

546.77  
T 266 d  
res/mem



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“DETERMINAÇÃO CATALÍTICA DE MOLIBDÊNIO(VI) EM  
TECIDOS VEGETAIS EMPREGANDO DETECÇÃO  
ESPECTROFOTOMÉTRICA”**

**SISBI/UFU**



1000204756

**JURACI LOURENÇO TEIXEIRA**

**Uberlândia-MG**  
**fevereiro 2002**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**“DETERMINAÇÃO CATALÍTICA DE  
MOLIBDÊNIO(VI) EM TECIDOS VEGETAIS  
EMPREGANDO DETECÇÃO  
ESPECTROFOTOMÉTRICA”**

**MESTRANDO:**

**JURACI LOURENÇO TEIXEIRA**

**ORIENTADOR:**

**PROF. Dr. SEBASTIÃO DE PAULA EIRAS**

**UBERLÂNDIA-MG.**



Programa de Pós Graduação em Química- MESTRADO  
Instituto de Química – UFU  
Uberlândia/MG - Fone: (34) 3239-4385  
e-mail: [cpqquimica@ufu.br](mailto:cpqquimica@ufu.br)  
[www.cpgquimica.iqfu.ufu.br](http://www.cpgquimica.iqfu.ufu.br)

**ALUNO: JURACI LOURENÇO TEIXEIRA**

**NÚMERO DE MATRÍCULA: 5992406-X**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ANALÍTICA**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:**

**“DETERMINAÇÃO CATALÍTICA DE MOLIBDÊNIO (VI) EM  
TECIDOS VEGETAIS EMPREGANDO DETECÇÃO  
ESPECTROFOTOMÉTRICA”.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. SEBASTIÃO DE PAULA EIRAS**

A Dissertação foi **APROVADA** em reunião pública, realizada no Anfiteatro do Bloco X do Campus Santa Mônica, em 19 de fevereiro de 2002, às 14:00 horas, tendo como Banca Examinadora:

**NOME:**

**ASSINATURA**

Prof. Dr. Sebastião de Paula Eiras

(IQ/UFU)

Profa. Dra. Silvana Guillardí

(IQ/UFU)

Profa. Dra. Sheyla M.C. Máximo Bicalho (JHS-Lab.Quim/BH)

Uberlândia, 19 de fevereiro de 2002.

## **AGRADECIMENTOS**

### **A Deus**

Pela vida, saúde, amigos e pessoas que amo.

### **A meus Pais**

Pelo apoio incondicional, cobrando sempre pelo melhor caráter de seus filhos, pelo bem nosso bem e da sociedade.

### **A meus familiares**

Que mesmo estando distantes sempre querendo o melhor para a minha pessoa e o meu sucesso.

### **A Namorada *Fernanda***

Que sempre apoiou e esteve ao meu lado o tempo todo.

### **Ao Orientador *Sebastião***

Que muitas das vezes soube entender as dificuldades e com maestria sugeria novos caminhos, além é claro da infinita paciência.

### **Aos amigos da república *tabajaras; Leonardo, Eduardo, Cláudio, Tiago e Demais***

Que de alguma forma contribuíram na minha formação.

### **Aos colegas do LSPC; *Adriana, Fábio, Francislei, Juvenal, Natal, Ricardo e Wércio***

Que quando cobravam é porque sabiam que eu poderia contribuir com algo mais.

### **Ao Técnico; *Ildo***

Que muito contribuiu nas aberturas de amostras.

### **Ao programa de pós-graduação em química**

Que tornou possível a realização deste sonho.

### **Ao Instituto de química/UFU**

Que deu estrutura para as condições e realização das experimentações para a conclusão desta dissertação.

### **A Banca Examinadora**

Pelas contribuições finais.

## SUMÁRIO

Abstract.....	vi
Resumo.....	vii
Capítulo I.....	1
Introdução .....	2
Capítulo II.....	5
Revisão Bibliográfica .....	6
II.1- O Molibdênio e a Agricultura .....	6
II.2 - O Molibdênio, o Solo e as Plantas.....	6
II.3- Métodos de Determinação de Molibdênio.....	8
II.3-1 - Método do Ditiol .....	8
II.3-2 - Método do Tiocianato.....	9
II.3-3 - Método Absorção Atômica.....	9
II.3-4 - Método ICP-AES .....	10
II.3-5 - Métodos Catalíticos.....	10
II.4 - Extração por Solventes .....	13
II.5 - Metilisobutilcetona ( MIC ) .....	14
Capítulo III .....	16
Experimental.....	17
III.1.1 Procedimento sem extração de I <sub>2</sub> .....	17
III.1.2 Procedimento com extração de I <sub>2</sub> .....	17
III.2 - Estudos empregando o Procedimento sem extração de I <sub>2</sub> .....	18
III.2.1 - Estudo do Tempo de Reação.....	18
III.2.2 – Estudo da Concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> no meio.....	18
III.3 - Estudos empregando o Procedimento com extração de I <sub>2</sub> .....	18
III.3.1 - Estudo do Solvente Extrator .....	18
III.3.2 - Curva Analítica de Calibração.....	19
III.3.3 - Estudo de Precisão e Exatidão para a Metodologia proposta	19

Capítulo IV.....	20
Resultados e Discussão.....	21
IV .1- Considerações Iniciais.....	21
IV .2- Estudo do Tempo de Reação .....	23
IV .3- Estudo do Efeito de Concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Para a Reação.....	25
IV .4- Estudo da Extração de Iodo ( I <sub>2</sub> ) .....	27
IV .5- Considerações sobre o processo de Extração de I <sub>2</sub> com MIC.....	28
IV .6- Curva Analítica de Calibração .....	31
IV.7 - Estudo de Precisão e Exatidão para a Metodologia proposta .....	33
IV.7.1 – Tratamento Estatístico.....	34
IV.7.1.1 – Comparação de Precisão dos Métodos, teste “F” .....	34
IV.7.1.2 – Equivalência entre os Métodos, teste “t” .....	34
Capítulo V.....	36
Conclusão.....	37
- Pretensões Futuras.....	38
Apêndices.....	39
Capítulo VI .....	48
Bibliografia.....	49

## **CAPÍTULO - I**

## ABSTRACT

A procedure for espectrophotometric determination of molybdenum in plants tissues was developed, using a catalytic oxidation of iodide by hydrogen peroxide in acid medium.

In good conditions of work, a procedure used suggest aqueous solutions of the  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , KI and  $\text{H}_2\text{O}_2$  in concentrations of 0,010, 0,0060 and 0,0020 mol.dm<sup>-3</sup>, respectively. The reaction must be performed in a separatory funnel and, after ten minutes of reaction, the reaction product is iodine, wich is extracted adding 3,0x10<sup>-3</sup> dm<sup>3</sup> of metyl-isobutyl-ketone. The analytical signal is the difference between the absorbance obtained for catalysed reaction using molybdenum and the reaction uncatalysed. Individuals absorbance are obtained at 360 nm using a cuvette of 10 mm. The effects of the interferents (Fe, Ti, W, Cr, V and  $\text{PO}_4^{3-}$ ), are minimized by means of the extraction of molybdenum with  $\alpha$ -benzoinoxime, followed by previous treatment of sample.

The analytical calibration curve is linear from 10,0 to 60,0  $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  and is represented by  $\Delta\text{Abs} = 0,0085C_{\text{Mo}} - 0,011$ , with  $r^2 = 0,9918$ . The relative standard deviation varies in a range of 18,1 - 4,35%, in a concentration internal of 10,0 and 50,0  $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , respectively (started of 12 experiments were performed). The limit detection calculated presents a standard deviation of 1,7  $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , (started of 12 experiments were performed of reagent blank).

The precision and accuracy of the proposed methodology was estimated comparing a different method used for determination of the molybdenum in beans leaves *Faseolus Vulgaris*. Dithiol Colorimetric Methods is used as a standard method for comparision. The results were checked apply "F" and "t" statistic tests, wich shown that both methods present good results in a perfect agreement.



## RESUMO

Um procedimento para determinação espectrofotométrica de molibdênio em tecidos vegetais foi desenvolvido, usando a oxidação catalítica de iodeto por peróxido de hidrogênio em meio ácido.

Em condições ótimas de trabalho o procedimento sugerido emprega soluções aquosas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , KI e  $\text{H}_2\text{O}_2$  em concentrações de 0,010, 0,0060 e 0,0020 mol.dm<sup>-3</sup>, respectivamente. A reação deve ser processada em funil de separação e, após 10 minutos de reação, extrai-se o iodo formado com a adição de  $3,0 \times 10^{-3}$  dm<sup>3</sup> de metilisobutilcetona (MIC). O sinal analítico é a diferença entre a absorvância obtida para reação catalisada por molibdênio e a reação não catalisada e as absorvâncias individuais são obtidas a 360 nm em cela de 1cm de caminho óptico. Os efeitos de interferentes; Fe(III), Ti, W, Cr, V e  $\text{PO}_4$  são minimizados mediante extração de Mo com  $\alpha$ -benzoiloxima na etapa de tratamento prévio da amostra.

A curva analítica de calibração é linear até 60,0  $\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  e é descrita pela equação  $\Delta\text{Abs} = 0,0085C_{\text{Mo}} - 0,011$  e  $r^2 = 0,9918$ . O desvio padrão relativo variando de 18,1 e 4,35% para as concentrações de 10,0 e 50,0  $\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , respectivamente, determinado com 12 replicatas. O Limite de detecção calculado em relação ao desvio padrão de 10 replicatas do branco, é de 1,7  $\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

A precisão e exatidão da metodologia foi avaliada por comparação de métodos, na determinação de molibdênio em folhas de feijão *Faseolus Vulgaris*. Como método referência empregou-se o Método Colorimétrico do Ditiol. Aplicando os testes "F" e "t", para cinco medidas, concluiu-se que os dois métodos apresentam precisão e exatidão equivalentes, respectivamente.

## INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O molibdênio é um micronutriente de suma importância para os processos vitais das plantas<sup>1</sup>, pois está ligado ao processo bioquímico de fixação do nitrogênio molecular por organismos livres e bactérias em simbiose com leguminosas. Participa de funções bioquímicas na redução de nitrato a nitrito<sup>2</sup> e na biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas<sup>2</sup>.

Análises dos tecidos vegetais secos, em solos deficientes de molibdênio, revelam concentrações em torno de 0,1 µg/g, deste elemento. Portanto, estes níveis de concentração exigem que o método analítico para a sua determinação seja muito sensível, sendo mais comum a sua determinação com concentração em solventes orgânicos<sup>1</sup>.

A determinação de molibdênio no solo, ou em tecidos vegetais, é muito importante pois sendo ele um micronutriente, os índices de sua concentração em tecidos vegetais que limitam as condições de carência e toxidez é relativamente estreito<sup>1</sup>, 0,5 e 3,0 µg/g.

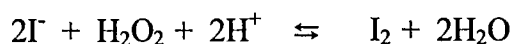
Concentrações de molibdênio em torno de 1,0 µg/g no tecido vegetal é considerado como adequado para a maioria das plantas cultivadas<sup>3</sup>. Por outro lado, teores de molibdênio no solo na faixa de 0,5 a 5,0 µg/g são valores normalmente encontrados. Entretanto, em análises de solo a determinação de molibdênio ainda não fornece informações com grande utilidade agrônômica, visto que sua disponibilidade não está diretamente relacionada com seu conteúdo total no solo<sup>4</sup>, conseqüentemente carência ou toxidez do vegetal é melhor verificado por análise foliar<sup>5,6</sup>. Assim, tão importante quanto a análise foliar é a análise para controle de qualidade dos adubos vegetais, que são empregadas para efetuar o suprimento do molibdênio na nutrição das plantas.

Dentre os diferentes métodos para a determinação analítica do molibdênio destaca-se os colorimétricos que empregam a complexação do molibdênio com tiocianato<sup>6,7</sup> ou com ditiol<sup>8</sup>. No entanto, emprega-se também determinação por espectrofotometria de absorção atômica após a complexação com tiocianato e extração com metilisobutilcetona<sup>9</sup>. Estes métodos apresentam um período de

execução relativamente elevado e exigem grande quantidade de material vegetal para análise, dificultando sua utilização rotineira em laboratórios.

Os métodos espectrofotométricos com atomização em forno de grafite<sup>10,11</sup> e emissão atômica com plasma induzido em argônio(ICP-AES)<sup>12,13</sup> também tem sido propostos com bons resultados, porém o alto custo da aparelhagem impossibilita os laboratórios de pequeno porte de executar determinações de molibdênio com fins agronômicos.

Uma alternativa para a determinação de molibdênio é a utilização do seu efeito catalítico na formação do iodo a partir de íons iodeto, pela água oxigenada<sup>14</sup>, cujo processo é dado pela seguinte reação:



Estudos tem mostrado que a reação, além de ser catalisada por Mo(VI), também é catalisada por certos metais, tais como, W, Ti, Nb, Ta, Zr, Hf, Th e Fe, no seu estado de oxidação mais elevado<sup>14,15</sup>. Este efeito catalítico que possibilita a determinação do metal, através da quantificação do produto de reação, I<sub>2</sub>, em meio aquoso.

