UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

FRACIONAMENTO DE FÓSFORO EM PLANTAS EMPREGANDO
DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE AMOSTRAS E SISTEMAS
DE ANÁLISE EM FLUXO MONOSSEGMENTADO

Andréa Keller Maruchi

Dissertação de Mestrado

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha

SÃO PAULO, 01/09/2005

Dedico este trabalho aos meus pais Paulo e Nazarete que sem eles não conseguiria realizar este trabalho. A distância entre nós este tempo foi imensa, mas o amor recíproco me fortalecia para o cumprimento desta etapa.

Agradeço de coração Rosana, Ademir e meu namorado Renato por fazer parte da minha vida me apoiando em todos os momentos.

Agradeço principalmente Deus pelas graças alcançadas!!!!

As minhas queridas: Wanessa, Patrícia e Débora

Um dia a maioria de nós irá se separar. Sentiremos saudades de todas as conversas jogadas fora, as descobertas que fizemos, dos sonhos que tivemos, dos tantos risos e momentos que compartilhamos.

Saudades até dos momentos de lágrima, da angústia, das vésperas de finais de semana, de finais de ano, enfim... do companheirismo vivido.

Sempre pensei que as amizades continuassem para sempre. Hoje não tenho mais tanta certeza disso. Em breve cada um vai pra seu lado, seja pelo destino, ou por algum desentendimento, segue a sua vida, talvez continuemos a nos encontrar quem sabe..... nos e-mails trocados. Podemos nos telefonar conversar algumas bobagens....

Aí os dias vão passar, meses...anos... até este contato tornar-se cada vez mais raro.

Vamos nos perder no tempo....Um dia nossos filhos verão aquelas fotografias e perguntarão : Quem são aquelas pessoas?

Diremos que eram nossos amigos. E..... isso vai doer tanto! Foram meus amigos, foi com eles que vivi os melhores anos de minha vida!

A saudade vai apertar bem dentro do peito. Vai dar uma vontade de ligar, ouvir aquelas vozes novamente.....

Quando o nosso grupo estiver incompleto... nos reuniremos para um ultimo adeus de um amigo. E entre lágrimas nos abraçaremos. Faremos promessas de nos encontrar mais vezes daquele dia em diante. Por fim, cada um vai para o seu lado para continuar a viver a sua vidinha isolada do passado. E nos perderemos no tempo.....

Por isso, fica aqui um pedido deste humilde amigo : não deixes que a vida passe em branco, e que pequenas adversidades seja a causa de grandes tempestades....

Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!"

(Fernando Pessoa)

Vocês moram no meu coração!!!!

Ao Professor Fábio

Sou grata pela dedicação, paciência e amizade. Sei que graças a você é que pude aprimorar, e ter subsídios para escolher meu caminho com segurança. É verdade que às vezes nossas opiniões divergiam, mas até neste momento, desfrutava do seu conhecimento tendo a chance de olhar a vida sobre um novo horizonte.

Professor seu ofício é dos mais dignos e por isso eu lhe admiro. E desejo que não lhe falte forças para prosseguir nessa sua jornada. Que todo seu esforço seja recompensado com muita alegria.

Muito obrigado!!!

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Pedro V. Oliveira pelo empréstimo do forno microondas e pelas sugestões que ajudaram a melhorar este trabalho.
- Ao Prof. Dr. Renato S. Freire pelo empréstimo da lâmpada de vapor de mercúrio e ao Thiago pela ajuda nos experimentos.
- Ao Prof. Dr. Andrea Cavicchioli pelo empréstimo do reator de fotodegradação.
- À Prof. Dra. Elizabeth de Oliveira e ao Prof. Dr. Pedro V. Oliveira pelo auxílio nas medidas por ICP-OES.
- À Tatiane Marsola pela amostras cedidas.
- Ao meu querido Angerson pela paciência e por todos os dias que me auxiliou.
- Aos meus amigos de outros laboratórios pelos momentos de alegrias e descontrações.
- Aos funcionários da secretaria de Pós-graduação da química.
- Aos colegas do laboratório de pesquisa Mariana, Maurício, Carlos, Sidnei, Pedro e Grazielle pelas opiniões dadas e pelas muitas risadas que demos.
- Ao CNPq pela bolsa concedida.
- Ao Instituto de química pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.
- A todos aqueles que fizeram parte da minha vida nestes dois anos, rindo ou chorando.

MUITÍSSIMO OBRIGADO!!!

Lista de abreviaturas

A – amostra

AAS – espectrometria de absorção atômica (do inglês *atomic absorption spectrometry*)

Abs - absorbância

ATP – adenosina trifosfato

B – reator helicoidal

C – carregador (transportador)

Col – reator contendo enzima imobilizada

D – detector

DNA – ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

FIA – análise por injeção em fluxo (do inglês *flow injection analysis*)

GC – cromatografia gasosa (do inglês *gas chromatography*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *high performance liquid chromatography*)

ICP OES – espectrometria de emissão ótica em plasma indutivamente acoplado (do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)

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

Ks – constante de solubilidade

LED – diodo emissor de luz (do inglês *light emitting diode*)

MS – espectrometria de massas (do inglês *mass spectrometry*)

MSFA – análise em fluxo monossegmentado (do inglês *monosegmented flow analysis*)

P – bomba peristáltica

PFA – perfluoroalcoxialcano (do inglês *perfluoroalkoxy*)

Pi – fósforo inorgânico

Po – fósforo orgânico

Pts – fósforo total solúvel

PVC – cloreto de polivinila (do inglês *polyvinyl chloride*)

R – reagente

r – coeficiente de correlação

RNA – ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*)

SIA – análise por injeção seqüencial (do inglês *sequential injection analysis*)

t – tempo

t_R : tempo de residência

t_L : tempo de limpeza

UV – radiação ultravioleta

X e Y – Pontos de confluência

V – válvula solenóide

W – recipiente de descarte

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - Composição química de uma planta da leguminosa <i>Crotalaria Juncea</i>	13
Tabela 2.1 - Seqüência de acionamento das válvulas solenóides para implementação de análises em fluxo monossegmentado com multicomutação..	22
Tabela 2.2 - Programa empregado na decomposição de material vegetal assistida por microondas, com controle de potência.....	26
Tabela 2.3 - Programa empregado na decomposição de material vegetal assistida por microondas, com controle de temperatura.....	27
Tabela 2.4 - Avaliação preliminar da fotodegradação empregando radiação UV.....	30
Tabela 2.5 - Parâmetros instrumentais para determinação de Ca, Mg e P por ICP-OES.....	32
Tabela 3.1 - Variação da proporção dos reagentes no monossegmento de acordo com o tempo de acionamento das válvulas.....	37
Tabela 3.2 - Avaliação de diferentes condições para decomposição do material vegetal.....	43
Tabela 3.3 - Concentrações de fósforo total encontradas em crotalária após digestão assistida por microondas com adição de 0,50 ou 1,0 mL de HNO ₃	45
Tabela 3.4 - Concentrações de fósforo total determinadas em crotalária empregando MSFA e ICP–OES.....	46
Tabela 3.5 - Diferença dos resultados obtidos na determinação de fósforo	

empregando os procedimentos por ICP–OES e MSFA.....	47
Tabela 3.6 - Determinação de Ca e Mg na planta <i>Crotalaria juncea</i> por ICP – OES em dois meios diferentes.....	51
Tabela 3.7 - Dados referentes à determinação de fósforo total solúvel empregando fotodegradação utilizando uma lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão posicionada horizontalmente.....	54
Tabela 3.8 - Dados referentes à fotodegradação do fósforo orgânico solúvel utilizando uma lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão posicionada verticalmente.....	54
Tabela 3.9 - Frações de fósforo determinadas pelos procedimentos estudados neste trabalho.....	55

Listas de Figuras

Figura 1.1 - Elementos mais investigados em estudos de especiação química empregando análises por injeção em fluxo.....	2
Figura 1.2 - Amostras mais analisadas em estudos de especiação química empregando análises por injeção em fluxo.....	2
Figura 1.3 - Possíveis alterações no sistema de análises em fluxo para especiação química.....	3
Figura 1.4 - Sistema de análises por injeção em fluxo empregado na especiação de nitrogênio.....	5
Figura 1.5 - Sistema de análises em fluxo empregado na especiação de colesterol.....	7
Figura 1.6 - Celas de fluxo conectadas em série em um espectrofotômetro de feixe simples.....	8
Figura 1.7 - Esquema do procedimento para fracionamento de fósforo em tecidos de planta segundo Hogue et al.....	10
Figura 1.8 - Esquema para fracionamento de fósforo em tecidos de planta segundo Furtini Neto et al.....	11
Figura 1.9 - Plantação de <i>Crotalaria uncea</i>	14
Figura 1.10 - Influência da acidez da amostra na velocidade de formação do azul de molibdênio.	16
Figura 1.11 - Representação de um monossegmento.....	18

Figura 2.1 - Diagrama de fluxos para implementação de análises em fluxo monossegmentado com multicomutação.....	22
Figura 2.2 - Formulário para entrada de variáveis e saída de dados do programa desenvolvido para controle dos dispositivos de comutação e aquisição de dados do sistema MSFA.....	24
Figura 2.3 - Representação da inserção da amostra e dos reagentes empregando 1 e 2 ciclos de amostragem.....	25
Figura 2.4 - Foto-reator empregado na degradação do fósforo orgânico.....	29
Figura 2.5 - Posição (horizontal) da lâmpada de vapor de mercúrio para a fotodegradação do fósforo orgânico no extrato solúvel.....	31
Figura 2.6 - Posição (vertical) da lâmpada de vapor de mercúrio para a fotodegradação do fósforo orgânico no extrato solúvel.....	31
Figura 3.1 - Esquema do sinal transiente gerado pelo sistema de análises em fluxo monossegmentado.....	34
Figura 3.2 - Efeito da variação da vazão de aspiração sobre o sinal analítico.....	35
Figura 3.3 - Efeito da variação do volume das bolhas de ar sobre o sinal analítico.....	36
Figura 3.4 - Sinais de absorbância obtidos para diferentes volumes de reagentes.....	38
Figura 3.5 - Efeito do número de ciclos de amostragem na sensibilidade para determinação de fosfato.....	39
Figura 3.6 - Efeito da acidez na determinação de fosfato empregando ácido	

ascórbico e SnCl_2 como reagentes redutores.....	40
Figura 3.7 - Curvas analíticas para quantificação de fósforo em extratos com acidez diferente.....	41
Figura 3.8 - Espectro de absorção do digerido no forno microondas, empregando o programa com controle de temperatura com adição de 0,5 mL de HNO_3 concentrado.....	44
Figura 3.9 - Digeridos de material vegetal empregando forno de microondas com adição de 0,5 mL de HNO_3 concentrado.....	46
Figura 3.10 - Espectros de absorção dos digeridos em forno microondas empregando 0,5 mL de HNO_3 concentrado.....	47
Figura 3.11 - Avaliação do tempo de extração empregando $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ como extrator.....	49
Figura 3.12 - Avaliação da eficiência de extração.....	50
Figura 3.13 - Avaliação das concentrações de H_2SO_4 e persulfato de amônio no procedimento para fotodegradação de fósforo orgânico.....	53

Resumo

Neste trabalho, foram avaliados diferentes procedimentos para tratamento de amostra de material vegetal, visando o fracionamento de fósforo (determinação das frações orgânica e inorgânica, solúvel e insolúvel). Os procedimentos avaliados visavam a conversão das diferentes frações em ortofosfato, minimizando tempo, consumo de reagentes e geração de resíduos. Foi desenvolvido um sistema de análises em fluxo monossegmentado empregando comutadores discretos (válvulas solenóides) para controlar a inserção das bolhas de ar e das alíquotas de amostras e reagentes. Para a determinação de fosfato, foi empregada a reação de formação do azul de molibdênio, empregando molibdato de amônio e ácido ascórbico como reagentes. Resposta linear foi obtida entre 0,50 e 25,0 mg L⁻¹ P, descrita pela equação $A = 0,0402 + 0,0377C$ (mg L⁻¹ P), $r = 0,999$ para soluções preparadas em água. A sensibilidade diminuiu 8 % e 22 % quando se trabalhou com solução de referência em 0,35 mol L⁻¹ e 0,70 mol L⁻¹ HNO₃, respectivamente. Limite de detecção de 0,024 mg L⁻¹ P (99,7% de confiança), coeficiente de variação de 3,5% (n = 10) e frequência de amostragem de 38 medidas/hora foram estimados. O consumo de reagentes foi de 5,0 mg de ácido ascórbico e 0,60 mg de molibdato de amônio por determinação. O sistema de análises em fluxo monossegmentado mostrou-se pouco susceptível a efeitos de matriz e perturbações por efeito Schlieren causadas por variações de acidez das amostras de planta. O sistema foi aplicado ao fracionamento de fósforo em uma planta que é utilizada como adubo verde (*Crotalaria Juncea*). Foram avaliados procedimentos para extração de fósforo, como o emprego de agitação mecânica empregando água ou ácido nítrico diluído como extrator (extração de fósforo solúvel), fotodegradação do fósforo orgânico solúvel em meio ácido com persulfato de amônio e digestão ácida assistida por microondas (determinação de fósforo total e de fósforo orgânico solúvel). Para determinação de fósforo total, foram avaliados procedimentos empregando diferentes massas de material vegetal, diferentes concentrações de HNO₃ e adição de H₂O₂ como oxidante auxiliar. Bons resultados foram obtidos empregando 100 mg de material vegetal e 500 µL HNO₃ concentrado, sendo

desnecessária a adição de H_2O_2 . O programa de aquecimento, com duração total de 29 min foi constituído pelas seguintes etapas: 1-rampa (5 min)/patamar (1 min): 140 °C; 2-rampa (4 min)/patamar (5 min): 180 °C; 3-rampa (4 min)/patamar (10 min): 220 °C. Na determinação de fósforo inorgânico solúvel, a mesma eficiência de extração foi obtida empregando 0,20 mol L⁻¹ HClO_4 , 0,05 mol L⁻¹ HNO_3 ou água como extrator em 10 minutos de agitação. Para a determinação do fósforo orgânico solúvel, foram avaliados diferentes massas de persulfato de amônio e diferentes tempos de irradiação. Obteve-se boa eficiência empregando 0,1 g de persulfato de amônio, em meio ácido com um tempo de irradiação de 30 min. Digestão ácida assistida por microondas também foi empregada para a determinação de fósforo orgânico solúvel; o programa de aquecimento empregado foi o mesmo para a determinação de fósforo total. Bons resultados foram obtidos empregando 5,5 mL do extrato solúvel e 500 µL HNO_3 concentrado. Os resultados para as diferentes frações foram concordantes com os obtidos por ICP-OES a nível de confiança de 95%.

