CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ELIÉZER DE OLIVEIRA

Determinação espectrofotométrica catalítica de molibdênio e ferro explorando calibração multivariada em um sistema de análises químicas em fluxo

Piracicaba

2015

ELIÉZER DE OLIVEIRA

Determinação espectrofotométrica catalítica de molibdênio e ferro explorando calibração multivariada em um sistema de análises químicas em fluxo

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Elias Ayres Guidetti Zagatto

Piracicaba

2015

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Oliveira, Eliézer de

Determinação espectrofotométrica catalítica de molibdênio e ferro explorando calibração multivariada em um sistema de análises químicas em fluxo / Eliézer de Oliveira; orientador Elias Ayres Guidetti Zagatto. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

63 p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Água natural 2. Análise multivariada 3. Análise por injeção em fluxo 4. Cinética química 5. Espectrofotometria 6. Metais 7. Plantas 8. Química analítica instrumental I. Título

CDU 543.068.3

AO SENHOR JESUS

Toda honra, glória e louvor são dados a ti.

Obrigado meu Deus.

Aos meus pais, Patrícia e João Batista, que me impulsionam cada dia a crescer e buscar a realização dos nossos sonhos. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e à Universidade de São Paulo pela instalação e oportunidade de participar deste programa de pós-graduação.

À Minha família pelo amor, carinho e atenção.

Ao Prof. Elias Zagatto pela orientação e por compartilhar experiências e conhecimentos que contribuíram para minha formação.

À Dra. Camélia Henriquez Hernándes pelo apoio em todas as etapas deste trabalho e por me oferecer sua amizade, carinho e dedicação.

À Dra Lidiane Cristina Nunes pela orientação nas etapas de preparo de amostras e calibração multivariada, e principalmente pelo de mais bonito que eu poderia receber: sua amizade.

Aos técnicos Valdemir Barros, Fátima Patreze, Sheila Perdigão e Iolanda Rufini pela ajuda e atenção durante a execução deste trabalho.

Aos amigos do laboratório: Claudinéia Rodrigues da Silva, Ana Clara Félix, Milton Katsumi Sasaki, Tuanne Dias e Carla Kamogawa pelas contribuições para a realização deste trabalho. Pela amizade, boas risadas e o convívio agradável.

A todos do Laboratório de Química Analítica pelas contribuições, discussões e risadas durante este período.

Aos amigos que se tornaram minha família piracicabana, pela força, paciência e pelos momentos felizes que me proporcionaram: Marcinha, Clau, Lidi, Came, Sil, Magdíssima, Re, Jana, Kelly, Tacy e Michelle.

Aos amigos que, mesmo distantes, estiveram sempre presentes: Jaqueline, Camila, Deyvin, Thiago e Fernanda.

A banca examinadora desta dissertação pela disponibilidade, sugestões e discussões.

"Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu."

Eclesiastes 3:1

RESUMO

OLIVEIRA, E. Determinação espectrofotométrica catalítica de molibdênio e ferro explorando calibração multivariada em um sistema de análises químicas em fluxo. 2015. 63 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Os efeitos catalíticos de Mo(VI) e Fe(III) na oxidação de iodeto por peróxido de hidrogênio foram explorados visando à determinação simultânea destes. Diferenças nas taxas de reação foram alcançadas através do estabelecimento de duas zonas reacionais distintas para alteração das cinéticas reacionais. Para isto, foi projetado um sistema de análises por injeção em fluxo que permite a inserção de duas alíquotas de amostra, sendo adicionado ácido sulfúrico em uma destas com formação de uma zona de amostra complexa. Cada elemento de fluido desta zona é caracterizado por composição química, tempo de residência e taxa de reação específicas. Os principais parâmetros que afetam a taxa reacional, tais como concentração dos reagentes, comprimento do reator e vazão total, dentre outros, foram avaliados buscando melhoria na sensibilidade e discriminação cinética entre os analitos. Os comprimentos das alcas de amostragem e da bobina separadora foram avaliados construindo-se modelos matemáticos visando máxima discriminação nas previsões para os analitos. Os modelos foram construídos a partir da ferramenta quimiométrica PLS (Partial Least Squares) utilizando os dados gerados por medidas de máximos e mínimos ao longo da zona de amostra. O conjunto de calibração era composto por misturas de Mo(VI) e Fe(III) na faixa de concentrações 6,2 -50,0 μ g L⁻¹ e 0,5 – 7,0 mg L⁻¹, respectivamente. O modelo selecionado apresenta boa habilidade de previsão com valores de RMSEP estimados como 0,67 µg L⁻¹ para Mo(VI) e 0,21 mg L⁻¹ para Fe(III). Recuperações entre 85 e 114% foram obtidas para amostras de águas naturais. O sistema proposto apresenta estabilidade física, boa repetibilidade entre as leituras (d. p. r. < 2 %), velocidade analítica de 31 h⁻¹ e consumo de 54 mg de iodeto de potássio e 0,30 mg de peróxido de hidrogênio por amostra.

Palavras-chave: Análises químicas por injeção em fluxo. Análise cinética diferencial. Molibdênio e ferro. Espectrofotometria. Calibração multivariada.

ABSTRACT

OLIVEIRA, E. Catalytic spectrophotometric determination of Mo(VI) and Fe(III) exploiting multivariate calibration implemented in a flow system. 2015. 63 p. Dissertação (Mestrado) – Centre for Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo, Piracicaba, 2015.

The catalytic effects of Mo(VI) and Fe(III) in the oxidation of iodide by hydrogen peroxide were exploited aiming at their simultaneous determination. Differences in reaction rates were achieved by establishing of two distinct reactions zones to modify the reaction kinetics involved. To this end, a flow injection system allowing insertion of two sample aliquots was designed, and sulfuric acid was added to one of the aliquots. A complex sample zone was then established. Each fluid element of this zone was characterized by a given chemical composition, residence time and reaction rate. The main parameters affecting the reaction rate, such as reagent concentrations, analytical path length and total flow rate, among others, were evaluated for improving sensitivity and analyte kinetic discrimination. Influences of sampling loop lengths and distance between initial plugs were studied, and mathematical models were constructed aiming at improved discrimination in prediction of analytes. The models were constructed from the PLS (Partial Least Squares) chemometric tool using data generated by measurements performed on sample zone regions with maximum and minimum local concentrations. The calibration set consisted of Mo(VI) and Fe(III) mixtures in concentration ranges of $6.2 - 50.0 \ \mu g \ L^{-1}$ and $0.5 - 7.0 \ m g \ L^{-1}$, respectively. The selected model is characterized by good prediction ability prediction, as RMSEP values were estimated as 0.67 μ g L⁻¹ for Mo(VI) and 0.21 mg L⁻¹ for Fe(III), respectively. Recoveries within the 85 - 114% range were obtained for natural waters. The proposed system presents physical stability and favorable characteristics of measurement repeatability (r.s.d.<2%), sampling rate (31 h^{-1}) and reagent consumption (54 mg of KI and 0.30 mg H₂O₂ per sample).

Keywords: Flow injection analysis. Differential kinetic analysis. Molybdenum and iron. Spectrophotometry. Multivariate calibration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de fluxos do sistema inicial	38
Figura 2 - Diagrama de fluxos do sistema proposto	38
Figura 3 - Registro do sinal analítico obtido pela inserção de amostra em um fluxo	
transportador-reagente	43
Figura 4 - Registro do sinal analítico obtido com a adição de R_1 na zona de	
amostra e inserção desta em transportador-reagente R2	44
Figura 5 - Efeito da concentração de ácido sulfúrico sobre o sinal analítico de	
Mo(VI) (a) e Fe(III) (b)	48
Figura 6 - Inclinações das curvas cinéticas obtidas em meios sulfúrico e nítrico	49
Figura 7 - Registro típico do sinal transiente gerado pela inserção de duas	
alíquotas de amostra	50
Figura 8 - Concentrações esperadas (abscissa) e previstas (ordenada) na etapa de	
validação	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações de Mo e Fe nas soluções empregadas para calibração e	
validação do modelo matemático	35
Tabela 2 - Influência das concentrações de iodeto de potássio, peróxido de	
hidrogênio e ácido nítrico	45
Tabela 3 - Influência do comprimento do reator e da vazão total	47
Tabela 4 - Influência da natureza do ácido nas sensibilidades para Mo(VI) e	
Fe(III)	48
Tabela 5 - Valores de RMSEP obtidos por modelos gerados a partir de	
experimentos com diferentes comprimentos de bobinas de amostragem e	
separadora	51
Tabela 6 - Seletividade	52
Tabela 7 - Concentrações previstas e reais e erros associados a etapa de validação	53
Tabela 8 - Concentrações de Mo (VI) e Fe (III) em digeridos de plantas	
determinadas pelo método proposto e por ICP OES	54
Tabela 9 - Resultados referentes aos ensaios de adição / recuperação envolvendo	54
amostras de águas naturais fortificadas	
Tabela 10 - Resultados comparativos	55

SUMÁRIO

2. REVISÃO DA LITERATURA. 22 2.1. Determinações simultâneas em sistemas de análises em fluxo. 22 2.2. Aspectos cinéticos. 27 2.3. Determinação catalítica de molibdênio. 36 3. MATERIAIS. 34 3.1. Equipamentos e acessórios. 34 3.2. Soluções. 34 3.3. Amostras. 36 4. MÉTODO. 35 4.1. Diagrama de fluxos. 37 4.2. Influência dos principais parâmetros envolvidos. 36 4.2.1. Concentrações dos reagentes. 46 4.2.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional. 40 4.2.3. Natureza e concentração do ácido. 41 4.3. Espécies interferentes. 41 4.4. Desenvolvimento do modelo matemático. 41 4.4. Desenvolvimento do modelo matemático. 41 4.5. Características analíticas. 42 5.1. Influência dos principais parâmetros envolvidos. 45 5.1.1. Concentrações dos reagentes. 42 5.1.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional. 42 5.1.3. Natureza e concentração do ácido. 42 5.1.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora. <td< th=""><th>1. INTRODUÇÃO</th><th>19</th></td<>	1. INTRODUÇÃO	19
2.1. Determinações simultâneas em sistemas de análises em fluxo	2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.2. Aspectos cinéticos	2.1. Determinações simultâneas em sistemas de análises em fluxo	22
2.3. Determinação catalítica de molibdênio	2.2. Aspectos cinéticos	27
3. MATERIAIS 34 3.1. Equipamentos e acessórios 34 3.2. Soluções 34 3.3. Amostras 36 4. MÉTODO 37 4.1. Diagrama de fluxos 37 4.2. Influência dos principais parâmetros envolvidos 39 4.2.1. Concentrações dos reagentes 46 4.2.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional 40 4.2.3. Natureza e concentração do ácido 40 4.3. Espécies interferentes 41 4.4. Desenvolvimento das alças de amostragem e da bobina separadora 41 4.4. Desenvolvimento do modelo matemático 41 4.5. Características analíticas 42 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 42 5.1.1. Influência dos principais parâmetros envolvidos 42 5.1.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional 42 5.1.1. Concentrações dos reagentes 42 5.1.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional 42 5.1.3. Natureza e concentração do ácido 42 5.1.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora 52 5.2. Espécies interferentes 52 5.3. Desenvolvimento do modelo 52	2.3. Determinação catalítica de molibdênio	30
3.1. Equipamentos e acessórios. 34 3.2. Soluções. 34 3.3. Amostras. 36 4. MÉTODO. 37 4.1. Diagrama de fluxos. 37 4.2. Influência dos principais parâmetros envolvidos. 39 4.2.1. Concentrações dos reagentes. 40 4.2.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional. 40 4.2.3. Natureza e concentração do ácido. 40 4.2.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora. 41 4.3. Espécies interferentes. 41 4.4. Desenvolvimento do modelo matemático. 41 4.5. Características analíticas. 42 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO. 42 5.1.1. Concentrações dos reagentes. 42 5.1.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional. 42 5.1.1. Concentrações dos reagentes. 42 5.1.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional. 42 5.1.3. Natureza e concentração do ácido. 47 5.1.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora. 50 5.2. Espécies interferentes. 52 5.3. Desenvolvimento do modelo. 52 5.4. Características analíticas.	3. MATERIAIS	34
3.2. Soluções	3.1. Equipamentos e acessórios	34
3.3. Amostras. 36 4. MÉTODO. 37 4.1. Diagrama de fluxos. 37 4.2. Influência dos principais parâmetros envolvidos. 39 4.2. Influência dos principais parâmetros envolvidos. 39 4.2. Influência dos principais parâmetros envolvidos. 39 4.2.1. Concentrações dos reagentes. 40 4.2.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional. 40 4.2.3. Natureza e concentração do ácido. 40 4.2.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora. 41 4.3. Espécies interferentes. 41 4.4. Desenvolvimento do modelo matemático. 41 4.5. Características analíticas. 42 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO. 42 5.1.1. Influência dos principais parâmetros envolvidos. 45 5.1.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional. 40 5.1.3. Natureza e concentração do ácido. 47 5.1.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora. 50 5.2. Espécies interferentes. 52 5.3. Desenvolvimento do modelo. 52 5.4. Características analíticas. 52 5.4. Características analíticas. 52	3.2. Soluções	34
4. MÉTODO. 37. 4.1. Diagrama de fluxos. 37. 4.2. Influência dos principais parâmetros envolvidos. 39. 4.2.1. Concentrações dos reagentes. 40. 4.2.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional. 40. 4.2.3. Natureza e concentração do ácido. 40. 4.2.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora. 41. 4.3. Espécies interferentes. 41. 4.4. Desenvolvimento do modelo matemático. 41. 4.5. Características analíticas. 42. 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO. 42. 5.1. Influência dos principais parâmetros envolvidos. 42. 5.1. Natureza e concentração do ácido. 42. 5.1. Natureza e concentração do ácido. 43. 5.1. Natureza e concentração do ácido. 43. 5.1. Natureza e concentração do ácido. 43. 5.1.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora. 50. 5.3. Desenvolvimento do modelo. 52. 5.4. Características analíticas. 52. 5.4. Características analíticas. 52. 5.4. Características analíticas. 52. 5.4. Características analíticas. 52. <tr< td=""><td>3.3. Amostras</td><td>36</td></tr<>	3.3. Amostras	36
4.1. Diagrama de fluxos	4. MÉTODO	37
4.2. Influência dos principais parâmetros envolvidos. 39 4.2.1. Concentrações dos reagentes. 40 4.2.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional. 40 4.2.3. Natureza e concentração do ácido. 40 4.2.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora. 41 4.3. Espécies interferentes. 41 4.4. Desenvolvimento do modelo matemático. 41 4.5. Características analíticas. 42 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO. 43 5.1.1. Influência dos principais parâmetros envolvidos. 44 5.1.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional. 40 5.1.3. Natureza e concentração do ácido. 47 5.1.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora. 50 5.2. Espécies interferentes. 52 5.3. Desenvolvimento das alças de amostragem e da bobina separadora. 50 5.4. Características analíticas. 52 5.4. Características anal	4.1. Diagrama de fluxos	37
4.2.1. Concentrações dos reagentes	4.2. Influência dos principais parâmetros envolvidos	39
4.2.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional	4.2.1. Concentrações dos reagentes	40
4.2.3. Natureza e concentração do ácido. 40 4.2.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora. 41 4.3. Espécies interferentes. 41 4.4. Desenvolvimento do modelo matemático. 41 4.5. Características analíticas. 42 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO. 42 5.1. Influência dos principais parâmetros envolvidos. 42 5.1.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional. 46 5.1.3. Natureza e concentração do ácido. 47 5.1.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora. 50 5.2. Espécies interferentes. 52 5.3. Desenvolvimento do modelo. 52 5.4. Características analíticas. 52 6. CONCLUSÕES. 56 REFERÊNCIAS. 57	4.2.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional	40
4.2.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora. 41 4.3. Espécies interferentes. 41 4.4. Desenvolvimento do modelo matemático. 41 4.4. Desenvolvimento do modelo matemático. 41 4.5. Características analíticas. 42 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO. 43 5.1. Influência dos principais parâmetros envolvidos. 45 5.1.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional. 46 5.1.3. Natureza e concentração do ácido. 47 5.1.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora. 50 5.2. Espécies interferentes. 52 5.3. Desenvolvimento do modelo. 52 5.4. Características analíticas. 52 6. CONCLUSÕES. 56 REFERÊNCIAS. 57	4.2.3. Natureza e concentração do ácido	40
4.3. Espécies interferentes. 41 4.4. Desenvolvimento do modelo matemático. 41 4.5. Características analíticas. 42 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO. 43 5.1. Influência dos principais parâmetros envolvidos. 44 5.1.1. Concentrações dos reagentes. 45 5.1.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional. 46 5.1.3. Natureza e concentração do ácido. 47 5.1.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora. 50 5.2. Espécies interferentes. 52 5.3. Desenvolvimento do modelo. 52 5.4. Características analíticas. 52 6. CONCLUSÕES. 56 REFERÊNCIAS. 57	4.2.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora	41
4.4. Desenvolvimento do modelo matemático.414.5. Características analíticas.42 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 435.1. Influência dos principais parâmetros envolvidos.455.1.1. Concentrações dos reagentes.455.1.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional.465.1.3. Natureza e concentração do ácido.475.1.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora.505.2. Espécies interferentes.525.3. Desenvolvimento do modelo.525.4. Características analíticas.52 6. CONCLUSÕES 56 7. REFERÊNCIAS 57	4.3. Espécies interferentes	41
4.5. Características analíticas	4.4. Desenvolvimento do modelo matemático	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 43 5.1. Influência dos principais parâmetros envolvidos 45 5.1.1. Concentrações dos reagentes 45 5.1.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional 46 5.1.3. Natureza e concentração do ácido 47 5.1.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora 50 5.2. Espécies interferentes 52 5.3. Desenvolvimento do modelo 52 5.4. Características analíticas 55 6. CONCLUSÕES 56 REFERÊNCIAS 57	4.5. Características analíticas	42
5.1. Influência dos principais parâmetros envolvidos	5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1.1. Concentrações dos reagentes.455.1.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional.465.1.3. Natureza e concentração do ácido.475.1.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora.505.2. Espécies interferentes.525.3. Desenvolvimento do modelo.525.4. Características analíticas.556. CONCLUSÕES.56REFERÊNCIAS.57	5.1. Influência dos principais parâmetros envolvidos	45
5.1.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional	5.1.1. Concentrações dos reagentes	45
5.1.3. Natureza e concentração do ácido.475.1.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora.505.2. Espécies interferentes.525.3. Desenvolvimento do modelo.525.4. Características analíticas.556. CONCLUSÕES.56REFERÊNCIAS.57	5.1.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional	46
5.1.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora	5.1.3. Natureza e concentração do ácido	47
5.2. Espécies interferentes. 52 5.3. Desenvolvimento do modelo. 52 5.4. Características analíticas. 55 6. CONCLUSÕES. 56 REFERÊNCIAS. 57	5.1.4. Comprimento das alças de amostragem e da bobina separadora	50
5.3. Desenvolvimento do modelo. 52 5.4. Características analíticas. 55 6. CONCLUSÕES. 56 REFERÊNCIAS. 57	5.2. Espécies interferentes	52
5.4. Características analíticas	5.3. Desenvolvimento do modelo	52
6. CONCLUSÕES	5.4. Características analíticas	55
REFERÊNCIAS	6. CONCLUSÕES	56
	REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

