



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LEANDRO LUAN GONÇALVES DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM SISTEMA DE
ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQUENCIAL APLICADO A
DETERMINAÇÃO DE VANÁDIO EM ÁGUA**

Londrina
2016

LEANDRO LUAN GONÇALVES DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM SISTEMA DE
ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQUENCIAL APLICADO A
DETERMINAÇÃO DE VANÁDIO EM ÁGUA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Oliveira, Leandro Luan Gonçalves de .

Desenvolvimento e Validação de um Sistema de Análise por Injeção Sequencial Aplicado a Determinação de Vanádio em Água / Leandro Luan Gonçalves de Oliveira. - Londrina, 2016.
129 f. : il.

Orientador: Carlos Alberto Paulinetti da Camara.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Vanádio - Teses. 2. Espectrofotometria UV/Vis - Teses. 3. Instrumentação - Teses. 4. Análise por Injeção Sequencial (SIA) - Teses. I. Camara, Carlos Alberto Paulinetti da. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

LEANDRO LUAN GONÇALVES DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM SISTEMA DE ANÁLISE
POR INJEÇÃO SEQUENCIAL APLICADO A DETERMINAÇÃO DE
VANÁDIO EM ÁGUA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Paulinetti
da Camara
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Janksyn Bertozzi
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Londrina, 9 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

.Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara, pela orientação, amizade, paciência, sou muito grato pela oportunidade e confiança. Agradeço a DEUS por coloca-lo no meu caminho, mas do que um professor, o considero como pai.

Ao Prof. Dr. João Carlos Alves, pela oportunidade, apoio e paciência, sugestões e coorientação tanto no laboratório quanto na elaboração deste trabalho.

A Prof. Dra. Suzana Lucy Nixdorf pelos ensinamentos e apoio para a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Janksyn Bertozzi parte fundamental no desenvolvimento e elaboração do trabalho.

Ao Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley pelos ensinamentos, sugestões e disponibilidade para a realização do trabalho.

A Prof. Ms. Angelita Ribeiro pela disponibilidade, atenção dada e sugestões preciosas no desenvolvimento do trabalho.

A Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Departamento de Química, que possibilitou esta oportunidade de amadurecimento intelectual.

Aos amigos de laboratório, Alan, Renan, Lycio e Rodrigo agradeço pela amizade, apoio, ajuda e convivência.

A todos aqueles que me estenderam a mão, e de alguma forma me ajudaram, obrigado.

Aos meus pais, Osvaldo e Vera pelo exemplo
de vida, carinho e amor incondicional.

OLIVEIRA, Leandro Luan Gonçalves. **Desenvolvimento e validação de um sistema de análise por injeção sequencial aplicado a determinação de vanádio em água**. 2016. 126 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina., 2016.

RESUMO

A presença de compostos de vanádio em águas tem despertado o interesse em relação às suas funções biológicas e toxicidade a longo prazo. Se por um lado a prevenção de algumas doenças cardíacas e o controle da glicose sanguínea é associada à ingestão de compostos de vanádio em água, por outro as vias de atuação do vanádio no organismo humano e seus efeitos tóxicos, principalmente nas funções celulares não são bem esclarecidas. O interesse em avaliar o nível de vanádio na água tem aumentado a busca por métodos e técnicas analíticas de rotina. Um deles é o método padrão de determinação de vanádio em água por espectrofotometria UV/Vis. Baseado na reação de oxidação do ácido gálico por solução ácida de persulfato de amônio catalisada pelo vanádio. No entanto, as etapas laboriosas de adição dos reagentes, controle do tempo de adição e o tempo gasto na obtenção do equilíbrio, torna o método complicado para a análise de rotina. A facilidade de aplicação dos métodos cinéticos devido ao controle das condições reacionais, e aceleração do processo catalítico, faz dos sistemas de injeção em fluxo uma poderosa ferramenta. O trabalho descreve o desenvolvimento de um sistema de Análise por Injeção Sequencial (SIA) totalmente automatizado por microcontrolador com plataforma de computação *open-source* (Arduino MEGA 2560), para o controle da bomba de pistão e válvula seletora. A automação do sistema foi testada por aplicação ao método padrão de determinação de vanádio em água por espectrofotometria UV/Vis. A adaptação do método ao sistema SIA foi realizada por otimização das condições reacionais, concentração e volume dos reagentes, ordem de aspiração, tempo de residência e temperatura. Nas condições otimizadas, foi alcançado um coeficiente de determinação R^2 de 0,996 para uma faixa linear de 50,0 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os limites de detecção e quantificação de 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 36,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente foram obtidos por medidas do branco analítico ($n=26$). Testes de adição e recuperação na faixa 94,5 a 109,1% foram obtidos pelo sistema SIA-UV/Vis. O sistema foi aplicado em amostras de águas ricas em vanádio, destinadas ao consumo humano. A exatidão do sistema foi testada por comparação com o método padrão de determinação por espectrofotometria UV/Vis e ICP-MS. Para um valor $p > 0,05$ não houve evidência significativa na média dos tratamentos das amostras de água. Baixo consumo de reagente, 4,0 mg de persulfato de amônio e 1,0 mg de ácido gálico e apenas 3,35 mL de resíduo gerado por análise, caracterizam o sistema como uma das técnicas em direção à química verde. A aceleração do processo catalítico permitiu uma frequência analítica de 19 determinações por hora. Portanto o sistema desenvolvido provou ser uma ferramenta útil na análise de rotina para a determinação de vanádio em água.

Palavras-chave: Vanádio. Espectrofotometria UV/Vis. Instrumentação. Análise por Injeção Sequencial (SIA).

OLIVEIRA, Leandro Luan Gonçalves. **Development and validation of a sequential injection system applied to determination of vanadium in water.** 2016. 126 p. Dissertation (Master's Degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina., 2016.

ABSTRACT

The presence of Vanadium compounds in waters has aroused the interest in relation to their biological functions and toxicity in the long run. If on the one hand the prevention of some heart diseases and the control of blood glucose is associated with the ingestion of vanadium compounds in water, on the other hand the actuation of vanadium in the human body and its toxic effects, mainly in cellular functions are not well clarified. The interest in estimate the level of vanadium in water has increased the search for methods and analytical techniques in routine. This is the case of method for determination of vanadium in water by UV/Vis Spectrophotometry. Based on the reaction of oxidation of acid gallic by acid solution of ammonium persulphate catalyzed by vanadium. However, the steps laborious to addition of the reagents, control the time of addition and the time spent in obtaining the balance, makes the complicated method for routine analysis. The facility of apply kinetic methods to the control of reactional conditions, and acceleration of catalytic process, makes of flow injection systems a suitable tool to application of the method. The work describes the development of a Sequential Injection System (SIA) fully automated for microcontroller with platform open-source (Arduino MEGA 2560), for the control of the piston pump and selector valve. The automation of the system was tested by application to the standard method of determination of vanadium in water by UV/Vis Spectrophotometry. The adaptation of the method to the SIA system was performed by optimization of reactional conditions, concentration and volume of reagents, order of aspiration, residence time and temperature. Optimized conditions, determination coefficient R^2 from 0.996 to a linear range from 50.0 to 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ was achieved by the system. The limits of detection and quantification of 15.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 36.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively were obtained by measures of analytical white ($n=26$). Tests of adding and recovery in the range 94.5 to 109.1% were obtained by the system SIA-UV/Vis. The system was applied in samples of waters rich in vanadium, intended for human consumption. The accuracy of the system was tested by comparison with the standard method of determination by UV/VIS Spectrophotometry and ICP-MS. For a p value > 0.05 there was no significant evidence on the average of the treatments of the water samples. Low consumption of reagent, 4.0 mg of ammonium persulphate, 1.0 mg of acid gallic and only 3.35 mL of residue generated by analysis, characterize the system as one of the techniques toward the green chemistry. The acceleration of catalytic process allowed an analytical frequency of 19 determinations per hour. Therefore the developed system has proved to be a useful tool in routine analysis for the determination of vanadium in water.

Keywords: Vanadium. UV/Vis spectrophotometry. Instrumentation. Sequential Injection Analysis (SIA).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de passos na determinação de vanádio através da Análise por Injeção Sequencial (SIA).....	73
Tabela 2 - Parâmetros operacionais e de aquisição de dados na determinação de vanádio por ICP-MS.	75
Tabela 3 - Fatores principais e de interação e sua estrutura de associação (confundimentos) para análise de efeitos.....	82
Tabela 4 - Níveis decodificados das variáveis independentes do planejamento fatorial fracionado (2^{5-1}).....	83
Tabela 5 - Matriz do Planejamento Fatorial Fracionado 2^{5-1} com ponto central em triplicata.	84
Tabela 6 - Equações de codificação para as variáveis independentes.	84
Tabela 7 - Efeitos calculados para o Planejamento Fracionado 2^{5-1}	85
Tabela 8 - Análise de variância para o modelo.	90
Tabela 9 - Resultado dos ensaios adicionais ao planejamento 2^{5-1}	92
Tabela 10 - Efeito de possíveis espécies interferentes.	94
Tabela 11 - Comparação entre métodos de batelada e de injeção em fluxo na determinação de vanádio por espectrofotometria UV/Vis.....	96
Tabela 12 - Análise de amostras de água.	98
Tabela 13 - Composição Química das amostras de água (mg L^{-1}).	101
Tabela 14 - Resultados obtidos na determinação de vanádio pelo sistema SIA-UV/Vis, Espectrofotométrico UV/Vis e ICP-MS para as 3 amostras de água.....	101

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Diagrama de fase para V (V) em solução aquosa em função da concentração total de vanádio e pH.....19
- Figura 2** - Representação da estrutura do fosfato e vanadato.23
- Figura 3** - Ilustração simplificada da ação do vanadato como efeito mimético de insulina. BEOV: bis (etilmaltolato)oxidovanadium (IV) ;Tf: transferrina , IR: receptor de insulina , PTP: proteína tirosina fosfatase . GLUT4 é um transportador de glucose.....24
- Figura 4** - Primeiro sistema de fluxo desenvolvido no porão da casa de Skeggs (1957).....33
- Figura 5** - Primeiro Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA).....34
- Figura 6** - Sistemas em fluxo contínuo desenvolvidos a partir da injeção de reagentes em linha única.35
- Figura 7** - Primeiro sistema de Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentado (MCFA). A seta indica a direção na qual a alça é movida de modo a introduzir a amostra em fluxo transportador.....36
- Figura 8** - Configuração do sistema SIA. H (do inglês Holding Coil) é para onde a zona de amostra e reagente é aspirada sequencial impedindo a entrada da solução no cilindro da bomba de êmbolo (à esquerda da imagem).....37
- Figura 9** - (a) V1 a V4, representam as válvulas solenóides acionadas individualmente à base de tempo, para a introdução de solução em direção ao percurso analítico. (b) Sistema utilizado para investigar o conceito de amostragem binária.....38
- Figura 10** - Representação esquemática da válvula solenoide de três vias.....38
- Figura 11** - A esquerda, o sistema de injeção de amostra e reagentes desenvolvido por Victor Cerdá e a direita representação esquemática das seringas e vista superior das válvulas. MS: Sistema Multiseringa; S: Seringa, V: Válvula comutadora.39
- Figura 12** - Microsistema de Injeção Sequencial. O sistema apresenta pistão de 500 μ L e célula de detecção construída junto a porta 2 da válvula seletora.40

Figura 13 - Esquema do primeiro sistema em fluxo com microbombas utilizado para a determinação de Cr^{6+} em água. P1 e P2: microbombas solenoides; L: reator; D: detector; R: reagente; S: amostra; W: resíduo; C: interface de controle; x: ponto de confluência.....	42
Figura 14 - Representação esquemática de uma microbomba solenoide.	42
Figura 15 - (a) Sistema de Interface única introduzido em 2005. P: microbombas solenoides; V: válvulas solenoides; S: amostra; R: reagente; L: reatores; D: detector. (b) Representação da evolução do sinal analítico em sistema SIFA com múltiplas inversões e detecção. A: amostra; R: reagente; I: interface única de reação.....	44
Figura 16 - Imagem do <i>Micro-Flow Injection System</i> (μFIA) para a determinação de bicarbonato em água.....	45
Figura 17 - Imagem do sistema μFBA com dimensões de milímetros.	46
Figura 18 - Esquema típico de um sistema de Análise por Injeção Sequencial (SIA).....	47
Figura 19 - Processo de inversão do sentido de fluxo dos sistemas SIA. Aspiração: Transporte por convecção e difusão axial; Propulsão e inversão do sentido: Difusão radial; A: amostra; R: Reagente; S: Sobreposição das zonas de amostra e reagente.	49
Figura 20 - Representação dos fenômenos de convecção, difusão axial e radial no sistema SIA.....	49
Figura 21 - Representação da sobreposição mútua da zona de amostra e reagente. A: zona de amostra; R: zona de reagente; P: sobreposição das zonas; Ls: largura da linha de base da zona sobreposta; La: largura da linha base da amostra; Lr: largura da linha base do reagente; I_D : ponto de isodispersão.....	51
Figura 22 - Imagem do sistema SIA desenvolvido.....	61
Figura 23 - Esquema do sistema SIA.....	61
Figura 24 - Fluxograma dos módulos de controle, do sistema de Análise por Injeção Sequencial (SIA) e aquisição dos dados.....	62
Figura 25 - Kloehn VersaPump 3.....	63

Figura 26 - (A) Representação esquemática da comunicação direta do microcomputador com a bomba pela porta serial RS232. (B) Representação esquemática da comunicação serial TTL de uma placa Arduíno Mega 2560 com a bomba através de um conversor RS232 - TTL.....	64
Figura 27 - Modelo esquemático da válvula seletora.....	65
Figura 28 - (A) Imagem da placa Arduíno MEGA 2560. (B) pinos e layout do Arduíno Mega.	66
Figura 29 - (A) Espectrofotometro UVMMini-1240. (B) Especificações de hardware. (C) Cubeta de fluxo de quartzo da marca Hellma modelo 283-QS.....	67
Figura 30 - (A) Banho Termostatizado TE-184. (B) Especificações técnicas. (C) Controle de temperatura da coluna de reação.....	68
Figura 31 - Imagem digitalizada do software SIACONTROL e dos macrocomandos.	69
Figura 32 - Imagem digitalizada do software AQUIS-UVMInl1240.....	70
Figura 33 - Obtenção das alturas dos picos (sinais transientes) pelo tratamento de dados utilizando software UTIFIA desenvolvido no grupo DIA.....	71
Figura 34 - Sistema SIA desenvolvido para a determinação de vanádio em água.....	74
Figura 35 - Espectro de absorção da reação de oxidação do ácido gálico por solução ácida de persulfato de amônio catalisada por vanádio.....	77
Figura 36 - (a) Efeito do volume de amostra; (b) Efeito do volume de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8\text{-H}_3\text{PO}_4$; Efeito do volume de $\text{H}_6\text{C}_7\text{O}_5$; (d) Ordem de aspiração dos reagentes e amostra e seu efeito na intensidade do sinal analítico. (n = 3).....	79
Figura 37 - Investigação das condições experimentais: (a) Efeito da vazão de aspiração na intensidade do sinal analítico (b) Efeito da vazão da solução transportadora na dispersão do sinal analítico. (n = 3)	81

Figura 38 - Gráfico normal dos valores da Tabela 7. Todos os efeitos são significativos. Os valores refletem a % de variação no sinal de absorbância no caso de mudança do nível inferior para o nível superior.....	86
Figura 39 - Efeito de interação ácido fosfórico e persulfato de amônio na intensidade do sinal analítico (Absorbância): (a) Curva de contorno. (b) Superfície de resposta.....	88
Figura 40 - Efeito de interação ácido fosfórico e temperatura na intensidade do sinal analítico (Absorbância): (a) Curva de contorno. (b) Superfície de resposta.....	88
Figura 41 - Resíduos dos ajustes dos dados: (a) Distribuição dos resíduos. (b) Respostas observadas versus valores estimados pelo modelo.....	91
Figura 42 - Curva analítica para os diferentes tempos de preparo da solução ácida de persulfato de amônio.....	93
Figura 43 - Avaliação da linearidade do método para o sistema SIA.....	95
Figura 44 - (a) Curva analítica para a determinação de vanádio em água (b) Sinais transientes obtidos para a concentração de 0,05 a 0,5 mg L ⁻¹ V (V).....	95
Figura 45 - Curva analítica do método padrão de determinação de vanádio em água.....	99
Figura 46 - (a) Curva analítica obtida para a determinação de vanádio total por ICP-MS. (b) Distribuição dos resíduos.....	100
Figura 47 - Análise de Variância (ANOVA), na comparação do sistema SIA-UV/Vis, espectrofotométrico e ICP-MS na determinação de vanádio.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BEOV	bis (etilmalato)oxidovanádio (IV)
BMOV	cloreto de bis(malato)oxovanádio (IV)
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Chama
FIA	Flow Injection Analysis
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite
GS	glicogênio sintase
GLUT4	transportador de glicose
GAC	<i>Green Analytical Chemistry</i>
IARC	International Agency Research for Cancer
IR	receptor transmembranar
LOV	<i>Lab-On-Valve</i>
MCFS	<i>Multicommutated Flow System</i>
MPFS	<i>Multi-Pumping Flow Systems</i>
MSFIA	<i>Multisyringe Flow Injection Analysis</i>
OEHHA	<i>Office of Environmental Health Hazard Assessment</i>
PMMA	polimetilmetacrilato
PTP	proteína tirosina fosfatase
SIA	Sequential Injection Analysis
SIFA	Single Interface Flow Analysis
SCFA	Análise de Fluxo Segmentado Contínuo
SPE	Extração em Fase Sólida
Tf	transferrina
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
VMP	valor máximo permitido

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 INTRODUÇÃO	16
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 VANÁDIO	19
2.1.1 VANÁDIO NO MEIO AMBIENTE	20
2.1.2 FUNÇÕES BIOLÓGICAS E TOXICIDADE DOS COMPOSTOS DE VANÁDIO	21
2.1.3 LEGISLAÇÃO	25
2.2 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE VANÁDIO	26
2.2.1 STANDARD METHODS (MÉTODO DO ÁCIDO GÁLICO)	28
2.3 SISTEMAS DE ANÁLISE EM FLUXO	31
2.3.1 INJEÇÃO EM FLUXO: HISTÓRIA	33
2.3.2 ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQUENCIAL (SIA)	46
2.3.3 DETERMINAÇÃO DE VANÁDIO POR INJEÇÃO EM FLUXO	52
CAPÍTULO 3 - OBJETIVO DO TRABALHO	57
3.1 OBJETIVO	58
CAPÍTULO 4 - PARTE EXPERIMENTAL	60
4.1 INSTRUMENTAÇÃO	61
4.2 HARDWARE/SOFTWARE	63
4.2.1 MICROCOMPUTADOR	63
4.2.2 BOMBA DE SERINGA	63
4.2.3 VÁLVULA SELETORA DE 10 PORTAS	64
4.2.4 PLACA ARDUÍNO	65
4.2.5 ESPECTROFOTOMETRO UV/MINI-1240	66
4.2.6 BANHO TERMOSTATIZADO	67
4.2.7 SIACONTROL	68
4.2.8 AQUIS-UVMINI1240	69
4.2.9 UTIFIA	70
4.3 REAGENTES E SOLUÇÕES	71

4.3.1	SIA-UV/VIS.....	71
4.3.2	STANDARD METHODS (MÉTODO DO ÁCIDO GÁLICO).....	72
4.3.3	ICP-MS	72
4.4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	72
4.4.1	SIA-UV/VIS.....	72
4.4.2	STANDARD METHODS (MÉTODO DO ÁCIDO GÁLICO).....	74
4.4.3	ICP-MS	75
CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		76
5.1	ESPECTRO DE ABSORÇÃO	77
5.2	ESTUDO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO PADRÃO AO SISTEMA SIA- UV/VIS.....	78
5.2.1	ORDEM DE ASPIRAÇÃO E ESTUDO DO VOLUME DE AMOSTRA E REAGENTE	78
5.2.2	PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO	81
5.2.3	CAMINHO DE MÁXIMA ASCENSÃO (STEEPEST ASCENT)	92
5.2.4	EFEITO DO TEMPO DE PREPARO DE (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ -H ₃ PO ₄ NA SENSIBILIDADE	93
5.3	ESTUDO DE INTERFERENTES	94
5.4	PERFORMANCE ANALÍTICA	94
6.	CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		105

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL

1.1 INTRODUÇÃO

O interesse em avaliar o nível de vanádio no ambiente, sobretudo em água direcionadas ao consumo, bem como os efeitos que eles podem provocar à saúde humana, tem aumentado a busca por métodos e técnicas analíticas de rotina, que permitam quantificar com segurança espécies tóxicas no meio ambiente (MACHACKOVA, L.; ZEMBERYOVA, M., 2009).

No mundo existem poucas fontes de águas naturais ricas em sais de vanádio e as propriedades atribuídas na prevenção de problemas de saúde, agregam alto valor econômico ao metal. No entanto, a presença de compostos de vanádio em águas tem despertado o interesse em relação às suas funções biológicas e toxicidade a longo prazo (HUANG et al., 2016).

Alguns estudos tem demonstrado que o consumo de água vanádica tem favorecido pacientes diabéticos. Goldfine et al. (1995) verificaram que o metavanadato de sódio atua na regulação da insulina em pacientes diabéticos tipo II e alguns do tipo I. Para Mouser os compostos de vanádio apresentam grande potencial no tratamento da diabetes, por melhorarem a hiperglicemia e a homeostasia anormal da glicose em animais de diabetes tipo I e II (JAMES et al., 1988; MOUSER, J., 2004). Pesquisadores relatam que o consumo de vanádio em concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, atua na prevenção de algumas doenças cardíacas e é essencial para o crescimento das células (KIMURA et al., 2006; GOC, A., 2006; REHDER, D., 2012).

Apesar de eficaz no controle da glicose sanguínea, a toxicidade do vanádio pode limitar seu papel como agente terapêutico no tratamento do diabetes (SRIVASTAVA, A. K., 2000; PREET et al., 2005). Hamel e Duckworth (1995), verificaram que a longo prazo, o vanádio tende a se acumular em diferentes órgãos, principalmente nos rins.

Apesar dos benefícios da ingestão de águas ricas em sais de vanádio, o conhecimento de seu potencial toxicológico a longo prazo tem exigido o desenvolvimento de métodos analíticos para se monitorar a presença e concentração do metal. Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS) (LIU, H.; JIANG, S., 2002; BEDNAR, A. J., 2009) Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS) (MACHACKOVA, L.; ZEMBERYOVA, M., 2009; SOYLAK et al., 2013) são algumas

das técnicas utilizadas na determinação de vanádio, entretanto o custo operacional e instrumental são desvantagens relacionadas às técnicas. Outras envolvem a determinação por Espectrofotometria de Absorção Molecular UV/Vis, que se baseiam na formação de complexos, reações redox, associações iônicas e reações cineticamente catalisadas, que apesar de sensíveis, são complicadas e laboriosas, consome tempo e reagente, exigindo um operador treinado (FISHMAN, M. J.; SKOUGSTAD, M. W., 1964; WEIGUO, Q., 1983; AL-TAYAR et al., 2012; EL-SHAHAT et al., 2012).

É o caso do método padrão de determinação de vanádio em água por espectrofotometria UV/Vis. A reação cinética é baseada na oxidação do ácido gálico por solução ácida de persulfato de amônio catalisada por vanádio, onde a taxa de oxidação do ácido gálico é proporcional a concentração de vanádio presente (FISHMAN, M. J.; SKOUGSTAD, M. W., 1964; *STANDARD METHODS 3500 V*).

A aplicação de metodologias tradicionais aos sistemas de injeção em fluxo, como a determinação de vanádio por Espectrofotometria UV/Vis tem como vantagem trabalhar em condições de não equilíbrio químico, acelerando o processo catalítico, aumentando a frequência analítica do método. As condições reacionais passam a ser exatamente as mesmas para cada padrão e amostra, através controle do tempo e volume, reduzindo significativamente o consumo de reagente e resíduo gerado (SILVA et al., 2009; OGUMA et al., 2012; PINTO et al., 2013).

Se por um lado os compostos de vanádio presente em água representam uma saída no controle da diabetes, por outro, o acúmulo no organismo pelo consumo de água vanádica a longo prazo pode trazer riscos a saúde. Normas brasileiras e americanas tem estipulado o valor máximo permitido em água de 50,0 e 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, como nível de segurança para a concentração de vanádio devido a toxicidade que representam (CONAMA, 2008; OEHHA, 2000). No entanto, águas minerais destinadas ao consumo humano são comercializadas com concentrações que vão desde 23,0 e 87,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ até 300 $\mu\text{g L}^{-1}$. Mostra-se necessário o desenvolvimento de técnicas analíticas de rotina que sejam rápidas e eficaz na quantificação e controle da concentração de vanádio no que concerne a sua presença em água.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

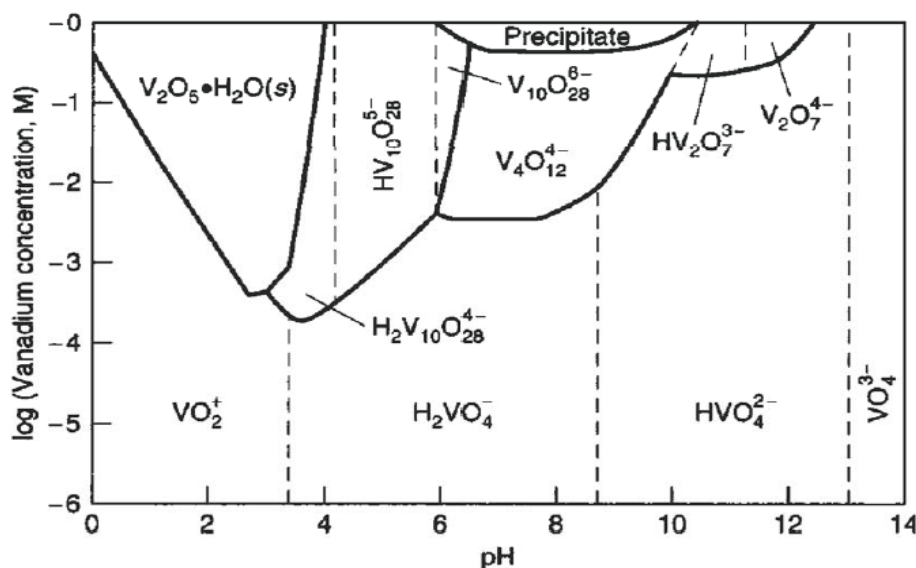
2.1 VANÁDIO

O vanádio ($Z= 23$) é um elemento de transição pertencente ao grupo 5B da tabela periódica. Se destaca como o quinto metal de transição mais abundante na natureza e ponto de fusão mais elevado entre os elementos da primeira série de transição (CINTAS, P., 2004).

Entre todos os estados de oxidação existentes, I-, 0, I, II, III, IV e V, a espécie V, o pentóxido de vanádio (V_2O_5), em sua forma inorgânica é a mais comum. Em menor proporção, também são encontrados outros compostos, metavanadato de amônio (NH_4VO_3), metavanadato de sódio ($NaVO_3$) e ortovanadato de sódio (Na_3VO_4). A toxicidade do vanádio difere significativamente devido a natureza do composto e seu estado de oxidação, sendo a forma pentavalente a mais tóxica (CRANS, D., 2004).

A espécie pentavalente (V_2O_5) age como catalisador em vários tipos de reações, como na oxidação de SO_2 em SO_3 , para a produção de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Em meio ácido predomina a espécie VO_2^+ , de coloração amarelo pálido, em meio alcalino predomina o íon VO_4^{3-} , incolor. O estado de oxidação na qual o vanádio é encontrado depende do pH e da concentração no meio (Figura 1). O vanádio existe numa extensa série de óxidos como V_2O_5 (V), VO_2 (IV), V_2O_3 (III), VO (II) (LARSON, J. W., 1995).

Figura 1 - Diagrama de fase para V (V) em solução aquosa em função da concentração total de vanádio e pH.



Fonte: LARSON, J. W., (1995).

No ambiente, o vanádio (V) é a espécie mais estável, podendo ser encontrado na forma de vários óxidos, chamados de vanadatos (VO_3^- , VO_4^{3-} , H_2VO_4^- , HVO_4^{2-}). Em meio ácido, o V (V) prevalece como cátion VO_2^+ (pervanadil) e em meio alcalino, como o ânion $\text{VO}_3^-/\text{VO}_4^{3-}$ (vanadato). O vanádio (IV) pode ser encontrado na forma de cátion VO^{2+} (vanadil) em solução ácida. Em pH inferior a 2, o V (IV) é oxidado a V (V) na presença de agentes oxidantes (LARSON, J. W., 1995; McCANN et al., 2013).

2.1.1 VANÁDIO NO MEIO AMBIENTE

Apresentando cerca de 0,019% de abundância na crosta terrestre, o vanádio é o segundo elemento de transição mais abundante em águas marinhas, perdendo apenas para o zinco. Proveniente de fontes naturais e antropogênicas não são encontrados em sua forma pura. Existem aproximadamente 65 diferentes minérios contendo o metal, como a vanadita ($\text{PbCl}_2 \cdot 3\text{Pb}_3(\text{VO}_4)_2$), carnotita ($\text{K}_2(\text{UO}_2)_2(\text{VO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), sendo também encontrado no petróleo e carvão (REHDER, D., 2012).

A concentração de vanádio na crosta terrestre é de aproximadamente 0,140 mg Kg^{-1} e no solo 135 mg kg^{-1} (ATSDR, 2012). Na atmosfera, a presença de vanádio está relacionada a fontes naturais (emissões vulcânicas) e atividades antropogênicas (queima de combustíveis, carvão e óleo). Mais de 64 mil toneladas de vanádio são lançadas na atmosfera todos os anos, como resultado da atividade antropogênica. Durante a queima de combustíveis fósseis, concentrações variam entre 20,0 e 300 ng m^{-3} de vanádio no ar das grandes cidades (LIN et al., 2004).

Em água doce, a concentração de vanádio se encontra entre 0,200 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e entre 0,200 e 29,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ na água salgada. Quando a fonte de água doce se localiza próximo a áreas industriais (produção de ligas de ferro e vanádio), o teor de vanádio pode chegar a 60,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. As fontes naturais abundantes em vanádio, como depósitos de urânio, ou onde pode ocorrer lixiviação de lava vulcânica, os níveis podem ser maiores que 70,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CETESB, 2012). Na água potável, a concentração é normalmente menor que 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto nas águas superficiais podem estar entre 0,040 a 104 $\mu\text{g L}^{-1}$. Nos Estados Unidos (2012), os níveis de vanádio medidos em amostras de água da torneira, coletadas em vários estados, chegaram a 1,0 e 1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN, 2012).

Um levantamento realizado pelo *World Health Organization* (WHO) indicou que a concentração de vanádio em água potável é menor que $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e pode chegar a níveis superiores a $70,0 \mu\text{g L}^{-1}$ dependendo da área geográfica. Na água salgada, as concentrações podem estar entre $1,0$ e $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e em sedimentos de $20,0$ a $200 \mu\text{g g}^{-1}$ (EPA, *Environmental Protection Agency*).

2.1.2 FUNÇÕES BIOLÓGICAS E TOXICIDADE DOS COMPOSTOS DE VANÁDIO

A função biológica e a toxicidade de um elemento dependem do estado de oxidação. O V (V), na forma de VO_4^{3-} (vanadato) é mais tóxico que V (IV), na forma VO^{2+} (vanadil) (RODRÍGUEZ-MERCADO, J. J.; ALTAMIRANO-LOZANO, M. A., 2006).

O vanádio desempenha um importante papel em processos bioquímicos, as formas (IV) e (V) são capazes de reagir com o material genético, podendo interagir com os grupos fosfatos e açúcares dos nucleotídeos para formar complexos que inibem ou estimulam a atividade das muitas enzimas de DNA e RNA. A exposição aguda de humanos e animais ao vanádio ou a compostos de vanádio por inalação, causa efeitos adversos ao sistema respiratório, resultando em conjuntivites, reinite, bronquite e asma (VENKATARAMAN, B. V.; SUDHA, S., 2005; GOC, A., 2006).

Há evidências biológicas que o vanádio esteja envolvido no acúmulo e fixação de nitrogênio por plantas e bactérias em nódulos de raízes de vários legumes cultivados em solos com baixas concentrações de vanádio (SWETHA et al., 2013; TU et al., 2015).

Estudos in-vitro mostraram que o vanádio, em níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$, é essencial para o crescimento das células, além de atuar na prevenção de algumas doenças cardíacas (SEMIZ et al., 2002; GOC, A., 2006; REHDER, D., 2012; ALONSO-LOMILLO et al., 2013; PINTO et al., 2013).

Nas últimas décadas, o foco principal da medicina tem sido a utilização de complexos de vanadato, como agentes que reproduzem os efeitos metabólicos da insulina no tratamento da diabetes e a diminuição da repercussão de doenças cardíacas (KIMURA et al., 2006; WEI et al., 2011; REHDER, D., 2012).

Os primeiros estudos associam a administração de vanadato com a atenuação significativa de disfunções do coração como a cardiomiopatia e consequente melhora da diabetes (HEYLIGER, E. C., 1985). Yuen et al. (1993)

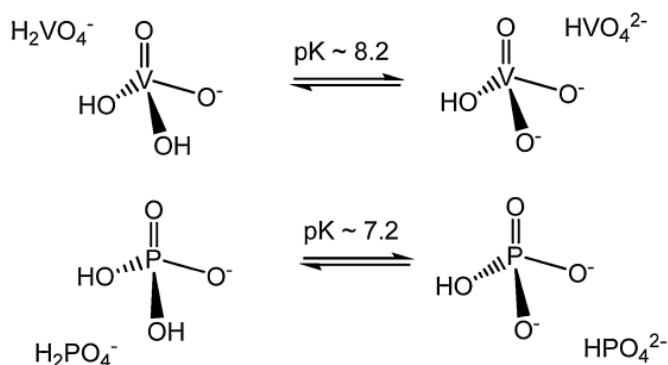
induziu a cardiomiopatia (complicação secundária em pacientes diabéticos) em ratos, e avaliou o efeito terapêutico do complexo de vanádio orgânico, cloreto de bis(maltolato)oxovanádio (IV) (BMOV). Após o tratamento, observou-se uma diminuição da glicose sanguínea em 70 % dos ratos diabéticos sem o aumento do nível de insulina no plasma. Parâmetros cardíacos também indicaram que a administração resultou numa atenuação significativa da disfunção do coração.

No trabalho “*Vanadium Compounds as Insulin Mimics*”, Orvig et al. (1999) descreve o potencial de atuação dos compostos de vanádio na regulação da secreção de insulina, de tal forma que num período entre 10 e 20 anos os compostos representariam uma oportunidade no controle da diabetes, proporcionando formas de investigação do mecanismo de ação da insulina.

SEMIZ et al. (2002), explica que a síntese de glicogênio contribui para a regulação da glicose sanguínea pela insulina, que por sua vez, promove o transporte da glicose, pelo transportador (GLUT4) até a membrana plasmática celular e estimula a deposição de glicose em glicogênio pela ativação do glicogênio síntase (GS). O transportador de glicose (GLUT4) é regulado por insulina e encontrado principalmente em tecidos adiposos e em músculos estriados (esquelético e cardíaco). Quando a proteína quinase, mais ativa na fosforilação de GS, é inativada, ocorre a diminuição da regulação de glicose por insulina (RAGOLIA, L.; BEGUM, N., 1998).

Para Rehder, D. (2012), a principal razão para o potencial do vanádio no tratamento da diabetes, vem da similaridade entre vanadato e fosfato. Do ponto de vista geométrico, não são muito diferentes, possuem estrutura análoga fazendo do vanadato um concorrente aos sítios ocupados pelo fosfato (Figura 2). No interior das células, o vanadato, devido à semelhança com fosfato, se liga ao sítio ativo de fosfatases. Quando isso acontece, proteína fosfatase (PTP) é desativada (inibida) e a enzima é mantida fosforilada, restaurando ou mantendo ativo o sinal e os caminhos de transdução para a captação da glicose (ORVIG, C.; THOMPSON, K. H., 2006; ORVIG et al., 2009; REHDER, D., 2015; PESSOA, J. C., 2015).