Abstract

In this work, different sample treatment procedures were evaluated for fractionation of phosphorous in plant material (determination of organic and inorganic, soluble and insoluble fractions). The evaluated procedures aimed the conversion of different fractions in ortophosphate, minimizing time, reagent amounts and waste generation. It was developed a monosegmented flow system using discrete commutators (solenoid valves) to control the insertion of air bubbles, samples and reagents. For the determination of phosphate, it was used the reaction of molibdenium blue formation, using ammonium molibdate and ascorbic acid as reagents. Linear response was observed within 0.50 and 25.0 mg L⁻¹ P, described by the equation $A = 0.0402 + 0.0377C$ (mg L⁻¹ P), $r = 0.999$ for solutions prepared in water. The sensitivity decreased about 8 and 22 % for reference solutions in 0.35 mol L⁻¹ and 0.70 mol L⁻¹ HNO₃, respectively. Detection limit of 0.024 mg L⁻¹ P (99.7% confidence level), coefficient of variation of 3.5% (n = 10) and sampling rate of 38 measurements per hour were estimated. The reagent consumption was 5.0 mg ascorbic acid and 0.60 mg ammonium molibdate per determination. The flow system was less prone to matrix effects and perturbations by Schlieren effect, both caused by variations of acidity in the samples. The system was applied to fractionation of phosphorous in a plant used as green manure (*Crotalaria juncea*). Several procedures for phosphorous extraction were evaluated, such as mechanic agitation using water or diluted nitric acid as extractor (extraction of soluble phosphorous), photodegradation of organic soluble phosphorous in acid medium and acid digestion assisted by microwaves (determination of total phosphorous and organic phosphorous). For determination of total phosphorous, procedures using different mass of plant material, different concentrations of HNO₃ concentrated and addition of H₂O₂ as auxiliary oxidant were evaluated. Good results were obtained using 100 mg of plant material and 500 µL HNO₃, not being necessary the addition of H₂O₂. The heating program, with 29 min duration was constituted by the steps: 1-ramp (5 min)/hold (1 min): 140 °C; 2-ramp (4 min)/hold (5 min): 180 °C; 3-ramp (4 min)/hold (10 min): 220 °C. In inorganic soluble phosphorous determination, the same extraction efficiency

was obtained using $0.20 \text{ mol L}^{-1} \text{ HClO}_4$, $0.05 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ or water as extractor in 10 minutes of agitation. For the determination of organic soluble phosphorous, different amounts of ammonium persulphate and different irradiation times were evaluated. It was obtained a good efficiency using 0.1 g of ammonium persulphate in acid medium with an irradiation time of 20 min. Acid digestion assisted by microwaves was also used for determination of organic soluble phosphorous; the heating program was the same applied for total phosphorous determination. Good results were attained using 5.5 mL of soluble extract and 500 μL HNO_3 concentrated. The results for the different fractions agreed with the obtained by ICP-OES at the 95% confidence level.

Sumário

1 – Introdução.....	1
1.1 - Especiação química empregando sistemas de análises em fluxo.....	1
1.1.1 – Especiação química explorando tratamento prévio da amostra.....	4
1.1.2 – Unidade de propulsão.....	4
1.1.3 – Unidade de injeção.....	5
1.1.4 – Sistema de transporte e reação.....	6
1.1.5 – Unidade de detecção.....	7
1.2 – Especiação de fósforo em plantas.....	9
1.2.1 – Especiação de fósforo empregando análise por injeção em fluxo.....	11
1.3 – Crotalaria Juncea.....	13
1.4 – Efeitos de matriz e efeito Schlieren em sistemas de análises em fluxo.....	15
1.5 – Multicomutação e sistemas de análise em fluxo monossegmentado.....	17
1.6 – Metodologia.....	19
1.7 – Objetivos.....	20
2 – Parte Experimental.....	21
2.1 – Sistemas de análises em fluxo monossegmentado com multicomutação..	21
2.1.1 – Equipamentos e acessórios.....	21
2.1.2 – Diagrama de fluxos e software de controle.....	21
2.1.3 – Reagentes e soluções.....	24
2.1.4 – Otimização do sistema de análises em fluxo.....	24
2.2 – Fracionamento de fósforo em plantas.....	26
2.2.1 – Determinação de fósforo total.....	26
2.2.1.1 – Equipamentos.....	26
2.2.1.2 – Procedimento experimental.....	27
2.2.2 – Extração de fósforo solúvel.....	27
2.2.2.1 – Reagentes e soluções.....	27
2.2.2.2 – Procedimento experimental.....	27
2.2.3 – Determinação de fósforo inorgânico solúvel.....	28
2.2.4 – Determinação de fósforo orgânico solúvel.....	28
2.2.4.1 – Equipamentos.....	28
2.2.4.2 – Procedimento experimental.....	29

2.3 – Medidas em espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado.....	31
2.3.1 – Reagentes e soluções.....	31
2.3.2 – Equipamentos.....	32
3 – Resultados e discussões.....	33
3.1 - Sistemas de análises em fluxo monossegmentado com multicomutação...	33
3.1.1 – Otimização do sistema de análises em fluxo.....	33
3.1.2 – Otimização do sistema de análises em fluxo monossegmentado para determinação de fosfato.....	36
3.2 – Determinação de fósforo total.....	41
3.3 – Extração de fósforo solúvel.....	48
3.3.1 – Extração de fósforo inorgânico solúvel.....	48
3.3.2 – Determinação de fósforo orgânico solúvel.....	51
3.4 – Frações de fósforo determinadas no material vegetal	55
3.5 – Procedimentos recomendados para o fracionamento de fósforo em tecido vegetal (Crotalaria Juncea).....	55
3.5.1 – Procedimento recomendado para determinação de fósforo total.....	55
3.5.2 – Procedimento recomendado para extração de fósforo inorgânico solúvel.....	56
3.5.3 – Procedimento recomendado para determinação de fósforo total solúvel.....	56
4 – Conclusões.....	57
5 – Referências Bibliográficas.....	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 Especiação química empregando sistemas de análises em fluxo

De acordo com a IUPAC, espécies químicas são definidas como as formas específicas de um elemento, como sua composição isotópica, estado eletrônico, estado de oxidação e estrutura molecular. Especiação química pode ser definida como a atividade analítica de identificar e/ou quantificar uma ou mais espécies químicas individuais em uma amostra¹. A importância do conhecimento dessas espécies se deve ao comportamento diferente de cada forma particular em relação à toxicidade, reatividade química e biodisponibilidade².

Entretanto, nem sempre é possível a determinação da concentração das diferentes espécies, por limitações de sensibilidade e estabilidade, por exemplo. Em muitos casos, a determinação de um grupo de espécies pode fornecer informação suficiente. Fracionamento é definido como o processo de classificação de um analito ou grupo de analitos de uma certa amostra de acordo com as propriedades físicas (e.g. tamanho e solubilidade) ou químicas (e.g. ligações, reatividade)¹.

Estudos de especiação, em geral, exigem técnicas sensíveis, pois várias espécies são encontradas em baixas concentrações, e seletivas, para identificação e quantificação das diferentes espécies. A maioria dos métodos para especiação química emprega técnicas de separação antes da detecção das diferentes espécies. Um levantamento bibliográfico empregando o banco de dados do *Analytical Abstracts* mostrou que cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi a técnica de separação predominante³. Para maior sensibilidade e/ou seletividade, pode ser explorada a hifenação de técnicas, como por exemplo, o acoplamento de HPLC-AAS, GC-MS e GC-ICP-MS.

A análise por injeção em fluxo (FIA) consiste na inserção da amostra em um fluido que a transporta em direção ao detector. Durante o transporte, pode haver adição de reagentes, separação, pré-concentração etc. Além da inserção da amostra, outras características importantes são a temporização reprodutível e o processo de dispersão controlada. Nos estudos de especiação química, a análise por injeção em fluxo é empregada nas etapas de derivação química e

separação, preparando a amostra previamente à detecção. O processo permite, de maneira geral, menor consumo de reagentes e menor tempo de análise, aumentando a frequência de amostragem.

Uma pesquisa feita no *Analytical Abstracts* em outubro de 2004 referente ao período 1975-2004 revelou o emprego de sistemas de injeção em fluxo para a especiação de diversos elementos (Figura 1.1), sendo que quase 60% das amostras analisadas são de águas naturais e residuárias (Figura 1.2). Predominam também os trabalhos envolvendo especiação redox e a determinação de 2 espécies químicas.

Figura 1.1 - Elementos mais investigados em estudos de especiação empregando análises por injeção em fluxo, de acordo com pesquisa no banco de dados do *Analytical Abstracts*.

Figura 1.2 – Amostras mais analisadas em estudos de especiação química empregando análises por injeção em fluxo, de acordo com pesquisa no banco de dados *Analytical Abstracts*.

Artigos de revisão sobre especiação química em análises por injeção em fluxo têm sido publicados. Das et al.⁴ enfocaram a especiação química em linha de diversos elementos, apresentando as dificuldades, estratégias gerais e métodos propostos na literatura para cada elemento ou série de elementos. Campanella et al.² descreveram as vantagens de utilizar a análise por injeção em fluxo para a especiação, como curto tempo de análise, redução da participação humana em operações que levam um tempo considerável, como o preparo da amostra, manipulação de reagentes e calibração do sistema de medidas. Discutiram também que entre os métodos publicados para a especiação química, a determinação de elementos com diferentes estados de oxidação é predominante, enquanto um pequeno número se divide entre a determinação do grau de complexação e a determinação de compostos organometálicos. Luque de Castro et al.⁵ apresentaram estratégias para especiação química em sistemas de injeção em fluxo, descrevendo diferentes configurações dos sistemas, explorando alterações nos componentes que constituem os módulos de análise (Figura 1.3). O emprego da FIA para especiação química depende de uma ou mais alterações dos elementos básicos do sistema como: unidade de propulsão, sistema de injeção, transporte/reacção e detector. Em cada caso, o sistema é construído para facilitar a remoção de interferentes, derivação química e a transferência do analito para o detector. Contudo, em diversas aplicações, a especiação química é

possível devido ao tratamento da amostra previamente à inserção no sistema de análises em fluxo.

Figura 1.3 – Possíveis alterações no sistema de análises em fluxo para especiação química.

Adaptada da referência 5.

1.1.1 Especiação química explorando tratamento prévio da amostra

O tratamento da amostra permite a conversão seletiva das espécies em uma forma mensurável pelo detector. Dessa forma, com a introdução da amostra tratada e não tratada no sistema FIA é possível a determinação seqüencial das espécies de um dado elemento. Esta situação pode ser exemplificada pela especiação redox de selênio por ação catalítica do Se(IV) na reação entre clorato e cloreto em meio ácido (Equação 1.1)⁶. A presença de hidrazina no meio diminui a velocidade da reação 1.1 que é rápida na ausência deste reagente. Em meio ácido, Se(VI) é convertido em Se(IV), como descrito pela equação 1.2. O Se(IV) age como um catalisador da reação 1.1, sendo o seu desenvolvimento monitorado pela formação de um produto colorido por reação do cloro com o-toludina ($\lambda_{\text{máx}} = 440 \text{ nm}$). Duas alíquotas da amostra eram necessárias, sendo uma diretamente inserida no sistema de análises em fluxo, gerando um sinal correspondente ao Se(IV) e outra previamente tratada em meio ácido para a determinação de Se(IV) e Se(VI).

1.1.2 Unidade de propulsão

No caso de alterações na unidade de propulsão, uma alternativa é a parada de fluxo. Por exemplo, para a determinação simultânea de espécies de S (IV) livres e combinados em vinhos, um procedimento envolvia a introdução da amostra no módulo de análises através de duas válvulas acopladas em paralelo e duas paradas de fluxo seqüenciais⁷. Duas alíquotas da amostra eram inseridas no sistema simultaneamente pelas válvulas, alcançando o detector em tempos diferentes. Quando a primeira alíquota alcançava o detector o fluxo era interrompido para a medida de S (IV) livre. Simultaneamente, a alíquota inserida pela outra válvula, após ter recebido NaOH, alcançava um reator onde ocorria hidrólise alcalina convertendo S (IV) combinado em S (IV) livre. Após a medida da

primeira alíquota (S (IV) livre) no detector, o fluxo prosseguia até o momento em que a segunda zona de amostra alcançasse o detector; o fluxo era novamente interrompido para medida de S (IV) total.

1.1.3 Unidade de injeção

Muitas alterações no sistema de injeção podem ser efetuadas visando especificação química. Duas ou mais válvulas de injeção podem ser arranjadas em série ou em paralelo. O sistema também pode comportar reatores sólidos de diferentes naturezas em suas alças de amostragem para facilitar a conversão dos analitos na forma adequada para medida no detector. Um exemplo é um procedimento proposto para determinação de uréia e amônio⁸. O sistema em fluxo consistiu em duas alças de amostragem conectadas em paralelo (zonas coalescentes), sendo que uma das alças de amostragem apresentava um reator contendo a enzima urease imobilizada para a conversão da uréia em amônia (Figura 1.4). Para a determinação de amônio (existente na amostra e formado na reação enzimática) foi empregada espectrofotometria com reagente de Nessler.

Figura 1.4 – Sistema de análises por injeção em fluxo empregado na especificação de nitrogênio. C₁ e C₂: transportadores; A: amostra; R: reagente de Nessler; L: alça de amostragem do reagente; Col: reator enzimático; D: detector. Adaptada da referência 8.

As alças de amostragem eram preenchidas em sentido oposto ao dos fluxos transportadores, de modo que uma das frações contidas na alça de amostra não passava pela coluna enzimática. Portanto, uma porção da amostra, a primeira a chegar ao detector, gerava o sinal referente ao amônio livre, a segunda porção, que passou pelo reator, fornecia o sinal de amônio mais uréia.

A multicomutação em sistemas de análises em fluxo consiste no uso de dispositivos discretos de comutação (válvulas ou bombas solenóides) controlados independentemente por um *software*. Esta é uma alternativa para aumentar a versatilidade de sistemas de análises em fluxo que pode ser explorada para especiação química. Um sistema empregando multicomutação foi utilizado por Rocha et al.⁹ para a especiação inorgânica de nitrogênio (determinação de nitrato, nitrito e amônio). O sistema empregou 8 válvulas solenóides de 3 vias controladas por um microcomputador através de um *software* especialmente desenvolvido, uma coluna de cádmio cobreado para conversão de nitrato a nitrito e um fotômetro com LED bicolor (vermelho / verde) associado com um fotodiodo para a realização das medidas. As válvulas responsáveis pela inserção das alíquotas de amostra e reagentes cromogênicos para amônio eram acionadas, o transportador encaminhava a zona de amostra para um reator, onde esta permanecia retida para desenvolvimento da reação. Enquanto esta etapa ocorria, eram realizadas a determinação de nitrato e nitrito com duas alíquotas de amostra que atravessavam ou não a coluna redutora. Para terminar, a zona de amostra para determinação de amônio contida no reator era encaminhada para o detector (determinação de amônio).

