considerável sensibilidade das técnicas de redissolução na detecção de metais traço é atribuída à combinação de uma etapa de pré-eletrólise, com procedimentos de medição que geram sinais de correntes de oxidação ou redução com relação sinal/ruído favorável analiticamente. Considerando que os metais são pré-concentrados na superfície do eletrodo de trabalho por fatores de 100 a 1000 vezes, os limites de detecção podem sofrer diminuições de 2 a 3 ordens de magnitude, o que permite chegar-se a

determinações analíticas com limites abaixo da ordem de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹ (MELLO, 2003).

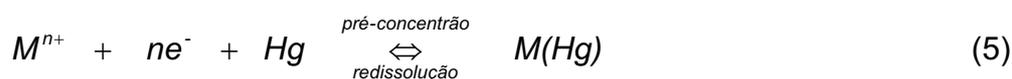
Uma das técnicas que utiliza processos de pré-concentração é a voltametria de redissolução anódica (*Anodic Stripping Voltammetry – ASV*) muito empregada na determinação de metais pesados, uma vez que vários deles podem ser depositados no eletrodo de trabalho através de eletrólise de soluções de seus íons. A etapa de pré-concentração consiste na deposição feita eletroliticamente na superfície do eletrodo aplicando-se um potencial de deposição (E_d) pré-estabelecido durante um determinado tempo e com agitação da solução. O tempo de deposição é escolhido em função da espécie eletroativa e de sua concentração, estando geralmente entre 30 e 300 s (ZAREI et al., 2006; ENSAFI et al., 2004). Podem ser usados eletrodos de gota pendente ou filme de mercúrio, além de eletrodos sólidos ou quimicamente modificados. Os eletrodos de mercúrio podem ser considerados mais vantajosos para a determinação de metais pesados, pois muito deles formam amálgamas, produzindo sinais mais repetíveis do que os depósitos metálicos formados na superfície de eletrodos sólidos.

A concentração do metal no eletrodo de mercúrio, após certo tempo de pré-concentração, pode ser obtida aplicando-se a equação 4:

$$C = \frac{i_l \cdot t_d}{n \cdot F \cdot V_{Hg}} \quad (4)$$

sendo i_l a corrente limite para a deposição do metal; t_d o tempo de deposição; V_{Hg} o volume do eletrodo de mercúrio; n o número de mols de elétrons envolvidos no processo e F a constante de Faraday. Tempos muito longos de deposição devem ser evitados, pois podem produzir correntes que não tenham uma relação linear com a concentração. A agitação constante e controlada faz com que o transporte de massa por convecção mantenha a concentração da espécie eletroativa junto à superfície do eletrodo igual a do resto da solução. Deste modo, a quantidade de metal depositado na superfície do eletrodo é maior do que a do processo de transporte de massa, quando este é governado apenas por difusão.

Na etapa de deposição ocorre a redução da espécie eletroativa, em particular, o metal (M^{n+}), formando a amálgama $M(Hg)$ para um eletrodo de mercúrio (Equação 5) ou para eletrodos sólidos, depositando-se na superfície do eletrodo formando um filme metálico (M).



Após a deposição do metal, em quaisquer casos, a agitação é interrompida e a solução é mantida em repouso por alguns segundos para que a concentração do metal depositado entre em equilíbrio na superfície do eletrodo.

Na etapa de redissolução, faz-se a varredura de potencial na direção anódica, na qual os metais depositados são oxidados em potenciais definidos. Ao promover a redissolução da espécie, registra-se um voltamograma cuja corrente de pico (I_p) é proporcional à concentração da espécie previamente depositada na superfície do eletrodo. Pode-se observar um esquema ilustrando a etapa de deposição e redissolução (Figura 7A) e um voltamograma típico para a determinação simultânea de dois metais com a técnica de voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial (Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry – DPASV) (Figura 7B).

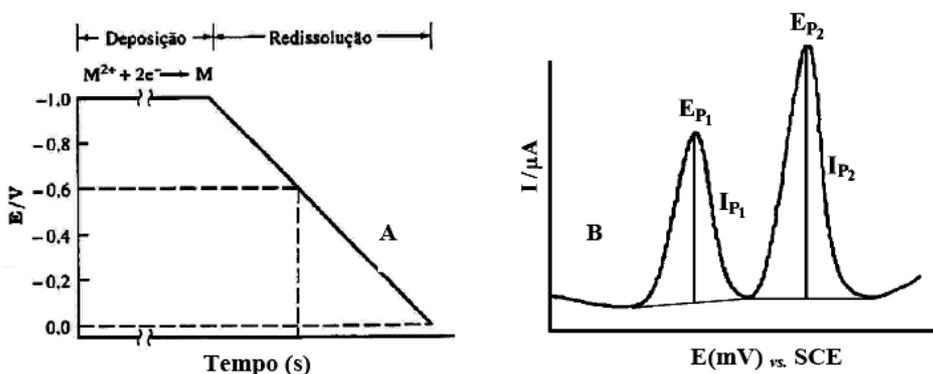


Figura 7. (A) Forma de aplicação do potencial durante a etapa de deposição e redissolução empregando DPASV para quantificação de dois metais. (B) Voltamograma obtido para a determinação simultânea de dois metais por DPASV (ALEIXO, 2007).

A ASV, empregando eletrodo de mercúrio, apesar de ser uma técnica muito sensível e conveniente para a análise de traços é restrita a metais que apresentem solubilidade no mercúrio, sendo aplicável à cerca de 30 elementos (ALEIXO, 2007).

A voltametria de redissolução catódica (*Cathodic Stripping Voltammetry* – CSV) é usada para a determinação de substâncias que formam sais pouco solúveis no mercúrio do eletrodo de trabalho. A técnica consiste na polarização anódica do eletrodo em cuja superfície se deposita uma camada de um composto pouco solúvel, formada por ânions da espécie

e cátions do eletrodo, seguida da eletroredução da camada depositada através da varredura de potencial no sentido catódico. Entre as espécies que podem ser determinadas em nível de traços, pode se exemplificar os elementos: As, Mn, Se, Mo, cloreto, brometo, iodeto, sulfeto, cianeto, entre outros.

2.4.3 Voltametria de redissolução adsortiva

As limitações apresentadas pela ASV e CSV podem ser eliminadas através da técnica voltamétrica chamada de voltametria adsortiva por redissolução em análises de traços. Nesta técnica, a pré-concentração é feita pela adsorção da espécie eletroativa na superfície do eletrodo. No caso de metais, isto é feito através de seus íons complexos. Adiciona-se à solução contendo o íon metálico um complexante adequado e o complexo formado (metal-ligante) é que será acumulado junto à superfície do eletrodo. A pré-concentração não depende da solubilidade do metal no mercúrio como no caso da voltametria de redissolução convencional, e metais pouco solúveis no mercúrio poderão ser determinados (ALEIXO, 2007; SOUZA et al., 2003)

As técnicas de voltametria de redissolução e de adsorção quando associadas às de pulso diferencial ganham muito em sensibilidade. Neste caso, a instrumentação foi desenvolvida de tal modo que as medidas de corrente e as aplicações de potencial e pulsos de potencial fossem realizados em intervalos de tempo muito pequeno, permitindo a determinação de concentrações de diversos íons metálicos na ordem de 10^{-9} a 10^{-12} mol L⁻¹ (ALEIXO, 2007) (GARBELLINI et. al., 2008). O esquema de pré-concentração utilizado na voltametria adsortiva por redissolução (*Adsorptive Stripping Voltammetry* – AdSV) é semelhante ao da voltametria de redissolução anódica.

Os parâmetros usados na etapa de pré-concentração são basicamente os mesmos já discutidos para a ASV, sendo apenas diferentes os processos de acumulação e de redissolução. Na figura 8, está representado esquematicamente o procedimento usado na voltametria adsortiva por redissolução para a determinação de um metal M na presença do ligante L, formando o complexo a ser adsorvido ML_n .

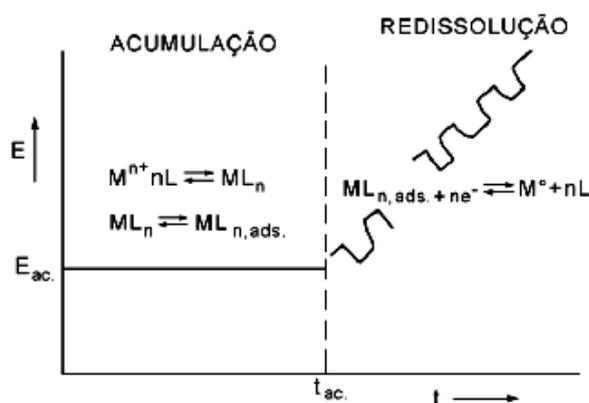


Figura 8. Representação esquemática do procedimento usado na voltametria adsortiva por redissolução mostrando as etapas para a acumulação e redissolução na determinação de um metal M^{n+} em presença de um ligante(L) (ALEIXO, 2007).

Na voltametria de redissolução adsortiva pode-se usar um potencial análogo ao potencial de deposição da ASV, o potencial de acumulação (E_{ac}), para obter-se uma pré-concentração mais seletiva, embora isso não seja necessário em muitos casos. Aqui também existirá um tempo de acumulação (t_{ac}), análogo ao t_d da ASV, que também é cronometrado, durante o qual a espécie de interesse será adsorvida sobre a superfície do eletrodo. As reações envolvidas nesta etapa são exemplificadas pelas equações 6 e 7:



O processo envolvido na interface eletrodo-solução é a adsorção, não havendo necessidade de um tempo de repouso ou de equilíbrio, como no caso da ASV, onde ocorre eletrodeposição de metais e difusão dos mesmos no mercúrio. Deste modo, após terminar a pré-concentração, pode-se proceder a redissolução executando a varredura usualmente na direção catódica pela técnica voltamétrica adequada, obtendo-se um pico, como no caso da ASV. A reação eletródica pode ser representada pela equação 8.



Como o metal foi adsorvido, ele será reduzido a partir do ponto onde o potencial atingir o valor do potencial de decomposição e o valor de potencial de pico E_p , também correspondente ao $E_{1/2}$ da onda polarográfica; assim, a varredura de potencial será catódica e não anódica como no caso da ASV,

onde o metal pré-concentrado será reoxidado (SOUZA et al., 2003; ALEIXO, 2003).

De acordo com a equação 9, a quantidade de composto adsorvido Γ , que após um tempo de acumulação t_{ac} cobre a superfície A do eletrodo, determina a sensibilidade do sinal medido (CRUZ, 2007).

- Corrente de pico em um voltamograma de redissolução adsortiva:

$$i_p = k \cdot A \cdot \Gamma = k \cdot A \cdot c_a \left(\frac{D}{r} \cdot t_{ac} + 2 \sqrt{\frac{D}{\pi} \cdot t_{ac}^{1/2}} \right) \quad (9)$$

Sendo:

i_p = corrente de pico;

t_{ac} = tempo de acumulação;

k = constante $k = \frac{n^2 \cdot F^2 \cdot v}{4 \cdot R \cdot T}$;

n = número de elétrons trocados;

A = área da superfície do eletrodo; F = constante de Faraday;

Γ = quantidade de composto adsorvido;

v = velocidade de varredura;

c_a = concentração do analito;

R = constante dos gases; e

D = coeficiente de difusão do analito;

T = temperatura absoluta.

r = raio da gota de mercúrio;

Até que a superfície do eletrodo se torne saturada (Γ_{max} após $t_{ac(max)}^{1/2}$) a corrente de pico aumenta linearmente com t_{ac} e atinge um máximo (Equação 10).

$$i_{p(max)} = k \cdot A \cdot \Gamma_{(max)} \quad (10)$$

Para que uma substância possa ser determinada pela AdSV ela precisa apresentar propriedades de adsorção (superfície ativa) junto à superfície do eletrodo de trabalho além de ser, evidentemente, eletroativa em uma dada região de potencial. Isto pode ser feito usando-se um complexante na solução associado à técnica de voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada.

Se for feita a varredura no sentido catódico em vários tempos de "espera", ou seja, de acumulação, e o pico do voltamograma de pulso diferencial ou onda quadrada aumentar a cada vez, tem-se o indicativo de que o complexo está sendo adsorvido. Aumentando-se o tempo de

acumulação, aumenta-se a adsorção e a concentração do complexo na superfície do eletrodo, aumentando-se então a corrente de pico a cada etapa enquanto não houver saturação da superfície.

Se não houver alteração da altura do pico voltamétrico antes de uma eventual saturação, o íon complexo formado não estará sendo adsorvido e não apresentará coeficiente de adsorção apropriado ao uso desta técnica.

2.4.4. Voltametria de redissolução catódica adsortiva

A voltametria de redissolução catódica adsortiva (Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry – AdCSV) é um método que detecta um complexo eletroquimicamente ativo formado pela reação do metal e um ligante adicionado à amostra. Consiste na acumulação ou pré-concentração do analito na forma de um complexante apropriado para adsorver a espécie de interesse sobre a superfície do eletrodo (Equação 11) e subsequente, redissolução do material adsortivo por varredura catódica do potencial (SAFAVI et al, 1999; JUGADE et al., 2005; ZAREI et al 2006).



A redissolução ocorre através de uma variação de potencial para região mais catódica, ou seja, em direção a potenciais mais negativos. A medição é feita após ser atingido o equilíbrio entre o ligante adicionado e o metal ligado ao analito (Equações 12 e 13):



Tempos de adsorção curtos resultam em acumulação mais efetiva do complexo formado. A combinação desse fator com uma redução eficiente pode resultar na diminuição dos limites de detecção (de 10^{-10} a 10^{-11} mol L⁻¹). É essencial para o sucesso das análises que se faça uma escolha criteriosa dos agentes complexantes para que o complexo resultante tenha superfície ativa e seja eletroativo (MELLO, 2003).

O potencial de pré-concentração é aplicado sobre o eletrodo de trabalho com a finalidade de proporcionar a deposição da espécie de interesse na superfície do eletrodo; este é um parâmetro que deve ser controlado. É aconselhável averiguar, experimentalmente, o efeito do potencial de pré-concentração sobre a corrente de pico a fim de obter elevadas correntes (ALEIXO, 2003).

O tempo de pré-concentração é selecionado de acordo com a concentração da espécie de interesse. Quanto maior o tempo de pré-concentração maior a quantidade de analito disponível no eletrodo durante a etapa de redissolução; entretanto, elevar o tempo de pré-concentração pode resultar em interferências devido à formação de compostos intermetálicos ou saturação da superfície da gota de mercúrio.

A sensibilidade e precisão da voltametria de redissolução são largamente dependentes do equilíbrio hidrodinâmico, o qual controla a quantidade de analito transportado durante a etapa de deposição. O emprego da agitação da solução conduz não somente ao transporte por difusão, mas também por convecção, o que proporciona maior sensibilidade à técnica voltamétrica de redissolução (SUN et al., 2000; JUGADE et al., 2005).

Durante a etapa de pré-concentração e deposição a concentração do analito no eletrodo assume distribuição parabólica com maior concentração em direção à solução. Para permitir a formação de uma concentração uniforme da espécie de interesse sobre o eletrodo, um período de repouso é empregado entre a etapa de deposição e a medida (SOUZA et al., 2003).

2.5. Interferentes em análises voltamétricas por redissolução

De modo geral, os principais interferentes em voltametria de redissolução incluem a formação de compostos intermetálicos, sobreposição de picos de redissolução, adsorção de compostos orgânicos e complexação.

Compostos intermetálicos podem-se formar no eletrodo de mercúrio quando altas concentrações de certos metais estão presentes. Como resultado, os picos de redissolução para os constituintes metálicos podem ser drasticamente extinguidos ou deslocados e picos adicionais podem ser observados devido a redissolução de compostos intermetálicos.

São aconselháveis alguns procedimentos para minimizar a formação de compostos intermetálicos: usar o eletrodo de mercúrio de gota pendente em lugar de um eletrodo de filme de mercúrio; aplicar um potencial de pré-concentração suficientemente negativo para reduzir o metal desejado, mas não o interferente; utilizar períodos de pré-concentração relativamente curtos seguidos por uma modulação relativamente grande do pulso (50 mV) durante o estágio da redissolução (SUN et al., 2000; ALEIXO, 2007). A

separação de picos de redissolução sobrepostos inclui a escolha apropriada do tampão e do eletrólito. Tais recursos podem combinar um pré-tratamento adequado com a adoção de parâmetros eletroquímicos eficientes. É recomendado também que se faça uma limpeza eletroquímica ao final de cada varredura.

Por conseguinte, para reduzir as interferências a partir de íons em análise de amostras naturais recomenda-se que seja utilizado mascarantes (surfactantes) para aumentar o limite de tolerância (ANDRADE et al., 2003).

2.6. Quimiometria

A tecnologia dos processadores evoluiu muito nos últimos anos, graças as pesquisas para desenvolver os melhores "hardware" e "software". A química analítica ganhou muito com o desenvolvimento da instrumentação química, pois permite o interfaceamento de aparelhos aos computadores produzindo uma enorme quantidade de informações, entretanto, essas informações que relacionam os sinais obtidos com os resultados desejados na maioria das vezes são complexas e variadas fazendo-se necessário tratamento mais sofisticados de dados, como os providos pela quimiometria (FERREIRA et al., 1999).

A quimiometria surgiu nos anos oitenta e pode ser definida como a ciência que relaciona medições realizadas num sistema ou processo químico como o estado do sistema, através da aplicação de métodos matemáticos ou estatísticos, permitindo a previsão ou seleção de procedimentos de medida ótimos ou experiências a realizar para retirar a máxima informação dos dados adquiridos (NETO et al., 2006).

Uma de suas contribuições foi apresentar aos químicos o modo de pensar multivariado. Isso se aplica aos dados da química analítica instrumental, os quais são por natureza multivariados, mas também ao planejamento de experimentos, tradicionalmente dominado pela mentalidade de variar um fator de cada vez (VALDERRAMA, 2008).

Aplicações rotineiras de métodos quimiométricos afluem da literatura em química analítica, mas apenas uma pequena parte desta literatura tem-se dedicado ao campo da eletroquímica e eletroanalítica (CORREIA et al., 2007).

2.6.1. Planejamento experimental

O planejamento experimental é uma técnica que vem sendo usada em grande escala, onde uma série de ensaios experimentais pré-estabelecidos determinam mudanças nas variáveis de entrada de um processo ou sistema de modo que se possa observar e identificar os fatores que modificam a resposta (FERREIRA et al., 1999; BRASIL et al., 2007).

Aplicando planejamentos experimentais, pesquisadores podem determinar as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo tendo como resultado a redução da variação do processo e a melhor concordância entre os valores medidos e os valores preditos, redução do tempo de análise, do custo operacional e a melhoria dos resultados.

A figura 9 apresenta um exemplo de estratégia inicial de uma técnica de planejamento experimental.

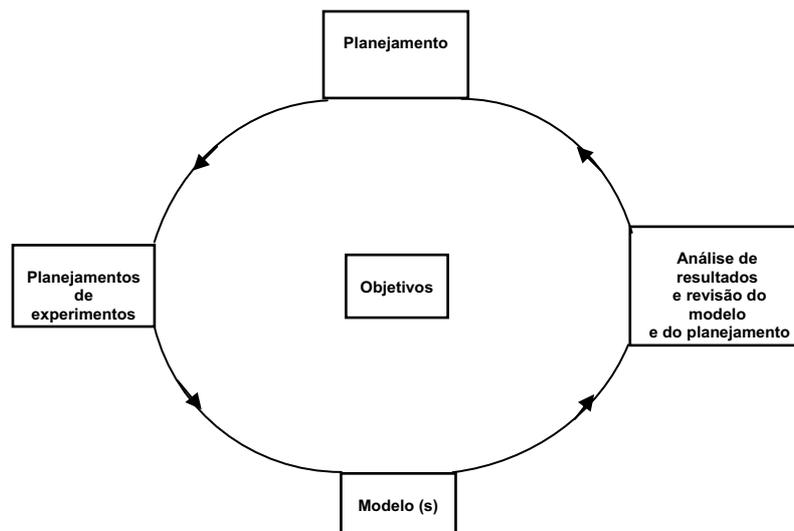


Figura 9. Estratégia Inicial.

Planejamentos experimentais são eficientes quando fornecem uma quantidade suficiente de informações com menos esforço. Após selecionar as variáveis possíveis de serem estudadas e que provavelmente interferem no sistema é preciso avaliar a metodologia experimental (tempo, custo, etc.). As variáveis que não foram selecionadas devem ser fixadas durante todo o experimento (TEÓFILO et al., 2006).

Tem se encontrado em muitas áreas e em diversas metodologias a aplicação do planejamento experimental, de fato, pode se visualizar a

experimentação como parte de um processo científico bem como uma das maneiras de descrever sobre como os sistemas e processos se comportam (NETO et al., 2002; TEÓFILO et al., 2006). Em uma etapa seguinte deve-se escolher qual planejamento usar para estimar a influência das diferentes variáveis no resultado. No estudo de triagem, as interações entre as variáveis, as interações principais e as de segunda ordem, obtidas normalmente pelos planejamentos fatoriais completos ou fracionários, são de extrema importância para a compreensão do comportamento do sistema.