Métodos catalíticos têm sido aplicados na determinação de uma ampla gama de compostos tais como metais de transição, ânions, moléculas orgânicas, dentre outros. Geralmente, estes métodos utilizam detecção espectrofotométrica, fluorimétrica ou quimioluminescente, sendo isto um atrativo frente a outras técnicas principalmente no que tange à relação custo/benefício. Como os catalisadores atuam em concentrações baixas, estes métodos podem ter limites de detecção muito baixos e alta sensibilidade, o que tem aumentado sua aplicação em análises de traço (PÉREZ-BENDITO; SILVA, 1988). Entretanto, nem sempre estes apresentam seletividade adequada, a qual por vezes pode ser melhorada modificando-se as condições de desenvolvimento da reação indicadora através da variação dos reagentes e suas concentrações, da utilização de reagentes de mascaramento ou de ativadores, ou por combinação com um método de separação (OTTO et al., 1978).

Como os métodos catalíticos são fortemente dependentes do tempo, sua aplicabilidade pode ser ampliada explorando-se os sistemas de análises em fluxo que, além de caracterizados por um rígido controle temporal (RUZICKA; HANSEN, 1988), permitem a utilização deste parâmetro como variável experimental como salientado por Sasaki e colaboradores (2012). Desta forma, a implementação de métodos catalíticos em sistemas de análises em fluxo tem levado a melhorias em precisão, sensibilidade e frequência analíticas, robustez e portabilidade dos analisadores, bem como economia de reagentes (TROJANOWICZ, 2000). Determinações multielementares são então eficientemente desenvolvidas, especialmente quando a discriminação se baseia nas diferentes taxas de reação dos analitos (OTTO et al., 1978).

Diversas estratégias têm sido implementadas em sistemas de análises por injeção em fluxo objetivando-se determinações espectrofotométricas simultâneas. Estas envolvem: (i) uso de analisadores apresentando diversos canais analíticos ou técnicas "sandwich" (ALONSO et al., 1987); (ii) desenvolvimento de condições específicas para cada analito, permitindo mensurações em tempos diferentes de reação, favorecendo a cinética diferencial; transformação química dos analitos a uma forma adequada e mensuração (iii) desta em condições características; (iv) exploração de gradientes de concentração criando estágios intermediários de reação ao longo de um zona de amostra; (v) o estabelecimento de diferentes condições instrumentais com base na medição de dados multivariados para e.g. (BLANCO análise espectral multivariada et al., 1992); dentre outras. Algumas dessas estratégias podem ser associadas visando à determinação de uma espécie outrora considerada como interferente, conforme salientado por Kawashima e colaboradores (1992).

Outra possibilidade se refere à exploração conjunta de sistemas de análises em fluxo e de ferramentas quimiométricas visando aplicação de cinética diferencial, conforme apresentada preliminarmente por Fortes et al. (2006). As contribuições de Kawashima e Nakano (1992) e de Fortes et al. (2006) indicam que a determinação catalítica de Mo(VI) e de Fe(III), este último outrora considerado como interferente, é viável.

Molibdênio e ferro são elementos essenciais para as plantas. Mo atua na fixação de nitrogênio atmosférico por bactérias para iniciar a síntese de proteínas (MALAVOLTA, 2006), ao passo que Fe desempenha papel importante na síntese de clorofila (BASAYIGIT et al., 2015). As concentrações de Mo e Fe em plantas estão nas faixas de 0,2 a 2 e de 50 a 900 mg kg⁻¹, respectivamente. Uma vez que Mo é encontrado em concentrações muito baixas neste tipo de matriz, métodos sensíveis são requeridos para a determinação deste. A determinação espectrofotométrica de Mo em plantas envolve frequentemente um método catalítico e a eliminação da interferência de Fe. O método espectrofotométrico baseado no efeito catalítico de Mo(VI) na oxidação de iodeto por peróxido de hidrogênio é amplamente utilizado. Em excesso de iodeto de potássio, íons tri-iodeto são formados e monitorados na ausência e presença de Mo. A diferença entre as medidas reflete a concentração do analito na amostra (FANG; XU, 1983). Neste método, o resultado da determinação de Mo pode sofrer interferência de Fe(III), que apresenta um comportamento catalítico similar ao analito. Diversas estratégias tem sido exploradas para eliminar ou diminuir esta interferência, em geral envolvendo etapas de complexação, separação por extração com solventes ou em coluna de troca iônica, bem como determinando-se conjuntamente Fe(III) e Mo(VI), conforme salientado na secção 2.3, esta última estratégia se justificando face à importância de Fe(III) em plantas.

No presente trabalho, o método espectrofotométrico catalítico envolvendo a oxidação de iodeto por peróxido de hidrogênio foi aplicado para comprovação da viabilidade da determinação simultânea por cinética diferencial aliada a uma ferramenta quimiométrica. A determinação de Mo(VI) e Fe(III) foi investigada em um sistema de análises em fluxo aplicado a amostras de águas naturais e de digeridos de vegetais, no qual duas alíquotas de amostra eram inseridas. Ácido sulfúrico era adicionado a uma das alíquotas, resultando em uma zona complexa de amostra apresentando gradientes de acidez pronunciados. Como as cinéticas de oxidação eram dependentes da acidez do ambiente reacional, as mesmas

eram modificadas ao longo da zona de amostra. Medidas sucessivas ao longo dessa zona permitiam então a discriminação cinética entre os analitos. Para a determinação quantitativa destes, construíram-se modelos de calibração multivariada por meio da regressão dos mínimos quadrados parciais (PLSR).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Determinações simultâneas em sistemas de análises em fluxo

A identificação e quantificação de diversos componentes em *e.g.* plantas, águas naturais, solos, fluidos biológicos e alimentos são frequentemente necessárias para a caracterização destas amostras, pois a determinação de um único componente muitas vezes não é suficiente e representativa como indicativos de qualidade, toxicidade, contaminação, etc. Análises de rotina requerem determinações rápidas e simultâneas dos componentes em uma amostra visando economia de tempo e de reagentes. Desta forma, métodos analíticos baseados na coleta de dados referentes a mais de um analito têm sido desenvolvidos. Para isso, os dados obtidos devem ser tratados, e as respostas das espécies químicas distinguidas umas das outras em uma mistura. Neste sentido, a quimiometria desempenha um papel fundamental (GELADI; KOWALSKI, 1986), uma vez que tem sido frequentemente empregada para o desenvolvimento de métodos, otimização e para explorar um conjunto de dados e informações originados de um determinado sistema.

As características inerentes aos sistemas de análises por injeção em fluxo (RUZICKA; HANSEN, 1975), tais como dispersão controlada, formação de gradientes de concentração e temporização precisa, bem como a sua versatilidade tem permitido determinações espectrofotométricas sequenciais ou simultâneas, onde a discriminação entre espécies químicas é fundamental. No primeiro caso, tem-se a determinação de *n* analitos a partir de *n* inserções de amostra, enquanto que, no segundo, vários analitos podem ser determinados a partir de uma única inserção, conforme salientado por Luque de Castro e Valcárcel (1986).

Diferentes abordagens têm sido apresentadas para permitir determinações multielementares empregando analisadores em fluxo, em geral envolvendo extração em fase sólida, extração líquido-líquido, cromatografia por injeção sequencial, eletroforese capilar, hifenações com detectores multi-elementares (voltametria, ICP-MS, ICP-OES, etc), configurações multicanais e tratamentos quimiométricos (GÓMEZ; CALLAO, 2007; KOLEV; McKELVIE, 2008).

Dentre as diversas técnicas de detecção acopladas aos sistemas de análises em fluxo, a espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível deve ser salientada (CHALK, 2008). Os analitos são determinados em função da absorção de radiação eletromagnética em comprimentos de onda específicos. Esta técnica apresenta baixo custo e simplicidade,

porém não pode ser utilizada de maneira direta na maioria das determinações. Derivatização envolvendo reações químicas torna-se então necessária, e o produto gerado apresenta capacidade de absorção de radiação proporcional à concentração do analito na amostra. Em alguns casos, ocorre absorção que não é referente ao produto formado pelo analito, resultando em interferência. Esta pode ser proveniente de espécies que reagiram com um reagente em comum formando o mesmo produto detectável ou pela formação de produtos com espectro de absorção similar. Assim, etapas adicionais (extração, separação, análise espectral) são necessárias para a identificação e quantificação destas espécies individualmente (GONÇALVES, 2001). Sistemas de análises químicas em fluxo se constituem, então, em uma ferramenta importante para discriminação do sinal do analito e possibilitar o mascaramento e/ou a determinação das espécies químicas potencialmente interferentes.

Nos sistemas de análises por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica, uma alíquota de amostra é inserida em um fluxo transportador (que pode ser um reagente), e a zona de amostra estabelecida é conduzida em direção à cubeta de detecção após interação com os reagentes apropriados. A resposta analítica é obtida em forma de um sinal transiente, que é avaliado pela medida da altura, área ou largura do pico. Quando a interferência é suprimida, o sinal obtido é idealmente específico para um analito (LUKKARI; LINDBERG, 1988).

Na maioria dos procedimentos de análises em fluxo, a determinação da concentração do analito envolve a medida de um único sinal. No entanto, é possível a obtenção de maior quantidade de informação analítica, realizando-se várias medições com uma única inserção de amostra (LUQUE DE CASTRO; VALCÁRCEL, 1986). Os dados podem ser adquiridos a partir de detectores multicanais ou de varredura, análises por cinética diferencial, gradientes de concentração, etc.