Figura 2 - Representação da estrutura do fosfato e vanadato.



Fonte: PESSOA et al., 2015.

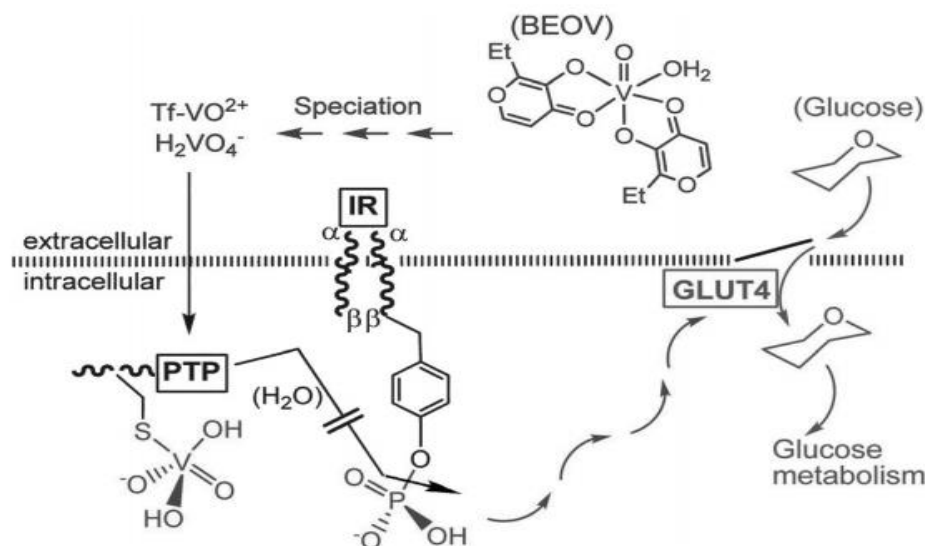
A transição de pH 7,4 para 6,8 o equilíbrio é deslocado e a quantidade de HVO_4^{2-} aumenta. Na faixa de pH 4,5 - 6,0 (fisiológico), o vanadato predomina sob a forma H_2VO_4^- . Sob as mesmas condições, HPO_4^{2-} e H_2PO_4^- existem em quantidades aproximadamente iguais. Uma vez que o vanádio é incorporado aos sítios ativos de fosfato, a atividade das enzimas que fazem a desfosforilação é inibida (PESSOA et al., 2015).

No organismo, o transportador mais importante de H_2VO_4^- , VO_2^+ (e compostos de vanádio com um sítio de coordenação acessível) em soro sanguíneo é a transferrina (Tf), proteína de transporte de ferro e outros elementos no plasma e no líquido extracelular para suprir as necessidades teciduais. O VO_2^+ também se liga à imunoglobulina e albumina do soro, embora de forma menos eficiente do que a Tf. Além disso, glóbulos vermelhos contribuem na captação, transporte e subsequente distribuição de $\text{VO}_2^+/\text{VO}_2^+$ na forma adequada para atravessar a membrana plasmática (GARRIBA et al., 2011).

Segundo Kimura et al. (2006), pacientes com diabetes, que consumiram águas ricas em vanádio das regiões de Ibirá-SP, tiveram melhoras nas condições da doença. Para o autor o vanádio atua de forma coordenada em eventos celulares que regulam os efeitos metabólicos da deficiência absoluta ou relativa na secreção de insulina e/ou resistência dos tecidos alvos à ação da insulina.

Estudos clínicos recentes demonstram o aumento na excreção da insulina por VO_2^+ utilizando maltolato (BEOV) (THOMPSON et al. 2009). A Figura 3 ilustra o possível modo de ação.

Figura 3 - Ilustração simplificada da ação do vanadato como efeito mimético de insulina. BEOV: bis (etilmaltolato)oxidovanadium (IV) ;Tf: transferrina , IR: receptor de insulina , PTP: proteína tirosina fosfatase . GLUT4 é um transportador de glicose.



Fonte: REHDER, D., 2015

Primeiro o ligante sofre especiação (parcial) no soro de sangue, o que inclui remoção do ligante maltolato, e a coordenação de VO^{2+} a Tf e/ou oxidação para vanadato . Ambos, complexo Tf e vanadato podem entrar no espaço intracelular via endocitose e canais de fosfato, respectivamente. O receptor de insulina IR (receptor transmembranar) tem à sua disposição resíduo de tirosina ligado às subunidades intracelulares. O acoplamento da insulina a subunidade extracelular α promove a fosforilação das tirosinas. Na ausência de insulina (diabetes tipo I) ou insuficiência na excreção da (diabetes tipo II), a proteína tirosina fosfatase (PTP) neutraliza a fosforilação do $\text{IR}\beta$, impedindo os caminhos (setas vermelhas), que levam a captação celular de glicose (setas malva) pelo transportador de glicose (GLUT4). Nesse momento o vanadato entra na história e se liga fortemente a um resíduo de cisteína da tirosina fosfatase (PTP), inibe sua atividade e impede a desfosforilação das subunidades $\text{IR}\beta$, restaurando ou mantendo a sinalização da translocação dos caminhos de captação da glicose (REHDER, D., 2015).

Nos seres humanos, as propriedades toxicológicas dos compostos de vanádio, não são totalmente esclarecidas. Sabe-se que a administração de 14,0 mg de vanádio durante o período de um mês em pacientes com diabetes, provoca leves dores gástricas, e por um período superior a cinco meses, perda de peso e dores

abdominais. Alguns estudos realizados não notaram alterações nas células sanguíneas, do fígado e dos rins após ingestão de vanádio em baixas concentrações (GOC, A., 2006; THOMPSON, K. H.; ORVIG, C., 2006, *U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2012*).

Estudos em ratos demonstram que doses orais elevadas de vanádio, provocam opressão dos vasos, congestão e degeneração do fígado, hemorragia nos pulmões, insuficiência respiratória, convulsões, diarreia com perda de sangue, acarretando a morte (RODRÍGUEZ-MERCADO, J. J.; ALTAMIRANO-LOZANO, M. A., 2006). Evidências de células cancerígenas também foram observadas após exposição ao pentóxido de vanádio. A ingestão de água rica em sais de vanádio não revelou o aumento na incidência de câncer. Em humanos não existem estudos disponíveis sobre os possíveis efeitos carcinogênicos do vanádio (WHO, 2001; *U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN, 2012*). De acordo com a EPA (*Environmental Protection Agency*) o vanádio e os seus compostos não são classificados como carcinogênicos. No entanto, o IARC (*International Agency Research for Cancer*) classifica o V_2O_5 como possível agente carcinogênico.

Apesar do potencial dos compostos de vanádio, é necessário, antes de qualquer aplicação terapêutica, conhecer os efeitos tóxicos a nível celular. A falta de conhecimento acerca dos problemas e efeitos do vanádio em reações inflamatórias do sistema imunológico e outros inconvenientes, particularmente da administração a longos períodos, dificulta a aplicação clínica destes compostos, enquanto não forem elucidadas todas as vias de atuação no organismo humano (PESSOA, J. C., 2015).

2.1.3 LEGISLAÇÃO

No Brasil, a portaria N° 540 da ANVISA classifica as águas minerais de acordo com os elementos químicos raros provenientes de fontes naturais ou de fontes artificialmente captadas. De acordo com o artigo 1º, a água é considerada vanádica quando contiver concentração de no mínimo $30,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de vanádio.

A resolução N°2914 de 2011 do Ministério da Saúde dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Do anexo VII, o elemento vanádio não está presente entre as substâncias químicas que representam risco a saúde.

A resolução 357 de 2005 do CONAMA classifica os corpos de água e as diretrizes ambientais para o seu enquadramento e condições de lançamento de efluentes. Do referido decreto, seção II (padrões de qualidade de águas doces classe 1 e 2) e artigo 16 (água doce - classe 3) estipula Valor Máximo Permitido (VMP) de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de vanádio, dada a toxicidade que o vanádio apresenta para várias culturas, mesmo em concentrações relativamente baixas. Em relação às águas destinadas diretamente ao consumo humano, a norma não estipula valor de referência no que concerne à presença do elemento vanádio neste tipo de matriz.

Do Anexo I, a resolução 396 de 2008, parâmetros com maior probabilidade de ocorrência em águas subterrâneas e seus respectivos Valores Máximos Permitidos (VMP), estabelece $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ como concentração máxima de vanádio em água para o consumo humano e $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para a dessedentação de animais e irrigação.

Para a OEHA (*“Office of Environmental Health Hazard Assessment”*) o nível máximo para a concentração de vanádio na água potável é de $15 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, dado o risco a saúde humana por ingestão á longo prazo.

2.2 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE VANÁDIO

Muitas técnicas tem sido utilizadas para determinação de vanádio em água, Espectrofotometria UV-Vis (KUMAR et al., 2012; MOHAMED et al., 2012; NARAYANA, B.; SUNIL, K., 2009; SWETHA et al., 2013), Voltametria (ARANCIBIA et al., 2016), Potenciometria (MASTERALO et al., 2016), Fluorimetria (GAO et al., 2002), Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES) (LI, L.; HU, B., 2007), Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS) (MARTÍN-CAMEÁN, A., 2014).

O *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005), propõe quatro métodos para determinação de vanádio em amostras de água: Espectrometria de Absorção Atômica (EAA), Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica (EAA ET), Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP MS) e o Método do Ácido Gálico (UV/Vis).

Na FAAS (*“Flame Atomic Absorption Spectrometry”*), a amostra é atomizada na chama ao estado atômico, onde um feixe de radiação é emitido por uma lâmpada cujo cátodo (fonte: lâmpada de cátodo oco) é feito do elemento a ser determinado.

Os átomos livres no estado fundamental absorvem radiação em comprimentos de onda característicos. A quantidade de radiação absorvida é proporcional à concentração do analito na amostra. Devido a sensibilidade, a utilização da técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS) na determinação de vanádio tem sido relatada na literatura para diferentes matrizes (SOYLAK, et al., 2013). O vanádio tende a formar carbetos refratários quando em contato com o grafite pirolítico a altas temperaturas, prejudicando a atomização e causando a redução da sensibilidade e reprodutibilidade do método. Faz-se necessário a adição de modificadores químicos a amostra (supressor de interferência), para que a sensibilidade do método não seja inferior e as medidas se tornem precisas (FERREIRA et al., 2007).

Marques et al. (2003), determinou vanádio em óleo diesel por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, empregando nitrato de magnésio como modificador químico para aumentar a sensibilidade do sistema. As temperaturas ótimas de pirólise e atomização obtida na presença de modificador químico foram de 1100 e 2700 °C, respectivamente. O aumento do sinal analítico proporcionou um limite de detecção e quantificação de 12 e 40 ng L⁻¹ para o sistema.

O ICP-MS, devido ao baixo limite de quantificação, é capaz de detectar elementos traços. Por esse motivo é recomendado na determinação de vanádio, principalmente quando a amostra provém de fontes naturais, onde o elemento é encontrado em baixas concentrações. Limites de detecção de ng L⁻¹ são normalmente encontrados na literatura (LIU, H.; JIANG, S., 2002). A medida realizada no ICP-MS resulta na quantidade total do elemento a ser determinado, a ionização é feita em plasma, sendo mais completa e inerte do que em chama, evitando a formação de óxidos (HUANG et al., 2016).

Apesar das vantagens inegáveis da técnica, baixo limite de detecção, alta precisão, sinal analítico estável e determinação simultânea de mais de 60 elementos químicos, a técnica possui algumas desvantagens. Uma delas é a interferência isobárica elementar causada por isótopos de diferentes elementos que formam íons de mesma razão massa/carga (¹¹⁴Sn e ¹¹⁴Cd) e espectral causada pela formação de íons poliatômicos no plasma. Em água, interferência poliatômica, de óxidos, hidróxidos, hidretos, podem influenciar de forma significativa no limite de detecção de alguns elementos. Segundo Guseva et al., (2015) a escolha das condições para a

determinação de vanádio, crômio e arsênio em águas ricas de íon cloreto por ICP-MS é complicada, principalmente em decorrência da formação de íons poliatômicas de mesma razão massa-carga.

O ICP-MS oferece melhor sensibilidade na determinação de vanádio, no entanto, o íon diatômico $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$ e $^{34}\text{S}^{16}\text{OH}^+$ (decorrente da matriz), sobrepõe o isótopo de maior abundância do vanádio ($m/z = 51$) (PYRZYNSKA, K.; WIERZBICK, T., 2004). Cloreto é considerado o ânion mais problemático na determinação de vanádio por ICP-MS, principalmente em matrizes contendo altas concentrações. A adição de pequena quantidade de solvente orgânico ou a utilização da cromatografia de exclusão de tamanho é diferentes formas de contornar a presença de matrizes ricas em cloreto (EBDON et al., 2004).

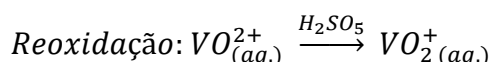
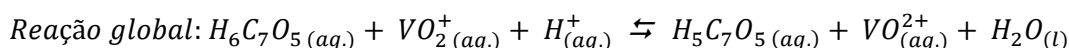
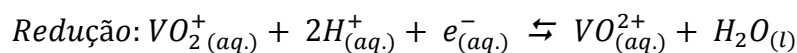
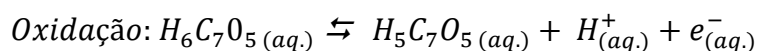
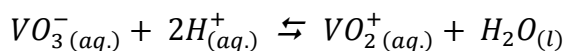
Os métodos espectrofotométricos usados na determinação de vanádio baseiam-se na formação de complexos, oxidação-redução, reações cineticamente catalisadas, associações iônicas e extração por solvente (ROCHA, F. R. P., 2004). Os métodos espectrofotométricos baseados em reações catalíticas são os mais comuns na determinação de vanádio (MASTOI, G. M.; KHUHAWAR, M. Y., 2007).

2.2.1 STANDARD METHODS (MÉTODO DO ÁCIDO GÁLICO)

A metodologia adotada como referência para a quantificação de traços totais de vanádio por espectrofotometria UV/Vis foi proposto por Skougstad e Fishman em 1964. A determinação indireta do vanádio está relacionado com o seu efeito catalítico na oxidação do ácido gálico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) por solução ácida de persulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8\text{-H}_3\text{PO}_4$, onde a taxa de oxidação do ácido gálico é proporcional à concentração de vanádio presente.

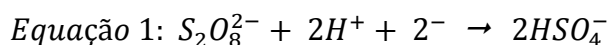
Os autores descrevem que a oxidação de ácido gálico por solução ácida de persulfato de amônio é lenta, mas acelerada na presença de vanádio (catalisador). O persulfato de amônio sob extrema condição de acidez (adição de H_3PO_4 concentrado) forma o íon peroxidisulfato (HS_2O_5^-). O ácido peroximonossulfúrico (H_2SO_5), forte agente oxidante, ativa o processo de oxidação catalítica do ácido gálico.

As reações de oxi-redução do vanádio são apresentadas abaixo:

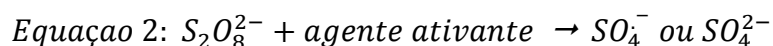


As etapas de oxidação catalítica envolvem a oxidação do $C_7H_6O_5$ por ácido peroximonossulfúrico (H_2SO_5) (agente ativante da reação) de cinética lenta e pelo íon pervanadil (VO_2^+), que acelera a oxidação do ácido gálico. O íon vanadil (VO^{2+}) resultante da redução do íon pervanadil (VO_2^+) durante a etapa de oxidação do ácido gálico é imediatamente reoxidado pelo ácido peroximonossulfúrico. O sinal analítico correspondente ao produto de cor amarela é detectado espectrofotometricamente com seleção de comprimento de onda em 415 nm (*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater-Method 3500 V*).

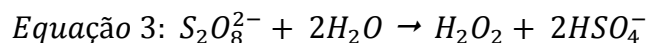
Outras vias de atuação do ânion peroxidissulfato ($S_2O_8^{2-}$) na reação poderia envolver a formação de radicais ao invés do ácido peroximonossulfúrico (H_2SO_5) (Equação 1). O ânion peroxidissulfato é um agente oxidante forte, com um potencial de oxidação $E^0 = 2,05$ V, é utilizado na indústria de petróleo para o tratamento de fluídos hidráulicos ou iniciador reacional (McCALLUM et al., 2000):



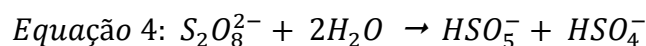
No entanto o ânion possui cinética lenta a temperatura ambiente, como resultado $S_2O_8^{2-}$ é tipicamente ativado (aquecimento ou fotoquímica) e convertido a radical sulfato, agente oxidante mais forte que $S_2O_8^{2-}$ ($E^0 = 2,6$ V) (Equação 2):



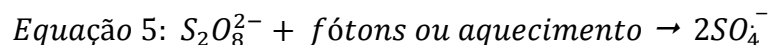
Sob condições ácidas (Equação 3), ânion peroxidissulfato pode sofrer hidrólise para formar peróxido de hidrogênio:



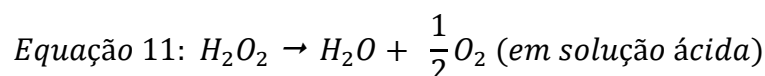
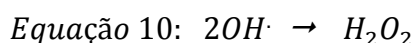
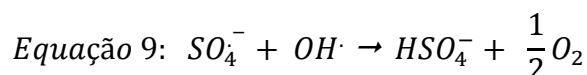
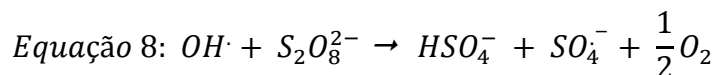
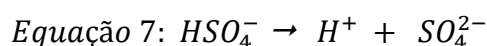
O peróxido de hidrogênio tem potencial de oxidação de 1,77 V, que na presença de ativadores pode formar radical hidroxila ($OH\cdot$), com $E^0 = 2,8$ V, o agente oxidante mais forte. Pode também ocorrer a formação de radical hidroxila por reação do radical sulfato ($SO_4^{\bullet-}$) com água (MORGAN et al., 1997). Outra possibilidade é a formação do ânions peroximonopersulfato ($E^0 = 1,44$ V) a partir de peroxidissulfato sob condições fortemente ácida (Equação 4):



Segundo Chu et al. (2007), a ativação térmica ou fotoquímica do $S_2O_8^{2-}$ o decompõe em íon $SO_4^{\bullet-}$ (Equação 5):

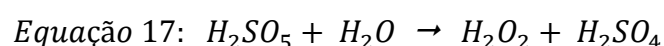
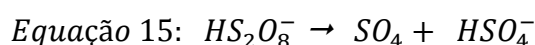
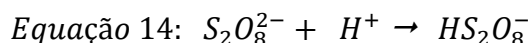
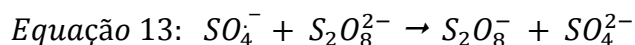
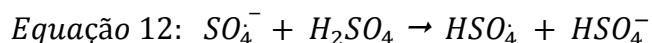


Sob condições ácidas $SO_4^{\bullet-}$, produz HSO_4^- e $OH\cdot$ que irá se decompor para formar íon sulfato SO_4^{2-} como indica as equações abaixo (Equações 6, 7, 8, 9, 10, 11):



Em geral, após a clivagem da ligação do $S_2O_8^{2-}$ o radical sulfato, reage com água para formar radical hidroxila, o mais forte agente oxidante. Em condições

extremas de acidez ($\text{pH} < 3$), a formação de ácido peroximonossulfúrico (H_2SO_5) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) é favorecida, via decomposição do $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ e $\text{SO}_4^{\bullet -}$, como sugere as reações a seguir (Equações 12, 13, 14, 15, 16,17):



Nessa faixa de pH, prevalece a formação de agentes oxidantes mais fracos como $\text{HS}_2\text{O}_8^{\bullet -}$, H_2SO_5 , SO_4 , $\text{HSO}_4^{\bullet -}$, H_2O_2 , ao invés de radicais fortemente oxidantes, como OH^{\bullet} ($E^\circ = 2,8 \text{ V}$) e $\text{SO}_4^{\bullet -}$ ($E^\circ = 2,6 \text{ V}$) (CHU et al., 2007). Isso sugere que a solução de persulfato é decomposta em diferentes radicais e agentes oxidantes ($E^\circ = 0,87$ a $2,8 \text{ V}$) em meio ácido, e os caminhos do processo de ativação da oxidação catalítica do ácido gálico por vanádio é mais complexo do que o proposto por Fishman e Skougstad (1964).

2.3 SISTEMAS DE ANÁLISE EM FLUXO

Os sistemas de fluxo derivam do aperfeiçoamento de técnicas analíticas com a finalidade de minimizar o consumo de reagentes e resíduo gerado, aumentar a frequência analítica, diminuindo a intervenção do operador reduzindo a contaminação, e melhorar a precisão do método (RUZICKA, J.; HANSEN, E. H.; 1980; ZAGATTO et al., 2014).

Extremamente versáteis, esses sistemas podem ser adaptados a diversas condições de trabalho, como faixas temperaturas e pH, em reações cinéticas. Podem ser acoplado a diversos detectores como absorção molecular, absorção atômica, voltamétricos, amperométricos, potenciométricos, de quimiluminescência e fluorescência. Ao longo do percurso analítico pode receber reagente e passar por etapas de processamentos, tais como: extração líquido-líquido, pré-concentração, geração de fase gasosa para separar o analito, diluição em linha, diálise por

membrana permeável a gás, etc (REIS, B. F., 1995; REIS, B. F., 1996; ROCHA, et al., 2012; ZAGATTO et al., 2014)

A Análise por Injeção em Fluxo (FIA) tem como conceito básico a introdução da amostra em um fluido carregador (que pode ser o reagente), cuja função é transportar a zona de amostra introduzida ao longo do percurso analítico até o detector. É constituído basicamente por uma bomba de propulsão (bomba peristáltica) ou seringa (pistão), injetor comutador, válvula solenoide ou válvula seletora, bobinas de reação para a formação da espécie de interesse e um detector responsável pelo sinal analítico transiente (RUZICKA, J.; MARSHALL, G. D., 1990; REIS et al., 1994; MASINI, J. C., 2008; MASINI, J. C.; SANTOS, A. C. V., 2010).

O processo de dispersão da amostra pelo fluido carregador depende de parâmetros físico-químicos, coeficiente de difusão das espécies, viscosidade dos reagentes, temperatura, pH, volume de amostra e reagente, presença de fluxos confluentes, além das dimensões do percurso analítico, dimensões e forma da bobina de reação e o tempo de permanência da mistura no percurso analítico, são fatores que podem e devem ser otimizados (REIS, B. F.; KRONKA, E. A. M., 1997; MASINI, J. C.; SANTOS, A. C. V., 2010).

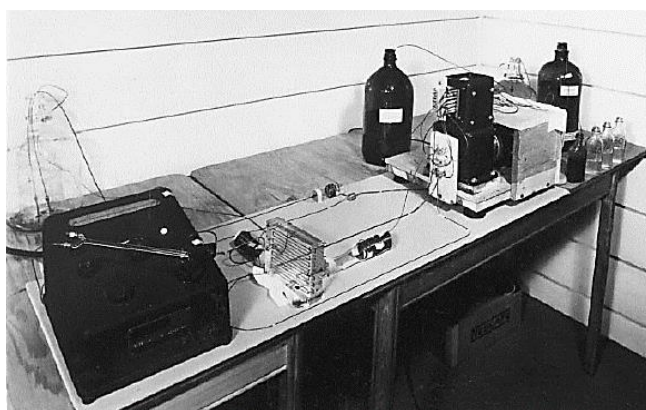
A essência dos processos de injeção em fluxo é o conhecimento das reações químicas envolvidas. A partir deste domínio, o módulo de análise é desenvolvido, e as variáveis envolvidas são investigadas a fim de se obter o melhor desempenho para o sistema (REIS, B. F., 1996). Sistemas de injeção em fluxo diferem dos métodos tradicionais com relação a não obrigatoriedade na obtenção do equilíbrio químico, já que, o intervalo de tempo disponível para desenvolvimento das reações envolvidas é rigorosamente mantido para todas as amostras e padrões (ZAGATTO et al., 2010; ZAGATTO et al., 2012). Economiza-se então o tempo que seria gasto para complementação das reações químicas e abre-se a perspectiva de controle das condições químicas com redução do volume de amostra e reagente (ZAGATTO et al., 2014).

Um exemplo de aplicação dessa técnica é a tradicional determinação de vanádio em água por espectrofotometria UV/Vis. A reação cinética é baseada na oxidação do ácido gálico por solução ácida de persulfato de amônio catalisada por vanádio, onde a taxa de oxidação do ácido gálico é proporcional a concentração de vanádio presente (FISHMAN, M. J.; SKOUGSTAD, M. W., 1964; *STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER*, 2005).

2.3.1 INJEÇÃO EM FLUXO: HISTÓRIA

Em 1957 um bioquímico de formação preocupado com a qualidade dos resultados de amostras de fluido sanguíneo, percebeu que poderia fazer a análise colorimétrica por fluxo contínuo (Figura 4).

Figura 4 - Primeiro sistema de fluxo desenvolvido no porão da casa de Skeggs (1957).



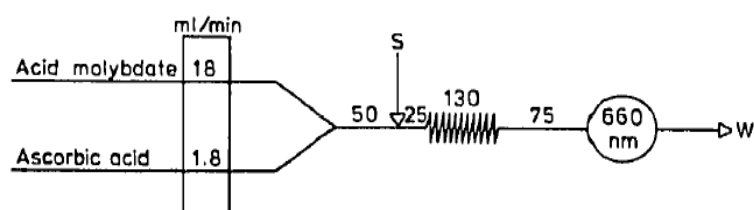
Fonte: SKEGGS, L.T., (2000).

À direita da imagem as garrafas grandes contêm os reagentes, as garrafas pequenas contém a solução de uréia usada para a curva de calibração. Da direita para a esquerda observa-se a bomba peristáltica usada na propulsão das soluções por meio de tubulação de polietileno enrolada em torno de tubos de ensaio. O detector, um colorímetro, foi equipado com célula de fluxo construída a partir de uma pipeta (SKEGGS, L.T., 1957; SKEGGS, L.T., 2000). No processo, a amostra e reagente, era segmentada por bolhas de gás e as reações processadas até o equilíbrio. Nascia o conceito de Análise de Fluxo Segmentado Contínuo (SCFA) por bolhas de gás. A análise química, antes empregada discretamente por batelada, poderia ser realizada em um fluxo contínuo de amostra e reagentes (SKEGGS, L. T., 2000).

As primeiras aplicações dos sistemas em fluxo não-segmentado ocorreram no Brasil, principalmente da colaboração científica entre a Agência Internacional de Energia Atômica de Viena e o Centro de Energia Nuclear de Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo, campus de Piracicaba. A análise por injeção em fluxo é a versão em português do título “Flow Injection Analysis” (FIA), introduzida pelo Dr. Jaromir Ruzicka (RUZICKA, J.; STEWART, J. W. B., 1975) (Figura 5) que como

perito da Agência Internacional de Energia Atômica, participou das instalações do laboratório de Química Analítica do CENA, onde os primeiros trabalhos foram publicados (RUZICKA et al., 1976).

Figura 5 - Primeiro Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA).

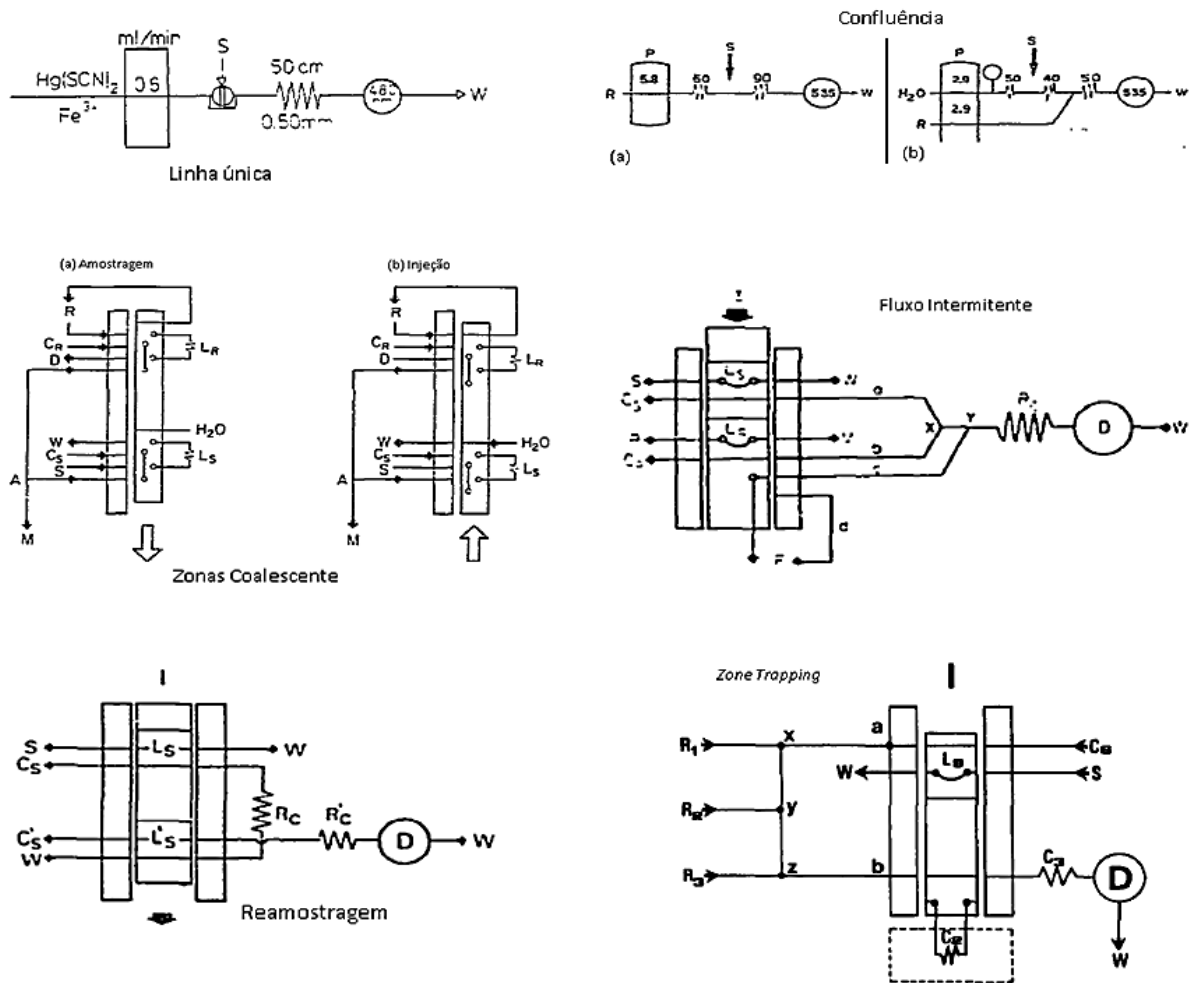


Fonte: RUZICKA, J.; STEWART, J. W. B., (1975).

Com o título *Flow Injection Analysis Part I: A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis*, Ruzicka e Hansen (1975) introduziram os conceitos do novo sistema desenvolvido. Ainda nesse ano, a segunda parte (aplicação do sistema) resultaria no trabalho *Flow Injection Analysis Part II: Ultrafast Determination of Phosphorus in Plant Material by Continuous Flow Spectrophotometry*, introduzindo o sistema como uma nova ferramenta na análise química de rotina (RUZICKA, J.; STEWART, J. W. B., 1975).

Deste momento em diante, os sistemas de injeção em fluxo não-segmentado ganharam espaço a partir dos sistemas em linha única (RUZICKA et al., 1977), com o desenvolvimento dos sistemas em confluência (BERGAMIN et al., 1978), zonas coalescente (BERGAMIN et al., 1978), fluxo intermitente (BERGAMIN et al., 1980), reamostragem (BERGAMIN et al., 1981), zone trapping (KRUG et al., 1983) (Figura 6).

Figura 6 - Sistemas em fluxo contínuo desenvolvidos a partir da injeção de reagentes em linha única.

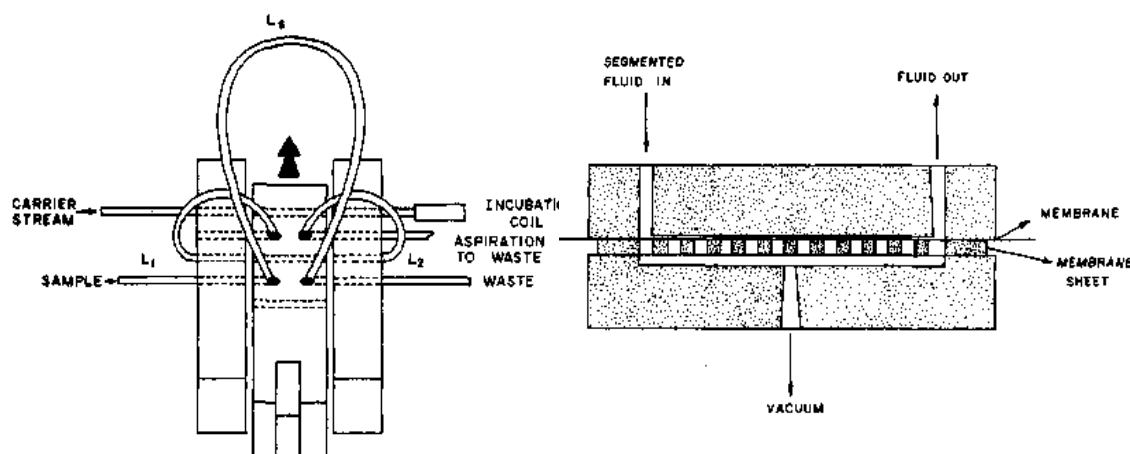


S: Amostra; R: Reagente; W: Descarte; L_S: Alça de amostragem; L_R: Alça do reagente; C_R: Solução carregadora do reagente; C_S: Solução carregadora da amostra; R_C: Bobina de reação; x,y,z: Pontos de confluência; P: Bomba peristáltica; D: Detector.

Fonte: RUZICKA et al., (1977), BERGAMIN et al., (1978, 1980, 1981), KRUG et al., (1983).

Em 1985, Pasquini e Oliveira retomam o conceito de Injeção de bolhas de gás para o aprisionamento da zona de amostra e reagente. O conceito de um sistema monsegmentado do inglês “*Monosegmented Continuous Flow Analysis*” (MCFA) (Figura 7).

Figura 7 - Primeiro sistema de Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentado (MCFA). A seta indica a direção na qual a alça é movida de modo a introduzir a amostra em fluxo transportador.

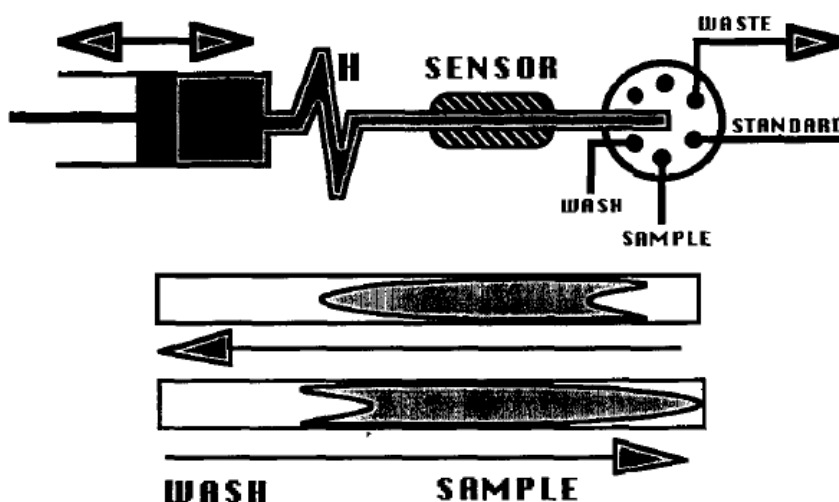


Fonte: PASQUINI, C.; OLIVEIRA, W. A., (1985).