1.1.4 Sistema de transporte e reação

Modificações na unidade de transporte e reação envolvem o uso de confluências, válvulas para introdução da amostra e reagentes, divisão da zona de amostra e zonas coalescentes.

Um sistema com zonas coalescentes assíncronas, com a introdução da amostra e de um reagente modificador, foi proposto para a determinação seqüencial de Fe(II) e Fe(III) em produtos farmacêuticos¹⁰. A amostra e o reagente alcançam o ponto de confluência em tempos diferentes devido às diferenças de vazões e ao uso de um reator no canal do reagente, de forma que somente a porção final da amostra recebia o reagente modificador (ácido ascórbico). Desta maneira, foi possível determinar Fe(II) e Fe(III) simultaneamente, empregando 1,10 fenantrolina como reagente cromogênico.

Para a especiação de colesterol (determinação de colesterol livre/colesterol esterificado) foi empregado um sistema com divisão da zona de amostra em duas partes (Figura 1.5)⁵. A amostra, ao passar pelo ponto (x), era dividida em duas porções; uma delas passava por um reator contendo a enzima colesterol esterase imobilizada, no qual ocorria a hidrólise enzimática de colesterol esterificado. A porção que não passava pelo reator sólido (que não sofria hidrólise) gerava o sinal correspondente ao colesterol livre, e a porção que passava pelo reator gerava o sinal correspondente ao colesterol livre + colesterol esterificado. Após o ponto de confluência, um reator contendo colesterol oxidase era responsável pela oxidação das duas porções de amostra para posterior medida.

Figura 1.5 – Sistema de análises em fluxo empregado na especiação de colesterol livre/colesterol esterificado. C: transportador; A: amostra; Col 1: reator contendo colesterol esterase imobilizada; Col 2: reator contendo colesterol oxidase; D: detector. Adaptada da referência 5.

1.1.5 Unidade de detecção

A discriminação entre diferentes formas químicas pode ser realizada usando um ou mais detectores que podem ser interfaceados a um microcomputador para aquisição e processamento dos dados. Em detecção espectrofotométrica, há também a possibilidade de se empregar duas celas de fluxo, podendo ser arranjadas em série ou em paralelo em um equipamento de feixe duplo, ou posicionadas entre o feixe de radiação e a cela de fluxo de um espectrofotômetro de feixe simples, permitindo a obtenção de dois picos por injeção da amostra. O primeiro sinal transiente corresponde às espécies que reagem diretamente com o reagente cromogênico; a zona de amostra recebe, então, um reagente modificador, que gera espécies que podem ser detectadas pela reação anterior. O segundo sinal, portanto, corresponde às duas formas

inicialmente presentes na amostra. Com celas de fluxo conectadas em série (Figura 1.6), o ponto de confluência do reagente modificador fica entre as celas permitindo obter dois sinais transientes por amostra injetada. Dessa maneira, a amostra ao passar pela primeira cela de fluxo gera um sinal correspondente a uma das espécies, e ao passar pela segunda cela de fluxo após receber o reagente modificador gera um sinal correspondendo à concentração total das espécies. A chegada da segunda zona de amostra na cela de fluxo deve ser retardada para evitar sobreposição de picos.

Figura 1.6 - Celas de fluxo conectadas em série em um espectrofotômetro de feixe simples. C: transportador; A: amostra; R₁: reagente cromogênico; R₂: reagente modificador.

Um sistema FIA incluindo vários detectores pode ser uma alternativa poderosa para especiação química; no entanto, o custo é alto. Como exemplo, espectrofotômetros de absorção molecular e de absorção atômica arranjados em série foram usados para especiação de Fe(II) e Fe(III) e de Cr(III) e Cr(VI)¹¹.

Uma montagem mais complexa consiste no arranjo de três detectores em série, que foi empregada para especiação de nitrogênio ($\text{NH}_3/\text{NO}_2^-$) e determinação de pH, condutividade e cloro residual em águas. A configuração é um excelente exemplo de versatilidade dos sistemas de análises em fluxo, em que um simples canal permite cinco determinações¹².

1.2 Especificação de fósforo em plantas

Fósforo é um dos nutrientes essenciais para a vida na Terra, é indispensável para plantas, animais e seres vivos em geral, pois faz parte de processos vitais como a fotossíntese e as transformações energéticas. O fósforo inorgânico, prioritariamente o íon H_2PO_4^- , é absorvido da solução do solo pelas raízes das plantas. No ambiente celular, adquire papel primordial no metabolismo e fisiologia das plantas, sendo essencial na cadeia fotossintética, compondo moléculas de ATP, fosfolipídios, ácidos nucleicos e também coenzimas¹³. Nas plantas, o fósforo está na forma inorgânica ou orgânica, fazendo parte de biomoléculas (fosfolipídios, ácidos nucleicos (DNA e RNA), fosfato de inositol e outros ésteres fosfatados)¹⁴. Também se distinguem o fósforo solúvel, mais facilmente liberado e o fósforo insolúvel, fortemente ligado às moléculas orgânicas¹⁵. Geralmente, mais de 50% do fósforo presente nos tecidos de plantas está na forma inorgânica¹⁴.

Alguns trabalhos destacaram-se no estudo das frações de fósforo (fracionamento) em tecidos de plantas. Hogue et al.¹⁶ propuseram uma seqüência de extrações capazes de solubilizar as frações de fósforo inorgânico e orgânico, dentre elas as moléculas de fosfolipídios, RNA, DNA e fosfoproteínas (Figura 1.7). A seqüência de extrações é trabalhosa e, muitas vezes, excessivamente detalhada para estudos agronômicos. Neste estudo, comprovou-se que quando aumenta a adubação fosfatada, o teor de fósforo inorgânico também aumenta nos tecidos das plantas de tomate. Porém, as frações de fósforo orgânico (DNA, RNA e fosfolipídios) permanecem constantes.

Figura 1.7 – Esquema do procedimento para fracionamento de fósforo em tecidos de planta. Adaptado da referência 16.

Furtini Neto et al.¹⁵ estudaram o comportamento de mudas de eucaliptos de espécies diferentes cultivadas em soluções nutritivas na presença e na ausência de fósforo. O procedimento empregado para o fracionamento está esquematizado na Figura 1.8. Todas as espécies de eucalipto estudadas apresentaram redução do percentual de participação do fósforo inorgânico (Pi) em relação ao fósforo total solúvel (Pts) com o aumento de omissão de P, seguida de maior participação relativa do fósforo orgânico (Po) em relação ao Pts nos diversos compartimentos da planta. A magnitude do decréscimo da participação do Pi e Pts foi distinta entre as espécies de eucalipto estudadas.

Figura 1.8 – Esquema para fracionamento de fósforo em tecidos de planta. Adaptado da referência 16.

A absorção de Pi do solo é contínua e realizada por vários sistemas de transporte através das membranas celulares. Contudo, as formas de P, suas quantidades e localização na célula podem mudar de acordo com a espécie da planta e a disponibilidade de P no solo¹⁷.

Estes e outros estudos de interesse agrônomo requerem o fracionamento de fósforo nas amostras de plantas que, em geral, é efetuado por procedimentos demorados e que consomem quantidades elevadas de ácidos e solventes. Em vista disto, fica evidente a necessidade de procedimentos alternativos simples, rápidos e com baixo consumo de reagentes para a determinação das diferentes frações de P (orgânico e inorgânico, solúvel e insolúvel) em plantas.

1.2.1 Especificação de fósforo empregando análises por injeção em fluxo

Diversas configurações de sistemas de análises em fluxo e detectores têm sido empregados para a determinação de fósforo, como descrito recentemente em artigo de revisão¹⁸. Grande parte das publicações que exploram

FIA para a determinação de fósforo em diferentes tipos de amostras, empregam o método azul de molibdênio utilizando espectrofotometria UV-Vis, por ser fácil de implementar e de baixo custo.

Análises de fósforo são complexas devido ao fato do elemento ser encontrado em diferentes formas orgânicas e inorgânicas. Algumas reações fotoquímicas foram aplicadas com sucesso na redução ou oxidação em linha de substâncias contendo fósforo, gerando procedimentos simples e rápidos de pré-tratamento da amostra¹⁸. Diversos procedimentos empregam persulfato de potássio como agente oxidante na presença de radiação ultra-violeta. Alternativamente, pode-se empregar decomposição ácida assistida por microondas. Um artigo de revisão descrevendo procedimentos para armazenamento e decomposição de amostras de águas para a determinação de espécies de fósforo foi apresentado por Maher e Wao¹⁹.

Pérez-Ruiz et al.²⁰ desenvolveram um método em fluxo contínuo para a determinação de fósforo orgânico e inorgânico em águas. O sistema incluiu um fotoreator ultra-violeta para a degradação em linha do fósforo a ortofosfato na presença de persulfato e uma unidade de decomposição externa para a hidrólise do fósforo condensado na presença de ácido clorídrico. A configuração do sistema FIA permite duas injeções sequenciais da amostra, a primeira alíquota não recebendo irradiação e a segunda sendo irradiada. O ortofosfato gerado é determinado por fluorimetria após reação com molibdato de amônio e tiamina em meio amoniacal.

Um sistema de análises em fluxo acoplado a um sistema de filtração em gel (coluna Sephadex G25) foi empregado para a determinação de espécies de fósforo orgânico e inorgânico em águas e sedimentos²¹. Ortofosfato e ácido fítico foram empregados como substâncias representativas de baixa e alta massa molecular, respectivamente. Foto-oxidação foi empregada para converter as espécies orgânicas de fósforo em ortofosfato previamente à detecção espectrofotométrica.

Um sistema de análises por injeção em fluxo para a determinação de espécies de fósforo em águas foi proposto por McKelvie et al.²². A alíquota de amostra injetada era dividida em duas porções. Uma delas era encaminhada diretamente ao detector enquanto a outra atravessava uma coluna contendo a

enzima fitase imobilizada, para a hidrólise do ácido fítico. Portanto, dois sinais transientes eram obtidos para cada injeção de amostra, sendo a determinação feita por espectrofotometria com base no método do azul de molibdênio.

Vieira et al.²³ desenvolveram um sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de fósforo total, fitato e ortofosfato em cereais. O ortofosfato foi diretamente determinado no extrato pelo método espectrofotométrico do azul de molibdênio. O fitato foi hidrolisado pela enzima fitase presente em um reator enzimático, sendo o ortofosfato formado determinado pela mesma reação. O procedimento apresentou menor tempo de análise (72 determinações/hora) e menor consumo de reagentes quando comparado aos procedimentos convencionais para determinação de fitato.

1.3 *Crotalaria juncea*

A *Crotalaria juncea*, planta estudada neste trabalho, é originária da Índia e Ásia tropical, onde é explorada como planta têxtil, assim como na Rússia Meridional. É uma planta arbustiva cujo porte varia de 2 a 3 m de altura (Figura 1.9 A), com folhas alongadas, flores grandes e vagens longas, com 10 a 20 grãos cada (Figura 1.9 B). É uma leguminosa anual de rápido crescimento inicial, o que lhe confere maior competitividade com as invasoras, apresentando também um expressivo efeito supressor e/ou alelopático sobre estas. Seu rápido crescimento inicial possibilita cortes precoces em torno de 70 a 90 dias após o plantio. É de clima tropical e subtropical, e não resiste a geadas severas. Comporta-se bem em solos argilosos e arenosos com razoáveis níveis de fertilidade²⁴. A composição química de uma planta de *Crotalaria juncea* pode ser verificada na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Composição química de uma planta da leguminosa *Crotalaria Juncea*. Adaptada da referência 25.

Macronutrientes (% da matéria seca)						Relação	Micronutrientes (mg / kg)		
N	P	K	Ca	Mg	C	C/N	Cu	Zn	Mn
2,50	0,19	1,20	2,31	0,47	45,25	18,10	14	44	179

Figura 1.9 – Plantação de *Crotalaria Juncea* (A) folhas, flores e vagens da planta (B).

A Crotalária pode ser empregada como produtora de fibras e na produção de papéis finos (principalmente para cigarros), mas seu principal emprego é como adubo verde. Várias técnicas agrícolas estão sendo desenvolvidas com o intuito de aumentar a produção de alimentos e diminuir o impacto ambiental. Uma das tecnologias desenvolvidas foi o sistema de plantio direto que minimiza o impacto causado pela aração e gradagem do solo. Neste sistema, mantém-se o solo coberto pela palhada do cultivo anterior que pode ser uma cultura comercial ou adubo verde. Essa alteração dos moldes agrícolas tradicionais de exploração agrícola foi impulsionada, principalmente, pela adoção de novas tecnologias de manejo e conservação de solo e pela maior conscientização dos agricultores da importância da preservação dos recursos naturais.

Com a prática da adubação verde, é possível a recuperação da fertilidade do solo, proporcionando aumento do teor de matéria orgânica, da capacidade de troca de cátions e da disponibilidade de macro e micronutrientes; a melhoria da infiltração de água e da aeração; a diminuição da amplitude de

variação térmica; o controle dos nematóides; e, no caso das leguminosas, a incorporação ao solo de nitrogênio por fixação biológica²⁵.

Diversas leguminosas podem ser usadas na adubação verde, sendo a definição da espécie condicionada à adaptação local, à produção de massa verde, ao preço e à facilidade de obtenção de sementes. Na região centro-sul do país, as leguminosas mais empregadas são: *Crotalaria Juncea*, mucuna-preta, soja e amendoim. No nordeste, a mucuna-preta tem merecido especial atenção. Pode-se identificar basicamente duas regiões no Estado de São Paulo: a região norte-oeste com deficiências hídricas pronunciadas, onde são recomendadas no outono-inverno leguminosas como o feijão, ervilha e grão-de-bico, e com irrigação, mucuna-preta, *Crotalaria Juncea*, guandu e outras; na região sul, com melhor distribuição de chuvas, porém podendo apresentar problemas de geadas, são recomendadas ervilha, grão-de-bico, chícharo e tremoço²⁶.

1.4 Efeitos de matriz e efeito Schlieren em sistemas de análises em fluxo

Medidas em sistemas de análises em fluxo são usualmente efetuadas sem que os equilíbrios químicos e físicos sejam atingidos. Entretanto, medidas fora das condições de equilíbrio químico podem ser afetadas pela matriz da amostra (principalmente por diferenças de acidez e de intensidade iônica), desde que a matriz possa afetar a velocidade das reações envolvidas.

Zagatto et al.²⁷ enfatizaram este aspecto na determinação de fosfato em digeridos de plantas baseada na formação de azul de molibdênio. A velocidade da redução do heteropoliácido pelo ácido ascórbico diminui à medida que aumenta a acidez da amostra (Figura 1.10). Em se tratando de tempos de residência curtos, como é o caso, onde a medida é feita em menos de 10 segundos após a inserção da amostra, erros consideráveis podem ser causados pelas variações de acidez. Como mostra a figura, trabalhando com tempos de residência longos (neste caso maiores que 30 s), esse tipo de erro pode ser minimizado, já que a reação (mesmo em diferentes concentrações de ácido) tende a um equilíbrio.