A inserção única de amostra envolve a inserção de uma (RUZICKA; HANSEN, 1975) ou mais (MARTINELLI et al., 1989) alíquotas da mesma amostra. Diferentes condições associadas a cada medida podem ser estabelecidas explorando-se as variações em dispersão da amostra, tempo de reação, temperatura, pH, força iônica, etc, bem como adição de diferentes reagentes. Relativamente ao tempo de reação, foram desenvolvidos procedimentos analíticos baseados em cinética diferencial, explorando as diferentes taxas com as quais duas ou mais espécies químicas interagem com um reagente em comum (DAHL et al., 1979).

A inserção simultânea de duas alíquotas da mesma amostra em fluxos diferentes com monitoramento por detectores independentes permite que cada percurso apresente condições específicas para cada analito, de acordo com a necessidade de diferenciação entre eles (LUQUE DE CASTRO; VALCÁRCEL, 1986). Apenas uma cubeta de detecção pode ser utilizada inserindo-se duas alíquotas de amostra simultaneamente em fluxos transportadores paralelos que se confluem imediatamente antes da detecção. Kagenow e Jensen (1980) demonstraram esta viabilidade, determinando estrôncio e cálcio ou estrôncio e magnésio em amostras sintéticas. Em uma das alíquotas, os íons metálicos livres interagiam com o reagente cromogênico e o sinal analítico (altura de pico) representava a soma dos sinais referentes a ambos os analitos. Na outra alíquota, os íons eram complexados com (2.2.2) criptato e somente cálcio (ou magnésio) era liberado antes da detecção devido ao curto intervalo de tempo disponível para a dissociação. Desta forma, o segundo pico refletia apenas a concentração deste metal. Como inconveniente, pode-se mencionar a diluição da segunda zona de amostra provocada pela confluência dos dois fluxos transportadores.

Esta limitação foi superada implementando-se a estratégia acima em um sistema de análises em fluxo em linha única: duas alíquotas de amostra eram inseridas simultaneamente em um único fluxo transportador, em pontos diferentes ao longo do caminho analítico. As diferentes posições do local de inserção resultavam em diferentes tempos disponíveis para o desenvolvimento das reações. Cobre e níquel eram então determinados com base nas diferentes taxas de complexação destes com 2-hidroxibenzaldeído tiossemicarbazona (FERNANDEZ et al., 1987). Dois picos com contribuições de ambos analitos eram registrados após a passagem das duas alíquotas pelo detector. As condições de reação eram as mesmas para ambos os metais, e apenas os tempos disponíveis para as reações eram suficientes para a discriminação cinética entre analitos.

A inserção de uma única alíquota de amostra foi também explorada com a abordagem de bifurcação / convergência de fluxos (RUZICKA et al., 1976). A amostra era inserida no fluxo transportador, o qual era bifurcado para originar duas zonas independentes de amostra que eram direcionadas para reatores paralelos com características diferentes. Os fluxos estabelecidos após a bifurcação convergiam antes da passagem das alíquotas processadas pelo detector. Assim, dois picos apresentando diferentes frações volumétricas, dispersões e tempos disponíveis para o desenvolvimento da reação eram obtidos. A estratégia foi inicialmente aplicada à determinação de cloreto em águas salobras visando expansão do intervalo analítico por Ruzicka et al. (1976), que previram o uso desta abordagem para determinações simultâneas. Esta viabilidade foi confirmada por Fernandez et al. (1984), que combinaram a bifurcação / convergência de fluxos com análise por cinética diferencial para a determinação de Ni(II) e Co(II) embasados nas diferentes taxas de complexação destes metais com 2-hidroxibenzaldeído tiossemicarbazona.

Após a bifurcação dos fluxos transportadores, as alíquotas de amostra podem passar por reatores diferentes, receber a adição de reagentes apropriados em cada um dos fluxos, e ser direcionadas para cubetas de detecção independentes. Esta estratégia foi inicialmente explorada por Anderson (1979), em relação à determinação conjunta de nitrito e nitrato. Após a bifurcação, uma das alíquotas passava por uma coluna redutora onde nitrato era convertido a nitrito e a soma de ambos era determinada, ao passo que a outra alíquota era dirigida diretamente ao detector, onde apenas nitrito era quantificado. Por diferença, as concentrações individuais de ambos os analitos eram determinadas.

Uma única alíquota de amostra pode passar por detectores posicionados em série, em dois pontos diferentes do percurso analítico. A passagem da zona de amostra por ambos fornece respostas referentes a diferentes tempos disponíveis para o desenvolvimento da reação e dispersões. Para que esta estratégia seja aplicada, os componentes de uma mistura binária devem apresentar pronunciada diferença nas taxas de reação. Esta possibilidade foi inicialmente explorada por Dahl et al. (1979) para a determinação de magnésio e estrôncio. A proposta se baseava nas diferentes taxas de dissociação dos complexos formados entre os Mg(II) e Sr(II) o reagente trans-1,2-diaminociclohexanotetraacetato (CDTA), envolvendo o íon cúprico como sequestrador. O monitoramento da intensidade de cor devido ao complexo Cu-CDTA em dois pontos consecutivos com intervalos de tempos adequados permitiu a diferenciação dos analitos por meio de equações proporcionais.

O uso de dois detectores não é requerido pela estratégia de detecção multi-localizada. O detector é deslocado entre dois pontos do módulo de análises por meio de um injetor comutador. Assim, a zona de amostra é quantificada em pontos diferentes resultando em tempos de reação diferentes. Como proposta, Zagatto et al. (1992) determinaram Fe(II) e Fe(III) pela formação de ferroína. No primeiro ponto apenas Fe (II) era determinado, após a passagem da zona de amostra por este ponto, um agente redutor era adicionado para conversão de Fe(III) a Fe(II). Assim, com a mudança da posição da cubeta de detecção para o segundo ponto, a soma da contribuição dos dois analitos era mensurada, e as concentrações individuais eram determinadas por diferença.

Outra estratégia envolve parada de fluxos, na qual a zona de amostra é retida na cubeta de detecção por um tempo pré-determinado e várias medidas referentes a tempos diferentes são realizadas enquanto a reação química se desenvolve. Com base nisso, Kagenow e Jensen (1983) exploraram as diferentes taxas de dissociação dos complexos de cálcio e magnésio com (2.2.2) criptato. O complexo de magnésio se dissocia rapidamente enquanto o de cálcio se dissocia de forma relativamente lenta, permitindo assim a análise por cinética diferencial.

Procedimentos explorando a inserção de uma alíquota de amostra suficientemente grande para gerar gradientes de concentração podem também ser mencionados. Ao longo do percurso analítico a amostra sofre dispersão e, na região interfacial entre a zona de amostra e o fluxo transportador, gradientes de concentração são formados. Cada fração da amostra apresenta então um estágio intermediário da reação, um grau de diluição, e um diferente tempo de processamento (TROJANOWICZ, 2000).

Neste sentido, Betteridge e Fields (1978) exploraram pioneiramente a formação de gradientes de pH ao longo da zona da amostra na determinação de misturas multielementares. Os resultados obtidos demonstraram a possibilidade da criação de condições viáveis para determinações multielementares ao longo de uma única zona de amostra. Posteriormente, estes mesmos autores (1981) exploraram gradientes de pH na determinação de misturas binárias. A complexação dos íons metálicos sob diferentes valores de pH, combinada à formação destes gradientes nos sistemas de análises em fluxo, permitiram registros de sinais contendo informações analíticas que permitiram a discriminação matemática e a consequente determinação dos analitos em amostras sintéticas.

Muller e colaboradores (1990) propuseram a determinação simultânea de Fe(II) e Fe(III) baseada nos diferentes comportamentos cinético-catalíticos destes íons na reação redox entre verde de leucomalaquita e peroxodissulfato, em presença ou ausência de ativador 1,10-fenantrolina: uma reação química é muito rápida enquanto a outra é relativamente lenta, o que viabilizou a proposta de um método cinético diferencial. Dois procedimentos foram apresentados: no primeiro uma cubeta dupla era utilizada para medida de sinal analítico em diferentes tempos inserindo-se alíquotas da mesma amostra em dois percursos diferentes; no segundo a formação de picos duplos era explorada, como resultado do estabelecimento de uma zona de amostra longa no fluxo reagente. O primeiro pico formado refletia apenas a concentração de Fe(II) na ausência de ativador, enquanto o segundo refletia a soma das concentrações de Fe(II) e Fe(III) na presença de ativador, pois os complexos formados por ambos apresentam coeficientes de absortividade similares.

Analogamente, técnicas "sandwich" envolvem a inserção de amostra entre duas soluções transportadoras de composições diferentes. Esta possibilidade foi originalmente demonstrada por Alonso e colaboradores (1987) que projetaram um analisador em fluxo com recalibração contínua. A amostra era inserida entre duas soluções-padrão e os reagentes apropriados eram inseridos posteriormente. Para determinações simultâneas, as duas soluções transportadoras apresentavam composições diferentes em relação a valores de pH ou presença de agentes mascarantes para promover a reação química de interesse.

Duas interfaces diferentes eram estabelecidas entre a amostra e as soluções transportadoras. O procedimento foi utilizado para a determinação conjunta de Fe(II) e de Fe(III) em águas naturais (ALONSO et al., 1989). O reagente 1,10-fenantrolina era adicionado ao longo da zona de amostra interagindo com Fe(II) presente. A alíquota de amostra que fora inserida entre água e uma solução de ácido ascórbico a 1,0% (m/m) apresentava duas interfaces. Na interface zona de amostra/água, o sinal correspondente refletia apenas a concentração de Fe(II); por outro lado, na interface entre a zona de amostra e ácido ascórbico, Fe(III) era convertido a Fe(II), o que permitia a determinação da concentração total de Fe.

A exploração de gradientes de concentração, cinética diferencial e calibração multivariada foi proposta por Fortes e colaboradores em 2006. Ferro e vanádio foram determinados pela inserção de uma alíquota de amostra em um fluxo transportador reagente (iodeto). Ao longo do percurso, gradientes de concentração eram gerados e após adição por confluência de dicromato, o produto triiodeto era predominante nas porções iniciais e finais da zona de amostra. As medidas de absorbância eram realizadas ao longo da zona de amostra refletindo o progresso reacional, pois cada porção da zona dispersa se caracterizava por um grau diferente de diluição, de tempo de processamento e de proporção razão analito/reagente, e os dados gerados eram tratados por regressão parcial por mínimos quadrados. A inovação foi posteriormente aperfeiçoada com a redução no número de medidas consideradas ao longo da zona de amostra (FORTES et al., 2010). Isso foi possível inserindo-se três alíquotas da amostra em um único fluxo transportador: a mútua dispersão das zonas estabelecidas resultava em uma zona complexa de amostra com máximos e mínimos de concentrações localizadas. Apenas as medidas referentes a estes pontos, caracterizadas por melhor repetibilidade, eram consideradas. A inovação foi aplicada à análise de ligas metálicas. Em ambas aplicações, as altas concentrações dos analitos permitiram a inserção de alíquotas pequenas de amostra. No entanto, determinações em que a sensibilidade é um fator limitante envolvem menor dispersão da amostra e, neste caso, outras maneiras de adição do reagente devem ser investigadas. Este aspecto parece ainda não ter sido estudado.

2.2. Aspectos cinéticos

Os métodos cinéticos podem ser definidos como "qualquer procedimento analítico no qual a etapa de medida é infuenciada por um processo transiente" (PARDUE, 1989). Uma classe de relevância dentre os métodos cinéticos, são os métodos catalíticos, os quais se

baseiam no estabelecimento de uma relação de proporcionalidade entre a taxa da reação catalisada e a concentração de catalisador.

Estes métodos geralmente são baseados em abordagens de medições e processamento de dados explorando estratégias de tempo fixo ou de taxa inicial (PARDUE, 1989). Este último tem sido implementado nos sistemas de análises em fluxo com paragem da zona de amostra dentro da cubeta de detecção. Assim, informações cinéticas são obtidas, permitindo se estimar a inclinação da função absorbância vs tempo, em geral proporcional à concentração do analito. Na abordagem de tempo fixo a concentração da amostra é determinada em função do incremento em sinal analítico durante um intervalo de tempo pré-determinado (INGLE; CROUCH, 1971). Para isso, explora-se a paragem da zona de amostra no percurso analítico, antes de atingir a cela de detecção ou emprega-se um percurso analítico suficientemente longo para permitir que o desenvolvimento da reação seja mensurável. A maioria dos métodos analíticos explora a estratégia de tempo fixo, uma vez que o fluxo não precisa ser interrompido e o controle do tempo disponível para reação depende apenas das vazões e das dimensões do percurso analítico. Porém, maior dispersão é observada para maiores percursos analíticos (HERNÁNDEZ, 2013).

Uma das características vantajosas dos métodos cinéticos de análises em relação aos métodos onde os equilíbrios químicos são alcançados é a possibilidade de se realizar determinações simultâneas de espécies com base nas suas diferentes taxas de reação com um reagente em comum, ou seja, desenvolver métodos cinético-diferenciais (SASAKI, 2011). Nestes métodos, melhor diferenciação entre os sinais referentes aos analitos são obtidos quando as taxas de reação são mais diferenciadas. Porém, não é fácil encontrar sistemas químicos em que, sob condições experimentais específicas, podem ser estabelecidas diferenças suficientes entre duas ou mais taxas reacionais, facilitando as determinações simultâneas. Outras variáveis podem então ser utilizadas para melhorar a discriminação, tais como temperatura, pH, tipo e concentração de reagente e catalisador, força iônica, etc. Ainda, outras estratégias podem ser usadas para discriminar os sinais analíticos dos diferentes catalisadores em uma mesma análise, obtendo-se múltiplas respostas que podem ser resolvidas por métodos adequados. Neste aspecto, ferramentas matemáticas frequentemente empregadas em calibração multivariada podem ser aplicadas (OLIVIERI, 2015).