Diferentemente de Skeggs (1957) que utilizava a segmentação contínua com bolhas de gás, Pasquini e Oliveira propuseram um sistema onde a zona de amostra é aprisionada entre duas bolhas de gás, com o objetivo de evitar a dispersão (van STADEN et al., 1997) da zona de amostra e reagente. Nesse caso, o tempo de residência da amostra é maior que aqueles atribuídos a sistemas de fluxo contínuo, o que é uma vantagem para amostras com baixa concentração do analito de interesse (aumento da sensibilidade) e reações de cinética lenta. As bolhas foram removidas por membrana permeável a gás antes da detecção (PASQUINI, C.; OLIVEIRA, W. A., 1985).

Em 1990, Ruzicka e Marshall desenvolvem um novo conceito de injeção em fluxo, a Análise por Injeção Sequencial (SIA), do inglês "*Sequential Injection Analysis*" (Figura 8). Como principal objetivo, os autores queriam implantar um sistema mais versátil e preciso, com as características já conhecidas dos sistemas de fluxo, baixo consumo de reagente e amostra (RUZICKA, J.; MARSHALL, G. D., 1990).

Figura 8 - Configuração do sistema SIA. H (do inglês Holding Coil) é para onde a zona de amostra e reagente é aspirada sequencial impedindo a entrada da solução no cilindro da bomba de êmbolo (à esquerda da imagem).

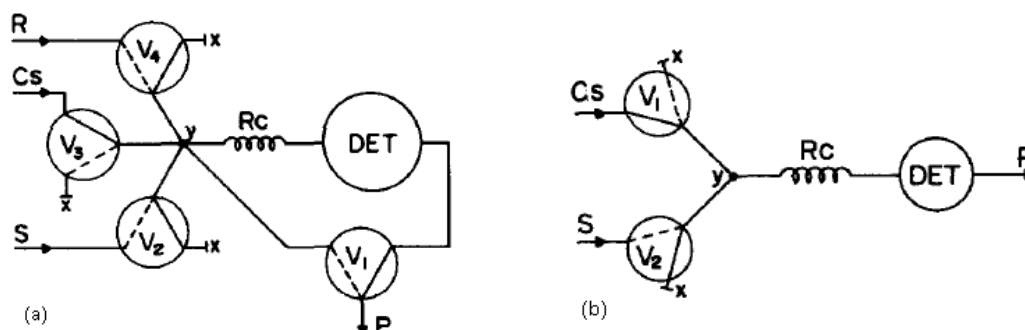


Fonte: RUZICKA, J.; MARSHALL, G. D., (1990)

O sistema SIA foi concebido no sentido de simplificar mecanicamente os sistemas a análise por injeção em fluxo (mudanças de configuração), automação dos processos de aspiração, vazão e inversão do sentido do fluxo. O monitoramento *on-line* de métodos, onde a exigência por um sistema robusto, estável por longos períodos e de pouca manutenção, faz com que a automação do sistema SIA se torne requisito essencial, principalmente em processos industriais (RUZICKA et al., 1991).

A automação das análises químicas, aliada à chegada dos computadores aos laboratórios, proporcionou o desenvolvimento dos sistemas envolvendo a multicomutação. Do inglês, "*Multicommutated Flow System*" (MCFS), foi descrita pela primeira vez por Reis et al., (1994), para a introdução de reagentes e amostra (Figura 9). Dessa forma, a Análise por Injeção em Fluxo (FIA), até então explorada pela injeção de solução através de injetor comutador, passa a ter uma alternativa de introdução de reagentes e amostra, de forma automatizada, com a inserção das válvulas solenoides.

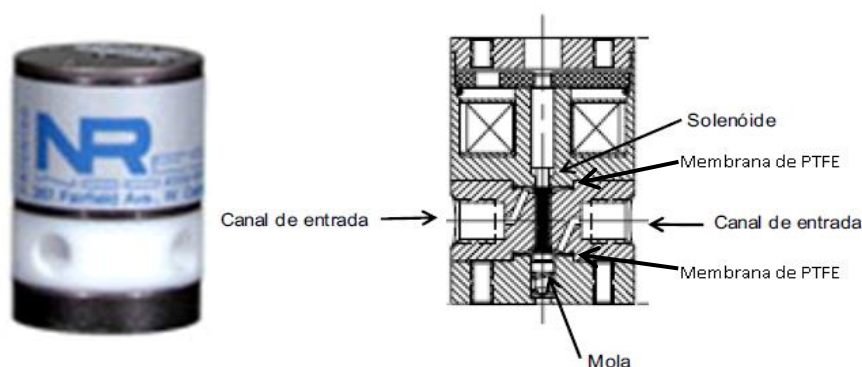
Figura 9 - a) V1 a V4, representam as válvulas solenóides acionadas individualmente à base de tempo, para a introdução de solução em direção ao percurso analítico. (b) Sistema utilizado para investigar o conceito de amostragem binária.



Fonte: REIS et al., (1994)

Nesse sistema, a escolha do percurso das soluções é realizado por aplicação de voltagem (fonte 12 V) condicionado pela posição de duas membranas. Quando o potencial é gerado (tempo de resposta de 5 à 20 ms), a solenoide interna é ativada, pressionando uma das membranas de Politetrafluoretileno (PTFE) presente no centro da válvula em direção a uma das vias, esse caminho se fecha, abrindo espaço a passagem da solução pela via oposta (Figura 10).

Figura 10 - Representação esquemática da válvula solenoide de três vias.



Fonte: NResearch Inc. (West Caldwell, USA).

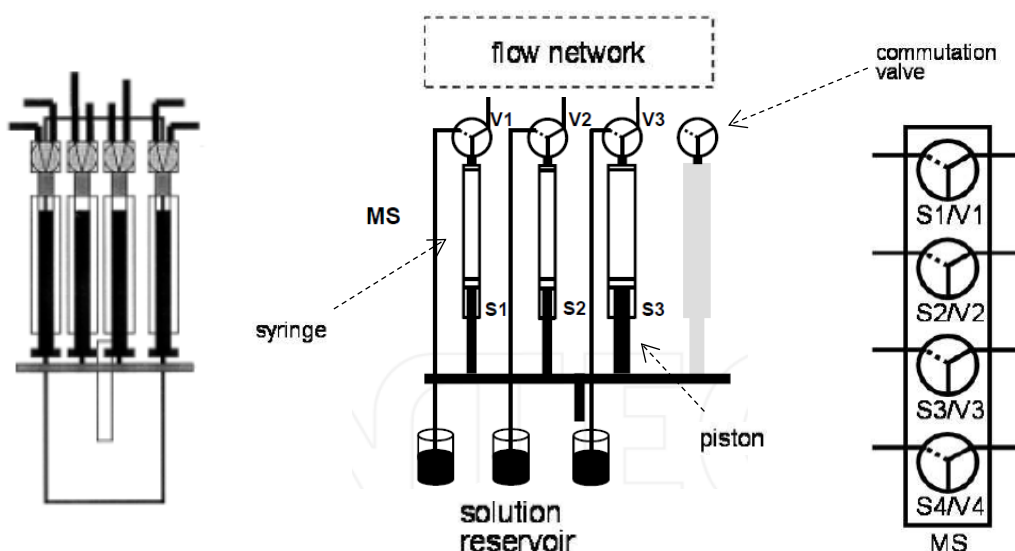
O percurso alternativo é restabelecido (Figura 10) após desligar a fonte de potencial, permitindo que a mola interna reposicione a membrana a posição inicial.

Válvulas solenóides apresentam resistência química interna elevada (PTFE) e pequeno volume morto. Economia de reagentes e amostra e alta frequência analítica está sempre associado a esse tipo de sistema. O trabalho de Reis e

colaboradores resultou na estratégia conhecida como amostragem binária, definida por segmentos de amostra intercalados com volumes definidos de reagente, facilitando a homogeneização da mistura, diminuindo a dispersão da zona de amostra. A sobreposição das soluções depende exclusivamente de fenômenos de difusão e convecção nas interfaces dos segmentos. (REIS et al., 1994; REIS et al., 1997).

A análise por injeção em fluxo explorando multi-seringa, do inglês “*Multisyringe Flow Injection Analysis*” (MSFIA), foi descrita em 1999, por Víctor Cerdá, como uma técnica multicanal que combina as vantagens dos sistemas FIA e SIA. É basicamente um conjunto de seringas de diferentes capacidades, empregado como dispositivo de propulsão ao invés de bombas peristálticas. A multisiringa está ligada em bloco a um único motor, e tem como característica a presença de válvulas de inserção e propulsão no topo de cada seringa. O sistema é totalmente automatizado.

Figura 11 - A esquerda, o sistema de injeção de amostra e reagentes desenvolvido por Víctor Cerdá e a direita representação esquemática das seringas e vista superior das válvulas. MS: Sistema Multiseringa; S: Seringa, V: Válvula comutadora.



Fonte: adaptado de CERDÁ et al., (1999); MIRÓ et al., (2011).

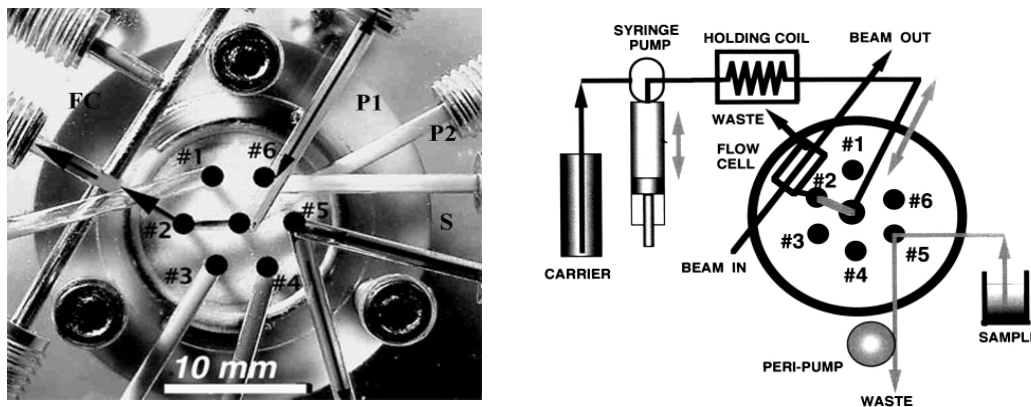
O sistema desenvolvido por Víctor Cerdá e colaboradores é um híbrido entre as principais características do sistema FIA e SIA. Um motor de passo propulsiona simultaneamente os êmbolos das seringas, operando em modo multi-canal, de forma

semelhante às bombas peristálticas. Pode também atuar em etapas de multicomutação das soluções com seleção exata do volume de amostra e reagente, como nos sistemas SIA (CERDÁ et al., 2005; MIRÓ et al., 2011).

Cada uma das quatro seringas que compõe o MSFIA possui volume interno diferente, e pode trabalhar com diferentes vazões. Versatilidade e precisão do sistema SIA combinado a etapas de multicomutação dos sistemas FIA resultam em baixa geração de resíduo. O funcionamento da multi-seringa requer que as mesmas sejam preenchidas periodicamente diminuindo a frequência analítica (CERDÁ, et al., 2005).

Pouco tempo depois, em 2000, surge o conceito de *Lab-On-Valve* (LOV). Proposto por Ruzicka, trata-se da compactação dos sistemas sequenciais (SIA), dando início ao que se tornou muito comum nos últimos 16 anos, miniaturização dos sistemas em fluxo (Figura 12).

Figura 12 - Microsistema de Injeção Sequencial. O sistema apresenta pistão de 500 μL e célula de detecção construída junto a porta 2 da válvula seletora.



Fonte: RUZICKA, J., (2000).

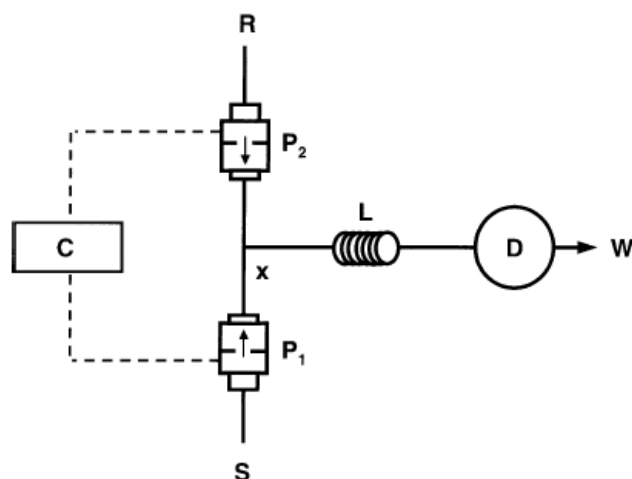
Apresenta o mesmo princípio de funcionamento do sistema SIA. Processos de diluição, mistura de reagentes, parada de fluxo e detecção é todo desenvolvido ao redor das portas da válvula seletora. A célula de fluxo, de estrutura monolítica é montada no topo da válvula seletora. Fibra óptica é normalmente utilizado para a detecção espectrofotométrica UV/Vis e fluorimétrica. Caso seja necessário, a célula de fluxo possui saídas pré estabelecidas para o acoplamento a diversos sistemas de detecção. Com a compactação do sistema, o percurso analítico é praticamente inexistente, como resultado baixo volume de reagente (alguns microlitros) e resíduo

são características do sistema. Os módulos de análise LOV apresentam como desvantagem a baixa frequência analítica em função do intervalo de tempo necessário para que a válvula seletora faça a comutação (RUZICKA, J., 2000).

“*Bead Injection Analysis*” está intimamente ligado aos sistemas *Lab-On-Valve*. A possibilidade de deslocamento das fibras ópticas, através dos microconduites de polimetilmetacrilato (PMMA), abre perspectivas ao empacotamento de microesferas. Diferentemente da Extração em Fase Sólida (SPE), o empacotamento *on-line* da fase sólida (microesferas em solução), retém o analito na zona de detecção (MIRÓ, M.; HANSEN, E. L., 2012). Na sequência, duas são as possibilidades, renovação química da superfície do material sólido *in-line* ou por inversão do sentido de fluxo, substituição física do sorvente. Microlitros da suspensão (microesferas), sem a necessidade de etapas de eluição e a renovação física do material sólido após cada ciclo, superam limitações da coluna permanente. Manipulação da suspensão, empacotamento das esferas no caminho óptico, assim como, forma, tamanho e sua distribuição são requisitos de estudo para o sistema (MIRÓ, M.; HANSEN, E. H., 2012; CERDÁ et al., 2012; HE et al., 2013). *Lab-On-Valve* tem sido aplicado a sistemas biológicos (enzimas ou imunoenaios), devido ao custo ou a disponibilidade dos mesmos (MIRÓ, M.; HANSEN, E. H., 2012).

Uma nova estratégia de bombeamento, injeção, homogeneização e comutação foi proposta por Lapa et al. (2002) com objetivo de tornar mais eficiente a etapa de mistura de pequeno volume de solução. Os sistemas de análises em fluxo explorando esta estratégia foram denominados sistemas de multipulsão, do inglês “*Multi-Pumping Flow Systems*” (MPFS) (Figura 13).

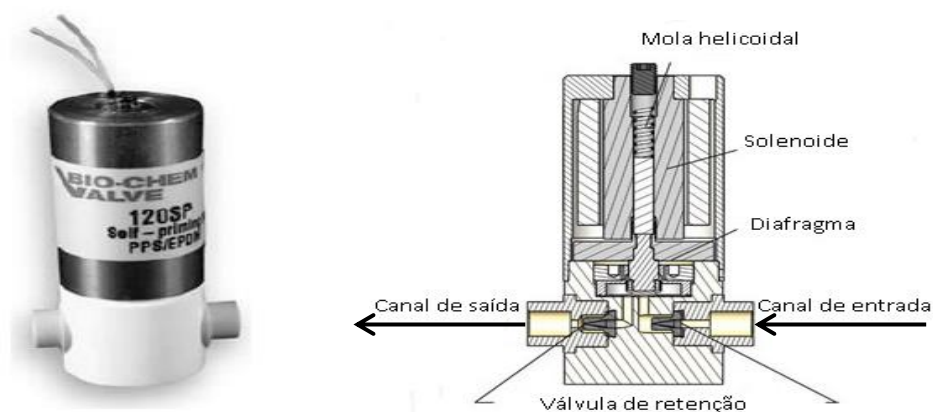
Figura 13 - Esquema do primeiro sistema em fluxo com microbombas utilizado para a determinação de Cr^{6+} em água. P1 e P2: microbombas solenoides; L: reator; D: detector; R: reagente; S: amostra; W: resíduo; C: interface de controle; x: ponto de confluência.



Fonte: LAPA et al., (2002).

O funcionamento das bombas solenoides é baseado no deslocamento do diafragma por ativação da solenóide interna. Por aplicação de voltagem 12 V, a solenóide comprime o diafragma, permitindo a aspiração da solução para a câmara interna (Figura 14).

Figura 14 - Representação esquemática de uma microbomba solenoide.



Fonte: BioChem Valve Inc. (Boonton, EUA).

Quando a fonte de potencial é suprimida a solenóide é desativada e a mola interna recoloca o diafragma na posição inicial. O movimento súbito da mola sobre o diafragma, provoca a propulsão do líquido, gerando um pulso de volume fixo

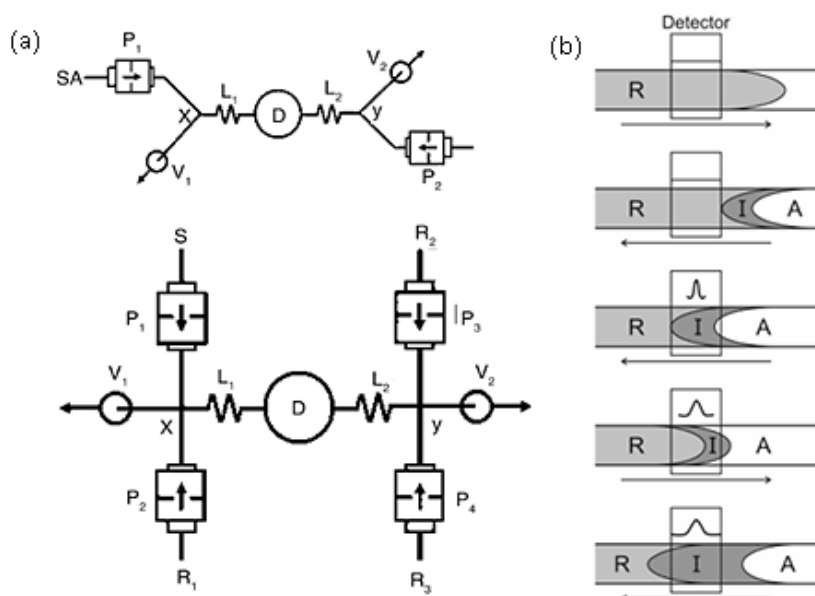
correspondente ao volume interno da bomba solenoide. O período de ativação e desativação da solenoide define o tempo de pulso (CERDÁ, V.; PONS, C., 2006).

Microbombas solenoides são empregadas para o bombeamento individual de cada solução envolvida. Originam fluxos pulsados (causado pelo deslocamento repentino do diafragma), caracterizado pelo volume de um pulso (cada bomba solenóide possui volume de pulso individual de 5, 10, 15, 20 ou 25 μL) e pela frequência de pulso (número de pulsos utilizado). Em combinação estabelecem a vazão individual de cada solução (LAPA et al., 2002; ZAGATTO et al., 2007).

Cada pulso da microbomba gera um movimento desordenado dos elementos no fluido, possibilitando que o grau de mistura entre amostra e reagente seja mais rápida e eficaz quando comparada àquela obtida em condições de fluxo laminar, na qual a interpenetração na interface das soluções, dependem exclusivamente do fenômeno de dispersão e convecção. Microbombas de volume interno menor são mais eficientes na mistura das soluções do que as de volume interno maior. Diminuição na extensão da bobina de reação (menos significativo devido aos pulsos gerados entre os segmentos na mistura dos reagentes), simplicidade de configuração (uma bomba solenóide para cada solução), controle automatizado e individual das bombas, além de alta frequência analítica são as principais características. (LIMA et al., 2004; ZAGATTO et al., 2007).

Os sistemas de análises que exploram interface única (SIFA), do inglês "*Single Interface Flow Analysis*", são os sistemas mais recentes em termos de flexibilidade na configuração dos módulos de análises. Desenvolvido por Ribeiro et al. (2005), não está relacionado a inserção de volume fixo das soluções, mas na interpenetração das zonas de segmento de amostra e reagentes com dispersão controlada. Uma interface única de reação é estabelecida pela extensão com que a sobreposição dos reagentes e amostra ocorrem. Volume de amostra e reagente, deixa de ser imprescindível, mas a extensão da sobreposição nas interfaces da solução passa a ser o principal objetivo (Figura 15) (RIBEIRO et al., 2005; ZAGATTO et al., 2007).

Figura 15 - (a) Sistema de Interface única introduzido em 2005. P: microbombas solenoides; V: válvulas solenoides; S: amostra; R: reagente; L: reatores; D: detector. (b) Representação da evolução do sinal analítico em sistema SIFA com múltiplas inversões e detecção. A: amostra; R: reagente; I: interface única de reação.



Fonte: Adaptado de RIBEIRO et al., (2005).

O posicionamento do detector no centro da montagem e a utilização das microbombas solenoides ou microburetas automáticas (LIMA et al., 2012) permite multi-deteções da zona de amostra através da realização de múltiplas inversões do sentido do fluxo (com ou sem detecção) ou inversões parciais, contribuindo no aumento do grau de penetração das zonas adjacentes e monitoramento contínuo do desenvolvimento da reação (SANTOS et al., 2008; SANTOS et al., 2010).

Com o objetivo de evitar os processos convencionais de Extração Líquido-Líquido (LLE) envolvendo solvente orgânico e de soluções aquosas imiscíveis, Santos et al. (2010) desenvolveu um sistema aquoso bifásico para extração *on-line* de chumbo, explorando os sistemas SIFA. Melhora no contato e processo de transferência de massa entre as duas fases, através de múltiplas inversões, estabelecendo uma única interface, levou a um baixo volume de solvente (400 μL), faixa de trabalho entre $4,8 \times 10^{-7}$ e $2,4 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} para o Pb^{2+} com fator de enriquecimento de 3 para o sistema.

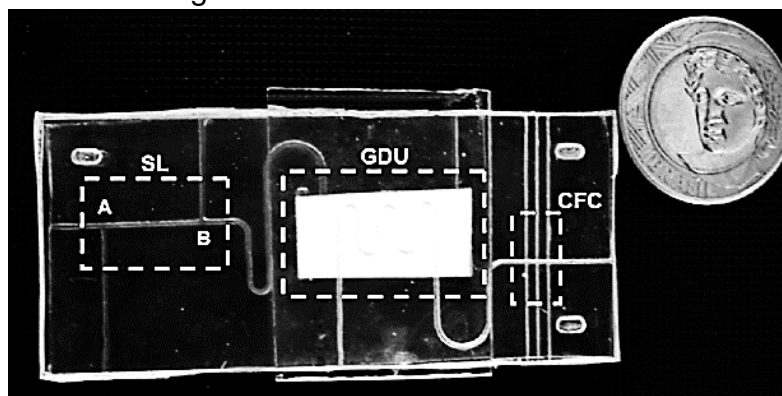
Sequential Injection Analysis (SIA), Multicommutated Flow Analysis (MCFA), Multisyringe Flow Injection Analysis (MSFIA), Lab-on-Valve (LOV), Multi-Pumping Flow System (MPFS), assim como *Single Interface Flow Analysis (SIFA)* são

considerados a evolução dos sistemas em fluxo em direção a química analítica verde. *Green Analytical Chemistry* (GAC), é definido pelas técnicas e métodos químicos que reduzem ou eliminam o uso de reagentes tóxicos assim como a geração de resíduos que são perigosos a saúde humana e ao meio ambiente. Entre as vantagens dos sistemas SIA, MCFS, MSFIA, LOV, MPFS, SIFA está a minimização no consumo de reagente e a adição de reagente de forma intermitente (ROCHA, et al., 2012).

Essas características levam a uma tendência na química analítica, a miniaturização e o desenvolvimento de sistemas portáteis para a implantação de métodos clássicos, com baixo consumo de reagente e geração de resíduos. Em 1990 surge o conceito de microssistemas de análise total do inglês “*Micro Total Analytical System*” (μ TAS), também conhecido como “*Lab-On-a-Chip*” (LOC), termo geral e utilizado para designar todo tipo de microssistemas, quer seja para análise química ou para outro propósito (ARAÚJO, et al., 2010; LEE, et al., 2012; ALMEIDA et al., 2014).

Nesse contexto, surge os sistemas chamados de *Micro-Flow Injection System* (μ FIA), sistemas explorando microfluídos, que trabalham com vazões na ordem de nL a $\mu\text{L min}^{-1}$. Esses sistemas são construídos a partir da confecção de máscaras fotolitográficas, utilizando como substrato uma foto-resina a base de Uretana-Acrilato (UA) por ultravioleta profundo para gravar os canais (Figura 16) (FONSECA, A.; SILVA, J. C. B., 2013).

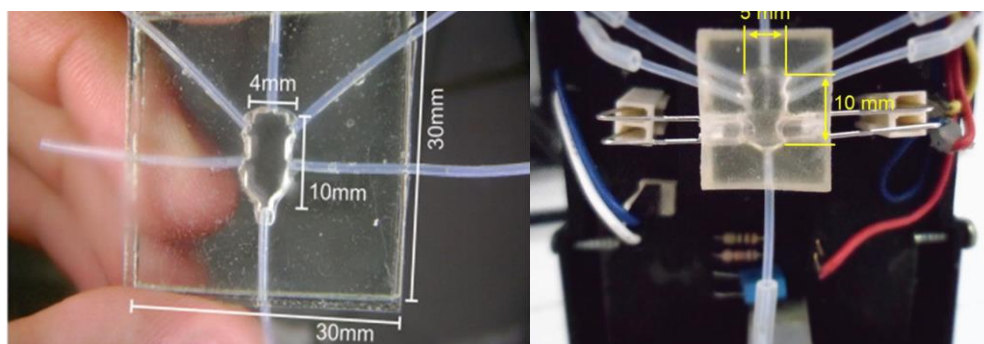
Figura 16 - Imagem do *Micro-Flow Injection System* (μ FIA) para a determinação de bicarbonato em água.



Fonte: FONSECA, A.; SILVA, J. C. B., (2013).

Muitos trabalhos têm sido relatados na literatura com relação a μ FIA, baseando-se principalmente no sistema *Flow Batch Analysis* (FBA) (HONORATO et al., 1999; ARAÚJO et al., 2012), que tem como principal característica a presença de uma câmara, onde todas as soluções são condicionadas para a homogeneização das soluções, tempo de residência, processos de pré-tratamento, diluições, e processos de extração líquido-líquido (ARAÚJO et al., 2012; ZAGATTO et al., 2014). Também construído por fotolitografia UV (Figura 17) em resina de Uretana-Acrilato (UA) a miniaturização do sistema FBA tem sido realizada, sendo chamada de *Micro-Flow Batch Analysis* (μ FBA) (ARAÚJO et al., 2012; 2013).

Figura 17 – Imagem do sistema μ FBA com dimensões de milímetros.



Fonte: ARAÚJO et al., (2012) e (2013).

Portabilidade e redução nos volumes totais da análise (entre alguns nanolitros até algumas dezenas de microlitros) além de alta frequência analítica são vantagens atribuídas aos sistemas. A principal desvantagem é que o sistema é construído para uma reação específica, mudanças de análise normalmente acarreta na construção de um novo sistema. Em razão dos benefícios de portabilidade e consumo de reagente e amostra, diferentes configurações e processos de desenvolvimento de microfluxos tem sido explorado em escala miniaturizada (ARAÚJO, et al., 2010; ARAÚJO et al., 2012; LEE et al., 2012; TODA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2012; LEE, N. Y.; WU, W.; 2013; ALMEIDA et al., 2014).

2.3.2 ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQUENCIAL (SIA)

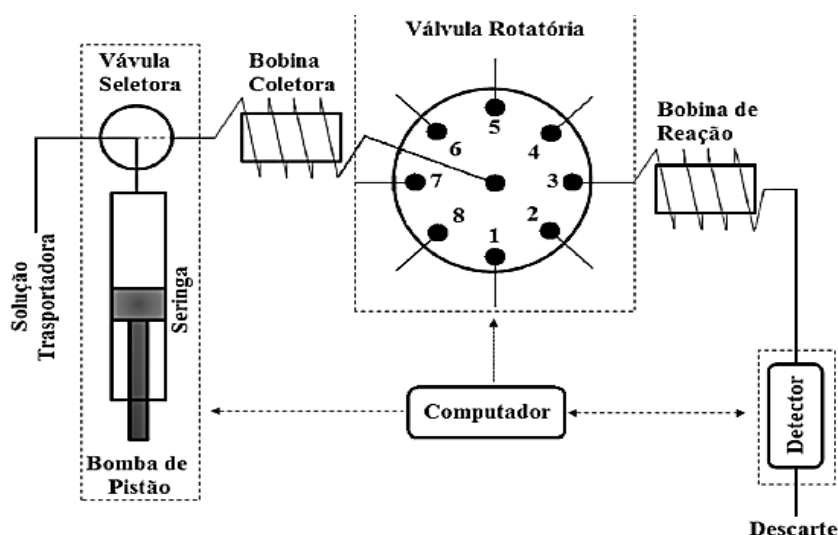
Um ampla descrição da Análise por Injeção Sequencial (SIA) foi realizada no que diz respeito as suas características, vantagens e desvantagens, conceitos e

aplicações. Como o trabalho realizado gira em torno dos sistemas sequenciais, uma ênfase maior foi dada aos sistemas SIA. Nesse contexto foi realizada uma discussão em torno dos componentes básicos que formam o sistema, assim como dos processos de dispersão que envolvem o desenvolvimento e formação do sinal analítico.

No início da década de 1990 a utilização de computadores se tornou cada vez mais comum na análise de rotina dos laboratórios, ao mesmo tempo a automação dos sistemas de fluxo na análise química passa a se tornar essencial com o advento dos sistemas sequenciais SIA (RUZICKA, J. MARSHALL, G. D., 1990). Nesse sentido, vários sistemas em fluxo foram desenvolvidos, “*Multicommutated Flow System*” (MCFS), descrito em 1994, em 1999 o “*Multisyringe Flow Injection Analysis*” (MSFIA), “*Lab-On-Valve*” (LOV) em 2000, e a última forma automatizada de propulsão de líquidos, descrita em 2005, “*Multi-Pumping Flow Systems*” (MPFS).

O sistema SIA é basicamente formado por uma válvula seletora, componente principal do sistema, contendo de seis a dez portas, possui uma porta central. Por comutação, a porta central tem acesso sequencial a amostra, reagentes e reatores (MASINI, J. C., 2008) (Figura 18).

Figura 18 - Esquema típico de um sistema de Análise por Injeção Sequencial (SIA).



Fonte: Masini, J. C.; Santos, A. C. V., (2010).

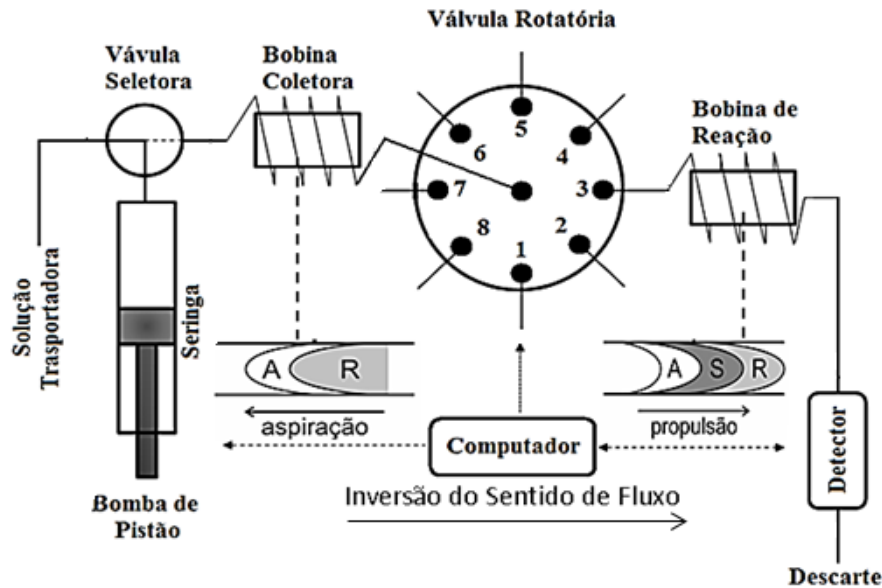
O dispositivo de propulsão (bomba de pistão) é responsável pela etapa de aspiração sequencial da amostra e reagentes em direção a uma bobina coletora

(comprimento equivalente ao volume da seringa), posicionado estrategicamente entre a bomba de pistão e a porta central da válvula seletora. Por inversão do sentido de fluxo a mistura é dispensada em direção ao detector pela bomba de pistão (RUZICKA et al., 1991).

Duas são as principais vantagens do sistema SIA em relação ao FIA. Quando se utiliza a válvula solenoide, a introdução de volume se torna a base de tempo, via bomba peristáltica (precisão do volume depende da atuação da bomba e “deformação do *tygon*”), enquanto o sistema SIA é caracterizado pela injeção de volumes exatos, que torna o sistema preciso. Outra vantagem é a versatilidade da válvula seletora, construída em torno de uma porta central (linha única). Permite configuração simples do sistema, sem a necessidade de reconfigurá-lo em caso de mudança da análise (MASINI, J. C., 2008).

Uma das principais características desse sistema é a inversão do sentido de fluxo, promovendo a sobreposição da zona de amostra e reagente. Por definição, duas zonas adjacentes em movimento contínuo, onde a primeira sofre sobreposição da segunda, como consequência da velocidade superior do fluxo no centro do tubo (Figura 19), em relação a velocidade média do fluxo. Os processos que contribuem para a dispersão e sobreposição são conhecidos como transporte por convecção e difusão (RUZICKA, J.; HANSEN, E. H., 1988).

Figura 19 - Processo de inversão do sentido de fluxo dos sistemas SIA. Aspiração: Transporte por convecção e difusão axial; Propulsão e inversão do sentido: Difusão radial; A: amostra; R: Reagente; S: Sobreposição das zonas de amostra e reagente.



Fonte: adaptado de Masini, J. C.; Santos, A. C. V., (2010).

O transporte por convecção, condicionado pelas dimensões da tubulação, predomina no início do transporte. A mistura inserida no fluxo laminar sujeita-se, ao longo do diâmetro do tubo, a um perfil de velocidade parabólico, no qual, a mistura que se move no centro têm o dobro da velocidade média daquela que se move junto à parede da tubulação. No transporte por difusão, que pode ser axial ou radial (RUZICKA et al., 1991), a mistura gera os gradientes de concentração durante o transporte por convecção (Figura 20).

Figura 20 - Representação dos fenômenos de convecção, difusão axial e radial no sistema SIA.



Fonte: adaptado de RUZICKA et al., 1991.

A difusão axial é caracterizada por ocorrer na direção do fluxo (diluição significativa do segmento da zona composta), enquanto a difusão radial é caracterizada por provocar o movimento perpendicular da mistura em relação a

direção do fluxo (90°), do centro a parede da tubulação e vice-versa, preservando a zona de amostra e reagente (aumento da sensibilidade). A inversão do sentido de fluxo característico do sistema SIA minimiza a dispersão axial e promove a difusão radial dos segmentos (van STADEN et al., 1997).

Parâmetros foram definidos para compreender os processos de dispersão no sistema em fluxo. São eles, o coeficiente de dispersão (D) (CLADERA et. al., 1996), o parâmetro ($S_{1/2}$) que é o volume injetado necessário para se atingir um $D_{\text{máx}} = 2$ (RUZICKA et al., 1991; CLADERA et. al., 1996) e o grau de sobreposição de zonas (S) (CHRISTIAN, G. D., 1994; MASINI, J. C., 2008).