2.6.2. Planejamento fatorial

O planejamento fatorial tem sido muito aplicado em pesquisas básicas e tecnológicas. É classificado como um método do tipo simultâneo em que as variáveis de interesse que realmente apresentam influências significativas na resposta, são avaliadas ao mesmo tempo (NETO et al., 2002) (AOUADA et al., 2008). Deve ser realizado na fase inicial do procedimento experimental e quando há necessidade de se definir os fatores mais importantes, bem como estudar os efeitos sobre a variável resposta-escolhida. Um planejamento fatorial requer a execução de experimentos para todas as possíveis combinações de níveis dos fatores. Observa-se que, quando se tem vários fatores, o número de experimentos pode ser imenso (ROSÁRIO et al., 1999).

O planejamento fatorial pode ser representado por b^a , em que a é o número de variáveis e b é o número de níveis escolhidos. Os planejamentos 2^a são os mais comuns.

Nos planejamentos experimentais onde as variáveis são exploradas em 2 níveis é comum codificá-los usando os sinais (+) e (-). A atribuição destes sinais aos níveis superiores ou inferiores é feita de forma arbitrária e não interfere na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados. Um exemplo de um planejamento mais simples é quando num planejamento fatorial todas as variáveis são estudadas em apenas dois níveis. Havendo k fatores, o planejamento de dois níveis irá requerer a realização de 2^k ensaios diferentes, sendo chamado por isso de fatorial 2^k (TEÓFILO, 2003).

A interação de um fator é definida como sendo a mudança na resposta produzida no nível do outro fator. Este é frequentemente chamado de efeito

principal, pois ele se refere aos fatores primários de interesse do experimento. Em certos experimentos é possível constatar que a diferença na resposta entre os níveis de um fator não é igual a todos os níveis de outros fatores. Quando isto ocorre, há uma possível interação entre estes fatores. Se o efeito de uma variável depende do nível de outra, pode-se dizer que as duas variáveis interagem e é possível calcular o valor do efeito de interação entre elas. Muitos experimentos envolvem o estudo dos efeitos de dois ou mais fatores.

Dados sobre interação é um fator importante na procura das condições ideais, desde que sua existência, implique que o valor assumido por um dos fatores tenha influência no efeito da resposta de outro fator. Com esta técnica o experimento evolui em estágios pré-planejados.

A análise de dados pode ser realizada utilizando softwares estatísticos como MINITAB[®], EXCEL[®] e o STATISTICA[®], que proporcionam a utilização de técnicas de planejamento e análise de experimentos (NETO et al., 2002).

Após a realização dos experimentos de triagem, os fatores significativos são selecionados e uma metodologia de análise de superfície de resposta pode ser executada para a otimização do experimento. Sendo que nesta situação, otimizar significa encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor condição desejada, isto é, encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores.

2.6.3. Metodologia de superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta (*Response Surface Methodology* – RSM) baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado (TEÓFILO et al., 2006) e conseqüentemente, oferecer condições de explorar o sistema até a sua otimização. Em experimentos planejados a utilização RSM permite que se faça a otimização de produtos ou processos através da modelagem das variáveis de interesse sendo constituída de duas etapas distintas, a modelagem e o deslocamento. Estas etapas podem ser repetidas quantas vezes forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima (máxima ou mínima) da superfície investigada.

A modelagem é feita ajustando-se os modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais, onde o deslocamento se processa sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia na forma mais pronunciada (NETO et al., 2002).

De maneira geral, consiste em técnicas de análise e planejamentos de experimentos empregados na modelagem matemática de respostas, que procuram relacionar e identificar a relação existente entre fatores controláveis (variáveis independentes) e as respostas como variáveis dependentes do sistema analisado. A superfície de resposta demonstra em um gráfico o comportamento da resposta em função de fatores tomados dois a dois, permitindo analisar os fatores que afetam o sistema.

A função matemática que descreve a superfície de resposta (NETO et al., 2002) é dada pela equação 14 onde x_1, x_2, \dots, x_k são os fatores experimentais e ε é o resíduo ou erro experimental.

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon \quad (14)$$

A escolha de um planejamento experimental adequado é fundamental na otimização e construção da superfície de resposta (NETO et al., 2002). Muitos sistemas exibem respostas que são funções não de um, mas de dois ou mais fatores. A aplicação de modelos empíricos para o caso de dois fatores são os mais simples, além de ser possível mostrá-los em um gráfico em três dimensões. Em vários casos um modelo de primeira ordem (linear) ou de segunda ordem (quadrático) é usado.

Os polinômios de primeira ordem geralmente são a primeira função que é utilizada para se aproximar o conjunto de resultados (Equação 15). Neste caso procura-se verificar se a variação da resposta em função dos fatores é bem modelada por uma superfície plana, sendo que $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$, representam os coeficientes do polinômio; x_1, x_2, \dots, x_k são os fatores experimentais e ε é o erro experimental.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (15)$$

Se o teste estatístico aponta que o modelo linear não satisfaz as condições de operação do sistema, porque existe uma curvatura na superfície de resposta então, o planejamento composto central (*Central Composite Design - CCD*) é apropriado para ajustar o modelo polinomial completo de segunda ordem. A função a ser aproximada no conjunto de

resultados é um polinômio de ordem maior como um modelo quadrático (Equação 16) sendo que $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ representam os coeficientes do polinômio de 2º grau; x_1, x_2, \dots, x_k são os fatores experimentais e ε é o erro experimental.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (16)$$

O planejamento estrela é feito fora de duas combinações de tratamento axial nos níveis baixo e alto para cada fator mantendo todos os outros fixos nos pontos centrais acrescidos de um ponto unitário no nível central para todos os fatores (TEÓFILO et al., 2006).

O CCD, introduzido por Box e Wilson no início da década de 1950, são construções sem o correspondente planejamento fatorial completo (níveis baixos e altos), apresenta uma grande sobreposição do planejamento estrela (Figura 10 A) dando a ele uma forma esférica (Figura 10 B).

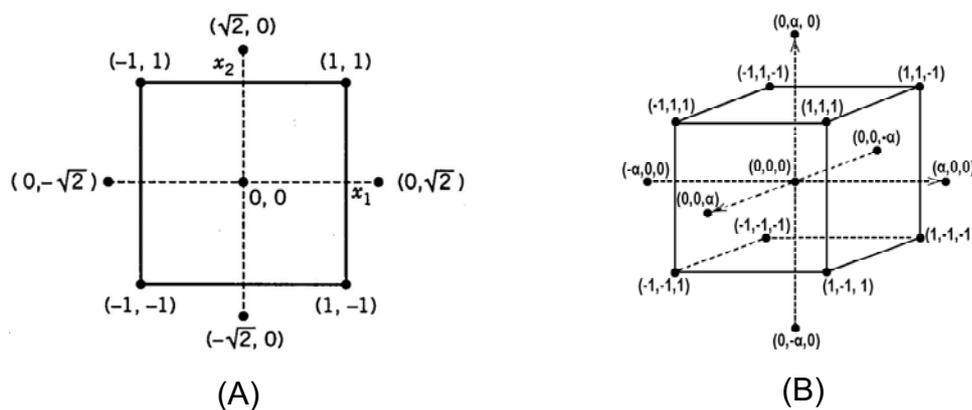


Figura 10. (A) planejamento composto central para dois fatores ($k=2$ e $\alpha=\sqrt{2}$). (B) planejamento composto central para três fatores ($k=3$ e $\alpha=\sqrt{3}$) (TEÓFILO et al., 2006).

O CCD é na verdade o planejamento fatorial clássico em dois níveis ($2k$), utilizado para ajuste em equação de primeira ordem, acrescido de alguns pontos experimentais que permitem a estimação dos coeficientes de uma superfície de 2ª ordem. No CCD é comum codificar os níveis das variáveis. Geralmente, assumem-se três níveis igualmente espaçados, de forma que assumam os valores de -1 e $+1$, respectivamente para o valor inferior, intermediário e superior. A atribuição dos sinais de codificação aos níveis superiores ou inferiores é feita de forma arbitrária e não interfere na realização dos experimentos ou na interpretação dos resultados, além de

permitir esquematizar o planejamento na forma de matrizes de planejamento. As matrizes de planejamento são tabelas utilizadas para organizar as informações relacionadas ao desenvolvimento de um planejamento fatorial.

O CCD apresenta notável superioridade sobre o planejamento fatorial para se estimar os parâmetros do modelo, pois proporciona o teste para a variância da estabilidade, além disso, o modelo de segunda ordem completo pode ser ajustado com o número de graus de liberdade fornecido pela combinação de tratamentos do CCD (TEÓFILO et al., 2006).

2.6.4. Significância e confiabilidade nos experimentos

Ao realizar os experimentos podem-se estimar alguns parâmetros que reduzem a probabilidade de errar nas decisões ou chegar a uma conclusão incerta sobre os fatores que influenciam o sistema investigado (NETO et al., 2002).

A probabilidade de se cometer um erro ao se rejeitar a hipótese nula quando ela é verdadeira é identificada como nível de significância (α) do teste estatístico, o qual é controlado e definido decidindo o nível de risco α que se está disposto a tolerar, sendo recomendável selecionar os níveis de α em torno de 0,1 ou menos. O complemento da probabilidade de um erro de rejeição da hipótese nula sendo verdadeira é denominado de confiança, que é identificado com $(1 - \alpha)$. Se este termo for multiplicado por 100%, temos o nível de confiança do experimento. O problema consiste então na comparação de mais de duas médias. Neste caso a técnica indicada é a análise de variância.

A *Análise de Variância (Analysis of Variance – ANOVA)* foi desenvolvida e utilizada pela primeira vez por Ronald A. Fischer. Box, Yates, Bose, Cochran e Kempthorne posteriormente contribuíram para a evolução da técnica (DEMING et al., 1987; NETO et al., 2002). ANOVA é uma ferramenta para comparação de vários grupos ou estratos de interesse, permitindo investigar a existência de diferenças significativas entre os grupos estudados. Conclusões obtidas a partir da ANOVA apresentam um nível de confiança determinado pelo analista.

Na análise de variância (ANOVA) a variação total da resposta é definida como a soma quadrática de dois componentes: a soma quadrática da regressão e a soma quadrática dos resíduos (TEÓFILO et al., 2006).

A soma quadrática da variação total, corrigida para a média (SQ_{Tot}) pode, assim, ser escrita como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Tabela com os cálculos matemáticos utilizados na Análise de Variância (ANOVA)

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_0
Entre tratamentos	$SQ_{Trat} = \sum_{i=1}^a n_i (\bar{y}_i - \bar{y})^2$	$a - 1$	$QM_{Trat} = \frac{SQ_{Trat}}{a - 1}$	$F_0 = \frac{QM_{Trat}}{QM_{Res}}$
Erro (dentro dos tratamentos)	$SQ_{Res} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{n_i} (\bar{y}_{ji} - \bar{y}_i)^2$	$\sum_{i=1}^a n_i - a$	$QM_{Res} = \frac{SQ_{Res}}{\sum_{i=1}^a n_i - a}$	
Total	$SQ_{Tot} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{n_i} (\bar{y}_{ji} - \bar{y})^2$	$\sum_{i=1}^a n_i - 1$		

2.7. Validação dos métodos analíticos – técnicas e conceitos

A utilização de um método analítico exige confiabilidade, assim os resultados apresentados devem ser precisos e o valor obtido para a concentração do analito deve ser verdadeiro dentro da faixa do erro experimental. Para analisar o desempenho de métodos analíticos e para constatar se os resultados são consistentes entre si e próximos aos valores verdadeiros de concentração do analito na amostra, avalia-se a precisão e a exatidão dos mesmos, respectivamente, a partir de parâmetros como a linearidade, seletividade, limite de detecção e a sensibilidade.

2.7.1. Sensibilidade

A sensibilidade indica quanto um método pode diferenciar amostras com concentrações parecidas de analito (RIBANI, 2004), de acordo com a equação 17 pela inclinação da curva analítica.

$$Sensibilidade = \frac{\Delta \text{valor do sinal da corrente}}{\Delta [\text{analito}]} \quad (17)$$

2.7.2. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é o valor de concentração do analito que corresponde ao menor sinal que pode ser detectado com certeza razoável em um dado método analítico. O valor recomendado para o limite de detecção obedece à equação 18.

$$LD = 3 \frac{S_B}{b} \quad (18)$$

sendo S_B a estimativa do desvio padrão da média aritmética e o b o valor do coeficiente angular da reta de calibração obtida da curva.

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão. O valor recomendado para o limite de quantificação obedece à equação 19.

$$LQ = 10 \frac{S_B}{b} \quad (19)$$

2.7.3. Seletividade

A seletividade de um método é o quanto esse método é livre da ação de potenciais interferentes. O grau de seletividade do método pode ser avaliado através de um estudo determinando o analito na presença de possíveis interferentes.

2.7.4. Precisão

A precisão de um método caracteriza-se pela reprodutibilidade e repetibilidade das medidas feitas com o analito. A repetibilidade se refere ao grau de reprodução do sinal analítico em relação às medidas feitas com replicatas nas mesmas condições experimentais, enquanto que a reprodutibilidade é associada ao grau de reprodução do sinal ao usar diferentes amostras do mesmo ponto amostral e ou diferentes calibrações. Os valores de desvio padrão e de variância obtidos a partir dos dados experimentais são indicadores de precisão (RIBANI, 2004).

2.7.4.1. Repetitividade

A repetitividade caracteriza-se pela concordância entre os resultados de medições sucessivas por um mesmo método. Itens como, procedimentos

analista e aparelhos usados sob as mesmas condições de trabalho em intervalos curtos de tempo são observados e avaliados.

2.7.4.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária indica o efeito de variações dentro do mesmo laboratório devido à diferentes circunstâncias como diferentes dias, equipamentos ou analistas. O objetivo da validação intermediária é verificar que num mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI, 2004).

2.7.4.3. Precisão instrumental

Este parâmetro tem como objetivo verificar a variação da resposta do equipamento através de sucessivas injeções de uma mesma amostra.

2.7.5. Exatidão

A exatidão da análise é indicada pela diferença entre o resultado analítico e o valor verdadeiro associado à amostra (RIBANI, 2004). Existem várias formas de se determinar a exatidão de um método, avaliando fatores como a seletividade, a linearidade da curva analítica e comparando resultados obtidos por um novo método com os obtidos por um método padrão.

2.7.5.1. Linearidade de uma curva analítica

A linearidade da curva é expressa pelo coeficiente de correlação (r), calculado através de regressão linear. Quanto mais esse valor estiver perto da unidade, maior é a linearidade da curva. Para concentrações acima do limite da faixa linear o sinal medido é menor que o sinal interpolado a partir da curva de calibração. A faixa linear da curva analítica é definida como a região da curva onde há uma boa correlação linear ($r = 0,999$) entre os sinais analíticos registrados e as concentrações correspondentes ao analito. Dentro dessa faixa a sensibilidade do método é estável.

2.7.5.2. Ensaio de recuperação

O ensaio de recuperação avalia a porção do analito que estava originalmente na matriz em estudo pelo método voltamétrico proposto.

2.8. Ambiente computacional

O *software* Statística[®] é uma linguagem computacional dotada de variadas metodologias utilizadas em grande escala em tratamentos estatísticos. É também largamente utilizado por profissionais de química. É excelente para analisar dados, pois este módulo estrutural possui todas as ferramentas gráficas de integração e produção de relatórios, dispõe de processos apropriados para recolher, organizar, classificar, apresentar e interpretar conjuntos de dados. Oferece estatísticas essenciais com clareza de análise, facilidade de benefício de uso, além de conter ferramentas para estatística descritiva, regressão linear, análise de variância, testes de hipóteses e testes não-paramétricos.

O *software* Statística[®] possui todas as técnicas para análise descritiva de dados como intervalos de confiança, desvio-padrão, erro-padrão, média harmônica, testes t para uma e duas amostras e teste t pareado. Inclui desde medidas de posição, a teste de estimativas e regressão.

Em todos os módulos do Statística[®] há uma diversidade de gráficos que ajudam na exploração dos dados e visualização dos resultados histogramas, gráficos, *scatterplots*, gráfico de superfície, entre outros. O *software* Statística[®] fornece técnicas para extrair informações relevantes de bancos de dados, os quais são muitas vezes incompletos, na medida em que são expostos. O objetivo do sistema é extrair informações úteis sobre problemas em estudo, realçando aspectos importantes até então desconhecidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Limpeza do material

Antes de iniciar o processo experimental todo o material a ser utilizado passou por um procedimento de limpeza, com o intuito de assegurar a ausência de quaisquer resíduos que pudessem interferir nas medidas. A vidraria utilizada foi lavada com detergente, mergulhada em solução de HNO_3 $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ por 72 horas, posteriormente, lavada com água destilada e em seguida com água deionizada. O tratamento com HNO_3 foi realizado para evitar a contaminação da solução em contato com a vidraria através da troca de íons metálicos, possivelmente adsorvidos em sua superfície, que poderiam ser liberados para a solução por íons H^+ , enquanto que, os recipientes de polietileno utilizados para armazenamento das soluções foram tratados com solução HNO_3 20% por 72 horas e em seguida, lavados com água deionizada.

Para reduzir os riscos de contaminação, a cela de medidas foi lavada com solução de HNO_3 1:1 e em seguida com água deionizada a cada final de análise. Durante as análises os materiais necessários tais como, células de vidro, frascos com água deionizada, reagentes e amostras foram manuseados com o auxílio de luvas de polietileno descartáveis.

3.2. Aferição de material volumétrico

Foram utilizadas micropipetas volumétricas de 10, 50, 100 e 200 μL ; todas com ponteiros descartáveis de polietileno. Todo material volumétrico foi calibrado ou aferido a fim de verificar se os volumes neles indicados correspondiam aos volumes reais. A calibração ou aferição foi realizada mediante a pesagem da quantidade de água neles contida a uma temperatura próxima a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

O volume real calculado (V) foi obtido através da multiplicação da massa de água (m) obtida pelo fator de conversão tabelado (f), correspondente à temperatura de trabalho ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), conforme a expressão da equação 20:

$$V = m \cdot f \quad (20)$$

Foram realizadas a aferição de balões de 50 e 100 mL, pipetas de 5, 10 e 20 mL, como também as pipetas automáticas de 10, 50, 100 e 200 μ L. As variações encontradas foram em média 0,20% e 0,10% para os balões; 1%; e 3% para as pipetas volumétricas e 0,20%, 0,10%, 1%, 3% para as pipetas automáticas.

3.3. Reagentes

Todos os compostos e reagentes químicos utilizados neste trabalho foram de grau analítico e não sofreram etapas prévias de purificação. A água ultra-pura utilizada para o preparo de todas as soluções foi deionizada pelo aparelho da BAUMER[®] (CIRURTEC HOSPITALAR – TKA – DI 800 / 1900).

O complexante 8-hidroxiquinolina foi obtido da Vetec[®] e os diversos reagentes utilizados para se preparar o eletrólito de suporte foram ácido acético glacial (Merck[®]), acetato de sódio (Vetec[®]) e nitrato de potássio (Vetec[®]). Os diversos ácidos utilizados na digestão das amostras foram: ácido clorídrico (Merck[®]), ácido nítrico (Merck[®]), ácido perclórico (Reagen[®]), ácido fluorídrico (Vetec[®]) e peróxido de hidrogênio (Vetec[®]). Os reagentes nitrato de sódio (Vetec[®]) e hidróxido de sódio (Vetec[®]) foram utilizados em alguns testes durante o trabalho de otimização. O gás nitrogênio utilizado na célula voltamétrica foi da White Martins, com teor de pureza de 99,996%. O mercúrio utilizado em todo o trabalho foi proveniente da Merck[®].

3.4. Preparo de soluções

As soluções foram preparadas com água deionizada, sendo que as soluções dos íons metálicos foram preparadas em HNO_3 0,001 mol L^{-1} . Todas as soluções e misturas foram armazenadas em frascos de polietileno ou vidro previamente descontaminados em banho de ácido nítrico 6,0 mol L^{-1} por um dia e em seguida lavados com água deionizada.

A solução estoque padrão de molibdênio (1g L^{-1}) foi preparada dissolvendo-se 1,8402 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 1 L de HNO_3 0,1 mol L^{-1} . Através desta solução foram preparados todos os padrões diluídos utilizados no experimento. A solução padrão de trabalho Mo(VI) 200 mg L^{-1} foi

preparada e acondicionada na geladeira e foi usada por um período de uma semana.

3.4.1. Soluções para calibração multivariada

A solução estoque $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de oxina (8-hidroxiquinolina) em HCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 0,56 g de (8-hidroxiquinolina) em 100 mL de HCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Por diluição, obteve-se semanalmente, uma solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de oxina enquanto que a solução 2 mol L^{-1} de KNO_3 foi preparada dissolvendo-se 20,22 g de KNO_3 em água deionizada e transferindo-se para um balão volumétrico de 100,0 mL, o qual foi completado o volume com água deionizada. A solução tampão ácido acético/acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 4,7 foi preparada através de quantidades necessárias de solução acetato de sódio $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ e solução ácido acético $2,0 \text{ mol L}^{-1}$; o pH da solução tampão foi ajustado quando necessário usando soluções de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ padronizadas.

3.4.2. Outras soluções

A solução de Triton X-100 10% (m/v) foi preparada dissolvendo-se 10,0 g de Triton X-100 em água deionizada e o volume foi completado para 100 mL em balão volumétrico aferido. Esta solução foi utilizada no teste de interferentes.