Algumas das restrições dos métodos manuais que utilizam este procedimento catalítico para a determinação quantitativa de molibdênio reside na lentidão e da apurada execução manual do analista, o que em muitos casos compromete a reprodutibilidade dos resultados inviabilizando a aplicação da técnica como método para análise de rotina.

Para tornar viável a execução do método catalítico na determinação de molibdênio, tem sido investigado métodos contínuos segmentados<sup>16,17,18,19</sup>, não segmentados<sup>15,20</sup> e monosegmentado<sup>21,22</sup>. Estes métodos apresentam uma boa sensibilidade, repetibilidade e limite de detecção e atingem a frequência de 100-150 injeções de amostra por hora<sup>21</sup>. Além disso, estes métodos são simples e de baixo custo. Entretanto, devido a sua alta frequência analítica, colocar em funcionamento um sistema com estas características exige um acúmulo de amostras no laboratório relativamente grande para que seja economicamente viável a sua implementação.

Assim, sua aplicação para determinações de molibdênio em laboratórios com baixa demanda de amostras é inviável.

Uma proposta alternativa é reunir em uma só metodologia a facilidade de operação e o relativo baixo custo dos métodos de extração com determinação colorimétrica, a alta sensibilidade e baixo limite de detecção dos métodos catalíticos, porém ainda viável mesmo para um número reduzido de amostras.

Assim, neste trabalho, propõe-se um procedimento para determinação espectrofotométrica de molibdênio, empregando o efeito catalítico de Mo(VI) na oxidação de iodeto por peróxido de hidrogênio em meio ácido, com interrupção da reação, por extração com metilisobutilcetona, do produto I<sub>2</sub> formado na reação.

## **CAPÍTULO – II**

## Revisão Bibliográfica

### II.1 - O molibdênio e a agricultura

O molibdênio é um elemento considerado nutriente por ser essencial para o crescimento das plantas, e por se encontrar disponível em baixas concentrações é um micronutriente<sup>1,5</sup>. Os micronutrientes são considerados biocatalisadores responsáveis pela síntese das substâncias vegetais<sup>23</sup>.

O estudo da importância biológica do molibdênio teve seu início com Bortels em 1930, quando este mostrou que o elemento é altamente benéfico na fixação de nitrogênio pelas bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico Azobacter chroococcum e Clostridium pasteurianum e mais tarde estudos comprovaram que era também essencial às plantas superiores<sup>1,2,24</sup>.

A importância do molibdênio está relacionada não só com a fixação de nitrogênio, mas também como integrante de algumas enzimas envolvidas em reações bioquímicas necessárias ao metabolismo das plantas<sup>1,2,24</sup>. A sua disponibilidade na solução solo está relacionada à alguns fatores tais como pH e matéria orgânica e, principalmente, tipo da rocha matriz e o seu estágio de intemperização quando da utilização do solo<sup>1,5</sup>.

### II.2 - O molibdênio, o solo e as plantas

A presença de molibdênio no solo está na faixa de 0,5 a 5,0 $\mu\text{g/g}$ , dissolvido na solução de solo, adsorvido nas partes carregadas do solo como molibdato, quelado na matéria orgânica ou retido na rede cristalina de minerais<sup>4</sup>. Apesar de aparecer nestas condições nem todo este molibdênio está disponível para as plantas, onde os níveis médios disponíveis estão em torno de 0,2  $\mu\text{g/g}$ <sup>1,6</sup>. No Brasil estudos realizados<sup>25</sup> mostram que está em torno de 0,01 a 0,16  $\mu\text{g/g}$ , porém, ainda não se tem condições de avaliar e comparar a quantidade de molibdênio nas varias regiões do País.

O molibdênio dissolvido no solo encontra-se em maior quantidade na forma de ácido molíbdico, ( $\text{H}_2\text{MoO}_4$ ) não dissociado, para valores de pH abaixo de 2. Com o aumento de pH aparece a forma dissociada de ( $\text{HMoO}_4^-$ ) e para pH de neutro a alcalino o íon molibdato ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) predomina<sup>26</sup>.

O efeito de adsorção do  $\text{MoO}_4^{2-}$  pelas plantas é afetado pela presença de íons alumínio e ferro, pois estes podem formar complexos com cargas positivas, aderindo ao ânion molibdato, dificultando assim a sua liberação para o meio e conseqüentemente a adsorção<sup>5</sup>.

Concentrações de molibdênio encontradas nos tecidos vegetais na matéria seca em torno de 1  $\mu\text{g/g}$  mostram ser uma quantidade adequada do elemento, para o bom desenvolvimento das plantas cultivadas<sup>3</sup>. A absorção de molibdênio pela planta, dá-se juntamente com outros minerais e é favorecida pela presença de molibdato na solução de solo<sup>5</sup>. A sua ausência é notada nas folhas mais velhas, uma vez que a ausência do elemento no solo, faz com ele se desloque das folhas mais velhas para as mais novas, devido a sua grande mobilidade<sup>4</sup>.

O molibdênio, na forma de molibdato, participa como cofator das enzimas nitrogenase, redutase do nitrato e oxidase do sulfeto e atua no transporte de elétrons e hidrogênio nas reações bioquímicas das plantas, como nos processos de biossínteses de proteínas e ácidos nucléicos. A nitrogenase é uma enzima existente em organismos procariontes capazes de fixar nitrogênio molecular e nesta enzima existem sítios que necessitam de microelementos como o molibdênio e o ferro para que o processo seja ativado<sup>2,24</sup>.

A quantidade de molibdênio no solo não necessariamente tem que ser igual a quantidade encontrada na planta, uma vez que a planta pode armazenar o elemento, ou a quantidade existente no solo não estar disponível para a planta. A disponibilidade do molibdênio está relacionada a alguns fatores como pH, matéria orgânica, concentração na solução solo, ou em clusters onde esta não será disponibilizada para a planta, devendo a quantidade do mesmo ser determinada com a finalidade de oferecer resultados satisfatórios para uma boa resposta do elemento às plantas<sup>3</sup>.

A correção da deficiência deste elemento é feita pela adição de molibdatos na forma de adubação foliar e adição juntamente com outros fertilizantes no plantio<sup>25</sup>. Estudos realizados<sup>27</sup> mostram que com o sistema de pulverização das plantas com molibdênio teve-se um aumento na produtividade das plantas bem como na resposta de molibdênio presente nos tecidos vegetais em relação ao controle em culturas de feijão na região de Viçosa-MG.

A inclusão de molibdênio na adubação deve ser de forma controlada, pois um leve excesso do elemento pode induzir à toxidez. Este excesso produz nas plantas o sintoma de clorose. Entretanto antes de se perceber a clorose, os animais, principalmente os ruminantes apresentam distúrbios nutricionais, levando a uma molibdenose<sup>5</sup>.

### **II.3 - Métodos de Determinação de Molibdênio**

Devido a grande importância deste elemento, a busca por métodos para a sua determinação em diversas matrizes, vem sendo amplamente estudada. É possível encontrar vários métodos que detectam a presença de molibdênio, sejam eles colorimétricos, complexométricos e até os que utilizam maiores investimentos como absorção atômica com forno de grafite e emissão atômica com plasma induzido de argônio (ICP-AES).

#### **II.3-1 - Método do Ditiol**

O método baseia-se na formação de um complexo colorido obtido pela reação do molibdênio com 4-metil-1,2-dimercaptobenzeno (ditiol). O ditiolato de molibdênio  $[(CH_3.C_6H_3.S_2)_3Mo]$  é extraído em acetato de butila e a absorvância do complexo que é determinada a 680nm, indicará a quantidade de molibdênio presente<sup>28</sup>.

O Método tem sido estudado utilizando vários extratores, como éter isopropílico, tetracloreto de carbono<sup>8</sup>, acetato de butila<sup>28</sup>, benzeno e clorofórmio<sup>29</sup>, e acetato de isoamila<sup>30</sup>, tanto para extratos vegetais como para amostras geológicas. O



limite de detecção para o método varia de  $50\mu\text{g.L}^{-1}$  no trabalho de Quin e Brooks<sup>30</sup> a  $10\mu\text{g.L}^{-1}$  segundo Chan e Riley<sup>31</sup>.

### II.3-2 - Método do Tiocianato

O molibdênio, em meio ácido, forma com o tiocianato o complexo  $[\text{Mo}(\text{SCN})_5]$  que é extraído em metilisobutilcetona. A fase orgânica é então levada ao espectrofotômetro e determina-se a absorvância a  $470\text{ nm}^{32}$ . O ferro (III) é o principal interferente do método<sup>33,34</sup>. Ácidos como tartárico, cítrico e ascórbico tem sido estudados como acidificadores do meio<sup>35</sup>. Os extratores como acetato de etila<sup>36</sup>, misturas de solventes como álcool isoamílico e tetracloreto de carbono<sup>37</sup> e álcool butílico e tetracloreto de carbono<sup>6</sup>, tem sido estudados para substituir o metilisobutilcetona. O método usando como extrator a mistura do álcool isoamílico e tetracloreto de carbono, apresentou uma linearidade de  $0,10-10,0\text{ mg.L}^{-1}$  de molibdênio<sup>37</sup>.

### II.3-3 - Método Absorção Atômica

A determinação de molibdênio por absorção atômica, é feita em chama de óxido nitroso-acetileno, raia de absorvância  $313,3$ , o limite de detecção<sup>38,39</sup> em torno de  $30\mu\text{g.L}^{-1}$ . Entretanto, esta técnica é de pouco interesse pois a sensibilidade analítica é baixa, exigindo pré-concentração do molibdênio.

Absorção atômica com forno de grafite<sup>10</sup> também tem sido proposto e, para tecidos vegetais, apresenta um desvio padrão de 10%, para determinações de molibdênio a um nível de  $0,50\text{ mg.L}^{-1}$ .

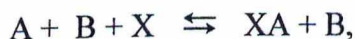
### II.3-4 - Método ICP-AES

A espectrofotometria de emissão atômica com plasma induzido em argônio (ICP-AES) já foi utilizado para determinação de molibdênio<sup>12,13,39</sup>. A determinação é precedida da extração seletiva do molibdênio com 8-hidroxiquinolina<sup>12</sup> cujo limite de detecção é 0,09 mg.L<sup>-1</sup> e para a análise multielementar sem extração seletiva<sup>12</sup> o limite de detecção é 0,10 mg.L<sup>-1</sup>.

### II.3-5 - Métodos Catalíticos

Uma reação que ocorre como na equação  $A + B \rightleftharpoons Z + Y$ , pode ter sua velocidade aumentada na presença de um catalisador.

Um catalisador X pode formar um complexo XA ( ou XB ) com um dos reagentes. O complexo formado reage então com o outro reagente, levando aos produtos ( Z e Y ) e o catalisador é liberado<sup>14</sup>.



A equação de velocidade de reação é dada por:

$$\frac{d[X]}{dt} = k(C_X^a \cdot C_A^b \cdot C_B^d),$$

A catálise homogênea é mais frequentemente usada nos métodos cinéticos de análise<sup>14</sup>, que podem ser divididos em métodos cinéticos catalíticos, enzimáticos e velocidade de reação diferencial<sup>40</sup>.

Dentre estes destacamos o método catalítico no qual busca-se a determinação do catalisador ou ativador / inibidor, relacionando alguma propriedade física do sistema com a quantidade (concentração) do catalisador.

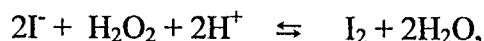
Os métodos quantitativos que podem ser usados para a determinação da concentração de substâncias em solução<sup>14</sup> são:

a) Método das tangentes – a concentração é determinada a partir da inclinação da curva obtida pela variação do tempo de reação contra uma função da concentração de substância indicadora.

b) Método do tempo fixo – a determinação da concentração é feita a partir de dados sobre a extensão da reação, após intervalos de tempos medidos, regularmente.

c) Método da concentração fixa – a determinação da concentração é obtida a partir de dados sobre o tempo requerido para atingir determinado ponto de reação.

Bejan<sup>41</sup> estudou a oxidação de iodeto por peróxido de hidrogênio em meio ácido, descrito pela equação de reação:



que na presença do catalisador Mo(VI) pode ser descrita pela seguinte expressão cinética:

$$\frac{d[\text{I}_2]}{dt} = k(C^a_{\text{Mo}} \cdot C^b_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot C^d_{\text{I}^-}) + k_1(C^{b'}_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot C^{d'}_{\text{I}^-}),$$

onde  $k_1$  é a constante de velocidade da reação não catalisada,  $k$  é a constante de velocidade da reação catalisada,  $a$ ,  $b$  e  $d$  indicam a ordem da reação com respeito a cada reagente e  $b'$  e  $d'$  são os coeficientes da reação não catalisada. Por outro lado foi verificado que a porção não catalisada da equação é praticamente zero, em função da reação catalisada, assim a equação que representa a expressão cinética se torna:

$$\frac{d[I_2]}{dt} = k(C^{a}_{Mo} \cdot C^{b}_{H_2O_2} \cdot C^{d}_{I^-}).$$

Os coeficientes **a**, **b** e **d** dependem das condições iniciais da reação e foram determinados como 1 (reação de 1ª ordem com respeito aos reagentes), ainda no trabalho conduzido por Bejan<sup>41</sup> em concentrações de peróxido superiores a  $1,5 \times 10^{-3}$ , **b** assume valor de 0, ou a ordem de reação com respeito a **b** é zero.