O coeficiente de dispersão (D), é definido como a razão entre C_o e C:

$$D = \frac{C_o}{C}$$

Em que C_o é a concentração do reagente antes da injeção no sistema e C a concentração após a dispersão. Este parâmetro representa o grau de dispersão da zona de amostra e reagente e está intimamente ligado a sensibilidade e limite de detecção para o sistema desenvolvido. Para $D < 2$, o sistema possui dispersão limitada, se D está entre 2 e 10, ele é caracterizado por dispersão média ou ainda se $D > 10$, caracterizam sistemas de alta dispersão (CLADERA et. al., 1996).

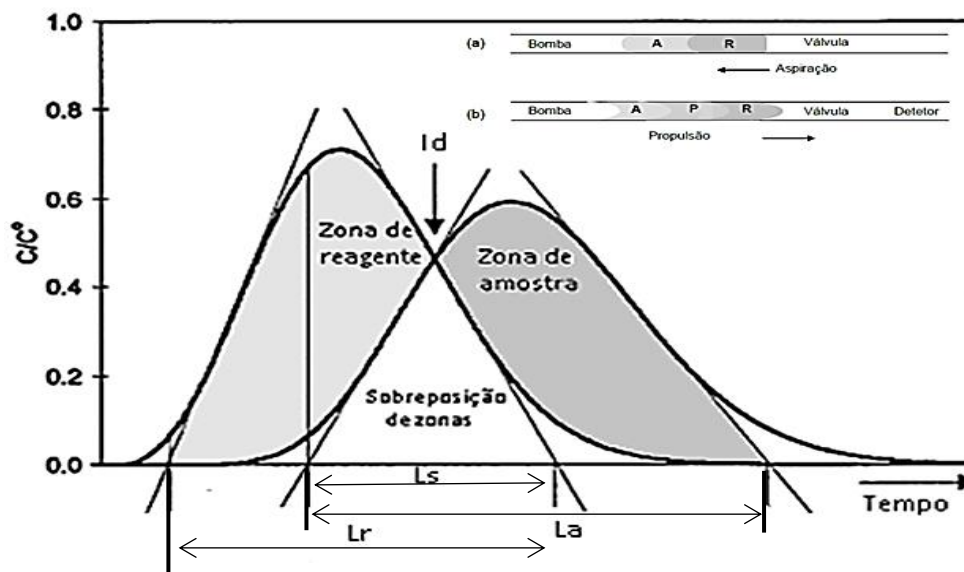
O grau de sobreposição (S) pode ser definido pela expressão:

$$S = \frac{2L_s}{L_a + L_r}$$

Onde L_a e L_r dizem respeito às larguras do pico na linha de base da amostra e reagente, respectivamente, enquanto L_s diz respeito à largura da base da região de sobreposição das zonas compostas. A razão das larguras representam o grau máximo de sobreposição das zonas de amostra e reagente para o sistema desenvolvido. É dependente das dimensões do percurso analítico e bobinas reacionais, assim como, do tempo de residência no sistema, ordem de aspiração, concentração das soluções e da relação do volume de amostra e reagente (CHRISTIAN, G. D., 1994; van STADEN, J. F.; McCOMARCK, T., 1997; MASINI, J.

C., 2008). Quando $S = 0$ não existe sobreposição e quando $S = 1$ existe sobreposição total das zonas (Figura 21).

Figura 21 - Representação da sobreposição mútua da zona de amostra e reagente. A: zona de amostra; R: zona de reagente; P: sobreposição das zonas; Ls: largura da linha de base da zona sobreposta; La: largura da linha base da amostra; Lr: largura da linha base do reagente; I_D : ponto de isodispersão.



Fonte: adaptado de Masini., 2008.

Como normalmente ocorre ausência de sobreposição completa, observa-se um ponto de isodispersão (I_D). É o ponto onde os coeficientes de dispersão da amostra e do reagente são idênticos, ou seja, a razão das concentrações são idênticas a razão das soluções puras antes de serem injetadas no sistema (RUZICKA et al., 1991; van STADEN et al., 1997).

O parâmetro $S_{1/2}$ proposto por Ruzicka et al. (1991), descreve a dispersão da zona de amostra e reagente de qualquer sistema de injeção em fluxo, independente da geometria e tipo de fluxo. Os autores investigaram as características do uso do parâmetro para extrapolar o resultado da sobreposição da zona de amostra e reagente do seu sistema desenvolvido para qualquer outro sistema de diferente configuração. Segundo Cladera et al., (1996), as considerações foram baseadas apenas na dispersão física do sistema, os autores não levaram em conta o potencial do efeito das reações químicas e sua cinética no desenvolvimento do parâmetro $S_{1/2}$. Conseqüentemente, o parâmetro deve ser considerado como um

guia na escolha para o ponto de partida, isso claro, se o efeito das reações químicas e da cinética reacional forem ignorados. Portanto, cada sistema em particular deve e é inevitável a otimização do coeficiente de dispersão (D), sobreposição (S) e parâmetros $S_{1/2}$, através do controle da dispersão física (extensão do percurso analítico e da bobina de reação), assim como das condições reacionais (fração dos volumes de reagente, amostra e tempo de residência da mistura no percurso analítico) aumentando a eficiência da sobreposição nas interfaces dos segmentos para que o sinal analítico do sistema desenvolvido seja máximo (RUZICKA et al., 1991; CLADERA et al., 1996).

Uma das desvantagens apresentada pela metodologia SIA, talvez a principal, procede das dificuldades encontradas na mistura "topo a topo" das zonas de amostra e reagentes. Significa dizer que o aumento do número de segmentos que compõe a mistura deixa de ser eficaz. Segundo van Staden et al. (1997), três é o número máximo de zonas de amostra e reagentes que sofrem uma mistura efetiva.

Apesar dos mais de 25 anos do desenvolvimento do sistema SIA, sua aplicação a técnicas e metodologias analíticas tradicionais é ainda uma área de grande exploração por pesquisadores que buscam reduzir o consumo de reagente e resíduo gerado e aumentar a frequência analítica. Características que fazem do sistema, uma ferramenta de grande aplicação na produção científica (HORSTKOTTE et al., 2014; ALEXOVIC et al., 2015; BATISTA, et al., 2015).

2.3.3 DETERMINAÇÃO DE VANÁDIO POR INJEÇÃO EM FLUXO

Vários trabalhos descritos na literatura envolvem a determinação de vanádio aplicada aos sistemas de injeção em fluxo, por Espectrofotometria de Absorção Molecular UV/Vis (FUKASAWA et al., 1985; NAKANO et al., 1989; ENSAFI, A. A.; KAZEMZADEH, A. 1996; SILVA et al., 2009; KEYVANFARD, M.; ABEDI, N., 2011; OGUMA et al., 2012; PINTO et al., 2013), Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS) (PATEL et al., 1989), Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GF AAS) (KIM, M. L.; TUDINO, M. B., 2009; BERTON et al., 2000), Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP AES) (WUILLOUD et al., 2000; WUILLOUD et al., 2001), técnicas eletroquímicas (GREENWAY, G. M., WOLFBAUER, G., 1995) por fluorescência (PALEOLOGOS et al., 2002) usando a extração por fase sólida (YAMANE et al., 1998; RAMA, et al.,

2005; MOYANO et al., 2006) ou líquida (PALEOLOGOS et al., 2002; WUILLOUD et al., 2002) em sistemas *on-line* (grau máximo de automação, vai desde a injeção das soluções até processos de pré-concentração, separação ou extração, detecção e limpeza num ciclo que envolve repetidas injeções) e *off-line* (processos de separação e pré-concentração da amostra são realizados de forma manual antes da injeção pelo sistema em fluxo). Além dos processos *on-line* e *off-line*, os sistemas de fluxo ainda envolvem o processamento *at-line* e *in-line* de amostra (MIRÓ et al., 2011).

Um sistema FIA-UV/Vis foi desenvolvido baseado no método de oxidação do ácido gálico por bromato catalisado por vanádio (método cinético espectrofotométrico), onde a taxa de oxidação do ácido gálico é proporcional à concentração de vanádio presente. Parâmetros como concentração dos reagentes e temperatura da reação (65°C) foram otimizadas para a adaptação ao sistema de Injeção em Fluxo (FIA). Faixa de trabalho de 0,05 a 4,0 ng de vanádio com frequência analítica de 12 h⁻¹ foram alcançadas para o método (FUKASAWA et al., 1985)

Em 1989, Nakano e colaboradores, realizaram o estudo catalítico da reação de oxidação do (4-amino-2,3-dimetil-1-fenil-5-pirazolona) com N,N-dimetilanilina na presença de 1,2-dihidróxi-benzeno-3,5-ácido dissulfônico (TIRON) e bromato como ativador. As condições para a reação catalisada e não catalisada foram estudadas para adaptar a reação ao sistema de Injeção em Fluxo (FIA). Limite de detecção de 0,05 µg L⁻¹ e frequência analítica de 30 h⁻¹ para a determinação de vanádio em águas naturais foram alcançados por medida espectrofotométrica.

A utilização de técnicas Eletroquímicas já a muito tempo usada na determinação de metais, foi acoplada a um sistema de injeção em fluxo para a adsorção *on-line* de traços de vanádio por Voltametria. Desenvolvido por Greenway e Wolfbauer, vanádio é complexado em solução tampão de acetato e adsorvido sobre a superfície de um eletrodo de filme de mercúrio. Com corrente aplicada, vanádio é reduzido do complexo adsorvido na presença de bromato. Em condições otimizadas o limite de detecção para o método foi de 8,0 ng L⁻¹ (GREENWAY, G. M.; WOLFBAUER, G., 1995).

Um sistema de Injeção em Fluxo Quimioluminescente é descrito na literatura para a determinação de vanádio em água, baseado na oxidação do luminol na presença de oxigênio dissolvido catalisado por V (IV). Vanádio V (V) é reduzido e

pré-concentrado a V (IV) por colunas de prata redutora e 8-hidroxiquinolina em pH 3,15. Faixa linear de 0,025 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ com frequência analítica de 30 h^{-1} foi obtido com o acoplamento das colunas ao sistema de injeção em fluxo (ATTIQ-ur-REHMAN et al., 1995).

A partir da reação colorimétrica de formação de complexos binários de Mo (VI) e V (IV) com ácido carmínico (CA) na presença de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) para aumentar a absorvidade molar, Perez-Ruiz (1995) e colaboradores estudaram as condições reacionais para a aplicação ao sistema de injeção em fluxo para a determinação simultânea destes metais. A solubilidade dos complexos binários de Mo (VI)-CA e V (IV)-CA quando CTAB está acima da concentração micelar crítica permitiu a aplicação ao sistema FIA com faixa linear de 0,3 a 9,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e limite de detecção de 0,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o vanádio.

Outros quatro trabalhos envolvendo a determinação de vanádio por sistemas de fluxo são descritos nos anos 90 (van STADEN, et al., 1996; ENSAFI et al., 1996; QIN et al., 1997; YAMANE et al. 1998),

Em 2000, Wuilloud et al. desenvolveram um sistema de pré-concentração *on-line* de vanádio e determinação por Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP AES). Para o sistema (FI-ICP-AES) limite de detecção de 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$. Outros três trabalhos foram publicados pelo mesmo grupo de pesquisadores (WUILLLOUD et al., 2000). Nesse mesmo ano, o sistema em fluxo foi acoplado a Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (FI-ICP-OES) (WUILLLOUD et al., 2000). Nos anos seguintes outros dois trabalhos com determinação de vanádio por ICP OES foram publicados. Um envolve a especiação *on-line* de V (IV) e V (V) por injeção em fluxo com resina de amberlite XAD-7 com seletividade alcançada por adição de CDTA como agente mascarante (WUILLLOUD et al., 2001). O outro envolve a extração *off-line* de vanádio por ponto nuvem e posterior introdução e determinação *on-line* da fase rica em vanádio por ICP OES (WUILLLOUD et al., 2002).

Paleologos et al. (2001), desenvolveu um método para a pré-concentração *off-line* de vanádio por extração em ponto nuvem. Em seguida, a determinação *on-line* da fase concentrada foi realizada por hifenção do sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA) com detecção fluorimétrica. A pré-concentração foi realizada utilizando o surfactante Triton X-114, e a eliminação de interferentes com ácido inorgânico permitiu um fator de pré-concentração de 50 vezes para o vanádio

utilizando 8-quinolinol em meio ácido. Baseado no efeito catalítico da pironina B- H_2O_2 em ácido fórmico na presença do surfactante, vanádio foi determinado por fluorimetria. O método foi aplicado com sucesso para amostras ambientais, biológicas e substratos de alimentos, obtendo limites de quantificação de $0.020 \mu\text{g L}^{-1}$. Um ano depois Paleologos et al. (2002), propôs um novo de determinação de vanádio por fluorescência.

Os métodos cinéticos espectrofotométricos são retomados com Shiobara e colaboradores. Baseado no efeito catalítico do vanádio na oxidação do N-(3-sulfopropil)-3,3',5,5'-tetrametilbenzidina usando bromato como agente oxidante, o método foi aplicado ao sistema em fluxo. Faixa de trabalho entre $0,05$ e $8,0 \text{ ng mL}^{-1}$ com um limite de detecção de $0,01 \text{ ng mL}^{-1}$ e frequência analítica de 15 h^{-1} (SHIOBARA et al., 2001). Dois anos depois, outro método cinético foi aplicado a um sistema FIA. A frequência analítica do sistema foi de 30 h^{-1} , para uma faixa de trabalho de $0,01$ a $3,0 \text{ ng mL}^{-1}$ e $0,008 \text{ ng mL}^{-1}$ para o limite de detecção (NAKANO et al., 2003).

Entre 2005 e 2006 três trabalhos foram publicados para a determinação de vanádio. No primeiro, o sistema chamado de "*Bead Injection Spectroscopy-Flow Injection Analysis*" (BIS-FIA) foi utilizado na determinação de V (V) em água e amostras fisiológicas (soro e urina). Uma suspensão de resina de troca aniônica (*Sephadex QAE A-25*) contendo um reagente fluorogênico (Alizarin Red S) é injetada para preencher a célula de fluxo, então vanádio é injetado e reage com o reagente imobilizado na superfície do sólido dentro da célula de fluxo formando um quelante fluorescente. O método foi aplicado com uma boa linearidade na faixa de 2 a 60 ng mL^{-1} com limite de detecção de $0,45 \text{ ng mL}^{-1}$ (RAMA et al., 2005). Nesse mesmo ano, Pradana et al., (2005) propôs um método quimioluminescente para a determinação de V (IV) e um ano depois, Moyano descreve outro sistema FI-ICP-OES na determinação de vanádio (MOYANO et al., 2006).

Em 2009, pela primeira vez um Sistema de Injeção Sequencial (SIA) é utilizado para a determinação de vanádio acoplado a espectrofotometria UV/Vis. Para o sistema em fluxo a reação cinética foi baseada na oxidação da dopamina em meio ácido, catalisada por V (V). A operação do sistema SIA permitiu a implementação do procedimento "*stopped flow*" para o aumento da sensibilidade, como resultado, limite de detecção de $0,39 \text{ mg L}^{-1}$ para uma faixa de trabalho de

0,50 a 5 mg L⁻¹ foram utilizadas para a determinação de vanádio em água (SILVA et al., 2009).

Em 2009 e 2010, dois trabalhos de especiação de V (IV) e V (V) foram realizados, o primeiro envolve a extração *on-line* em fase sólida e determinação por espectrofotometria de absorção atômica (SPE-FI-ETAAS) (KIM, M. L.; TUDINO, M. B., 2009). O segundo, envolve o potencial de redução Fe (III) /Fe (II) nos processos de oxi-redução do V (V) e V (IV). Dois picos alternados para os estados de oxidação do vanádio foram obtidos (WEI et al., 2010). Entre 2010 e 2014 sete trabalhos foram publicados, a maioria os sistemas de fluxo são acoplados a determinação por espectrofotometria (WASSEM et al., 2010; XIONG et al., 2010; BERTON et al., 2010; KEYVANFARD, M.; ABEDI, N. 2011; OGUMA et al., 2012; PINTO, et al. 2013; REIS et al., 2014).

Mais recentemente Teshima et al. (2015), desenvolveu um sistema espectrofotométrico para a determinação simultânea de ferro e vanádio. Composta por três válvulas seletoras e duas bombas peristáltica, a determinação do vanádio foi baseada na cinética de oxidação do p-anisidina por bromato em tampão acetato 0,05 mol L⁻¹. A aceleração do processo oxidativo foi realizada por parada de fluxo da mistura na bobina de reação a 85 °C por 3 minutos. Limite de detecção de 0,052 µg L⁻¹ e 10 análises por hora caracterizam o sistema.

Baseado na literatura, a hifenação entre os sistemas de fluxo e a espectrofotometria UV/Vis é a mais empregada na determinação de vanádio. O controle das condições reacionais, volume de reagente, tempo de adição e de reação, são fatores facilmente controlados pelos sistema de fluxo (ZAGATTO et al., 2010; 2014).

CAPÍTULO 3 - OBJETIVO DO TRABALHO

3.1 OBJETIVO

Devido a sensibilidade da Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP MS) e da Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS), ICP MS e GF AAS são técnicas recomendadas para a determinação de vanádio em matrizes de baixa concentração (*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2005*). Apesar disso, o custo operacional e instrumental são desvantagens relacionadas às técnicas. Além disso, interferência isobárica, devido a formação de íons poliatômicas de mesma razão massa-carga, principalmente pela presença de cloreto em água, são dificuldades encontradas na análise por ICP MS (PYRZYNSKA, K.; WIERZBICK, T., 2004; GUSEVA et al., 2015). Já no GF AAS a formação de carbetos refratários no forno de grafite, são causas frequentes de problemas e limitações da técnica, diminuindo a sensibilidade, afetando a precisão do método (MARQUES et. al., 2003; FERREIRA et al., 2007).

Outros métodos envolvem a determinação por Espectrofotometria de Absorção Molecular UV/Vis, que se baseiam principalmente em reações cineticamente catalisadas. Apesar de sensíveis, são complicados, laboriosos, consomem muito tempo e reagente, exigindo um operador treinado (FISHMAN, M. J.; SKOUGSTAD, M. W., 1964; AHMED, M. J.; BANOO, S., 1999; NARAYANA et al., 2008; GURKAN, R.; ULUSOY, H. I., 2009; MOHAMED et al., 2012).

Dessa forma, a aplicação e automação dessas metodologias aos sistemas de injeção em fluxo na determinação de vanádio por Espectrofotometria UV/Vis tem como vantagem o baixo custo operacional e instrumental, controle das condições reacionais, tempo e volume, diminuindo o consumo de reagente tóxico e amostra, aumentando a frequência analítica do método (OGUMA et al., 2012; PINTO et al., 2013, REIS et al., 2014; CERDÁ et al., 2014; TESHIMA et al., 2015).

Em 2013, Kamogawa e Miranda demonstraram através da determinação de ferro em água empregando multicomutação em fluxo e amostragem binária, o potencial da plataforma arduino no acionamento de válvulas solenoides. Os autores destacam que os microcontroladores além de acionar válvulas solenoides podem ser utilizados na aquisição de dados, controle da bomba peristáltica e microbomba solenoide (KAMOGAWA, M. Y.; MIRANDA, J. C., 2013).

Nesse sentido, esse trabalho descreve o desenvolvimento de um sistema de Análise por Injeção Sequencial (SIA) automatizado através de plataforma livre (*open-*

source) por placa arduíno MEGA 2560 de baixo custo para o acionamento da bomba de pistão (etapas de aspiração, inversão do sentido de fluxo e controle da vazão) e da válvula seletora (processos de comutação e inversão das portas) realizado via sistema de chaveamento (módulo reles).

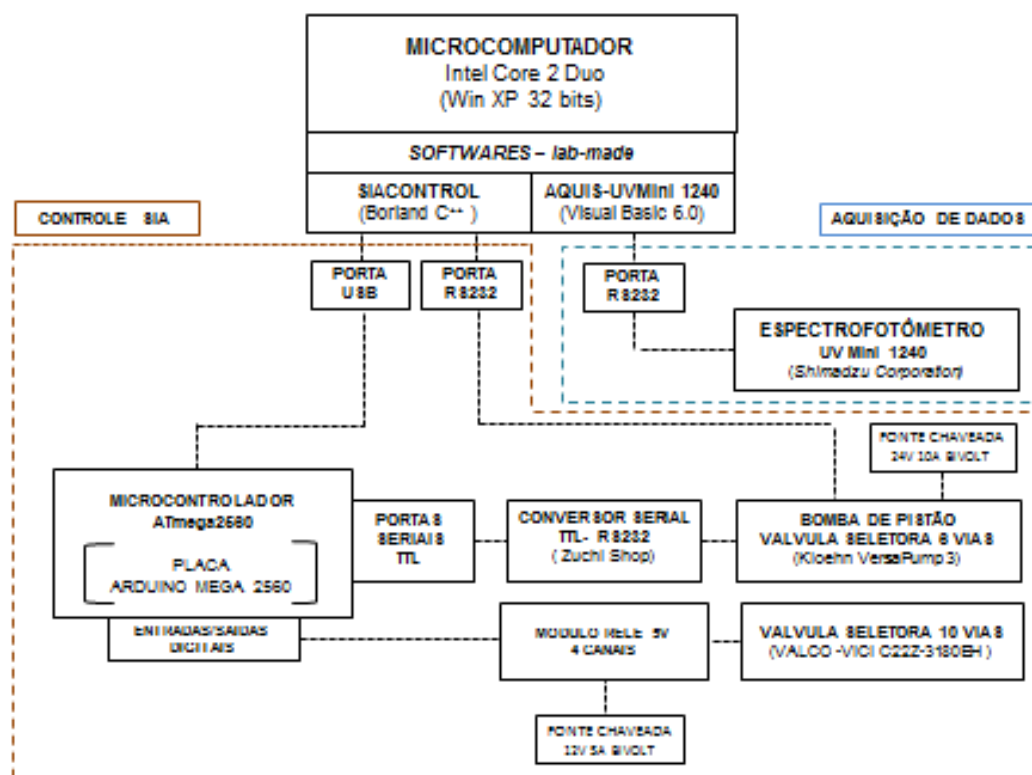
Com o objetivo geral de desenvolver um método automatizado de baixo custo, de fácil operação, rápido e eficaz, aplicado ao método padrão de determinação de vanádio em água através da Análise por Injeção Sequencial (SIA) com detecção espectrofotométrica, a principal vantagem é o aumento da frequência analítica com redução no consumo de reagentes tóxicos e volume de amostra, assim como, resíduo gerado. Os objetivos específicos são:

- Desenvolver a automação do sistema de Análise por Injeção Sequencial (SIA);
- Estudar e definir as condições instrumentais adequadas para a aplicação do método espectrofotométrico ao sistema SIA;
- Estudar e definir as condições reacionais para a aplicação do método padrão ao sistema SIA;
- Reduzir o tempo de equilíbrio reacional e aumentar a frequência analítica do método padrão de determinação de vanádio em água;
- Discutir o efeito de possíveis interferentes;
- Determinar o limite de detecção e quantificação do método para o sistema proposto;
- Validar o sistema;
- Aplicar o sistema SIA à quantificação de vanádio em amostras de água potável.

CAPÍTULO 4 - PARTE EXPERIMENTAL

A automação do sistema e execução das etapas que caracterizam a análise sequencial é realizada via microcontrolador Atmega 256 por meio de placa Arduino Mega 2560, conectada a porta USB do microcomputador. Através do software (SIACONTROL-labmade) os comandos, enviados sequencialmente ao microcontrolador Atmega 2560, possibilitam a mudança de estado das portas digitais de entrada/saída e o envio pelas portas seriais TTL (transistor-transistor logic) para o acionamento da bomba de pistão com válvula de 6 vias e válvula seletora 10 portas. A Figura 24 apresenta o fluxograma do módulo de controle e aquisição dos dados.

Figura 24 - Fluxograma dos módulos de controle, do sistema de Análise por Injeção Sequencial (SIA) e aquisição dos dados.



Fonte: Próprio autor.

O Arduino, plataforma aberta (*open-source*), oferece além de baixo custo a versatilidade de atualização do *software* e *hardware* ao surgimento de novas variações do sistema e/ou aplicações específicas que caracterizam os sistemas sequenciais.

4.2 HARDWARE E SOFTWARE


4.2.1 MICROCOMPUTADOR

Foi utilizado um microcomputador Intel Core 2 Duo E 4400 de 2 GHz, 1 GB de RAM com velocidade de 533 MHz. Disco rígido de 160 MB com 7200 RPM, equipado com uma placa NIPCI-6025 de conversores A/D – D/A, entradas e saídas analógicas e linhas digitais de I/O. Placa de vídeo aceleradora AGP Riva TNT2 M64 - 32 MB e monitor SyncMaster 710N de 15". Resolução de tela de 1280 por 1024 pixels com qualidade máxima de 32 bits. Os *softwares lab made* (CONTROLSIA, AQUIS-UVMMini1240 e UTIFIA) realizaram o controle do sistema SIA, aquisição e tratamento dos dados, respectivamente.

4.2.2 BOMBA DE SERINGA KLOEHN VERSAPUMP 3

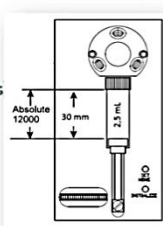
Como unidade de aspiração e propulsão de fluídos uma bomba de pistão com seringa de vidro com capacidade de 2,5 mL acoplada a uma válvula seletora de baixa pressão com 6 portas (Kloehn VersaPump 3, Las Vegas, NV 89144 U.S.A). A Figura 25 apresenta a imagem de uma bomba de seringa Kloehn VersaPump 3. O acionamento do pistão e da válvula seletora foi controlado por um microcomputador via porta RS232 através do software SIACONTROL.

Figura 25 - Kloehn VersaPump 3.



Specifications

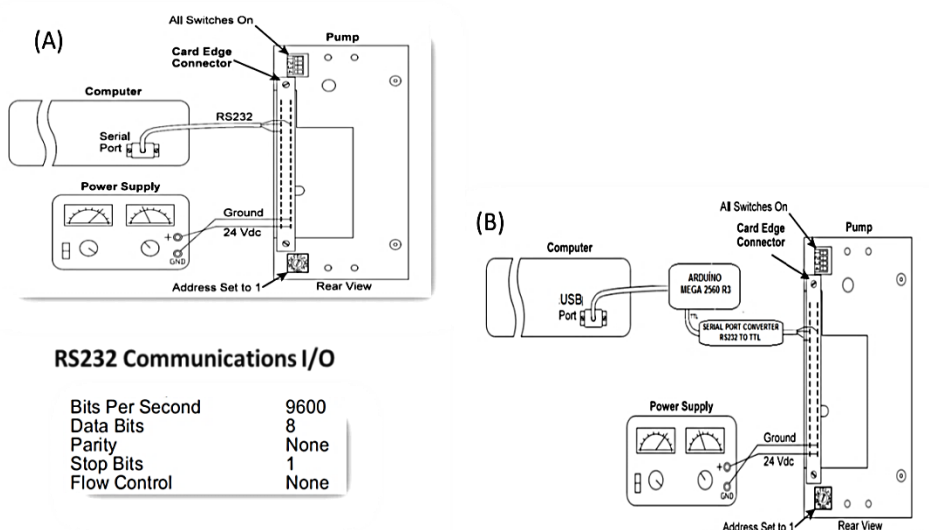
<p>Physical</p> <p>Height 5"</p> <p>Width 2.55"</p> <p>Depth 4.6" (face plate to back plate)</p> <p>Weight 2.5 lbs</p> <p>Environmental</p> <p>Operating Temperature 32°F to 131°F (0°C to 55°C)</p> <p>Operating Humidity 5 to 95% RH, non-condensing at 131°F (55°C)</p> <p>Storage Temperature 13°F to 185°F (-25° to 85°C)</p> <p>WEEE & RoHS compliant</p> <p>Interface RS-485 or RS-232 communications Data terminal or OEM protocol 1200 to 38.4K baud, 8 data bits, 1 stop bit, no parity, half duplex</p>	<p>Power Operation 24V nominal (20V to 30V) (with a maximum power ripple of 720mv peak to peak).</p> <p>Power Consumption 25 watts; 6 watts idle.</p> <p>Mechanical Operation Any orientation</p> <p>Mounting Holes Top and bottom</p> <p>Two Resolutions Available (6,000 and 12,000 increments)</p> <p>Speed (Max. - 8000 steps/sec.) (Default - 2500 steps/sec.)</p> <p>Syringe Size 50ul to 5ml</p> <p>Valve Type 2 way to 6 way</p> <p>1/10 Stroke Dispenses Precision: 0.36% CV, 0.5% max. Accuracy: 0.44% CV, 0.5% max.</p> <p>Full Stroke Dispenses Precision: 0.01% CV, 0.018% max. Accuracy: ---</p>
---	--



Fonte: Hardware user's Manual for the Versapump 3

A Figura 26 apresenta dois métodos diferentes de comunicação serial entre o microcomputador e a bomba. Visando a utilização da placa Arduino Mega 2560 para controle de todo sistema, optou-se pela comunicação serial (Figura 26B). É importante ressaltar que neste caso, o acionamento da bomba de pistão e válvula de 6 vias, os comandos são enviados da porta USB do microcomputador para a placa Arduino e reenviados pela porta de comunicação serial TTL. Posteriormente, um conversor RS232 – TTL faz a comunicação com a porta RS232 da bomba.

Figura 26 - A) Representação esquemática da comunicação direta do microcomputador com a bomba pela porta serial RS232. (B) Representação esquemática da comunicação serial TTL de uma placa Arduino Mega 2560 com a bomba através de um conversor RS232 - TTL.



Fonte: Hardware user's Manual for the Versapump 3 (A). Próprio autor (B).

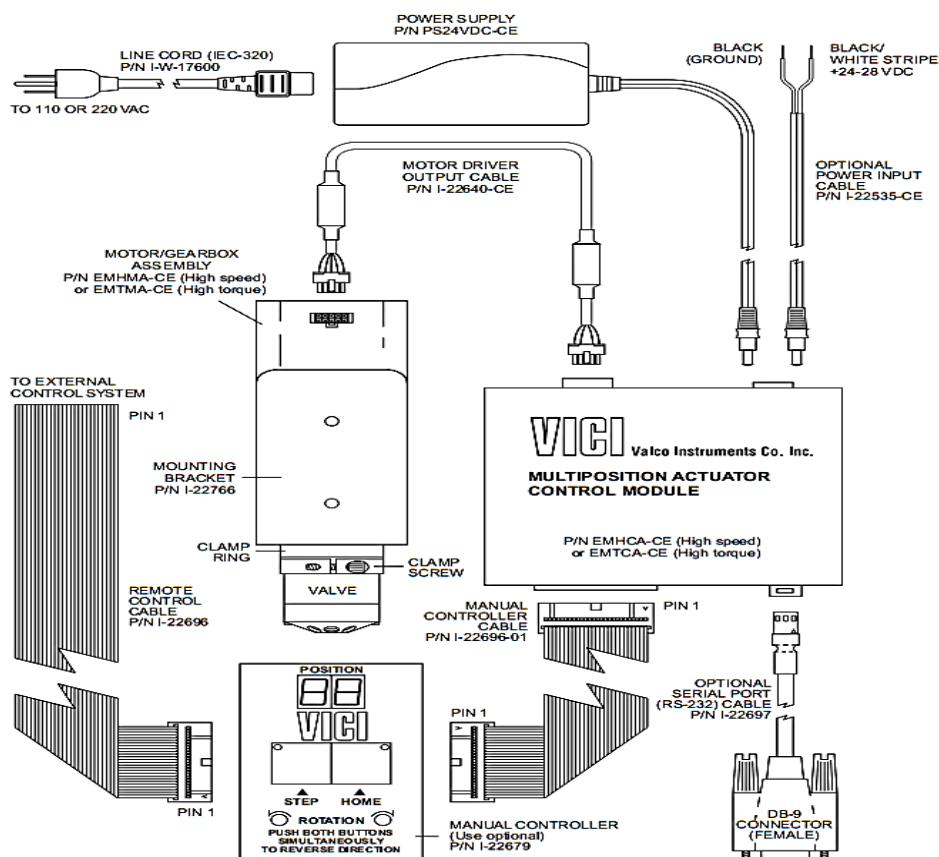
4.2.3 VÁLVULA SELETORA DE 10 PORTAS

Para o direcionamento e seleção das soluções através do sistema foi utilizada uma válvula seletora (Figura 27) baixa pressão de 10 portas VICI C22Z-3180EH (*Valco Instruments Inc., Houston, TX, EUA*). A inversão do sentido de rotação e as etapas de comutação das portas da válvula seletora foram realizadas através do acionamento dos reles por comandos enviados pelo microcomputador via porta USB/Serial da placa Arduino Mega 2560. Os comandos de inversão de sentido e comutação das portas foram realizados pelo programa SIACONTROL.

As saídas dos reles são conectadas as entradas digitais do microcontrolador do módulo atuador multiposições da Valco, e seu acionamento realizado pelas

saídas digitais da placa Arduino Mega 2560, permite ligar ou desligar as entradas digitais do microcontrolador do módulo multiposições da Valco, executando as etapas de comutação das portas da válvula seletora.

Figura 27 - Modelo esquemático da válvula seletora.

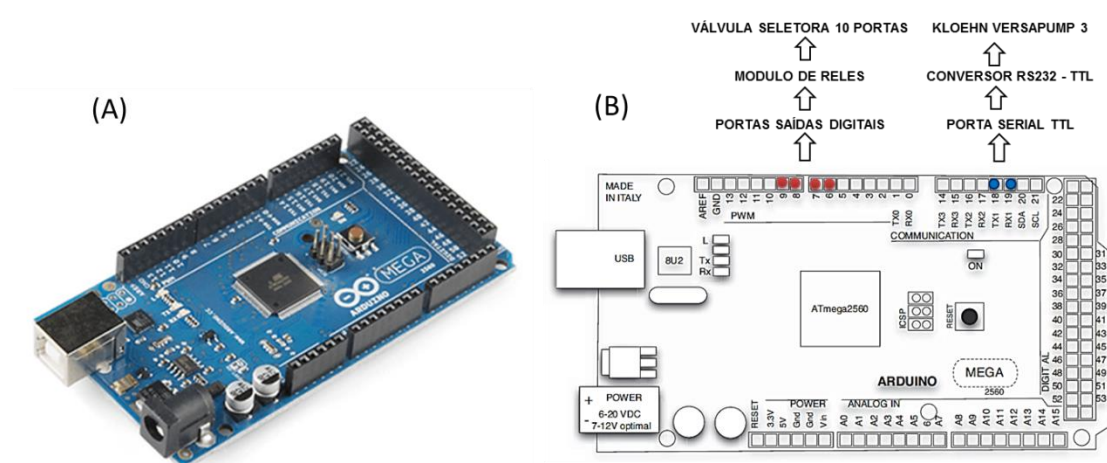


Fonte: Manual da válvula seletora baixa pressão de 10 portas VICI C22Z-3180EH

4.2.4 PLACA ARDUÍNO MEGA 2560 R3

O Arduino Mega 2560 responsável pelo acionamento da bomba de pistão e das válvulas seletoras de 6 vias e 10 portas é uma placa baseada no microcontrolador ATmega2560, de 8 bits e arquitetura RISC avançada. Conta com 256 KB de Flash (mais 8 KB são utilizados para o bootloader), 8 KB de RAM e 4 KB de EEPROM. Possui 54 entradas/saídas digitais, das quais, 14 podem ser utilizadas como saídas PWM, 16 como entradas analógicas e 4 portas seriais de hardware (McROBERTS, M., 2011; HOCHENBAUM et al., 2013). A placa ainda conta com oscilador de 16MHz, conexão USB, conector de força e ICSP além de um botão de reset (Figura 28). A Figura 28B apresenta as saídas digitais utilizadas para controlar a válvula seletora de 10 portas e a porta serial usada para controlar a VersaPump 3.