Figura 1.10 – Influência da acidez da amostra na velocidade de formação do azul de molibdênio. Solução $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ P em diferentes concentrações de HClO_4 : (A) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, (B) $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e (C) $0,40 \text{ mol L}^{-1}$. A reta tracejada indica o instante de parada de fluxo. Adaptada da referência 27.

Em sistemas em fluxo, com detecção espectrofotométrica, a formação de intensos gradientes de concentração resulta em um fenômeno denominado efeito Schlieren. Este fenômeno surge devido à formação de intensos gradientes de concentração que resultam na formação de interfaces com diferentes índices de refração, que podem provocar refração e reflexão do feixe de radiação incidente, focalizando-o em direção ao detector ou provocando espalhamento da radiação, podendo levar à formação de picos distorcidos ou invertidos²⁸.

Propriedades físico-químicas que afetam a mistura entre amostra, transportador e reagentes, tais como densidade e viscosidade, influenciam a magnitude do efeito Schlieren. Assim, soluções de diferentes espécies químicas que apresentem mesmo índice de refração, podem afetar de forma distinta os sinais transientes, em função de sua habilidade de mistura com o transportador²⁸.

Diversos procedimentos têm sido explorados no sentido de evitar, eliminar ou corrigir perturbações causadas por efeito Schlieren. O artifício mais

simples consiste na compatibilização entre as características físico-químicas do transportador e das soluções a serem processadas. Este procedimento, apesar de ser simples, é limitado, por exemplo, quando são analisadas amostras com acidez e salinidade elevadas e variáveis. As perturbações devidas ao efeito Schlieren na quantificação do analito podem ser evitadas, melhorando as condições de mistura, através de procedimentos instrumentais ou efetuando-se as medidas em uma região da zona de amostra não afetada por intensos gradientes de concentração²⁸. Para tanto, a interação entre a solução injetada e o transportador deve ser minimizada, de forma a proteger uma fração da zona de amostra do processo de dispersão. Isto pode ser alcançado, por exemplo, utilizando sistemas com fluxo monossegmentado.

1.5 Multicomutação e sistemas de análise em fluxo monossegmentado

Com os sistemas de análise por injeção em fluxo, propostos em 1975 por Ruzicka e Hansen²⁹, é possível obter altas frequências de amostragem, com boa reprodutibilidade e versatilidade, empregando instrumentação simples e de baixo custo. No entanto, o tempo de residência é menor que em sistemas em fluxo segmentados, sendo uma desvantagem quando se trata da aplicação de reações lentas.

Inicialmente, era aceito que a segmentação, dividindo a amostra em compartimentos pequenos, regulares e separados por bolhas de ar, era imprescindível para se evitar o alargamento da zona de amostra no percurso desde o ponto de sua introdução até o detector³⁰. A função da segmentação era, portanto, reduzir a dispersão longitudinal permitindo trabalhar com percursos analíticos longos (longos tempos de residência), visando o uso de reações relativamente lentas³¹.

A análise em fluxo monossegmentado (MSFA), proposta por Pasquini e Oliveira³¹ em 1985 foi uma alternativa para minimizar este tipo de dificuldade encontrada em análises por injeção em fluxo. A análise em fluxo monossegmentado é caracterizada pela compartimentalização da amostra e reagentes entre duas bolhas de ar, que têm a função de minimizar a dispersão longitudinal (Figura 1.11). Como consequência, maiores tempos de residência

podem ser implementados com reduzida dispersão e diferentes monossegmentos podem ocupar simultaneamente o percurso analítico, sem que haja intercontaminação entre as amostras, permitindo um aumento de frequência de amostragem. Portanto, os sistemas MSFA permitem conciliar características favoráveis dos sistemas FIA (simplicidade da instrumentação e altas frequências de amostragem) às características dos sistemas de análise em fluxo segmentado (altos tempos de residência com reduzida dispersão longitudinal). Devido a estas características, sistemas MSFA são bastante atraentes quando são envolvidas reações lentas.

A menor interação da amostra com o transportador e as melhores condições de mistura propiciadas pela monossegmentação e pelos maiores tempos de residência fazem com que os sistemas MSFA sejam também atraentes para o processamento de amostras com composição variável de matriz. Como discutido anteriormente, perturbações por efeito Schlieren podem ser minimizadas pela menor interação da amostra com o transportador^{27,32}. Adicionalmente, com a possibilidade de implementar maiores tempos de residência pode se minimizar efeitos da matriz da amostra sobre a cinética das reações envolvidas.

Figura 1.11 – Representação de um monossegmento. A + R: mistura de amostra e reagente; ar: bolha de ar; C: transportador.

Uma alternativa que permite a redução do consumo de reagentes e da geração de resíduos consiste no emprego de comutadores discretos (multicomutação) para controlar a inserção de alíquotas de amostras e reagentes³². Em um sistema com amostragem binária para determinação de manganês em grãos de soja, foi implementado fluxo monossegmentado com multicomutação, desenvolvido para aumento de sensibilidade (maior tempo de residência) sem prejudicar a frequência de amostragem. As medidas foram feitas por espectrofotometria em 548 nm. O método foi baseado na oxidação do Mn^{2+} pelo periodato em meio de ácido fosfórico para formar o anion permanganato. A

reação é relativamente lenta, sendo necessário um tempo de residência de 5 minutos para atingir o equilíbrio³³.

Um procedimento empregando multicomutação em fluxo monossegmentado também foi desenvolvido para titulação potenciométrica ácido-base, empregando o processo de procura binária³⁴. Como detector foi empregado um eletrodo tubular de membrana polimérica sensível ao íon hidrogênio. Uma solução tampão em pH 7 com baixa capacidade tamponante foi empregada como transportador. A fração volumétrica da solução titulante era continuamente variada e uma solução diluente era empregada para manter o volume total e a intensidade iônica constantes. A diferença de potencial correspondente ao centro da zona de amostra era empregada para decidir se a fração volumétrica do titulante deveria ser aumentada ou diminuída. O critério para a determinação do ponto final era que a diferença de potencial correspondente ao centro da zona de amostra estivesse dentro do intervalo definido pela média ± 3 vezes o desvio padrão das medidas efetuadas para a solução transportadora. Fluxo monossegmentado foi empregado para melhorar as condições de mistura sem excessiva dispersão. O procedimento permitiu que resultados precisos (em torno de 1 % de variação) fossem obtidos. Apesar de uma solução tampão em pH 7 ser empregada como referência, resultados satisfatórios foram obtidos mesmo quando soluções de ácidos fracos foram tituladas.

1.6 Metodologia

Neste trabalho, foi empregado o método espectrofotométrico para a determinação de fósforo conhecido como azul de molibdênio. O método é um dos mais empregados para a determinação de fósforo¹⁸ e consiste na condensação dos íons ortofosfato e molibdato em solução ácida para a formação do ácido molibdofosfórico (Equação 4) que, por redução (estado de oxidação +6 para +5) produz um complexo de coloração azul, cuja composição é incerta (Equação 5). A intensidade da cor azul é proporcional à quantidade de fosfato inicialmente incorporada ao heteropoliácido³⁵. Os agentes redutores mais empregados são ácido ascórbico e cloreto estanoso.

A reação de redução com ácido ascórbico é relativamente lenta, mas a velocidade pode ser aumentada adicionando antimônio como catalisador. Empregando cloreto estânico, a sensibilidade é maior, sendo a reação de redução rápida. No entanto, o desenvolvimento da cor é instável e difícil de ser reproduzido¹⁸.

Os íons que formam heteropoliácidos, como silicato, arsenato, germanato e tungstato são interferentes, assim como agentes oxidantes e redutores.

A instabilidade dos agentes redutores empregados no método azul de molibdênio tem sido estudada na tentativa de substituí-los por redução eletroquímica. Recentemente, um método de análise em fluxo seqüencial (SIA) foi desenvolvido³⁶ para a determinação de ortofosfato em bebidas, águas residuárias e amostras biológicas por geração eletroquímica do azul de molibdênio empregando eletrodos tubulares (tubo de aço-inoxidável como eletrodo catódico de trabalho, tubo de grafite como eletrodo auxiliar) com detecção espectrofotométrica em 760 nm. A metodologia apresentada permite a determinação de ortofosfato em amostras com altas concentrações empregando uma câmara de diluição.

1.7 Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram (i) desenvolver um sistema de análises em fluxo menos susceptível às variações da composição da matriz da amostra e às perturbações causadas por efeito Schlieren e aplicá-lo ao fracionamento de fósforo em plantas e (ii) desenvolver procedimentos para a extração de espécies de fósforo ou para a decomposição de materiais vegetais, visando minimizar o tempo de tratamento da amostra, o consumo de reagentes e a geração de resíduos.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Sistema de análises em fluxo monossegmentado com multicomutação

2.1.1 Equipamentos e acessórios

O sistema de análises em fluxo foi composto por seis válvulas solenóides de 3 vias (NResearch) empregadas para gerenciar as diferentes soluções e para a introdução reprodutível das bolhas de ar. O controle desses dispositivos pelo microcomputador foi feito através de uma interface comercialmente disponível (Advantech, PCL-711S). Para a compatibilização da intensidade de corrente necessária para o acionamento das válvulas solenóides com as geradas pela interface eletrônica, foram empregados circuitos integrados do tipo ULN2003³⁷. Uma fonte de diferença de potencial constante (12 V) foi construída para alimentação dos solenóides³⁷. Para a medida dos sinais, foi empregado um espectrofotômetro de absorção molecular na região visível (Micronal, B 342 II), equipado com uma cela de fluxo de 10 mm de caminho óptico e volume de 80 μL (Hellma). Um reator helicoidal foi construído com tubo de Teflon com diâmetro interno de 3,0 mm e 2 m de comprimento. Uma confluência construída em acrílico com 5 entradas e 1 saída foi empregada para introdução das diferentes soluções. A aquisição de dados foi efetuada empregando uma das entradas analógicas da interface PCL-711S. Para a propulsão dos fluidos foi empregada uma bomba peristáltica (Ismatec, IPC-8) equipada com um tubo de propulsão de Tygon de 2,5 mm de diâmetro interno.

2.1.2 Diagrama de fluxos e software de controle

O diagrama de fluxos para implementação de análises em fluxo monossegmentado com multicomutação é mostrado na Figura 2.1. Válvulas solenóides de 3 vias foram empregadas para gerenciar as diferentes soluções ($V_1 - V_4$), para a introdução das bolhas de ar (V_5) e para redução da pressão interna (V_6). Os volumes de cada alíquota e das bolhas de ar foram definidos pela vazão de aspiração e pelo tempo de acionamento de cada válvula. Para determinação de fosfato, as válvulas solenóides foram operadas de acordo com a sequência de acionamento apresentada na Tabela 2.1.

Figura 2.1 – Diagrama de fluxos para implementação de análises em fluxo monossegmentado com multicomutação. V₁-V₆: válvulas solenóides de 3 vias; X: ponto de confluência; B: reator helicoidal (2 m, 3 mm di); D: cela de fluxo do espectrofotômetro; P: bomba peristáltica; A: amostra; R₁: molibdato de amônio; R₂: ácido ascórbico; C: transportador; W: recipiente de descarte.

Tabela 2.1 – Seqüência de acionamento das válvulas solenóides para implementação de análise em fluxo monossegmentado com multicomutação. Os números 0 e 1 indicam que as válvulas estão desligadas ou acionadas, respectivamente.

Etapa	Descrição	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆	Tempo (s)
1	Introdução da 1 ^a bolha de ar	1	0	0	0	1	0	1,5
2	Introdução do reagente R ₁	1	0	1	0	0	0	6,0
3	Introdução da amostra	1	1	0	0	0	0	6,0
4	Introdução do reagente R ₂	1	0	0	1	0	0	6,0
5	Redução da pressão em B	0	0	0	0	0	1	0,1
6	Introdução da 2 ^a bolha de ar	1	0	0	0	1	0	1,5
7	Transporte do monossegmento	0	0	0	0	0	0	20
8	Transporte do monossegmento	0	0	0	0	0	0	t ₁
9	Leitura	0	0	0	0	0	0	t ₂

A amostra e os reagentes foram introduzidos entre duas bolhas de ar no percurso analítico pelas válvulas solenóides (V_2 - V_4). Cada válvula foi seqüencialmente acionada por 6 segundos, totalizando o volume do monossegmento em 600 μ L (etapas 2, 3 e 4). As bolhas de ar foram inseridas pelo acionamento da válvula V_5 por 1,5 s (etapas 1 e 6). Na etapa 5, a válvula 6 foi acionada por 0,1 s (entrada de ar através da válvula), minimizando a pressão interna no reator B antes da entrada da segunda bolha de ar. Todas as válvulas foram então desligadas por 20 s para inserir um volume de transportador (ca. 1,4 mL) entre o primeiro e o segundo monossegmento (etapa 7). As etapas 1-7 foram repetidas mais 2 vezes para a inserção de mais 2 monossegmentos idênticos no percurso analítico. Os monossegmentos foram transportados através de um reator helicoidal de 2,0 m em direção à cela de fluxo, na qual a medida espectrofotométrica foi feita em 660 nm (etapa 8 e 9).

O programa para controle dos dispositivos de comutação e aquisição de dados foi desenvolvido em linguagem VISUAL BASIC (Microsoft), sendo o formulário principal mostrado na Figura 2.2. Este formulário permite ao usuário a entrada das variáveis (tempo de aspiração de amostra, R_1 , R_2 , bolhas de ar, número de ciclos de amostragem e número de leituras) e a apresentação dos sinais na forma de valores de absorbância e na forma gráfica ($A \times t$). Os dados foram salvos em arquivos no formato ASC II, cujo nome e extensão eram previamente definidos pelo usuário.

The screenshot shows a software window titled "MSFA" with a menu bar containing "Sair" and "Salvar". Below the menu is a large empty rectangular area labeled "A". At the bottom of the window, there is a control panel with several sections:

- Buttons:** "Iniciar" (highlighted), "Etapa" (text input), "Absorbância" (text input), and "tempo" (text input).
- Variáveis:**
 - Amostra: 60
 - Reagente 1: 60
 - Reagente 2: 60
 - Bolha de ar: 15
 - Ciclos de amostragem: 5
 - Replicata: [] de 0
 - Leitura: [] de 530
 - Delay: 200
 - ☒ Salvar dados
- Trocar:**
 - ☒ Amostra
 - ☐ Reagente 1
 - ☐ Reagente 2
 - tempo: 200
 - Limpar button
- Gráfico:**
 - X min: 0
 - X max: 2000
 - Y min: 0
 - Y max: 1

Figura 2.2 – Formulário para entrada de variáveis e saída de dados do programa desenvolvido para controle dos dispositivos de comutação e aquisição de dados do sistema MSFA.