Em um estudo cinético Copper e Koubek<sup>42</sup>, mencionam a possibilidade de se formar complexos mono ou diperoxo. Bejan<sup>41</sup> com base nos resultados experimentais confirma que com o complexo formado do tipo Mo:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (complexo mono peroxo), a reação apresenta o melhor rendimento.

Diante das reações já estudadas por outros autores, nota-se que a reação de oxidação do iodeto por peróxido de hidrogênio em meio ácido, pode caracterizar os métodos catalíticos de análise, empregados em metodologias espectrofotométricas determinativas de Mo, os quais tem evoluído bastante a partir de Yatsimirsky<sup>14</sup>, onde aparecem métodos que determinam molibdênio na faixa de 0,1 a 8,0 µg.mL<sup>-1</sup> no trabalho de Huang et al<sup>43</sup>, 0,022-1000 µg.mL<sup>-1</sup> de Ensafi et al<sup>44</sup> e 0,002-0,036 µg.mL<sup>-1</sup> no trabalho de Ning<sup>45</sup>.

O método proposto por Yatsimirsky e Afanaseva<sup>46</sup>, baseia-se na mesma reação e para aumentar a sensibilidade da detecção, adiciona-se amido e lê-se a absorvância em intervalos de tempos adequados. O excesso de I<sup>-</sup> e o I<sub>2</sub> formado na reação, produzirá o complexo I<sub>3</sub><sup>-</sup> que na presença de amido permite a detecção espectrofotométrica a 575 nm<sup>47</sup>.

Por se tratar de método catalítico a reprodução do intervalo de tempo entre a mistura dos reagentes e a obtenção do valor do sinal analítico influencia de maneira significativa a repetibilidade dos resultados, quando o procedimento é executado em batelada.

Uma alternativa para aproveitar a alta sensibilidade alcançada pelos métodos catalíticos, sem o inconveniente de baixa repetibilidade dos resultados, é o uso de métodos de análise em fluxo<sup>15</sup>.

Os métodos de análise em fluxo surgiram com Skeggs<sup>48</sup> em 1957 e são métodos onde a concentração da espécie a ser analisada é medida continuamente sem interrupção do fluxo dos reagentes, apenas variando a amostra.

A determinação catalítica de molibdênio empregando a oxidação de iodeto por peróxido de hidrogênio em meio ácido e detecção de  $I_3^-$  a 350 nm em sistemas automáticos segmentados apresentam limite de detecção bastante variável, 0,003  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  por Bradfield e Stickland<sup>18</sup>, 0,2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  no trabalho apresentado por Fuge<sup>16</sup> e 0,1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  por Eivazi et alii<sup>17</sup>.

O mesmo sistema químico, porém usando análise em fluxo não segmentado foi proposto para determinação de molibdênio em vegetais digeridos com limite de detecção de 0,7  $\mu\text{g.L}^{-1}$  no trabalho de Zhao-lun e Shu-Kun<sup>20</sup> e 1,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  no trabalho de Pessenda et alii<sup>15</sup>.

O sistema de análise em fluxo contínuo mono-segmentado<sup>49</sup> também foi empregado para a determinação do molibdênio em tecidos vegetais<sup>22</sup>. Com esta metodologia alcança-se a velocidade de injeção de amostra de 120  $\text{h}^{-1}$ , linearidade até 50,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , limite de detecção de 1,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

#### II.4 - Extração por Solventes

Extração por solventes ou extração líquido-líquido é uma técnica de separação que utiliza um sistema binário de solventes, constituído por uma fase aquosa e uma fase orgânica idealmente imiscíveis entre si. Geralmente o sistema contendo as duas fases sofre agitação para aumentar a área de contato e assim facilitando a transferência da espécie a ser extraída para uma das fases<sup>50,51</sup>.

Na extração por solventes, o soluto distribui-se entre as duas fases imiscíveis obedecendo o equilíbrio de distribuição. A razão das concentrações do soluto nas duas fases é chamada coeficiente de distribuição,  $K_d$  onde<sup>50,51</sup>:

$$K_d = \frac{[S]_{org}}{[S]_{aq}}$$

$[S]_{org}$  e  $[S]_{aq}$  são as concentrações do soluto  $S$  após estabelecido o equilíbrio.

Na condição de equilíbrio, a razão da distribuição de  $S$  nas duas fases é uma constante e independente da quantidade de  $S$ . Para valor do coeficiente de distribuição  $K_d$  maior que 1 significa que o soluto tende a se transferir para a fase orgânica, e quanto maior este valor mais eficiente é a transferência.

A distribuição do soluto entre os solventes segue aproximadamente o princípio da solubilidade. Assim as moléculas neutras apolares ou fracamente apolares como o  $I_2$  tem fracas interações com os solventes polares como a água, distribuindo-se preferencialmente na porção apolar do sistema<sup>51</sup> (tal como o  $CCl_4$ ).

Em geral, quanto maior a semelhança entre as moléculas do soluto e moléculas do solvente extrator maior será o fator de extração e assim maior a quantidade do produto extraído. O fator de extração é dado por:

$$\%E = \frac{[S]_{org}}{[S]_{aq} + [S]_{org}} \times 100$$

## II.5 - Metilisobutilcetona ( MIC )

Também chamado 4-metil - 2 -pentanona, MIC, ou ainda hexona, é um solvente orgânico polar, parcialmente solúvel em água (2,15 mL em 100 mL de água)<sup>52</sup>, muito empregado em extrações por solventes.

Devido à sua polaridade, quando usado como solvente extrator, tanto pode participar do mecanismo de extração<sup>53</sup>, como pode facilitar a extração de complexos polares, já que a presença do átomo de oxigênio da carbonila, como um doador coordenante, causa provavelmente uma interação entre o soluto extraído e o solvente, aumentando deste modo a eficiência da extração<sup>54</sup>. Isto mostra, por exemplo que MIC pode complexar inclusive metais alcalinos terrosos como um ligante monodentado<sup>53</sup>.

Uma de suas características é a de promover a extração da espécie,  $I_2$ , na qualidade de agente polar solvatador, que como a água poderá não deslocar a região de absorvância do iodo no espectro de absorção, que tem o principal comprimento de onda a  $350\text{nm}^{47}$ . Por outro lado, o MIC pode reagir com iodo para formar o Iodofórmio, pois o MIC tem o grupo metil vizinho à carbonila, sendo que a reação de iodação ocorre em meio básico ou ácido<sup>55</sup>. Este efeito aumenta a eficiência da extração de iodo porém pode diminuir a sensibilidade de detecção espectrofotométrica devido ao consumo de iodo para formar o iodofórmio.

### **CAPÍTULO – III**



## EXPERIMENTAL

### III.1- PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

As soluções empregadas neste trabalho foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico e suas preparações estão descritas no Apêndice 1.

Neste estudo, dois procedimentos experimentais foram empregados: Procedimento sem extração de  $I_2$  e Procedimento com extração de  $I_2$ .

#### III.1.1- Procedimento sem extração de $I_2$

O procedimento experimental sem extração de  $I_2$  consiste na mistura, em béquer de 50,0 mL, das seguintes soluções aquosas: 5,0 mL de solução de Mo(VI) (ou solução amostra); 1,0 mL de solução de  $H_2SO_4$ ; 1,0 mL de solução de KI e 1,0 mL de solução de  $H_2O_2$ . A introdução do último reagente no meio define o tempo de referência para início de reação, isto é, tomamos este instante como tempo inicial (tempo zero). Pequenos movimentos circulares durante um minuto garantem a homogeneização da solução. Transcorrido o tempo de reação desejado, obtém-se a leitura de absorvância da solução à 350 nm, em um espectrofotômetro Metertek SP-850, cela cilíndrica de 1,0 cm de diâmetro.

#### III.1.2- Procedimento com extração de $I_2$

Para o procedimento experimental com extração de  $I_2$ , segue-se o procedimento anterior, substituindo o béquer para a reação por um funil de separação de aproximadamente 60 mL. Transcorrido o tempo de reação desejado adiciona-se um volume de 3,0 mL de solvente extrator, o metilisobutilcetona. Extraí-se o iodo e obtém-se a leitura de absorvância do iodo dissolvido em metilisobutilcetona a 360 nm, em um espectrofotômetro Metertek SP-850, cela cilíndrica de 1,0 cm de diâmetro.

## **III.2 - Estudos empregando o Procedimento sem extração de I<sub>2</sub>**

### **III.2.1 – Estudo do Tempo de reação**

Com o procedimento sem extração de I<sub>2</sub> e as soluções aquosas Mo(VI) a 0,1 µgcm<sup>-3</sup>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1,0x10<sup>-2</sup> moldm<sup>-3</sup>, KI a 6,0x10<sup>-3</sup> moldm<sup>-3</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 2,0x10<sup>-3</sup> moldm<sup>-3</sup>, estudou-se o tempo de reação com as leituras de absorvância tendo um branco de reagente como referência.

### **III.2.2 - Estudo da concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no meio**

Ainda com o mesmo procedimento e as mesmas condições empregadas no estudo do tempo de reação, estudou-se também a influência da concentração da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. De acordo com resultados obtidos o tempo de reação adotado foi de 10 minutos.

## **III.3 – Estudos empregando o procedimento com extração de I<sub>2</sub>**

### **III.3.1 - Estudo do solvente extrator**

No procedimento com extração de I<sub>2</sub>, tempo de reação de 10 minutos e concentrações das soluções Mo(VI) a 0,1 µgcm<sup>-3</sup>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1,0x10<sup>-2</sup> moldm<sup>-3</sup>, KI a 6,0x10<sup>-3</sup> moldm<sup>-3</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 2,0x10<sup>-3</sup> moldm<sup>-3</sup>, avaliou-se o comportamento do sistema frente ao solvente extrator metilisobutilcetona.

Inicialmente, após adição dos 3,0 cm<sup>3</sup> do solvente extrator e agitação por 1 minuto separou-se as fases e obteve-se um espectro de absorção de fase orgânica num espectrofotômetro HP-8453, cela de 1,0 cm de caminho óptico, contra um branco de solvente extrator puro.

Estudou-se também o procedimento de extração avaliando o período de agitação após a adição do solvente extrator. As medidas de absorvância a 360 nm,

nesse caso, foram obtidas no espectrofotômetro Meterteck SP-850 e cela cilíndrica de 1,0 cm de diâmetro.

### III.3.2 - Curva Analítica de Calibração

No experimento com extração de  $I_2$ , variou-se a concentração de molibdênio nos 5,0 cm<sup>3</sup> de solução, que foram inicialmente adicionados no funil de separação e empregou-se as seguintes condições: Soluções de ácido sulfúrico a  $1,0 \times 10^{-2}$  mol .dm<sup>-3</sup>, iodeto de potássio a  $6,0 \times 10^{-3}$  mol.dm<sup>-3</sup>, peróxido de hidrogênio a  $1,5 \times 10^{-3}$  mol.dm<sup>-3</sup> e adição de 3,0 cm<sup>3</sup> de metilisobutilcetona no tempo de reação de 10 minutos, para a extração e agitação do funil de separação para a extração.

### III.3.3 – Estudo de Precisão e Exatidão para a metodologia proposta

Este estudo foi realizado com amostras de feijão *Phaseolus Vulgaris*. Coletou-se as folhas de feijão conforme recomendação técnica<sup>56</sup>, em seguida procedeu-se a lavagem das mesmas com água e sabão e duas lavagens com água desionizada. Secou-se em estufa à 80°C e macerou-as em almofariz e homogeneizou-as. Após a homogeneização estocou-as em frascos de polietileno.

O estudo de validação foi feito comparando-se os resultados de concentrações de molibdênio obtidos nas folhas de feijão empregando o procedimento com extração de  $I_2$ , proposto por nós, e o método Colorimétrico do Ditiol, descrito no Apêndice 2.

## **CAPÍTULO – IV**

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### IV.1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O sistema de análise em fluxo contínuo monossegmentado (AFCM) proposto por de Andrade et al.<sup>21,22</sup>, cuja configuração do sistema está representada na Figura 1, foi empregado para estabelecer as condições iniciais de concentrações dos reagentes no desenvolvimento da metodologia determinativa catalítica de molibdênio, que propomos.