Quando há diferenças pronunciadas entre as taxas reacionais, a variação em sinal analítico é praticamente devida a apenas uma espécie que está reagindo, pois as outras ou já reagiram completamente ou reagem tão lentamente que não contribuem significativamente para a modificação do sinal analítico (KAGENOW; JENSEN, 1983). Por outro lado, se a razão das constantes de velocidade é muito pequena, diferentes estratégias podem ser aplicadas. Aquelas explorando mascaramento envolvem o deslocamento do equilíbrio de uma espécie interferente de modo que esta não reaja na presença da espécie de interesse, por exemplo, pela conversão do interferente em um complexo com alta estabilidade (QUENCER; CROUCH, 1993). Neste sentido, a determinação simultânea de molibdênio e tungstênio foi possível pela supressão do efeito catalítico de W(VI) na oxidação de iodeto por peróxido de hidrogênio em meio ácido (GERVÁSIO et al., 2006). Duas alíquotas de amostra eram inseridas e, em umas dessas, citrato era adicionado, formando um complexo altamente estável com tungstênio. Assim, em uma das alíquotas apenas molibdênio era determinado e na outra, a soma de ambos os analitos era quantificada.

Alterações na cinética reacional podem ser exploradas quando existe a possibilidade de alterar o tipo de reagente usado a fim de incrementar as diferenças em taxas reacionais. Quando os sinais analíticos não podem ser separados em um grau suficiente pelos métodos acima, emprego do método das equações proporcionais tem sido utilizado. Equações proporcionais são aplicadas quando as espécies envolvidas, em qualquer momento da reação, interagem a uma taxa constante independentemente das concentrações iniciais destas. Em qualquer momento, a quantidade de produto formado é diretamente proporcional à concentração inicial das espécies (GARMON; REILLEY, 1962). Para aplicação da estratégia empregando sistemas de equações proporcionais, é imperativo que os sinais devidos aos diferentes analitos sejam aditivos.

Sendo a concentração de produto formado diretamente proporcional à concentração inicial do analito, o desenvolvimento da reação pode ser observado por parâmetros proporcionais ao produto tais como absorbância, condutividade elétrica, dentre outros. Em determinações multielementares, este método é geralmente utilizado para quantificar o produto formado após dois tempos diferentes da reação de dois analitos com um reagente em comum, a diferentes taxas de reação. Cobre e níquel foram determinados em digeridos de plantas aliando cinética diferencial com detecção multi-localizada (VENDRAMINI et al., 2006). As informações analíticas obtidas em dois tempos diferentes pela relocação do detector no percurso analítico foram tratadas matematicamente por meio de duas equações.

Equações proporcionais são aplicadas com eficiência na resolução de misturas binárias pela resolução de duas incógnitas (concentrações) a partir de duas equações, e os coeficientes angular e linear associados a estas equações são estimados a partir de calibração univariada. As determinações em sistemas de análises por injeção em fluxo são caracterizadas por procedimentos de calibração univariada, onde a resposta analítica (altura ou área dos picos) é

correlacionada ao teor de analito. Este tipo de calibração não pode ultrapassar a presença de contribuições interferentes para a resposta, de modo que a sua aplicação depende da existência de uma resposta seletiva para o analito (SAURINA; HERNÁNDEZ-CASSOU, 2001) e como resultado, uma resposta é obtida para cada amostra.

Matrizes de dados por amostra podem ser obtidas e o tratamento dos dados pode ser realizado empregando-se calibração multivariada (OLIVIERI, 2014), de forma que procedimentos de cálculos matriciais sejam conduzidos. Esta tem sido aplicada por meio de modelagem matemática com sucesso na resolução simultânea de misturas, estabelecendo-se uma relação entre os dados de informação a partir das medidas instrumentais e as concentrações das amostras (OLIVIERI, 2008). Dados multivariados podem ser gerados a partir detectores multicanal ou de varredura, análises por cinética diferencial, exploração de gradientes de concentração, etc (SAURINA, 2010).

Na etapa de calibração são estabelecidas relações matemáticas entre as matrizes X (sinais analíticos) e Y (concentrações), a partir das amostras de concentrações conhecidas. Após isso, é realizada a etapa de validação que otimiza a relação no sentido de uma melhor descrição dos analitos de interesse, com a avaliação na habilidade de previsão do modelo.

A forma mais comum de definir a habilidade de predição de um modelo é pela raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP, do inglês *root mean-square error of prediction*). Este compara as concentrações previstas pelo modelo com as concentrações verdadeiras (BARROS NETO et al., 2001).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}}$$

onde, \hat{y} = valor previsto pelo modelo; y = valor da propriedade; n = número de amostras.

2.3. Determinação de molibdênio

A importância de molibdênio em plantas e as baixas concentrações em que este é encontrado têm impulsionado o desenvolvimento de métodos para determinação deste envolvendo diferentes técnicas, tais como *e.g.* a espetrofotometria UV-Vis, a fluorimetria, a espectrometria de absorção atômica eletrotérmica ou em chama óxido nitroso-acetileno, a espectrometria de emissão óptica ou a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, a voltametria, a potenciometria e a amperometria (PYRZYNSKA, 2007; DENG et al., 2011; FERREIRA et al., 2005; TROJANOWICZ et al.,

1986). A espectrofotometria UV-Vis tem sido aplicada com frequência, principalmente em vista da simplicidade e dos menores custos envolvidos.

Existem muitos métodos disponíveis para a determinação espectrofotométrica de molibdênio (PYRZYNSKA, 2007). O método convencional explora a formação de um complexo colorido Mo(VI) com tiocianato em meio ácido na presença de um agente redutor, formando uma espécie química com máximo de absorção em 462 nm. A sensibilidade deste método pode ser aumentada pela extração deste complexo em solventes orgânicos. Alternativamente, outros reagentes têm sido empregados, tais como rodamina G6 (FILIK et al., 2004), ditiol (BERMEJO-BARRERA et al., 1987), N,N-bis(2-hidroxi-5-bromobenzil)1,2 diaminopropano (KARA; KARADAS, 2015), vermelho de alizarina (ALKAN et al., 2003), vermelho de pirogalol (PELIT et al., 2013), dentre outros. Porém, a aplicação destes reagentes a amostras agro-ambientais requer frequentemente etapas de separação-concentração do analito.

Para as análises acima mencionadas, métodos catalíticos têm sido propostos, por que não requerem etapas de separação-concentração em função de sua alta sensibilidade. Neste sentido, o efeito catalítico de Mo(VI) tem sido explorado em métodos envolvendo a oxidação de espécies orgânicas ou aniônicas, tais como vermelho de pirogalol (ENSAFI; HAGHIGHI, 1998), ácido 4-amino-3-hidroxi-naftalenosulfônico (PHANSI et al., 2014), 2-aminofenol (MOHAMED et al., 2002), L-ácido ascórbico (HARITA et al., 2003), iodeto (FANG; XU, 1983) por peróxido de hidrogênio.

O método empregando a oxidação de iodeto por peróxido de hidrogênio em meio ácido como reação indicadora foi pioneiramente apresentado por Yatsimirskii e Afanas'Eva (1956 apud CAMAÑAS et al., 1990¹). A reação indicadora é descrita pela Eq. 1.

 $H_2O_2 + 2\Gamma + 2H^+ \rightarrow I_2 + 2H_2O \dots \dots (1)$

O iodo formado, em excesso de iodeto, é convertido ao íon complexo triiodeto, conforme a Eq. 2, o qual é monitorado em 350 nm. A diferença entre as absorbâncias referentes à reação catalisada e não catalisada é idealmente proporcional à concentração de molibdênio na amostra.

¹ YATSIMIRSKII, K. B.; AFANAS'EVA, L. P. Zh. Anal. Khim. v. 11, p. 319, 1956.

O procedimento original era realizado manualmente e envolvia a medida de absorbância após 10 min (FUGE, 1970). Posteriormente outros procedimentos analíticos foram desenvolvidos com esta mesma reação (SVEHLA, 1963; HADJIIOANOU, 1966).

A necessidade de rígido controle temporal levou à implementação do método em analisadores automáticos com fluxo segmentado (FUGE, 1970; BRADFIELD; STICKLAND, 1975; QUIN; WOODS, 1979). A determinação de molibdênio em digeridos de plantas foi possível com uma etapa de separação preliminar deste em α -benzaldoxima e clorofórmio, e a interferência de Fe(III) remanescente foi contornada por complexação com fluoreto (BRADFIELD; STICKLAND, 1975). Quin e Woods (1979) observaram, entretanto que, com altas concentrações de Fe(III), a interferência devida a este íon metálico variava de um dia para outro e de uma amostra para outra. Os autores concluíram que esse efeito é resultado da redução parcial de Fe(III) a Fe (II) quando iodeto é adicionado a amostra antes do peróxido e propuseram a alteração na ordem de adição desses reagentes.

Fang e Xu (1983) propuseram a combinação sistema de análises por injeção em fluxo método catalítico, visando a determinação de Mo(VI) em águas naturais. Os autores utilizaram medidas cinéticas com tempo fixo, uma vez que a parada de fluxos se mostrou inviável devido ao efeito pronunciado da reação não catalisada, registrando altos valores para a linha base. A interferência de Fe(III) foi suprimida ajustando-se o pH das amostras na faixa de 5 a 9. Nesta faixa, ocorre a formação de óxido de ferro(III) por hidrólise, com formação de coloração amarela das soluções. As absorbâncias eram então corrigidas para cada amostra, em função do sinal referente ao branco. O método foi aplicado a análises de águas naturais na faixa de 1 a 1000 μ g L⁻¹ Mo(VI). O limite de detecção, o desvio-padrão relativo dos resultados para 13 μ g L⁻¹ Mo(VI), e a frequência analítica foram estimados como 0,7 μ g L⁻¹, 1,9 % e 90 h⁻¹, respectivamente.

Outras estratégias têm sido adotadas para minimizar / eliminar a interferência de Fe(III) na determinação de molibdênio. Pessenda et al. (1988) propuseram a incorporação de uma coluna de troca iônica no módulo de análises para remoção de potenciais interferentes, dentre os quais Fe(III). Observou-se sorção em torno de 10 % de molibdênio na resina. Uma etapa de eluição com 2,0 mol L⁻¹ de cloreto de amônio era necessária após 40 medições. Para a faixa de concentrações de 1,0 a 40,0 μ g L⁻¹ Mo(VI), a frequência de amostragem foi de 40 h⁻¹ e o desvio padrão relativo foi estimado como < 2%.

Bejan (1999) determinou Mo(VI) em vinhos brancos. Fe(III) foi removido das amostras em uma etapa preliminar com coluna de troca iônica. As concentrações de molibdênio foram estimadas pelos métodos da tangente, tempo fixo e absorbância fixa. As concentrações de Mo(VI) encontradas nos vinhos brancos se situaram na faixa entre $1,77 \ge 10^{-7} \ge 1,83 \ge 10^{-7} \mod L^{-1}$.

Andrade e colaboradores (1991) estudaram a influência dos principais parâmetros envolvidos na reação descrita pela Eq. 1 e otimizaram o sistema analítico empregando otimização multivariada. Posteriormente, estes autores Andrade et al. (1993) determinaram molibdênio em plantas. Devido aos potenciais interferentes presentes na amostra, inclusive Fe(III), uma etapa de extração com α -benzaldoxima e clorofórmio foi introduzida no preparo da amostra. Para a faixa de trabalho de até 50 µg L⁻¹ Mo(VI), o limite de detecção foi de 1,0 µg L⁻¹ e desvios padrão relativos próximos a 1,0% foram estimados.

A fim de se evitar etapas prévias de separação, Carrilho et al. (1995) utilizaram ácido sulfosalisílico como agente mascarante para contornar a interferência de Fe (III). O complexo salicilato de ferro (III) formado era monitorado em 490 nm, permitindo a determinação de Fe(III) na amostra de forma a corrigir a interferência no sinal de Mo(VI) em 350 nm. Assim, foi possível a determinação simultânea de molibdênio e ferro em digeridos de plantas e de alimentos, na faixa de até 100 μ g L⁻¹ Mo(VI) em presença de até 25 mg L⁻¹ Fe(III) com limites de detecção de 0,6 μ g L⁻¹ para Mo(VI) e 0,2 mg L⁻¹ para Fe(III). O desvio-padrão relativo e a frequência de amostragem foram < 2% e 50 h⁻¹.

Além de Fe(III), outras espécies têm sido determinadas simultaneamente com Mo(VI). Liu et al. (1995) determinaram molibdênio e tungstênio em amostras de relevância mineralógica e geológica, empregando um sistema de análises por injeção em fluxo com três alças de amostragem, duas para a amostra e uma para solução de ácido cítrico, complexante de W(VI). Este ácido interagia com apenas uma das zonas de amostra estabelecidas, de forma que dois picos eram registrados, refletindo a concentração de molibdênio (adição de ácido cítrico) ou a concentração de ambos os analitos. A faixa de trabalho foi linear entre $2,0 \times 10^{-7}$ a $3,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para os dois analitos, com limites de detecção de 4 x 10^{-8} e 6×10^{-8} mol L⁻¹ para Mo(VI) e W(VI), respectivamente.

3. MATERIAIS

3.1. Equipamentos e acessórios

- Espectrofotômetro UV-Vis modelo USB 4000 de fabricação Ocean Optics (Dunedin FL, USA), equipado com fibras ópticas P400-1 para transporte da radiação, fonte de radiação modelo Halogen HL-2000, cubeta de fluxo de 10 mm caminho óptico e 80 uL de volume interno;
- Bomba peristáltica Ismatec IPC-4 V2.00 equipada com tubos de bombeamento de Tygon;
- Injetor comutador em acrílico (KRUG et al., 1986);
- Linhas de transmissão, alças de amostragem e reatores tubulares helicoidais constuídos com tubos polietileno de diâmetro interno 0,8 mm;
- Software SpectraSuite (fabricante: Ocean Optics) para aquisição e tratamento dos dados. Monitoramento do produto formado em 410 nm. Tempo de integração fixado em 16 ms, com médias de 4 leituras e alisamento (do inglês "smoothing") dos sinais obtidos baseado em média móvel de 4 pontos;
- *Software* Matlab versão 7.0, disponibilizado pela Universidade de São Paulo, contendo o PLS *toolbox* versão 4.0.2 para calibração e validação dos modelos.

3.2. Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada (resistividade > $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) produzida em sistema MilliQ, e reagentes de grau analítico.

A solução-padrão estoque, 1000 mg L⁻¹ Mo(VI), foi preparada em 0,014 mol L⁻¹ HNO₃ a partir da dissolução de heptamolibdato de amônio tetrahidratado. A partir dessa solução, preparou-se uma solução intermediária, 1,00 mg L⁻¹ Mo(VI), a partir da qual foram tomadas alíquotas apropriadas para o preparo das soluções-padrão de trabalho.