2.1.3 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e reagentes de grau analítico. Soluções de referência contendo de 0,50 a 25 mg L⁻¹ P foram preparadas por diluição de uma solução estoque 1000 mg L⁻¹ P preparada a partir de KH₂PO₄ seco em estufa a 80 °C por 2 horas. As soluções de referência foram preparadas em água e em meio 0,35 ou 0,70 mol L⁻¹ HNO₃. Os reagentes utilizados na determinação de fosfato foram 2,5 mmol L⁻¹ molibdato de amônio em meio 0,2 mol L⁻¹ HNO₃, 0,15 mol L⁻¹ ácido ascórbico e 4,4 mmol L⁻¹ de SnCl₂ em meio 0,30 mol L⁻¹ HCl.

2.1.4 Otimização do sistema de análises em fluxo

Para a otimização do volume do monossegmento (300, 400, 500, 600, 700, 800 e 900 µL), das vazões de aspiração (1, 2, 3 e 4 mL min⁻¹) e do

volume da bolha de ar (50, 100 e 200 μL) foi utilizada solução de permanganato de potássio $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Os volumes dos dois reagentes no monossemento foram variados simultaneamente, alterando o tempo de acionamento das válvulas V_3 e V_4 (Figura 2.1), utilizando soluções $2,0$ e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ P, $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ molibdato de amônio e $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ ácido ascórbico. O volume total do monossemento foi mantido constante ($600 \mu\text{L}$) e o tempo de acionamento da válvula referente à amostra foi de 6 segundos, equivalente a $200 \mu\text{L}$.

As alíquotas da amostra foram inseridas no percurso analítico entre as alíquotas dos reagentes R_1 e R_2 , constituindo um ciclo de amostragem (Figura 2.3 A). Foram avaliados diferentes ciclos de amostragem (1-5 ciclos), empregando solução 10 mg L^{-1} P. A Figura 2.3 B exemplifica o processamento da amostra com dois ciclos de amostragem.

Figura 2.3 – Representação da inserção da amostra e dos reagentes empregando (A) 1 ciclo e (B) 2 ciclos de amostragem.

O efeito da concentração de ácido na amostra sobre o sinal analítico foi avaliado empregando diferentes concentrações de ácido nítrico (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e ácido ascórbico ou SnCl_2 como redutores. Nos experimentos empregando ácido ascórbico foi utilizada solução $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ P e empregando SnCl_2 foi utilizada solução $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ P devido à maior sensibilidade, quando se emprega este redutor.

2.2 Fracionamento de fósforo em plantas

As amostras das plantas de crotalária (caule e folhas de diversas plantas) foram secas em estufa com circulação de ar a 60 °C por 48 horas e moídas em moinho de facas até tamanho de partícula < 1,0 mm.

2.2.1 Determinação de fósforo total

2.2.1.1 Equipamentos

Para a determinação de fósforo total, foi realizada decomposição ácida assistida por microondas (Anton Paar – multiwave 3000), sendo avaliados dois programas (Tabela 2.2 e 2.3) previamente empregados para digestão de alimentos, para decomposição de amostras em sistema fechado.

Tabela 2.2 — Programa empregado na decomposição de material vegetal assistida por microondas, com controle de potência. Temperatura máxima atingida: 110 °C; pressão máxima atingida: 16 bar; tempo de decomposição: 49 minutos.

Etapas	Potência (W)	Rampa (min)	Patamar (min)
1	140	5	1
2	180	4	5
3	220	4	10
4	0	0	20

Tabela 2.3 — Programa empregado na decomposição de material vegetal assistida por microondas, com controle de temperatura. Potência máxima atingida: 1400 W; pressão máxima atingida: 32 bar; tempo de decomposição: 49 minutos.

Etapas	Temperatura (°C)	Rampa (min)	Patamar (min)
1	140	5	1
2	180	4	5
3	220	4	10
4	0	0	20

2.2.1.2 Procedimento experimental

Para decomposição ácida assistida por microondas, nos tubos de Teflon PFA do forno microondas foram adicionados volumes variáveis (0,5; 1,0 e 2,0 mL) de HNO_3 concentrado diretamente na amostra (100 ou 200 mg de planta), completando o volume para 6,0 mL com água deionizada. Experimentos foram também conduzidos na presença de 1,0 mL de H_2O_2 na mistura de ácido diluído.

2.2.2 Extração de fósforo solúvel

2.2.2.1 Reagentes e soluções

Foram avaliadas para as extrações água deionizada, soluções de HNO_3 (0,05; 0,10; 0,20 e 0,50 mol L^{-1}) e 0,20 mol L^{-1} HClO_4 , preparadas com reagentes de grau analítico e água deionizada.

2.2.2.2 Procedimento experimental

A extração foi feita adicionando em tubos graduados de 50,0 mL, 20,0 mL do extrator a 200 mg da planta (crotalária) seca e moída seguida por agitação em agitador mecânico (Tecnal, TE-140). Após a agitação, a mistura foi filtrada a vácuo, separando o filtrado (extrato solúvel) para estudos posteriores.

Foram feitos estudos variando o tempo de extração em até 120 minutos em intervalos de 20 minutos. Posteriormente avaliou-se o efeito do tempo de extração durante 20 minutos com intervalos de 5 minutos.

2.2.3 Determinação de fósforo inorgânico solúvel

A concentração de fósforo inorgânico solúvel foi determinada diretamente no extrato solúvel obtido de acordo com o procedimento descrito no item 2.2.2.2. Foi empregado o sistema de análises em fluxo monossegmentado descrito no item 2.1.2.

2.2.4 Determinação de fósforo orgânico solúvel

2.2.4.1 Equipamentos

Para a decomposição de fósforo orgânico solúvel, foi realizada uma digestão ácida assistida por microondas, empregando o forno (Anton Paar – multiwave 3000).

Também foi investigada a fotodegradação para a decomposição do fósforo orgânico solúvel. Duas avaliações foram feitas, uma empregando uma lâmpada de vapor de mercúrio (Philips HPL-N 400, 400 W) utilizada em iluminação pública, sendo o bulbo de vidro externo removido e a lâmpada colocada diretamente sobre o recipiente contendo a amostra. Em outro experimento foi empregado um fotoreator³⁸ (Figura 2.4), que contém uma lâmpada de vapor de mercúrio, semelhante à citada anteriormente, envolvida por um tubo de Teflon (1 mm d.i., volume de 4 mL). O conjunto foi colocado em um tubo de PVC (4” de diâmetro, 60 cm de comprimento), sendo a lâmpada presa pelo soquete em uma das extremidades do tubo. Na extremidade oposta, foi inserida uma ventoinha para refrigeração do fotoreator. As lâmpadas foram alimentadas através de um reator apropriado (Serwal RIM426B, 220 V). A fonte de radiação empregada apresenta um espectro de emissão contínuo predominantemente na região visível e linhas de emissão típicas de vapor de mercúrio em 254, 313 e 366 nm.

Figura 2.4 – Foto-reator empregado na degradação do fósforo orgânico. 1: lâmpada de vapor de mercúrio, 2: tubo de Teflon (1 mm d.i., volume de 4,0 mL) e 3: tubo de PVC (4" de diâmetro, 60 cm de comprimento). Adaptada da referência 38.

2.2.4.2 Procedimento experimental

Para a digestão ácida do fósforo orgânico solúvel assistida por microondas foi empregado 0,5 mL de HNO_3 concentrado em 5,5 mL do extrato solúvel e programa de aquecimento descrito na Tabela 2.3 (item 2.2.1.1).

Para a fotodegradação do fósforo orgânico solúvel em meio ácido foram empregados 30 μL de H_2SO_4 concentrado e (0,05, 0,1 ou 0,2 g) de persulfato de amônio em 8,0 mL do extrato solúvel (item 2.2.2.2). Para a determinação do fósforo em MSFA o volume do digerido foi completado para 20,0 mL.

Foram avaliados os efeitos da radiação UV e da presença de ácido e persulfato sobre a determinação de fósforo. A avaliação foi realizada empregando 6 frascos graduados de 50 mL: em 3 foram adicionados 8,0 mL de solução $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$ e nos outros 3 frascos, 8,0 mL de extrato solúvel. Os reagentes foram adicionados de acordo com a Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Avaliação preliminar da fotodegradação empregando radiação UV. Os frascos foram completados com água deionizada para 10 mL.

Amostra	H ₂ SO ₄ concentrado (μL)	Persulfato de amônio (g)
10 mg L ⁻¹ P	-	-
10 mg L ⁻¹ P	30	-
10 mg L ⁻¹ P	30	0,20
Extrato solúvel	-	-
Extrato solúvel	30	0,20
Extrato solúvel	30	0,20*

* solução irradiada por UV

Foram avaliados o tempo de exposição da amostra à radiação UV e a massa de persulfato necessária para a fotodegradação. Para isso, em um béquer de 50,0 mL foram adicionados 8,0 mL do extrato solúvel, (50, 100 e 200 mg) de persulfato de amônio e 30 μL de H₂SO₄. A lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão primeiramente foi posicionada acima do béquer (10,0 cm), presa por uma garra em um suporte no sentido horizontal (Figura 2.5). Posteriormente, a lâmpada foi colocada na posição vertical, de modo que metade permanecesse dentro do béquer, aumentando a incidência de radiação na amostra (Figura 2.6). Durante o tempo de irradiação, a amostra ficou sob agitação magnética. Para as medidas, os volumes foram completados para 20 mL.

Figura 2.5 – Posição (horizontal) da lâmpada de mercúrio para a fotodegradação do fósforo orgânico no extrato solúvel.

Figura 2.6 – Posição (vertical) da lâmpada de mercúrio para a realização da fotodegradação do fósforo orgânico no extrato solúvel.

2.3 Medidas em espectrômetro de emissão ótica com plasma induzido em argônio

2.3.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e reagentes de grau analítico. Soluções de referência contendo de $5,0 - 25 \text{ mg L}^{-1}$ P foram preparadas por diluição de uma solução estoque 1000 mg L^{-1} P preparada a partir de KH_2PO_4 seco em estufa a 80°C por 2 horas. Soluções de referência contendo de $1,0 - 20 \text{ mg L}^{-1}$ Ca e Mg foram preparadas por diluição de soluções estoque 1000 mg L^{-1} preparadas a partir de CaCO_3 ou MgSO_4 .

2.3.2 Equipamentos

As determinações de Ca, Mg e P foram executadas por ICP OES com detecção simultânea e configuração axial (Spectro Cirrus^{ccd} – Spectro Analytical Instruments). O gás para formação do plasma foi o argônio 99,998 % v/v (oxilúmen), responsável por gerar um plasma estável e

quimicamente inerte. Os parâmetros instrumentais aplicados estão apresentados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Parâmetros instrumentais para determinação de Ca, Mg e P por ICP OES.

Potência (W)	1400
Nebulizador	Fluxo cruzado (espectro)
Câmara de nebulização	Duplo passo tipo Scott
Fluxo de gás externo (L min^{-1})	12
Fluxo de gás intermediário (L min^{-1})	1,0
Fluxo de gás de nebulização (L min^{-1})	1,0
Introdução de amostra (mL min^{-1})	1,5
Comprimento de onda (nm)	Ca (I) = 422,673
	Mg (II) = 280,270
	P (I) = 177,495

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Sistema de análises em fluxo monossegmentado com multicomutação

3.1.1 Otimização do sistema de análises em fluxo

Em sistemas de análises em fluxo freqüentemente as reações químicas não alcançam o equilíbrio e as medidas podem ser afetadas pela matriz da amostra, quando as espécies presentes afetam a cinética das reações. Em procedimentos para o fracionamento de fósforo em plantas é esperado que os extratos apresentem diferentes concentrações de ácido. Como discutido anteriormente, a concentração de ácido afeta a velocidade da redução do ácido molibdofosfórico por ácido ascórbico. Um efeito de matriz seria portanto esperado caso as medidas fossem feitas fora da condição de equilíbrio químico (Figura 1.10). De acordo com esta figura, para minimizar o efeito de matriz, foi empregado um tempo de residência longo, para que a medida fosse feita quando a reação estivesse próxima ao equilíbrio químico. Para minimizar a dispersão de amostra, optou-se por empregar um sistema de análises em fluxo monossegmentado.

Outro fenômeno a ser considerado em análises em fluxo com detecção espectrofotométrica é a formação de intensos gradientes de concentração, que resultam da dispersão da amostra no fluxo transportador - um fenômeno denominado efeito Schlieren. Os gradientes resultam na formação de interfaces com diferentes índices de refração, geradas devido às diferenças físico-químicas entre amostra e transportador, causando perturbação do sinal. O artifício mais empregado para evitar o efeito Schlieren consiste na compatibilização da amostra com o fluxo transportador, que não é viável quando se trabalha com amostras que possuem composição variável de matriz. A análise em fluxo monossegmentado também permite minimizar o efeito Schlieren, devido às melhores condições de mistura e à menor interação da amostra com o transportador.

O módulo de análises foi construído com comutadores discretos (válvulas solenóides) para controlar a inserção das bolhas de ar e das alíquotas de amostras e reagentes, permitindo maior versatilidade no gerenciamento das soluções e redução do consumo de reagentes e da geração de resíduos. O

sistema foi similar ao proposto por Smiderle et al.³³, que implementou fluxo monossegmentado com multicomutação para obtenção de um maior tempo de residência sem prejudicar a frequência de amostragem.

Para a otimização do sistema MSFA, os parâmetros gerais (volume do monossegmento, vazão de aspiração e volume das bolhas de ar) foram investigados empregando solução $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ KMnO}_4$.

A primeira avaliação foi feita a fim de verificar o melhor volume do monossegmento, que deveria no momento da aquisição dos dados apresentar um patamar, já que a medida foi feita sem a remoção das bolhas de ar. As bolhas de ar causam perturbação no sinal ao passar pela cela de fluxo, devido à alteração de índice de refração nas interfaces. Um volume mínimo é necessário para a medida dos sinais no centro do monossegmento com confiabilidade (formação de um patamar), como pode ser verificado na Figura 3.1. Foi verificado que o volume igual a 600 μL foi suficiente para tal objetivo.

Figura 3.1 – Esquema do sinal transiente gerado pelo sistema de análises em fluxo monossegmentado. B₁, B₂: perturbações causadas pelas bolhas de ar; S: medida referente à amostra; t_R: tempo de residência; t_L: tempo de limpeza.

Foram avaliadas quatro vazões de aspiração diferentes (1, 2, 3 e 4 mL min^{-1}), mantendo constante o volume do monossegmento, sendo os resultados mostrados na Figura 3.2. Para vazões maiores que 3 mL min^{-1} havia segmentação das extremidades do monossegmento formando pequenas bolhas

de ar, o que aumentava o desvio das medidas e a probabilidade de retenção das bolhas na cela de fluxo. Como os valores de absorbância para as vazões 1 e 2 mL min⁻¹ foram próximos, a vazão selecionada foi 2 mL min⁻¹ visando não comprometer a frequência de amostragem.