3.5. Instrumentação

3.5.1. Instrumentação para análises voltamétricas

As determinações voltamétricas foram executadas em um analisador voltamétrico da Metrohm® modelo 797 VA *Computrace* (Figura 11), operando com um eletrodo de mercúrio foi utilizado no modo de eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE). Assim toda a varredura de potencial foi realizada em uma gota estacionária, em geral com o passo de pré-concentração. O sistema foi mantido bem fechado para evitar entrada de ar no interior do capilar.



Figura 11. (A) Instrumento voltamétrico 797 VA *Computrace*
(B) Montagem completa do sistema.

A principal vantagem desse eletrodo é sua excelente faixa de potencial de redução associada a uma corrente residual baixa. Sua importância prática reside na facilidade com que reproduz novas gotas de mercúrio no final de cada análise. As desvantagens incluem velocidades de agitação baixas, a fim de evitar o desprendimento da gota de mercúrio durante a deposição e uma razão área superficial/volume relativamente pequena que leva a formação de picos mais largos provocando perda da resolução. Entretanto, eletrodos de mercúrio são muito utilizados em técnicas de redissolução devido ao fato de apresentarem ampla faixa de potencial em região catódica e elevada sobretensão em relação à redução H^+/H_2 . O eletrodo de referência foi o eletrodo de prata/cloreto de prata $Ag/AgCl$ ($3,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$). Foi empregado um eletrodo auxiliar de platina, como mostrado na figura 12.

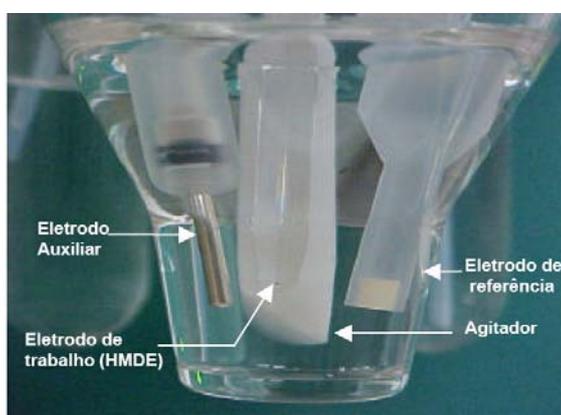


Figura 12. Célula voltamétrica do analisador polarográfico 797 VA *Computrace*, destacando os três eletrodos e o agitador não magnético.

Um pHmetro Orion-Jundilab, modelo 720 A (Figura 13) com eletrodo de vidro de dupla junção foi adaptado ao polarógrafo da Metrohm®, para verificação do pH das amostras na célula voltamétrica durante a realização das varreduras.



Figura 13. Medidor de pH adaptado ao aparelho 797 VA *Computrace*.

O sistema voltamétrico 797 VA *Computrace* requer para o seu funcionamento um computador Pentium III acima de 1GHz, um sistema operacional Windows® 2000 ou Windows® XP Professional, com espaço livre no disco rígido de 20 MB para arquivos do programa e recomenda-se 100 MB de espaço para arquivos de dados, memória RAM de 256 MB, resolução gráfica 1024×768 ou mais e uma conexão USB para o interfaceamento.

A manipulação dos dados, o armazenamento e a saída para visualização dos resultados foram controlados pelo “software” VA *Computrace* 1.2 (METRODATA, 2005).

De acordo com o objetivo, o software 797 VA *Computrace* versão 1.2 pode ser usado em dois modos de operações diferentes:

- Modo Exploratório: utilizado para análises qualitativas. É adequado para práticas orientadas de voltametria no treinamento de operação do instrumento. Este modo permite ao usuário aplicar dez diferentes técnicas voltamétricas de medidas e comparar seus resultados.

- Modo de Determinação: é usado para análises quantitativas de substâncias orgânicas e inorgânicas. A calibração pode ser feita via adição

de padrão ou curvas de calibração. A avaliação do sinal e o cálculo das concentrações são automáticos. Ao final da medida, um relatório pode ser gerado e impresso. A maioria dos métodos importantes para determinação de metais ou outras substâncias podem ser acessados diretamente. Todas as informações numéricas e gráficas podem ser visualizadas. Os voltamogramas, curvas de calibração e os resultados numéricos podem ser transferidos para outras aplicações do Windows via Windows Clipboard. Também é possível importar e exportar os dados em formato ASCII.

3.5.2. Espectrofotômetro de absorção atômica

A determinação das concentrações do metal em estudo para efeito de comparação foi realizada em um espectrômetro de emissão de plasma da Perkin Elmer modelo Optima 3300 DV.

3.6. Aquisição e tratamento de dados

Os dados voltamétricos foram registrados através do programa “797 VA Computrace” que foram processados com o próprio programa do polarógrafo e também por programas comerciais que operam dentro do ambiente Windows, como o OriginPro 7.5[®] e o Statistica 7.0[®].

3.7. Parâmetros eletroanalíticos

Obedecendo aos parâmetros voltamétricos da literatura pesquisada, foi colocada em prática a metodologia de voltametria para se determinar molibdênio em níveis traços em solos e plantas usando amostra padrão de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Mo(VI). A partir dos resultados obtidos foi feita a otimização do eletrólito de suporte e dos parâmetros voltamétricos para se melhorar as respostas instrumentais. A partir de estudos iniciais foram definidos os valores dos parâmetros escolhidos para o planejamento fatorial.

Em análise voltamétrica, um fator que certamente interferirá na resposta é a natureza do eletrólito de suporte e sua concentração. A escolha de um eletrólito de suporte em voltametria exige uma seleção entre muitas soluções, portanto, este fator não pode ser incluído em um planejamento experimental sem um prévio conhecimento. O método qualitativo é uma opção para selecionar bons eletrólitos a serem incluídos em um planejamento experimental. Para a situação em questão, estudos anteriores

realizados com molibdênio mostraram ser o meio ácido o melhor meio para análise deste tipo de composto. Desta maneira, o eletrólito de suporte escolhido para ser incluído no planejamento fatorial deste estudo foi a solução acetato de sódio/ácido acético e KNO_3 , sendo avaliado no planejamento qual a melhor concentração do mesmo para se obter a melhor resposta. A presença de eletrólito de suporte na cela eletroquímica, no caso a solução acetato de sódio/ácido acético e KNO_3 , garante um decréscimo na resistência da solução e permite que as espécies eletroativas movam-se principalmente por difusão (LI HONG et al, 1997); além disso, o eletrólito de suporte também ajuda a manter o pH em um valor desejado. Dessa forma, o uso de soluções tampão é altamente difundido para estas situações.

3.8. Estudo inicial da composição do eletrólito

O eletrólito de suporte é uma solução iônica cuja concentração deve estar tipicamente entre 10 a 100 vezes maior que as das espécies a serem estudadas. Este deve ser eletroinativo na faixa de potencial do eletrodo onde os estudos com o analito de interesse são realizados. Também deve ser neutro não reagindo com o analito eletroativo ou nenhum de seus subprodutos. A principal função do eletrólito de suporte é ser responsável pela totalidade da corrente iônica da cela, uma vez que ele está em excesso em relação às demais substâncias em solução. A alta concentração do eletrólito de suporte mantém baixa a resistência da cela, também mantém a força iônica da solução constante impedindo que a composição da interface entre a solução e o eletrodo mude significativamente com a corrente proveniente da reação. Como a composição desta região influi nas medidas elétricas é necessário que ela se mantenha constante durante todo o tempo da análise. Finalmente, o eletrólito de suporte suprime a contribuição da corrente de migração (formação de um gradiente de carga elétrica) no transporte do analito para a superfície do eletrodo.

A primeira etapa dessa otimização foi encontrar a melhor composição do eletrólito de suporte, visando obter um sinal eletroanalítico relevante da solução padrão de molibdênio. Estabeleceram-se como características para escolha da composição do eletrólito: correntes faradaicas estáveis, reprodutíveis e de maior intensidade para o molibdênio.

Para iniciar a otimização da composição do eletrólito de suporte para a determinação de Mo(VI) empregou-se uma mistura de KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, solução tampão ácido acético/acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$) $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e o complexante 8-hidroxiquinolina (oxina) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

3.9. Planejamento experimental

Os fatores estudados foram: o tamanho da gota (área) de mercúrio a ser formada (mm^2), o tempo de deposição (s), frequência (Hz), amplitude (mV) e o incremento de varredura (V) e a mistura da composição do eletrólito também foram escolhidos como parâmetros a serem analisados no planejamento fatorial. As medidas foram feitas utilizando um tempo de deposição de 80 s. A primeira leitura na ausência de molibdênio foi gravada como branco. Em seguida foi adicionada uma alíquota de $100 \mu\text{L}$ de uma solução padrão contendo íons Mo(VI) na concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$.

Quando se analisa oito variáveis em dois níveis em um planejamento fatorial completo, o tempo gasto é muito longo, pois 2^8 correspondem a 256 ensaios. Para fazer a triagem identificando as variáveis realmente significativas, comparando os efeitos e as interações entre elas, foram executados ensaios utilizando o planejamento fatorial fracionário, utilizando oito fatores com dois níveis para cada fator; logo, um planejamento fatorial fracionário $2^{\frac{8-4}{IV}}$ de resolução IV (ROSÁRIO et al., 1999). O procedimento em todos os experimentos realizados para a otimização da resposta voltamétrica foi feito pela adição de 10 mL de água deionizada acidificada com HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), $70 \mu\text{L}$ de complexante oxina, $1,30 \text{ mL}$ de solução tampão de ácido acético/acetato de sódio, $2,00 \text{ mL}$ de nitrato de potássio e $100 \mu\text{L}$ de solução de Mo(VI) em uma célula voltamétrica. Foi feita a desoxigenação desta mistura por borbulhamento de nitrogênio ultra puro por 10 minutos nesta etapa. Depois do tempo de equilíbrio (10 s), uma varredura catódica foi aplicada de $-0,2$ a $-0,7$ volts. Em seguida foi adicionado um volume de $100 \mu\text{L}$ da solução da molibdênio $200 \mu\text{g L}^{-1}$. Procedeu-se a desoxigenação por 90 segundos e realizou-se nova varredura na mesma faixa de potencial.

O analisador voltamétrico foi programado para realizar três varreduras em cada experimento registrando a média das correntes de pico máximo no potencial de determinação do molibdênio. Cada ensaio no planejamento

fatorial foi realizado em triplicata e os resultados foram anotados para o estudo dos níveis dos fatores a serem empregados posteriormente no tratamento quimiométrico.

O planejamento experimental, também denominado delineamento experimental, foi utilizado com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis nos resultados de um dado sistema ou processo para se conseguir o máximo de informação útil a partir de poucos ensaios. Isso proporciona economia de tempo e de reagentes, produzindo resultados mais satisfatórios.

3.10. Estudos iniciais para as determinações voltamétricas de Mo(VI)

Após ter sido encontrado os parâmetros otimizados do eletrólito de suporte como KNO_3 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, complexante 8-hidroxiquinolina (oxina) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, tampão de ácido acético/acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,65), foram realizadas varreduras com medida da corrente de pico no potencial de $-0,54 \text{ V}$.

Este procedimento foi executado em todos os experimentos realizados para a otimização da resposta voltamétrica, composta por 10 mL de água deionizada acidificada com HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), $1,3 \text{ mL}$ de solução tampão ácido acético/acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,65), $2,0 \text{ mL}$ de KNO_3 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ e $70 \mu\text{L}$ do complexante 8-hidroxiquinolina (oxina) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Estes foram desoxigenados por borbulamento de gás nitrogênio ultra puro por 10 minutos em uma primeira etapa e por 90 segundos nas sucessivas etapas, como anteriormente. Depois do tempo de equilíbrio (10 s) uma varredura catódica foi aplicada entre $-0,2$ e $-0,7 \text{ V}$. A adição de $100 \mu\text{L}$ de amostra padrão de Mo $100 \mu\text{g L}^{-1}$ foi feita após a execução do voltamograma do branco.

3.11. Otimização da resposta voltamétrica

Ao se desenvolver uma metodologia eletroanalítica é de extrema importância fazer a otimização dos parâmetros que possam influenciar na resposta do eletrodo, buscando desta forma o maior sinal analítico do eletrodo. Deste modo foi realizado o estudo dos parâmetros descritos no item 3.7. disponibilizados pelo software VA Computrace 1.2 (METRODATA,

2005). Outros parâmetros como purga inicial, tempo de purga adicional e tempo de equilíbrio foram fixados em 600, 90 e 10 s respectivamente. O planejamento fatorial completo apresentou cinco fatores com dois níveis para cada fator.

3.12. Preparo das amostras

As amostras de solos e plantas utilizadas no experimento foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa. Estas estavam devidamente selecionadas, secas e trituradas.

3.12.1. Solos

O solo moído foi peneirado com malha de 1 mm (16 mesh). Pesou-se 0,25 g com precisão de 1 mg da amostra em béqueres de teflon. Foi utilizada a metodologia da digestão total de quatro ácidos (HNO_3 , HClO_4 , H_2SO_4 e HF) para efetuar a abertura da amostra, adicionou-se algumas gotas de água deionizada para umedecer a amostra. Foi realizado um pré-tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 30% V) para eliminação da matéria orgânica. Logo em seguida foi adicionado 5 mL de HNO_3 e aqueceu-se à elevação gradual da temperatura até 140 °C em bloco digestor.

A amostra foi digerida até restar cerca de 1 mL de ácido, onde foram acrescentados 3 mL de HF, 1 mL de HClO_4 e 1 mL de H_2SO_4 , deixando-se aquecer no banho de areia até que a cor da suspensão ficasse clara. Depois que o volume baixou apresentando suspensão clara adicionou-se 1 mL de HClO_4 . Foi feito o aquecimento em bloco digestor até a digestão total. Recomenda-se quando a amostra não estiver completamente dissolvida que se acrescente 3 mL de HF e proceda o aquecimento, repetindo este processo até que haja digestão total. Após digestão total deixou-se evaporar todo o HF restando no béquer um gel de cor amarela. Foi adicionado 5 mL de HNO_3 (1:1) e aqueceu-se até a solubilização do gel. Em seguida, os extratos foram retirados do banho de areia e resfriados a temperatura ambiente. Estando a amostra completamente dissolvida, lavou-se com cuidado o béquer utilizando água deionizada vertendo todo o líquido através do filtro rápido (membrana celulósica com 0,45 μm de diâmetro). Completou-se o volume para 50 mL e reservou-se o extrato para leitura.

A digestão de cada amostra foi realizada em triplicata e um branco foi preparado a partir dos respectivos volumes dos ácidos utilizados.

3.12.2. Vegetais

A combinação de um ácido oxidante e outro agente oxidante tem sido bastante utilizada na abertura de amostras vegetais, pois o agente oxidante potencializa o poder de oxidação do ácido. Em geral, se emprega o peróxido de hidrogênio como oxidante devido ao seu alto poder de oxidação e ao seu alto grau de pureza, resultando em baixos valores das amostras em branco, além disso, o produto final da sua decomposição é a água.

Para a abertura da amostra pesou-se 0,25 g em béqueres de teflon com precisão de 1 mg da amostra de vegetal triturado, peneirado com malha de 1 mm (16 mesh). Adicionou-se algumas gotas de água deionizada para umedecer a amostra e em seguida adicionou-se 3 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 30% V) e 5 mL de HNO_3 . Aqueceu-se com elevação gradual da temperatura até a fervura, mantendo-se no bloco digestor até que a cor da suspensão ficasse clara. Recomenda-se quando a amostra não estiver completamente dissolvida que se acrescente 3 mL de HNO_3 e proceda o aquecimento, repetindo este processo até que haja digestão total. Os extratos foram retirados do banho de areia e resfriados a temperatura ambiente. Estando completamente dissolvidas, lavou-se com cuidado o béquer utilizando água deionizada, vertendo todo o líquido através do filtro rápido de membrana celulósica com 0,45 μm de diâmetro. Completou-se o volume para 50 mL e reservou o extrato para leitura. A digestão das amostras foi realizada em triplicata e um branco foi preparado a partir dos respectivos volumes dos reagentes utilizados.

3.13. Aplicação da técnica de recuperação

As amostras foram validadas utilizando medidas obtidas com espectrometria de emissão atômica, com fonte de plasma induzido (ICP-AES) e com determinações conhecidas como “teste de recuperação” utilizando-se o teste de dopagem das amostras com 2,0 ppb de Mo(VI) e verificando o sinal recuperado para cada uma. Estas determinações consistem no enriquecimento da amostra com uma quantidade conhecida do padrão utilizado. O resultado obtido para a concentração do analito com a

amostra enriquecida foi subtraído do resultado obtido da amostra natural sem o enriquecimento. A diferença deve resultar no valor da concentração do padrão adicionado para o enriquecimento da amostra dentro do erro experimental. O resultado é expresso em termos de porcentagem de recuperação do padrão adicionado (SKOOG et al., 1992).

Nestas condições, obtiveram-se os resultados exibidos na tabela 18, evidenciando que o método voltamétrico possibilita a determinação de molibdênio nas amostras de solos e plantas, visto que não se utilizou nenhuma etapa de separação ou pré-concentração das amostras, e que bons resultados foram obtidos nas determinações diretas, sendo que estes são compatíveis com os resultados do ICP-AES e com os resultados dos testes de recuperação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização da concentração de oxina e o eletrólito para a detecção de Mo(VI)

4.1.1. Estudo dos parâmetros voltamétricos

No estudo do planejamento como não se conhece as variáveis que afetam significativamente a resposta e para não excluir de forma arbitrária fatores potencialmente importantes é conveniente incluir neste estágio o maior número possível de variáveis (MASSART et al., 1978) as quais foram relatadas no item 3.7.

4.1.2. Planejamento fatorial – escolha dos fatores

Para se evitar um número excessivo de ensaios foram realizados estudos utilizando o planejamento fatorial fracionário saturado $2^{\frac{8-4}{IV}}$ de resolução IV, ao invés do fatorial completo. Os fatores escolhidos e os respectivos níveis estão expostos na tabela 2, enquanto que na tabela 3 encontram-se respostas para a SWV.

Tabela 2. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial fracionário $2^{\frac{8-4}{IV}}$ de resolução IV.

Símbolo	Fatores	Níveis	
		-	+
1 AM	Amplitude (mV)	50	150
2 FR	Frequência (Hz)	25	150
3 IV	Incremento de varredura (V)	0,0001	0,01
4 TG	Tamanho da gota (mm ²)	0,2	0,6
5 TD	Tempo de deposição (s)	30	180
6 CK	Concentração de KNO ₃ (mol L ⁻¹)	0,5	3,0
7 ST	Solução tampão (mol L ⁻¹)	0,5	3,0
8 CO	Concentração de oxina (mol L ⁻¹)	0,005	0,1

Tabela 3. Planejamento fatorial fracionário saturado $2^{\frac{8-4}{IV}}$, definida por I = 1248, I = 1358, I = 2368 e I = 1237.

Experimento	Fatores								Resposta X nA
	AM	FR	IV	TG	TD	CK	ST	CO	
01	-	-	-	+	+	+	-	+	155
02	+	-	-	-	-	+	+	+	262
03	-	+	-	-	+	-	+	+	107
04	+	+	-	+	-	-	-	+	119
05	-	-	+	+	-	-	+	+	679
06	+	-	+	-	+	-	-	+	381
07	-	+	+	-	-	+	-	+	392
08	+	+	+	+	+	+	+	+	286
09	+	+	+	-	-	-	+	-	366
10	-	+	+	+	+	-	-	-	472
11	+	-	+	+	-	+	-	-	498
12	-	-	+	-	+	+	+	-	523
13	+	+	-	-	+	+	-	-	307
14	-	+	-	+	-	+	+	-	208
15	+	-	-	+	+	-	+	-	259
16	-	-	-	-	-	-	-	-	209

Os efeitos das variáveis foram obtidos utilizando o *software* Statistica 7.0[®]. Os resultados estão expostos na tabela 4.

Tabela 4. Efeitos e erros para os fatores estudados no planejamento fatorial fracionário saturado $2^{\frac{8-4}{IV}}$ para a SWV.

Estimativa dos efeitos \pm erro padrão	Relação t(23)	
Média	323,72 \pm 15,06	21,50
Principais		
AM	-28,94 \pm 30,11	-0,96
FR	-88,44 \pm 30,11	-2,94
IV	246,81 \pm 30,11	8,19
TG	15,81 \pm 30,11	0,52
TD	-25,19 \pm 30,11	-0,83
CK	5,06 \pm 30,11	0,17
ST	16,06 \pm 30,11	0,53
CO	-60,69 \pm 30,11	-2,01

Os efeitos destacados foram significativos pelo teste t. ($\alpha = 0,05$).

De acordo com os resultados dispostos na tabela 4, os efeitos principais FR e IV foram significativos. Os demais efeitos não foram significativos.

O efeito principal da solução tampão (ST) não se apresentou significativo, analisando-se isoladamente, a função do tampão é manter o pH ótimo constante e sua concentração nos níveis estudados por este

planejamento mostrou-se adequada. Além disso, os fatores (AM), (TD) e (CO) apresentaram maior valor nas respostas quando estudado em seu nível negativo.

