UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

Diogo Librandi da Rocha

**Desenvolvimento de procedimentos analíticos
em fluxo com multicomutação e foto-oxidação
em linha para a determinação espectrofotométrica
de espécies de interesse ambiental,
alimentício e clínico**

Versão corrigida da Tese defendida conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

07/05/2013

DIOGO LIBRANDI DA ROCHA

**Desenvolvimento de procedimentos analíticos em
fluxo com multicomutação e foto-oxidação em linha
para a determinação espectrofotométrica de espécies
de interesse ambiental, alimentício e clínico**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química*

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Rocha, Diogo Librandi da
R672d Desenvolvimento de procedimentos analíticos em fluxo com
multicomutação e foto-oxidação em linha para a determinação
espectrofotométrica de espécies de interesse ambiental, alimentício
e clínico / Diogo Librandi da Rocha. -- São Paulo, 2013.
167p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Rocha, Fábio Rodrigo Piovezani

1. Análise por injeção em fluxo : Química 2. Espectrofotometria
3. Preparação de amostras : Química analítica 4. Cereal : Análise :
Tecnologia de alimentos 5. Análise de urina : Medicina 6. Água :
Análise química I. T. II. Rocha, Fábio Rodrigo Piovezani, orientador.

543.08 CDD

À minha família, por transmitirem os bons princípios que regem a minha vida, com amor e carinho. Nada que até hoje se concretizou seria possível sem seus incentivos e confiança.

*Ao meu orientador Prof. Fábio,
por compartilhar experiências e
conhecimentos. Sua competência,
dedicação, compreensão e
paciência são admiráveis. Ainda
tenho muito a aprender com ele.*

*Aos verdadeiros amigos que
sempre se dispuseram a ajudar
e compartilhar experiências, sem
nada pedirem em troca. Tão
importante quanto a seriedade
no trabalho, foram as risadas
nos momentos de descontração.*

*“Triste época! É mais fácil
desintegrar um átomo do que
um preconceito”.*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários, amigos e colegas do IQ-USP e do CENA-USP, pelos conhecimentos e experiências compartilhados, por todo o auxílio que puderam oferecer e pelos bons momentos que para sempre serão lembrados.

Aos Profs. Pedro Vitoriano de Oliveira e Maria Encarnación Vázquez Suárez Iha pela participação no Exame de Qualificação e pelas sugestões que enriqueceram o trabalho.

Aos Profs. Ivano G.R. Gutz, Lúcio Angnes, Lilian Rotschild, Claudimir L. do Lago, Fábio R. P. Rocha e Francisco J. Krug pela oportunidade de participar, como estagiário, das disciplinas de Química Analítica, ministradas no IQ-USP e CENA-USP.

À Prof^a. Wanessa Melchert Mattos (ESALQ/USP) pelas sugestões e comentários durante a revisão desta Tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas concedidas por 8 meses de doutorado e através do Programa de Aperfeiçoamento Didático (PAE).

Aos membros da banca da defesa de doutorado pela disponibilidade e pelos comentários e sugestões apresentados.

RESUMO

ROCHA, D. L. **Desenvolvimento de procedimentos analíticos em fluxo com multicomutação e foto-oxidação em linha para a determinação espectrofotométrica de espécies de interesse ambiental, alimentício e clínico.** 2013. 167 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2013.