Figura 3.2 - Efeito da variação da vazão de aspiração sobre o sinal obtido para solução de KMnO₄ 2,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. V_{monossemento} = 600 µL. As barras de erro indicam estimativa de desvio padrão (n = 3).

O volume das bolhas de ar é um parâmetro crítico, pois como a medida dos sinais foi feita sem a remoção das bolhas, estas poderiam ficar retidas na cela de fluxo. Em estudos anteriores³³ foi observado que a retenção das bolhas não ocorria caso o volume fosse maior que o volume da cela de fluxo. Volumes das bolhas de ar de 50, 100 e 200 µL foram avaliados, não sendo observadas diferenças significativas em termos de magnitude de sinal (Figura 3.3). No entanto, foi escolhido o volume de 50 µL por reduzir o tempo de amostragem e apresentar desvio padrão relativo ligeiramente menor. O uso de menores volumes das bolhas de ar foi evitado para impedir a retenção das mesmas na cela de fluxo.

Figura 3.3 - Efeito da variação do volume das bolhas de ar sobre o sinal obtido para solução $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ KMnO}_4$. $V_{\text{monossegmento}} = 600 \text{ } \mu\text{L}$, Vazão = $2,0 \text{ mL min}^{-1}$.

3.1.2 Otimização do sistema de análises em fluxo monossegmentado para determinação de fosfato

O método empregado para a determinação de fosfato foi baseado na reação de formação do azul de molibdênio, empregando molibdato de amônio como reagente 1 (R_1) e ácido ascórbico como reagente 2 (R_2), sendo as concentrações dos reagentes baseadas em informações da literatura. Otimizado o volume total do monossegmento em $600 \text{ } \mu\text{L}$, fixou-se o volume de amostra em $200 \text{ } \mu\text{L}$ e variou-se o volume dos reagentes simultaneamente, de forma que o volume total fosse mantido em $600 \text{ } \mu\text{L}$. O volume de reagente injetado depende do tempo de acionamento da válvula e da vazão de aspiração ($2,0 \text{ mL min}^{-1}$), sendo que 6 segundos de acionamento equivalem a $200 \text{ } \mu\text{L}$ de solução introduzida no monossegmento. Por exemplo, quando a válvula responsável pela introdução de R_1 (V_3) era acionada por 2 segundos, a válvula responsável pela introdução de R_2 (V_4) era acionada por 10 segundos. Dessa forma, enquanto o

tempo de acionamento da válvula V_3 aumentava a cada 2 segundos, o tempo de acionamento da válvula V_4 diminuía em intervalos de 2 segundos, como mostra a Tabela 3.1. A avaliação foi feita utilizando soluções de fósforo ($2,0$ e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$) em substituição à amostra.

Tabela 3.1 - Variação da proporção dos reagentes no monossemento de acordo com o tempo de acionamento das válvulas.

Proporção $R_1 : R_2$ (v/v)	Volume R_1 (μL)	Tempo de acionamento de V_3 (s)	Volume de R_2 (μL)	Tempo de acionamento de V_4 (s)
1 : 5	67	2	333	10
1 : 2	133	4	267	8
1 : 1	200	6	200	6
2 : 1	267	8	133	4
5 : 1	333	10	67	2

A avaliação dos diferentes volumes dos reagentes R_1 e R_2 , mostrou que quando adicionados volumes iguais, foram obtidos maior sinal analítico e baixo desvio padrão relativo (Figura 3.4). As determinações de fósforo, portanto, foram feitas empregando volumes iguais de amostra e reagentes. Nestas condições, as concentrações de reagentes no monossemento foram $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ molibdato de amônio e 50 mmol L^{-1} ácido ascórbico.

Figura 3.4 – Sinais de absorbância obtidos para diferentes volumes de R_1 e R_2 a partir de soluções (■) 2,0 e (●) 10,0 mg L⁻¹ P. As barras de erro indicam estimativa de desvio padrão.

As alíquotas de amostra foram inseridas no percurso analítico entre as alíquotas dos reagentes R_1 e R_2 , constituindo um ciclo de amostragem, como exemplificado na Figura 2.3 A. Como explicado no item 2.1.4, quando a inserção da amostra e dos reagentes R_1 e R_2 é feita n vezes, constitui-se n ciclos de amostragem. O aumento no número de ciclos de amostragem, mantendo o volume total constante, permite melhores condições de mistura. No entanto, os resultados apresentados na Figura 3.5 mostraram que não houve diferença significativa nos valores de absorbância para os diferentes números de ciclos. Isto se deve ao longo percurso analítico (2,0 m) empregado e às alíquotas relativamente pequenas de amostra e reagentes. Portanto, optou-se por trabalhar com apenas um ciclo de amostragem.

Figura 3.5 – Efeito do número de ciclos de amostragem na sensibilidade para determinação de fosfato. As barras de erro indicam estimativas de desvio padrão ($n = 3$).

Para o fracionamento de fósforo, o material vegetal foi submetido a diferentes tratamentos e os extratos apresentaram variações de acidez. O efeito da concentração de ácido sobre o sinal analítico foi, portanto, avaliado. Essa avaliação foi feita empregando ácido ascórbico ou SnCl_2 como redutores (R_2) (Figura 3.6). Os resultados mostram que concentrações ácidas acima de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ afetam significativamente as medidas. No entanto, a variação da absorbância foi menor quando utilizado SnCl_2 como reagente R_2 . Esta observação está de acordo com o esperado, visto que o ácido ascórbico apresenta maior eficiência como redutor quando na forma dissociada (ânion ascorbato). Desta forma, a eficiência é altamente dependente da acidez. Soluções contendo $2,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$ e $10,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$ foram empregadas para os estudos com SnCl_2 e ácido ascórbico, respectivamente. Isto foi necessário pois o heteropoliácido formado na reação entre fosfato e molibdato é mais rapidamente reduzido a azul de molibdênio empregando SnCl_2 como redutor, fazendo com que no momento em que é feita a medida a sensibilidade seja maior.

O ácido ascórbico, mesmo sendo mais sensível ao efeito da acidez, em concentrações menores que $0,40 \text{ mol L}^{-1}$ apresentou desvio padrão relativamente menor quando comparado ao SnCl_2 . Os altos valores de desvio padrão quando se emprega SnCl_2 como redutor podem estar relacionados à formação de um precipitado azul, visível no interior do reator. Como neste

trabalho, a acidez não ultrapassou $0,35 \text{ mol L}^{-1}$, deu-se a preferência ao emprego de ácido ascórbico. Considerando a variação de acidez esperada nos extratos, a variação de sensibilidade deve ser de no máximo 8 %.

Figura 3.6 – Efeito da acidez na determinação de fosfato empregando ácido ascórbico (■) e SnCl_2 (●) como redutores. As barras de erro indicam estimativas de desvio padrão ($n=3$).

Nas condições otimizadas, empregando $V_{\text{monossemento}} = 600 \text{ }\mu\text{L}$, $V_{\text{amostra, reagentes}} = 200 \text{ }\mu\text{L}$, $V_{\text{bolhas de ar}} = 50 \text{ }\mu\text{L}$, vazão = $2,0 \text{ mL min}^{-1}$, um ciclo de amostragem e ácido ascórbico como redutor, foram feitos testes para avaliar a resposta linear em duas diferentes concentrações de ácido ($0,35$ e $0,70 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$) e em água (Figura 3.7). Foi observada resposta linear entre $0,50$ e $25,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$ descrita pelas equações ($A = 0,0402 + 0,0377C \text{ (mg L}^{-1} \text{ P)}$, $r = 0,999$ em água; $A = 0,0185 + 0,0347 C \text{ (mg L}^{-1} \text{ P)}$, $r = 0,999$ em $0,35 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$; $A = 0,0413 + 0,0291C \text{ (mg L}^{-1} \text{ P)}$, $r = 0,999$ em $0,70 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$). Esta perda de sensibilidade está de acordo com a discussão apresentada anteriormente.

Limite de detecção de $0,024 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$ (99,7% de confiança), coeficiente de variação de 3,5% ($n = 10$) e frequência de amostragem de 38 medidas/hora foram estimados. O consumo de reagentes por determinação foi de $5,0 \text{ mg}$ de ácido ascórbico e $0,60 \text{ mg}$ de molibdato de amônio. O tempo de

residência foi estimado em 150 s, o que permite diminuir efeitos de matriz, como descrito na Figura 1.10.

Figura 3.7 – Curvas analíticas para quantificação de fósforo em extratos com acidez diferente: (■) H₂O, (●) 0,35 mol L⁻¹ HNO₃, (▲) 0,70 mol L⁻¹ HNO₃. As barras de erro indicam estimativas de desvio padrão (n = 3).

3.2 Determinação de fósforo total

Para a determinação de fósforo total, foi realizada uma digestão ácida assistida por microondas, em sistema fechado, no qual se trabalha com pressões e temperaturas elevadas diminuindo o tempo de decomposição, o consumo de reagentes e o risco de contaminação. Vários parâmetros importantes como: massa da amostra, volume de ácido, temperatura e tempo de aquecimento foram avaliados para melhorar a eficiência da decomposição do material vegetal.

O aquecimento por microondas ocorre mais rapidamente em comparação ao aquecimento por condução, já que não é necessário aquecer o frasco da amostra, pois este é transparente às microondas. Desta forma, a solução no interior do frasco se aquece mais rapidamente, sendo a temperatura

da solução maior que a do próprio frasco. Em um aquecimento por condução, há primeiro o aquecimento do frasco seguido do aquecimento da solução no interior.

Fornos de microondas comerciais trabalham com uma frequência de 2450 MHz que equivale a um quantum de energia de 0,0016 eV. Esta energia não é suficiente para a decomposição de substâncias orgânicas, já que uma simples ligação de hidrogênio entre moléculas de água (H_2O) possui um quantum de energia de 0,21 eV. Para solucionar este problema, empregam-se diferentes tipos de ácidos. O mais utilizado é o HNO_3 , devido à simplicidade de manipulação, facilidade de purificação e capacidade oxidativa para compostos orgânicos em amostras biológicas. Os reagentes utilizados precisam além de absorver as microondas, convertê-las em calor. A água é uma molécula adequada pois possui uma elevada capacidade de conversão (elevado fator de dissipação). Desta forma, é interessante a utilização de ácidos diluídos, nos quais a água aumenta a eficiência do ácido na decomposição³⁹. Soluções diluídas de HNO_3 têm sido usadas com sucesso para digestão de plantas, gerando baixos valores de branco e baixo desvio padrão relativo⁴⁰. No entanto, em geral, a decomposição requer H_2O_2 como oxidante auxiliar⁴¹. Procedimentos convencionais para digestão assistida por microondas recomendam o uso de 0,4 – 2,0 mL de HNO_3 concentrado para 200 mg de amostra de material vegetal, sendo requerido o uso de H_2O_2 na decomposição³⁹.

Digeridos com alta concentração ácida dificultam a determinação de fosfato pelo método do azul de molibdênio, como discutido no item 3.1.2. Além disso, como a reação ocorre em meio redutor, a presença de H_2O_2 é indesejável. Para a decomposição das amostras, foram avaliados dois programas de aquecimento, sendo um controlado pela potência (Programa 1, Tabela 2.2) e outro pela temperatura (Programa 2, Tabela 2.3).

Visando diminuir o consumo de ácido e evitar o emprego de H_2O_2 , diferentes condições para decomposição do material vegetal foram avaliadas. Os volumes de ácido, as massas de amostras e uma avaliação qualitativa dos digeridos estão descritos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Avaliação de diferentes condições para decomposição do material vegetal.

Programa	Massa (mg)	Volume de HNO₃ (mL) **	Cor	Resíduo sólido
1	200	2,0*	incolor	não
1	200	0,5	amarelada	sim
1	200	1,0	amarelada	sim
1	100	0,5	amarelada	sim
2	100	1,0	incolor	não
2	100	0,5	amarelada	não

* Adição de 1,0 mL de H₂O₂ 30 % (m / m).

** Todos os volumes foram completados com água deionizada para 6 mL antes do aquecimento em forno de microondas.

Empregando o programa com controle de potência apresentado na Tabela 2.2, foi feita a digestão com 200 mg de amostra. A primeira digestão consistiu na adição de 2,0 mL de HNO₃ e 1,0 mL de H₂O₂. O digerido final não apresentou coloração nem resíduo sólido, indicando a decomposição completa. Outras duas digestões consistiram na adição de 0,5 e 1,0 mL de HNO₃, sem adição de H₂O₂. Ambos os extratos apresentaram coloração amarelada e resíduo sólido, indicando a decomposição incompleta da amostra. Uma última digestão empregando o mesmo programa foi feita para 100 mg de amostra com a adição de 0,5 mL de HNO₃, também não sendo observada digestão completa da amostra. Isto ocorreu porque foram empregadas temperaturas e potências relativamente baixas, que não foram suficientes para a digestão completa da amostra. O segundo programa, que permitia atingir temperaturas mais elevadas (até 220 °C), foi então avaliado. Adicionalmente, procurou-se diminuir a massa de amostra.

Duas digestões com 100 mg de amostra foram feitas, com adição de 1,0 e 0,5 mL de HNO_3 . O extrato que continha 1,0 mL de HNO_3 não apresentou coloração, diferente do extrato que continha 0,5 mL de HNO_3 que apresentou coloração levemente amarelada. Ambos não apresentaram resíduos sólidos, mostrando que a decomposição foi mais eficiente devido às altas temperaturas alcançadas (até 220 °C).

Foi obtido um espectro de absorção do digerido obtido com 0,50 mL HNO_3 (Figura 3.8), sendo comprovado que não há absorção significativa no comprimento de onda de medida do azul de molibdênio (660 nm). Visando verificar se seria possível a decomposição do material vegetal com 0,5 mL HNO_3 , 4 replicatas com volume de ácido de 0,5 ou 1,0 mL foram efetuadas. Os valores estão mostrados na Tabela 3.3. A comparação desses dois procedimentos empregando-se o teste t mostrou que no nível de 95% de confiança, os resultados não são significativamente diferentes. Desta forma optou-se pelo o menor volume de HNO_3 (0,5 mL), para a decomposição do material vegetal.

Figura 3.8 – Espectro de absorção do digerido no forno microondas, empregando o programa com controle de temperatura com adição de 0,5 mL de HNO_3 .

Tabela 3.3 – Concentrações de fósforo total encontradas em crotalária após digestão assistida por microondas com adição de 0,50 e 1,0 mL de HNO_3 .