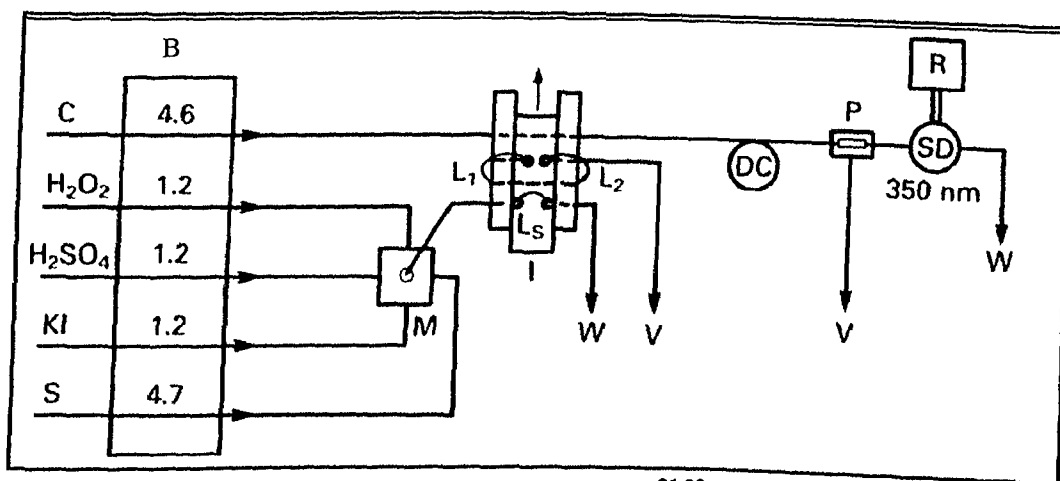


Figura 1- Configuração do sistema AFCM<sup>21,22</sup>

O sistema é composto por: B- bomba peristáltica; M- câmara de mistura; I- injetor; L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>- alça para introdução de bolhas de ar; L<sub>s</sub>- alça de amostragem; TB- banho termostático; DC- bobina de reação; P- cela de permeação; SD- detector; R- registrador; W- descarte e V- vácuo.

A concentração dos reagentes propostas por de Andrade et al.<sup>21,22</sup>, na câmara de mistura, Figura 1, são: ácido sulfúrico a  $9,6 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , iodeto de potássio a  $2,21 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  e peróxido de hidrogênio a  $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , em um volume total de 8,3 mL. Observa-se ainda que os volumes dos reagentes (KI, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) são iguais e de 1,2 mL e o volume da solução padrão de molibdênio (ou amostra) fixado em 4,7 mL com 130 s para o tempo de reação.

Para transformar estas condições experimentais para uma metodologia de bancada, os volumes foram alterados para minimizar os erros operacionais. Adotou-

se os seguintes volumes: solução de molibdênio(Mo(VI))(ou amostra), 5,00 mL e para as demais soluções adotamos o volume de 1,00 mL (solução de KI, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e as concentrações para os reagentes foram: ácido sulfúrico a  $7,68 \times 10^{-2}$  mol. dm<sup>-3</sup>, iodeto de potássio a  $1,77 \times 10^{-1}$  moldm<sup>-3</sup>, peróxido de hidrogênio a  $4,80 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>, em um volume total de  $8,0 \times 10^{-3}$  dm<sup>3</sup>.

Efetuada um pequeno ajuste nas concentrações adotamos como concentrações iniciais as seguintes concentrações: ácido sulfúrico a  $8,0 \times 10^{-2}$  mol dm<sup>-3</sup>, iodeto de potássio a  $1,5 \times 10^{-2}$  mol dm<sup>-3</sup> e peróxido de hidrogênio a  $5,0 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>.

A ordem de adição dos reagentes em sistemas sequenciais, em fluxo por confluência ou bancada substituindo o sistema AFCM também é um fator importante. De Andrade et ali<sup>57,58</sup> demonstraram que estes quatro reagentes podem ser adicionados em vinte e quatro diferentes ordem de adição e que estas apresentam diferença significativa nos resultados observados.

Os autores demonstram que a ordem de adição Mo, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KI e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é uma das ordens que apresentam uma maior sensibilidade<sup>57</sup> e então adotamos esta, pois além da melhor sensibilidade esperada, torna-se mais fácil o controle do tempo de reação, uma vez que a reação exige a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Outras ordens não seriam recomendadas, pois a reação entre KI e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, embora lenta, ocorre na ausência de Mo(VI) e também ocorre sem adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no meio<sup>21,58</sup>.

No procedimento sem extração de I<sub>2</sub> (item III.1-1) efetuamos os testes preliminares empregando 5,0 mL de solução padrão de 0,1 µg.mL<sup>-1</sup>; 1,0mL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $8,0 \times 10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>, 1,0mL de solução de KI  $1,5 \times 10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> e 1,0mL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $5,0 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>, adicionados nesta ordem, e tempo de reação de 2 minutos. Efetuou-se também um branco de reagentes, isto é, a solução de Mo(VI) foi substituída por água desionizada.

Observamos que tanto a reação catalisada por Mo(VI) como a reação sem catalisador(branco) os valores de absorvância foram bastante elevados; catalisada superior a 1,900 e branco superior a 0,400.

Devido à simplicidade do instrumento utilizado, estes valores são limitantes enquanto que para o trabalho de de Andrade et ali<sup>22,58</sup> estes valores não eram

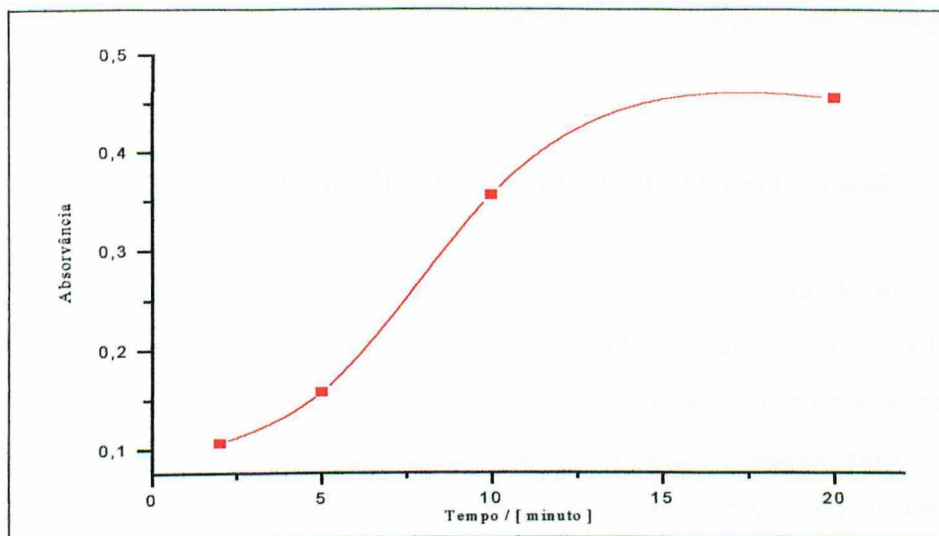
limitantes. O sinal analítico ( $\Delta_{abs}$ ) que de fato nos interessa é a diferença de absorvância entre a reação catalisada e o sinal do branco. Estes valores de absorvância permitem obter o sinal analítico que desejamos, mas limita a variação da quantidade de catalisador no meio.

Uma outra observação relevante é que o desvio padrão das medidas de absorvância para a reação era bastante elevado, caracterizando irreprodutibilidade do sinal analítico ao aproximarmos da reprodução de condições experimentais do sistema AFCM em bancada. Passamos então a estudar o sistema com concentrações menores dos reagentes, diminuindo-as numa proporção, de no mínimo 2,5 vezes.

#### IV.2 - Estudo do Tempo de reação

Num primeiro momento reproduzimos o tempo de reação de 130 segundos, para a reação proposta quando empregado o sistema AFCM<sup>21,22,58</sup>, observamos uma irreprodutibilidade do sinal analítico ( $\Delta_{abs}$ ), justificada provavelmente devido ao pequeno intervalo de tempo de reação (130s) e a tomada do sinal analítico, uma vez que nos sistemas automatizados como o AFCM esta é uma variável perfeitamente controlável<sup>21</sup>. Entretanto torna-se inviável sua reprodutibilidade em sistemas de bancada.

Assim, passamos a estudar o tempo de reação visando reprodutibilidade do sinal analítico. Portanto, o procedimento sem extração de  $I_2$ , efetuamos um estudo do tempo de reação, isto é, período transcorrido entre a adição do último reagente ( $H_2O_2$ ) e a leitura de absorvância. Este estudo foi utilizado tanto para a reação catalisada quanto para o branco e é apresentado na Figura 2.



**Figura 2 : Estudo do tempo de reação.**

*Empregando o procedimento A, com leitura de absorvância após tempo de adição do  $H_2O_2$  nos tempos de 2, 5, 10 e 20 minutos, tanto para a reação catalisada quanto para o branco. O sinal analítico é a diferença de absorvância entre as duas situações de reação.*

Observa-se que há um aumento considerável do valor de absorvância do sinal analítico até por volta de 10 minutos de reação. Daí em diante o aumento é menos acentuado, tendendo a um valor de absorvância constante por volta de 20 minutos.

O baixo valor de sinal analítico, diferença entre os valores de absorvância para a reação não catalisada e a reação catalisada, obtido após 2 minutos de reação, pode ser o responsável pela falta de reprodutibilidade dos resultados, quando reproduzimos em bancada, o tempo de reação de 2 minutos proposto como ideal para o sistema AFCM.

Com o tempo de reação prolongado, 20 minutos, por exemplo, levaria o método a uma maior sensibilidade, entretanto pode tornar inviável a adoção da metodologia em análise de rotina. Assim, escolhemos como tempo de reação, para o sistema que propomos, 10 minutos. Com este tempo de reação observamos que pequenas variações de tempo que vierem ocorrer entre a adição do último reagente até a leitura de absorvância não provocarão grandes variações nos valores de



absorvância, tornando possível a reprodutibilidade de resultados mesmo em bancada.

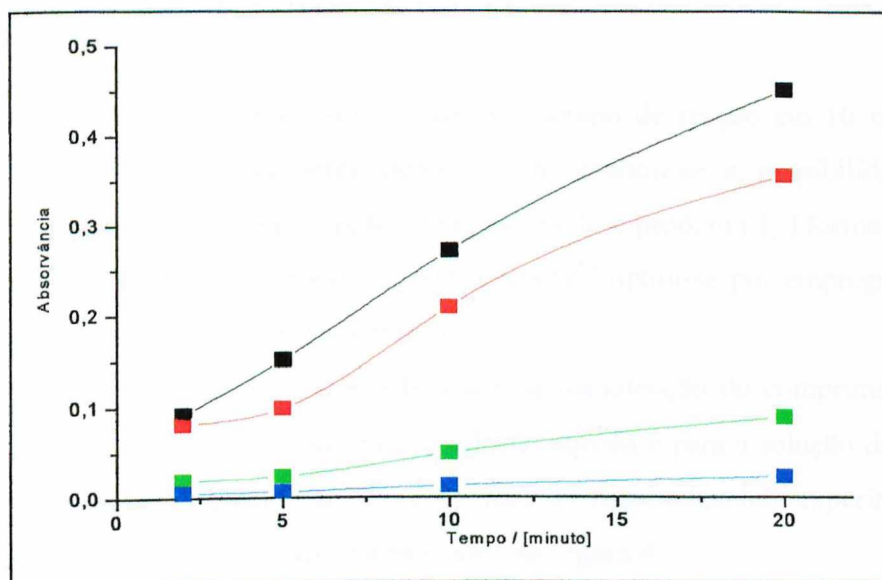
### IV.3 - Estudo do Efeito de concentração de $H_2SO_4$ para a reação

O estudo quimiométrico de análise de superfície de resposta, de Andrade et alli<sup>58</sup> demonstrou que numa faixa relativamente ampla de concentrações do  $H_2SO_4$  no meio pode-se obter valores muito semelhantes da absorvância para as reações em que as variáveis concentração e tempo de reação se mantiverem constante. No procedimento sem extração de  $I_2$ , avaliou-se o comportamento do sistema em bancada frente à variação de concentração do  $H_2SO_4$  adicionado no meio, comparando-o com o tempo de reação ( Figura 3 ).

Observa-se, na Figura 3, que após 10 minutos de reação o aumento do sinal analítico em função do aumento da concentração de  $H_2SO_4$  no meio ainda é evidente e para as altas concentrações de  $H_2SO_4$ , o valor de absorvância se torna constante, isto é, concentrações de  $H_2SO_4$ , superior a  $0,0050 \text{ mol dm}^{-3}$ . Este fato foi descrito por Eiras<sup>21</sup> empregando o sistema AFCM.

Ainda podemos observar, que nas altas concentrações de  $H_2SO_4$ , haverá um ganho de sensibilidade quando comparamos o tempo de reação de 10 minutos com o tempo de 20 minutos.

O tempo de reação de 20 minutos, apesar da possibilidade de alta sensibilidade, apresenta alguns inconvenientes, como já mencionamos, de levar o sistema a altos valores de absorvância limitando o uso de instrumentos simples e ainda tornando o tempo de espera muito longo para obtenção de resultados para uma única unidade de amostra na determinação de Mo(VI).