Tendo em vista os resultados obtidos, o fator tamanho da gota (TG) foi fixado em seu valor médio $0,4 \text{ mm}^2$. O fator frequência (FR) foi fixado em um valor baixo, portanto, 50 Hz, devido a sua influência negativa sobre a simetria dos picos para o valor de 150 Hz. O fator amplitude (AM) foi fixado em um valor baixo, 100 mV, devido a sua influência negativa sobre a simetria dos picos para o valor de 150 mV, e o tempo de deposição (TD) foi também fixado no valor da média 90 s. Os valores otimizados estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros otimizados utilizados na composição do eletrólito de suporte.

Parâmetro operacional		Intervalo estudado	Valor otimizado
AM	Amplitude	50 a 150 m V	100 mV
FR	Freqüência	25 a 150 Hz	50 Hz
IV	Incremento de varredura	0,001 a 0,01 V	0,001 V
TG	Tamanho da gota (mm^2)	0,2 a 0,6	0,4 mm^2
TD	Tempo de deposição (s)	30 a 180	90 s
CK	Concentração de KNO_3	0,5 a 3,0 mol L^{-1}	1,0 mol L^{-1}
ST	Solução tampão HOAc/Acet.	0,5 a 2,0 mol L^{-1}	1,0 mol L^{-1}
CO	Concentração de oxina	0,005 a 0,1 mol L^{-1}	0,05 mol L^{-1}

Entre os fatores da tabela 5 foram escolhidos: (CK) concentração de KNO_3 , (ST) solução tampão HOAc/Acet. e (CO) concentração de oxina, dispostos em um novo planejamento fatorial completo com três variáveis (Tabela 7), tendo como objetivo otimizar o eletrólito de suporte. A tabela 6 mostra os fatores escolhidos e seus respectivos níveis: concentração KNO_3 , solução tampão e concentração da oxina, a fim de mais especificamente avaliar a ação do eletrólito versos complexante.

Tabela 6. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial completo.

Símbolo	Fatores	Níveis	
		-	+
CK	Concentração de KNO ₃ mol L ⁻¹	0,5	3,0
ST	Solução tampão mol L ⁻¹	0,05	1,0
CO	Concentração da oxina mol L ⁻¹	0,005	0,050

Tabela 7. Coeficientes de contrastes para um fatorial 2³.

Ensaio	Fatores								Resposta nA
	CK	ST	CO	CKxST	CKxCO	STxCO	CKxSTxCO	Média	
01	-	-	-	+	+	+	-	+	139,6
02	+	-	-	-	-	+	+	+	92,75
03	-	+	-	-	+	-	+	+	47,14
04	+	+	-	+	-	-	-	+	70,80
05	-	-	+	+	-	-	+	+	50,47
06	+	-	+	-	+	-	-	+	22,70
07	-	+	+	-	-	+	-	+	244,8
08	+	+	+	+	+	+	+	+	279,5

Os efeitos das variáveis foram obtidos utilizando o *software* Statistica 7.0[®]. Os resultados foram expostos na tabela 8.

Tabela 8. Efeitos e erros para os fatores estudados no planejamento fatorial completo 2³ para a SWV.

Estimativa dos efeitos ± erro puro	Relação t(16)
Média	118,45 ± 2,76 42,91
Principais	
CK	-4,07 ± 5,52 0,74
ST	84,21 ± 5,52 15,25
CO	61,79 ± 5,52 11,19
Interação 2 ^a ordem	
CK x ST	33,23 ± 5,52 6,02
CK x CO	7,52 ± 5,52 1,36
ST x CO	141,39 ± 5,52 25,61

Os efeitos destacados foram significativos pelo teste t.

De acordo com os resultados dispostos na tabela 8, os efeitos principais (ST) e (CO) foram significativos positivamente e o efeito (CK) não foi significativo no efeito principal; porém, os fatores escolhidos interferem diretamente na resposta voltamétrica devido as interações nos níveis estudados.

Tendo em vista os resultados obtidos, o fator concentração de KNO_3 (CK) foi fixado em $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. O fator solução tampão (ST) foi fixado em um valor intermediário, portanto, $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e o fator concentração da oxina (CO) foi fixado em um valor baixo $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Os valores otimizados estão dispostos na tabela 9.

Tabela 9. Otimização dos parâmetros utilizados na composição do eletrólito de suporte.

Símbolo	Fatores	Intervalo estudado	Valor otimizado
CK	Concentração de KNO_3	$0,5$ a $3,0 \text{ mol L}^{-1}$	$2,0 \text{ mol L}^{-1}$
ST	Solução Tampão HOAc/Acet	$0,05$ a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$	$0,5 \text{ mol L}^{-1}$
CO	Concentração de oxina	$0,005$ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	$0,01 \text{ mol L}^{-1}$

Com os valores otimizados da tabela 9 realizou-se um planejamento fatorial completo com cinco variáveis (Tabela 11), tendo com objetivo a realização de uma triagem dos fatores que apresentam influência sobre a resposta voltamétrica, que será otimizada. Os fatores escolhidos e os respectivos níveis estão expostos na tabela 10.

Tabela 10. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial completo 2^5 .

Símbolo	Fatores	nível -	nível +
IV	Incremento de varredura (V)	0,0005	0,005
AM	Amplitude (mV)	75	150
FR	Frequência (Hz)	50	125
TD	Tempo de deposição (s)	30	180
TG	Tamanho da gota (mm^2)	2,0	6,0

Tabela 11. Planejamento fatorial completo e respectivas respostas instrumentais para a SWV.

Experimento	Fatores					Resp. nA
	IV	AM	FR	TD	TG	
01	-	-	-	-	-	167,167
02	+	-	-	-	-	220,867
03	-	+	-	-	-	178,767
04	+	+	-	-	-	454,733
05	-	-	+	-	-	179,200
06	+	-	+	-	-	33,053
07	-	+	+	-	-	280,600
08	+	+	+	-	-	450,467
09	-	-	-	+	-	226,067
10	+	-	-	+	-	233,367
11	-	+	-	+	-	122,200
12	+	+	-	+	-	752,833
13	-	-	+	+	-	480,000
14	+	-	+	+	-	142,400
15	-	+	+	+	-	588,767
16	+	+	+	+	-	1109,00
17	-	-	-	-	+	220,267
18	+	-	-	-	+	254,200
19	-	+	-	-	+	177,267
20	+	+	-	-	+	652,700
21	-	-	+	-	+	309,812
22	+	-	+	-	+	72,867
23	-	+	+	-	+	559,867
24	+	+	+	-	+	911,433
25	-	-	-	+	+	331,167
26	+	-	-	+	+	219,267
27	-	+	-	+	+	269,733
28	+	+	-	+	+	1046,33
29	-	-	+	+	+	450,867
30	+	-	+	+	+	197,000
31	-	+	+	+	+	772,367
32	+	+	+	+	+	1146,00

Os dados referentes à tabela 11 foram processados pelo *software* Statistica 7.0[®], onde se realizaram os cálculos para obter os efeitos das variáveis.

De acordo com os resultados dispostos na tabela 12, todos os efeitos principais foram significativos mostrando que os fatores escolhidos interferem positivamente na resposta voltamétrica nos níveis estudados.

Tabela 12. Efeitos e erros para os fatores estudados no planejamento fatorial para a SWV.

Estimativa dos efeitos \pm erro padrão	Relação t(70)	
Média	412,83 \pm 5,08	81,22
Principais		
IV	161,39 \pm 10,16	15,87
AM	358,46 \pm 10,16	35,26
FR	134,80 \pm 10,16	13,26
TD	185,25 \pm 10,16	18,22
TG	123,23 \pm 10,16	12,12
Interação 2ª ordem		
IVxAM	285,34 \pm 10,16	28,07
IVxFR	-106,31 \pm 10,16	-10,46
IVxTD	39,23 \pm 10,16	3,86
IVxTG	14,65 \pm 10,16	1,44
AMxFR	135,69 \pm 10,16	13,35
AMxTD	82,42 \pm 10,16	8,11
AMxTG	76,56 \pm 10,16	7,53
FRxTD	75,88 \pm 10,16	7,46
FRxTG	21,36 \pm 10,16	2,10
TDxTG	-25,97 \pm 10,16	-2,55
Interação 3ª ordem		
IVxAMxFR	13,95 \pm 10,16	1,31
IVxAMxTD	89,30 \pm 10,16	8,78
IVxAMxTG	32,91 \pm 10,16	3,23
IVxFRxTD	-18,72 \pm 10,16	-1,84
IVxFRxTG	-11,16 \pm 10,16	-1,09
IVxTDxTG	-19,16 \pm 10,16	-1,88
AMxFRxTD	9,88 \pm 10,16	0,97
AMxFRxTG	19,05 \pm 10,16	1,87
AMxTDxTG	-8,41 \pm 10,16	-0,82
FRxTDxTG	-57,11 \pm 10,16	-5,62
Interação 4ª ordem		
IVxAMxFRxTD	-16,71 \pm 10,16	-1,66
IVxAMxFRxTG	-27,64 \pm 10,16	-2,80
IVxAMxTDxTG	-28,56 \pm 10,16	-2,45
IVxFRxTDxTG	-0,05 \pm 10,16	-0,01
AMxFRxTDxTG	-38,41 \pm 10,16	-3,91
Interação 5ª ordem		
IVxAMxFRxTDxTG	-34,30 \pm 10,16	-3,32

Os efeitos destacados foram significativos pelo teste t.

A figura 14 mostra a representação gráfica dos efeitos de interação de segunda ordem significativos destacados na tabela 12. A interação (IVxAM) indica que ao variar os níveis do fator amplitude (AM) para o maior valor dentro do nível (-) negativo do fator incremento de voltagem (IV), a média das respostas é mínima e que a mesma variação dos níveis de (AM) dentro

do nível positivo de (IV) ocorre um aumento significativo na resposta. Este aumento na resposta, provavelmente acontece devido ao aumento no valor do pulso aplicado; conseqüentemente contribui para a polarização brusca no eletrodo e uma troca efetiva de elétrons no complexo Mo-oxina. Enquanto que a interação (IVxFR) indica que ao variar os níveis do fator frequência (FR) para o maior valor dentro do nível (+) positivo do fator incremento de voltagem (IV) ocorre um aumento na resposta de corrente, com a conseqüente melhoria na sensibilidade da análise.

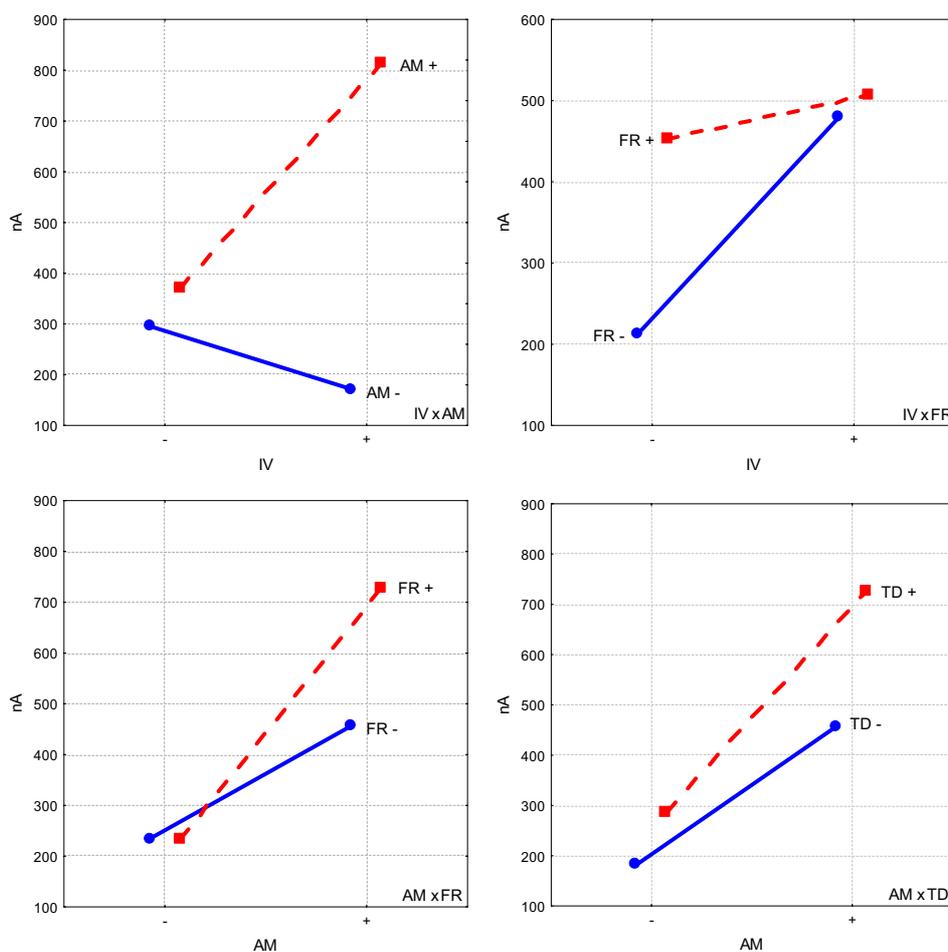


Figura 14. Gráficos de Efeitos de Interação, representação gráfica dos efeitos de segunda ordem.

A interação (AMxFR) indica que a variação da frequência (FR) no nível (+) positivo do fator amplitude (AM) apresenta uma resposta melhor do que no nível (-) negativo, enquanto que a interação (AMxTD) indica que a variação do tempo de deposição (TD) no nível (+) positivo do fator amplitude (AM) apresenta uma média maior do que no nível (-) negativo. Este aumento

na resposta provavelmente deve-se ao aumento do tempo de deposição do complexo Mo-oxina na superfície (área) da gota.

A amplitude (AM) foi o fator estatisticamente mais importante, tanto no efeito principal, onde apresentou o maior valor, como nas interações de segunda ordem.

As interações negativas IVxFR, IVxAMxFRxTG, IVxAMxTDxTG, e IVxAMxFRxTDxTG destacam a incompatibilidade do aumento do incremento de varredura (IV) com o aumento na polarização em uma gota com grande área, nos níveis estudados.

Portanto o fator tamanho da gota (TG) foi fixado em seu valor máximo e o fator incremento de varredura (IV) no seu nível mais baixo. Os fatores frequência (FR), tempo de deposição (TD) e amplitude (AM) foram fixados em seus valores médios: 80 Hz, 80 s e 110 mV, respectivamente, sendo estes os fatores escolhidos para a metodologia de superfície de resposta.

4.2. Otimização da resposta voltamétrica

4.2.1. Metodologia para a superfície de resposta

Foi utilizado o planejamento composto central (CCD) para estudar como a determinação dos íons Mo(VI) depende dos três fatores mais significativos no planejamento anterior: amplitude (AM), frequência (FR) e tempo de deposição (TD).

Para a elaboração do planejamento CCD, os níveis -1 e +1 foram os mesmos utilizados no planejamento fatorial, os outros níveis (Tabela 13) foram calculados a partir da equação 21:

$$Z = \frac{X_i - \bar{X}}{\frac{\Delta X}{2}} \quad (21)$$

sendo Z o valor codificado do planejamento composto central (CCD), X_i representa o valor procurado para o nível, \bar{X} o valor médio entre os níveis +1 e -1, que é o próprio valor para o nível 0 e ΔX é o valor da diferença entre o nível +1 e -1.

A tabela 14 mostra o planejamento composto central (com $\alpha = 1,682$) construído para os três fatores nas condições descritas.

Tabela 13. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento CCD para a SWV.

Fatores	Níveis				
	-1,682	-1	0	+1	+1,68
A (mV)	76	90	110	130	144
F (Hz)	46	60	80	100	114
TD (s)	63	70	80	90	97

Tabela 14. Resultado do Planejamento CCD com $k = 3$.

Ensaio	A (X_1)	F (X_2)	TD(X_3)	A (mV)	F (Hz)	TD (s)	Resposta nA
01	-1	-1	-1	90	60	63	176,52
02	1	-1	-1	130	60	63	409,38
03	-1	1	-1	90	100	63	296,85
04	1	1	-1	130	100	63	585,05
05	-1	-1	1	90	60	90	301,67
06	1	-1	1	130	60	90	504,06
07	-1	1	1	90	100	90	291,89
08	1	1	1	130	100	90	396,45
09	-1,682	0	0	76	80	80	171,51
10	1,682	0	0	144	80	80	525,12
11	0	-1,682	0	110	46	80	355,28
12	0	1,682	0	110	114	80	490,25
13	0	0	-1,682	110	80	63	381,49
14	0	0	1,682	110	80	97	445,69
15	0	0	0	110	80	80	495,57
16	0	0	0	110	80	80	511,57
17	0	0	0	110	80	80	535,43
18	0	0	0	110	80	80	519,73

Os coeficientes do modelo (Tabela 15) e seus erros foram obtidos por planilhas eletrônicas da Microsoft® Excel 2003 (TEÓFILO et al. 2006).

A tabela 16 mostra os resultados obtidos da análise de variância (ANOVA). A regressão foi significativa, enquanto a falta de ajuste não, o que garante um modelo de segunda ordem bem ajustado para o planejamento proposto.

Tabela 15. Coeficientes e erro puro para o modelo da superfície de resposta.

Símbolo	Coeficientes \pm Erro*	Relação t(3)	**t ^{tab}
b ₀	516,412 \pm 8,293	62,270	3,18
AM	104,170 \pm 4,494	23,177	
FR	29,698 \pm 4,494	6,608	
TD	9,829 \pm 4,494	2,187	
AMxAM	-62,879 \pm 4,669	-13,466	
FRxFR	-36,563 \pm 4,669	-7,83	
TDxTD	-39,806 \pm 4,669	-8,525	
AMxFR	-5,311 \pm 5,872	-0,904	
AMxTD	-26,763 \pm 5,872	-4,557	
FRxTD	-51,676 \pm 5,872	-8,799	

** Os coeficientes em destaque foram significativos pelo teste t.

*t^{tab} com 3 graus de liberdade e 5% de probabilidade.

Tabela 16. ANOVA do planejamento CCD.

	SQ	GL	QM	Fcalc.	P
Regressão*	253122	9	28125	34,062	2E-05
Resíduos	6605,46	8	825,68		
Falta de ajuste	5777,74	5	1155,5	4,1882	0,1340
Erro puro	827,725	3	275,91		
Total	259728	17			
% da variância explicada			97,46		
% Máxima da variância			99,68		

*Coeficientes significativos.

Uma indicação gráfica da qualidade do modelo pode ser visualizada nas figuras 15A e 15B.

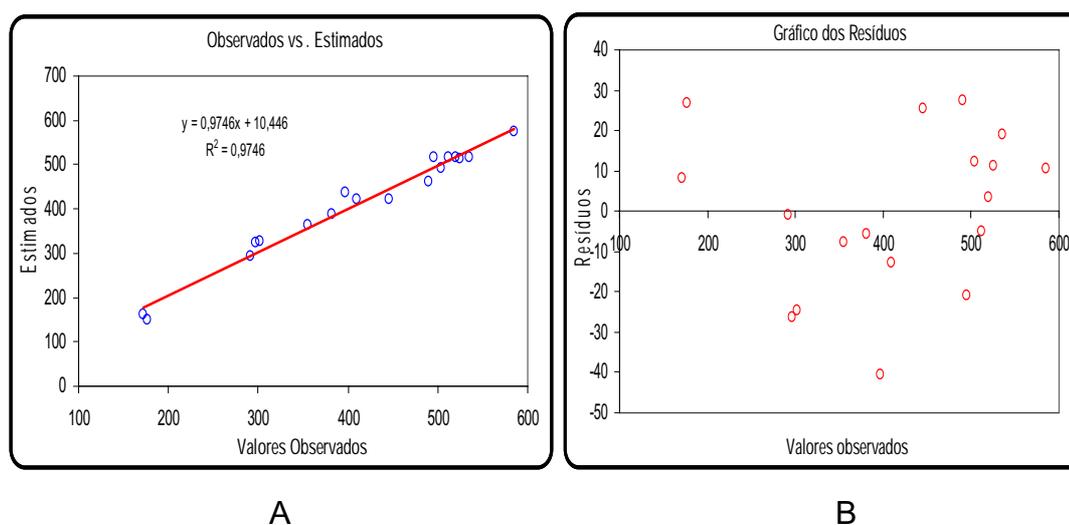


Figura 15. (A) Gráficos de valores observados vs. valores estimados. (B) Gráfico dos resíduos.

A equação do modelo ajustada para os coeficientes significativos e seus respectivos erros é apresentada pela equação z.

$$Z = 516,41 \pm 8,293 + 104,17 \pm 4,494 (AM) + 29,70 \pm 4,494 (FR) - 62,88 \pm 4,669 (AM)^2 - 36,56 \pm 4,669 (FR)^2 - 39,81 \pm 4,669 (TD)^2 - 26,76 \pm 5,872 (AM \times TD) - 51,67 \pm 5,872 (FR \times TD)$$

De acordo com o modelo obtido para a voltametria de onda quadrada, o fator amplitude e frequência se destacam como os dois termos de maior influência sobre a resposta voltamétrica. O fator tempo de deposição não foi significativo, entretanto, duas de suas interações com dois fatores, AMxTD e FRxTD são significativas. A superfície de resposta não pode ser obtida diretamente do modelo, neste caso fixou-se um dos fatores independentes e outros dois valores, estes fixados de acordo com as melhores respostas correspondentes ao nível estudado.