A solução-padrão estoque, 1000 mg L^{-1} Fe(III), foi preparada em 0,14 mol L^{-1} HNO₃ a partir da dissolução de nitrato férrico. A partir dessa solução, preparou-se uma solução intermediária, 100,0 mg L^{-1} Fe(III), a partir da qual foram tomadas alíquotas apropriadas para o preparo das soluções-padrão de trabalho.

As soluções-padrão de trabalho eram preparadas em 0,014 mol L^{-1} HNO₃, de forma a conter ambos os analitos nas faixas de concentrações: 6,25 a 50,00 µg L^{-1} Mo(VI) e 0,50 a 7,00 mg L^{-1} Fe(III), conforme Tabela 1.

A solução 0,04 % (m/m) de peróxido de hidrogênio era preparada diariamente pela diluição da solução comercial concentrada (30 % m/m), a qual foi padronizada por titulação (MORITA; ASSUMPÇÃO, 1988). A solução 3,5 % (m/v) de iodeto de potássio foi preparada em água e a solução 0,15 mol L^{-1} de ácido sulfúrico foi preparada a partir de diluição apropriada de solução 1,0 mol L^{-1} H₂SO₄.

As soluções para estudo dos potenciais interferentes (Tabela 6) foram preparadas em $0,014 \text{ mol } L^{-1} \text{ HNO}_3$, a partir de pentóxido de vanádio, cloreto de alumínio, óxido de magnésio, dihidrogeno-fosfato de sódio, óxido de manganês, dicromato de potássio e nitrato de cálcio.

Solução	Molibdênio µg L ⁻¹	Ferro mg L ⁻¹	Solução	Molibdênio µg L ⁻¹	Ferro mg L ⁻¹
1	0,00	0,00	13	25,0	1,00
2	6,25	0,00	14	25,0	3,00
3	12,50	0,00	15	25,0	7,00
4	25,00	0,00	16	50,0	1,00
5	50,00	0,00	17	50,0	3,00
6	0,00	0,50	18	50,0	7,00
7	0,00	1,00	*19	20,0	2,00
8	0,00	3,00	*20	40,0	2,00
9	0,00	7,00	*21	30,0	4,00
10	12,5	1,00	*22	30,0	6,00
11	12,5	3,00	*23	45,0	3,50
12	12,5	7,00			

Tabela 1 - Concentrações de Mo e Fe nas soluções empregadas para calibração e validação do modelo matemático.

* soluções empregadas na etapa de validação do modelo.

3.3. Amostras

As amostras de águas naturais foram coletadas nos rios Jaguari, Ribeirão das Posses e Camanducaia e as amostras de água da chuva eram resultantes de escoamento superficial, tendo sido cedidas pelo Laboratório de Ecologia Isotópica do CENA. Estas foram filtradas utilizando membrana de acetato celulose de 0,45 μ m, a acidez foi ajustada para 0,014 mol L⁻¹ HNO₃ e as mesmas foram conservadas sob refrigeração.

As amostras de folhas foram secas em forno (60 °C até peso constante) e cominuídas em moinho de facas. 5,000 gramas do material vegetal seco foram ponderados em cadinhos de porcelana e incinerados durante 4 horas a 550 °C. Após arrefecimento, 10 ml de ácido nítrico 0,1 mol L⁻¹ foram adicionados e então levado para secagem a 60 °C. O resíduo foi retomado com porções sucessivas de solução de ácido nítrico 0,014 mol L⁻¹, filtrado através de papel de filtro Whatman e o volume completado em balão volumétrico de 50 ml.

4. MÉTODO

É bem conhecida a interferência de Fe(III) na determinação espectrofotométrica de Mo(VI) pelo efeito catalítico deste na oxidação de iodeto por peróxido de hidrogênio. Esta interferência se manifesta de forma aditiva (CARRILHO et al., 1995), mesmo em baixas concentrações de Fe(III), superestimando o sinal analítico de Mo(VI). O efeito catalítico de ambos foi explorado neste trabalho para a determinação simultânea destes. Os analitos atuam como catalisadores na formação de triiodeto $[I_3]^-$ que absorve na região ultravioleta do espectro eletromagnético com um máximo de absorção em 350 nm. Com o intuito de operar na região visível do espectro eletromagnético, optou-se por conduzir o monitoramento em 410 nm, assumindo-se uma diminuição em absorbância de aproximadamente 30% (BRADFIELD; STICKLAND, 1975).

Os principais parâmetros que alteram a taxa reacional foram avaliados em ausência e na presença de cada analito, visando o desenvolvimento de um procedimento analítico sensível, com máxima discriminação entre os sinais analíticos de Mo(VI) e de Fe(III).

4.1. Diagrama de fluxos

O sistema de análises por injeção em fluxo (Figura 1) utilizado para o estudo da influência dos principais parâmetros envolvidos foi projetado com base nos experimentos desenvolvidos por Carrilho et al. (1995). Inicialmente, a amostra é aspirada através da alça de amostragem L₁ e seu excesso é descartado. Os reagentes R₁ (peróxido de hidrogênio) e R₂ (iodeto de potássio) são adicionados ao percurso analítico por confluência, e a zona de amostra com os reagentes flui pela bobina reacional em direção ao detector. Na ausência da amostra, este fornece o sinal referente à reação não catalisada, representada pela linha base registrada. Ao se acionar o injetor-comutador para a posição de injeção, a alíquota de amostra inserida no fluxo transportador (0,014 mol L⁻¹ HNO₃), converge com os reagentes R₁ e R₂, e a reação ocorre na bobina reacional. O pico registrado reflete então o desenvolvimento da reação catalisada, e é proporcional ao teor de analito na amostra. Neste trabalho, altura de pico foi considerada como a base das medidas.



Figura 1 - Diagrama de fluxos do sistema inicial. A: amostra; L: alça de amostragem (900 μ L); B: bobina reacional (250 cm); D: detector (410 nm); R₁: peróxido de hidrogênio a 0,4 mL min⁻¹; R₂: iodeto de potássio a 0,8 mL min⁻¹; T: fluxo transportador (0,014 mol L⁻¹ HNO₃) a 1,6 ml min⁻¹. Área hachurada: posição alternativa do injetor-comutador.

Para a determinação simultânea de molibdênio e ferro, o sistema de análises em fluxo (Figura 2) foi projetado de forma que a discriminação entre os analitos fosse ressaltada. Para isto, uma configuração que permita a inserção de duas alíquotas de amostra foi proposta. Para tal, duas alças de amostragem ($L_1 e L_2$) foram utilizadas e um reator entre elas foi adicionado para gerar uma zona de amostra complexa com sobreposição parcial dos picos. Em uma das alíquotas, ácido sulfúrico foi adicionado por aspiração diferencial.



Figura 2 - Diagrama de fluxos do sistema proposto. A: amostra; L_1 e L_2 = alças de amostragem; B_1 = bobina separadora; B_2 = bobina reacional; R_1 : peróxido de hidrogênio a 0,4 mL min⁻¹; R_2 : iodeto de potássio a 0,8 mL min⁻¹; R_3 : ácido sulfúrico a 0,4 mL min⁻¹; T: fluxo transportador (0,014 mol L⁻¹ HNO₃) a 1,6 ml min⁻¹

Em trabalhos anteriores (FORTES et al., 2006; 2010; SASAKI, 2011), a discriminação cinética foi proporcionada inserindo-se alíquotas de amostra em um fluxo transportador-reagente, criando uma zona de amostra complexa com diferentes gradientes de concentrações. Duas estratégias de adição dos reagentes (A e B) para formação de gradientes foram testadas:

A – Inserção da amostra em fluxo transportador-reagente. Foram avaliadas quatro configurações, com a inserção da amostra em:

- iodeto com adição de peróxido por confluência;
- peróxido com adição de iodeto por confluência;
- mistura de ambos os reagentes acima;
- fluxo transportador com acidez mais alta (0,04 0,4 mol L⁻¹).

B – Emprego da configuração em linha única, com adição de um reagente (R_1 ou R_2) na zona de amostra, e adição do outro na solução transportadora, ou vice-versa.

A inserção de reagente na zona de amostra foi inicialmente avaliada adicionando-se R_1 ou R_2 por aspiração diferencial nas duas alças de amostragem. Enquanto um reagente era adicionado na zona de amostra, o outro era adicionado por confluência. Um modelo matemático foi construído para ambos os casos, a fim de se avaliar a discriminação entre os analitos. Optou-se, posteriormente, pelo estabelecimento de duas zonas reacionais diferentes, o que foi possível adicionando-se R_3 em apenas uma alça de amostragem, como mostrado na Figura 2.

Em todas as estratégias a solução transportadora foi ácido nítrico 0,014 mol L⁻¹. Estas foram avaliadas realizando-se modificações apropriadas nos sistemas apresentados nas Figuras 1 e 2.

4.2. Influência dos principais parâmetros envolvidos

O sistema de análises em fluxo cujo diagrama de fluxos é mostrado na Figura 1 foi utilizado nos estudos iniciais para dimensionar os principais parâmetros envolvidos, visando aumento da sensibilidade na determinação de Mo(VI), e melhoria na discriminação entre os sinais analíticos referentes a Mo(VI) e a Fe(III).

4.2.1. Concentrações dos reagentes

O procedimento experimental empregado na etapa da definição das concentrações dos reagentes consistiu num planejamento fatorial completo 2^3 . As variáveis estudadas foram as concentrações de iodeto, de peróxido de hidrogênio e de ácido nítrico. Foram realizadas três replicatas do ponto central, em um total de 11 experimentos. Os níveis mínimo e máximo de concentração selecionados foram 1,5 e 3,5 % (m/v) KI; 0,01 e 0,04 % (m/m) H₂O₂ e 0,007 e 0,30 mol L⁻¹ HNO₃.

4.2.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional

Os parâmetros vazão total (soma das vazões de T, $R_1 e R_2$) e comprimento da bobina reacional influenciam diretamente no tempo disponível para reação. O tempo de reação foi variado em função destes dois parâmetros, e um planejamento fatorial 3² foi realizado para tal. A vazão total foi modificada entre 1,8 e 3,8 mL min⁻¹ variando-se a velocidade de rotação da bomba peristáltica e o comprimento da bobina reacional foi modificado entre 150 e 350 cm.

4.2.3. Natureza e concentração do ácido

Os efeitos da adição de ácidos clorídrico, sulfúrico, perclórico ou nítrico na sensibilidade foram avaliados para ambos os analitos. Estes ácidos foram individualmente adicionados (0,30 mol L⁻¹) nas soluções de peróxido de hidrogênio (R_1 – Figura. 1).

As taxas reacionais de Mo e Fe em função do tempo, relativamente a dois meios diferentes (ácidos sulfúrico e nítrico a 0,014 mol L⁻¹) foram avaliadas com a paragem da zona de amostra na cubeta de detecção, sendo o progresso da reação observado por 1 min. As inclinações das curvas cinéticas obtidas em função das concentrações dos analitos estão apresentadas na Figura 6.

Após se selecionar ácido sulfúrico como reagente R_3 , sua concentração foi investigada no intervalo de 0,014 a 0,30 mol L⁻¹.

4.2.4. Comprimentos das alças de amostragem e da bobina separadora

Os comprimentos das alças de amostragem L_1 e L_2 que definem os volumes inseridos de amostra, e da bobina separadora B_1 (Figura 2), que define a distância entre as duas alíquotas de amostra foram avaliados (Tabela 5). Os níveis mínimo e máximo para L_1 e L_2 foram 60 e 160, e para B_1 , 60 e 100 cm.

O critério para o dimensionamento dos volumes inseridos de amostra e o do intervalo entre as duas alíquotas foi o modelo matemático resultante, o qual deveria apresentar os menores erros de previsão, avaliados como RMSEP (THOMAS, 1994).

4.3. Espécies interferentes

Os principais interferentes que influenciam na taxa de oxidação de iodeto por peróxido de hidrogênio foram avaliados. Para isto, cada espécie química interferente em potencial foi sequencialmente adicionada a soluções contendo 20,0 μ g L⁻¹ Mo(VI) + 2,0 mg L⁻¹ Fe(III), sendo a solução resultante analisada empregando-se o sistema da Figura 2. As concentrações de molibdênio e ferro foram previstas e os erros de previsão calculados na presença e ausência da espécie interferente.

4.4. Desenvolvimento do modelo matemático

No que se refere ao desenvolvimento dos modelos, estes foram construídos utilizandose PLS. Os dados foram organizados sob forma de matrizes. A matriz $X_{n,m}$ de variáveis independentes era composta pelos dados experimentais de absorbância, onde cada *n* representava uma amostra e cada *m* um ponto considerado na zona de amostra. A matriz $Y_{n,p}$ continha as variáveis dependentes, neste caso as concentrações dos analitos, onde cada linha *n* representava uma amostra e cada coluna *p* um analito. Como pré-processamento, os dados das matrizes X e Y foram auto-escalados (FERREIRA et al., 1999). A média era calculada em cada coluna da matriz de variáveis independentes, então, cada valor experimental era subtraído da respectiva média e dividido pelo respectivo desvios-padrão.

Posteriormente à calibração, era realizada a validação cruzada segundo o método *leave* one out (HAALAND et al., 1988). Uma amostra por vez era retirada do conjunto de treinamento, e o modelo era construído com as demais. Esse procedimento era repetido até que os modelos tivessem sido construídos com todas as retiradas de amostras realizadas. Os erros de calibração eram, então, estimados pela raiz quadrada média dos erros de validação cruzada (RMSECV, do inglês *root mean square error of cross-validation*). O número de variáveis latentes para cada modelo foi definido levando-se em consideração as porcentagens de variância capturadas e os erros de validação cruzada atrelados a ele.

A capacidade de previsão do modelo escolhido foi verificada comparando-se os resultados obtidos por adição e recuperação dos analitos pelo método proposto e por ICP OES. Concentrações conhecidas dos analitos 10,0 e 20,0 μ g L⁻¹ Mo(VI) e 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ Fe(III) foram adicionadas nas amostras de águas naturais.

4.5. Características analíticas

Definido o modelo que apresentava melhor discriminação entre os analitos, e estabelecido o dimensionamento para o sistema proposto, as principais características analíticas foram avaliadas. A estabilidade do módulo de análises foi verificada com o sistema mantido em operação por 4 h.

A frequência analítica foi calculada através da equação 3:

$$F = 3600 \text{ x} (t_{L})^{-1}$$
.....(3)

onde: F: frequência analítica (h^{-1}); t_L : tempo de limpeza, aqui definido como o intervalo de tempo entre os instantes correspondentes ao máximo do primeiro pico e o restabelecimento da linha base (a determinado nível pre-selecionado de *carry-over*) após o registro do segundo pico.