**Figura 3: Estudo da Influência da concentração de  $H_2SO_4$ .**

*Procedimento A, com concentrações de  $H_2SO_4$  variáveis como:*

$[H_2SO_4]$  [■] =  $0,016 \text{ moldm}^{-3}$ ;  $[H_2SO_4]$  [■] =  $0,010 \text{ moldm}^{-3}$ ;

$[H_2SO_4]$  [■] =  $0,0016 \text{ moldm}^{-3}$ ;  $[H_2SO_4]$ [■] =  $0,000050 \text{ moldm}^{-3}$ ; e

*demais reagentes nas seguintes concentrações:  $5,0 \text{ cm}^3$  de solução padrão de  $0,10 \mu\text{gcm}^{-3}$ ;  $1,0 \text{ cm}^3$  de solução de  $KI$   $1,50 \times 10^{-2} \text{ moldm}^{-3}$  e  $1,0 \text{ cm}^3$  de solução de  $H_2O_2$   $5,0 \times 10^{-3} \text{ moldm}^{-3}$ , leituras após 10 minutos de reação.*

Assim adotou-se a concentração de  $H_2SO_4$  como sendo  $0,010 \text{ moldm}^{-3}$ . Comparando o valor de concentração de  $H_2SO_4$  adotado por nós com o valor proposto por Eiras<sup>21</sup>, observa-se uma diferença acentuada nas concentrações, porém com resultados de absorvância semelhantes. Isto, provavelmente, se deve a dois fatores: a relativa independência de concentração de  $H_2SO_4$  no sistema para altas concentrações do ácido e ainda ao fato da diferença de pH da solução de frasco contendo os padrões de molibdênio, já que a solução estoque de molibdênio Mo(VI)) empregada nos estudos realizados por Eiras<sup>21</sup>, é menos ácida do que a solução por nós utilizada. Assim, nosso sistema exige uma concentração menor na solução de trabalho de  $H_2SO_4$  para a reação.

#### IV.4 - Estudo da Extração de Iodo ( I<sub>2</sub> )

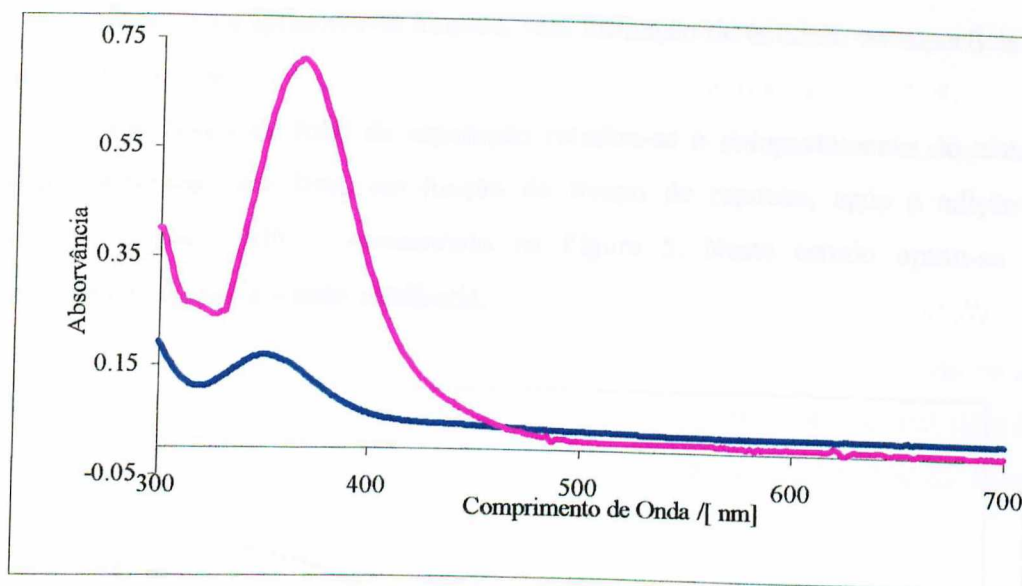
No trabalho de rotina é difícil manter o tempo de reação em 10 minutos exatos, para garantir a reprodutibilidade, assim avaliou-se a possibilidade de interromper a reação. Esta interrupção é feita extraindo o produto ( I<sub>2</sub> ) formado.

Sendo o MIC considerado um bom extrator<sup>53</sup> optou-se por empregá-lo no procedimento com extração de I<sub>2</sub>, formado.

Inicialmente avaliamos a possibilidade da manutenção do comprimento de onda até então empregado 350nm, para a solução aquosa e para a solução de I<sub>2</sub> em MIC. Obteve-se um espectro de absorção para as duas situações experimentais deste trabalho. Os espectros estão apresentados na Figura 4.

Observando o espectro com MIC obtido experimentalmente e comparando com de outros solventes da literatura<sup>47</sup> tais como benzeno, tetracloreto de carbono, vemos que o espectro de iodo em MIC mantém as características do espectro com água, onde há uma grande absorção a 350nm, porém com o máximo a 360 nm.

Analisando os espectros observamos, num primeiro momento, diferença significativa nos valores absolutos de absorvância. Entretanto devemos salientar que os espectros foram obtidos em volumes diferentes para uma mesma quantidade de iodo( I<sub>2</sub> ) formado na reação. Em MIC um volume de 3,0 mL e em solução aquosa um volume de 8,0 mL, assim o aumento de absorvância observado em MIC tem uma significativa contribuição do efeito concentração.



**Figura 4 : Espectro de absorção do produto da reação de Peróxido de Hidrogênio, Iodeto, Ácido Sulfúrico, e Molibdênio (VI)**

( — ) *Procedimento com extração do  $I_2$  após 10 minutos de reação em  $3,0\text{ cm}^3$  de metilisobutilcetona.*

( — ) *Procedimento sem extração do  $I_2$  após 10 minutos de reação. Para os dois espectros empregou-se um branco de reagentes, respectivamente.*

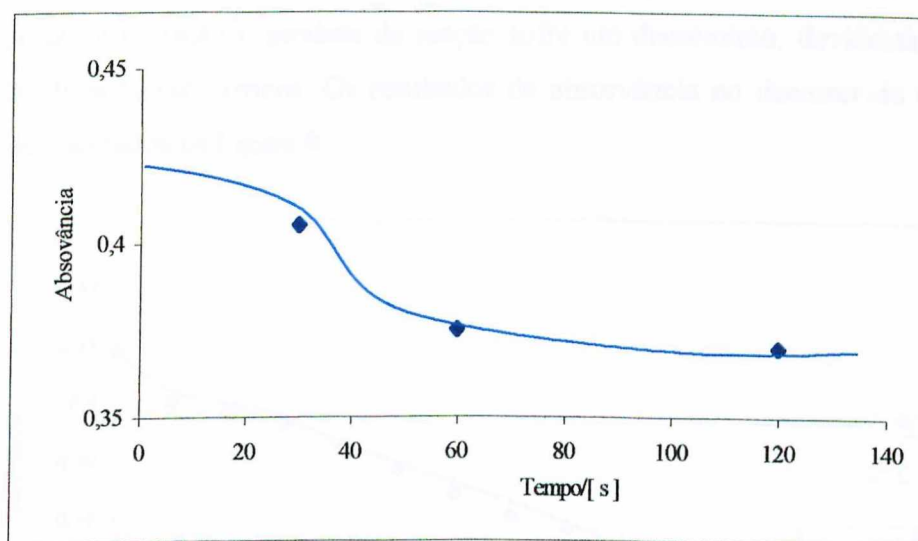
Nota-se que para a absorvância de iodo em MIC a 360 nm, devemos ter um ganho de sensibilidade para a metodologia em relação a 350 nm. Este deslocamento do máximo de absorção para a região do vermelho em algumas unidades de comprimento de onda provavelmente é devido ao efeito do solvente MIC no meio<sup>59</sup>. De qualquer forma, o uso do MIC para extrair o  $I_2$  proporcionará à metodologia vantagens sobre a determinação de iodo na solução aquosa onde ele é gerado.

#### **IV.5 - Considerações sobre o processo de Extração com MIC**

Efetou-se um estudo visando otimizar o processo de extração, para que o máximo de produto de reação,  $I_2$ , esteja na fase orgânica, e ainda observando para

que a fase orgânica apresente-se límpida, sem formação de emulsão na superfície de separação das fases.

Com pouca do funil de separação estudou-se o comportamento do sistema para a separação das fases em função do tempo de repouso, após a adição do solvente extrator, MIC, apresentado na Figura 5. Neste estudo optou-se por acompanhar apenas a reação catalisada.



**Figura 5: Estudo do tempo de repouso para a separação das fases.**

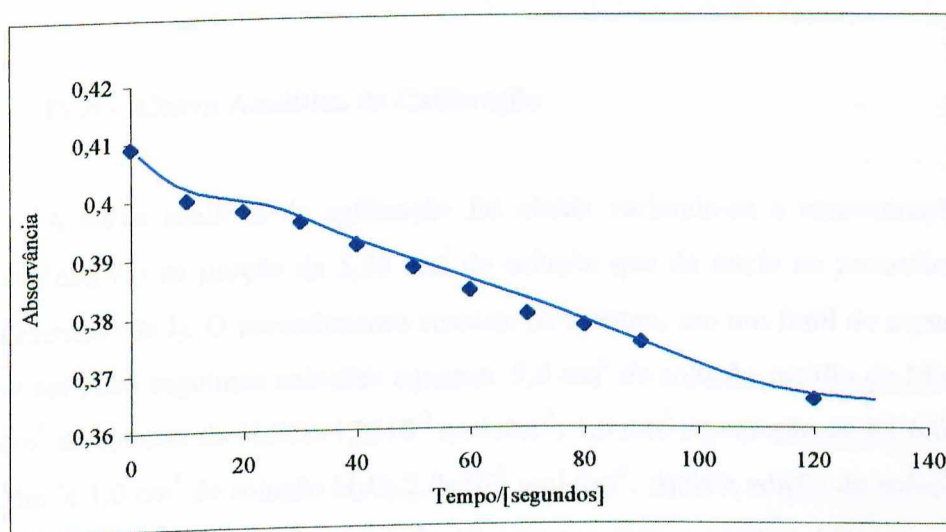
*Procedimento com extração do  $I_2$  e agitação de 5 inversões do funil de separação. Estudo realizado apenas para a reação catalisada.*

A Figura 5, apresenta os valores de absorvância obtidos imediatamente transcorrido o tempo de repouso para a separação das fases e extração do  $I_2$ . Observou-se que um período de repouso até 30 segundos a variação da absorvância lida é desprezível e comparando com período de repouso superior a 60 segundos, uma diminuição de 10%, no valor de absorvância é observada. Esta diminuição pode ser devido ao estabelecimento do equilíbrio de solubilidade entre MIC e água (2,15ml em 100ml de água) e também, e mais provável, devido à reação entre MIC e  $I_2$ , formando iodofórmio. Embora esta reação se dê preferencialmente em meio básico o equilíbrio ceto-enólico do MIC pode iniciar-se em meio ácido<sup>55</sup>. Como

existe uma pequena solubilidade de MIC em água, este fato pode alterar o pH da fase orgânica e assim a substituição de hidrogênio  $\alpha$  na carbonila é possível.

Observou-se que a transferência de  $I_2$  para o MIC é um processo bastante rápido e não necessita muita agitação do funil de separação para promover a extração.

A agitação lenta, efetuada do funil de separação apresentou resultados de absorvância superiores aos resultados com bruscas agitações. No decorrer do tempo de agitação e extração o produto de reação sofre um decréscimo, devido talvez à iodação do solvente extrator. Os resultados de absorvância no decorrer do tempo estão apresentados na Figura 6.



**Figura 6: Leitura da absorvância do  $I_2$  extraído em MIC, com leituras após tempos decorridos da extração.**

*Procedimento com extração de  $I_2$  e agitação com uma única inversão do funil de separação.*

*$\Delta abs$  é dado como a diferença entre absorvância para a reação catalisada e a reação não catalisada.*

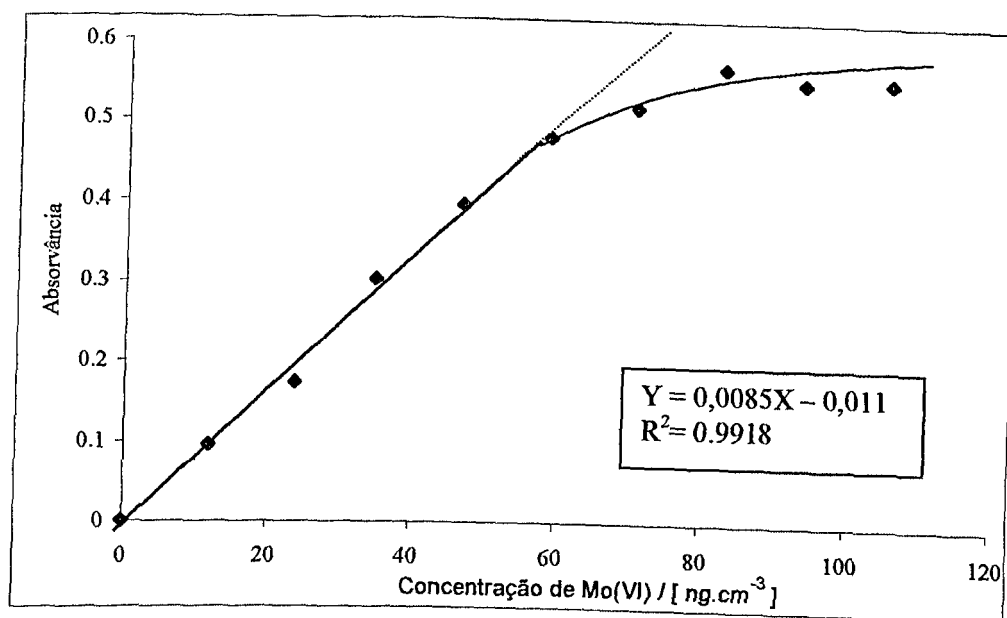
Observa-se que, para um período de até 60 segundos de espera entre a separação das fases e obtenção do sinal analítico, ocorre uma diminuição do sinal analítico em torno de 6%, chegando a 10% para um período de espera de 120 segundos. Isto implica que para garantir reprodutibilidade e manter ganho de

sensibilidade, a determinação de absorvância deve ocorrer até por volta de um minuto após a separação das fases, num processo de agitação efetuado com um único movimento de inversão do funil de separação.