4.2.1.1. Superfície de resposta

Os fatores significativos para a composição dos parâmetros voltamétricos foram: a amplitude (AM), com um coeficiente quadrático negativo e um coeficiente linear positivo, isto é, quanto maior a amplitude, melhor a resposta obtida dentro do intervalo estudado e a frequência (FR), que apresentou efeito positivo para o coeficiente linear e efeito negativo para o coeficiente quadrático, isto é, quanto maior a frequência, melhor a resposta obtida dentro do intervalo estudado.

O fator tempo de deposição (TD) é significativo somente para o coeficiente quadrático negativo. As interações entre os fatores presentes neste planejamento se apresentaram significativas, exceto (AMxFR), todas as interações que apresentaram coeficientes nos níveis negativo, sendo todos os parâmetros voltamétricos com um intervalo de confiança de 95%.

As melhores respostas foram obtidas ao fixar o valor da variável (TD) no nível 0 (tempo de deposição = 80 s). O modelo construído para determinação voltamétrica do Mo(VI) é representado pela equação ip .

$$ip = 516,4 + 104,17(AM) - 62,8(AM)^2 + 29,7(FR) - 36,56(FR)^2 - 5,3(AM \times FR)$$

Este modelo mostra que a amplitude (AM) e a frequência (FR) apresentam efeitos significativos para a resposta da corrente e o termo cruzado (AMxFR) mostra que há interação entre amplitude e frequência na resposta da corrente obtida nos ensaios.

A superfície de resposta gerada pela equação ip , representadas nas figuras 16 e 17, mostra que a interseção do nível 0 (frequência = 80 Hz) e o nível +1,682 (amplitude = 144 mV) apresentaram um melhor valor da corrente voltamétrica para a determinação do molibdênio.

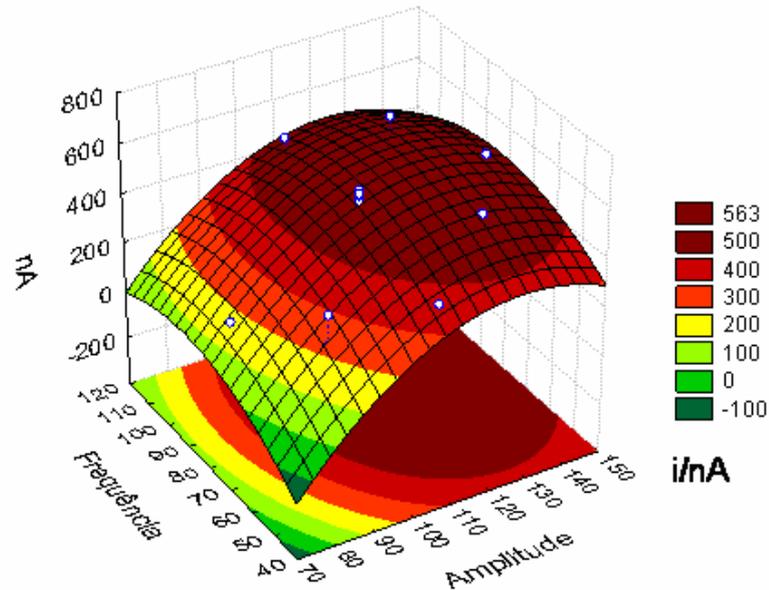


Figura 16. Superfície de resposta com a variável tempo de deposição fixa no nível (0), 80 segundos. $X_1 = AM$ (V), $X_2 = FR$ (Hz) em termos de variáveis codificadas. A legenda mostra os valores da corrente em nA, obtidos no ensaio.

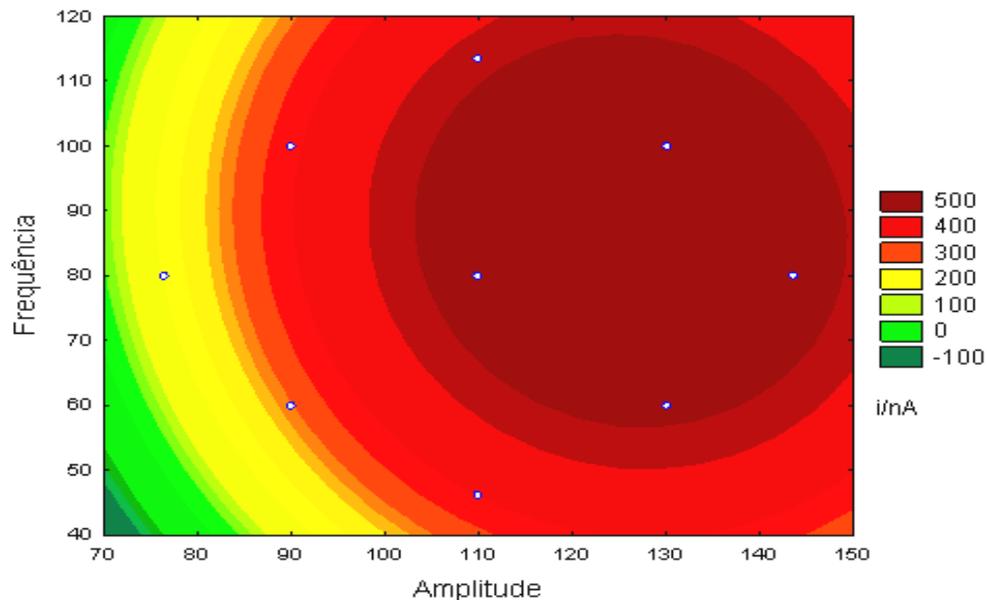


Figura 17. Superfície de resposta com a variável tempo de deposição fixa no nível (0), 80 segundos. Amplitude = AM (V), frequência = FR (Hz) em termos de variáveis codificadas. A legenda mostra os valores da corrente em nA, obtidos no ensaio.

Os resultados da superfície de resposta mostram que os fatores utilizados no planejamento são potencialmente capazes de aumentar a resposta voltamétrica. Os melhores resultados encontrados no fator amplitude variaram entre os níveis (0) e (1). No fator tempo de deposição os melhores resultados encontrados também variaram entre os níveis (0) e (1). Nos níveis mais baixos e nos níveis máximos os resultados não foram satisfatórios devido aos valores das respostas serem baixos.

Para os modelos estudados, quando ajustados no nível mais alto dos valores codificados na superfície de resposta, a maior corrente prevista foi praticamente a mesma, mostrando que o modelo foi bem ajustado e que os parâmetros não se interagem neste nível de estudo.

Os parâmetros otimizados estão dispostos na tabela 17, os quais apresentam as condições de trabalho em que foram executados, além do erro relativo referente às correntes estimadas e observadas nas mesmas condições estabelecidas. Tal erro mostra o quanto o modelo matemático foi bem ajustado ao sistema voltamétrico e o quanto foi valiosa a contribuição deste modelo para o aumento da corrente para uma mesma concentração de molibdênio na célula voltamétrica.

Tabela 17. Parâmetros otimizados para a análise do molibdênio por voltametria de redissolução adsortiva com onda quadrada

Parâmetros	Valores ótimos	Corrente estimada*
Potencial Inicial	-0,2 V	523,89 nA
Potencial Final	-0,75 V	
Incremento de voltagem	0,025 V	
Amplitude	110 mV	Corrente observada*
Freqüência	100 Hz	525,72 nA
Velocidade de varredura	1,0 mVs ⁻¹	
Tamanho da gota	0,60 mm ²	
Tempo de deposição	80 s	*Erro relativo: +0,34 %

4.3. Aplicabilidade da técnica otimizada

4.3.1. Linearidade

A capacidade do método para fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de uma faixa de aplicação (RIBANI, 2004) foi estabelecida para a determinação do molibdênio utilizando a metodologia proposta. A curva analítica foi construída

adicionando-se alíquotas de 100 μL da solução padrão de molibdênio 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 10 mL de água deionizada acidificada com HNO_3 0,01 mol L^{-1} (pH 2,0), 1,3 mL de solução tampão ácido acético/acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$) 0,5 mol L^{-1} (pH 4,65), 2,0 mL de KNO_3 2,0 mol L^{-1} e 75 μL do complexante 8-hidroxiquinolina (oxina). A figura 17 mostra os voltamogramas de onda quadrada e curva analítica. A equação da reta obtida foi $\Delta i(\mu\text{A}) = 1,82 + 1,34 \times 10^{-5} \cdot [\text{Mo(VI)}]$, com um coeficiente de correlação de 0,997. O potencial de meia onda para o molibdênio utilizando os parâmetros otimizados para a SWV (Tabela 17) foi de -0,54 Volt.

A figura 18 mostra que as correntes de pico em função da concentração apresentaram uma boa linearidade no intervalo de 1,0 até 6,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Mo(VI) que é demonstrado pelo valor de R^2 igual a 0,997.

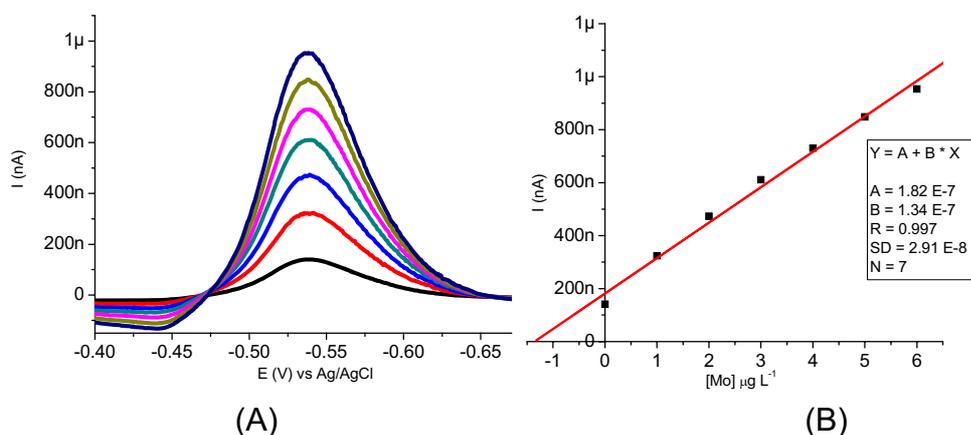


Figura 18. (A) Voltamograma referente ao estudo do comportamento da corrente para avaliação da faixa de trabalho. (B) Curva analítica do comportamento da resposta voltamétrica em função da variação da concentração do molibdênio por SWV, na faixa de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 6,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.3.2. Repetitividade

A repetitividade do método de determinação de molibdênio foi avaliada realizando-se sete leituras em um mesmo dia, para amostras de água deionizada fortificada com Mo(VI) a uma concentração de 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os cálculos da estimativa do desvio padrão relativo obedeceram às recomendações do INMETRO 2003 (RIBANI, 2004). Verificou-se nestas condições a repetibilidade do sinal analítico na concentração de 1,35 $\mu\text{g L}^{-1}$ na célula polarográfica.

Efetou-se sete determinações para este valor, obtendo-se como resultado a seguinte média: $1,335 \pm 0,008 \mu\text{g L}^{-1}$, com um RSD de 0,60%. Este resultado indicou uma boa repetibilidade e um baixo desvio entre uma determinação e outra, sendo portanto, confiáveis.

4.3.3. Limite de detecção

O desvio padrão do branco do método voltamétrico de determinação de molibdênio foi avaliado realizando-se dez leituras em um mesmo dia, sob as mesmas condições de análise para amostras livres de qualquer resíduo de molibdênio. Os cálculos da estimativa do desvio padrão relativo obedeceram às recomendações do INMETRO 2003 (RIBANI, 2004).

Nas condições da faixa linear estimou-se o limite de detecção usando o critério $LD=3S_B/b$ para o método proposto em $20,0 \text{ ng L}^{-1}$ (20,0 ppt), considerando-se o valor de três vezes o desvio padrão da medida de uma amostra “branco”, o limite de quantificação $LQ=10S_B/b$ obtido experimentalmente foi de em 80,0 ppt na célula polarográfica. Estes resultados mostraram que o método proposto provou ter um baixo limite de detecção e quantificação, semelhante a outros métodos voltamétricos, estando apto a ser empregado em análises de rotina.

4.3.4. Precisão intermediária

A precisão intermediária indica o efeito de variações dentro do mesmo laboratório devido a diferentes circunstâncias como diferentes dias, equipamentos ou analistas. O objetivo da validação intermediária é verificar que num mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI, 2004). Foram preparadas três amostras de água deionizada fortificadas com as concentrações de Mo em $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$, $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Estas foram submetidas à técnica voltamétrica, em três dias diferentes. As amostras foram fortificadas nos respectivos dias de avaliação.

4.4. Estudo de interferentes para a análise de Mo(VI) em solos e plantas

As interferências causadas pela sobreposição de picos ou pela presença de determinada concentração de um elemento junto ao complexante limitam a aplicação do método a um grupo de matrizes.

Amostras de plantas apresentam valores de concentração na grandeza de ppb para Mo(VI) e os demais componentes como zinco, ferro, cobre e manganês (micronutrientes) são encontrados na ordem de ppm e os macronutrientes (nitrogênio, fosfato, enxofre, potássio, cálcio e magnésio) são encontrados em mmol kg^{-1} de material seco (AGRIFAX, 1998).

Uma varredura foi efetuada para melhor observar a interação dos íons e a interferência destes na determinação Mo(VI) nas condições otimizadas e descritas para o método (Figura 19). Verificou-se a interferência dos íons Fe^{3+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , WO_4^{2-} , VO^{3-} para uma concentração do metal de 500 - 1000 vezes superior a de Mo(VI) na célula polarográfica. Comparando o resultado do voltamograma observou-se que o método é muito mais resistente a ação dos interferentes, e que as razões dos (micronutrientes) $\text{mg kg}^{-1}/\text{Mo(VI)}$ e dos macronutrientes $\text{mmol kg}^{-1}/\text{Mo(VI)}$ não afetam a determinação de molibdênio na faixa de varredura estudada. Os experimentos de recuperação mostraram a potencialidade da técnica eletroanalítica frente aos possíveis interferentes contidos nas amostras de solo e plantas analisadas.

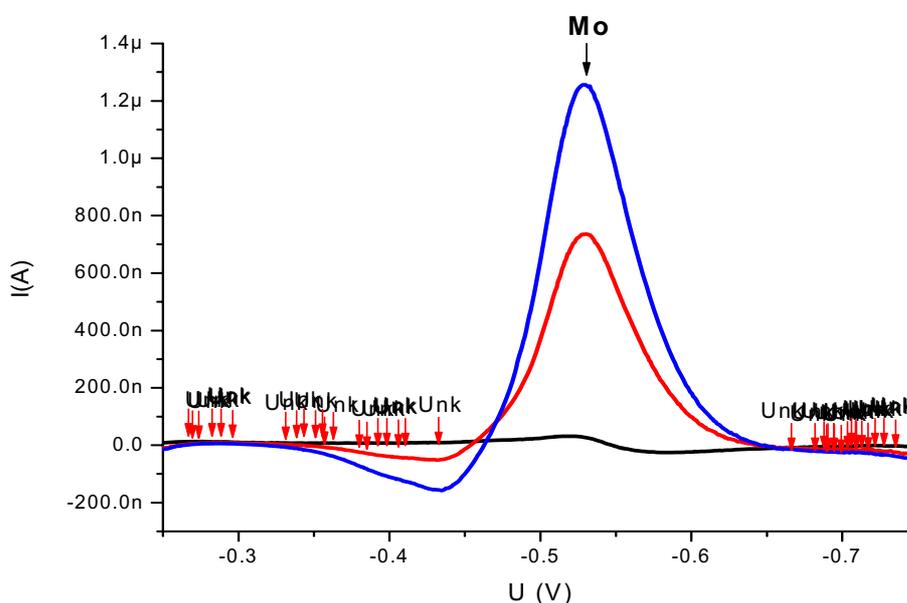


Figura 19. Efeito da adição de interferentes sobre a corrente de pico em $-0,54$ V. Mo(VI) $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$. SWCSV, ΔE : 125 mV; E_{dep} : 0,50 V; T_{dep} : 80 s; T_{eq} : 10 s e E_{v} : 20 mV s^{-1} . (Unk = desconhecido, interferentes)

Desta forma, optou-se pela aplicação e uso do método nas determinações de molibdênio em solos e plantas sem a preocupação da interferência de micronutrientes e macronutrientes e sem a necessidade do

uso de procedimento de pré-concentração ou separação. Foi também elaborado um protocolo analítico descrito no apêndice para a determinação de Mo(VI) em plantas e solos.

4.5. Aplicabilidade da técnica otimizada

4.5.1. Análise das amostras

Para a determinação de Mo(VI), uma alíquota da amostra de planta (100 μL) foi transferida para a cela voltamétrica contendo 10 mL de água deionizada acidificada com HNO_3 0,01 mol L^{-1} (pH 2,0), 1,3 mL de solução tampão ácido acético/acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$) 0,5 mol L^{-1} (pH 4,65), 2,0 mL de KNO_3 2,0 mol L^{-1} e 70 μL do complexante 8-hidroxiquinolina (oxina) 0,01 mol L^{-1} . Estes foram desoxigenados por borbulamento de gás nitrogênio ultra puro, por 10 minutos em uma primeira etapa e por 90 segundos nas sucessivas etapas, como anteriormente. Depois do tempo de equilíbrio (10 s) uma varredura catódica foi aplicada entre -0,2 e -0,7 volts. A adição de 100 μL de amostra padrão de Mo 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi feita após a execução do voltamograma do branco.

As amostras foram lidas e o voltamograma registrado (Figuras 20, 21 e 22) usando-se o método proposto com as condições descritas no item 4.2.1.1. (Tabela 17).

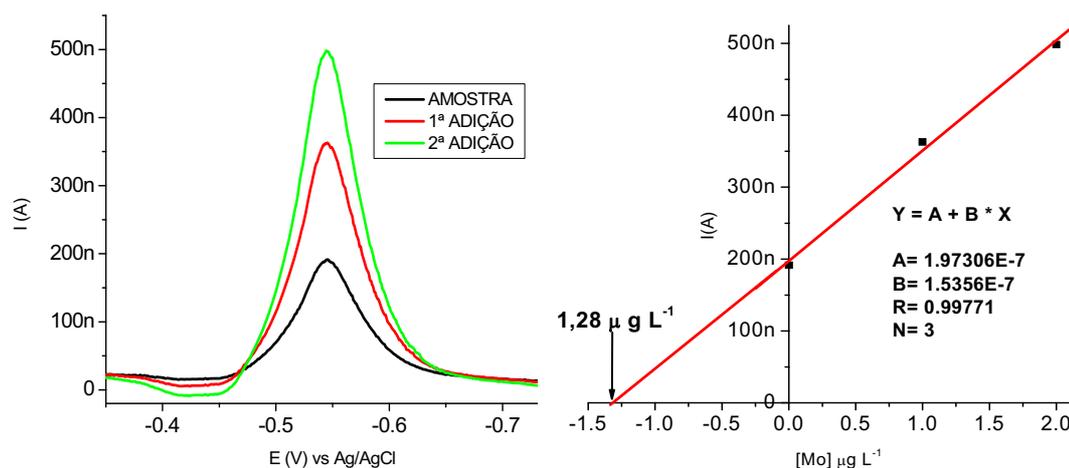


Figura 20. Análise por adição padrão da amostra referência (1) com detecção $1,28 \mu\text{g L}^{-1}$

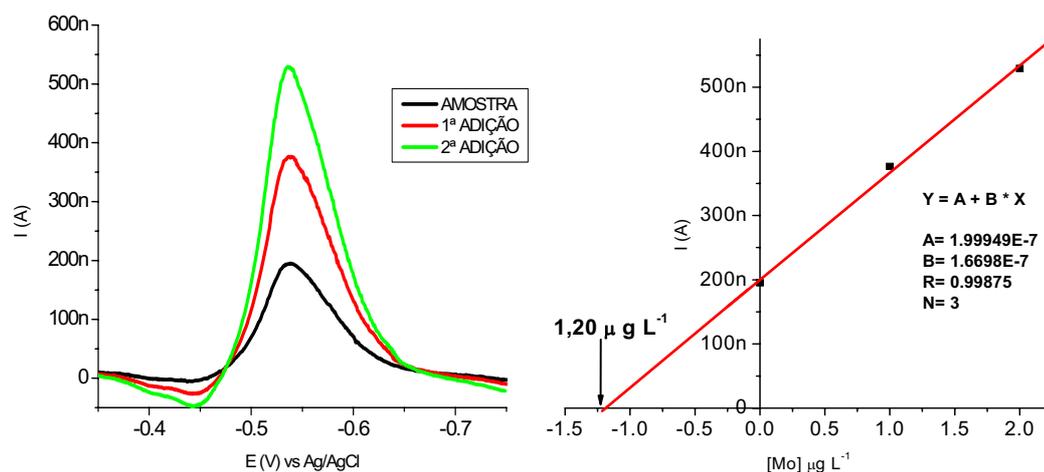


Figura 21. Análise por adição padrão da amostra referência (2) com detecção $1,20 \mu\text{g L}^{-1}$.