Considerando a frequência analítica, as vazões e as concentrações utilizadas, o consumo de reagentes foi estimado.

A repetibilidade dos sinais analíticos foi avaliada a partir da estimativa dos desviospadrão de 10 análises de uma amostra de água natural fortificada, levando-se em consideração os desvios dos dois picos e do vale, independente um do outro. A exatidão foi avaliada pela comparação entre as concentrações recuperadas dos analitos pelo método proposto e por ICP OES.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em sistemas de análises em fluxo com detecção espectrofotométrica, o sinal transiente monitorado é registrado sob forma de um pico normal ou invertido. Geralmente, a altura do pico é utilizada como resposta analítica. Porém, no que se refere a métodos catalíticos onde há reação catalítica e não catalítica, a altura do pico nem sempre representa o comportamento do analito frente ao parâmetro estudado, uma vez que a altura do pico inclui o sinal referente à reação não catalítica. Portanto, neste trabalho utilizou-se a sensibilidade (inclinação da curva analítica) como resposta analítica.

Experimentos preliminares envolvendo inserção de padrões mono e bi-elementares de Mo e Fe no sistema de análises em fluxo da Figura 1 confirmaram aditividade dos sinais analíticos, valores entre 98 e 102% sendo sempre obtidos.

Relativamente às estratégias para adição de reagentes, especificadas no item 4.1, a inserção de amostra no fluxo transportador-reagente (peróxido, iodeto, mistura de ambos ou ácido de maior concentração) do sistema da Figura 2, resultou em baixas concentrações deste nas porções centrais da zona de amostra. A linha base representada pela reação não catalisada apresentava maiores valores que a zona de amostra e um sinal transiente na forma de pico invertido foi observado, como mostrado na Figura 3, que se refere à inserção de solução 50,00 μ g L⁻¹ Mo(VI) em um fluxo transportador-reagente (R₂), e admissão de R₁ por confluência. O efeito da diluição dos reagentes na zona de amostra prevaleceu sobre o efeito catalítico impedindo a formação dos dois picos necessários para a quantificação.



Figura 3 - Registro do sinal analítico obtido pela inserção de amostra em um fluxo reagente.

Quando se tinha um reagente no fluxo transportador e outro na zona de amostra, picos distorcidos e com baixa reprodutibilidade eram observados impossibilitando a coleta de dados (Figura 4). Esta estratégia apresentou baixa sensibilidade uma vez que, o tempo disponível para reação era menor do que o tempo de residência no percurso analítico. A figura 4 se refere a adição de R1 por na zona de amostra solução 40,00 μ g L⁻¹ Mo(VI) e inserção desta em um fluxo transportador-reagente (R₂).



Figura 4 - Registro do sinal analítico obtido com a adição de R_1 na zona de amostra e inserção desta em transportador-reagente R_2 .

A adição de R₁ na zona de amostra e de R₂ por confluência (ou vice-versa) evitou os efeitos relatados acima. Dois picos bem definidos e sobrepostos eram formados com adição de apenas um reagente na zona de amostra enquanto o outro era adicionado por confluência. Entretanto, os valores de RMSEP obtidos para ambos os casos mostraram que a discriminação cinética não foi satisfatória. Isso se deve ao fato de a diferença entre efeitos catalíticos de Mo(VI) e Fe(III) não ser influenciada pelo modo de adição de reagentes, demonstrando a necessidade de mudanças mais significativas nas condições reacionais para evidenciar a discriminação cinética e, neste sentido, os principais parâmetros envolvidos foram estudados. De fato, a oxidação de iodeto por peróxido de hidrogênio tem sido frequentemente estudada para determinação de Mo (V. 2.3), porém não há relatos do comportamento do Fe(III) frente a esta oxidação. As condições que influenciam o desenvolvimento reacional em presença ou ausência dos analitos são então discutidas a seguir.

5.1.1. Concentrações dos reagentes

Os experimentos conduzidos conforme planejamento fatorial completo 2^3 demostraram o efeito causado no sinal analítico de Mo(VI) e Fe(III). O planejamento foi avaliado visando a obtenção de condições experimentais que levassem a maior sensibilidade na determinação de molibdênio, bem como máxima discriminação entre os analitos.

 Tabela 2 - Influência das concentrações de iodeto de potássio, peróxido de hidrogênio e ácido nítrico

Experimento	KI H_2O_2 HNO ₃ Sensibilidade Mo		Sensibilidade Fe		
_	(% m/v)	(% m/m)	$(\text{mol } L^{-1})$	Abs L μg ⁻¹	Abs L mg ⁻¹
1	1,5	0,010	0,0070	0,0007	0,014
2	3,5	0,010	0,0070	0,0012	0,028
3	1,5	0,040	0,0070	0,0010	0,025
4	3,5	0,040	0,0070	0,0020	0,050
5	1,5	0,010	0,30	0,0010	0,014
6	3,5	0,010	0,30	0,0013	0,029
7	1,5	0,040	0,30	0,0020	0,024
8	3,5	0,040	0,30	0,0036	0,046
9	2,5	0,025	0,15	0,0025	0,033
10	2,5	0,025	0,15	0,0025	0,033
11	2,5	0,025	0,15	0,0024	0,032

A sensibilidade da determinação de Mo(VI) foi priorizada em relação à de Fe(III), buscando-se então condições favoráveis à determinação do primeiro analito, uma vez que já se obtinha uma boa resposta analítica para Fe(III). Os resultados do planejamento fatorial demonstraram que, para os níveis máximos dos três parâmetros, havia um aumento em sensibilidade para Mo(VI) enquanto que, para Fe(III), não se observaram alterações significativas com relação à concentração do ácido. Em alguns casos, até mesmo uma perda de sensibilidade no nível máximo deste parâmetro foi observada. Já o aumento das concentrações de iodeto e peróxido levaram a um aumento de sensibilidade até seus níveis máximos testados.

Em termos de discriminação, os parâmetros foram avaliados segundo o efeito que estes causaram em cada analito, a fim de se definirem condições onde os analitos apresentassem comportamentos diferentes em resposta à mudança causada pela variação do nível de um determinado parâmetro. Quando a concentração de peróxido de hidrogênio foi modificada do nível mínimo para o máximo, verificou-se um aumento na sensibilidade tanto para molibdênio quanto para ferro, ou seja, com a alteração do nível deste parâmetro ambos analitos se comportaram de forma similar. O mesmo aconteceu relativamente à variação na concentração de iodeto. Para a concentração de ácido nítrico observou-se, em alguns casos, um aumento na sensibilidade para Mo(VI) e um decréscimo para Fe(III). Os experimentos 3 e 7 ilustram tal fato, onde a variação na acidez de 0,0070 para 0,30 mol L⁻¹ HNO₃ causou um aumento em sensibilidade para molibdênio (0,0010 para 0,0020 Abs L μg^{-1}) enquanto que, para Fe(III) não se observou variação significativa (0,025 para 0,024 Abs L mg⁻¹).

Os melhores resultados foram obtidos em níveis máximos para os três parâmetros, sugerindo que a faixa de trabalho deveria ser ampliada e um estudo mais detalhado ser realizado. Elaboração de um novo planejamento experimental envolvendo concentrações de iodeto e peróxido de hidrogênio acima dos níveis testados não se tornou necessário porque o aumento destas concentrações leva a um aumento pronunciado na taxa da reação não catalisada, obtendo-se valores de branco muito elevados. Além disso, altas concentrações de iodeto podem afetar a etapa de limpeza do sistema. A concentração de iodeto foi então fixada em 3,5 % (m/v) e a de peróxido, em 0,04 % (m/m).

5.1.2. Vazão total e comprimento da bobina reacional

Os experimentos executados de acordo com o planejamento fatorial completo 3² mostra a influência dos parâmetros acima sobre o sinal analítico de ambos os analitos. O comprimento da bobina apresenta uma influência positiva, pois variando de um nível mínimo para um nível máximo, tem-se um aumento na sensibilidade (Tabela 3). De fato, um aumento no percurso analítico proporciona maior tempo disponível para o desenvolvimento da reação. Este aumento de sinal da reação catalítica foi acompanhado por um aumento na reação não catalisada (branco). No que se refere à vazão total, esta apresenta influência negativa. Variando do nível mínimo para o nível máximo tem-se uma diminuição do sinal analítico, causada pela redução no tempo de reação e menor eficiência de mistura.

Experi- Mento	Comprimento do reator (cm)	Vazão total (mL min ⁻¹)	Sensibilidade Mo Abs L µg ⁻¹	Sensibilidade Fe Abs L mg ⁻¹	Frequência analítica (h ⁻¹)
1	150	1,8	0,0023	0,053	32
2	150	2,8	0,0015	0,038	52
3	150	3,8	0,0011	0,030	70
4	250	1,8	0,0032	0,064	28
5	250	2,8	0,0022	0,051	47
6	250	3,8	0,0017	0,042	61
7	350	1,8	0,0038	0,067	27
8	350	2,8	0,0029	0,061	42
9	350	3,8	0,0022	0,052	57

Tabela 3 - Influência do comprimento do reator e da vazão total

O comprimento da bobina reacional apresenta relação direta com o intervalo de tempo para o desenvolvimento das reações, porém comprimentos excessivos são indesejáveis, pois levam a um aumento da dispersão, prejudicando a frequência analítica (Tabela 3) e aumentando o consumo de reagentes (RUZICKA; HANSEN, 1988). Por outro lado, este não pode ser muito pequeno, para garantir uma mistura efetiva dos reagentes e minimizar ruídos no sinal analítico, especialmente no presente caso, onde se tem altas concentrações de iodeto. Estes efeitos deletérios foram observados para reator de 150 cm. Como compromisso entre condições de mistura, intervalo de tempo disponível para o desenvolvimento da reação e perda de sinal por dispersão resultando em aumento da frequência analítica, o comprimento da bobina foi selecionado em 250 cm e a vazão total em 2,8 mL min⁻¹.

5.1.3. Natureza e concentração do ácido

Embora a concentração do ácido seja um parâmetro que apresenta forte influência sobre a sensibilidade analítica, Andrade et al. (1993) relataram que a natureza deste não afeta significativamente o sinal analítico na determinação de Mo(VI). Como neste trabalho havia interesse na discriminação cinética, foram avaliados os efeitos dos ácidos clorídrico, sulfúrico, perclórico e nítrico. Na Tabela 4 são mostradas as sensibilidades obtidas para Mo(VI) e Fe(III) em presença dos diferentes ácidos.

Ácido	Mo(VI)	Fe(III)
Acido	Abs L μg ⁻¹	Abs L mg ⁻¹
HCl	2,66 x 10 ⁻³	0,0339
H_2SO_4	2,43 x 10 ⁻³	0,0060
HClO ₄	2,77 x 10 ⁻³	0,0349
HNO ₃	2,81x 10 ⁻³	0,0339

Tabela 4 - Influência da natureza do ácido nas sensibilidades para Mo(VI) e Fe(III)

A análise da Tabela 4 revela que a natureza do ácido não apresentou efeito significativo sobre a sensibilidade analítica referente a Mo(VI), uma vez que os valores de sensibilidades obtidos para os diferentes ácidos estudados foram muito similares entre si. Este efeito foi também observado para Fe(III), exceção feita a H₂SO₄. De fato, foi observada uma diminuição expressiva no valor de sensibilidade em presença deste ácido, com respeito aos outros ácidos. Isto parece não ter sido ainda relatado, e foi decisivo na discriminação entre ambos os analitos. A fim de se realizar um estudo mais completo do efeito da presença deste ácido no desenvolvimento da reação realizaram-se experimentos variando-se a sua concentração.

A Figura 5 mostra o aumento no sinal analítico de Mo(VI) causado pelo aumento da acidez, até 0,1 mol L^{-1} H₂SO₄ com um decréscimo de sinal para concentrações acima desta. Relativamente a Fe(III), o sinal analítico diminuiu com o aumento nas concentrações deste ácido, confirmando-se o efeito inverso nas catálises devidas a ambos analitos causado pelo aumento nesta concentração.



Figura 5 - Efeito da concentração de ácido sulfúrico sobre o sinal analítico de (a) Mo(VI) e(b) Fe(III).

As diferenças nas taxas reacionais para Fe(III) em presença de ácido sulfúrico foram evidenciadas avaliando-se o progresso da reação em função do tempo. As curvas cinéticas mostraram o aumento contínuo da absorbância monitorada com a formação do produto e as inclinações destas curvas em função das concentrações dos analitos são mostradas abaixo.



Figura 6 - Inclinações das curvas cinéticas obtidas em meios sulfúrico e nítrico. Para cada concentração de Mo(VI) à esquerda e de Fe(III) à direita, uma curva cinética foi obtida em função da concentração dos analitos, em (•) ácido sulfúrico 0,15 mol L^{-1} e (\blacktriangle) nítrico 0,014 mol L^{-1} .

Mo(VI) apresentou comportamento semelhante no tocante à formação de triiodeto, tanto em meio ácido nítrico, quanto em ácido sulfúrico. Porém, para Fe(III) observou-se que, em ácido sulfúrico, a reação catalisada procede mais lentamente em relação a ácido nítrico. Esse comportamento foi fundamental para a discriminação cinética entre os analitos, uma vez que torna-se possível a seleção de diferentes condições reacionais na mesma alíquota de amostra inserida no sistema analítico.

Em vista disso, uma configuração que evidenciava o estabelecimento de duas condições reacionais diferentes foi proposta (Figura 2). O ácido sulfúrico que já havia mostrado efeito como discriminante pela variação da concentração foi, então, utilizado e adicionado em apenas uma das alíquotas de amostra resultando em uma zona de amostra com gradientes de acidez mais pronunciados do que a outra. Com isso, as diferentes taxas das reações catalisadas por Mo(VI) e Fe(III) em meio ácido sulfúrico nortearam as discriminações e quantificações dos analitos através do estabelecimento de duas zonas reacionais diferentes. O sinal transiente obtido formado por dois picos e um vale é mostrado na Figura 7.



Figura 7 - Registro típico do sinal transiente gerado pela inserção de duas alíquotas de amostra. A figura se refere ao sistema da Figura 2, sendo 1: alíquota com adição de ácido sulfúrico; 2: sobreposição parcial das duas alíquotas; 3: alíquota sem adição de ácido sulfúrico A: branco; B, C, D: 12,5; 25,0; 50,0 μ g L⁻¹ Mo(VI); E, F, G: 1,00; 3,00; 7,00 mg L⁻¹ Fe(III).