Figura 28 - (A) Imagem da placa Arduíno MEGA 2560. (B) pinos e layout do Arduíno Mega.



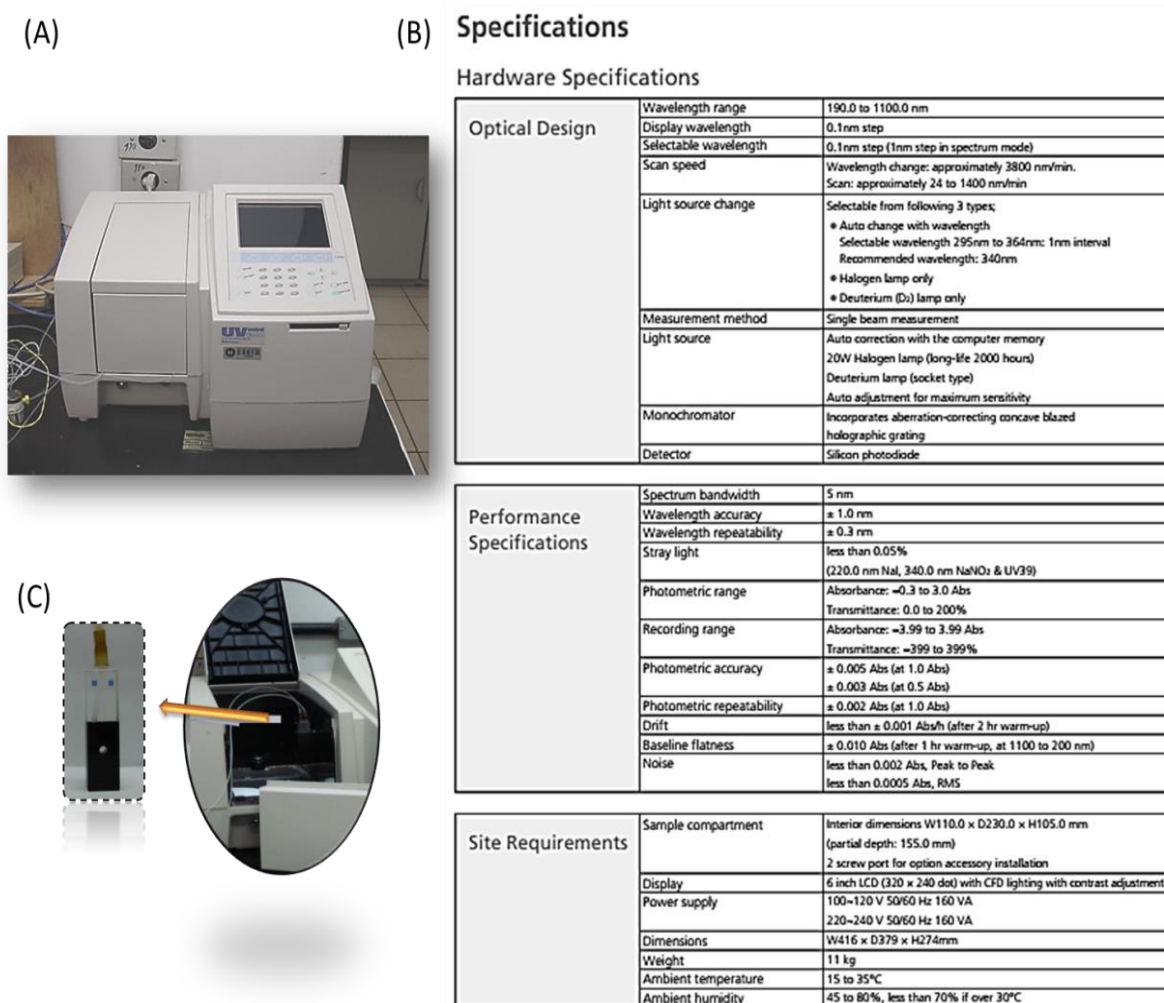
Fonte: Hochenbaum et al., 2013.

A programação da placa Arduíno Mega 2560 foi realizada utilizando o Arduino IDE (Versão 1.6.5 - Windows) baixado gratuitamente de <http://Arduino.cc/en/Main/Software>.

4.2.5 ESPECTROFOTOMETRO UV/MINI-1240

O detector, um espectrofotômetro UV Mini 1240 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipado com uma cubeta de fluxo de quartzo 283-QS, volume de 80 μL e caminho óptico de 10 mm (Hellma GmbH & Co., Müllheim, Germany). O UVMini 1240 possibilita a medida de absorbância ou transmitância em comprimentos de onda fixo ou varrer o espectro completo de amostras na faixa de 190 a 1100 nm (Figura 29). Os resultados podem ser impressos ou então enviados para a saída RS232 a uma taxa de transferência de 2Hz, ou seja, a cada 0,5 segundo é enviado pela porta serial o valor do display (absorbância). Os dados são transferidos para um programa AQUISUVMini-1240 pela porta serial RS232 e posteriormente são tratados pelo software UTIFIA.

Figura 29 - (A) Espectrofotometro UVMini-1240. (B) Especificações de hardware. (C) Cubeta de fluxo de quartzo da marca Hellma modelo 283-QS.

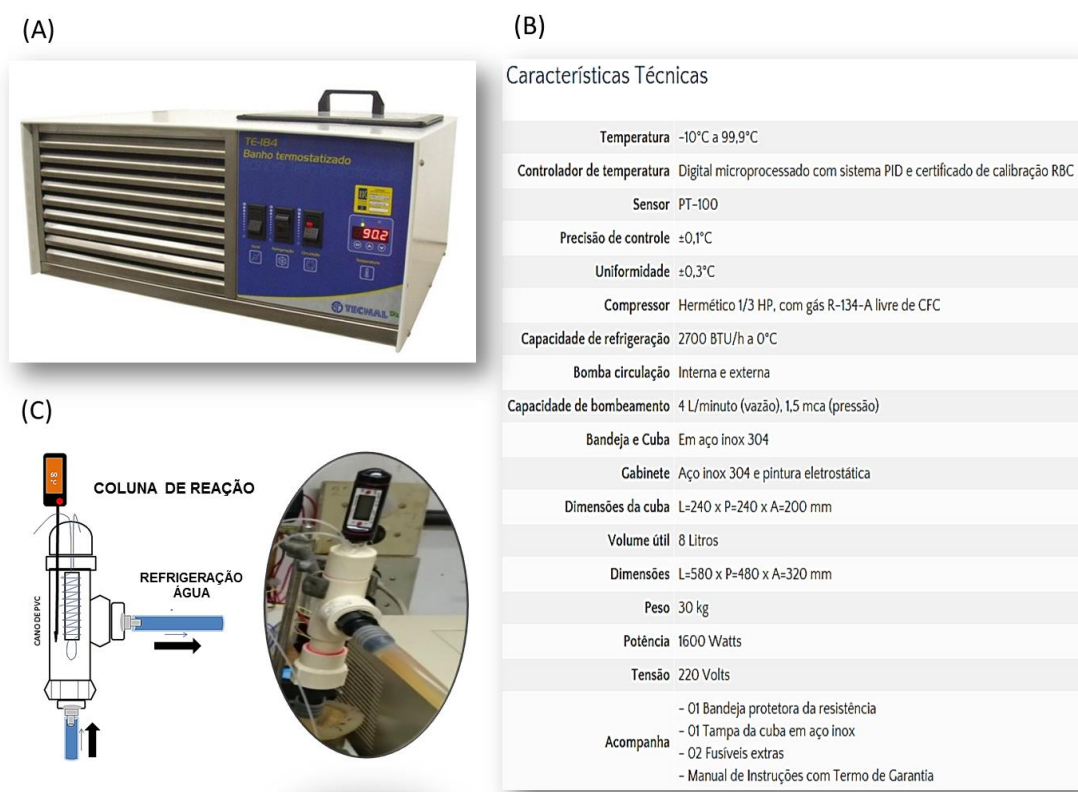


Fonte: Manual do Espectrofotometro UVMini-1240 (A e B). Próprio autor (C).

4.2.6 BANHO TERMOSTATIZADO

Para o controle da temperatura da coluna de reação foi utilizado um banho termostaticado da marca Tecnal, modelo TE – 184 que trabalha a temperaturas de -10° C a 99,9 ° C, com precisão de ± 0,1° C e uniformidade de ± 0,3° C, com refrigeração de 2700 BTU/h a 0°C e bomba de circulação interna e externa (Figura 30).

Figura 30 - (A) Banho Termostatizado TE-184. (B) Especificações técnicas. (C) Controle de temperatura da coluna de reação.



Fonte: Manual do Banho Termostatizado TE-184 (A e B). Próprio autor (C).

4.2.7 SIACONTROL

O software SIACONTROL foi desenvolvido pelos professores doutores Carlos Alberto Paulinetti da Camara (Grupo de Desenvolvimento de Instrumentação, Automação e Metodologia Analítica - DIA – DQ-UEL) e Janksyn Bertozzi (Grupo de Automação e Instrumentação Aplicada - GAIA – DQ-UTFPR) em linguagem de programação *Borland C++ Builder 6.0*, compatível com a plataforma *Windows®* - 32 bits. Através deste programa é possível disparar um cronômetro para o acionamento programado da seringa e das válvulas seletoras, conforme mostra Figura 31.

Figura 31 - Imagem digitalizada do software SIACONTROL e dos macrocomandos.

The screenshot shows the 'SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS - CONTROL MODULE' interface. It includes sections for 'SYRINGE', 'VALVES', 'MACROS', and 'SERIAL'. A table of parameters is visible, with 'flw' set to 300. Below this is a 'MACROCOMANDOS' table.

MACROCOMANDOS		
GERAL		
TEMPO		
TMS	100	milissegundos
TS	1	seg
LOOP		
IL1		
NL1	3	3 number loops
IL2		
NL2	2	2 number loops
IL3		
NL3	5	5 number loops
VERSA PUMP 3		
SIN		INITIALIZE
FLW	100	UL/sec (Flow)
SVP	1,5	1,5 mL (Pickup)
SVD	1,5	1,5 mL (Dispense)
SVA	2	PORT (x = 1 a 6)
VÁLVULA SELETORA VALCO VICI		
PORT	3	PORT (x = 1 a 10)
HOM		PORT (1)

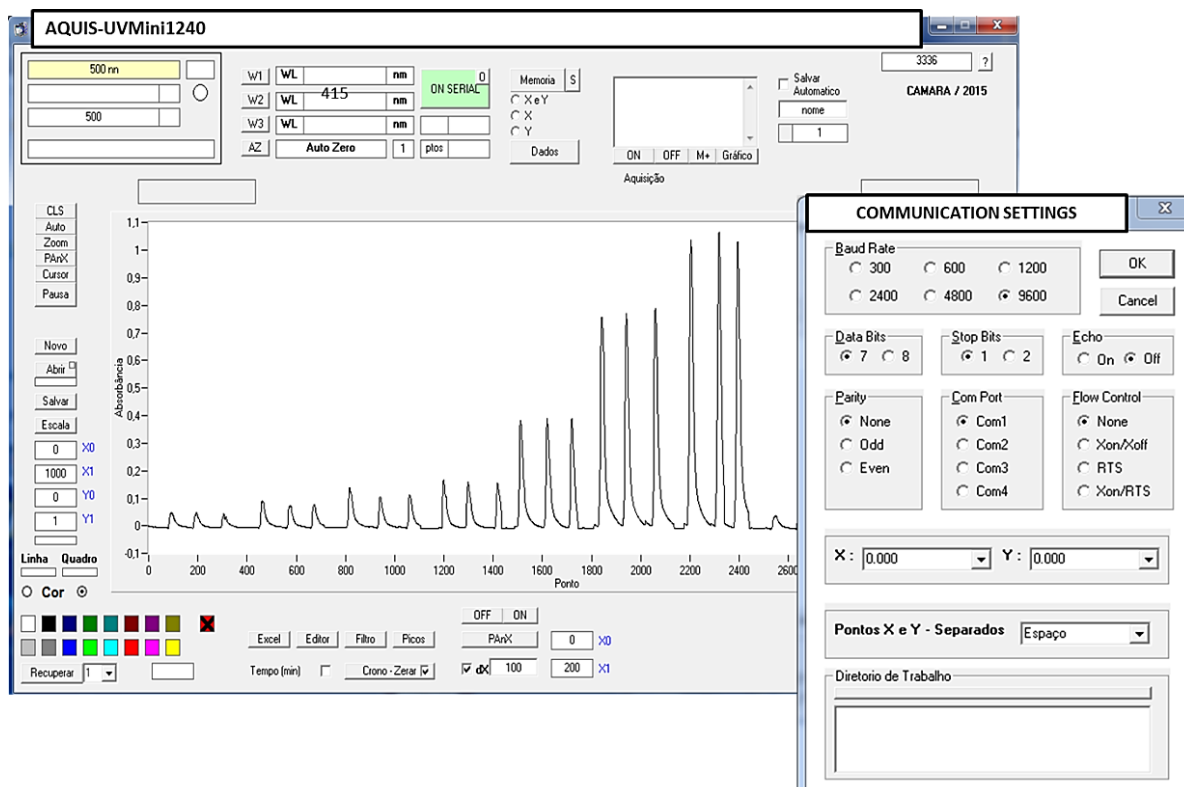
Fonte: Próprio autor.

Os macrocomandos são acionados na janela de programação e lidos sequencialmente durante a execução do experimento. Permite realizar diferentes etapas, que se adaptam as diferentes condições reacionais do método.

4.2.8 AQUIS-UVMINI1240

O software AQUIS-UVMini1240 responsável pela aquisição dos dados foi desenvolvido pelo professor Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara, em linguagem *Microsoft Visual Basic 6.0*, compatível com a plataforma *Windows®* - 32 bits (Figura 32). Em modo remoto o software permite a aquisição do sinal analítico (absorbância) do espectrofotômetro UV Mini 1240 via porta serial RS232C. Com uma taxa de transferência de 2Hz, (um valor de absorbância a cada meio segundo), o *software* ajusta o comprimento de onda e efetua a correção da linha de base da análise. Também permite a aquisição dos dados enviados pela comunicação serial (RS232C) do espectrofotômetro trabalhando no modo fotométrico ou espectro.

Figura 32 - Imagem digitalizada do software AQUIS-UVMini1240.

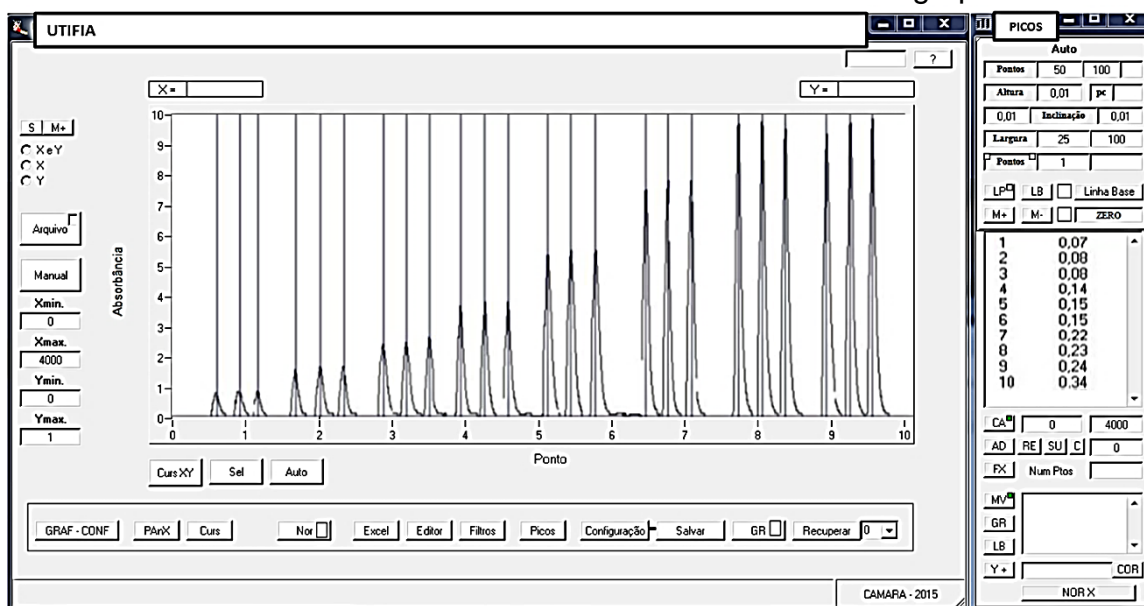


Fonte: Próprio autor.

4.2.9 UTIFIA

O software UTIFIA responsável pelo tratamento dos dados foi desenvolvido pelo professor Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara, em linguagem *Microsoft Visual Basic 6.0*, compatível com a plataforma *Windows® - 32 bits* (Figura 33). Este *software* contém recursos gráficos que facilitam a visualização de curvas experimentais e seu tratamento (normalização por intercalação ou remoção de pontos; inversão de sinal; subtração do branco; altura dos picos por processo manual ou automático). Com o UTIFIA é possível a utilização de diferentes filtros digitais para correção das curvas, inversão do gráfico, alteração das escalas e legendas, efeito “zoom” e a transferência direta dos dados experimentais para planilha eletrônica do *Excel*. A Figura 33 mostra um exemplo de tratamento dos dados com o software UTI-FIA para obtenção das alturas dos picos (sinais transientes) nos diagramas.

Figura 33 - Obtenção das alturas dos picos (sinais transientes) pelo tratamento de dados utilizando software UTIFIA desenvolvido no grupo DIA.



Fonte: próprio autor.

4.3 REAGENTES E SOLUÇÕES

4.3.1 SIA-UV/VIS

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Água ultra-pura (resistividade $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) foi utilizada durante toda à análise. Solução ácida de persulfato de amônio 4 % (m/v) foi preparada dissolvendo 2,00 g de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Synth) em 25,0 mL de água, a solução foi aquecida, e 25,0 mL de H_3PO_4 (da Biotech) 85% (m/m) foram adicionados. A solução foi utilizada 24 horas após o preparo.

Ácido gálico (Dinâmica) 2 % (m/v) foi obtido por dissolução de 1,00 g de $\text{H}_6\text{C}_7\text{O}_5$ em 10,0 mL de álcool etílico (Biotech) 99,5 % (v/v) e o volume final ajustado para 50,0 mL com água. Para evitar a oxidação da solução de ácido gálico pela luz o frasco foi envolvido por papel alumínio.

A curva analítica foi construída utilizando-se padrão 1000 mg L^{-1} (Metavanadato de amônio (NH_4VO_3) com certificado de análise (Specsol®) rastreado junto ao NIST (058930). Soluções a 0,00; 0,05; 0,08; 0,12; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 e $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ de vanádio V (V) foram preparadas diariamente por diluição do padrão.

4.3.2 STANDARD METHODS (MÉTODO DO ÁCIDO GÁLICO)

O preparo dos reagentes e amostra segue a metodologia do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Method 3500V)* com algumas alterações. A partir de solução padrão de Metavanadato de amônio (NH_4VO_3) com concentração de 1000 mg L^{-1} em V (V) com certificado de análise (Specsol®) rastreado junto ao NIST (058930), solução estoque de vanádio 100 mg L^{-1} V (V) foi obtida por diluição apropriada. Solução trabalho $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ V (V) foi preparada por diluição da solução estoque 100 mg L^{-1} V (V). A curva analítica foi construída a partir de alíquotas da solução $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ V (V).

Solução de nitrato mercúrico (II) 0,035% (m/v) com certificado de análise (Specsol®) rastreado junto ao NIST (0,58932). O preparo da solução ácida de persulfato de amônio 5 % (m/v) foi realizado, dissolvendo 2,50 g de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Synth) em 25,0 mL de água, depois de aquecida até fervura, volume final de 50,0 mL foi obtido com adição de 25,0 mL de H_3PO_4 (Biotech) 85% (m/m). Para promover o agente ativante da reação, a solução foi utilizada 24 horas após o preparo.

Ácido gálico (Dinâmica) 2% (m/v) foi preparado dissolvendo 2,0 g em 100 mL de água morna, e levado até fervura para a completa dissolução do reagente.

4.3.3 ICP-MS

A determinação de vanádio total nas amostras de água foi realizada por construção de curva analítica preparada por diluição apropriada a partir de padrão multielementar (Merck-UN2031) de 10 mg L^{-1} em HNO_3 20 % com água ultrapura (Milli-Q, $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$), com concentrações de vanádio de 1 a $100 \mu\text{g L}^{-1}$. O registro das suas intensidades foi realizado em relação a um padrão interno de ródio (Rh) $200 \mu\text{g L}^{-1}$.

4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 SIA-UV/VIS

A rotina de calibração e a sequência de passos para a análise quantitativa das amostras de água pelo sistema SIA é descrito na Tabela 1.

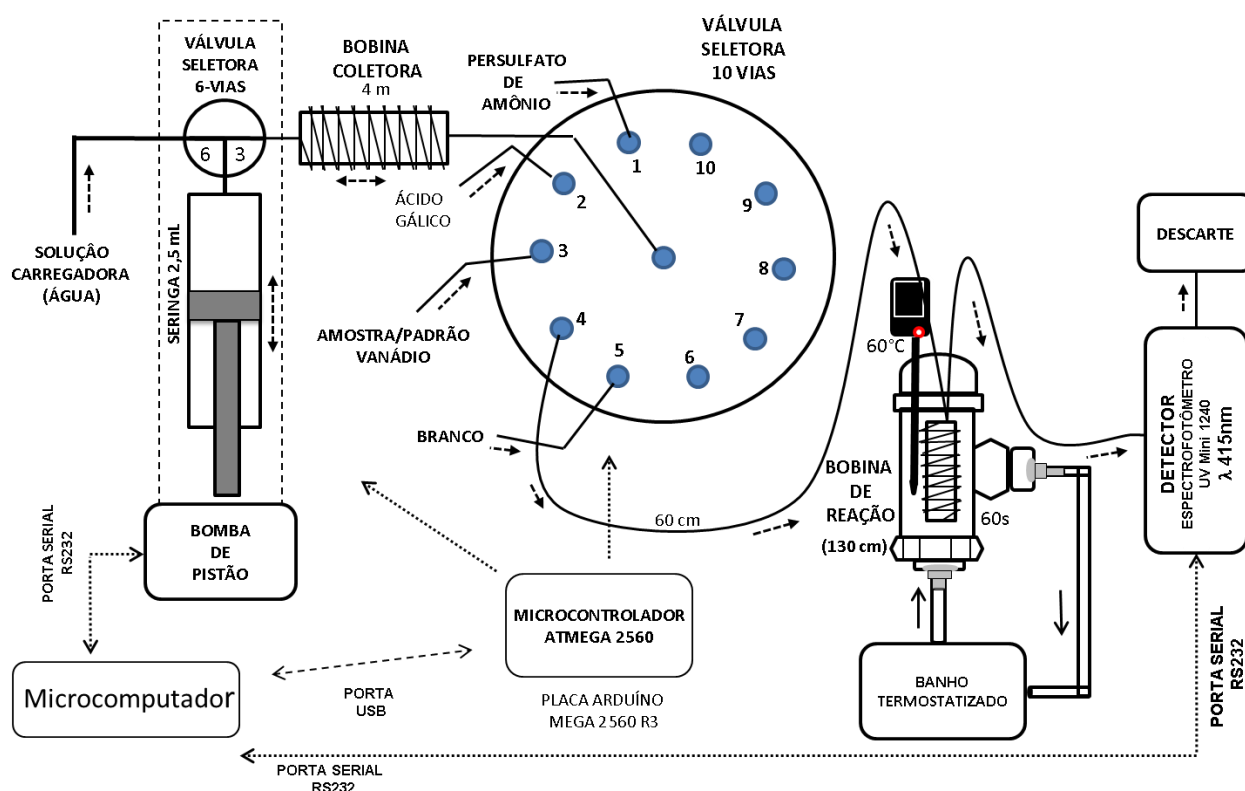
Tabela 1 - Sequência de passos na determinação de vanádio através da Análise por Injeção Sequencial (SIA).

Passo	Direção	Posição (pistão)	Posição (seletora)	Vazão ($\mu\text{L s}^{-1}$)	Volume (μL)	Operação
1	-	6	-	200	300	Aspiração de solução carregadora (água)
2	BC	3	1	30	100	Aspiração da solução ácida de persulfato de amônio
3	BC	3	2	30	50	Aspiração do ácido gálico
4	BC	3	3	30	500	Aspiração amostra/padrão
5	BR	3	4	75	950	Dispensa a mistura na BR a 60°C
6	-	6	-	200	2400	Preenchimento do pistão com a solução carregadora (água)
7	-	-	-	-	-	<i>Stopped flow</i> (Preenchimento da seringa + 38 s)
8	DET	3	4	50	2400	Dispensa a mistura em direção ao detector

BC: Bobina coletora; BR: Bobina de reação; DET: Detector.

O sistema inicia com a aspiração da solução carregadora pelo pistão (300 μL) pela porta 6 da bomba de pistão. Os dois reagentes, a solução ácida de persulfato de amônio e o ácido gálico, mais a amostra/padrão são aspirados em direção à bobina coletora, 100, 50 e 500 μL respectivamente, através das portas 1, 2 e 3 da válvula seletora (Figura 34). Por inversão do sentido de fluxo e comutação da válvula seletora para a porta 4 a bomba de pistão via porta 3 dispensa a mistura (sobreposição mútua da zona de amostra e reagente) em direção à bobina de reação (130 cm), formando uma zona composta na interface dos segmentos da amostra e reagentes (van STADEN, et al., 1997). A mistura é aprisionada na bobina de reação a 60 °C por 60 s (envolve a etapa de preenchimento do pistão com solução carregadora + 38 s), e o sistema então opera em modo *stopped flow* (RUZICKA, J.; GUBELLI, T., 1991; HERRERA-LÓPEZ et al., 2015) para a aceleração catalítica do ácido gálico pelo vanádio (V^{5+}). Cada ciclo se fecha com a limpeza do detector pela solução carregadora.

Figura 34 - Sistema SIA desenvolvido para a determinação de vanádio em água.



Fonte: Próprio autor.

Usando um detector espectrofotométrico, a concentração total de vanádio nas amostras de água é quantificada em 415 nm.

4.4.2 STANDARD METHODS (MÉTODO DO ÁCIDO GÁLICO)

Alíquotas de 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 mL da solução trabalho $0,10 \text{ mg L}^{-1} \text{ V (V)}$ foram adicionados em tubos e o volume completado para 10,0 mL com água. Para cada padrão e amostra adicionou-se 1,0 mL da solução de nitrato mercúrico (II) 0,035 % (m/v) para complexar haletos e minimizar sua interferência, principalmente cloreto, iodeto e brometo (FISHMAN, M. J.; SKOUGSTAD, M. W., 1964). Os tubos contendo a mistura foram mantidos por 45 minutos em banho termostático a 25 °C. Na sequência 1,0 mL da solução ácida de persulfato de amônio 5 % (m/v) foi adicionado e os tubos mantidos no banho por 5 minutos para mistura do reagente. Após 5 minutos foi realizada a adição sucessiva de 1,0 mL de ácido gálico 2 % (m/v) para cada tubo em intervalos de 2 minutos, para a medida da absorbância entre cada padrão e amostra. Exatamente 60 minutos após a adição do ácido gálico (equilíbrio químico), os tubos são sucessivamente removidos do banho

e as absorvâncias imediatamente medidas em 415 nm (FISHMAN, M. J.; SKOUGSTAD, M. W.; 1964). Durante toda análise o banho termostatizado é mantido a 25 °C para o equilíbrio reacional.

4.4.3 ICP-MS

A quantificação de vanádio também foi realizada por espectrometria de massas com plasma de argônio induzido (modelo ICP-MS Varian 820-MS), no Laboratório de Apoio à Pesquisa Agropecuária (LAPA), localizado na Universidade Estadual de Londrina. Para a introdução de padrão e amostra no plasma de argônio induzido foi empregado nebulizador microconcêntrico operado com bomba peristáltica. Os dados foram adquiridos pelo *software* ICP-MS *ExpertVarian* v2.0 b87. As condições operacionais do ICP-MS e de aquisição encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros operacionais e de aquisição de dados na determinação de vanádio por ICP-MS.

Condições Experimentais – ICP-MS	
Potência de Rádio Frequência	1400W
Modo Scan	<i>Peak Hopping</i>
Fluxo de Plasma	17 L min ⁻¹
Vazão do gás nebulizador	0,21 L min ⁻¹
Replicatas de varredura/Tempo	5/169x10 ⁻³ s
Replicatas de análise/Tempo	5/0,84s
Temperatura ambiente	20 °C
Isótopos	⁵⁰ V e ⁵¹ V

CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

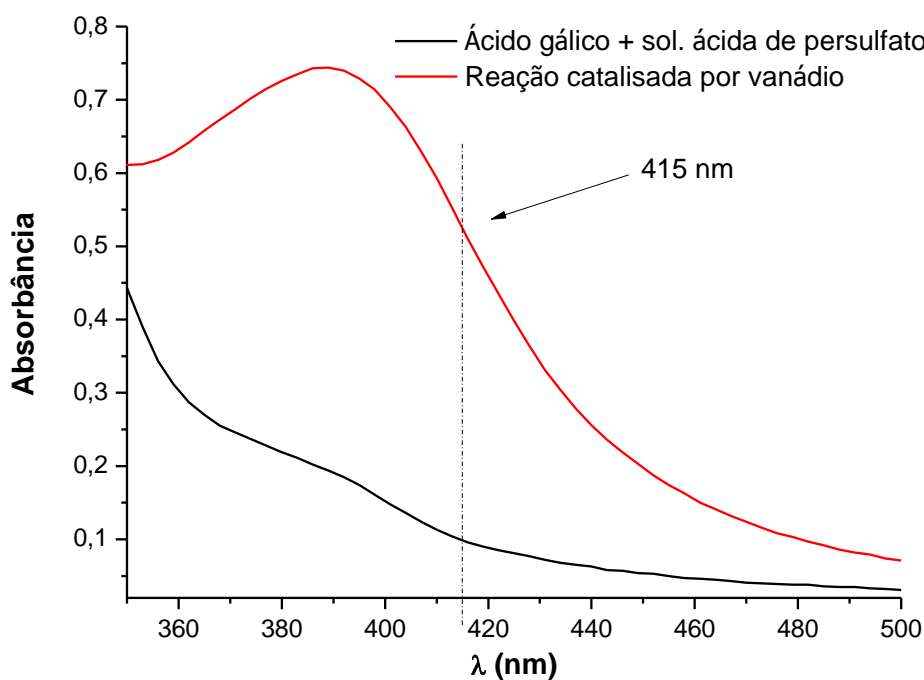
5.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO

A Figura 35 apresenta o espectro de absorção molecular UV/VIS para as soluções de ácido gálico/persulfato de amônio em meio ácido obtidos na ausência e presença do vanádio (catalisador), visando à escolha do melhor comprimento de onda para a leitura do sinal analítico.

As condições reacionais para a obtenção do espectro de varredura seguem o procedimento descrito no item 4.4.2. Para a reação catalisada, uma alíquota de 4 mL de solução trabalho $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ V (V)}$ foi utilizada e o volume completado para 10 mL com água. A reação não catalisada (branco) foi preparada na ausência de vanádio, adicionando 10 mL de água ao tubo, seguido pela adição de nitrato de mercúrio (II), solução ácida de persulfato de amônio e ácido gálico nas mesmas ordens, tempos e temperatura descrito anteriormente.

O comprimento de onda foi selecionado levando em consideração a intensidade do sinal analítico (absorbância) entre a reação catalisada e a não catalisada (branco) e a resposta do sinal analítico do branco.

Figura 35 - Espectro de absorção da reação de oxidação do ácido gálico por solução ácida de persulfato de amônio catalisada por vanádio.



Fonte: próprio autor.

Embora o comprimento de onda de 415 nm não represente a maior diferença de sinal analítico (reação catalisada e não catalisada), o comprimento de onda foi selecionado por apresentar menor sinal analítico do branco.

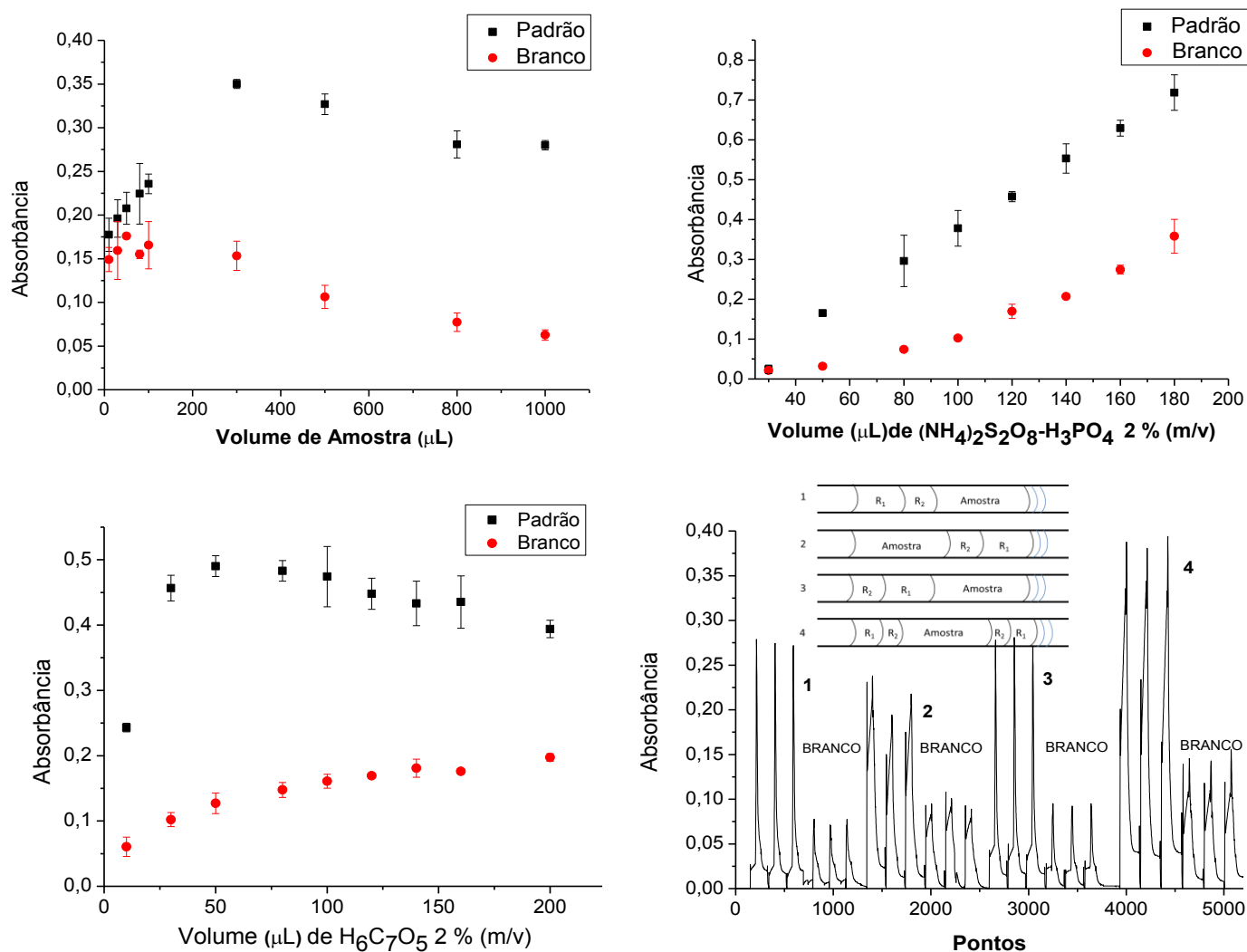
5.2 ESTUDO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO PADRÃO AO SISTEMA SIA-UV/VIS

5.2.1 ORDEM DE ASPIRAÇÃO E ESTUDO DO VOLUME DE AMOSTRA E REAGENTE

Com o objetivo de obter melhor razão sinal/branco avaliou-se a ordem de aspiração, volume de amostra e reagente, concentração de ácido gálico, persulfato de amônio e ácido fosfórico, além do tempo de residência e temperatura foram investigadas para a adaptação da metodologia ao sistema. O critério de avaliação foi realizado através do aumento da intensidade do sinal analítico em relação ao sinal do branco (optando sempre que possível pelo sinal de branco mais baixo). Foram realizadas três repetições de todas as medidas.