Qualitativamente observou-se também que ocorre uma boa separação das fases, sem formação de emulsão na superfície de separação das fases, mesmo para um período de repouso de 10 a 15 segundos após a agitação efetuada com um único movimento de inversão do funil de separação. Como visto na Figura 6, para o período de espera de 10 a 15 segundos, a variação de absorvância não chega a 3%, adotamos este período de espera para a obtenção do sinal analítico de  $I_2$  extraído em MIC, não superior a 30 segundos.

#### IV.6 - Curva Analítica de Calibração

A curva analítica de calibração foi obtida variando-se a concentração de molibdênio(VI) na porção de  $5,00 \text{ cm}^3$  de solução que dá início ao procedimento com extração de  $I_2$ . O procedimento consiste na mistura, em um funil de separação de  $60 \text{ cm}^3$ , das seguintes soluções aquosas:  $5,0 \text{ cm}^3$  de solução padrão de Mo(VI);  $1,0 \text{ cm}^3$  de solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol.dm}^{-3}$ ;  $1,0 \text{ cm}^3$  de solução de KI  $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$  e  $1,0 \text{ cm}^3$  de solução  $\text{H}_2\text{O}_2$   $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ . Após a adição de solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , inicia-se o tempo de espera de 10 minutos para a reação. Adiciona-se um volume de  $3,0 \text{ cm}^3$  de metilisobutilcetona, e faz-se um movimento de inversão no funil de separação com a finalidade de promover a extração. Após a separação das fases no funil, separa-se a fase orgânica contendo o iodo e obtém-se a leitura de absorvância do iodo dissolvido em metilisobutilcetona à 360 nm. A curva analítica de calibração, apresentada na Figura 7, é obtida com os valores das diferenças de absorvância da reação catalisada e a reação não catalisada.



**Figura 7: Curva Analítica de Calibração**

*Procedimento com extração de I<sub>2</sub>, com a absorção pela concentração de Molibdênio em ng.cm<sup>-3</sup>, seguindo todas as concentrações dos reagentes do procedimento sem a extração de I<sub>2</sub>, estudadas e as de Molibdênio variando de 0,0 a 112 ng.cm<sup>-3</sup>.*

Através da Figura 7, nota-se que a metodologia apresenta linearidade até 60,0 ng.cm<sup>-3</sup>. A precisão do método foi examinada através do desvio padrão relativo de dez replicatas do padrão na concentração de 10,0 ng.cm<sup>-3</sup> e 50,0 ng.cm<sup>-3</sup>, sendo que o desvio padrão relativo para estas concentrações foi de 18,1 e 4,35 %, respectivamente. O limite de detecção 1,7 ng.cm<sup>-3</sup> foi calculado a partir do desvio padrão do branco de doze replicatas. Observa-se que mesmo sendo efetuado em bancada, a metodologia que propomos apresenta limite de detecção apenas ligeiramente maior do que o conseguido por Análise em Fluxo Contínuo monossegmentado<sup>21,22</sup>, que foi de 1,00 ng.cm<sup>-3</sup>.



#### IV.7 - Estudo de Precisão e Exatidão do procedimento com extração de I<sub>2</sub>

A aplicação deste procedimento na determinação de molibdênio nos tecidos vegetais é necessário eliminar prováveis interferentes.

1º \_ A oxidação do iodeto pelo peróxido de hidrogênio em meio ácido, além de ser catalisada pelo molibdênio, pode também, ser catalisada pelo ferro, titânio, tungstênio, cromo, vanádio, zircônio, háfnio, tório e tálio<sup>14,15</sup>. Destes somente o ferro, titânio, cromo, vanádio e o tungstênio são encontrados nos tecidos vegetais portanto são interferentes para a metodologia.

2º \_ O teor de fósforo também deve ser considerado, visto que o mesmo pode formar o ânion molibdofosfato<sup>33</sup> diminuindo a concentração de molibdênio no meio.

Estudos de determinação do molibdênio empregando a mesma técnica deste trabalho<sup>15,22</sup> concluíram que a alternativa mais viável é a separação do molibdênio do meio. Pessenda et alli<sup>15</sup> propuseram o uso de um sistema de análise em fluxo contínuo com uma coluna de resina trocadora de íons em linha. Por outro lado, de Andrade et alli<sup>22</sup> propôs a separação do molibdênio com  $\alpha$  - benzoiloxima e posterior aplicação no sistema de análise em fluxo monossegmentado. A técnica aqui proposta, tratou os interferentes seguindo a metodologia empregada por de Andrade et alli<sup>22</sup>, pois nosso objetivo é a aplicação, em bancada.

O Apêndice 3 apresenta, na forma de diagrama de blocos, o procedimento proposto por Eiras<sup>21</sup> e qual foi empregado na abertura e preparação das amostras usadas no presente trabalho.

A precisão e exatidão do método proposto neste trabalho, foram determinadas comparando os resultados obtidos, em Análise de folhas de feijão *Phaseolus Vulgaris*, com os resultados obtidos pelo Método Colorimétrico do Ditiol<sup>28</sup>.

Uma amostra do tecido vegetal foi submetido ao procedimento do Apêndice 3 e o teor de molibdênio foi determinado pelos dois procedimentos:

- a) Extração do I<sub>2</sub>.

b) Método colorimétrico do ditiol. A média dos resultados das cinco repetições estão na Tabela 01.

**Tabela 1: Determinação de molibdênio em folhas de feijão *Phaseolus Vulgaris***

Procedimento em estudo		Método do Ditiol	
<i>Teor de molibdênio</i> $\mu\text{gkg}^{-1}$	<i>Estimativa de desvio padrão</i>	<i>Teor de molibdênio</i> $\mu\text{gkg}^{-1}$	<i>Estimativa de desvio padrão</i>
607	32	571	38

#### IV.7.1 – Tratamento Estatístico

##### IV.7.1.1 – Comparação de precisão dos métodos, “teste F”

$$F = \frac{S_{\text{ditiol}}^2}{S_1^2} = \frac{(38)^2}{(32)^2} = 1,41$$

para os dois procedimentos, o grau de liberdade é 4 e o valor crítico<sup>60</sup> de F (5%) é 6,39. Assim, podemos afirmar que as diferenças observadas nas estimativas de desvio padrão dos métodos são ao acaso e que ambos podem ser considerados precisos.

##### IV.7.1.2 – Equivalência entre os métodos, “teste “t”

A Tabela 2, contém os valores das medidas efetuadas por ambos os métodos. Consideraremos o Método do Ditiol como referência.

**Tabela 2: Determinações individuais de molibdênio em folhas de feijão**

***Phaseolus Vulgaris***

Determinação*	Procedimento em estudo $x_2(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	Método do Ditiol $x_1(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	$x_2 - x_1 = d_i$	$d^2$
01	580	523	57	3249
02	640	615	25	625
03	610	595	15	225
04	635	540	95	9025
05	570	580	-10	100

\* Replicatas de uma mesma amostra de tecido vegetal.

Para determinação em paralelo<sup>60,61</sup>, o teste “t” é dado por:

$$t = \frac{\bar{d}}{\sqrt{\frac{\sum(d_i - \bar{d})^2}{(N-1)}}} \sqrt{N}, \quad \bar{d} = 36.4 ; \sum(d - \bar{d})^2 = 6599.2 ; N = 5$$

$$t = \frac{36,40}{\sqrt{\frac{6599,2}{(5-1)}}} \sqrt{5} \Rightarrow t = 2,004$$

Como  $t_{\text{calculado}} = 2,004$ , é inferior a  $t_{90\%} = 2,132$ , podemos afirmar que, com 90% de probabilidade de acerto, as diferenças entre os valores obtidos experimentalmente, são diferenças ao acaso. Portanto, os valores obtidos podem ser considerados representantes de uma mesma população (amostra de tecido vegetal). Assim, tanto pelo “teste F” como pelo “teste “t”, podemos afirmar que a aplicação do procedimento com extração de  $I_2$  que propomos apresenta resultados tão confiáveis como os obtidos pelo Método do Ditiol.

## **CAPÍTULO - V**

## 1- CONCLUSÃO

De acordo com os estudos e resultados obtidos durante o desenvolvimento e avaliação do presente projeto, pode-se concluir que o procedimento proposto;

a) Apresenta precisão, exatidão, facilidade e tempo de execução compatíveis com o Método Colorimétrico do Ditiol, porém com um custo inferior.

b) Alcança um limite de detecção semelhante ao obtido com métodos de Análise em Fluxo, recomendados para situações de número elevado de amostras a serem analisadas.

c) O procedimento proposto pode substituir satisfatoriamente, estes métodos. Sem perda de confiabilidade nos resultados, quando poucas amostras ou mesmo uma única amostra for apresentada ao laboratório de análise.

d) O procedimento proposto permite análise precisa de uma única amostra.

## 2- PRETENSÕES FUTURAS

Devido a importância do molibdênio para a agricultura, a sua determinação em tecidos vegetais para avaliar a condição de nutrição da planta por este microelemento é tão importante, quanto a avaliação do teor de molibdênio nos adubos empregados para a correção da deficiência como no suprimento deste microelemento nas plantas, ou no solo.

Assim, pretendemos dar continuidade ao estudo avaliando a possibilidade de aplicar a metodologia aqui proposta, para a determinação de molibdênio em fertilizantes bem como em tecidos de outros vegetais.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE I :

### Preparo das Soluções

#### a) Solução de Iodeto

A partir do sal de iodeto de potássio, pesou-se 1,0000 g, dissolveu-se o sal e diluiu-se em balão volumétrico de 1,0 dm<sup>3</sup>, com água desionizada.

#### b) Solução de Mo (VI) 1,0 mg.cm<sup>-3</sup> ( Solução estoque)

Para a solução de Mo(VI), utilizou-se ácido molíbdico 85%, pesou-se 1,7200 g do sal e dissolveu-se, completando o volume da solução para 1,0 dm<sup>3</sup> com água desionizada.

#### c) Solução de Mo (VI) 50 ng.cm<sup>-3</sup>

A partir da solução estoque (b) (conservada em geladeira), tomou-se uma alíquota 50 µL, com o auxílio de uma micropipeta, diluindo a solução para 1,0 dm<sup>3</sup> em balão volumétrico. Esta solução foi preparada diariamente.

#### d) Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol.dm<sup>-3</sup>

Para posteriores diluições preparou-se uma solução contendo 0,1 mol.dm<sup>-3</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tomou-se uma alíquota de aproximadamente 5,5 cm<sup>3</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% P.A., adicionou-se o ácido em aproximadamente 500 cm<sup>3</sup> de água desionizada em balão de 1,0 dm<sup>3</sup>, em seguida completou-se o volume até o menisco com água desionizada. Padronizou-se a solução.

#### e) Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,010 mol.dm<sup>-3</sup> ( Solução ácida de trabalho )

Esta solução foi preparada a partir da solução (d) de onde pipetou-se 10,0 cm<sup>3</sup> e diluiu-se em balão volumétrico de 100 cm<sup>3</sup> com água deionizada.



#### **f) Solução de $\text{H}_2\text{O}_2$ $0,0015 \text{ mol.dm}^{-3}$**

A Solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi preparada a partir de uma solução 30% m/m, em duas etapas:

Numa primeira etapa preparou-se uma solução  $0,15 \text{ mol.dm}^{-3}$ , tomando-se uma alíquota de  $1,5 \text{ cm}^3$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% e diluiu-se para um balão volumétrico de  $100,0 \text{ cm}^3$ , com água desionizada.

Numa Segunda etapa preparou-se uma solução  $0,0015 \text{ mol.dm}^{-3}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Para o preparo desta solução tomou-se uma alíquota de  $1,0 \text{ cm}^3$  da solução  $0,15 \text{ mol.dm}^{-3}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  padronizada e diluiu-se para um balão de  $100 \text{ cm}^3$  com água desionizada.

#### **Obs:**

Todas as soluções que puderam ser estocadas **a, b e e**, foram estocadas em geladeira e para o início dos trabalhos esperou-se que a solução adquirisse a temperatura ambiente.

## APÊNDICE 2 :

### Método colorimétrico – ditiol<sup>56</sup>

**Preparo do extrato** – incinerou-se 5,000 g de material seco e moído, a 500° C durante duas horas ou mais, em cápsulas de porcelana. Esfriou-se e umedeceu-se. Juntou-se 5mL de solução de HCl 6N e evaporou-se em banho-maria. Dissolveu-se o resíduo com 10mL de solução de HCl 2N, aqueceu-se e filtrou-se diretamente para funil de separação de 125mL. Lavou-se a cápsula com mais duas alíquotas de solução de HCl e com água desionizada até completar o volume a aproximadamente 45mL.

**Determinação** – juntou-se ao funil de separação de 125mL, 1mL de solução de ácido ascórbico a 5%, 2mL de solução de tiouréia a 9% e 2mL de solução de ditiol a 0,2%, agitando-se após a adição de cada reagente. Depois de dez minutos, adicionou-se 3mL de acetato de butila e agitou-se vigorosamente durante meio minuto.