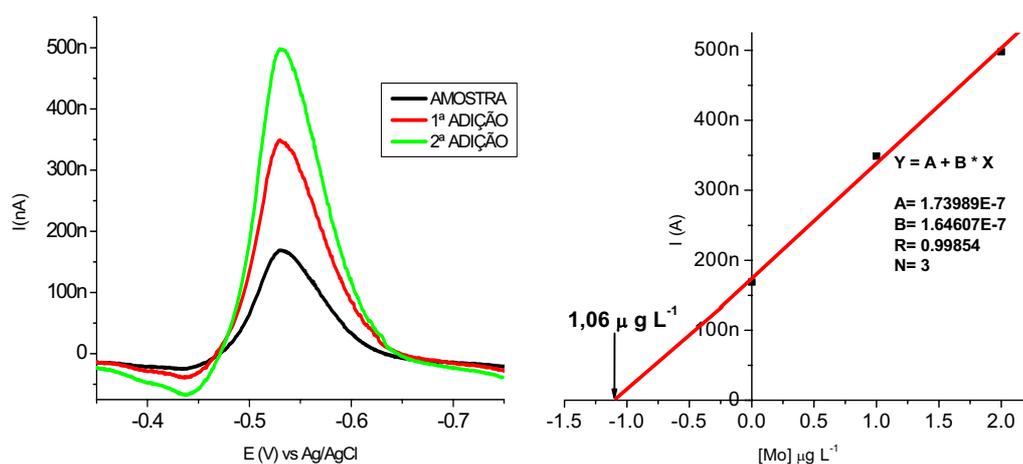


Figura 22. Análise por adição padrão da amostra referência (3) com de detecção $1,06 \mu\text{g L}^{-1}$.

A concentração prevista à amostra de água deionizada fortificada a ser encontrada na célula era de $1,25 \mu\text{g L}^{-1}$ e a concentração média encontrada foi de $1,18 \pm 0,093 \mu\text{g L}^{-1}$, portanto, uma recuperação de 94,4% com um erro relativo de -5,93%.

O método validado foi aplicado para detecção de Mo(VI) em 4 amostras de plantas, as quais foram numeradas de acordo com a ordem da abertura da amostra. O molibdênio foi encontrado apenas em três amostras da alíquota de 0,1 mL. Os resultados estão dispostos nas figuras 23, 24 e 25.

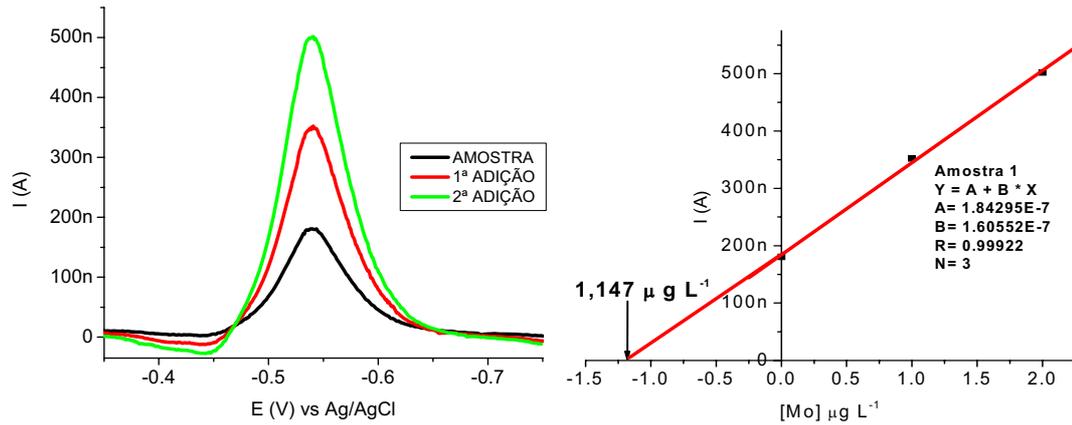


Figura 23. Análise por adição padrão da amostra (1) folha de banana.

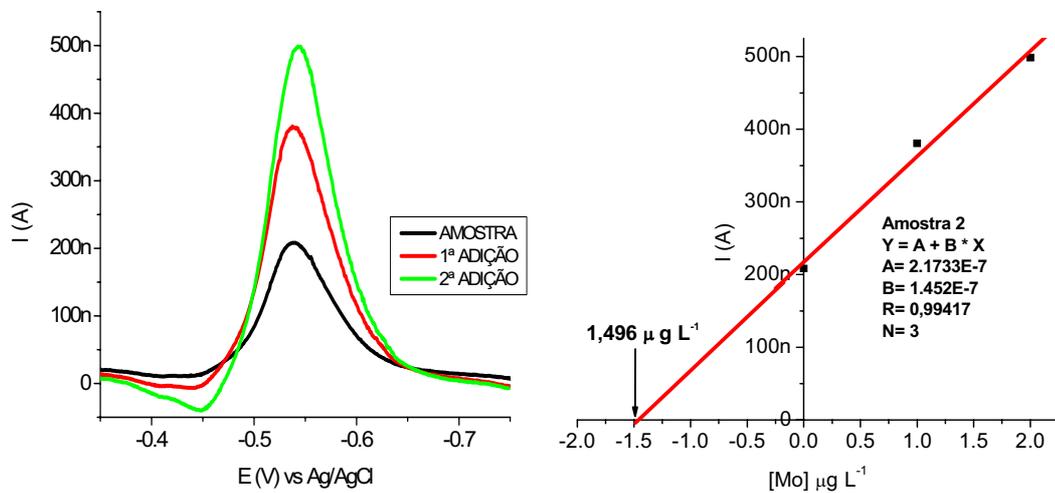


Figura 24. Análise por adição padrão da amostra (2) folha de café.

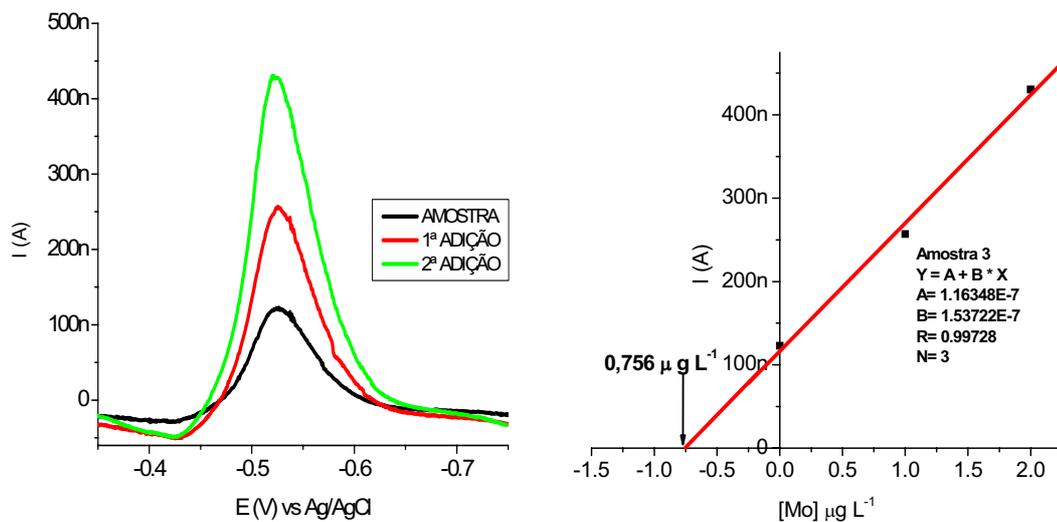


Figura 25. Análise por adição padrão da amostra (3) folha de pimentão.

Na amostra 4 (folha de cana) não foi encontrado o elemento molibdênio. As concentrações de Mo(VI) nas amostras 1, 2 e 3 são de $1,147 \mu\text{g L}^{-1}$, $1,496 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,756 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

O método validado foi aplicado para detecção de Mo(VI) em 4 amostras de solos, as quais foram numeradas de acordo com a ordem da abertura da amostra.

O molibdênio foi encontrado apenas em duas amostras da alíquota de 0,1 mL. Os resultados estão dispostos nas figuras 26 e 27.

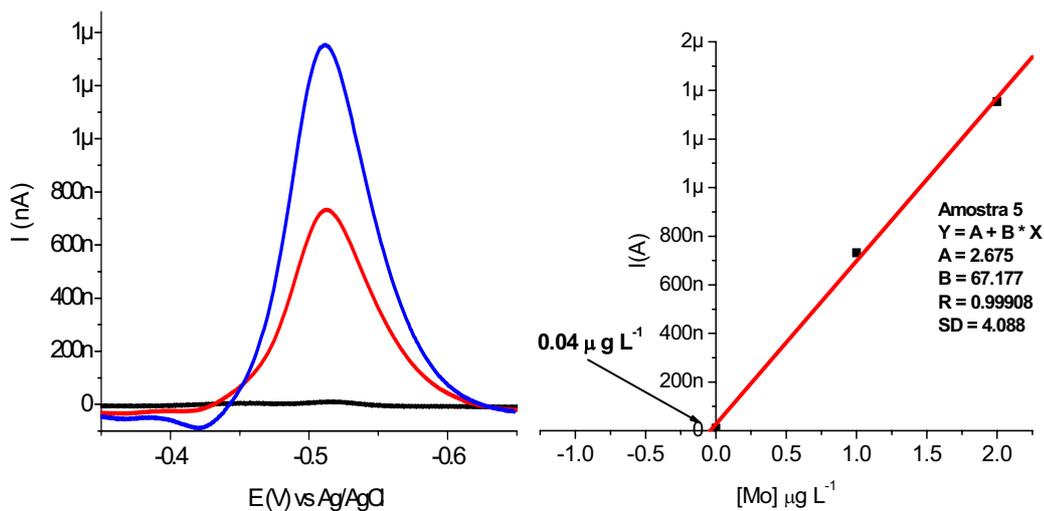


Figura 26. Análise por adição padrão da amostra (5) solo.

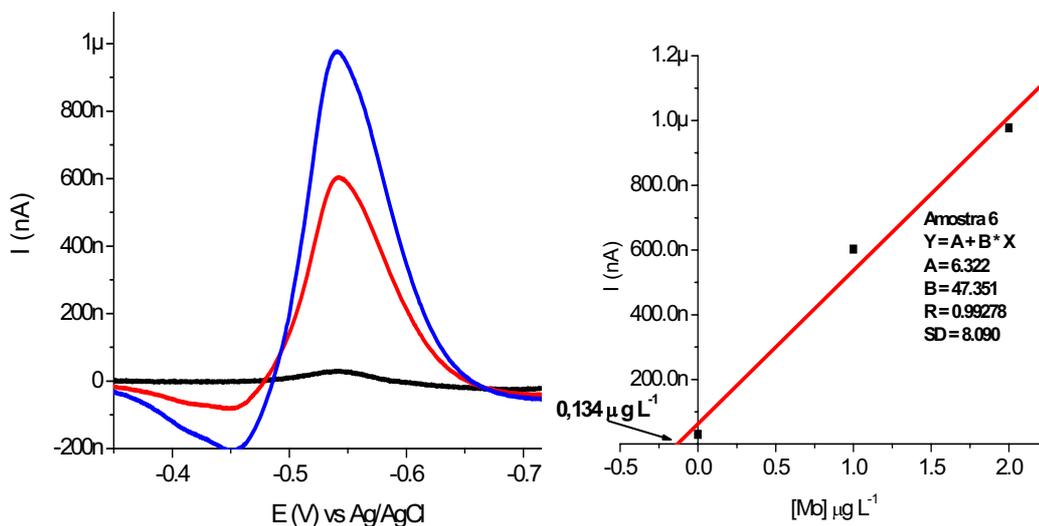


Figura 27. Análise por adição padrão da amostra (6) solo.

Na amostra 7 (solo) e 8 (solo) não foi encontrado o elemento molibdênio. As concentrações de Mo(VI) nas amostras 5 e 6 são de $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,134 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Efetuar-se-ram determinações por voltametria adsorptiva de redissolução e por ICP-AES para as amostras de plantas e solos. Na tabela 18 são comparados os resultados obtidos para o Mo(VI) por voltametria e ICP-AES.

Tabela 18. Resultados relativos às determinações efetuadas por ICP-AES e pelo método voltamétrico para o molibdênio.

Amostras	Concentração de molibdênio ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	Presente método	ICP-AES
1	1,147 \pm 0,031	1,156
2	1,496 \pm 0,035	1,515
3	0,756 \pm 0,08	0,845
4	ND*	ND*
5	0,04 \pm 0,003	0,045
6	0,134 \pm 0,03	0,155
7	ND*	ND*
8	ND*	ND*

* Não Detectado.

Os resultados obtidos para a determinação de Mo(IV), utilizando a ICP-AES e a técnica eletroquímica proposta são bastante próximos para algumas amostras. Os resultados mostraram que o método proposto é bastante preciso, pois o teor de molibdênio determinado aproximou do encontrado por ICP-AES.

5. CONCLUSÕES

O método proposto para a detecção e determinação de Mo(VI) para as diferentes matrizes, as quais foi aplicado, mostrou-se simples, preciso e reprodutível com a vantagem de não necessitar de etapas de separação ou pré-concentração.

O planejamento fatorial possibilitou a otimização da técnica voltamétrica utilizando-se da voltametria de onda quadrada com redissolução catódica adsortiva com o uso do eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE). Os procedimentos de otimização foram eficazes devido à fatores como: o uso do eletrólito de suporte adequado ao agente complexante 8-hidroxiquinolina e o uso de estudos multivariados. A partir dos parâmetros voltamétricos obtidos na utilização da técnica de SWV foram determinados os limites de detecção e realizada a validação da metodologia.

Desta forma, conclui-se que os resultados alcançados são bastante promissores para a detecção do íon Mo(VI), visto a rapidez, a sensibilidade, a exatidão, o custo benefício e a simplicidade da metodologia de SWV.

6. RECOMENDAÇÕES FUTURAS

A partir dos procedimentos e condições analíticas desenvolvidos neste trabalho surgem novas perspectivas que deverão ser aprofundadas em estudos posteriores para testar outros eletrodos de trabalho e eletrólitos de suporte, bem como o uso de outros agentes complexantes e diferentes parâmetros voltamétricos, visando aperfeiçoar a determinação por voltametria de onda quadrada com redissolução catódica adsortiva e a validação do método por outras técnicas, explorando as diversas possibilidades de técnicas disponíveis e oferecidas pelo software VA Computrace 1.2 no analisador voltamétrico da Metrohm® modelo 797 VA *Computrace*, que foi o aparelho utilizado.

Poder-se-ão empregar outros planejamentos experimentais para misturas e também testar a aplicação de outras técnicas quimiométricas, que poderão auxiliar na obtenção de melhores resultados de grande importância na determinação do íon Mo(VI) em amostras de águas naturais, vegetais, solos e águas residuais de indústrias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELOJU, S. B. O.; FLEURDELIS, P.; Adsorptive stripping voltammetric determination of ultratrace concentrations of molybdenum in biological and environmental materials on a glassy carbon mercury film electrode. *Electroanalysis*, V. 7, Issue 5, P. 405 – 498, 1995.
- AGRIFAX. Mineral for plants, animals and man. Alberta, agriculture, food and rural development. Agendex 531-3, 1998.
- AOUADA, F. A. ; MOURA, M. R. de ; CAMPESE, G. M. ; GIROTTO, E. M.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; Caracterização de hidrogéis condutores constituídos por PAAm e PEDOT/PSS por meio de planejamento fatorial. *Polímeros*. V. 18, Nº 2, p. 126-131, 2008.
- ALMEIDA, A. M.; Determinação voltamétrica de molibdênio (VI) utilizando um sistema ternário homogêneo de solventes. Campinas, SP: Unicamp, 120 p. Dissertação (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, 2003.
- ALMEIDA, A. M.; ALEIXO, L. M.; ANDRADE, J. C.; COSCIONE, A. R.; Determinação direta de molibdênio em comprimidos polivitamínicos por voltametria em meio aquoso. *Química Nova*. V. 29. Nº. 1, 2006.
- ALEIXO L. M.; Voltametria: conceitos e técnicas. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 40 p. [on-line]. Disponível em: www.chemkeys.com. Acessado em: 25/09/2007.
- 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. *Analytica Chimica Acta*, V. 487, p. 243-248, 2003.
- ANDRADE, C. E. O.; Otimização de metodologia para determinação de molibdênio. Dissertação de mestrado, (M. S.) Universidade Federal de Viçosa – UFV, 57 p., 2005
- ARANCIBIA, V.; MUÑOZ, C.; Determination of aluminium in water samples by adsorptive cathodic stripping voltammetry in the presence of pyrogallol red and a quaternary ammonium salt. *Talanta*, V. 73, p. 546-552, 2007.
-

- ARAMBARRI, R. G.; MILLÁN, E.; Optimisation of tin determination in aqua regia-HF extracts from sediments by electrothermal atomic absorption spectrometry using experimental design, *The Analyst*, V. 125, p. 2048-2088, 2000.
- ARABINDA, K.; CHAKRABORTY, R.; CERVERA, M. L.; GUARDIÑA, M. de la; A review on molybdenum determination in solid geological samples. Review. *Talanta*, V. 71 p. 987-1000, 2007.
- BATISTA, J.A.; TANADA-PALMU, P.S.; PASSOS, F.A.; TRANI, P.E.; GROSSO, C.R.F.; Vigor de sementes de brócolos submetidas a coberturas biodegradáveis e micronutrientes. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.23, n.3, p.841-845, 2005.
- BAUCELLS, M.; LACORT, G.; ROURA, M.; Determination of cadmium and molybdenum in soil extracts by graphite furnace atomic absorption and inductively coupled plasma spectrometry. *Analyst*, V. 110, p. 1423-1429. 1985.
- CABANILLAS, A. G.; CÁCERES, M. I. R.; CAÑAS, M. A. M.; Square wave adsorptive stripping voltametric of the mixture of nalidixic acid and its main metabolite (7-hydroxymethylnalidixic acid) by multivariate methods and artificial neural network. *Talanta*, V. 72, p. 932-940, 2007.
- CABRAL, M. F.; SOUZA, D.; ALVES, C. R.; MACHADO, S. A. S.; Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. *ECLETICA Química*, V. 28, nº 2, 2003.
- CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C.; Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Química Nova*. V. 30, Nº. 2. p. 481-487, 2007.
- DEMING, S. N.; MORGAN, S. L.; *Experimental Design: A Chemometric Approach*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1987.
- ENSAFI, A. A.; KHAYAMIAN, T.; ATABATI, M.; Simultaneous voltammetric determination of molybdenum and copper by adsorption cathodic differential pulse stripping method using a principal component artificial neural network. *Talanta*, V. 57, p. 785-793, 2002.
-

- ENSAFI, A. A.; KHAYAMIAN, T.; KHALOO, S. S.; Application of adsorptive cathodic differential pulse stripping method for simultaneous determination of cooper and molybdenum using pyrogallol red. *Analytica Chimica Acta*, V. 505, p. 201207, 2004.
- ENSAFI, A. A.; KHALOO, S. S.; Determination of traces molybdenum by catalytic adsorptive stripping voltammetry. *Talanta*, V. 65, p. 781-788, 2005.
- ENSAFI, A. A.; KHAYAMIAN, T.; KHALOO, S. S.; Simultaneous determination of trace amounts of vanadium and molybdenum in water and foodstuff samples using adsorptive cathodic stripping voltammetry. *International Journal of Food Science & Technology*, V. 43, n. 3, p. 416-422, 2008.
- FERREIRA, M. M. C., ANTUNES A. M., MELGO M. S., VOLPE P. L. O. *Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial*. *Química Nova*, V. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.
- GAO, Z.; SLOW, K. S.; Catalytic-adsorptive stripping voltammetric determination of molybdenum in plant foodstuffs. *Talanta*, V. 43, p. 719-726, 1996.
- GÁMEZ, A. L. A.; ROJAS, C. L.; CASTELLÓN, E. R. E.; Development of a voltammetric method to determine molybdenum in food grains. *Portugaliae Electrochimica Acta*, V. 23, p. 393-402, 2005.
- GARBELLINI, G. S.; SALAZAR-BANDA, G. R.; AVACA, L. A.; Aplicação do ultra-som em sistemas eletroquímicos: considerações teóricas e experimentais. *Química Nova*, V. 31, n. 1, 123-133, 2008.
- GIROUSI, S. T.; KASPENTAKIS, G. C.; VOULGAROPOULOS, A. N.; STRATIS, J. A.; Simultaneous voltammetric determination of molybdenum and cooper in manganese compounds. *Mikochim Acta*, n. 136, p. 223-226, 2001.
- GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; JORGE J. N.; Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Dep. de Fitotecnia; *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, V. 42 n.3, Brasília, 2007.
- GUPTA, U. C.; *Molybdenum in Agriculture*. Cambridge University Press, Cambridge, 1997.
-