Amostra	0,50 mL HNO_3	1,0 mL HNO_3
	mg P / g de planta	mg P / g de planta
1	$2,30 \pm 0,05$	$2,05 \pm 0,01$
2	$2,15 \pm 0,04$	$2,13 \pm 0,01$
3	$2,08 \pm 0,03$	$2,17 \pm 0,03$
4	$2,24 \pm 0,03$	$2,17 \pm 0,01$

A quantidade de ácido residual em cada solução após a digestão foi determinada por titulação ácido – base. Nas decomposições com 1,0 mL de HNO_3 concentrado a porcentagem de ácido residual foi de 87,1 % em relação a quantidade inicial, enquanto nas soluções contendo 0,50 mL de HNO_3 concentrado, este valor foi de 65,7 %. Desta forma, mesmo empregando 0,5 mL HNO_3 , a quantidade remanescente de ácido é considerável, demonstrando excesso mesmo com a decomposição com soluções diluídas.

Medidas em espectrômetro de emissão ótica com plasma induzido em argônio foram feitas nas amostras contendo 0,50 mL de HNO_3 após a digestão (Tabela 3.4). A comparação dos resultados obtidos pelos dois procedimentos para a determinação de fósforo total (MSFA e ICP–OES), empregando o teste-t, mostrou que os resultados não são significativamente diferentes no nível de 95% de confiança.

O procedimento proposto permite reduzir drasticamente o tempo de decomposição e o consumo de ácidos. Por exemplo, alguns procedimentos clássicos de decomposição nitro-perclórica para a decomposição de materiais vegetais empregam 5 mL HNO_3 e 1 mL HClO_4 para a decomposição de 0,5 g de material vegetal. Em alguns casos, o tempo de decomposição é superior a 24 h⁴².

Tabela 3.4 - Concentrações de fósforo total determinadas em *Crotalaria Juncea* empregando MSFA e ICP–OES.

Amostra	MSFA	ICP- OES
	mg P / g de planta	mg P / g de planta
1	2,30 ± 0,05	2,36 ± 0,01
2	2,15 ± 0,04	2,23 ± 0,01
3	2,08 ± 0,03	2,32 ± 0,01
4	2,24 ± 0,03	2,31 ± 0,01

Em algumas digestões ácidas em forno microondas foi observado que diferentes porções da mesma amostra após a decomposição possuíam colorações diferentes (Figura 3.9), dependendo da posição de cada recipiente no forno. As amostras mais amarelas apresentaram menor quantidade de fósforo pelo procedimento em MSFA, que requer a conversão prévia das espécies de fósforo em ortofosfato. Assim, a coloração das amostras é um indicativo de que a digestão não havia se completado. A partir desta observação, espectros de absorção (Figura 3.10) foram obtidos para as amostras que ocupavam posições diferentes no forno e o resultado foi comparado à diferença dos resultados obtidos nos métodos MSFA e ICP – OES, demonstrada na Tabela 3.5. Quanto menor à diferença entre os métodos, maior a eficiência de conversão das espécies de fósforo orgânico em ortofosfato.

Figura 3.9 – Digeridos de material vegetal empregando microondas com adição de 0,5 mL de HNO_3 . (Frascos 7, 9, 11 e 15). Frasco 13 = branco.

Figura 3.10 – Espectros de absorção dos digeridos em microondas empregando 0,50 mL de HNO_3 . Frascos: A: 7; B: 9; C: 15; D: 11.

Tabela 3.5 – Diferença dos resultados obtidos na determinação de fósforo empregando os procedimentos por ICP–OES e MSFA.

Frascos	Diferença
7	0,06
9	0,08
11	0,24
15	0,07

Observando a Tabela 3.5 juntamente com a Figura 3.10, nota-se que a amostra presente no frasco 11 apresentou maior diferença entre as concentrações de fósforo determinadas pelos 2 procedimentos e a maior absorção de radiação em comprimentos de onda abaixo de 480 nm. Em geral, notou-se que as amostras de coloração menos intensa apresentaram menor diferença entre as concentrações de fósforo determinadas pelos 2 procedimentos e menor absorção de radiação. Isso mostra que para as amostras posicionadas em alguns frascos, a digestão pode não ter sido completa. Entretanto, este resultado pode ser devido à redução da pressão interna nos frascos, impedindo que a temperatura máxima fosse atingida. Esta conclusão deve-se à observação

de que nas primeiras decomposições efetuadas e em decomposições em forno de microondas de outro fabricante não foram observadas diferenças significativas na coloração dos digeridos. Adicionalmente, verificou-se a perda de material em alguns dos frascos de decomposição.

3.3 Extração de fósforo solúvel

O extrato solúvel da amostra de planta apresenta em sua composição fósforo nas formas inorgânica e orgânica, lembrando que o fósforo inorgânico apresenta-se prioritariamente da forma H_2PO_4^- e o fósforo orgânico fazendo parte de biomoléculas¹³. Geralmente, mais de 50% do fósforo presente nos tecidos de plantas está na forma inorgânica¹⁴.

3.3.1 Extração de fósforo inorgânico solúvel

Procedimentos convencionais empregam $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ HClO}_4$ nas extrações de fósforo solúvel^{15,16}. Procedimentos alternativos foram avaliados visando reduzir tempo, o consumo de reagentes e geração de resíduos

Na avaliação do tempo necessário para extração completa do fósforo solúvel, foi empregado $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ em substituição a $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ HClO}_4$. Inicialmente, foi avaliado o efeito do tempo de extração em até 120 minutos de agitação, com medidas realizadas em intervalos de 20 minutos, não sendo verificada nenhuma diferença significativa. Estudos de extração durante 20 minutos de agitação, com medidas realizadas em intervalos de 5 minutos, foram então efetuados, podendo ser verificado que a partir de 10 minutos a extração se completa (Figura 3.11). A mesma eficiência de extração foi estimada com 10 e 120 min.

Figura 3.11 – Avaliação do tempo de extração empregando $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ como extrator. As barras de erro indicam estimativas de desvio padrão ($n = 3$).

Com tempo de agitação de 10 min, a mesma eficiência de extração foi obtida empregando $0,20 \text{ mol L}^{-1} \text{ HClO}_4$, concentrações menores que $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 ou água como extrator (Figura 3.12), comprovando que o HNO_3 e água podem substituir o HClO_4 como extratores. Cabe ressaltar que a diminuição de absorbância para o extrato com concentração $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ deve-se ao efeito da acidez sobre a redução do ácido fosfomolibdico pelo ácido ascórbico, como discutido anteriormente. Para comprovar a eficiência da extração, o procedimento empregando água como extrator foi realizado duas vezes na mesma amostra. Obteve-se $(1,35 \pm 0,06) \text{ mg P / g}$ de planta na primeira extração, e $(0,017 \pm 0,009) \text{ mg / g}$ de planta na segunda extração, comprovando a eficiência do processo.

Figura 3.12 – Avaliação da eficiência de extração empregando água, HClO₄ e HNO₃ como extratores. Tempo de agitação = 10 minutos. As barras de erro indicam estimativas de desvio padrão (n = 3).

Levando em consideração que fosfatos de Ca ($K_s = 2,7 \times 10^{-7}$) e Mg ($K_s = 1,0 \times 10^{-13}$) são pouco solúveis em água, o emprego de água como extrator poderia não ser eficiente, pois o fósforo inorgânico poderia estar associado a tais elementos. Os elementos Ca e Mg foram então determinados por ICP-OES nos extratos em dois meios diferentes (água deionizada e $0,20 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$), sendo os resultados mostrados na Tabela 3.6. Como esperado, maior eficiência de extração dos íons metálicos foi observada em meio ácido. No entanto, os resultados (determinados por ICP-OES) de extração de fósforo nos dois meios foram concordantes ($1,82 \pm 0,01$) mg P / g de planta em H₂O e ($1,82 \pm 0,01$) mg P / g de planta em $0,20 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$, permitindo concluir que os elementos Ca e Mg não estão associados ao fosfato. A diferença entre as concentrações de fósforo determinadas por ICP-OES (fósforo total solúvel) e pelo sistema MSFA (fósforo inorgânico solúvel) refere-se à concentração de fósforo orgânico solúvel.

Tabela 3.6 – Determinação de Ca e Mg na planta *Crotalaria juncea* por ICP – OES em dois meios diferentes.

Elemento	Água deionizada mg / g de planta	0,20 mol L ⁻¹ HNO ₃ mg / g de planta
Ca	5,21 ± 0,03	9,63 ± 0,14
Mg	2,06 ± 0,01	2,88 ± 0,01

3.3.2 Determinação de fósforo orgânico solúvel

A degradação dos compostos de fósforo orgânico com formação de ortofosfato tem sido efetuada mediante fotodegradação ácida ou aquecimento em autoclave⁴³ na presença de persulfato como agente de decomposição ou aquecimento em microondas na presença de ácido. O persulfato é um agente altamente oxidante, que na presença de radiação UV gera radicais altamente reativos⁴⁴ (Reações 3.1 e 3.2).

(M = compostos orgânicos)

O sistema MSFA desenvolvido responde apenas ao fósforo inorgânico, sendo necessária a conversão prévia do fósforo orgânico. Baseado nestas informações procurou-se desenvolver um método simples e de baixo custo para a decomposição de fósforo orgânico presente no extrato solúvel da planta analisada (*Crotalaria Juncea*). Foram investigados procedimentos envolvendo aquecimento assistido por microondas e fotodegradação na presença de persulfato em meio ácido.

Na decomposição do fósforo orgânico solúvel empregando aquecimento assistido por microondas, utilizou-se o mesmo programa com controle temperatura empregado na decomposição do fósforo total (Tabela 2.3).

Como o frasco do forno microondas deveria conter no mínimo 6,0 mL, foram adicionados ao tubo 5,5 mL do extrato solúvel e 0,50 mL de HNO_3 . Ao final da digestão, os digeridos foram transferidos para tubos graduados (50,0 mL) e completados para 20,0 mL com água deionizada, previamente à determinação de fosfato. Os resultados referentes a quatro decomposições apresentaram uma média de $(1,82 \pm 0,01)$ mg P / g de planta, sendo concordantes com os obtidos por ICP – OES $(1,82 \pm 0,01)$ mg P / g de planta a nível de confiança de 95%, comprovando a eficiência da decomposição.

No procedimento envolvendo fotodegradação, os reagentes e concentrações foram baseados em estudos que empregam persulfato de potássio como agente oxidante em meio ácido⁴⁵. Como discutido anteriormente, considerando a determinação pelo método do azul de molibdênio, deve-se minimizar a concentração de ácido e de espécies oxidantes. Desta forma, foi inicialmente avaliado o efeito dos reagentes (H_2SO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) na determinação de fosfato.

A avaliação feita para o H_2SO_4 mostrou que o volume de ácido empregado (30 μL) na fotodegradação não interferiu nas medidas (Figura 3.13). Empregando 0,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, tanto para a solução 10 mg L^{-1} P quanto para o extrato de material vegetal, houve uma pequena diminuição de sinal analítico, de acordo com o esperado, já que se trata da adição de um agente altamente oxidante.

Na primeira avaliação da fotodegradação do extrato solúvel empregou-se o fotoreator mostrado na Figura 2.4, no qual a amostra era impulsionada a 2,0 mL min^{-1} , passando por um reator de Teflon que envolvia a lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão com um volume igual a 4,0 mL. Na Figura 3.13, pode-se verificar que a degradação do fósforo orgânico não foi eficiente. Isso provavelmente se deve ao curto tempo de exposição da amostra à radiação ultravioleta (apenas 2 minutos) e à atenuação do feixe de radiação (principalmente em baixos comprimentos de onda) pelo Teflon.

Figura 3.13 – Efeito da presença de H₂SO₄ e persulfato de amônio sobre o sinal analítico em sistema MSFA e sobre a degradação de fósforo orgânico empregando o fotoreator. As barras de erro indicam estimativa de desvio padrão (n = 3).

Para obtenção de maior eficiência na degradação do fósforo orgânico, outros estudos visando aumentar a área de contato da amostra com a radiação UV, a potência da radiação que atingia a amostra e o tempo de irradiação foram realizados. Nestes estudos, avaliaram-se duas massas de persulfato de amônio (0,1 e 0,2 g) e dois tempos de exposição à radiação ultravioleta (20 e 30 min), empregando uma lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão localizada acima do béquer contendo a amostra e os reagentes. A lâmpada foi posicionada em duas posições e distâncias diferentes (horizontal e vertical) como descrito no item 2.2.4.2.

Empregando 0,2 g (NH₄)₂S₂O₈ em 20 mL de extrato foi avaliado o efeito do tempo de irradiação (10, 20 e 30 min). Visualmente foi observado que a coloração amarela do extrato diminuía gradualmente com o tempo de exposição à radiação, sendo observada solução transparente com tempo de irradiação de 30 min. Os resultados obtidos para irradiação por 30 min, com a lâmpada em posição horizontal e a 10 cm distante do béquer são apresentados na Tabela 3.7. Neste caso, as soluções de referência continham as mesmas quantidades de (NH₄)₂S₂O₈ que os extratos. Os resultados não foram concordantes com os

obtidos ICP–OES ($1,82 \pm 0,01$) mg P / g de planta. Provavelmente, a baixa eficiência do procedimento foi devida à longa distância entre a lâmpada de mercúrio e a solução (10,0 cm), o que reduz a potência da radiação incidente.

Tabela 3.7 – Dados referentes à determinação de fósforo total solúvel empregando fotodegradação utilizando uma lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão localizada 10 cm acima do béquer.

Massa de persulfato (g)	MSFA mg P / g de planta
0,20	$1,21 \pm 0,01$
0,10	$1,32 \pm 0,01$

Com a lâmpada em posição vertical próxima à solução, os efeitos da massa de persulfato adicionada (0,10 e 0,20 g) e do tempo de exposição à radiação ultravioleta (20 e 30 minutos) foram avaliados (Tabela 3.8). Os estudos relacionados ao tempo de irradiação mostraram que 20 minutos são suficientes para uma degradação completa. Empregando a menor quantidade de persulfato de amônio (0,10 g) os resultados foram mais satisfatórios, provavelmente devido à ação oxidante do persulfato no sistema de medida, como discutido no item 1.6. Com a menor concentração de persulfato de amônio, a interferência nas medidas foi pouco significativa, devido ao excesso do agente redutor (ácido ascórbico). Os resultados foram concordantes com os obtidos por ICP–OES a nível de confiança de 95%, demonstrando a eficiência do processo de fotodegradação.

Tabela 3.8 – Dados referentes à determinação de fósforo total solúvel após fotodegradação do fósforo orgânico solúvel utilizando uma lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão posicionada verticalmente.

Tempo de degradação (min)	mg P / g planta	
	0,20 g de persulfato	0,10 g de persulfato
20	$1,51 \pm 0,05$	$1,75 \pm 0,07$
30	$1,51 \pm 0,03$	$1,75 \pm 0,03$

3.4. Frações de fósforo determinadas no material vegetal

As frações de fósforo determinadas no material vegetal (*Crotalaria*) estão descritas na Tabela 3.9.

Tabela 3.9 – Frações de fósforo determinadas pelos procedimentos estudados neste trabalho.