5.1.4. Comprimento das alças de amostragem e bobina separadora

Os comprimentos das alças de amostragem (L_1 , L_2) e a distância (B_1) entre elas afetam diretamente o sinal transiente e, conseqüentemente, o modelo gerado. Para estudar o efeito destes parâmetros na discriminação entre os analitos, os erros de previsão RMSEP foram avaliados para modelos gerados em cada experimento variando independentemente L_1 , L_2 e B_1 (Tabela 5).

Experimento	L ₁	L ₂	B ₁ RMSEP Mo		RMSEP Fe
	(cm)	(cm)	(cm)	$(\mu g L^{-1})$	$(mg L^{-1})$
1	60	60	80	3,36	0,223
2	160	60	80	2,23	0,175
3	60	160	80	1,89	0,210
4	160	160	80	0,67	0,211
5	60	110	60	4,16	0,142
6	160	110	60	1,58	0,269
7	60	110	100	1,69	0,313
8	160	110	100	4,02	0,528
9	110	60	60	2,52	0,145
10	110	160	60	2,96	0,638
11	110	60	100	1,11	0,134
12	110	160	100	3,07	0,242
13	110	110	80	1,61	0,205
14	110	110	80	1,85	0,217
15	110	110	80	1,22	0,191

 Tabela 5 - Valores de RMSEP obtidos por modelos gerados a partir de experimentos com diferentes comprimentos de bobinas de amostragem e separadora

Observou-se uma tendência na diminuição do RMSEP para Mo com o aumento de L_1 . Diante disso, a condição experimental 4 que apresentava comprimentos de alças de amostragem L_1 e L_2 de 160 cm e bobina separadora 80 cm foi escolhida para análise de águas naturais. Embora no modelo gerado a partir desta condição o valor de RMSEP para Fe não tenha sido o menor, 0,211 mg L⁻¹, este modelo foi utilizado pois foi estimado o menor valor de RMSEP para Mo 0,67 µg L⁻¹. Maiores alças de amostragem são desejáveis e permitem aumento da resposta analítica devido a presença de maiores quantidades dos analitos. Este aumento favorece o desenvolvimento da reação e resulta em melhoria na sensibilidade, tornando a discriminação mais evidente devido às diferenças entre as taxas reacionais serem mais pronunciadas. Nesta condição experimental, a bobina separadora apresenta comprimento de 80 cm, como compromisso entre limitar sobreposição total entre os dois picos e não ocorrer perda de sinal do vale devido a uma separação pronunciada entre os picos.

5.2. Espécies interferentes

Foram estabelecidos limites máximos para as concentrações das espécies interferentes para os quais a adição causava uma modificação de até 10% na concentração prevista em relação a real para os analitos molibdênio e ferro. Com este critério, erros menores do que 10% eram obtidos, pois a influência do interferente se manifestava no intervalo de concentração entre os dois últimos valores testados. Os limites obtidos para todas as espécies interferentes foram maiores do que as concentrações destes geralmente encontradas em águas naturais (CONAMA, 2005), podendo-se então inferir que o procedimento proposto pode ser aplicado a águas naturais sem restrições no que se refere à seletividade analítica. No que se refere a análise de plantas, as concentrações de fósforo encontradas neste tipo de amostras estão acima do limite máximo tolerável para aplicação do método proposto.

Tabela 6. Seletividade. Concentrações toleráveis das espécies interferentes adicionadas a soluções de 20 μ g L⁻¹Mo(VI) + 2 mg L⁻¹ Fe(III).

Espécie	Concentração tolerável*/ mg L ⁻¹
Vanádio(V)	0,1
Alumínio(III)	50
Manganês(II)	100
Cromo(VI)	0,1
Di-hidrogeno fosfato	10
Magnésio(II)	250
Cálcio(II)	1000
Cobre(II)	1

* Concentração cuja adição causava um desvio de até 10% na concentração prevista

5.3. Desenvolvimento do modelo

Para todos os modelos gerados, duas variáveis latentes foram selecionadas, pois menores valores de RMSECV foram obtidos. Além disso, duas variáveis latentes foram suficientes para captura de mais de 98,0 % das variâncias.

O modelo escolhido não revelou a presença de amostras anômalas ("outliers") no conjunto de calibração ao nível de 95% de probabilidade, e apresentou boa habilidade de previsão, uma vez que os valores previstos foram concordantes com os valores reais.

A Figura 8 mostra as curvas de correlação entre as concentrações previstas e reais, para cinco soluções constituintes do conjunto de validação (n = 5), sendo os coeficientes de correlação estimados como 0,99717 e 0,99850 para Mo(VI) e Fe(III), respectivamente. Os valores RMSEP foram estimados com base nos erros obtidos a partir das previsões das concentrações destas soluções. Os erros provenientes da comparação entre as concentrações previstas e reais são apresentados na Tabela 7.



Figura 8 - Concentrações esperadas (abscissa) e previstas (ordenada) na etapa de validação. Porções à esquerda e à direita se referem a μ g L⁻¹ Mo(VI) e a mg L⁻¹ Fe(III).

-						
		Mo (VI)			Fe (III)	
-	Esperado	Previsto	Erro (%)	Esperado	Previsto	Erro (%)
_	$\mu g L^{-1}$	$\mu g L^{-1}$		$mg L^{-1}$	$mg L^{-1}$	
-	20	19,7	-1,5	2,0	2,2	10,0
	40	40,6	1,5	2,0	2,1	5,0
	30	29,2	-2,7	4,0	4,3	7,5
	30	30,7	2,3	6,0	6,2	3,3
	45	44,2	-1,8	3,5	3,7	5,7

Tabela 7 - Concentrações previstas e reais e erros associados a etapa de validação

O modelo otimizado foi aplicado na determinação dos analitos em amostras de digeridos de plantas. As concentrações encontradas pelo método proposto para molibdênio estiveram muito acima do que aquelas por ICP OES, enquanto que para ferro, estas estiveram abaixo do encontrado pelo método de referência. Esse efeito pode ser atribuído à presença de concentrações elevadas de interferentes neste tipo de matriz, e.g. fósforo.

Amostro	Método	proposto	ICP OES		
Amosua	$\frac{1}{100} \text{ Mo } \mu\text{g } \text{L}^{-1} \text{ Fe mg } \text{L}^{-1}$		Mo μ g L ⁻¹	Fe mg L ⁻¹	
Cana	$111,7\pm4,6$	$6,1 \pm 1,1$	$34,0 \pm 1,3$	$10,1 \pm 0,37$	
Café	$197,8\pm4,1$	$12,0\pm3,5$	$12,5 \pm 6,6x10^{-4}$	42,1 ± 3,1	
Soja	$273,2\pm6,8$	$6,8\pm3,2$	$48,5\pm 6,\!2x10^{4}$	$105,1\pm0,18$	

 Tabela 8 - Concentrações de Mo (VI) e Fe (III) em digeridos de plantas determinadas

 pelo método proposto e por ICP OES.

Os limites de detecção foram estimados como 0,88 μ g L⁻¹ Mo(VI) e 0,16 mg L⁻¹ Fe(III), não sendo adequados para análise de amostras de águas naturais, em que molibdênio se encontra em concentrações menores que o limite de detecção. Decidiu-se então pela adição dos analitos nas amostras, para verificação de possíveis efeitos matriciais. O modelo foi então utilizado na previsão das concentrações dos analitos adicionados às amostras. A porcentagem de recuperação dos analitos se situou entre 85 e 114% (Tabela 9), demonstrando ausência de efeito de matriz.

Tabela 9 - Resultados referentes aos ensaios de adição / recuperação envolvendo amostras de águas naturais fortificadas. Valores adicionados e concentrações dos analitos determinadas pelo método proposto, em μ g L⁻¹ e mg L⁻¹, e taxas de recuperação, em %.

Amostra	Concentração				Recupera	ação / %
	Adici	ionada	Determin	nada		
	Mo	Fe	Мо	Fe	Mo	Fe
Rio Jaguari	10	2	$11,1 \pm 0,18$	$2,1 \pm 0,03$	111%	105%
	20	4	$22{,}7\pm0{,}16$	$3,7\pm0,02$	114%	92%
Ribeirão das Posses	10	2	$10,8\pm0,18$	$2,0\pm0,03$	108%	100%
	20	4	$20{,}4\pm0{,}49$	$3{,}5\pm0{,}08$	102%	88%
Água de escoamento	10	2	$10,8\pm0,11$	$1{,}9\pm0{,}02$	108%	95%
superficial	20	4	$21,3\pm0,20$	$3,4\pm0,03$	107%	85%
Rio Camanducaia	10	2	$9,8\pm0,22$	$2,1\pm0,05$	98%	105%
	20	4	$19,\!6\pm0,\!37$	$3,5 \pm 0,06$	98%	87%

Os resultados do método proposto foram comparados com os obtidos por ICP OES (Tabela 10) e a exatidão analítica verificada pelo teste *t-Student* pareado. Este indicou concordância ($t_{calculado}$ 1,58 < $t_{tabelado}$ 2,26) entre os métodos, ao nível de 95% de confiança para a determinação de molibdênio. Para ferro, o teste *t-Student* indicou discordância entre os métodos, assumindo a inexatidão para determinação deste analito.

Amostra	Método proposto		ICP OES	
	Mo µg L ⁻¹	Fe mg L ⁻¹	Mo µg L ⁻¹	Fe mg L ⁻¹
Rio Jaguari	$11,1 \pm 0,18$	$2,1 \pm 0,03$	$10,2 \pm 4,5 \times 10^{-5}$	2,8 ± 0,01
	$22{,}7\pm0{,}16$	$3{,}7\pm0{,}02$	$20,6 \pm 4,4x10^{-4}$	$4,8\pm0,04$
Ribeirão das Posses	$10,\!8\pm0,\!18$	$2,0\pm0,03$	$10,6 \pm 9,0x10^{-5}$	$2{,}6\pm0{,}01$
	$20{,}4\pm0{,}49$	$3{,}5\pm0{,}08$	$21,3 \pm 5,0x10^{-4}$	$4,7\pm0,06$
Água de escoamento superficial	$10,8\pm0,11$	$1,\!9\pm0,\!02$	$10,\!6\pm1,\!7x10^{\text{-5}}$	$2,1\pm0,02$
	$21,3\pm0,\!20$	$3,4\pm0,03$	$21,3 \pm 1,3 ext{x}10^{-4}$	$4,1\pm0,10$
Rio Camanducaia	$9,8\pm0,22$	$2,1\pm0,05$	$9,4 \pm 1,2 x 10^{-4}$	$2{,}7\pm0{,}01$
	$19,6\pm0,37$	$3,5\pm0,06$	$18,7 \pm 2,8 \times 10^{-4}$	$4,5\pm0,04$

Tabela 10 - Resultados comparativos. Concentrações de moliblênio e de ferro em águas naturais determinadas pelo método proposto e por ICP OES.

5.4. Características analíticas

O sistema proposto não apresentou oscilação ou deriva na linha base durante períodos de operação de quatro horas. Boa repetibilidade entre as leituras foi observada com desvios-padrão relativos menores do que 2 % para os dois picos, bem como para a mensuração realizada na região entre eles.

O intervalo de tempo entre os instantes de registro dos dois sinais máximos foi de 42 s e o tempo de limpeza foi de 53 s, a ca 1 % de "carry-over". Consequentemente, a frequência de amostragem potencialmente atingível foi calculada como 38 h⁻¹. Entretanto, um intervalo de tempo maior entre uma injeção e outra foi necessário para garantir a limpeza do módulo de análises, porque o injetor era manualmente operado. Desta forma, a frequência analítica prática foi menor do que aquela potencialmente atingível e verificou-se uma frequência analítica de aproximadamente 31 h⁻¹. Nesta situação, foram consumidos 54,0 mg de iodeto de potássio e 0,30 mg de peróxido de hidrogênio por determinação.

6. CONCLUSÕES

A determinação simultânea de Mo(VI) e Fe(III) empregando sistemas de análises por injeção em fluxo, aliando cinética diferencial com a ferramenta quimiométrica PLS foi demonstrada. Etapas de eliminação / minimização da interferência de ferro foram evitados e a viabilidade da exploração de gradientes de concentração em sistemas de análises em fluxo foi demonstrada. O presente trabalho mostrou a possibilidade de discriminação entre dois analitos com taxas de reação muito próximas pelo estabelecimento de duas zonas reacionais diferentes. A adição de ácido sulfúrico foi essencial para discriminação entre os analitos, principalmente devido à mudança no comportamento catalítico de Fe(III) na presença deste ácido.

Digeridos de plantas também foram avaliados como aplicação do modelo proposto. Porém, este se mostrou inexato devido ao efeito de matriz e a complexidade destas. Estudos com interferentes deverão ainda ser realizados, especialmente no que se refere à componentes majoritários e.g. fósforo. Diante disso, testes de adição e recuperação foram realizados em amostras de águas naturais e boas taxas de recuperação foram obtidas, sendo concordantes com ICP OES para determinação de Mo(VI).

REFERÊNCIAS

ANDERSON, L. Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate by flow injection analysis. Analytica Chimica Acta, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 123-128, 1979.

ANDRADE, J. C.; BRUNS, R. E.; EIRAS, S. P. Catalytic determination of molybdenum (VI) in plants using mono-segmented continuous-flow analysis and spectrophotometric detection. **Analyst**, London, v. 118, n. 2, p. 213-217, 1993.

ANDRADE, J. C.; EIRAS, S. P.; BRUNS, R. E. Study of the Mo(VI) catalytic response in the oxidation of iodide by hydrogen peroxide using a monosegmented continuous-flow system. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 255, n. 1, p. 149-155, 1991.

ALKAN, M.; KHARUN, M.; CHMILENKO, F. Spectrophotometric determination of molybdenum with Alizarin Red S in the presence of poly(sulfonylpiperidinylmethylene hydroxide). **Talanta**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 605-611, 2003.

ALONSO, J.; BARTROLI, J.; DEL VALLE, M.; ESCALADA, M.; BARBER, R. Sandwich techniques in flow injection analysis. Part 1. Continuous recalibration techniques for process control. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 199, p. 191–196, 1987.

ALONSO, J.; BARTROLI, J.; DEL VALLE, M.; BARBER, R. Sandwich techniques in flow injection analysis. Part 2. Simultaneous determination of iron(II) and total iron. Analytica Chimica Acta, Amsterdam, v. 219, p. 345–350, 1989.