- HENZE G.; Introduction to Polarography and Voltammetry. Metrohm Ltd. 60 p., Suíça, 2003.
- HOENING, M., ELSEN, Y., CAUTER, R.; Factors influencing the determination of molybdenum in plants samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.*, V. 58, 1986.
- IVANOV, V. M.; KOHELAEVA, G. A.; PROKHOROVA, G. V.; Methods for determining molybdenum. *Journal of Analytical Chemistryca Acta*, V. 57 n. 9, p. 758-772, 2002.
- JAIN, R.; JADON, N.; RADHAPYARI, K.; Cathodic adsorptive stripping voltammetry studies on lamivudine: A antiretroviral drug. *Journal of colloid and Interface Science*, V. 313, p. 254-260, 2007.
- JIN, L; GOGAN, N.J.; Copper complexing capacities of freshwaters by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Anal. Chim. Acta*, V. 412, p. 77-88, 2000.
- JIANGUO, W.; LINGLING, W.; YINGHUI, H.; JIANBO, J.; JIANBO, L.; WEIWEI, Y.; QIAOHUA, S.; HUI, Lv.; PVC membrane electrode based on triheptyl dodecyl ammonium iodide for the selective determination of molybdaqte (VI). *Analytica Chimica Acta*, V. 589, p. 33-38, 2007
- JUGADE, R.; JOSHI, P. A.; Trace determination of Mo(VI) by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Acta Chim. Slov* V. 52, p. 145-148, 2005.
- KOCHELAEVA, G. A.; IVANOV, V. M.; PROKHOROVA, G. V.; Determination of molybdenum in steels, soil, and sea water by spectroscopic methods and adsorption voltammetry. *Journal of Analytical Chemistry Acta*, V. 56 n. 8, p. 767-773, 2001.
- LI, HONG; SMART, R. B.; Square wave catalytic stripping voltammetric complexed with dihydroxynaphthalene. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, V. 429, p. 169-174, 1997.
- MARCONDES, J. A. P.; CAIRES, E. F.; Aplicação de molibdênio e cobalto na semente para cultivo da soja, *Bragantia*, V. 64, Nº. 4, Campinas, 2005.
- MASSART, D. L.; DIJKSTRA, A.; KAUFMAN, L., Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures, a survey of
-

- statistical and mathematical techniques, Elsevier Scientific Publishing Company, New York, 1978.
- MAY, Z.; K. LODO, G. TABA, K. CSEDO, T. FEKETE, E. BIRÓ, K. SZENTMIHÁLY; Square wave voltammetric determination of selenium in medicinal plants. 12th Symposium on Analytical and Environmental Problems, Szeged, 2005.
- MELLO, L. C.; Otimização de técnicas voltamétricas de redissolução para análise de metais traço em águas de ambientes costeiros de Santa Catarina, Tese de Doutorado em Química. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Brasil. Ano de obtenção: 2003.
- MENDONÇA, F. J. R., C.X.; CARCIOFI, A.C.; Concentração de cobre e molibdênio em algumas plantas forrageiras do Estado do Mato Grosso do Sul. 1998.
- METRODAT: 797 VA; Computrace Software Manual, Metrohm Ltda, 280p. Suíça, 2005.
- NAVRÁTILOVÁ, Z.; KOPANICA, M.; Differential-pulse voltammetric determination of molybdenum in nitrate médium in the presence of 8-hydroxyquinoline. *Analytica Chimica Acta*, V. 244, p. 193-196, 1991.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R.E.; Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2^a ed. Editora da UNICAMP, Campinas-SP, 401 p, 2002.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R.E.; 25 anos de quimiometria no Brasil. *Química Nova*. V. 29. Nº. 6. p. 1401-1406, 2006.
- PARHAM, H.; AIBAGHI, B.; GHASEMI, J. Simultaneous square wave voltammetric determination of 2-mercaptobenzoxazole by partial least squares method in water samples. *Journal of Hazardous Materials*, V. 151, p. 636-641, 2008.
- PEDROSA, V. A.; CODOGNATO, L.; AVACA, L. A.; Determinação voltamétrica de 4-clorofenol sobre o eletrodo de diamante dopado com boro utilizando a voltametria de onda quadrada. *Química Nova*. V. 26. Nº. 6. p. 844-849, 2003.
- PRADA, F.; MENDONÇA JR., C.X.; CARCIOFI, A.C. Concentração de cobre e molibdênio em algumas plantas forrageiras do Estado do Mato Grosso do Sul. 1998.
-

- PRESTES, J. A.; CAIRES, E. F.; Aplicação de molibdênio e cobalto na semente para cultivo da soja, *Bragantia*, V. 64, Nº. 4, Campinas, 2005.
- PYZYNSKA, K.; Determination of molybdenum in environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, V. 590, p. 40-48, 2007.
- RIBANI, M.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, V. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- ROSÁRIO, A. V.; PEREIRA, E. C.; Investigação do comportamento electrocrômico de filmes finos de Nb_2O_5 por método quimiométrico. *Cerâmica*, V. 45 nº 291 São Paulo, 1999.
- SACHALSCHA, E. B., MORALES, M., PRATT, P. F.; Lead and molybdenum in soils and forage near an atmospheric source. *J. Environ. Qual.* V. 16, n. 4, p. 313-315. 1987.
- SAFAVI, A.; SHAMS, E.; Selective determination of ultra trace concentrations of molybdenum by catalytic adsorptive stripping voltametry *Analytica Chimica Acta*, V. 396, p. 215-220, 1999.
- SANDER, S.; Simultaneous adsorptive stripping voltammetric determination of molybdenum(VI), uranium(VI), vanadium(V), and antimony(III) *Analytica Chimica Acta*, V. 394, p. 81-89, 1999.
- SANTOS, L. B. O. Dos; MASINI, J. C.; Square wave adsorptive cathodic stripping voltammetry automated by sequential injection analysis Potentialities and limitations exemplified by the determination of methyl parathion in water samples. *Analytica Chimica Acta*, V. 606, p. 209-216, 2008.
- SERAFIM, D. M.; STRADIOTTO, N. R.; Determination of sulfur compounds in gasoline using mercury film electrode by square wave voltammetry. *Fuel*, V. 87 p. 1007-1013, 2008.
- SILVA, L. O. C.; Voltametria Adsorptiva com Redissolução Catódica e Pulso Diferencial em Misturas de Íons Metálicos: Uma Análise Exploratória. Dissertação de mestrado (M.S.); Universidade Federal de Viçosa, 135 p., 2007.
- SKOOG, D. A., WEST, D.M. e HOLLER, J.F.; "Fundamentals of Analytical Chemistry", 6th ed., Saunders College Publishing, Philadelphia, 1992.
-

- SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A.; Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. *Química Nova*, V. 26, n. 1, 2003.
- SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S., AVACA, L. A.; PEDROSA, V. A.; CODOGNATO, L.; MALAGUTTI, A. R. ; TOLEDO, R. A. , PEDROSA, V. A. O., ROBSON, T. S.; MAZO, L. H.; Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: Aplicações. *Química Nova*, V. 27, nº. 5, p. 790-797, 2004.
- SOUZA, D.; GALLI, A.; CALEGARO, M. L.; MACHADO, S. A. S., PIRES, R. C.; Utilização da múltipla voltametria de onda quadrada na determinação eletroanalítica de compostos orgânicos e inorgânicos. *Química Nova*, V. 30, nº. 2, p. 458-463, 2007.
- STADLOBER, M.; KALCHER, K.; RABER, G.; A new method for the voltammetry determination of molybdenum(VI) using carbon paste electrodes modified in situ with cetyltrimethylammonium bromide. *Analytica Chimica Acta*, V. 350, p. 319-328, 1997.
- SUN, Y.; MIERZWA, J.; CHI-REN, L.; Direct determination of molybdenum in seawater by adsorption cathodic stripping square wave voltammetry. *Talanta*, V. 52, p. 417-424, 2000.
- TEÓFILO, R. F.; REIS, E. L.; REIS, C.; DA SILVA, G. A.; KUBOTA, L.T.; Experimental Design Employed to Square Wave Voltammetry Response Optimization for the Glyphosate Determination. *J. Braz. Chem. Soc.*, V. 15, n. 6, p. 865-871, 2004.
- TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C.; Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais. Um tutorial. *Química Nova*. V. 29. Nº. 2. p. 338-350, 2006.
- TISDALE, S. L., NELSON, W. L., BEATON, J. D.; Soil fertility and fertilizers. New York: Macmillan Publishing Company, 4 ed, p. 378-382. 1985.
- TOLEDO, R. A.; Estudo eletroquímico e desenvolvimento de novas metodologias eletroanalíticas para a determinação de antidepressivos tricíclicos e neurotransmissores. Dissertação de doutorado. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2006.
- VALDERRAMA, P.; Quimiometria. Ensino Superior. *Revista Eletrônica de Ensino de Química*, V. 1, n. 1, 2008.
-

-
- VOGEL, "Análise Inorgânica Quantitativa", 4^a ed., Editora Guanabara Dois S.A., Rio de Janeiro, 1981.
- VRUBEL, H.; Desenvolvimento da química fundamental do molibdênio na modelagem biomimética funcional de molibdoenzimas. Dissertação de doutorado. Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, 2007.
- WELLS, M. L.; KOZELKA, P.B.; BRULAND, K.W.; The complexation of 'dissolved' Cu, Zn, Cd and Pb by soluble and colloidal organic matter in Narragansett Bay, RI. Marine Chemistry, V. 62, p. 203-217, 1998.
- YÁGODIN, B. A. Agroquímica I. URSS: Editorial Mir, 1982.
- ZAREI, K.; ATABATI, M.; ILKHANI H.; Catalytic adsorptive stripping voltammetry determination of ultra trace amount of molybdenum using factorial design for optimization. Talanta V. 69 p. 816-821, 2006.
-

8. APÊNDICE

Protocolo analítico: Determinação de Mo(VI) em amostras de plantas e solos utilizando voltametria de onda quadrada com redissolução catódica adsortiva.

Visando o maior entendimento do método e sua utilização por parte do usuário, este será descrito seguindo a ordem de execução, a saber: Abertura de amostras, seguido do preparo das soluções para uso diário e padrões, utilização correta do equipamento, utilização do software e ajustes necessários para uma boa determinação em amostras reais do analito.

I – Abertura das amostras

As amostras que serão submetidas a análise devem obedecer aos parâmetros do item 3.12.

II - Preparo das soluções estoque e dos padrões

O preparo das soluções deve obedecer aos parâmetros do item 3.3. e 3.3.1.

III - Cuidados operacionais obrigatórios antes de ligar o equipamento

Limpeza da célula polarográfica: A célula polarográfica deve ser limpa antes e nos intervalos entre as determinações das amostras, para tanto procede-se a uma limpeza com água deionizada em abundância, seguida por uma lavagem com uma solução de HNO₃ 10% e finalizando com lavagens sucessivas com água deionizada em abundância.

Limpeza dos eletrodos: Lavar os eletrodos com água deionizada em abundância utilizando uma piceta, secá-los bem com lenços de papel, que devem ser descartados após o uso, esta limpeza deve ser efetuada com extremo cuidado.

Sequência de operações do software “797 VA Computrace 1.2”

As várias etapas de funcionamento do programa são:

Iniciar o programa: o programa é acionado por um duplo clique no ícone “797 VA Computrace” (Figura 1).



Figura 1. Ícone de inicialização do programa “797 VA Computrace”.

Ao clicar no ícone de inicialização aparecerá a tela da figura 2. Para abrir o programa é necessário entrar com nome e senha, caso esta opção esteja habilitada, escolher a opção desejada “**Start measurements**” para começar a realizar medidas ou “**Recalculate only**” para refazer cálculos de determinações anteriores.

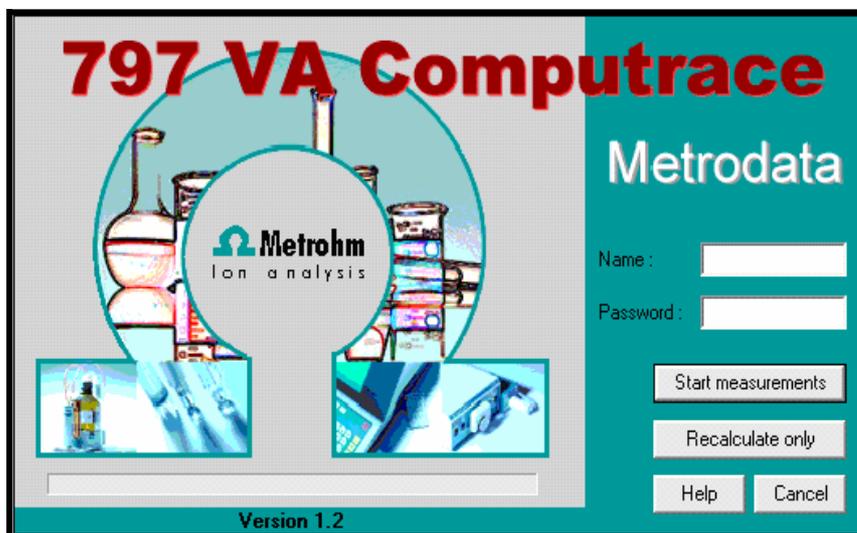


Figura 2. Tela inicial do programa “797 VA Computrace”.

Janela principal: é o centro do software “797 VA Computrace 1.2”. Seus elementos são a barra de menu, a barra de ferramentas e a barra de status (Figura 3).

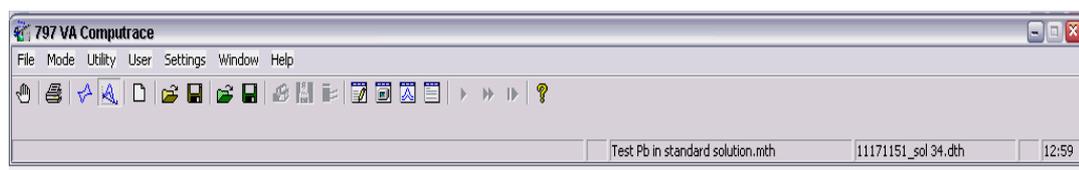


Figura 3. Janela principal do “797 VA Computrace”.

Menu da janela principal:

“**File**”: carregar, salvar e exportar arquivos de métodos, determinação e sinal; imprimir resultados e curvas; carregar e salvar determinações com o “**Autodatabase**”.

“**Mode**”: alternar entre os modos exploratório e de determinação.

“**Utility**”: controle do *VA Computrace*, controle de dosagem, controle de bomba, deposição de filme e procedimento de limpeza para eletrodos de estado sólido.

“**User**”: *login*, identificação e visualização de usuário.

“**Settings**”: ajustes gerais para salvar, automação, dispositivos de dosagem, controle remoto.

“**Window**”: abre e fecha janelas do programa.

“**Help**”: ajuda do programa.

Ícones da janela principal: de acordo com o modo selecionado (exploratório ou determinação) os seguintes ícones são mostrados ou não na janela principal.



Sair do programa *VA Computrace*;



Imprimir resultados e curvas;



Mudar para o modo exploratório;



Mudar para o modo de determinação;



Carregar parâmetros para modo exploratório ou de determinação;



Abrir arquivos de métodos ou sinais existentes;



Salvar arquivo de método ou sinal;



Abrir um arquivo de determinação existente;



Salvar um arquivo de determinação;

-  Controle manual do “797 VA Computrace”;
-  Controle manual do dispositivo de dosagem conectado ao “797 VA Computrace”;
-  Controle manual de bombas;
-  Abrir ou fechar a janela “*Working Method Specifications*” ou “*Exploratory Specification*” (Figura 4);

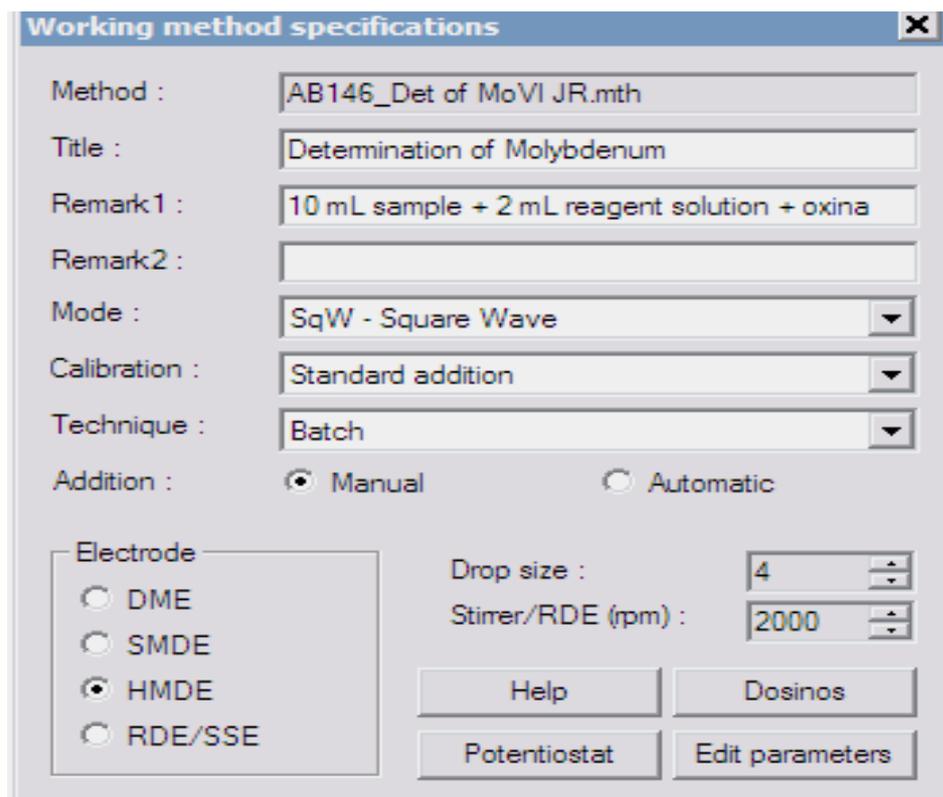


Figura 4. Tela “*Working Method Specifications*”.

-  Abrir ou fechar a janela “*DeterminationCurves*” (Figura 5);

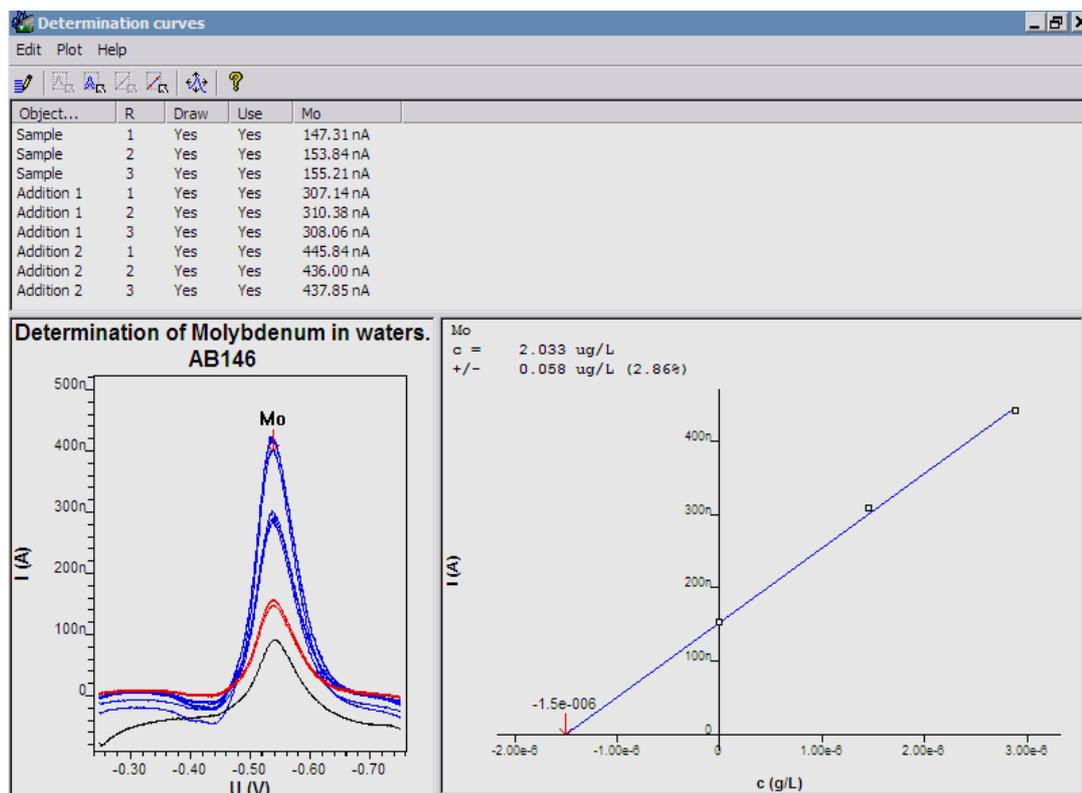


Figura 5. Tela “Determination Curves”. Voltamograma obtido através da técnica de Voltametria de redissolução catódica e onda quadrada.