Após a separação das fases, extraiu-se o solvente contendo o complexo colorido para cubetas de vidro de 1 cm de caminho óptico e procedeu-se as leituras em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 680nm.

**Curva - padrão** – transferiu-se 0, 1, 2 e 3mL da solução padrão contendo 1µg/ml de Mo para funis de separação. Juntou-se 10mL de solução de HCl 6N e ajustou-se o volume a 45mL, adicionou-se os reagentes e prosseguiu-se como foi descrito para as amostras.

**Cálculos** – ppm de Mo = Q x 0,20

Q = quantidade de molibdênio (microgramas) na fase orgânica determinada através da curva-padrão.

### APÊNDICE 3 :

Abertura de amostra de folhas para a metodologia proposta levando em consideração a forma de eliminar os possíveis interferentes<sup>21</sup>

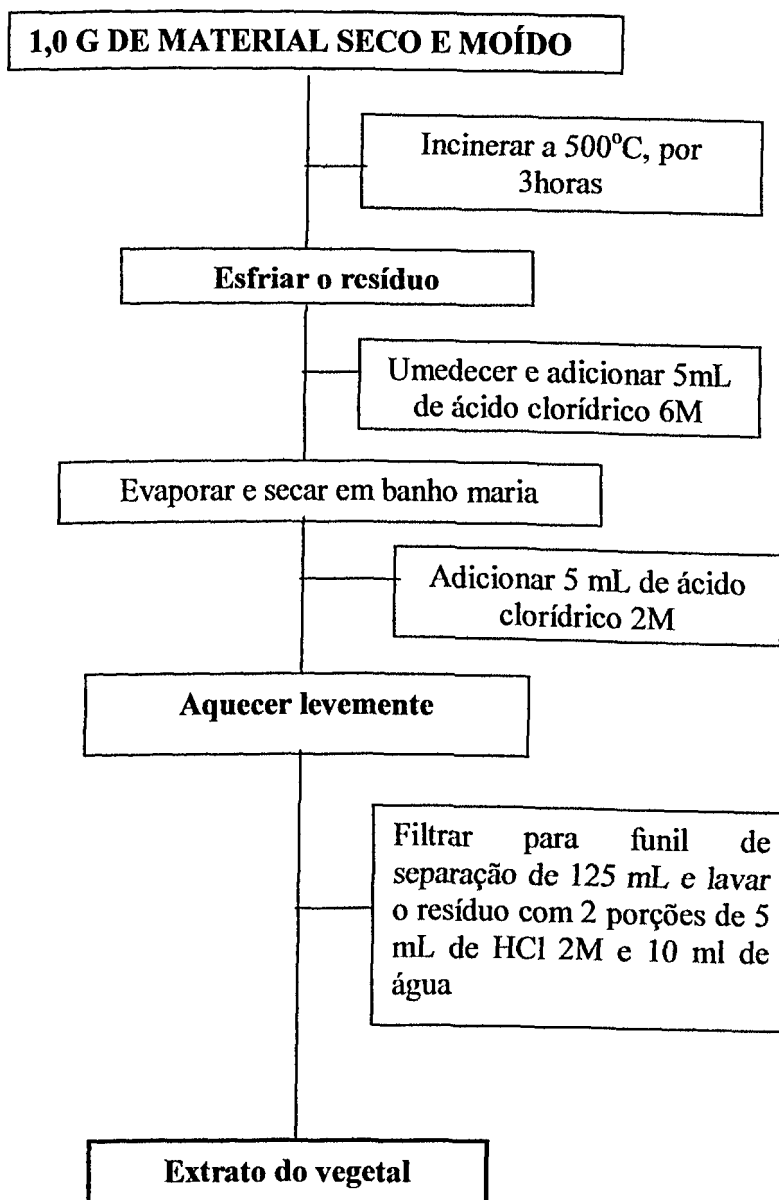
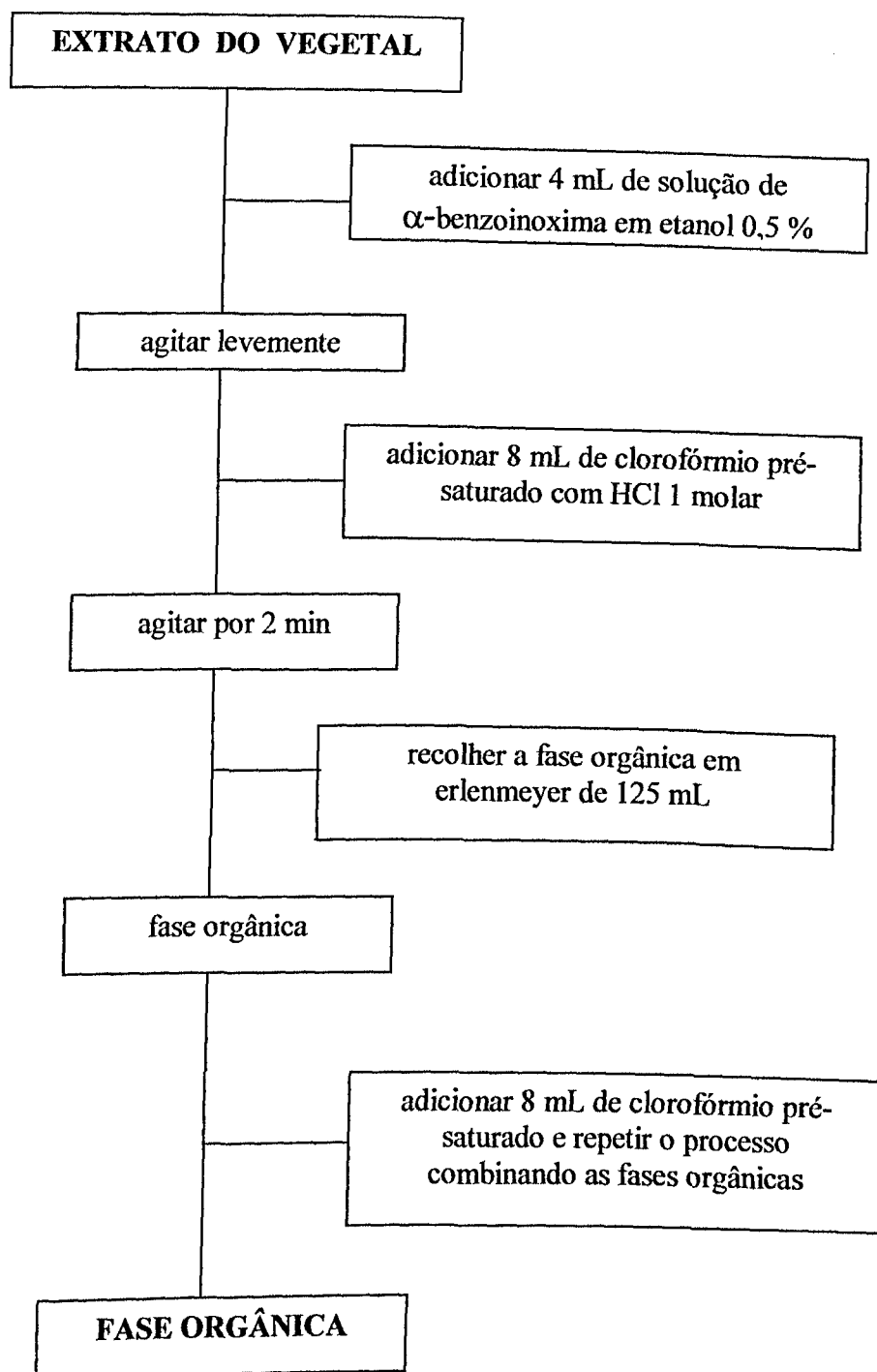
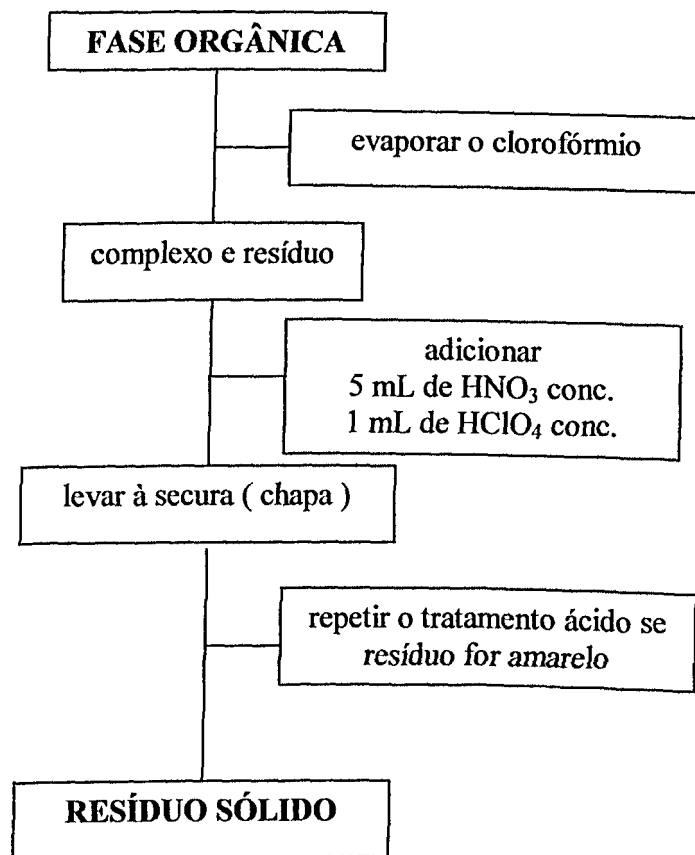


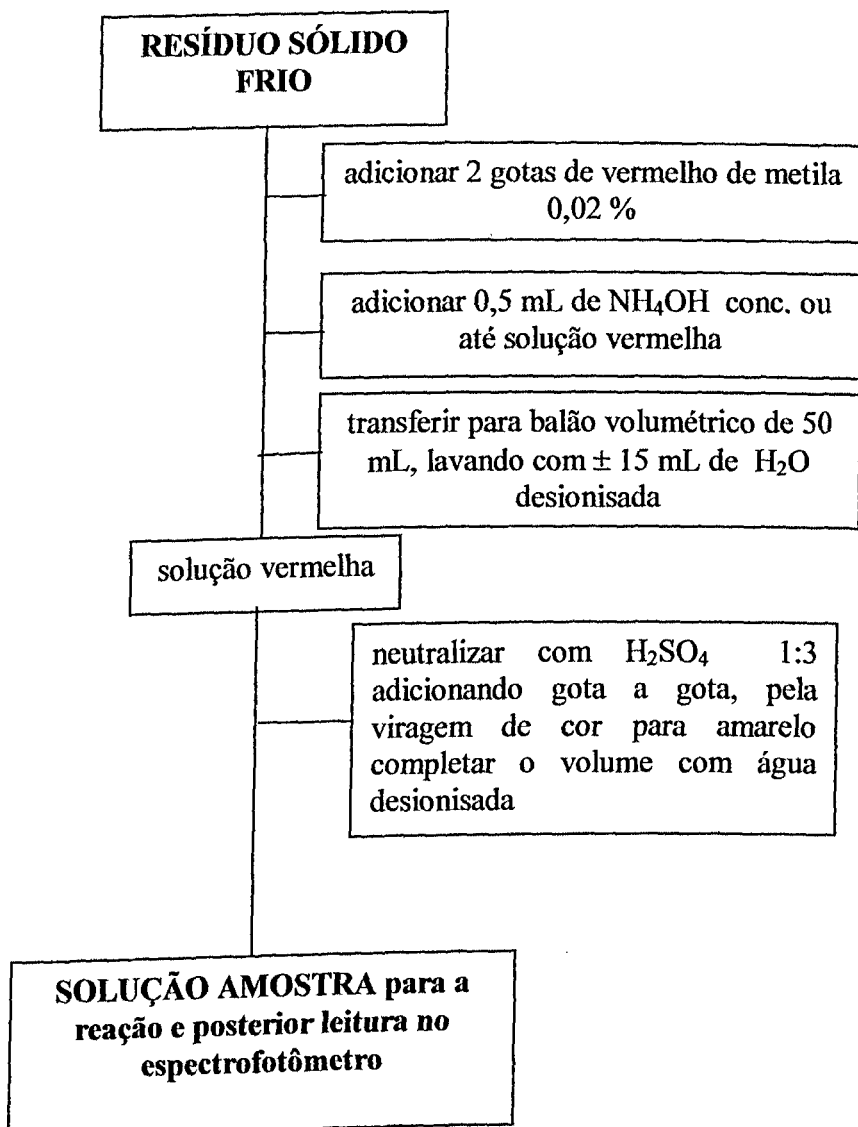
Diagrama de blocos : Preparação do Extrato de Tecido Vegetal.