De acordo com as exigências da *Green Analytical Chemistry* (GAC) (ROCHA, et al., 2012), a escolha do volume de reagente e amostra foram os menores possíveis. Volumes de 10 a 200 μL para o $\text{H}_6\text{C}_7\text{O}_5$, 30 a 180 μL para o $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8\text{-H}_3\text{PO}_4$ e de 10 a 1000 μL para o volume de amostra foram investigados. A formação da zona de amostra e reagente foi estudada variando três sequências de aspiração e uma em modo de amostragem binária (REIS, et al., 1994). A Figura 36, mostra o estudo dos volumes de amostra e reagente, e a ordem de aspiração.

Figura 36 - (a) Efeito do volume de amostra; (b) Efeito do volume de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8\text{-H}_3\text{PO}_4$; Efeito do volume de $\text{H}_6\text{C}_7\text{O}_5$; (d) Ordem de aspiração dos reagentes e amostra e seu efeito na intensidade do sinal analítico. (n = 3)



Concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ V (V); $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8\text{-H}_3\text{PO}_4$ 2 % (m/v); $\text{H}_6\text{C}_7\text{O}_5$ 2 % (m/v); Bobina de Reação 130 cm; Tempo de Residência 60 s; Temperatura $60 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda = 415 \text{ nm}$ (a) Efeito do volume de amostra: 50 µL de $\text{H}_6\text{C}_7\text{O}_5$; 100 µL de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8\text{-H}_3\text{PO}_4$; (b) Efeito do volume de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8\text{-H}_3\text{PO}_4$ 2 % (m/v): 50 µL de $\text{H}_6\text{C}_7\text{O}_5$; 500 µL de amostra; (c) Efeito do volume de $\text{H}_6\text{C}_7\text{O}_5$ 2 % (m/v): 500 µL de amostra; 100 µL de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8\text{-H}_3\text{PO}_4$; (d) Sequência de aspiração dos reagentes e amostra e a intensidade do sinal analítico: R_1 ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8\text{-H}_3\text{PO}_4$); R_2 ($\text{H}_6\text{C}_7\text{O}_5$); 50 µL de $\text{H}_6\text{C}_7\text{O}_5$; 100 µL de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8\text{-H}_3\text{PO}_4$; 500 µL de amostra.

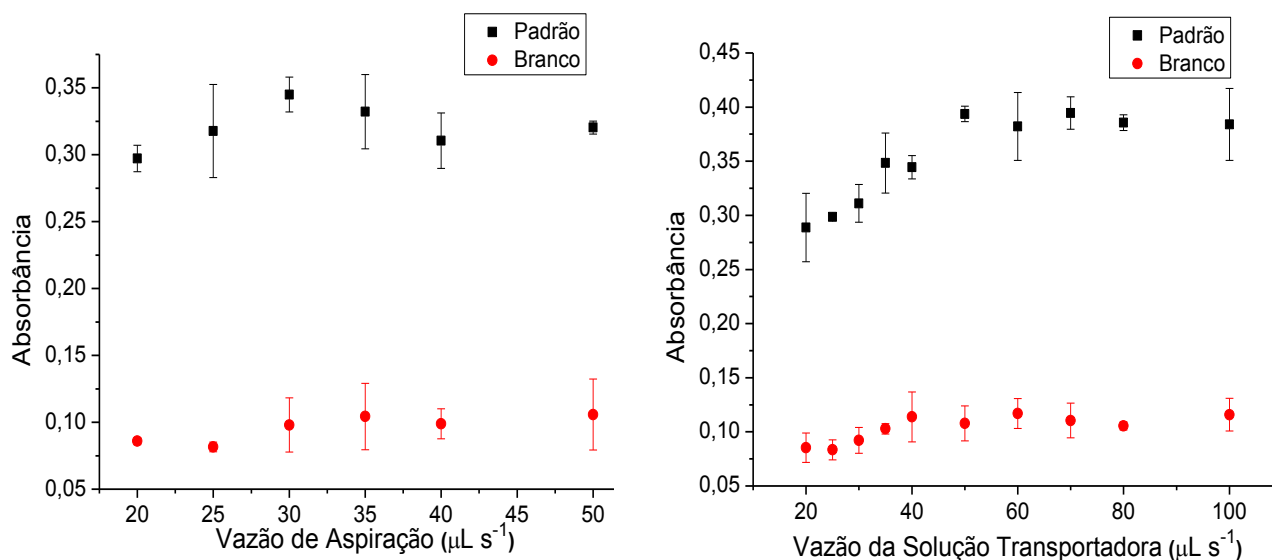
A Figura 36 (b) mostra que o aumento do volume de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8\text{-H}_3\text{PO}_4$ tem um efeito linear na resposta (absorbância). O volume foi fixado em 100 µL, com sinal de branco razoavelmente baixo e volume adequado para o comprimento da bobina de reação. Como mostra a Figura 36 (a) e (c), existe um máximo na intensidade do sinal, e depois a absorbância cai como resposta ao limite da extensão da bobina. Volumes de 500 µL de amostra e 50 µL de ácido gálico foram escolhidos de forma a manter o compromisso entre o ganho na intensidade do sinal analítico, o sinal do

branco e a extensão da bobina de reação.

A segmentação dos reagentes com o sistema operando em modo de amostragem binária (25 μL de $\text{H}_6\text{C}_7\text{O}_5$); 50 μL $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8\text{-H}_3\text{PO}_4$ resulta em ganho na intensidade do sinal analítico, mas percebe-se que não existe uma boa interpenetração mútua dos reagentes e amostra (Figura 36 d sequência 4). A sequência de aspiração 1 e 3 foram as de maior ganho na intensidade do sinal analítico (relação sinal padrão/branco), quando avaliado com concentração de 0,3 mg L^{-1} V (V). A sequência de aspiração 1 foi selecionada como a melhor relação sinal padrão/branco. Além disso, em comparação com a sequência de aspiração 3 (Figura 36 d), a sequência de aspiração 1 se mostra mais interessante, no sentido de que o sinal analítico do branco se torna menor. Por esta razão, a sequência de aspiração de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8\text{-H}_3\text{PO}_4$ (100 μL), $\text{H}_6\text{C}_7\text{O}_5$ (50 μL) e amostra (500 μL) foram escolhidas para os próximos estudos.

Como regra geral, o ganho da intensidade do sinal analítico está relacionado com a eficiência da sobreposição da zona de amostra e reagentes e a velocidade da superfície de contato das zonas, do qual pode ser alcançado com adequada vazão. A Figura 37 (a) e (b) mostra o estudo da vazão de aspiração da amostra e reagentes e da solução transportadora. Vazões de 20 a 50 $\mu\text{L s}^{-1}$, na etapa de aspiração de amostra e reagente e de 20 a 100 $\mu\text{L s}^{-1}$ para solução transportadora foram avaliadas para o sistema.

Figura 37 - Investigação das condições experimentais: (a) Efeito da vazão de aspiração na intensidade do sinal analítico (b) Efeito da vazão da solução transportadora na dispersão do sinal analítico. (n = 3)



As vazões mais baixas foram encontradas como sendo as mais adequadas para os demais experimentos. A Figura 37 (a) mostra o efeito de seis vazões diferentes no sinal de absorbância com melhores respostas obtida com vazão de $30 \mu\text{L s}^{-1}$. Para o transporte da mistura reacional até o detector, $50 \mu\text{L s}^{-1}$ foi encontrado como sendo a vazão mais adequada para o sistema (Figura 37 b). O efeito da vazão da solução transportadora é significativo não só na dispersão e da interpenetração mútua das zonas, como também nas condições de aquisição do detector, uma vez que os sinais transientes dependem da frequência de aquisição de dados. Em virtude da utilização da porta RS232, os resultados de absorbância são enviados a uma taxa de transferência de 2 Hz ou 2 pontos por segundo. Vazões maiores do que $100 \mu\text{L s}^{-1}$ resultam na diminuição do sinal analítico.

5.2.2 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO

A escolha dos parâmetros e a extensão do estudo foram feitas baseando-se no método padrão (*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*) e o método modificado (WEIGUO, Q. 1983). O efeito da concentração dos reagentes foi investigado, $\text{H}_6\text{C}_7\text{O}_5$ na faixa de 1 a 4 % (m/v) e $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ de 2 a 6 % (m/v). Nada se pode afirmar sobre a influência da concentração de H_3PO_4 na

formação do agente ativante da reação (H_2SO_5), reforçando a importância do seu estudo como um dos parâmetros do planejamento. Concentrações de 4,1 a 10 mol L⁻¹ foram avaliadas. Os parâmetros que aceleram a oxidação catalítica do $H_6C_7O_5$ foram investigados através da temperatura, na faixa de 30 a 70 °C, e tempo de residência da mistura amostra/reagentes na bobina de reação entre 30 e 60 s. A avaliação dos parâmetros na resposta (intensidade do sinal analítico) foi realizada através da relação do sinal padrão/branco para cada um dos níveis do planejamento. A intensidade do sinal analítico foi obtida com solução 0,3 mg L⁻¹ V (V). O objetivo é avaliar a influência dos parâmetros de concentração do ácido gálico, persulfato de amônio, e ácido fosfórico, e da temperatura e tempo de residência, estabelecendo a melhor condição de aplicação ao Sistema por Injeção Sequencial (SIA).

O delineamento experimental foi constituído de um planejamento fatorial fracionado 2⁵⁻¹, totalizando 16 ensaios com ponto central em triplicata, e como variável resposta a intensidade do sinal analítico (absorbância). As variáveis independentes são: concentração do ácido gálico (%), persulfato de amônio (%), e ácido fosfórico (mol L⁻¹), temperatura (°C) e tempo de residência (s). O planejamento apresentou uma resolução do tipo V, na qual os efeitos principais são confundidos com as interações entre quatro fatores, as interações entre dois fatores são confundidas com as de três fatores (Tabela 3).

Tabela 3 - Fatores principais e de interação e sua estrutura de associação (confundimentos) para análise de efeitos.

Fator	Estrutura de associação
Tempo de Residência (s)	2345
Temperatura (°C)	1345
Persulfato de Amônio (%)	1245
Ácido Gálico (%)	1235
Ácido Fosfórico (mol L ⁻¹)	1234
12	345
13	245
23	145
14	235
24	135
34	125
15	234
25	134
35	124
45	123

1:Tempo de Residência; 2:Temperatura; 3:Persulfato de Amônio; 4:Ácido Gálico; 5:Ácido Fosfórico.

A Tabela 4 apresenta os níveis descodificados das variáveis independentes.

Tabela 4 - Níveis descodificados das variáveis independentes do planejamento fatorial fracionado (2^{5-1}).

Variáveis Originais	Níveis		
	-1	0	+1
Tempo de Residência (s)	30	45	60
Temperatura (°C)	40	50	60
Persulfato de Amônio (%)	2	3	4
Ácido Gálico (%)	1	1,5	2
Ácido fosfórico (mol L ⁻¹)	4,10	6,15	8,20

Os parâmetros de concentração do persulfato de amônio, ácido gálico e ácido fosfórico dizem respeito às condições reacionais da zona de amostra e reagente, e o tempo de residência e temperatura do processo de oxidação catalítica do ácido gálico. As soluções ácidas de persulfato de amônio foram preparadas 24 horas antes do uso, como recomendado pelo método padrão. As soluções de ácido gálico foram preparadas em meio alcóolico 20 % (v/v) para evitar a precipitação da solução. No tempo de residência o sistema opera em modo *stopped flow* (RUZICKA, J.; GUBELLI, T., 1991; HERRERA-LÓPEZ, et al., 2015) e a zona de amostra e reagente é aprisionada na bobina de reação e condicionada a uma temperatura específica. A Tabela 5 apresenta a matriz do delineamento e a Tabela 6 as equações de codificação para as variáveis quantitativas.

Tabela 5 - Matriz do Planejamento Fatorial Fracionado 2^{5-1} com ponto central em triplicata.

Ordem	Ensaio	Variáveis em unidades codificadas					Resposta (y)
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	
18	1	-1	-1	-1	-1	1	0,111
11	2	1	-1	-1	-1	-1	0,014
2	3	-1	1	-1	-1	-1	0,033
7	4	1	1	-1	-1	1	0,321
13	5	-1	-1	1	-1	-1	0,014
15	6	1	-1	1	-1	1	0,235
4	7	-1	1	1	-1	1	0,399
1	8	1	1	1	-1	-1	0,142
10	9	-1	-1	-1	1	-1	0,000
17	10	1	-1	-1	1	1	0,134
9	11	-1	1	-1	1	1	0,255
3	12	1	1	-1	1	-1	0,099
12	13	-1	-1	1	1	1	0,211
14	14	1	-1	1	1	-1	0,043
8	15	-1	1	1	1	-1	0,113
5	16	1	1	1	1	1	0,926
19	17	0	0	0	0	0	0,165
16	18	0	0	0	0	0	0,138
6	19	0	0	0	0	0	0,167

X₁:Tempo de residência; X₂:Temperatura; X₃:Persulfato de amônio; X₄:Ácido gálico;
X₅:Ácido fosfórico; y:Absorbância (Padrão – Branco).

Tabela 6 - Equações de codificação para as variáveis independentes.

Variáveis	Equação de Codificação
Tempo de Residência	$X_1 = \frac{R - 45}{15}$
Temperatura	$X_2 = \frac{T - 50}{10}$
Persulfato de Amônio	$X_3 = \frac{P - 3}{1}$
Ácido Gálico	$X_4 = \frac{AG - 1,5}{0,5}$
Ácido Fosfórico	$X_5 = \frac{R - 45}{2,05}$

R: Tempo de residência; T: Temperatura; P: Persulfato; AG: Ácido Gálico;
AF: Ácido fosfórico.

A análise dos efeitos estimados para a intensidade do sinal analítico é apresentada na Tabela 7. A Figura 38 mostra o gráfico normal de distribuição dos fatores e seus efeitos (%) em caso de mudança do nível inferior para o superior do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

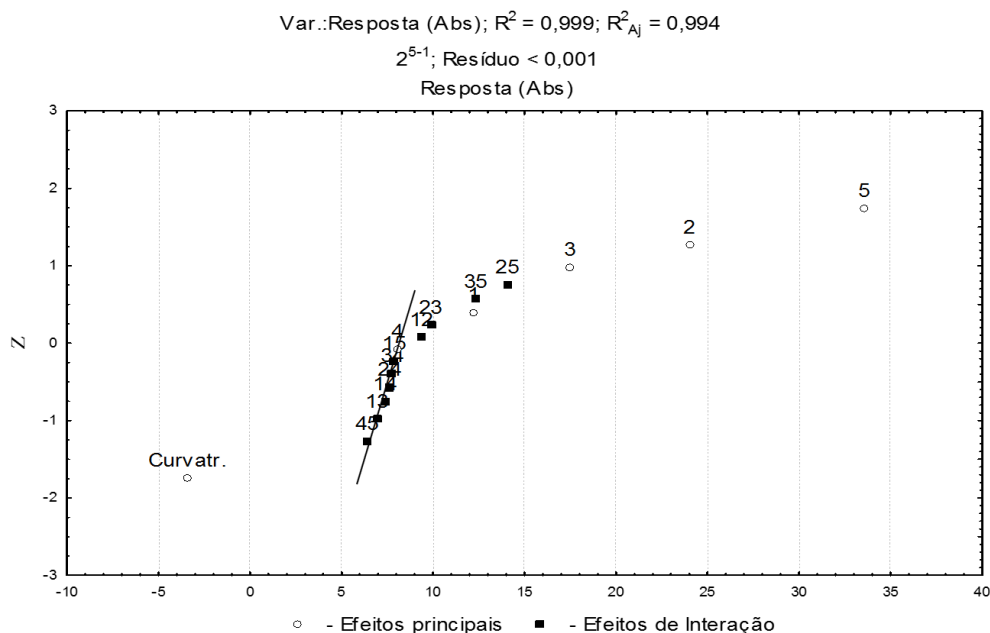
Tabela 7 - Efeitos calculados para o Planejamento Fracionado 2^{5-1} .

Parâmetro	Efeito	Erro Padrão	p-valor
Média	0,191	0,004	<0,0010
Curvatura	-0,068	0,020	0,0768
1 (Tempo de Residência)	0,097	0,008	0,0066
2 (Temperatura)	0,191	0,008	0,0017
3 (Persufato de Amônio)	0,140	0,008	0,0032
4 (Ácido Gálico)	0,064	0,008	0,0150
5 (ácido Fosfórico)	0,267	0,008	<0,0010
12	0,074	0,008	0,0111
13	0,055	0,008	0,0201
23	0,078	0,008	0,01789
14	0,059	0,008	0,01571
24	0,061	0,008	0,01009
34	0,062	0,008	0,01675
15	0,063	0,008	0,00502
25	0,112	0,008	0,01611
35	0,098	0,008	0,00651
45	0,051	0,008	0,02345

Efeito: Intensidade do sinal analítico (Absorbância).

$R^2 = 0,999$

Figura 38 - Gráfico normal dos valores da Tabela 7. Todos os efeitos são significativos. Os valores refletem a % de variação no sinal de absorbância no caso de mudança do nível inferior para o nível superior.



1:Tempo de residência; 2:Temperatura; 3:Persulfato de Amônio; 4:Ácido Gálico; 5:Ácido Fosfórico.

Os parâmetros mais significativos (Tabela 7, Figura 38) são a concentração de ácido fosfórico e temperatura (5 e 2, respectivamente), seguidos a uma certa distância pela concentração de persulfato de amônio (3). Note que, todos os 15 efeitos calculados são estatisticamente significativos ($p < 0,05$) e positivos (no sentido que todos contribuem para o aumento da intensidade do sinal analítico). Sem dúvida, os fatores 1 e 4, tempo de residência e concentração do ácido gálico, respectivamente, e seus efeitos de interação, são menos importantes que os outros três, mas eles também parecem atuar no sentido de aumentar a intensidade do sinal analítico. Se examinarmos seus efeitos, constatamos que a mudança do nível inferior para o nível superior produz um aumento na intensidade do sinal analítico. Apesar do interesse secundário por estes parâmetros, ignorar algum de seus efeitos causaria a falta de ajuste do modelo, pois todos contribuem positivamente e linearmente para o aumento da absorbância, assim outras regiões devem ser exploradas. A checagem da curvatura (Tabela 7), ($p > 0,05$), indica que a faixa escolhida para os parâmetros estão fora da região de máximo, como consequência um modelo completo e linear descreve a variável resposta em relação às variáveis independentes.

Quanto aos parâmetros relacionados à aceleração da oxidação catalítica do ácido gálico, a mudança dos níveis de temperatura e tempo de residência do inferior para o nível superior, resultou no aumento dos valores médios da intensidade do sinal analítico. Temperatura em nível superior (60 °C) resultou no ganho, em média, 0,191 na intensidade do sinal analítico, isso representa o aumento de 24 % no sinal de absorbância. Para o tempo de residência, em média, o aumento de 0,097 no sinal de absorbância, representa 12 % no aumento da resposta em caso de mudança do nível inferior (30 s) para o superior (60 s). No que diz respeito aos parâmetros relacionados a concentração, quando se trabalhou em nível superior, o ácido gálico 2 % (m/v) aumenta em 8,1 % a resposta analítica (0,064 em média no sinal de absorbância) e 17,5 % para a solução de persulfato de amônio 4 % (m/v) (0,140 no sinal de absorbância). Weiguo (1983) em seu método modificado também verificou em seu estudo que a resposta analítica aumenta com o aumento da concentração do persulfato de amônio assim como o sinal do branco se torna mais pronunciado. Com relação ao ácido gálico o autor também relata o aumento da resposta com a concentração, porém prefere ser mais modesto e fixar a concentração em 1 % (m/v), devido ao aumento não só do sinal do branco como da cristalização do ácido do gálico.

Parece que o principal fator para que a reação aconteça, a formação do agente ativante (H_2SO_5), é a concentração do ácido fosfórico. Como mostra a tabela 7 e a figura 38, a mudança de concentração do nível inferior para o superior (4,10 a 8,2 mol L⁻¹), resulta no aumento da intensidade do sinal analítico, em média 0,267, o que equivale a 33,6 % de aumento na intensidade do sinal analítico. Outros dois parâmetros de interação têm efeito mais pronunciado, e estão associados a concentração de ácido fosfórico. A combinação dessas variáveis em níveis iguais (++) , ácido fosfórico com persulfato de amônio ou temperatura resultam no aumento da absorbância (curvas de contorno e superfície de resposta, (Figuras 39 e 40).

Figura 39 - Efeito de interação ácido fosfórico e persulfato de amônio na intensidade do sinal analítico (Absorbância): (a) Curva de contorno. (b) Superfície de resposta.

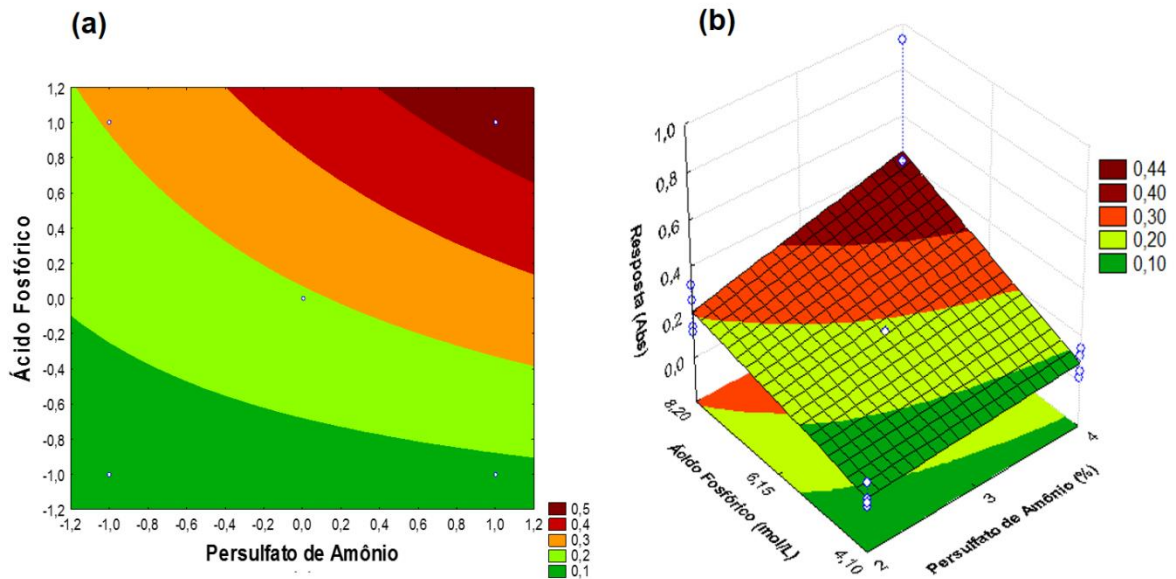
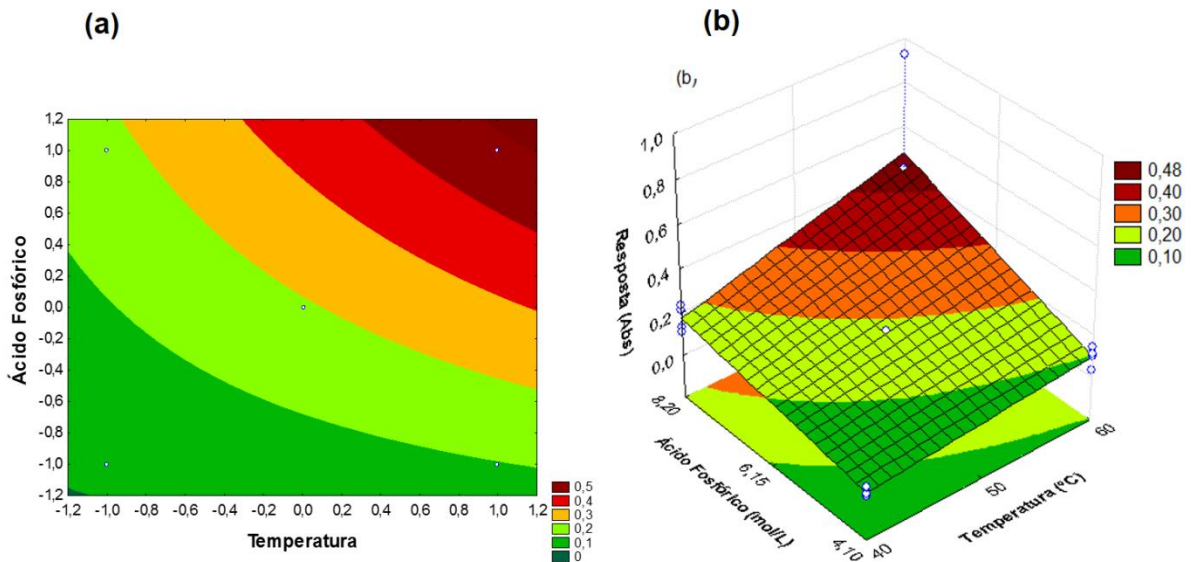


Figura 40 - Efeito de interação ácido fosfórico e temperatura na intensidade do sinal analítico (Absorbância): (a) Curva de contorno. (b) Superfície de resposta.



Em média a interação dos parâmetros ácido fosfórico e persulfato de amônio aumentam 0,098 no sinal de absorbância, aproximadamente 12,3 % de aumento na resposta. A superfície de resposta (Figura 39 b), exibe o aumento ascendente na absorbância da esquerda para a direita (de 2 para 4 %) para o persulfato de amônio e da direita para a esquerda para a concentração de ácido fosfórico (4,10 para 8,20 mol L⁻¹).

A interação do ácido fosfórico com a temperatura ao nível (++), Figura 40 (a), aumenta em 14,1 % a resposta. Como mostra a Figura 28 (b), a intensidade da resposta aumenta com a interação (++) entre a temperatura (60 °C) e ácido fosfórico (8,20 mol L⁻¹) resultando no aumento em média de 0,112 na absorbância. Conclusão, os resultados mostram uma tendência positiva das respostas, com a elevação do nível inferior para o nível superior dos parâmetros, para a faixa de trabalho escolhida.

O ensaio 16 foi escolhido como a melhor condição para os próximos estudos: H₆C₇O₅ 2 % (m/v), (NH₄)₂S₂O₈ 4 % (m/v), H₃PO₄ 8,2 mol L⁻¹ com temperatura de 60 °C e tempo de residência de 60 s.

Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo aos dados experimentais foi realizada a análise de variância ou ANOVA (*Analysis of Variance*). O desvio das respostas e das estimativas feitas pelo modelo em torno da média das respostas pode ser decomposta na equação 1:

$$\text{Equação 1: } SQ_T = SQ_R + SQ_r$$

Em que SQ_T é a soma quadrática total, SQ_R é a soma dos quadrados explicada pelo modelo e SQ_r é a soma dos quadrados devido ao resíduo.. A SQ_r ainda pode ser decomposta em duas partes:

$$\text{Equação 2: } SQ_r = SQ_{ep} + SQ_{faj}$$

Em que SQ_{ep} é a soma dos quadrados devido ao erro puro e SQ_{faj} é a soma dos quadrados devido a falta de ajuste do modelo. A primeira parcela da equação 2 nada tem a haver com modelo, é a dispersão das respostas repetidas em torno do ponto central. O segundo termo deve ser ajustado de acordo com as respostas observadas. A Tabela 8 fornece a análise de variância pelo método dos mínimos quadrados do modelo linear.

Tabela 8 - Análise de variância para o modelo.

Fonte de variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade	Média Quadrática (MQ)
Regressão	0,778717	5	0,1557434
Resíduos	0,003417	13	0,0002628
Falta de ajuste	0,002912	11	0,0002647
Erro puro	0,000505	2	0,0002525
Total	0,782134	18	0,0434519

O valor R^2 , coeficiente de determinação, obtido a partir da equação 3, indica o quanto da variação da resposta em torno da média é explicado pelo modelo.

$$\text{Equação 3: } \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{0,778716}{0,782134} = 0,996$$

Isso significa que 99,6 % da variação total em torno da média são explicadas pela regressão, para os resíduos restam apenas 0,4 %. A percentagem máxima de variação explicável pode ser calculada pela diferença entre a SQ_T e a SQ_{ep} . No caso, $0,782134 - 0,000505 = 0,781629$, isso corresponde a $0,781629 / 0,782134 = 99,9$ % da soma quadrática total.

O valor de R^2 ajustado (R^2_{aj}), dado pela equação 4, explica não apenas o quanto da variação é explicado pelo modelo, como também considera o número de fatores.

$$\text{Equação 4: } 1 - \frac{MQ_R}{MQ_r} = 1 - \frac{0,0002629}{0,0434519} = 0,994$$

Onde MQ_R é a razão entre a soma dos quadrados devido a regressão pelo seu número de graus de liberdade e MQ_r , a razão entre a soma dos quadrados devido ao resíduo em relação ao número de graus de liberdade (Tabela 8).

Podemos testar a hipótese nula $H_0: \beta = 0$, isto é, quando não há relação linear entre as variáveis.

$$\text{Equação 5: } \frac{MQ_R}{MQ_r} = F_{(p-1)(n-p)}$$

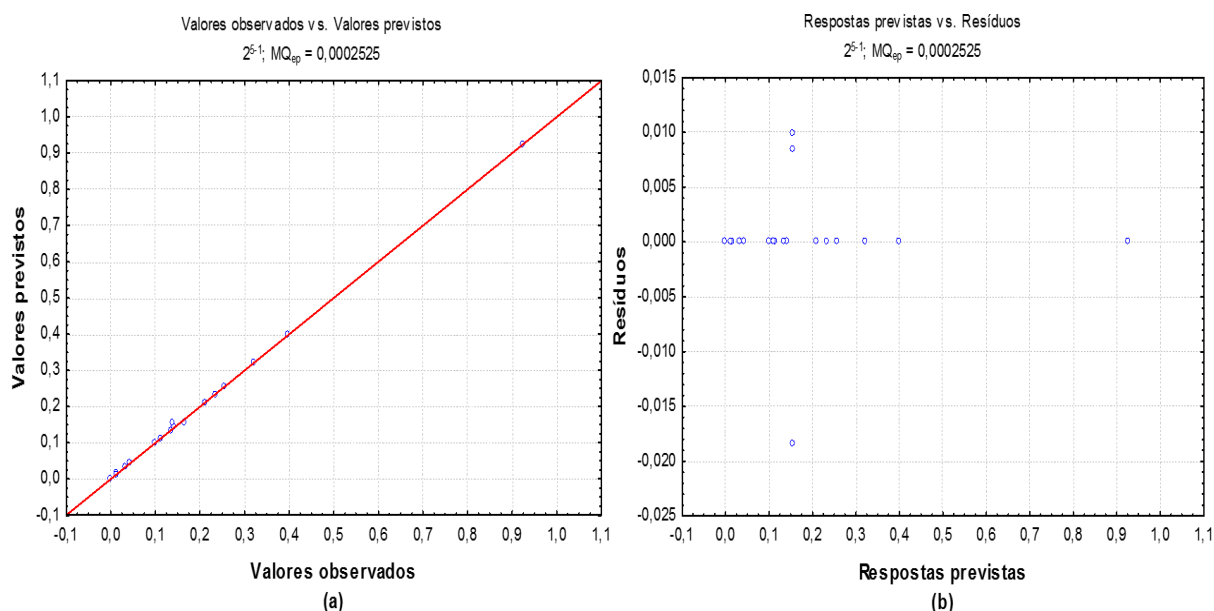
Temos $MQ_R / MQ_r = 0,1557432 / 0,0002629 = 592,4 > 3,03$, para $F_{5,13}$ no nível de 95 % de confiança. Devemos descartar a possibilidade de $\beta = 0$, existe

relação linear entre as variáveis.

Se compararmos a razão entre $MQ_{faj} / MQ_{ep} = 0,0002648 / 0,0002525 = 1,05$, com $F_{11,2} = 19,40$ no nível de 95 % de confiança, temos $MQ_{faj} / MQ_{ep} < F_{11,2}$, logo não há evidência de falta de ajuste do modelo para as condições e faixas escolhidas para os parâmetros. Como o modelo está bem ajustado, tanto MQ_{faj} quanto MQ_{ep} estimam σ^2 , e portanto o valor MQ_r passa a ser uma estimativa legítima da variância devido ao erro puro. Pelo valor da média quadrática residual, $\sigma^2 = 2,63 \times 10^{-4}$, temos as estimativas das variâncias dos parâmetros, logo a estimativa dos erros padrão dos parâmetros é 0,016. Como o erro padrão dos parâmetros (Tabela 7) é menor do que 0,016, concluímos que todos os efeitos principais e de interação são significativos.

A análise de resíduos realizada pelos gráficos dos desvios das respostas observadas pelas respostas estimadas dadas pelo modelo confirma o ajuste (Figura 41).

Figura 41 - Resíduos dos ajustes dos dados: (a) Distribuição dos resíduos. (b) Respostas observadas versus valores estimados pelo modelo.



O bom ajuste é confirmado pela distribuição aleatória em torno de zero (Figura 41 b), além disso, a variância residual deixada entre os valores observados e o estimado pelo modelo é baixa (Figura 41 a).

5.2.3 CAMINHO DE MÁXIMA ASCENSÃO (STEEPEST ASCENT)

Para definir o caminho de máxima ascensão na intensidade do sinal analítico (absorbância), a melhor condição estabelecida no planejamento fatorial fracionado foi fixada, fazendo o deslocamento para os níveis das variáveis originais e codificadas através da equação de codificação (Tabela 6). Os ensaios definidos e as respostas obtidas são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultado dos ensaios adicionais ao planejamento 2^{5-1} .

Ensaio Adicional	Variáveis Originais				Variáveis Codificadas				Resposta (y)	
	Temperatura (°C)	Persulfato (%)	Ác.Gálico (%)	H ₃ PO ₄ (mol L ⁻¹)	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Padrão	Branco
1	62,5	4,5	2,5	8,5	1,25	1,5	2,0	1,15	0,612	0,405
2	65	5	3	9,10	1,50	2,0	3,0	1,44	0,751	0,534
3	67,5	5,5	3,5	9,50	1,75	2,5	4,0	1,63	1,027	0,666
4	70	6	4	10	2,0	3,0	5,0	1,88	1,572	1,123

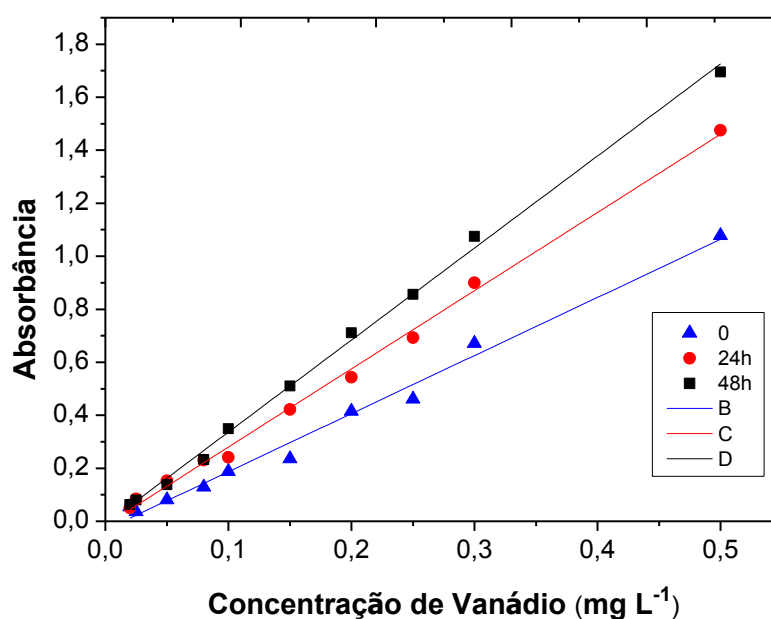
X₁: Temperatura (°C); X₂: Persulfato (%); X₃: Ácido Gálico (%); X₄: ácido Fosfórico (mol L⁻¹); y: Absorbância (Abs).