BASAYIGIT, L.; DEDEOGLU, M.; AKGUL, H. The prediction of iron contents in orchards using VNIR spectroscopy. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Erzurum, v. 39, n. 1, p. 123-134, 2015.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Editora da Unicamp, 2001. 401 p.

BEJAN, D. Kinetic-catalytic-spectrophotometric determination of low concentrations of molybdenum in white wines. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 390, n. 1-3, p. 255-259, 1999.

BERMEJO-BARRERA, M. P.; VAZQUEZ-GONZALEZ, J. F.; BERMEJO-MARTINEZ, F. Extraction-spectrophotometric determination of molybdenum with toluene-3,4-dithiol. **Analyst**, London, v. 112, n. 4, p. 473-475, 1987.

BETTERIDGE, D.; FIELDS, B. Construction of ph gradients in flow-injection analysis and their potential use for multielement analysis in a single sample bolus. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 50, n. 4, p. 654-656, 1978.

BETTERIDGE, D.; FIELDS, B. The application of ph gradients in flow-injection analysis: A Method for Simultaneous Determination of Binary Mixtures of Metal Ions in Solution. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 132, p. 139-155, 1981.

BLANCO, M.; COELHO, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S.; REDÓN, M.; RIBA, J. Multi-component analysis of concentrated solutions by flow-injection analysis with zone sampling and partial least-squares resolution. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 259, p. 219-224, 1992.

BRADFIELD, E. G.; STICKLAND, J. F. Determination of molybdenum in plants by an automated catalytic method. **Analyst**, London, v. 100, n. 1186, p. 1-6, 1975.

CAMAÑAS, R. M. V.; MORA, I. D. M.; RAMOS, G. R.; ALVAREZ-COQUE, M. C. G. The catalytic-thermometric determination of molybdenum in steels based on the hydrogenperoxide iodide indicator reaction. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 158, n. 2, p. 215-224, 1990.

CARRILHO, E. N. V. M.; KRUG, F. J.; ZAGATTO, E. A. G. Correction of iron interface in the spectrophotometric flow injection catalytic determination of molybdenum in plants. **Talanta**, Amsterdam, v. 42, n. 12, p. 2021-2026, 1995.

CHALK, S. Bibliometrics. In: KOLEV, S. D.; McKELVIE, I. D. (Ed.). Advances in flow injection analysis and related techniques. Amsterdam: Elsevier, 2008. chap. 5, p. 111-125. (Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry, 54).

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução nº 357/05, de 17 de março de 2005. Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 53, p. 58-63, 18 mar. 2005. Disponível em: http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf. Acesso em: 10 set. 2015.

DAHL, J. H.; ESPERSEN, D.; JENSEN, A. Differential kinetic analysis and flow injection analysis: Part I. The trans-1,2-diaminocyclohexanetetraacetate complexes of magnesium and strontium, **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 105, p. 327-333, 1979.

DENG, P.; FEI, J.; ZHANG, J.; FENG, Y. Determination of molybdenum by adsorptive anodic stripping voltammetry of molybdenum-alizarin violet complex at an acetylene black paste electrode. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 124, n. 3, p. 1231-1237, 2011.

ENSAFI, A. A.; HAGHIGHI, A. Spectrophotometric reaction rate method for the determination of molybdenum by its catalytic effect on the oxidation of pyrogallol red with hydrogen peroxide. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, Berlin, v. 360, p. 535-538, 1998.

FANG, Z.; XU, S. Determination of molybdenum at μL^{-1} levels by catalytic spectrophotometric flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 145, p. 143-150, 1983.

FERNANDEZ, A.; GOMEZNIETO, M. A.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; VALCARCEL, M. A flow-injection manifold based on splitting the sample zone and a confluence point before a single detector unit. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 165, p. 217-226, 1984.

FERNANDEZ, A.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; VALCARCEL, M. Flow injection system for kinetic determinations based on the use of two serial injection valves. **Analyst**, London, v. 112, n. 6, p. 803-807, 1987.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calbração multivariada, um tutorial. **Química Nova,** São Paulo, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

FERREIRA, T. L.; KOSMINSKY, L.; BERTOTTI, M. FIA amperometric determination of molybdenum(VI) based on the catalysis of the hydrogen peroxide-iodide reaction. **Microchimica Acta**, Vienna, v. 149, n. 3-4, p. 273-279, 2005.

FILIK, H.; TUTEM, E.; APAK, R. Use of the molybdenum–thiocyanate–rhodamine 6G ternary complex for spectrophotometric molybdenum determination without extraction. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 505, n. 1, p. 77-82, 2004.

FORTES, P. R.; MENESES, S. R. P; ZAGATTO, E. A. G. A novel flow-based strategy for implementing differential kinetic analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 572, n. 2, p. 316-320, 2006.

FORTES, P. R.; FERES, M. A.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C. Sequential injections as an alternative to gradient exploitation for implementing differential kinetic analysis in a flow injection system. **Talanta**, Amsterdam, v. 81, n. 4–5, p. 1409-1412, 2010.

FUGE, R. An automated method for the determination of molybdenum in geological and biological samples. **Analyst**, London, v. 95, n. 1127, p. 171-176, 1970.

GARMON, R. G.; REILLEY, C. N. Kinetic analysis of mixtures by method of proportional equations. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 34, n. 6, p. 600-606, 1962.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial least-squares regression: a tutorial. Analytica Chimica Acta, Amsterdam, v. 185, p. 1-17, 1986.

GERVASIO, A. P. G.; FORTES, P. R.; MENESES, S. R. P.; MIRANDA, C. E. S.; ZAGATTO, E. A. G. An improved flow-injection system for spectrophotometric determination of molybdenum and tungsten in tool steels. **Talanta**, Amsterdam, v. 69, n. 4, p. 927-931, 2006.

GÓMEZ, V.; CALLAO, M. P. Multicomponent analysis using flow systems. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 26, n. 8, p. 767-774, 2007.

GONÇALVES, M. L. S. S. **Métodos instrumentais para análise de soluções**. 4. ed. Lisboa: Fundação Caloustre Gulbenkian, 2001. 1050 p.

HAALAND, D. M.; THOMAS, E. V. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 60, n. 11, p. 1193-1202, 1988.

HADJIIOANNOU, T. P. Microdetermination of molybdenum by an automatic reaction-rate method. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 35, p. 360-364, 1966.

HARITA, Y.; HORI, T.; SUGIYAMA, M. Air-segmented continuos-flow analysis for molybdenum in various geochemical samples. **Microchimica Acta**, Vienna, v. 142, p. 71-78, 2003.

HERNÁNDEZ, C. H. Métodos automáticos de análisis para la determinación de parámetros de interés ambiental. 2013. Tese (Doutorado) - Universitat de les Illes Balears, Palma, 2013.

INGLE, J. D.; CROUCH, S. R. Theoretical and experimental factors influencing accuracy of analytical rate measurements. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 43, n. 6, p. 697-701, 1971.

KAGENOW, H.; JENSEN, A. Differential kinetic analysis and flow injection analysis. Part. 3. The (2.2.2) criptatos de magnésio, cálcio e estrôncio. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 114, p. 227-234, 1980.

KAGENOW, H.; JENSEN, A. Kinetic determination of magnesium and calcium by stopped-flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 145, p. 125-133, 1983.

KARA, D.; KARADAS, C. A simple spectrophotometric method for the determination of trace levels od molybdenum using N,N'-bis(2-hydroxy-5-bromo-benzyl)1,2 diaminopropane. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Amsterdam, v. 147, p. 158-162, 2015.

KAWASHIMA, T.; NAKANO, S. Flow-injection analysis of trace elements by use of catalytic reactions. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 261, n. 1–2, p. 167-182, 1992.

KOLEV, S. D.; McKELVIE, I. D. (Ed.). Advances in flow injection analysis and related techniques. Amsterdam: Elsevier, 2008. 777 p. (Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry, 54).

KRUG, F. J.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E. A. G. Commutation in flow-injection analysis. **Analytical Sciences,** Tokyo, v. 17, n. 1, p. 181-186, 1986.

LIU, R. M.; LIU, D. J.; SUN, A. L.; LIU, G. H. Simultaneous determination of molybdenum and tungsten using a flow-injection system and without pre-separation. **Analyst**, London, v. 120, n. 2, p. 565-568, 1995.

LUKKARI, I.; LINDBERG, W. Multicomponent determinations in flow systems by partial least squares modeling. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 211, p. 1-10, 1988.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; VALCÁRCEL, M. Flow injection methods based on multidetection. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 5, n. 3, p. 71-74, 1986.

MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. 1. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MARTINELLI, M.; BERGAMIN FILHO, H.; ARRUDA, M. A. Z.; ZAGATTO, E. A. G. A new approach for wide-range flow-injection spectrophotometry: determination of cobalt in livestock mineral supplements, **Quimica Analitica**, Madrid, v. 8, n. 2, p. 153-61, 1989.

MOHAMED, A. A.; AHMED, S. A.; EL-SHAHAT, M. F. Catalytic spectrophotometric determination of molybdenum. **Monatshefte Chemie**, Vienna, v. 133, p. 31-40, 2002.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. Manual de soluções, reagentes e solventes. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1988. 627 p.

MULLER, H.; MULLER, V.; HANSEN, E. H. Simultaneous differential rate determination of iron(II) and iron(III) by flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 230, p. 113-123, 1990.

OLIVIERI, A. C. Analytical advantages of multivariate data processing. One, two, theee, infinity? **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 80, p. 5713-5720, 2008.

OLIVIERI, A. C. Analytical figures of merit: from univariate to multiway calibration. **Chemical Reviews,** Washington, DC, v. 114, p. 5358-5378, 2014.

OLIVIERI, A. C. Practical guidelines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 868, p. 10-22, 2015.

OTTO, M.; MUELLER, H.; WERNER, G. Selectivity of catalytic methods of determination. **Talanta**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 123-130, 1978.

PARDUE, H. L. Kinetic aspects of analytical chemistry. Analytica Chimica Acta, Amsterdam, v. 216, p. 69-107, 1989.

PELIT, L.; KOÇAK, S.; PELIT, F. O.; TURKMEN,H.; ERTAS, F. N. A spectrophotometric method for determination of molybdenum in water samples by using pyrogallol red and a water soluble ionic liquid. **Analytical Methods**, London, v. 5, p. 5792-5798, 2013.

PÉREZ-BENDITO, D.; SILVA, M. Kinetic methods in analytical chemistry. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1988.

PESSENDA, L. C. R.; JACINTHO, A. O.; ZAGATTO, E. A. G. Catalytic determination of molybdenum in plants by flow-injection spectrophotometry with ion-exchange separation. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 214, p. 239-245, 1988.

PHANSI, P.; HENRÍQUEZ, C.; PALACIO, E.; NACAPRICHA, D.; CERDÀ, V. Automated in-chip kinetic-catalytic method for molybdenum determination. **Talanta**, Amsterdam, v. 119, p. 68-74, 2014.

PYRZYNSKA, K. Determination of molybdenum in environmental samples. Analytica Chimica Acta, Amsterdam, v. 590, n. 1, p. 40-48, 2007.

QUENCER, B. M.; CROUCH, S. R. Multicomponent kinetic methods. Critical Reviews in Analytical Chemistry, Boca Raton, v. 24, n. 3, p. 243-262, 1993.

QUIN, B. F.; WOODS, P. H. Automated catalytic method for the routine determination of molybdenum in plant materials. **Analyst**, London, v. 104, n. 1239, p. 552-559, 1979.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses. Part 1. New concept of fast continuous-flow analysis. Analytica Chimica Acta, Amsterdam, v. 78, n. 1, p. 145-157, 1975.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analysis. 2. ed. New York: Wiley Interscience, 1988.

RUZICKA, J.; STEWART, J. W. B.; ZAGATTO, E. A. Flow injection analysis. Part IV. Stream sample splitting and its application to the continuous spectrophotometric determination of chloride in brackish waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 81, n. 2, p. 387-396, 1976.

SASAKI, M. K. Projeto e desenvolvimento de um sistema de análises químicas por injeção em fluxo para determinações espectrofotométricas simultâneas de cobre e de níquel explorando cinética diferencial e calibração multivariada. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SASAKI, M. K.; VICENTE, S.; GRASSI, V.; ZAGATTO, E. A. G. Differential reaction-rate methods in flow analysis. **The Open Analytical Chemistry Journal**, Beijing, v. 6, p. 28-38, 2012.

SAURINA, J. Flow-injection analysis for multicomponent determinations of drugs based on chemometric approaches. **Trends in Analytical Chemistry,** Amsterdam, v. 29, n. 9, p. 1027-1037, 2010.

SAURINA, J.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S. Quantitative determinations in conventional flow injection analysis based on different chemometric calibration statregies: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 438, n. 1–2, p. 335-352, 2001.

SVEHLA, G.; ERDEY, L. The use of Landolt reactions in quantitative microanalysis: II. Determination of traces of molybdenum by the hydrogen peroxide-iodide reaction. **Microchemical Journal**, New York, v. 7, n. 2, p. 221-232, 1963.

THOMAS, E. V. A primer on multivariate calibration. Analytical Chemistry, Washington, DC, v. 66, p. 796-804, 1994.

TROJANOWICZ, M.; HULANICKI, A.; MATUSZEWSKI, W.; PAŁYS, M.; FUKSIEWICZ, A.; HULANICKA-MICHALAK, T.; RASZEWSKI, S.; SZYLLER, J.; AUGUSTYNLAK, W. Flow-injection catalytic determination of molybdenum with blamperometric detection in a microprocessor-controlled system. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 188, p. 165-175, 1986.

TROJANOWICZ, M. Flow injection analysis: instrumentation and applications. 1. ed. Singapore: World Scientific, 2000.

VENDRAMINI, D.; GRASSI, V.; ZAGATTO, E. A. G. Spectrophotometric flow-injection determination of copper and nickel in plant digests exploiting differential kinetic analysis and multi-site detection. 2006. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 570, p. 124-128, 2006.

ZAGATTO, E. A. G.; BERGAMIN FILHO, H.; BRIENZA, S. M. B.; ARRUDA, M. A. Z.; NOGUEIRA, A. R. A.; LIMA, J. L. F. C.; Multi-site detection in flow analysis: Part 1. Relocation of spectrophotometric detector. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 261 n. 1–2, p. 59-65, 1992.