**Diagrama de blocos : Extração de Molibdênio com  
α-Benzoinoxima / clorofórmio.**



**Diagrama de blocos : Tratamento da Fase Orgânica.**



**Diagrama de blocos : Ajuste de pH e determinação de Molibdênio.**

Após este tratamento a amostra está pronta para ser analisada, neste ponto toma-se uma alíquota de  $5,0 \text{ cm}^3$  de amostra num funil de separação de 60mL, ou que comporte o volume de todos os reagentes e que tenha um certo espaço livre para agitações dos mesmos, adiciona-se  $1,0 \text{ cm}^3$  de ácido Sulfúrico de concentração  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol.dm}^{-3}$ ,  $1,0 \text{ cm}^3$  de Iodeto a  $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$  e  $1,0 \text{ cm}^3$  Peróxido de Hidrogênio a  $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ , dispara o cronômetro, agita-se por 1 minuto a solução, para a homogeneização e aguarda até 10 minutos, após este tempo, adiciona-se 3 ml de metilisobutilcetona, fazendo-se com que haja a mistura das fases. Espera por aproximadamente 15 segundos para a separação das fases, extrai a fase orgânica e lê-se em  $\lambda$  de 360nm no espectrofotômetro em cela de vidro de caminho óptico de 1 cm. O valor de absorvância obtido é extrapolado em uma curva previamente obtida com valores de padrões de Mo(VI), de 10,0 a 50,0  $\text{ng.cm}^{-3}$ .

## CAPÍTULO - VI



## BIBLIOGRAFIA

1. JORGE, J. A.; "Solo: Manejo e Adubação", 2ª Edição, Livraria Nobel S.A. 1983, São Paulo – S.P.
2. PEYVE, Y. V.; "V Biochemistry of Molybdenum", Soviet Soil Science, 1 (1969); 34 – 47.
3. VIDOR, C. e PERES, J.R.R.. "Nutrição das Plantas com Molibdênio e Cobalto". IN: Reunião Brasileira de Fertilizantes do Solo. XVII., Anais – Enxofre e Micronutrientes na Agricultura Brasileira. Ed. Por BORKET, C.M. e LANTMANN, AF., Londrina, EMBRAPA-CNPQSO/IAPAR/SBCS, 1988.
4. MENGEL, K. e KIRBY, E. A.. "Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute", Berna, 1978.
5. GUPTA, U. C. and LIPSETT, J.; "Molybdenum in Soils, Plants and Animals", Advances in Agronomy, 34 (1981), 73 – 115.
6. GLÓRIA, N. A.. "Sobre uma Modificação na Determinação de Molibdênio nas Plantas". NA. Esc. Sup. Luiz de Queiroz. 20 (1962); 3-13.
7. PURQUIS, E. R. e PETERSON, N. K.. "Methods of Soil and Plant Analysis for Molybdenum". Soil Sci. Soc. Amer. Proc. . 81 (1956), 223-228.
8. SSEKAALO, H.. "A Rapid and Accurate Method for the Determination of Molybdenum in Plant Materials with Toluene-3,4-dithiol". The Analyst, 96 (1971) 346-348.

9. BATAGLIA, O. C.. "A Determinação de Molibdênio por Espectrofotometria de Absorção Atômica". Tese de Doutorado. ESALQ/USP, Piracicaba. 1972.
10. NEUMAN, DENNIS R. e MUNSHOWER , F. F.. "Rapid Determination of Molybdenum in Botanical Material by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, 123 (1981), 325-328.
11. HOEING, M., van ELSEN, Y. van CAUTER, R.. "Factors Influencing the Determination of Molybdenum in Plant Samples by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry". *Anal. Chem.* 58, (1986), 777-780.
12. LYONS, D. J. e ROOFAYEL, R. L.. "Determination of Molybdenum in Plant Material Using Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy". *The Analyst*, 107, (1982), 331-335.
13. SPIERS, G.A ; DUDAS, M.J. e HODGINS, L.W.. "Instrumental Conditions and Procedure for Multielement Analysis of Soils and Plant Tissue by ICP-AES". *Commun. In Soil Sci. Plant Anal.*, 14 (7), (1983), 629-644.
14. YATSIMIRSKII, K. B.; "Kinetic Methods Of Analysis", First Edition, Pergamon Press, (1966), London - G.B..
15. PESSEDA, L. C. R., JACINTHO, A. O. e ZAGATTO, E. A G.. "Catalytic Determination of Molybdenum in Plants by Flow- injection spectrophotometry with ion- exchange separation". *Anal. Chim. Acta*, 214, (1988), 239.
16. FUGE, R. "An Automated Method for the determination of Molybdenum in Geological and Biological Samples". *The Analyst*, 95, (1970), 171-176.

17. EIVAZI, F., SIMS, J. L. e CRUTCHFIELD, J.. "The Determination of Molybdenum in Plants Materials Using a Rapid Methods, Automated Method". *Comm. Soil Sci.. Plant Anal.* 13, (1982), 135-150.
18. BRADFIELD, E. G. e STICKLAND, J. F.. "The Determination of Molybdenum in Plants by an Automated Catalytic Method". *The Analyst*, 100,(1975), 1-7.
19. QUIN, B. F. e WOODS, P. H.. "Automated Catalytic Method for Routine Determination of Molibdenum in Plant Materials". *The Analyst*, 104, (1979), 552-559.
20. ZHAO-LUN, F. E SHU-KUN, X.. "Determination of Molybdenum at  $\mu\text{g L}^{-1}$  levels by Catalytic Spectrophotometric Flow Injection Analysis". *Anal. Chim. Acta.* 145, (1983), 143-150.
21. EIRAS, S. P., "Determinação Catalítica de Molibdênio em Plantas, usando Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentado com Detecção Espectrofotométrica", Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas – SP, 1991.
22. de ANDRADE, J. C. , EIRAS, S. P e BRUNS, R. E. e.; "Catalytic Determination of Molybdenum (VI) in Plants Using Mono-segmented Continous-flow Analysis and Spectrophotometric Detection". *The Analyst*, 118, (1993), 213-217.
23. PRIMAVESI, A.. "Manejo de Solo: A Agricultura em Regiões Tropicais. Nobel", São Paulo, 1984.
24. BURGMEYER, S. J. N. e STIEFEL, E. J.. "Molybdenum Enzymes, Cofators, and Model Systems – The Chemical Uniqueness of Molybdenum", *J. Chem. Ed.* 62, (1985), 943-953.

25. VIEIRA, R. F., SALGADO, L. T., VIEIRA, C.. "Rizóbio, Molibdênio e Cobalto na Cultura do Feijão no Alto Paranaíba e Noroeste de Minas Gerais". R. Ceres, Viçosa, MG, 41, (1994), 688-694.
26. DAVIES, E. B.. "Factors Affecting Molybdenum Availability in Soils". Soil Sci. 81, (1956), 209-221.
27. PESSOA, A. C. dos S.. "Atividades de Nitrogenase e Redutase do Nitrato e Produtividade do Feijoeiro em Resposta à Adubação com Molibdênio e Fósforo". Tese de Doutorado, UFV – Viçosa – MG, 1998.
28. BATAGLIA, O. C. et Alli. "Métodos de Análise Química de Plantas". Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, Boletim Técnico, 78, 1983.
29. SSEKAALO, H.. "Some Observations on the Choice of a Solvent in the Spectrophotometric Determination of Molybdenum by Toluene-3,4-dthiol". Lab. Pract.. 19, (1970), 603-604,.
30. QUIN, B.F. e BROOKS, R.R.. "The Rapid Colorimetric Determination of Molybdenum with Dithiol in Biological, Geochemical and Steel Samples". Anal. Chim. Acta, 74 (1975), 75-84.
31. CHAN, K.M. e RILEY, J.P.. "The Determination of Molybdenum in Natural Waters, Silicates and Biological Materials". Anal. Chim. Acta, 36, (1966), 220-229.
32. LUKE, C. L.. "Spectrophotometric Determination of Molybdenum in steel, Tantalum, Niobium or Tungsten". Anal. Chim. Acta. 34, (1966), 302-307.

33. BASSETT, J. et All.. "VOGEL - Análise Inorgânica Quantitativa". Quarta Edição, Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1978.
34. SCAIFE, J. F.. "Colorimetric Microestimation of Molybdenum as Thiocyanate Complex". *Analytical Chemistry*, 28, (1956), 1636.
35. LOUNAMAA, N.. "The absorciométric Determination of Molybdenum as Molybdenum(V) Thiocyanate in Steel". *Anal. Chim. Acta.* 33,(1965), 21-35.
36. CHATTOPADHYAY, P., MISTRY, M. e ROY, B.C.. "On Estimation of Molybdenum in Complex Matrices Using Dithiol and Thiocyanate". *Annali-di-chimica*, 88, (1998), 567-576.
37. JOHNSON, C. M. e ARKLEY, T. H.. "Determination of Molybdenum in Plant Tissue. *Analytical Chemistry*", 26 (1954) 572-574.
38. KHAN, S., CLOUTIER, R. e HIDIROGLOU, M.. "Atomic Absorption Spectroscopic Determination of Molybdenum in Plant Tissue and Blood Plasma. *J. Assoc. off Anal. Chem.*, 12 (1979), 348-351.
39. FASSEL, V. A. e KNISELEY, R.N.. "Inductively Coupled Plasma- Optical Emission Spectroscopy", *Analytical Chemistry*, 46, (1974),1110-1120.
40. MULLER, H.. "Catalymetric Methods of Analysis". C.R.C. Crit. Rew. In *Anal. Chem.* 12 (1982), 313-372.
41. BEJAN, D.. "Kinetic-catalytic-spectrophotometric determination of low concentrations of molybdenum in white wines", *Analytica Chimica Acta*, 390, (1999),255-259.

42. COPPER, C. L., KOUBEK, E.. "Kinetics of the molybdate and tungstate catalyzed oxidation of iodide by hydrogen peroxide", *Inorganica Chimica Acta*, 288, (1999),229-232.
43. HUANG, X.R., ZHANG, W.J., XU, G.Y., HAN, S.H., LI, Y. and LI, C.P.. "Mixed Micellar medium for the Spectrophotometric Determination of Molybdenum in Molybdenum/tungsten Mixtures". *Talanta*, 47(4), (1998), 869-875.
44. ENSAFI, A. A. , SADEGHIE, M. M. e ALAIE-YASDIE, F.. "Determination of Molybdenum(VI) by its Catalytic effect on the Oxidation of Nile Blue by Hydrogen Peroxide". *Indian Journal of Chemistry*, 37, (1998), 842-844.
45. NING, M. Y., "New Catalytic photometric Determination of trace Molybdenum". *Lihua Jianyan, Huaxue-Fence*, 34, (1998),167-168.
46. YATSIMIRSKY, K. B. and AFANASEVA, L. P.; "Kinetic Methods Of Quantitative Analysis. Determination Of Small Amounts Of Molybdenum", *J. Anal. Chem. (URSS)*, 11(1955), 327 – 330.
47. BABKO, A. K. and PILIPENKO, A. T.; "Photometric Analysis – Methods Of Determining Non-Metals", Translated from the russian by A. Rosinkin, (1976), Mir Publishers – Moscow.
48. SKEGGS Jr, L.T.. "An Automated Method for Colorimetric Analysis". *Am. J. Clin. Path.* 28 (1957), 311-322.
49. PASQUINI, C. e de Oliveira, W. A.. "Monossegmented System for Continuous Flow Analysis. Spectrophotometric Determination of Chromium (VI), Ammonia and Phosphorus". *Anal. Chem.* 57(1985), 2575-2579.

50. CHRISTIAN, G. D.; "Analytical Chemistry", Fifth Edition, John Wiley & Sons, 1994, New York – USA.
51. POMBEIRO, A. J. L. O.; "Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial", 2ª Edição, editora da Fundação Calouste Gulbenkian, (1991), Lisboa – Portugal.
52. LIDE, D. R.. "Handbook of Chemistry and Physics". CRC Press, New York, 1998/1999.
53. AKAZA, I.. "The Liquid-liquid Extraction of Alkaline Earth Metals With 2-thenoiltrifluoroacetone". Bull Chem. Soc., Japan, 39(1966), 971-980.
54. BERGER, S. A.. "Solvent Extraction of Copper(II) With Chloridric Acid". Talanta 23 (1976), 475-477.
55. MORRISON, R. T. & BOYD, R. N.. "Organic Chemistry. 6ª ed., Englewood Cliffs, Prentice-Hall, (1992).
56. BATALIA, O. C. et alli. "Métodos de Análise Química de Plantas". Boletim Técnico – IAC. 78 (1983), Campinas-SP.
57. EIRAS S. P.; de ANDRADE, J. C. e BRUNS, R. E.. "Effects of Reagent Addition Sequence on the Analytical Response of the Mo(VI) Catalysed Oxidation of Iodide by Hydrogen Peroxide". Journal of the Brazilian Chemical Society, 4(3), (1993), 128-132.
58. de ANDRADE, J. C.; EIRAS, S. P. e BRUNS, R. E. "Study of Mo(VI) catalytic response in the oxidation of iodide by hydrogen peroxide using a monosegmented continuous-flow system". Anal. Chim. Acta, 255 (1991), 149 –155.

59. SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C. e MORRILL, T. C.. "Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos". 5ª edição, ed. Guanabara-Koogan, (1995), Rio de Janeiro-RJ.
60. OHLWEILER, O. A., "Química Analítica Quantitativa", 3ª Edição, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Vol-1, (1984), Rio de Janeiro-RJ.
61. HARRIS, D. C.. "Análise Química Quantitativa".5ª Edição, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., (2001), Rio de Janeiro-RJ.