Espécies de P	mg de P / g de planta	
P inorgânico solúvel	1,35 ± 0,06	
P total	2,19 ± 0,09	
	microondas	fotodegradação
P total solúvel	1,82 ± 0,01	1,75 ± 0,07
P orgânico solúvel	0,47 ± 0,06	0,40 ± 0,09
P insolúvel (orgânico)	0,37 ± 0,09	0,44 ± 0,11

Os resultados obtidos pelos procedimentos empregando aquecimento assistido por microondas e fotodegradação na presença de persulfato não são significativamente diferentes a nível de confiança de 95%, indicando que ambos os procedimentos podem ser empregados. Na planta de *Crotalaria juncea*, a maior parte do fósforo (80%) encontra-se na forma solúvel, com predominância de fósforo inorgânico (75%). Assumindo a predominância de espécies orgânicas na fração de fósforo insolúvel, 38% do fósforo presente na planta encontra-se associado a espécies orgânicas.

3.5 Procedimentos recomendados para o fracionamento de fósforo em tecido vegetal (*Crotalaria juncea*)

3.5.1 Procedimento recomendado para determinação de fósforo total

Para a determinação de fósforo total, emprega-se digestão ácida assistida por microondas, com 100 mg de material vegetal e 500 µL HNO₃ concentrado, completando o volume com água deionizada para 6,0 mL. Emprega-se o programa de aquecimento descrito na Tabela 2.3 com duração total de 49 min.

3.5.2 Procedimento recomendado para extração de fósforo solúvel

Em tubos graduados contendo 200 mg da planta em estudo, seca e moída, emprega-se água deionizada como extrator (20,0 mL) sob agitação por 10 minutos. A mistura é filtrada previamente às determinações de fósforo inorgânico no extrato solúvel.

3.5.3 Procedimento recomendado para determinação de fósforo total solúvel

Após o processo de extração de fósforo solúvel (item 3.5.2), emprega-se o procedimento envolvendo digestão ácida assistida por microondas ou fotodegradação com radiação ultravioleta.

Empregando digestão ácida assistida por microondas, em cada frasco de decomposição adiciona-se 5,5 mL do extrato solúvel e 500 μL HNO_3 concentrado. Emprega-se o programa de aquecimento descrito na Tabela 2.3.

Empregando fotodegradação em meio ácido, em um béquer adiciona-se 8,0 mL do extrato solúvel, 0,10 g de persulfato de amônio e 30 μL de H_2SO_4 concentrado. A solução é irradiada com ultravioleta durante 20 minutos, com a lâmpada em posição vertical e o mais próximo possível da amostra.

A concentração de fósforo orgânico solúvel é obtida por diferença das concentrações determinadas pelos procedimentos descritos nos itens 3.5.3 e 3.5.2.

4. Conclusões

O sistema de análises em fluxo monossegmentado desenvolvido para a determinação de fosfato permitiu longos tempos de residência com baixa dispersão minimizando o efeito de matriz. A sensibilidade para determinação de fosfato diminuiu em no máximo 8% nas diferentes concentrações ácidas encontradas nos extratos. A inserção da amostra entre duas bolhas de ar evitando o contato com a solução transportadora e permitindo melhores condições de mistura evitou perturbações por efeito Schlieren. A automação através do processo de multicomutação possibilitou maior versatilidade na inserção das bolhas de ar, reagentes e amostra e minimizou o consumo de reagentes e a geração de resíduos.

O desenvolvimento de procedimentos para o fracionamento de fósforo visou menor tempo de análise, baixo consumo de reagentes e diminuição da geração de resíduos. O procedimento para a extração de fósforo solúvel possibilitou o emprego de água como solução extratora substituindo os ácidos (HNO_3 e HClO_4) empregados em métodos convencionais. Na determinação de fósforo total e total solúvel, o emprego de digestão ácida assistida por microondas possibilitou um menor tempo de análise (30 min) e redução do volume de ácido (500 μL HNO_3 concentrado por determinação) sem requerer a adição H_2O_2 . Além disto, o procedimento minimiza o risco de contaminação por se tratar de um sistema fechado. Empregando fotodegradação ácida na presença de radiação ultravioleta o procedimento mostrou-se eficiente na decomposição do fósforo orgânico solúvel utilizando pequenas quantidades de persulfato de amônio e H_2SO_4 , além de ser simples e de baixo custo. Para simplificação dos procedimentos, a extração de fósforo solúvel poderia ser efetuada com 0,35 mol L^{-1} HNO_3 , de forma a uniformizar a acidez em todas as soluções, evitando a necessidade de se preparar soluções de referência em diferentes concentrações ácidas.

Para estudos agrônômicos, nos quais em geral não há necessidade de uma especiação química detalhada, os procedimentos desenvolvidos oferecem vantagens quando comparados aos procedimentos convencionais,

como menor tempo de análise, baixo consumo de reagentes e menor geração de resíduos.

5. Referências bibliográficas

1. D.M. TEMPLETON, F. ARIESE, R. CORNELIS, L. DANIELSSON, H. MUNTAU, H.P. VAN LEEWEN, R. LOBINSKI, *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches*, Pure and Appl. Chem. 72 (2000) 1453 (IUPAC recommendations 2000).
2. L. CAMPANELLA, K. PYRZYNSKA, M. TROJANOWICZ, *Chemical speciation by flow injection analysis*, Talanta 43 (1996) 825.
3. J.F. VAN STADEN, R.I. STEFAN, *Chemical Speciation by sequential injection analysis: an overview*, Talanta 64 (2004) 1109.
4. A.K. DAS, M. DE LA GUARDIA, M.L. CERVERA, *Literature survey of on-line elemental speciation in aqueous solutions*, Talanta 55 (2001) 1.
5. M.D. LUQUE DE CASTRO, D.W. BRYCE, A. IZQUIERDO, *Speciation with unsegmented continuous systems*, Talanta 42 (1995) 1215.
6. P. LINARES, M.D. LUQUE DE CASTRO, M. VALCÁRCEL, *Spectrophotometric determination of selenium(IV) and selenium(VI) with flow injection*, Analyst 111 (1986) 1405.
7. F. LÁZARO, M.D. LUQUE DE CASTRO, M. VALCÁRCEL, *Doubly stopped flow: a new alternative to simultaneous kinetic multideterminations in unsegmented flow systems*, Anal. Chem. 59 (1987) 950.
8. J.S. COSANO, J.L. CALLE, J.L. PINILLOS, P. LINARES, M.D. LUQUE DE CASTRO, *Simultaneous determination of ammonia and urea with an asymmetric merging zones/flow-injection configuration*, Anal. Chim. Acta 221 (1989) 173.
9. F.R.P. ROCHA, B.F. REIS, *A flow system exploiting multicommutation for speciation of inorganic nitrogen in waters*, Anal. Chim. Acta 409 (2000) 227.
10. A.F. OLIVEIRA, J.A. NÓBREGA, O. FATIBELLO-FILHO, *Asynchronous merging zones system: spectrophotometric determination of Fe(II) and Fe(III) in pharmaceutical products*, Talanta 49 (1999) 505.
11. T.P. LYNCH, N.J. KERNOGHAN, J.N. WILSON, *Speciation of metals in solution by flow injection analysis. Part 1. Sequential spectrophotometric and atomic-absorption detectors*, Analyst, 109 (1984) 839.
12. F. CAÑETE, A. RIOS, M.D. LUQUE DE CASTRO, M. VALCÁRCEL, *Determination of pH, conductivity, residual chlorine, ammonium and nitrite ions in water with an unsegmented flow configuration*, Analyst 113 (1988) 739.

13. M. EPSTEIN, *Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas*, Livros Técnicos e Científicos, 1975.
14. R.L BIELESKI, I.B. FERGUSON, *Physiology and metabolism of phosphate and its compounds*. In: A. LAUCHLI,; R.L. BIELESKI, (Ed.) *Inorganic plant nutrition*. Berlin: Springer-Verlag, 1983, p.442.
15. A.E. FURTINI NETO, N.F. BARROS, R.F. NOVAIS, M.F.G. OLIVEIRA, *Frações fosfatadas em mudas de Eucalyptus*, Revista Brasileira de Ciência do Solo 22 (1998) 267.
16. E. HOGUE, G.E. WILCOX, D.J. CANTLIFFE, *Effect of soil phosphorus levels on phosphate fractions in tomato leaves*, Journal of the American Society for Horticultural Science 95 (1970) 174.
17. D.P. SCHACHTMAN, R.J. REID, S.M. AYLING, *Phosphorus uptake by plants: from soil to cell*, Plant Physiology, 116 (1998) 447.
18. J.M. ESTELA, V. CERDÀ, *Flow analysis techniques for phosphorous: an overview*, Talanta 66 (2005) 307.
19. W. Maher, L. Woo, *Procedures for the storage and digestion of natural waters for the determination of filterable reactive phosphorous, total filterable phosphorous and total phosphorous*, Anal. Chim. Acta 375 (1998) 5.
20. T. PÉREZ-RUIZ, C. MARTÍNEZ-LOZANO, V. TOMÁS, J. MARTÍN, *Flow-injection spectrofluorimetric determination of dissolved inorganic and organic phosphorus in waters using on-line photo-oxidation*, Anal. Chim. Acta 442 (2001) 147.
21. I.D. MCKELVIE, B.T. HART, *Speciation of dissolved phosphorous in environmental samples by gel filtration and flow-injection analysis*, Talanta 40 (1993) 1981.
22. I.D. MCKELVIE, B.T. HART, T.J. CARDWELL, R.W. CATTRALL, *Use of immobilized 3-phytase and flow injection for the determination of phosphorous species in natural waters*, Anal. Chim. Acta 316 (1995) 277.
23. E.C. VIEIRA, A.R.A. NOGUEIRA, *Orthophosphate, phytate, and total phosphorus determination in cereals by flow injection analysis*, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 1800.
24. A. CALEGARI, *Leguminosas para adubação verde de verão no Paraná*, Instituto Agrônômico do Paraná, Circular nº 80 (1995) 19.

-
25. A. CALEGARI, *Plantio direto: pequena propriedade sustentável*. Instituto Agrônomo do Paraná, Circular nº 101 (1998) 65.
 26. E.J. AMBROSANO, E.B. WUTKE, R.T. TANAKA, H.A.A. MASCARENHAS, N.R. BRAGA, T. MURAOKA, *Leguminosas para adubação verde: uso apropriado em rotação de culturas*, Campinas, 1997 (Apostila).
 27. E.A.G. ZAGATTO, F.R.P. ROCHA, P.B. MARTELLI, B.F. REIS, *Detecting and circumventing sources of inaccuracy in flow analysis*, Pure Appl. Chem. 73 (2001) 45.
 28. F.R.P. ROCHA, J.A. NÓBREGA, *Efeito Schlieren em sistemas de análise por injeção em fluxo*, Quím. Nova 19(6) (1996) 636.
 29. J. RÜZICKA, E.H. HANSEN, *Flow injection analysis: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis*, Anal. Chim. Acta 78 (1975) 145.
 30. E.A.G. ZAGATTO, C.C. OLIVEIRA, C.H. COLLINS, *Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo (Recomendações - IUPAC 1994)*, Quím. Nova 22 (1999) 143.
 31. C. PASQUINI, W.A. OLIVEIRA, *Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromium(VI), ammonia, and phosphorous*, Anal. Chem. 57 (1985) 2575.
 32. V.O. BRITO, I.M. RAIMUNDO JR, *Simultaneous multiple injection in monosegmented flow analysis*, Anal. Chim. Acta 371 (1998) 317.
 33. M. SMIDERLE, B.F. REIS, F.R.P. ROCHA, *Monosegmented flow system exploiting multicommutation applied to spectrophotometric determination of manganese in soybean digests*, Anal. Chim. Acta 386 (1999) 129.
 34. P.B. MARTELLI, B.F. REIS, M. KORN, J.L.F.C. LIMA, *Automatic potentiometric titration in monosegmented flow system exploiting binary search*, Anal. Chim. Acta 387 (1999) 165.
 35. J.BASSETT, R.C. SENNEY, G.H. JEFFERY, J.MENDHAM, *Análise inorgânica quantitativa*, 4ª ed., Rio de Janeiro – RJ, Editora Guanabara S.A., 1981, p.561.
 36. F. MAS-TORRES, J.M. ESTELA, M. MIRÓ, A. CLADERA, V. CERDÀ, *Seqüencial injection spectrophotometric determination of orthophosphate in beverages, wastewaters and urine samples by electrogeneration of molybdenum blue using tubular flow-through electrodes*, Anal. Chim. Acta 510 (2004) 61.

-
37. F.R.P. Rocha, *Determinações sequenciais em sistemas de injeção em fluxo empregando multicomutação e multidetecção*, São Carlos - SP, Departamento de química, Universidade Federal de São Carlos - 2000, Tese de doutorado.
 38. A. CAVICCHIOLI, I.G.R. GUTZ, *In-line TiO₂-assisted photodigestion of organic matter in aqueous solution for voltammetric flow analysis of heavy metals in water samples*, Anal. Chim. Acta 445 (2001) 127.
 39. G.C.L. ARAÚJO, M.H. GONZALEZ, A.G. FERREIRA, A.R.A. NOGUEIRA, J.A. NÓBREGA, *Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials*, Spectrochim. Acta Part B 57 (2002) 2121.
 40. C. ESSLEMONT, W. MAHER, P. FORD, F. KRIKOWA, *The determination of phosphorus and other elements in plant leaves by ICP-MS after low-volume microwave digestion with nitric acid*, At. Spectrosc. 21(2) (2000) 42.
 41. S. WU, X. FENG, A. WITTMEIER, *Microwave digestion of plant and grain reference materials in nitric acid and hydrogen peroxide for the determination of multi-elements by inductively coupled plasma mass spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom. 12 (1997) 797.
 42. F.J. KRUG, H. BERGAMIN FILHO, E.A.G. ZAGATTO, S.S. JORGENSEN, *Rapid determination of sulphate in natural waters and plant digests by continuous flow injection turbidimetry*, Analyst 102 (1977) 503.
 43. D.M.W. PEAT, I.D. MCKELVIE, G.P. MATTHEWS, P.M. HAYGARTH, P.J. WORSFOLD, *Rapid determination of dissolved organic phosphorus in soil leachates and runoff waters by flow injection analysis with on-line photo-oxidation*, Talanta 45 (1997) 47.
 44. P.D. TZANAVARAS, D.G. THEMELIS, *Novel flow injection spectrophotometric determination of fosinopropil using UV-assisted digestion and an orthophosphates calibration graph*, Anal. Chim. Acta 481 (2003) 321.
 45. K. HIGUCHI, H. TAMANOUCHI, S. MOTOMIZU, *On-line photo-oxidative decomposition of phosphorus compounds to orthophosphate and its application to flow injection spectrophotometric determinations of total phosphorus in river and waste waters*, Anal. Sci. 14 (1998) 941.