Abrir ou fechar a janela “Monitor” para determinações (Figura 6);

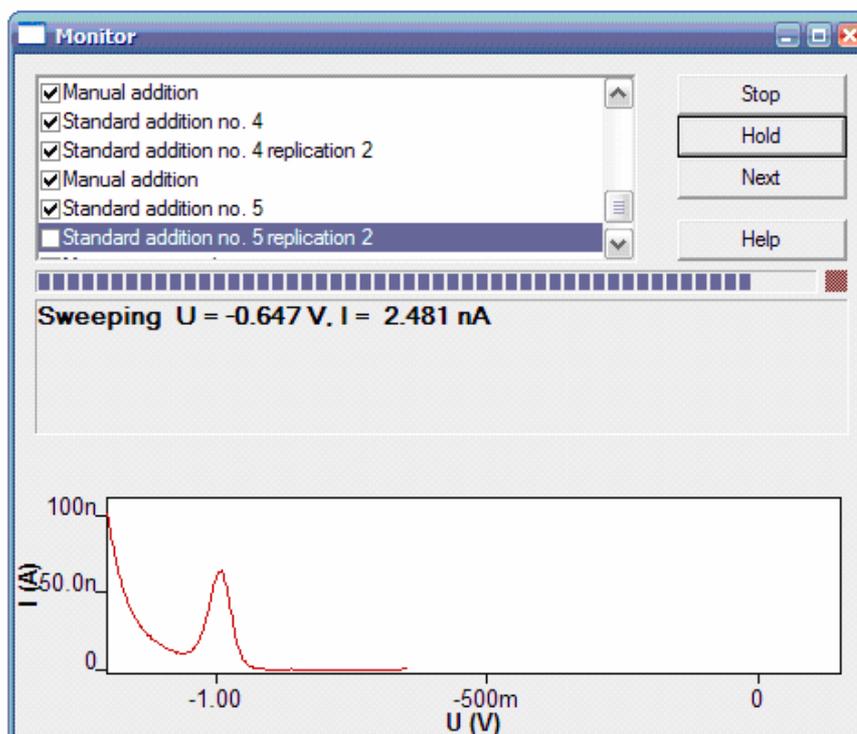


Figura 6. Tela “Monitor”.

 Abrir ou fechar a janela “*Exploratory Curves*” (Figura 7);

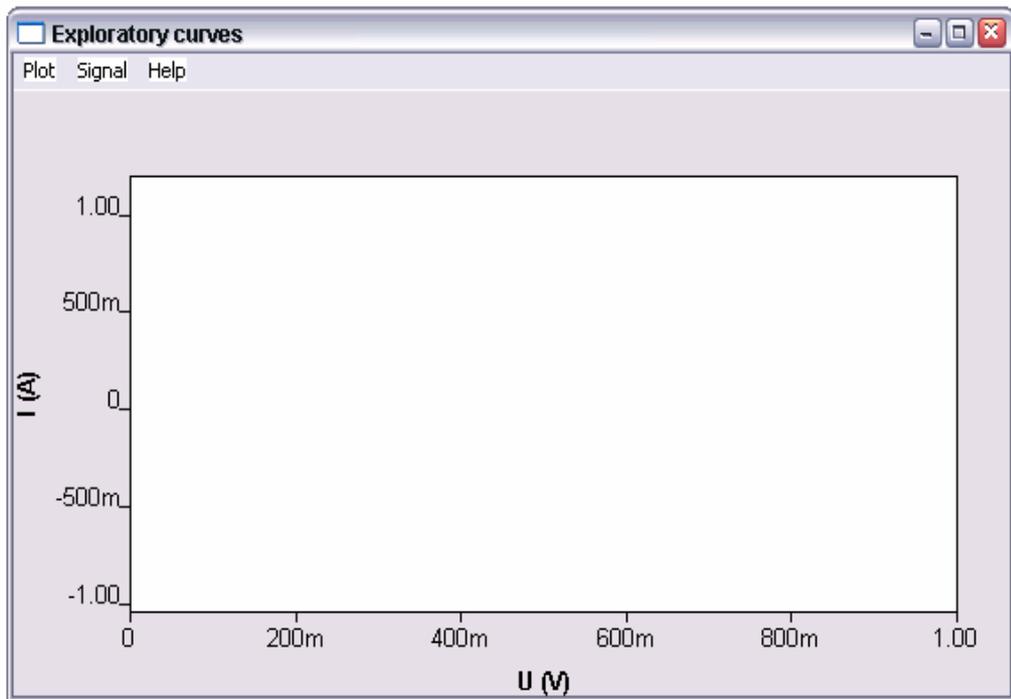


Figura 7. Tela “*Exploratory Curves*”.

 Abrir ou fechar a janela “*Results*” para determinações (Figura 8);

06211025_MoVI.txt - Bloco de notas

Arquivo Editar Formatar Exibir Ajuda

```

-----
Substance      : Mo
Conc.          : 1.506 ug/L
Conc. dev.     : 0.043 ug/L    ( 2.86%)
Amount        : 20.333 ng
Add. amount    : 20.000 ng
-----

```

VR	V	nA	I. mean	Std.Dev.	I. delta	Comments
1 - 1	-0.538	147.3	152.1	4.219	0.0	
1 - 2	-0.538	153.8				
1 - 3	-0.540	155.2				
2 - 1	-0.540	307.1	308.5	1.669	156.4	
2 - 2	-0.538	310.4				
2 - 3	-0.538	308.1				
3 - 1	-0.538	445.8	439.9	5.226	131.4	
3 - 2	-0.536	436.0				
3 - 3	-0.536	437.9				

```

-----
Substance      calibr.      Y.reg/offset      Slope Mean deviat.
Mo             std.add.          1.530e-007       1.016e-001       8.849e-009
-----
solutions
-----
No. Content                Predose (mL)
-----
-----
Final results                +/- Res. dev.    %      Comments
-----
Mo:
MoIybdenum      =      2.033 ug/L    0.058    2.856
-----

```

Figura 8. Tela “*Results*” arquivo texto salvo em bloco de notas.

-  Abrir ou fechar a janela “*Sample Table*”;
-  Iniciar medida;
-  Parar medida;
-  Pausar medida;
-  Continuar medida;
-  Ir para o próximo passo na seqüência de operações; e
-  Ajuda.

Ajustes gerais para o modo exploratório e, ou, de determinação:

Eletrodos: O eletrodo multi-modo (MME) é o eletrodo de trabalho comumente utilizado no “797 VA Computrace”. Ele combina os mais importantes eletrodos de mercúrio para polarografia e voltametria em uma única construção:

- DME: eletrodo gotejante de mercúrio;
- SMDE: eletrodo de gota estática de mercúrio;
- HMDE: eletrodo de gota pendente de mercúrio.

Modos de medidas voltamétricas:

- DP – Pulso diferencial;
 - SqW – Onda quadrada;
 - DC – Amostragem direta de corrente;
 - NP – Pulso normal (apenas para modo exploratório);
 - CV – Voltametria cíclica;
 - PSA – Análise potenciométrica por redissolução;
 - CCPSA – Análise potenciométrica por redissolução com corrente constante;
 - AC – Voltametria de corrente alternada;
 - CVS – Voltametria cíclica de redissolução;
 - CPVS – Voltametria de redissolução com pulsação cíclica.
-

Sequência de operações:

A sequência geral de operações para medidas é idêntica para os modos exploratório e de determinação, e incluem os seguintes passos:

1. Teste do eletrodo

Testam-se os eletrodos apenas se o eletrodo MME for utilizado. Este procedimento é controlado através do comando “**Computrace control**” cuja tela é mostrada na figura 9. É necessário selecionar o tipo de eletrodo de mercúrio a ser testado e clicar na opção “**Electrode test**”.

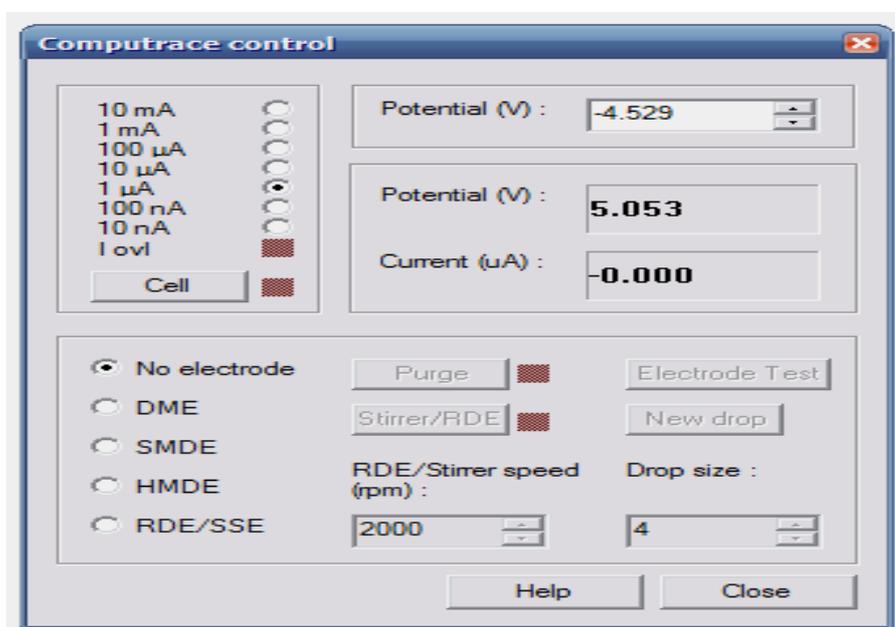


Figura 9. Tela “*Computrace control*”.

2. Agitação

A agitação da solução da amostra é opcional durante os procedimentos de preparação até iniciar o tempo de equilíbrio. Através da tela “**Computrace control**” (Figura 9) também é possível testar o mecanismo de agitação com um clique na opção “**Stirrer/RED**”.

3. Desoxigenação

Desoxigenação opcional da solução da amostra durante o tempo de purga inicial. Através da tela “**Computrace control**” (Figura 9) também é

possível testar o procedimento de desoxigenação com um clique na opção “*Purge*”.

4. Deposição

Deposição eletroquímica opcional para voltametria de redissolução por aplicação de um potencial de deposição durante o tempo de deposição.

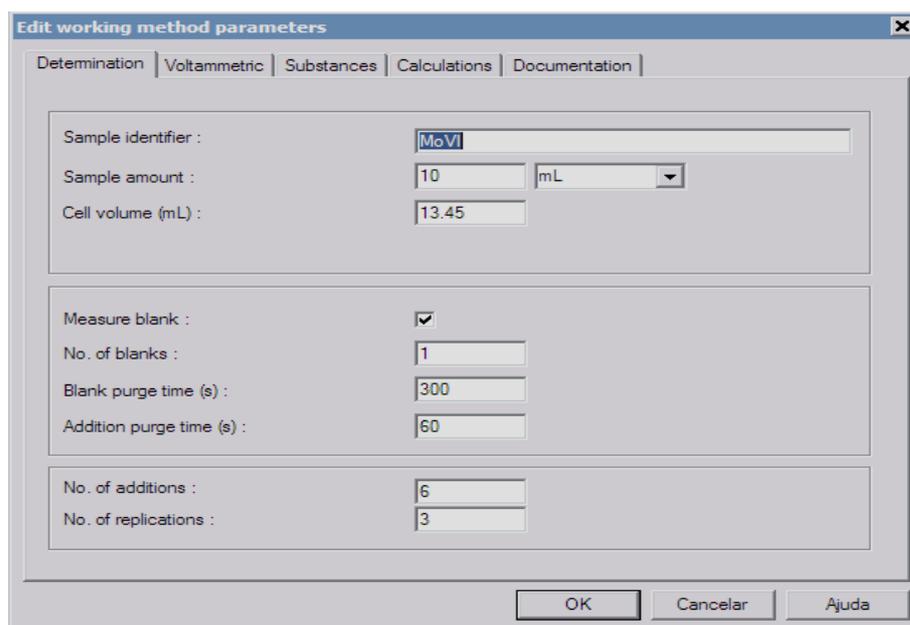
5. Tempo de equilíbrio

Aguarda-se um tempo antes de iniciar a varredura com o potencial inicial aplicado aos eletrodos.

6. Varredura de voltagem

Inicia-se a varredura de voltagem que depende do modo de medida selecionado na tela “*Working Method Specifications*” figura 4. Para ajustar os parâmetros do método de trabalho clica-se na opção “*Edit parameters*”.

A janela que se abre contém as opções “*Determination*”, “*Voltammetric*”, “*Substances*”, “*Calculations*” e “*Documentation*” que podem ser observadas nas figuras 10 (a), (b), (c), (d), e (e), respectivamente. A tela da figura 10(a) visualiza a opção “*Determination*” que contém as especificações gerais a serem utilizadas na determinação.



The screenshot shows a dialog box titled "Edit working method parameters" with a close button (X) in the top right corner. The dialog has five tabs: "Determination", "Voltammetric", "Substances", "Calculations", and "Documentation". The "Determination" tab is selected. The dialog contains the following fields and controls:

- Sample identifier: Text box containing "MoVI".
- Sample amount: Text box containing "10" and a dropdown menu set to "mL".
- Cell volume (mL): Text box containing "13.45".
- Measure blank: Check box checked.
- No. of blanks: Text box containing "1".
- Blank purge time (s): Text box containing "300".
- Addition purge time (s): Text box containing "60".
- No. of additions: Text box containing "6".
- No. of replications: Text box containing "3".

At the bottom of the dialog are three buttons: "OK", "Cancelar", and "Ajuda".

Figura 10. (a) Tela “*Determination*” da janela “*Edit working method parameters*”.

Na figura 10(b) observa-se a opção “**Voltammetric**” que contém os parâmetros voltamétricos a serem ajustados para as determinações no modo de medida selecionado.

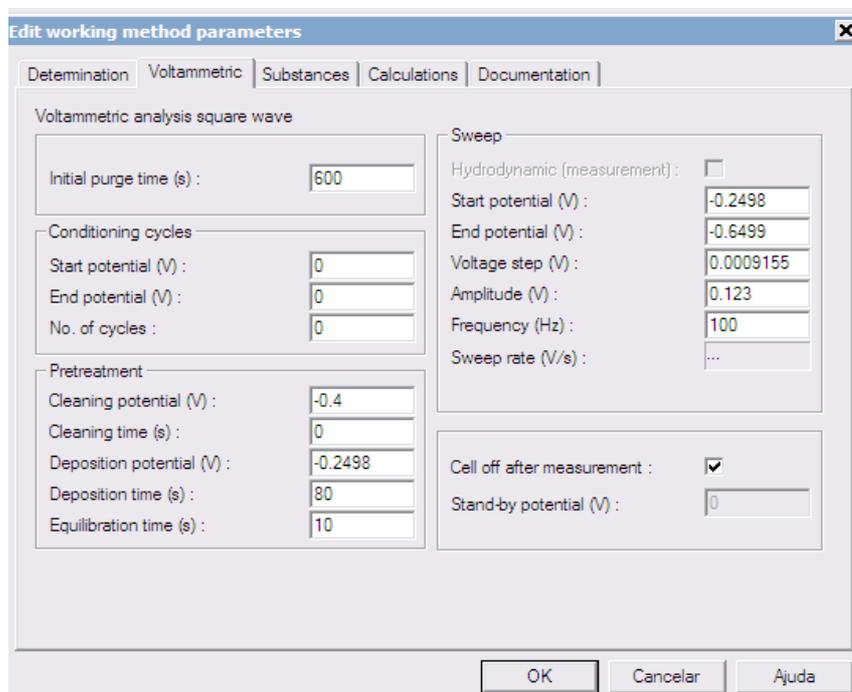


Figura 10. (b) Tela “**Voltammetric**” da janela “*Edit working method parameters*”.

A opção “**Substances**”, visualizada na figura 10(c), contém os parâmetros para a definição e reconhecimento de substâncias, para a definição de soluções de adição, para avaliação de picos e para cálculo de resultados.

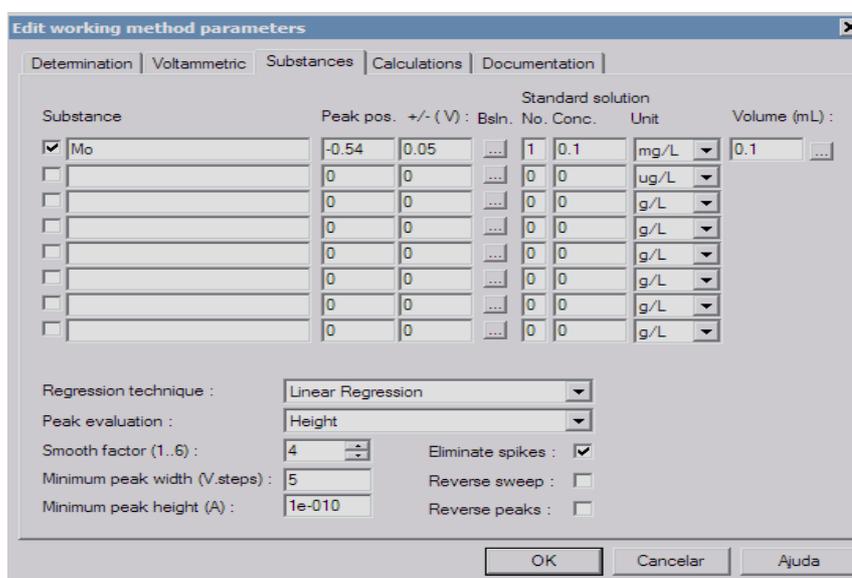


Figura 10. (c) Tela “**Substances**” da janela “*Edit working method parameters*”.

A figura 10(d) visualiza a opção “**Calculations**” que contém todas as fórmulas usadas para o cálculo do resultado final para uma substância. A opção “**Edit**” é acionada quando uma nova fórmula é adicionada ou se uma fórmula existente é editada.

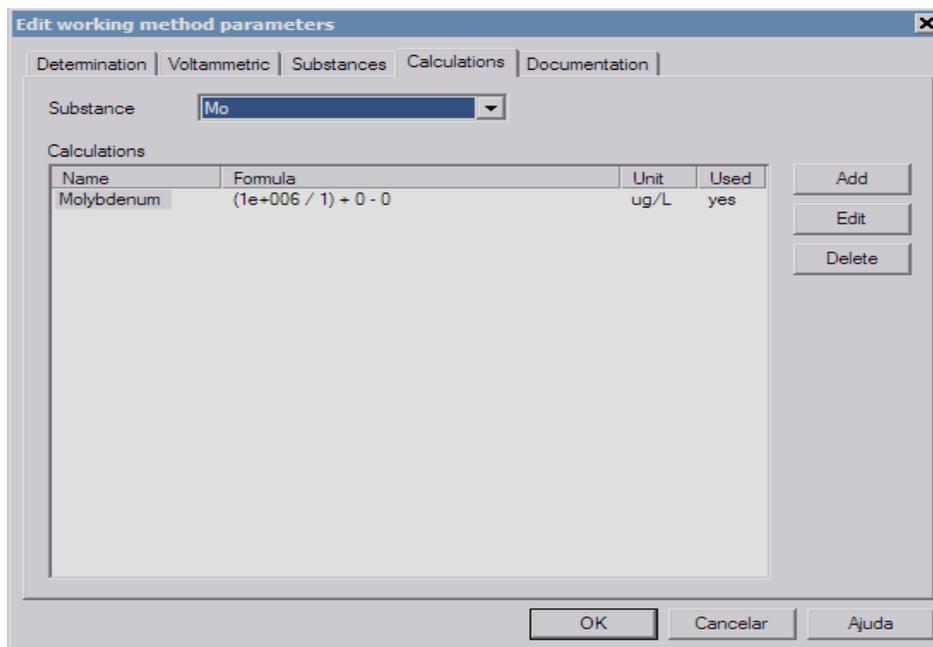


Figura 10. (d) Tela “*Calculations*” da janela “*Edit working method parameters*”.

Na opção “**Documentation**” (figura 10(e)) são definidos os elementos para documentação automática no final da determinação.

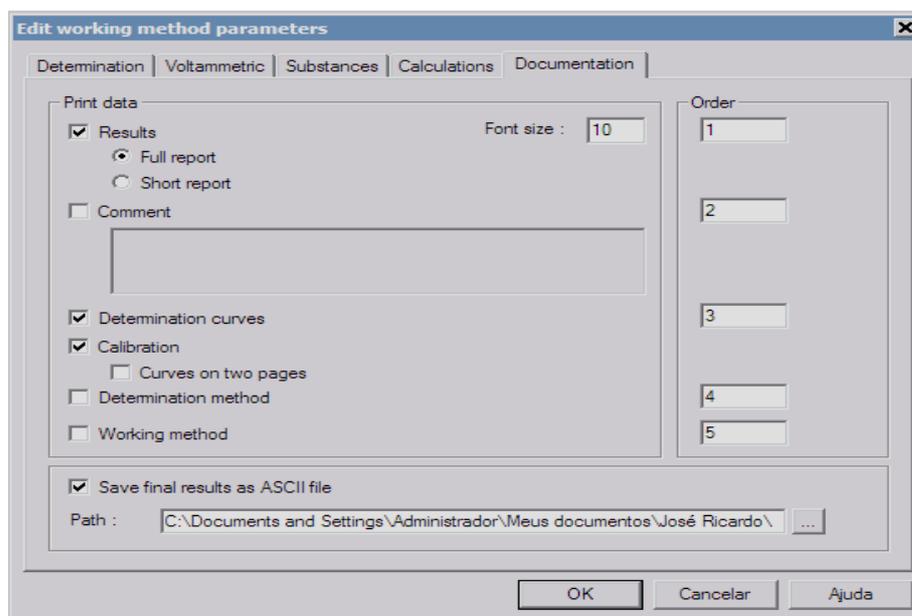


Figura 10. (e) Tela “*Documentation*” da janela “*Edit working method parameters*”.

Clique em OK, o programa voltará à tela “*Working Method Specifications*” figura 4.

Feche a janela e em seguida salve o método. Verifique se todas as outras condições do equipamento estão em ordem, em caso afirmativo clique sobre o ícone  “*Monitor*” para iniciar a determinação (figura 6). Caso já tenha iniciado a determinação e perceba que algo está errado clique na opção “*Hold*” parando imediatamente a análise e reiniciando o procedimento assim que o erro esteja corrigido.