O tempo de residência foi fixado em 60s para todas as condições variando os outros quatro fatores independentes, para o ganho na frequência analítica. Os ensaios adicionais foram realizados com padrão 0,05 mg L⁻¹ e o ganho na intensidade do sinal analítico atribuído em relação ao sinal do branco. Obviamente as respostas demonstram que o deslocamento das condições produz maiores respostas no sinal de absorbância (Tabela 9), porém o ganho de intensidade é acompanhado por problemas à adaptação das condições ao sistema. Altos sinais do branco e respostas nos limites do detector são observados. Cristalização do ácido gálico para as concentrações acima de 2,5 % (m/v) e problemas com a solução ácida de persulfato de amônio, como a formação de bolhas de gás e efeito *Schlieren* (ZAGATTO et al., 2006; LIMA et al., 2012) foram observados para o deslocamento das concentrações. Em razão das limitações, a melhor condição para o sistema são as concentrações de ácido gálico 2 % (m/v), persulfato 4 % (m/v), e ácido fosfórico 8,2 mol L⁻¹ com temperatura de 60 °C e tempo de residência de 60 s, obtidos pelo planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

5.2.4 EFEITO DO TEMPO DE PREPARO DE $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8\text{-H}_3\text{PO}_4$ NA SENSIBILIDADE

Segundo Fishman e Skougstad (1964) a solução ácida de persulfato de amônio deve ser preparada 24 horas antes do uso. Segundo os autores, o produto de hidrólise gerado pela mistura entre $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ e o H_3PO_4 é o ácido peroximonossulfúrico (H_2SO_5). Agente ativante da reação, sua formação está relacionada com o tempo de preparo. Foram levantadas três curvas, na faixa de 0,02 a 0,5 mg L^{-1} de vanádio (V), imediatamente após o preparo, 24h e 48h após o preparo (Figura 42).

Figura 42 - Curva analítica para os diferentes tempos de preparo da solução ácida de persulfato de amônio.



De fato, o ajuste é ruim para a curva obtida com a análise imediatamente após o preparo ($R^2 = 0,987$ e $y = 2,1923x - 0,0323$) e se tornam melhor após as 24 horas ($R^2 = 0,996$ e $y = 2,9513x - 0,0150$). A melhor resposta foi obtida após 48 horas do preparo da solução ácida de persulfato de amônio com aumento da inclinação e intercepto ($R^2 = 0,997$ e $y = 3,4749 - 0,0110$). Para diminuir o tempo de preparo do reagente e os limites de detecção e quantificação, para o restante do trabalho a solução foi preparada 24 horas antes do uso.

5.3 ESTUDO DE INTERFERENTES

Com o intuito de verificar se os íons normalmente presentes em água, assim como Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Cd^{2+} , Na^+ , Cl^- , F^- , SO_4^{2-} , Br^- , I^- e NO_3^- , causam interferência no procedimento analítico, um conjunto de soluções foram preparadas contendo $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de vanádio (V) com diferentes níveis de concentração do analito. A Tabela 10 mostra as espécies químicas e o nível de concentração avaliado.

Tabela 10 - Efeito de possíveis espécies interferentes.

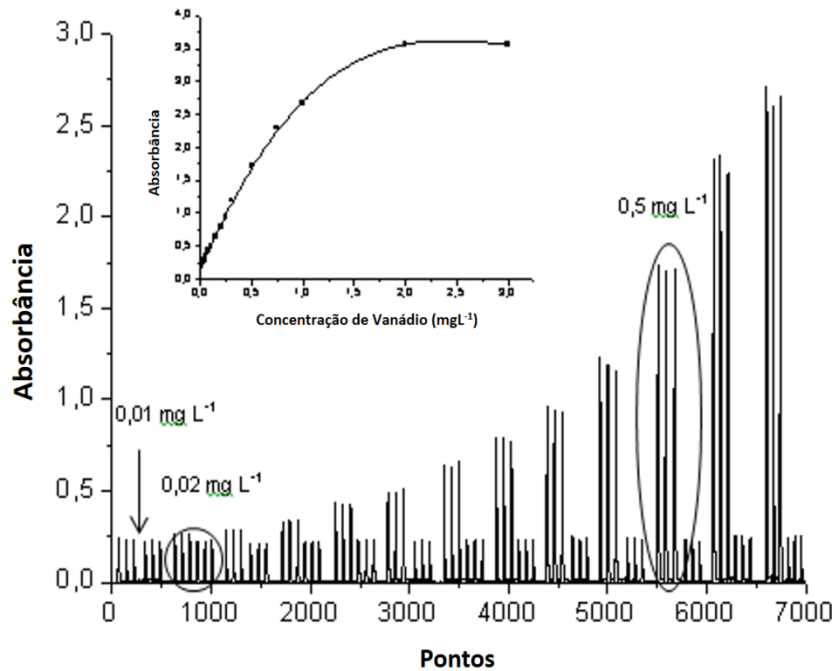
Espécies químicas	Concentração (mg L^{-1})	Varição na absorvância (%)
Mn^{2+}	2,5	< 3 %
Fe^{3+}	2,5	< 3 %
Cu^{2+}	2,0	< 3 %
Mg^{2+}	25	< 3 %
Zn^{2+}	2,5	< 3 %
Sr^{2+}	2,5	< 3 %
Al^{3+}	2,5	< 3 %
Cd^{2+}	2,0	< 3 %
Na^+	500	< 3 %
Cl^-	100	< 3 %
F^-	2,0	< 3 %
SO_4^{2-}	500	< 3 %
NO_3^-	500	< 3 %
Br^-	0,2	< 3 %
I^-	0,01	< 3 %

Nenhum dos íons estudados excederam o erro 3% no sinal analítico (absorvância) para o nível de concentração avaliado.

5.4 PERFORMANCE ANALÍTICA

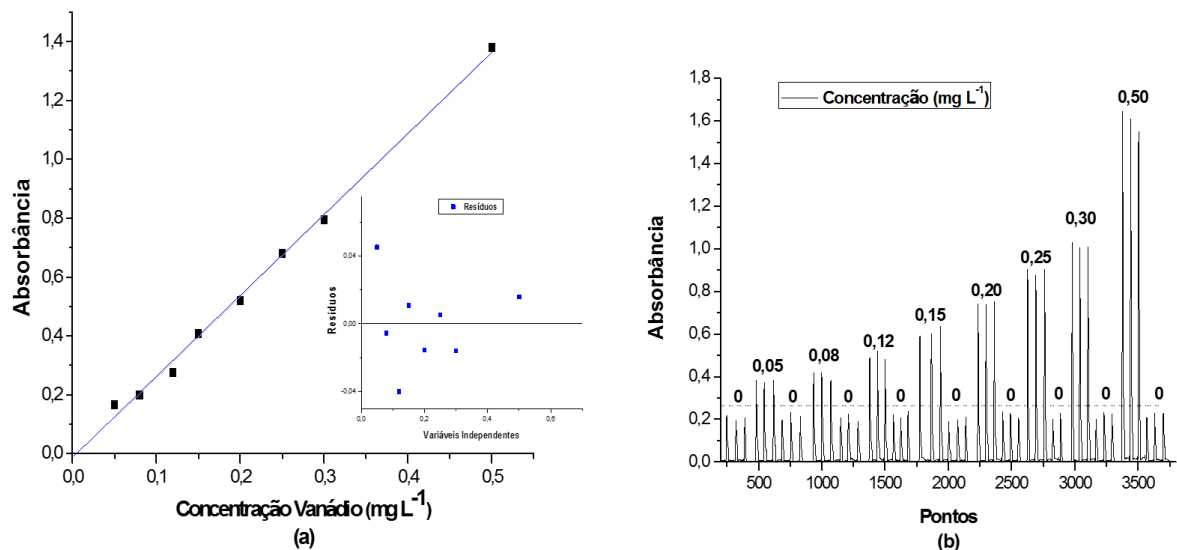
O sistema desenvolvido para determinação de vanádio em água foi avaliado em termos de faixa linear, limite de detecção e quantificação, adição e recuperação e comparação por método de referência (IUPAC, 1995). A faixa linear para o método foi avaliada até a concentração de $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ em vanádio. Faixa linear de $0,036$ a $0,500 \text{ mg L}^{-1}$ foram obtidas para o sistema. Concentrações menores que $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ não mostraram diferença em relação ao sinal do branco (Figura 43).

Figura 43 - Avaliação da linearidade do método para o sistema SIA.



A curva analítica foi construída com uma série de soluções padrões contendo V (V) em oito níveis de concentração (0,050 a 0,500 mg L⁻¹) e amostras de água foram determinadas nas melhores condições experimentais obtidas para o sistema. A Figura 44 (a) mostra a curva analítica obtida para a determinação das amostras, e a Figura 44 (b) os sinais transientes.

Figura 44 - (a) Curva analítica para a determinação de vanádio em água (b) Sinais transientes obtidos para a concentração de 0,05 a 0,5 mg L⁻¹ V (V).



A equação de regressão para a curva analítica, $A = 2,7608 \times C - 0,0164$, onde A é a absorbância e C a concentração de vanádio total em mg L^{-1} . Os resultados mostraram boa relação entre a absorbância e a concentração de vanádio, com coeficiente de determinação R^2 0,996. O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), calculado a partir do desvio padrão do branco ($n = 26$), de $15,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e $36,0 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A obtenção do sinal analítico no sistema SIA desenvolvido é acompanhada durante 312 s desde a injeção até a detecção (19 determinações por hora).

Uma comparação das características de desempenho de métodos espectrofotométricos acoplado a sistemas de injeção em fluxo, e métodos espectrofotométricos de batelada na determinação de vanádio é mostrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Comparação entre métodos de batelada e de injeção em fluxo na determinação de vanádio por espectrofotometria UV/Vis.

Procedimento	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Caminho óptico (mm)	Limite de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Frequência analítica (h^{-1})	Resíduo (mL)	Ref.
SIA ^a	36,0-500	10	15,0	19	3,35	*
SIA	500-5000	10	390	10	2,35	Silva
MSFIA ^b	0,24 – 75	30	0,24	30	-	Cerdá
FIA ^c	20,0-1500	150	13,0	47	2,40	Reis
FIA	100-5000	-	-	30	6,80	van Staden
FIA	0-3000	10	4,70	-	-	Pinto
FIA	10-140	10	5,20	20	-	Keyvanfard
Batelada	0,77-6,20	23	-	-	13,0	Fishman
Batelada	0,50-8,0	50	-	-	13,0	Weiguo
Batelada	1-250	10	0,42	-	12,8	Keyvanfard

^aSequencial Injection Analysis (SIA);

^bMultisyringe Flow Injection Analysis (MSFIA);

^cFlow Injection Analysis (FIA);

*Método proposto.

Observa-se que os procedimentos de batelada são em geral mais sensíveis do que aqueles aplicados a sistemas em fluxo, sobretudo pela dispersão da zona de amostra e reagente. Fishman e Skougstad (1964) em seu método de oxidação do ácido gálico por persulfato e Weiguo (método modificado), no entanto caminhos ópticos maiores, 23 e 50 mm, respectivamente, foram utilizados. A desvantagem dos métodos de batelada está no laborioso procedimento de análise, rigoroso controle

das condições e os enormes tempos gastos nos equilíbrios reacionais.

Dentre os sistemas em fluxo, o desenvolvido por Cerdá et al. (2014) baseado no método de oxi-redução do ácido gálico por bromato apresenta boa performance, com baixo limite de detecção, boa frequência analítica e faixa linear com concentrações próximas aquelas obtidas pelos métodos de batelada. Deve-se salientar a presença de caminho óptico três vezes maior que o normalmente utilizado. Para que atingissem limites de detecção tão baixos quanto $13,0 \mu\text{g L}^{-1}$, Reis et al. (2014) construíram uma célula de fluxo com 150 mm para determinação de vanádio, baseado na reação de eriocromo cianina R com ácido ascórbico.

Comparado ao sistema de Keyvanfard e Abedi (2011), o processo de oxidação do oxalato de malaquita por solução ácida de bromato, apresenta como vantagem, baixo limite de detecção. Apesar da boa frequência analítica e ampla faixa linear do sistema FIA desenvolvido por van Staden et al. (1996), a determinação espectrofotométrica do vanádio por complexação com 4-(2-piridilazo) resorcinol é dos sistemas em fluxo o que mais gera resíduos. O baixo limite de detecção e ampla faixa linear de Pinto et al. (2013) podem ser explicadas pelas etapas de pré-concentração antes da detecção espectrofotométrica.

O sistema SIA desenvolvido por Silva et al. (2009) baseado na determinação de vanádio por oxidação da dopamina em meio ácido, apresenta menor faixa linear e alto limite de detecção. A grande vantagem de seu trabalho é o baixo volume de resíduos gerados por análise (2,35 mL).

A exatidão do sistema SIA foi avaliado através de testes de adição e recuperação em amostras de água de torneira em dois níveis de concentração, 0,054 e 0,140 mg L^{-1} (IUPAC, 1995). A água de torneira foi recolhida em frasco de polietileno de alta densidade após escoamento em fluxo contínuo durante 2 minutos, tempo suficiente para eliminar impurezas acumulada na canalização. A Tabela 12, mostra a porcentagem de recuperação obtida para os dois níveis de concentração avaliado.

Tabela 12 - Análise de amostras de água.

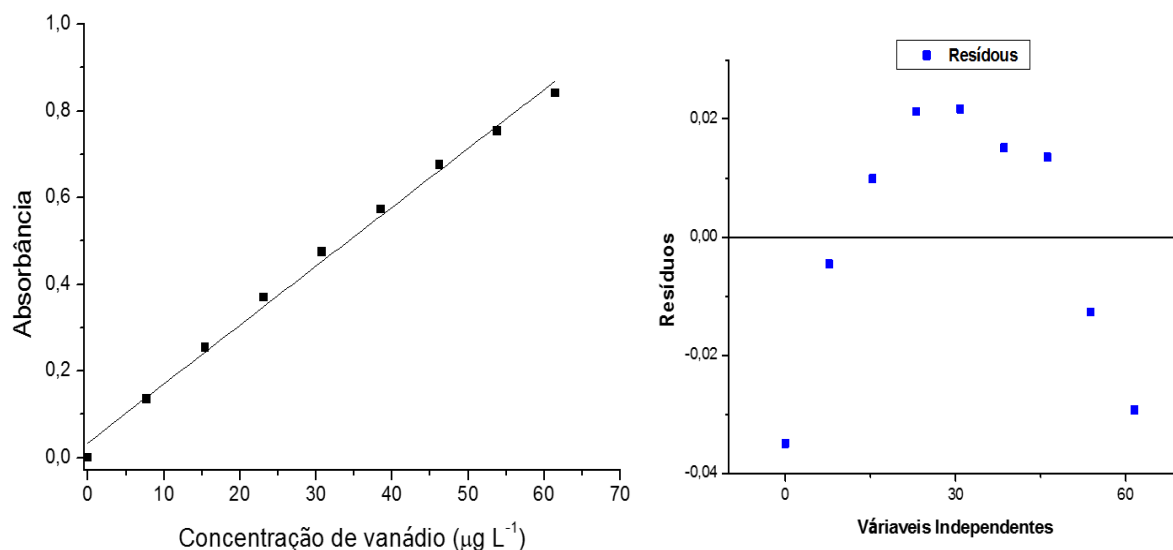
Amostra*	Adicionado (mg L ⁻¹)	Determinado (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Recuperação (%)
1	0,054	0,059	2,76	109,1
	0,140	0,132	4,15	94,5
2	0,054	0,058	2,31	107,9
	0,140	0,136	2,04	97,3
3	0,054	0,056	0,78	103,3
	0,140	0,133	0,69	94,7
4	0,054	0,055	0,60	102,0
	0,140	0,133	1,81	94,7

* água mineral; DPR: desvio padrão relativo. n = 3

Nas condições otimizadas a faixa de recuperação ficou entre 94,5 e 109,1 %, mostrando o potencial do sistema como ferramenta de análise de rotina na determinação de vanádio em água. Para demonstrar a aplicação do sistema do sistema, além do teste de adição e recuperação, a exatidão do Sistema de Análise por Injeção Sequencial (SIA), se deu por comparação com o método padrão de determinação de vanádio por Espectrofotometria UV/Vis e por Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS) (IUPAC, 1995).

A partir da curva analítica (Figura 44 a e b), as diferentes amostras de água foram quantificadas pelo sistema SIA-UV/Vis. A Figura 45 mostra a curva analítica com concentrações de 0; 7,70; 15,4; 23,1; 30,8; 38,5; 46,2; 53,8 e 61,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, para a determinação de vanádio por Espectrofotometria UV/Vis. O procedimento foi descrito no item 4.4.2 (pág. 67).

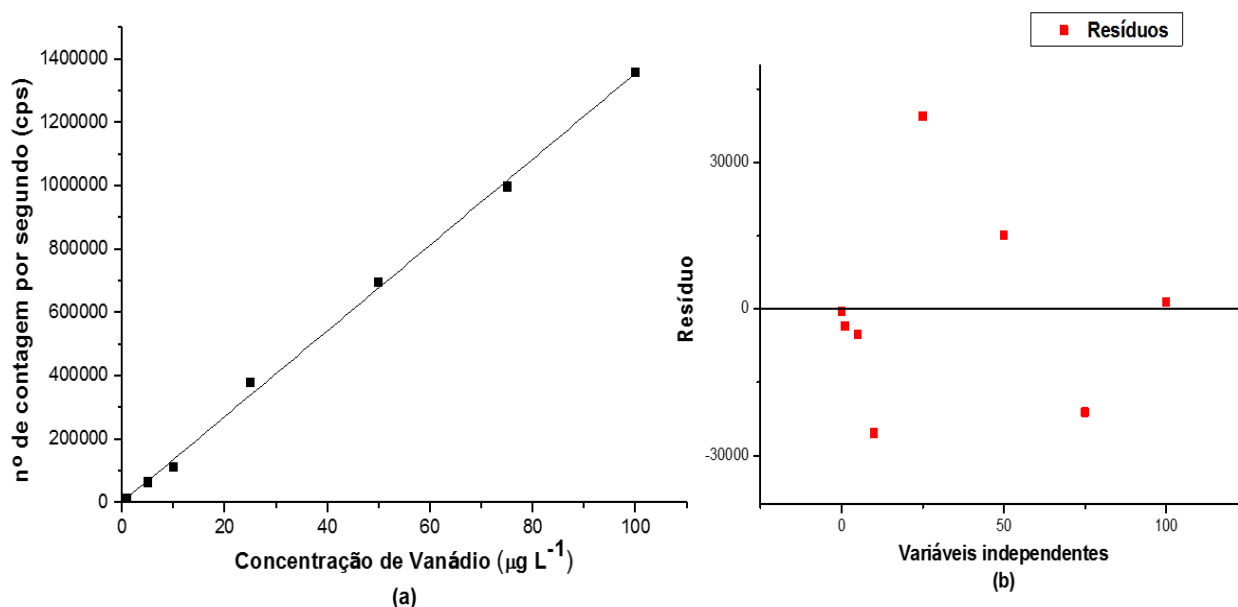
Figura 45 - Curva analítica do método padrão de determinação de vanádio em água.



Os resultados experimentais mostraram uma boa relação entre a absorbância e a concentração de vanádio para um R^2_{aj} 0,994. A equação de regressão para a curva analítica foi $A = 0,0136 \times C + 0,0350$, onde A é a absorbância e C é a concentração de vanádio ($\mu\text{g L}^{-1}$). A determinação de vanádio foi acompanhada por quase três horas desde a entrada dos tubos no banho termostaticado para o controle da reação até a última amostra medida. Em razão do caminho óptico da cubeta, a curva foi construída com concentrações dez vezes acima, da descrita pelo método padrão (*Gallic Acid Method, 3500-V B: Standard Methods For the Examination of water and Wastewater, 2005*).

Além da Espectrofotometria UV/Vis, outro método padrão de determinação de vanádio em água, o ICP-MS, foi utilizado para quantificar as amostras (*Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry (ICP/MS), 3125 B: Standard Methods For the Examination of water and Wastewater, 2005*). As condições utilizadas no ICP-MS para a determinação de vanádio nas amostras de água foi descrita no item 4.4.3 (pág. 68). Boa linearidade, com R^2_{aj} de 0,998 para uma faixa de 1 à $100 \mu\text{g L}^{-1}$ foi obtida. A Figura 46 mostra a curva analítica para o ICP-MS.

Figura 46 - (a) Curva analítica obtida para a determinação de vanádio total por ICP-MS. (b) Distribuição dos resíduos.



A equação de regressão da curva analítica para o método é dada por $y = 13553.0 x + 1843.2$, onde y corresponde a contagem por segundo (cps) e x é a concentração de vanádio ($\mu\text{g L}^{-1}$). A Figura 46 (b) mostra que os resíduos se distribuem de forma aleatória. Antes e após a entrada de cada padrão ou amostra, HNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e água ultrapura são injetados para evitar a presença da amostra/padrão no percurso analítico.

A tabela 13 mostra a composição química das amostras de água analisadas pelos três métodos.

Tabela 13 - Composição Química das amostras de água (mg L⁻¹).

Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
Estrôncio	0,027	Estrôncio	0,080	Estrôncio	0,032
Cálcio	0,614	Cálcio	33,88	Cálcio	1,450
Potássio	0,500	Potássio	0,684	Potássio	0,190
Sódio	94,10	Sódio	9,170	Sódio	76,31
Vanádio	0,087	Vanádio	0,023	Vanádio	0,310
Sulfato	39,26	Sulfato	2,830	Sulfato	0,400
Carbonato	79,82	Carbonato	-	Carbonato	74,15
Bicarbonato	33,77	Bicarbonato	158,0	Bicarbonato	54,09
Fluoreto	0,450	Fluoreto	0,050	Fluoreto	0,330
Nitrato	0,310	Nitrato	14,76	Nitrato	0,500
Cloretos	0,330	Cloretos	5,00	Cloretos	0,380
Brometo	0,020	Brometo	0,030	Brometo	-
Magnésio	-	Magnésio	11,23	Magnésio	0,070

Uma comparação dos resultados obtidos pelo sistema SIA-UV/Vis e os métodos de referência na determinação de vanádio são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados obtidos na determinação de vanádio pelo sistema SIA-UV/Vis, Espectrofotométrico UV/Vis e ICP-MS para as 3 amostras de água.

Amostra	[vanádio] (mg L ⁻¹)* ± IC					
	SIA-UV/Vis	DPR (%)	Espectrofotometria UV/Vis	DPR (%)	ICP-MS	DPR (%)
1	0,289 ± 0,027	3,74	0,336 ± 0,013	1,51	0,275 ± 0,058	8,43
2	0,088 ± 0,009	4,13	0,087 ± 0,0003	0,16	0,086 ± 0,010	4,78
3	0,023** ± 0,004	7,14	0,026 ± 0,0006	0,97	0,026 ± 0,003	5,13

*Valor Médio ± (IC) Intervalo de confiança. 95% de grau de confiança. t = 4,3. n = 3.

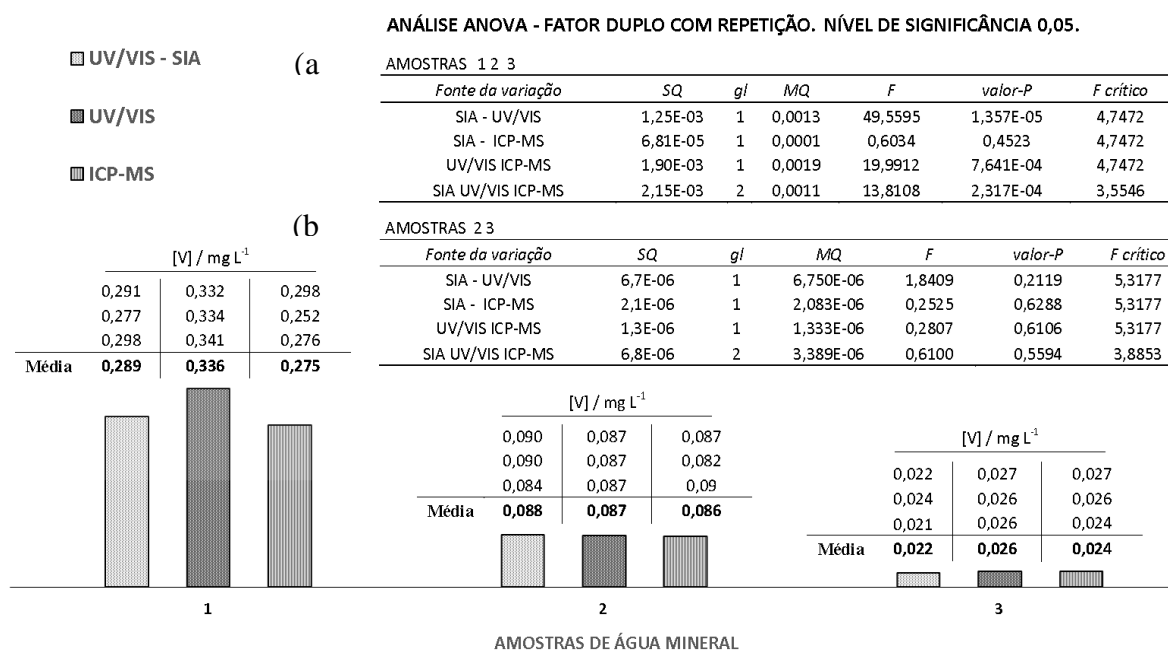
DPR: desvio padrão relativo. n = 3.

** Limite detectado

As amostras 1, 2 e 3 foram diluídas, respectivamente 13, 1,6 e 1,3 vezes para o método espectrofotométrico. Para o ICP-MS a amostra 1 foi diluída 10 vezes, antes da injeção no sistema.

As concentrações de vanádio obtidas para cada réplica nas diferentes técnicas foram submetidas a análise de variância ANOVA fator duplo com repetição, como mostra a Figura 47.

Figura 47 - Análise de Variância (ANOVA), na comparação do sistema SIA-UV/Vis, espectrofotométrico e ICP-MS na determinação de vanádio.



A análise dos resultados para os três métodos através do fator ANOVA, revela que existe diferença significativa entre as médias de tratamento das concentrações para o nível de 5% de significância ($p < 0,05$), fato confirmado pelo valor de $F_{\text{cal}} > F_{\text{crit}}$ (Figura 47 a). A cerca de saber quais dos métodos não mostram correlação, a análise dos fatores realizada de forma isolada, revela que não há evidência da diferença na média dos tratamentos para as 3 amostras entre o sistema SIA-UV/Vis e o ICP-MS para o valor-p $0,45 > 0,05$, assim como mostra o valor de $F_{\text{cal}} (0,60) < F_{\text{crit}} (4,74)$. Para um valor-p $< 0,05$, a ANOVA fator duplo com repetição revela falta de correlação do método espectrofotométrico UV/Vis com o sistema SIA-UV/Vis e o ICP-MS para $F_{\text{cal}} > F_{\text{crit}}$ (Figura 47 a). Para mostrar que esse efeito é causado pela amostra 1 com concentração de $0,336 \text{ mg L}^{-1}$ obtida pelo método espectrofotométrico UV/Vis, a sua remoção da análise ANOVA, ao nível de 5% de significância, mostra que não há evidenciada na falta de correlação entre o sistema SIA-UV/Vis e as técnicas de referência na determinação de vanádio para o valor-p $0,56$. Comparando $F_{\text{cal}} (0,61) < F_{\text{crit}} (3,89)$, também é possível afirmar que não existe diferença na média dos tratamentos para as amostras 2 e 3 entre o sistema SIA-UV/Vis, Espectrofotometria UV/Vis e ICP-MS (Figura 47 b).

6. CONCLUSÕES

A automação do Sistema de Injeção Sequencial (SIA) realizada com plataforma livre, proporcionou versatilidade e baixo custo de implementação. O microcontrolador permitiu o controle da vazão das etapas de aspiração e dispensa da bomba de pistão. O sistema ainda permitiu a escolha e aspiração sequencial das soluções através da comutação das portas da válvula seletora. O emprego de macrocomandos pelo *software* Control-SIA permitiu o acionamento do pistão e das válvulas seletoras possibilitando a execução sequencial das diferentes condições experimentais necessárias para o método cinético. Parada de fluxo, tempo de residência e controle nos tempos de dispensa da mistura, característicos ao sistema SIA, foram realizados com sucesso com elevado grau de confiabilidade e rapidez. Nas melhores condições experimentais obtidas para o sistema desenvolvido, parada de fluxo da mistura e o aumento da temperatura permitiram a aceleração do processo catalítico. Frequência analítica de 19 determinações por hora foram obtidas em condições de não equilíbrio reacional. Seguindo as diretrizes da *Green Analytical Chemistry*, eliminação de mercúrio (II) utilizado no método de batelada para complexar haletos e baixo consumo de reagentes, 100 µL da solução ácida de persulfato de amônio, 50 µL de ácido gálico e apenas 3,35 mL de resíduo gerado, são características do sistema desenvolvido. O baixo volume de reagentes utilizado por análise e a comparação com os métodos de referência confirmam que o sistema SIA-UV/Vis é uma ferramenta adequada para análise química de rotina na determinação de vanádio em água.

A seguir são apresentadas sugestões para o desenvolvimento de trabalhos futuros dentro da mesma linha de pesquisa:

- Aumentar a sensibilidade do método SIA-UV/Vis com o aumento do caminho óptico da cubeta de fluxo;
- Aumentar a frequência analítica com a inclusão de bobinas de reação no sistema;
- Termostatar todo o percurso analítico, uma vez que o método é cinético;
- No método do ácido gálico, estudar outros agentes oxidantes;
- Acoplar ao sistema colunas de pré-concentração ao sistema visando o aumento da sensibilidade do método;

- Aproveitar o sistema SIA desenvolvido em outras aplicações analíticas.

REFERÊNCIAS

ABOUHIAT, F. Z.; HENRÍQUEZ, C.; PALACIO, E.; EL YOUSFIA, F.; CERDÀ, V. Automatic integrated system for catalytic spectrophotometric determination of vanadium in water samples. **Anal. Methods**, v. 6, p. 9142, 2014.

AHMED, M. J.; BANO, S. Spectrophotometric method for determination of vanadium and its application to industrial, environmental, biological and soil samples. **Talanta**, v. 48, p. 1085-1094, 1999.

ALONSO-LOMILLO, M. A.; ALVARADO-GÁMEZ, A. I.; DOMÍNGUEZ-RENEDO, O.; ARCOS-MARTÍNEZ, M. J. Vanadium determination in water using alkaline phosphatase based screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 693, p. 51-55, 2013.

AL-TAYAR, N. G. S.; NAGARAJA, P.; VASANTHA, R. A.; SHRESTA, A. K. A spectrophotometric assay method for vanadium in biological and environmental samples using 2,4-dinitrophenylhydrazine with imipramine hydrochloride. **Environment Monit. Assess**, v. 184, p. 181–191, 2012.

ALBERTÚS, F.; HORSTKOTTE, B.; CLADERA, A.; CERDÀ, V. A robust multisyringe system for process flow analysis Part I. On-line dilution and single point titration of protolytes. **The analyst**, v. 124, p. 1373-138, 1999.

ALEXOVIC, M.; WIECZOREK, M.; KOZAK, J.; KOSCIELNIAK, P.; BALOGH, I. S.; ANDRUCH, V. An automatic, vigorous-injection assisted dispersive liquid–liquid microextraction technique for stopped-flow spectrophotometric detection of boron. **Talanta**, v. 133, p. 127–133, 2015.

ALMEIDA, L. F.; BARRETO, I. S.; ANDRADE, S. I. E.; LIMA, M. B.; SILVA, E. C.; ARAÚJO, M. C. U. A monosegmented flow-batch system for slow reaction kinetics: Spectrophotometric determination of boron in plants. **Talanta**, v. 94, p. 111–115, 2012.

ALMEIDA, L. F.; LIMA, E. A.; LIMA, M. B.; ANDRADE, S. I. E.; BARRETO, I. S.; ARAÚJO, M. C. U.; LIMA, R. A. C. A Micro-Flow-Batch Analyzer Using an In-line Cadmium Sponge Microcolumn for the Photometric Determination of Nitrate and Nitrite in Dairy Samples. **Food Anal. Methods**, v. 7, p. 1925–1931, 2014.

ALVARO-GÁMEZ, A. L.; ALONSO-LOMILLO, M. A.; DOMINGUEZ-RENEADO, O.; ARCOS MARTÍNEZ, M. J. Vanadium determination in water using alkaline phosphatase based screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 693, p. 51–55, 2013.

ANVISA. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a8234b0046e8a3f0a091b341cdd33a01/Portaria+540+-+18+12+2014-+Elementos+dignos+de+nota.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em fevereiro de 2016.

ARANCIBIA, V.; ROJAS-ROMO, C.; MORENO-DA-COSTA, D.; TAPIA, R. A. Highly sensitive determination of vanadium (V) by catalytic adsorptive stripping voltammetry. Substituent effect on sensitivity III. **Sensors and Actuators B**, v. 224, p. 772-779, 2016.

ARAÚJO, M. C. U.; FONSECA, A.; RAIMUNDO JR., I. M.; ROHWEDDER, J. J. R.; LIMA, R. S. A microfluidic device with integrated fluorimetric detection for flow injection analysis. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 396, p. 715–723, 2010.

ARAÚJO, M. C. U.; LIMA, M. B.; BARRETO, I. S.; ANDRADE, S. I. E.; ALMEIDA, L. F. A micro-flow-batch analyzer with solenoid micro-pumps for the photometric Determination of iodate in table salt. **Talanta**, v. 100, p. 308–831, 2012.

ARAÚJO, M. C. U.; DINIZ, P. H. G. D.; ALMEIDA, L. F.; HARDING, D. P. Flow Batch Analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 39-49, 2012.

ARAÚJO, M. C. U.; LIMA, M. B.; ANDRADE, S. I. E.; BARRETO, I. S.; ALMEIDA, L. F. A digital image-based micro-flow-batch analyzer. **Microchemical Journal**, v.106, p. 238–243, 2013.

ARDUÍNO. <http://Arduino.cc/en/Main/Software>. Acessado em fevereiro de 2016.

ARDUÍNO. <http://www.arduino.cc/en/Main/ArduinoBoardMega2560>. Acesso em fevereiro de 2016.

ATTIQ-ur-REHMAN; YAGOOB, M.; WASEEM, A.; NABI, A. **Talanta**, v. 42, p. 1525-32, 1995.

ATSDR (Agency for toxic substances, Disease registration). Toxicological Profile for Vanadium, 2012.

BATISTA, A. D.; CHOCHOLOUS, P.; ŠATÍNSKY, D.; SOLICH, P.; ROCHA, F. R. P. On-line hyphenation of solid-phase extraction to chromatographic separation of sulfonamides with fused-core columns in sequential injection chromatography **Talanta**, v. 133, p. 142–149, 2015.

BEDNAR, A. J. Determination of vanadium by reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta**, v. 78, p. 453–457, 2009.

BERGAMIN F. H.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G. A New Device for Improving sensitivity and stabilization in Flow Injection Analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 97 p. 427-431, 1978.

BERGAMIN F. H.; ZAGATTO, E. A. G.; KRUG, F. J.; REIS, B. F. Merging Zones in Flow Injection Analysis Part 1. Double Proportional Injector and Reagent Consumption. **Analytica Chimica Acta**, v. 101, p. 17-23, 1978.

BERGAMIN F. H.; ZAGATTO, E. A. G.; JACINTHO, A. O.; MORTATTI, J. An improved flow injection determination of nitrite in waters by using intermittent flows. **Analytica Chimica Acta**, v. 120, p. 399-403, 1980.

BERGAMIN F. H.; REIS, B. F.; JACINTHO, A. O.; MORTATTI, J.; KRUG, F. J.; ZAGATTO, E. A. G.; PESSENDA, L. C. R. Zone-sampling processes in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 123, p. 221-228, 1981.

BERTON, P.; MARTINS, E. M.; WUILLOUD, R. G. Development of an on-line temperature-assisted ionic liquid dispersive microextraction system for sensitive determination of vanadium in environmental and biological samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 176, p. 721–728, 2010.

BioChem Valve Inc. (Boonton, EUA) <http://biochemfluidics.com/products/solenoid-operated-micro-pumps>. Acesso em janeiro de 2016

CERDÁ, V.; ALBERTÚS, F.; B. HORSTKOTTE, CLADERA, A. A robust multisyringe system for process flow analysis Part I. On-line dilution and single point titration of protolytes. **Analyst**, v. 124, p. 1373–1381, 1999.

CERDÁ, V. HORSTKOTTE, B.; ELSHOLZ, O. A robust multisyringe system for process flow analysis Part I. On-line dilution and single point titration of protolytes. **J. Flow Injection Anal**, v. 22, p. 99–109, 2005.

CERDÁ, V.; HORSTKOTTE, B.; ELSHOLZ, O. Review on Automation using Multisyringe Flow Injection Analysis. **J. Flow Injection Anal.**, v. 22, p. 99–109, 2005.

CERDÁ, V.; PONS, C. Multicommutated flow techniques for developing analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, Nº. 3, 2006.

CERDÁ, V.; AVIVAR, J.; FERRER, L.; CASAS, M. Fully automated Lab-on-Valve Multisyringe Flow Injection Analysis-ICP-MS System: an effective tool for fast, and sensitive and selective determination of thorium and uranium at environmental levels exploiting solid phase extraction. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 27, p. 327-334, 2012.

CERDÁ, V.; ABOUHIAT, F. Z.; HENRÍQUEZ, C.; PALACIO, E.; EL YOUSFI, F. Automatic integrated system for catalytic spectrophotometric determination of vanadium in water samples. **Anal. Methods**, v. 6, p. 9142 –9151, 2014.

CETESB, FIT (Ficha de Informação Toxicológica), Vanádio e seus Compostos. <http://laboratorios.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/47/2013/11/vanadio.pdf>

CHRISTIAN, G. D. Sequential Injection Analysis for Electrochemical Measurements and Process. **Analysis Analyst**, v. 119, p. 2309-2314, 1994.

CHU, W.; LAU, T. K. ; GRAHAM, N. J. D. The Aqueous Degradation of Butylated Hydroxyanisole by UV/S₂O₈²⁻: Study of Reaction Mechanisms via Dimerization and Mineralization. **Environment Science Technology**, v. 41, p. 613-619, 2007.

CINTAS, P. The Road to chemical names and eponyms: Discovery, priority and credit. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 43, p. 5888-5894, 2004.

CLADERA, A.; GOMEZ, E.; ESTELA, J. M.; CERDÁ, V. Effect of variables influencing $S_{1/2}$ in sequential injection analysis. Extrapolability of $S_{1/2}$ based results between SIA designs. **Talanta**, v. 43, p. 1667-1674, 1996.

CONAMA, 357/2005 <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>, acessado em fevereiro 2016.

CONAMA, 396/2008. <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>

CRANS, D. C.; SMEE, J. J.; GAIDAMAUSKAS, E.; YOUNG, L. The Chemistry and Biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. **Chem. Ver.**, v. 104, p. 849-902, 2004.

EBDON, L.; GARCIA-SANCHEZ, R.; BETTMER, J. Development of a new method for the separation of vanadium species and chloride interference removal using modified silica capillaries-DIN-ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 76, p. 161-171, 2004.

ELOISA, A. P.; KRONKA, M.; REIS, B. F. Multicomutação e Amostragem Binária em Análise Química em Fluxo. Determinação Espectrofotométrica de Ortofosfato em Água Naturais. **Química Nova**, v. 20, p. 372-376, 1997.

EL-SHAHAT, M. F.; MOHAMED, A. A.; MUBARAK, A. T.; FAWY, K. F. Highly sensitive kinetic spectrophotometric determination of vanadium based on the oxidation of 2,3,4-trihydroxybenzoic acid with bromate. **Monatsh Chem.**, v. 143, p. 527-534, 2012.

ENSAFI, A. A.; KAZEMZADEH, A. Determination of Vanadium by Its Catalytic Effect on the Oxidation of Gallocyanine with Spectrophotometric Flow Injection Analysis **Microchem. J.**, v. 53, p. 139–146, 1996.

EPA. <http://www3.epa.gov/>, acessado em fevereiro 2016.

FERREIRA, L. S. C.; FÁBIO, A. C.; WELZ, A. B.; COSTA, A. C. S.; LEPRI, F. G.; VALE, M. G. R. Determination of vanadium in petroleum and petroleum products using atomic spectrometric techniques. **Talanta**, v. 72, p. 349–359, 2007.

FISHMAN, M. J.; SKOUGSTAD, M. W. Catalytic Determination of Vanadium in Water. , **Analytical Chemistry**, v. 36, p. 1643–1646, 1964.

FONSECA, A.; SILVA, J. C. B. A Microflow Analyzer with an Integrated Gas Diffusion Unit. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 24, p. 5-11, 2013.

FUKASAWA, T.; KAWAKUBO, S.; UNNO, A. Flow Injection Espectrometric Determination of Trace Vanadium Based on Catalysis of the Acid Gallic Bromate reaction. **Anal. Chimica Acta.** 1985, v. 183, p. 269-274, 1985.

GAO, J.; ZHANG, X.; YANG, W.; KANG, J. Highly sensitive spectrofluorimetric kinetic determination of ultratrace amounts of vanadium (V) based on the oxidation of 1,8-diaminonaphthalene by bromate. **Analytica Chimica Acta**, v. 455, p. 159–165, 2002.

GARRIBBA, E.; SANNA, G. D.; MICERA, G. Interaction of VO^{2+} Ion and Some Insulin-Enhancing Compounds with Immunoglobulin. **Inorg. Chem.**, v. 50, p. 3717–3728, 2011.

GOC, A. Biological activity of vanadium compounds. **Central European Journal of Biology**, v. 1(3), p. 314–332, 2006.

GOLDFINE, A. B.; SIMONSON, D. C.; FOLLI, F.; PATTI, M.; KAHN, C. R. Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and noninsulin

dependent diabetes mellitus in vivo and in vitro studies. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.**, v. 80, p. 3311–3320, 1995.

GREENWAY, G. M.; WOLFBAUER, G. On-line determination of vanadium by adsorptive stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 312, p. 15-25, 1995.

GÜRKAN, R.; ULUSOY, A. I. A Novel Indicator Reaction for the Catalytic Determination of V(V) at ppb Levels by the Kinetic Spectrophotometric Method. **Ecl. Quím.**, v, 34, p. 49 - 64, 2009.

GUSEVA, N.; MAZUROVA, I.; KHVASCHEVSKAYA, A. The choice of conditions for the determination of vanadium, chromium and arsenic concentration in waters by ICP-MS using collision mode. **Procedia Chemistry**, v. 15, p. 201 – 205, 2015.

HAMEL, F. G.; DUCKWORTH, W. C. The relationship between insulin and vanadium metabolism in insulin target tissues. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.153, p. 95-102, 1995.

HARDWARE USER'S MANUAL FOR THE VERSAPUMP 3, Syringe Dispenser Module, Kloehn Ltd. 10000 Banburry Cross Drive Las Vegas, NV 89144. U.S.A., P/N 23454, Rev. C., 2003.

HE, R. H.; YU, Y. L.; JIANG, Y. Development of a miniature analytical system in a lab-on-valve for determination of trace copper by bead injection spectroscopy. **Talanta**, v. 88, p. 352– 357, 2012.

HERRERA-LÓPEZ, G.; MATEOS, P. J.; RODRIGUEZ, J. C.; VALERO, J.; BAEZA, F.; FEMAT, M.; CAMACHO, R.; SANDOVAL, R. Monitoring Lipase/Esterase Activity by Stopped Flow in a Sequential Injection Analysis System Using p-NitrophenylButyrate. **J. Sensors**, v. 15, p. 2798-2811, 2015.

HEYLIGER, C. E.; TAHILIANI, A. G.; McNEILL, J. H. Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. **Science**, v. 22, p. 1474-1477, 1985.

HOCHENBAUM, J.; NOBLE, J.; EVANS, M. Arduíno em Ação. Editora Novatec, 1^o ed., 2013.

HONORATO, R. S.; ARAÚJO, M. C. U.; LIMA, R. A. C.; ZAGATTO, E. A. G.; LAPA, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C. A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search. **Anal. Chim. Acta**, v. 396, p. 91–97, 1999.

HORSTKOTTE, B.; SRAMKOVÁ, I.; SOLICH, P.; SKLENÁROVÁ, H. Automated in-syringe single-drop head-space micro-extraction applied to the determination of ethanol in wine samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 828, p. 53–60, 2014.

HUANG, F.; WU, F.; QI, Y.; TIAN, S.; HOU, Z. Vanadium Isotope measurement by MC-ICP-MS. **Chemical Geology**, v. 421, p. 17-25, 2016.

IARC. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol86/mono86-10.pdf>., Acessado em dezembro de 2015.

IMITIAZ, M.; RIZWAN, M. S.; XIONG, S.; LI, H.; ASHRAF, M.; SHAHZAD, S. M.; SHAHZAD, M.; RIZWAN, M.; TU, S. Vanadium recente advancements and research prospects: a review. **Environment International**, v. 80, p. 79–88, 2015.

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry Analytical Chemistry. Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods Including Detection and Quantification Capabilities, **Pure and Appl. Chem.**, v. 67, p. 1699-1723, 1995.

JAMES, D. E.; BROWN, R.; NAVARRO, J.; PILCH, P. F. Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. **Nature**, v. 333, p. 183 – 185, 1988.

KAMOGAWA, M. Y.; MIRANDA, J. C. Uso de Hardware de Código Fonte Aberto “Arduíno” para acionamento de dispositivo Solenoide em Sistemas de Análise em Fluxo. **Quim. Nova**, v. 36, p. 1232-1235, 2013.

KEYVANFARD, M. Kinetic-Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Vanadium (V) Based on its Catalytic Effect on the Oxidation of Victoria Blue B by Potassium Bromate in Micellar Medium. **World Applied Sciences Journal**, v. 6, p. 624-629, 2009.

KEYVANFARD, M.; ABEDI, N. Flow-injection spectrophotometric determination of vanadium with malachite green oxalate by bromate in acidic and micellar medium. **Rare Metals**, v. 30, p. 216-221, 2011.

KIM, M. L.; TUDINO, M. B. Non-chromatographic determination of ultratraces of V(V) and V(IV) based on a double column solid phase extraction flow injection system coupled to electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 79, p. 940–946, 2009.

KIMURA, C.B.; REIS, C.G.; FERNANDES, L.C. Efeito do consumo de água rica em sais de vanádio sobre a glicemia de ratos diabéticos. **Estudo biol.**, v. 28, p. 87-96, 2006.

KRUG, F. J.; REIS, B. F.; GINE, M. F.; ZAGATTO, E. A. G. Zone Trapping in Flow Injection Analysis, Spectrophotometric Determination of Low Levels of Ammonium Ion in Natural Waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 151, p. 39-48, 1983.

KUMAR, R. K.; REDDY, K. V. K.; YAMINI, P.; VENKATESWARLU, P. Spectrophotometric method for determination of vanadium and its application to environmental and biological samples. **International Journal of Chemical Engineering and Applied Sciences**, v. 2, p. 1-5, 2012.

LAPA, R.A.S.; LIMA, J.L.F.C.; REIS, F. B.; SANTOS, J. L. M.; ZAGATTO, E. A. G. Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. **Analytica Chimica Acta**, v. 466, p. 125-132, 2002.

LARSON, J. W. Thermochemistry of Vanadium (5+) in Aqueous Solutions. **J. Chem. Eng.**, v. 40, p. 1276-1280, 1995.

LEE, N. Y.; WU, W.; TRINH, K. T. L. Hand-held syringe as a portable plastic pump for on-chip continuous-flow PCR: miniaturization of sample injection device. **Analyst**, v. 137, p. 983-990, 2012.

LEE, N. Y.; WU, W. Two-layer microdevice for parallel flow-through PCRs employing plastic syringes for semi-automated sample injection and a single heater for amplification: toward process simplification and system miniaturization. **Sensors and Actuators B**, v. 181, p. 756-765, 2013.

LI, L.; HU, B. Hollow-fibre liquid phase microextraction for separation and preconcentration of vanadium species in natural waters and their determination by electrothermal vaporization-ICP-OES. **Talanta**, v. 72, p. 472–479, 2007.

LIMA, J. L. F. C.; SANTOS, J. L. M.; DIAS, A. C. B.; RIBEIRO, M. F. T., ZAGATTO, E. A. G. Multi-pumping flow systems: an automation tool. **Talanta**, v. 64, p. 1091–1098, 2004.

LIMA, J. L. F. C.; ABREU, V. L. R. G.; SANTOS, J. L. M. An Automated Single Interface Flow System for the Spectrophotometric Determination of Ethanol in Beverages Based on Schlieren Effect. **Food Anal. Methods**, v. 5, p. 867–873, 2012.

LIN, T. S.; CHANG, C. J.; SHENG, F. M. Whole blood vanadium in taiwaneise college students. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, v. 73, p. 781-786, 2004.

LIU, H.; JIANG, S. Determination of vanadium in water samples by reaction cell inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry. **JAAS**, v. 17, p. 556 – 559, 2002.

MACHACKOVA, L.; ZEMBERYOVA, M. Utilisation of solid phase extraction procedures for preconcentration and determination of vanadium and chromium in various types of water samples by atomic absorption spectrometry. **Int. J. Environ. Anal. Chem.**, v. 89, p. 705-715, 2009.

MARQUES, E. P.; LUZ, R. C. S.; SILVA, L. M. S.; LOPES, G. S.; MARQUES, A. B. M. Determinação de vanádio em óleo diesel por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS). **Revista Analytica**, v.7, p. 48-56, 2003.

MARTÍN-CAMEÁN, A.; JOS, A.; CALLEJA, A.; GIL, F.; IGLESIAS, A.; SOLANO, E.; CAMEÁN, A. M. Validation of a method to quantify titanium, vanadium and zirconium in oral mucosa cells by inductively coupled plasma-mass spectrometry(ICP-MS). **Talanta**, v. 118, p. 238–244, 2014.

MASINI, J. C. Demonstrando os fundamentos, potencialidades e limitações da Análise por Injeção Sequencial. **Quim. Nova**, v. 31, p. 704-708, 2008.

MASINI, J. C.; SANTOS, A.C.V. A Análise por Injeção Sequencial (SIA): vinte anos em uma perspectiva. **Quim. Nova**, v. 33, p. 1949-1956, 2010.

MASTERALO, V. R.; VIEIRA, N. C. S.; AVANSI JR., W.; FIGUEIREDO, A.; ZUCOLOTTI, V. Potentiometric detection of chemical species by spin-assisted assembly of vanadium pentoxide nanorods. **Sensors and Actuators B**, v. 229, p. 461-465, 2016.

MASTOI, G.M.; KHUHAWAR, M.Y. Kinetic Spectrophotometric Determination of Vanadium (V) Using Ponceau S. **Eurasian Journal of Analytical Chemistry**. v. 2, p. 68-76, 2007.

McCALLUM, J. E. B.; MADISON, S. A.; ALKAN, S.; PINTO, R. L.; WAHL, R. U. R. Analytical studies on the oxidative degradation of the reactive textile dye Uniblue A. **Environ.Sci.Technol.**, v. 34, p. 5157-5164, 2000.

McCANN, N.; WAGNER, M.; HASSE, H. A thermodynamic model for vanadate in aqueous solution-equilibria and reaction enthalpies. **Dalton Trans.**, v. 42, p. 2622, 2013.

McROBERTS, M. Arduíno Básico. Editora Novatec, 1º ed., 2011.

Ministério da Saúde, Portaria N°2914.
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html

MIRÓ, M.; OLIVEIRA, H. M.; SEGUNDO, M. A. Analytical potential of mesofluidic lab-on-a-valve as a front end to column-separation systems. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 153-164, 2011.

MIRÓ, M.; HANSEN, E. H. Recent advances and future prospects of mesofluidic Lab-on-a-Valve platforms in analytical sciences – A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 750, p. 3-15, 2012.

MOHAMED, A. A.; MUBARAK, A. T.; FAWY, K. F.; EL-SHAHAT, M. F. Highly sensitive kinetic spectrophotometric determination of vanadium based on the oxidation of 2,3,4-trihydroxybenzoic acid with bromate. **Monatsh Chem.**, v. 143, p. 527–534, 2012.

MORGAN, J. D.; LUSVARDI, K. M.; KALER, E. W. Kinetics and mechanism of microemulsion polymerization of hexyl methacrylate. **Macromolecules**, v.30, p. 1897-1905, 1997

MOUSER, J. New drugs for management of diabetes: insulin analogues, inhaled insulin, pramlintide, and novel peptides. **Nutritional in Clinical Practice**, v.19, p.172-180, 2004.

MOYANO, S.; POLLA, G.; SMICHOWSKI, P.; GÁSQUEZ, J. A.; MARTINEZ, L. D. J. On-line preconcentration and determination of vanadium in tap and river water samples by flow injection-inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (FI-ICP-OES). **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 21, p. 422–426, 2006.

NAKANO, S.; TAGO, M.; KAWASHIMA, T. Catalytic Determination of Nanogram Amounts Natural Water by Flow Injection Analysis. **Analytical Science**, v. 5, p. 69-72, 1989.

NAKANO, S.; TANAKA, E.; MIZUTANI, Y. Flow-injection spectrophotometry of vanadium by catalysis of the bromate oxidation of N,N'-bis(2-hydroxyl-3-sulfopropyl)-Tolidine. **Talanta**, v. 61, p. 203-210, 2003.

NARAYANA, S. L.; REDDY, K. J.; REDDY, S. A. D.; SARALA, Y.; REDDY, A. V. A highly sensitive spectrophotometric determination of micro amounts of vanadium(V) in environmental and alloy samples by using 3, 4-dihydroxybenzaldehydeisonicotinoylhydrazone (3,4-DHBINH). **Environ Monit Assess**, v. 144, p. 341–349, 2008.

NARAYANA, B.; SUNIL, K. Facile and Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Vanadium. . **Eurasian J. Anal. Chem.**, v.4, p. 141-151, 2009

NRResearch Inc. (West Caldwell, USA)
<http://datasheets.globalspec.com/ds/1412/NeptuneResearch>. Acesso em fevereiro de 2016

OEHHA. <http://oehha.ca.gov/water/pals/vanadium.html>. Acessado em janeiro de 2016.

OGUMA, K.; YOSHIOKA, O.; NORO, J.; SAKURAI, H. Simultaneous determination of vanadium(IV) and vanadium(V) by flow injection analysis using kinetic spectrophotometry with Xylenol Orange. **Talanta**, v. 96, p. 44 – 49, 2012.

ORVIG, C.; THOMPSON, K. H.; MCNEILL, J. H. Vanadium Compounds as Insulin Mimics. **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2561–2571, 1999.

ORVIG, C.; THOMPSON, K. H. Vanadium in diabetes: 100 years from phase 0 to phase I. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, p. 1925-1935, 2006.

ORVIG, C.; THOMPSON, K. H.; LICHTER, J.; LeBEL, C.; SCAIFE, M. C.; McNEILL, J. H. Vanadium treatment of type 2 diabetes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 554-558, 2009.

PALEOLOGOS, E. K.; KOUPPARIS, M. A.; KARAYANNIS, M. I.; VELTSISTAS, P. G. Nonaqueous Catalytic Fluorometric Trace Determination of Vanadium Based on the Pyronine B–Hydrogen Peroxide Reaction and Flow Injection after Cloud Point Extraction, **Anal. Chem.**, v. 73, p. 4428-4433, 2001.

PALEOLOGOS, E. K.; GIOKAS, D. L.; TZOUWARA-KARAYANNI, S. M.; KARAYANNIS, M. I. Spectrofluorometric Determination of Vanadium Based on the Formation of a Ternary Complex between Vanadium, Peroxides, and 2- α -Pyridylthioquinaldinamide. Application to the Determination of Hydrogen Peroxide and Peroxy Acids. **Anal. Chem.**, v. 74, p. 100-106. 2002,

PASQUINI, C.; OLIVEIRA, W. A. Monosegmented System for Continuous Flow Analysis. Spectrophotometric Determination of Chromium(VI), Ammonia, and Phosphorus **Anal. Chem.**, v. 57, p. 2575-2579, 1985.

PATEL, B.; HASWELL, S. J.; GRZESKOWIAK, R. Flow injection flame atomic absorption spectrometry system for the pre-concentration of vanadium(V) and characterisation of vanadium(IV) and -(V) species. **J. Anal. Atomic. Spectrometry**, v. 4, p. 195-198, 1989.

PÉREZ-RUIZ, T; MARTINEZ-LOZANO, C.; TOMÁS, V.; PAREDES, C. Flow-Injection Spectrophotometric Determination of Molybdenum and Vanadium with Carminic Acid in the Presence of CetyltrimethylammoniumBromide. **Mikrochim. Acta**, v. 118, p. 203-211, 1995.

PESSOA, J. C.; ETCHEVERRY, S.; GAMBINO, D. Vanadium compounds in medicine. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 301, p. 24-48, 2015.

PESSOA, J. C. Thirty years through vanadium chemistry. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 147, p. 4–24, 2015.

PINTO, J. J.; GARCÍA-VARGAS, M.; MORENO, C. A bulk liquid membrane–flow injection (BLM–FI) coupled system for the preconcentration and determination of vanadium in saline waters. **Talanta**, v. 103, p. 161–165, 2013.

PRADANA, J. A.; ALEGRIA, J. S. D.; FERNANDEZ, H. P.; SIERRA, N. A. Chemiluminescent determination of vanadium(IV) using a cinchomeric hydrazide–H₂O₂ system and flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**. 2005, 536, 115–119.

PREET, A.; GUPTA, B. L.; YADAVA, P. K.; BAQUER, N. Z. Efficacy of lower doses of vanadium in restoring altered glucose metabolism and antioxidant status in diabetic rat lenses. **Journal of Biosciences**, v. 30, p. 221-230, 2005.

PYRZYNSKA, K.; WIERZBICK, T. Review Determination of vanadium species in environmental samples. *Talanta*, v. 64, p. 823–829, 2004.

QIN, W.; ZHANG, Z.; ZHANG, C. Chemiluminescence flow system for vanadium(V) with immobilized reagents. **Analyst**, p. 685-688, 1997.

QUEZADA, A.; OHARA, K.; MARNWONG, N. R.; NACAPRICHA, D.; MURAKAMI, H.; TESHIMA, S. Stopped-in-loop flow analysis system for successive determination of trace vanadium and iron in drinking water using their catalytic reactions. **Talanta**, v. 144, p. 844–850, 2015.

RAGOLIA, L.; BEGUM, N. Protein phosphatase-1 and insulin action. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 182, p. 49–58, 1998.

RAMA, R. M. J.; MEDINA, R. A.; DÍAZ, M. A. A flow-injection renewable surface sensor for the fluorimetric determination of vanadium(V) with Alizarin Red S. **Talanta**, v. 66, p. 1333–1339, 2005.

REHDER, D. The potential of vanadium in medicinal applications. **Future Med. Chem.**, v. 4, p. 1823–1837, 2012.

REHDER, D. The role of vanadium in biology. **The Royal Society of Chemistry**, v. 7, p. 730-742, 2015.

REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; GINÉ, M. F.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. Multicommutation in flow analysis . Part 1 . Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests.

Anal. Chim. Acta, v. 293, p. 129-138, 1994.

REIS, B. F. Análise Química por Injeção em Fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Quim. Nova**, v. 19, p. 51-58, 1995.

REIS, B. F. Pré-concentração empregando extração fase líquida-fase sólida em sistemas de análise em fluxo com detecção espectrofotométrica. **Química Nova**, v. 19, p. 623-635, 1996.

REIS, B. F.; KRONKA, E. A. M. multicomutação e amostragem binária em análise química em fluxo. Determinação espectrofotométrica de ortofosfato em águas naturais. **Química Nova**, v. 20, p. 371-376, 1997.

REIS, B. F.; DIAS, T. R.; ROHWEDDER, J. J. R.; BRASIL, M. A. S.; Development of a high sensitivity photometric procedure for the determination of vanadium in mineral and fresh waters employing a downsized multicommutated flow analysis approach. **Analytical Methods**, v. 6, p. 9667–9674, 2014.

RIBEIRO, M. F. T.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C.; DIAS, A. C. B.; ZAGATTO, E. A. G. Single reaction interface in flow analysis. **Talanta**, v. 68, p. 351–358, 2005.

ROCHA, F. R. P. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV/Vis. **Quim. Nova**, v, 27, p. 807-812, 2004.

ROCHA, F. R. P.; MELCHERT, W. R.; REIS, F. B. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 714, p. 8-19, 2012.

RODRIGUEZ-MERCADO, J. J.; ALTAMIRANO-LOZANO, M. A. Vanádio: Contaminación, Metabolismo y genotoxicidad. **Rev. Int. Contam. Ambient.**, v. 22, p. 173-189, 2006.

ROJAS-ROMO, C.; ARANCIBIA, V.; MORENO-da-COSTA, D.; TAPIA, R. A. Highly sensitive determination of vanadium (V) by catalytic adsorptive stripping voltammetry. Substituent effect on sensitivity III. **Sensors and Actuators B**, v. 224, p. 772–779, 2016.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow Injection Analysis Part I: A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, p. 145-157, 1975.

RUZICKA, J.; STEWART, J. W. B. Flow Injection Analysis Part II: Ultrafast Determination of Phosphorus in Plant Material by Continuous Flow Spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 79, p. 79-91, 1975.

RUZICKA, J.; SEWART, J. W. B.; BERGMIN, F. H.; ZAGATTO, E. A. Flow Injection Analysis Part III. Comparison of Continuous Flow Spectrometry and Potenciometry for the rapid determination of the total Nitrogen content in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 81, p. 371-386, 1976.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H.; MOSBAEK, H.; KRUG, F. Exchange of Comments: Pumping Pressure and Reagent Consumption in Flow Injection Analysis. **J. Anal. Chem.**, v. 49, p. 1858-1861, 1977.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow Injection Analysis. Principles, Applications and Trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 114, p. 19-44, 1980.

RUZICKA, J., HANSEN, E. H., Flow Injection Analysis, Wiley-Interscience, New York, 2^o ed., 1988.

RUZICKA, J.; MARSHALL, G. D. Sequential injection : a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. **Anal. Chim. Acta**, v. 237, p. 329-343, 1990.

RUZICKA, J.; GUBELLI, T.; CHRISTIAN, G. D. Fundamentals of Sinusoidal Flow Sequential Injection Spectrophotometry. **Anal. Chem.**, v. 63, p. 2407-2413, 1991.

RUZICKA, J.; GUBELI, T. Principles of Stopped-Flow Sequential Injection Analysis and Its Application to the Kinetic Determination of Traces of a Proteolytic Enzyme. **Anal. Chem.**, v. 63, p. 1680-1685, 1991.

RUZICKA, J. Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection. **Analyst**, v. 125, p. 1053–1060, 2000.

SANTOS, J. L. M.; SILVESTRE, C. I. C.; LIMA, J. L. F. C.; ZAGATTO, E. A. G. Single reaction interface flow system for chemiluminescent monitoring of mannitol based on its hydroxyl radical scavenger activity. **Talanta**, v. 77, p. 518–521, 2008.

SANTOS, J. L. M.; SILVESTRE, C. I. C.; RODRIGUES, S.; LIMA, J. L. F. C.; ZAGATTO, E. A. G. Exploitation of a single interface flow system for on-line aqueous biphasic extraction. **Talanta**, v. 81, p. 1847–1851, 2010.

SASAKI, M. K.; VICENTE, S.; GRASSI, V.; ZAGATTO, E. A. G. Differential Reaction-Rate Methods in Flow Analysis. **The Open Analytical Chemistry Journal**, v. 6, p. 28-38, 2012.

SEMIZ, S.; ORVIG, C.; MCNEILL, J. H. Effects of diabetes, vanadium, and insulin on glycogen synthase activation in Wistar rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 231, p. 23–35, 2002.

SHIOBARA, T.; TESHIMA, N.; KURIHARA, M.; NAKANO, S.; KAWASHIMA, T. **Analytical Science**, v. 17, p. 769-842, 2001.

SILVA, E. S.; PINTO, P. C. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LÚCIA, M. F. S. Saraiva. Sequential injection spectrophotometric determination of V(V) in environmental polluted waters. **Water SA**, v. 35, p. 283-287, 2009.

SKEGGS, L. T. An automatic method for colometric analysis. **Amer.J.Clin. Pathol.**, v. 38, p. 311, 1957.

SKEGGS, L. T. Persistence...and Prayer: From the Artificial Kidney to the AutoAnalyzer. **Clin. Chem**, v. 46, p. 1425-1436, 2000.

SOYLAK, M.; WADHWA, S. K.; TUZEN, M.; KAZI, T. G. Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometric Detection of Vanadium in water and food samples after Solid Phase Extraction on Multiwalled Carbon Nanotubes. **Talanta**, v. 116, p. 205-209, 2013.

SRIVASTAVA, A. K. Anti-diabetic and toxic effects of vanadium compounds. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 206, p. 177-182, 2000.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 21^o ed., 3:100, 2005.

SWETHA, M; REDDY, P.R.; REDDY, V.K. Direct, derivative spectrophotometric determination of micro amounts of Vanadium (V) by 5-bromo salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (5-BrSAINH). **International Journal of ChemTech Research**, v. 5, p. 2322-2328, 2013.

TESHIMA, N.; QUEZADA, A. A.; OHARA, K.; RATANAWIMARNWONG, N.; NACAPRICHA, D.; MURAKAMI, H.; SAKAI, T. Stopped-in-Loop flow system for successive determination of trace vanadium and iron in drinking water using their catalytic reactions. **Talanta**, v. 144, p. 844–850, 2015.

THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. Vanadium in diabetes: 100 years from phase 0 to phase 1. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, p. 1925-1935, 2006.

THOMPSON, K. H.; LICHTER, J.; LeBEL, C.; SCAIFE, M. C.; McNEILL, J. H.; ORVIG, C. Vanadium treatment of type 2 diabetes: a view to the future. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 554–558, 2009.

TODA, K.; EBISU, Y.; HIROTA, K.; OHIRA, S. I. Membrane-based microchannel device for continuous quantitative extraction of dissolved free sulfide from water and from oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 741, p. 38-46, 2012.

TU, S.; IMTIAZ, M.; RIZWAN, M. S.; XIONG, S.; LI, H.; ASHRAF, M.; SHAHZAD, S. M.; SHAZHAD, M.; RIZWAN, M. Vanadium recent advancements and research projects: A Review. **Environment International**, v. 80, p. 79-88, 2015.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Toxicological Profile for Vanadium . **Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, 2012. <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp58.pdf>.

van STADEN, J. F.; TAYLOR, M. J. C.; MARSHALL, G. D.; WILLIAMS, S. J. S.; SALING, C. The determination of vanadium(V) in the presence of vanadium(IV) using 4-(2-pyridylazo)resorcinol in a flow-injection manifold. **Analytica Chimica Acta**, v. 329, p. 275-284, 1996.

van STADEN, J. C.; du PLESSIS, H.; TALJAARD, R. E. Determination of iron (III) in pharmaceutical samples using dialysis in a sequential injection analysis system. **Analytica Chimica Acta**, v. 357, p. 141-149, 1997.

van STADEN, J. F.; du PLESSIS, H.; LINSKY, S. M.; TALJAARD, R. E.; KREMER, B. Influence of different volume ratios on the isodispersion point in sequential injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 354, p. 59-64, 1997.

VENKATARAMAN, B.V.; SUDHA, S. Vanadium toxicity. **Asian J. Exp. Sci.**, v.19, p. 127-134, 2005.

ZAGATTO, E. A. G.; DIAS, A. C. B.; BORGES, E. P.; WORSFOLD, P. J. A critical examination of the components of the Schlieren effect in flow analysis. **Talanta**, v. 68, p. 1076, 2006.

ZAGATTO, E. A. G.; SANTOS, J. L. M.; RIBEIRO, M. F. T.; DIAS, A. C. B.; LIMA, J. L. F. C. Multi-pumping flow systems: The potential of simplicity. **Analytica Chimica Acta**, v. 600, p. 21–28, 2007.

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

ZAGATTO, E. A. G.; SASAKI, M. K.; VICENTE, S.; GRASSI, V. Differential Reaction-Rate Methods in Flow Analysis. **The Open Analytical Chemistry Journal**, v. 6, p. 28-38, 2012.

ZAGATTO, E. A. G.; BATISTA, A. D.; SASAKI, M. K.; ROCHA, F. R. P. Flow analysis in Brazil: contributions over the last four decades. **Analyst**, v. 139, p. 3666–3682, 2014.

WEI, Y.; ZHANG, C.; ZHAO, P.; YANG, X.; WANG, K. A new salicylic acid-derivatized kojic acid vanadyl complex: Synthesis, characterization and anti-diabetic therapeutic potential. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 105, p.1081–1085, 2011.

WADHWA, S. K.; TUZEN, M.; KAZI, T. G.; SOYLAK, M. Graphite furnace atomic absorption spectrometric detection of vanadium in water and food samples after solid phase extraction on multiwalled carbon nanotubes. **Talanta**, v.116, p. 205–209, 2013.

WASEEM, A., YAGOOB, M., NABI, A. Flow-injection Determination of Vanadium in seawater samples with acidic Potassium Permanganate hemiluminescence. **Analytical Sciences**, v. 26, p. 355-360, 2010.

WEIGUO, Q. Determination of Trace Vanadium in Water by a Modified Catalytic-P hotometric Method. **Analytical Chemistry**, v. 55, p. 2043-2047, 1983.

WHO (World Health Organization), Concise International Chemical Assessment Document 29 2001, Geneva.

WUILLOUD, R. G.; SALONIA, J. A.; GÁSQUEZ, J. A.; OLSINA, R. A.; MARTINEZ, L. D. On-line pre-concentration system for vanadium determination in drinking water using flow injection-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 420, p. 73–79, 2000.

WUILLOUD, R. G.; SALONIA, J. A.; OLSINA, R. A.; MARTINEZ, L. D.. Determination of vanadium V in drinking water by flow injection and pre-concentration in a knotted reactor by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with ultrasonic nebulization. ***Spectrochimica Acta PartB***, v. 55, p. 671-680, 2000.

WUILLOUD, R. G.; WUILLOUD, J. C.; OLSINA, R. A.; MARTINEZ, L. D.. Speciation and preconcentration of vanadium(V) and vanadium(IV) in water samples by flow injection-inductively coupled plasma optical emission spectrometry and ultrasonic nebulization. ***Analyst***, v. 126, p. 715–719, 2001.

WUILLOUD, G. M.; WUILLOUD, J. C. A.; WUILLOUD, R. G.; SILVA, M. F.; OLSINA, R. A.; MARTINEZ, L. D. Cloud point extraction of vanadium in parenteral solutions using a nonionic surfactant (PONPE 5.0) and determination by flow injection-inductively coupled plasma optical emission spectrometry. ***Talanta***, v. 58, p. 619-627, 2002.

XIONG, C.; QIN, Y.; SUZUKI, M. On-line separation/preconcentration of V(IV)/V(V) in environmental water samples with CTAB-modified alkyl silica microcolumn and their determination by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. ***J. Hazard. Mater***, v. 178, p. 164–170, 2010

YAMANE, T.; OSADA, Y.; SUZUKI, M. Continuous flow system for the determination of trace vanadium in natural waters utilizing in-line preconcentration/separation coupled with catalytic photometric detection. ***Talanta***, v. 45, p. 583-589, 1998.

YUEN, V. G.; ORVIG, C. THOMPSON, K. H.; McNEILL, J. H. Improvement in cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats following chronic oral administration of bis(maltolato)oxovanadium(IV). ***C. J Physiol Pharmacol.***, v. 71, p. 270-276, 1993.