A mecanização do preparo de amostras minimiza erros sistemáticos, a geração de efluentes e o tempo de análise. Sistemas em fluxo com microbombas solenoide (MPFS) atendem aos requisitos da mecanização de maneira robusta e versátil. Sendo assim, foram desenvolvidos procedimentos analíticos baseados em MPFS e foto-oxidação em linha visando ao fracionamento de fósforo em extratos de alimentos e águas naturais e à determinação de cloreto em águas naturais e urina. Fósforo é um nutriente importante cuja biodisponibilidade depende de sua forma química, tornando importante o fracionamento. O monitoramento de cloreto também é importante porque altas concentrações causam efeitos adversos ao meio ambiente e à saúde. Um MPFS foi proposto para o fracionamento de fósforo solúvel em extratos de alimentos, empregando foto-oxidação em linha do fósforo orgânico a ortofosfato, que foi quantificado pelo método do azul de molibdênio. Foi obtida resposta linear entre 5,0 e 40 mg L⁻¹ para fósforo inorgânico (P_I) e orgânico (P_O), com limites de detecção de 0,5 e 1,2 mg L⁻¹, respectivamente. Coeficientes de variação foram estimados em 1,2 e 3,6% para P_I e P_O, respectivamente, com frequência de amostragem de 80 determinações por hora. Por determinação, foram consumidos 380 µg de (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 620 µg de ácido ascórbico e 790 µg de K₂S₂O₈, gerando 2,5 mL de efluentes. Os resultados do fracionamento em extratos de alimentos concordaram com os obtidos pelo procedimento de referência (95% de confiança), baseado na digestão nitro-perclórica para a determinação de P_O. Um procedimento com MPFS e espectrofotometria de longo caminho óptico foi desenvolvido para o fracionamento de fósforo (inorgânico e orgânico dissolvidos) em águas naturais. A quantificação foi baseada no método do azul de molibdênio, após fotoconversão das espécies a ortofosfato. Resposta linear foi observada entre 10 e 75 µg L⁻¹ P, com limite de detecção de 2,0 µg L⁻¹. Foram obtidos coeficiente de variação de 1,8% e frequência de amostragem de 40 determinações por hora. Por determinação, foram consumidos 160 µg de (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 10 µg de SnCl₂, 640 µg de K₂S₂O₈ e 10 mg de NaOH, gerando 4,0 mL de efluentes. Os coeficientes angulares das curvas obtidas com 4 tipos diferentes de espécies de P_O indicaram conversão quantitativa e os resultados obtidos para amostras de águas de rios foram concordantes com os obtidos pelo procedimento descrito pela AOAC (95% de confiança). Um procedimento limpo foi também desenvolvido para a determinação de cloreto em águas naturais e urina, evitando o uso de reagentes tóxicos. O analito foi foto-oxidado a cloro, que foi determinado por espectrofotometria através da descoloração do alaranjado de metila. Resposta linear foi observada entre 2,0 e 20 mg L⁻¹, com limite de detecção de 0,7 mg L⁻¹. O coeficiente de variação foi estimado em 1,6%, com frequência de amostragem de 75 determinações por hora e consumo de 7,5 µg de corante por determinação. Espécies concomitantes usualmente presentes nas amostras não interferiram mesmo em excesso em relação às concentrações normalmente encontradas. Os resultados das análises das amostras concordaram com os obtidos pelo procedimento de referência (95% de confiança). Os procedimentos propostos são alternativas limpas e rápidas para o fracionamento de fósforo e determinação de cloreto.

Palavras-chave: Análises em fluxo; Química Verde; Foto-oxidação; Fracionamento de fósforo; Cloreto; Águas; Urina.

ABSTRACT

ROCHA, D. L. **Development of multicommuted flow-based analytical procedures with on-line photo-oxidation for the spectrophotometric determination of species of environmental, food and clinical relevance.** 2013. 167 p. PhD Thesis – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2013.

Mechanization of sample preparation minimizes systematic errors, waste generation and analysis time. Flow-based systems with solenoid micropumps (MPFS) attain the requirements for mechanization in a versatile and robust way. Therefore, analytical procedures based on MPFS and on-line photo-oxidation were developed aiming phosphorus fractionation in foodstuff and river waters and chloride determination in natural waters and urine. Phosphorus is an important nutrient for plants and animals and its bioavailability depends on its chemical form, making fractionation studies important. Chloride monitoring is relevant because the concentration unbalance leads to environmental and health issues. A MPFS was proposed for the fractionation of water soluble phosphorus in foodstuff, incorporating on-line photo-oxidation of organic phosphorus to phosphate, which was quantified by the spectrophotometric molybdenum blue method. Linear response was observed from 5 to 40 mg L⁻¹ for both inorganic (P_I) and organic (P_O) phosphorus, with detection limits of 0.5 and 1.2 mg L⁻¹, respectively. Coefficients of variation (n = 20) were estimated as 1.2 and 3.6% for P_I and P_O, respectively, with a sampling rate of 80 determinations per hour. Per determination, 380 µg of (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 620 µg of ascorbic acid and 790 µg of K₂S₂O₈ were consumed, generating 2.5 mL of waste. The results for food extracts agreed with those obtained by the reference procedure (95% confidence level) based on nitro-perchloric digestion for P_O determination. A MPFS procedure with long pathlength spectrophotometry was developed for phosphorus fractionation (dissolved organic and inorganic) in natural waters. Quantification was also based on the formation of molybdenum blue, after on-line photo-conversion of the organic species to orthophosphate. The analytical response was linear within 10 and 75 µg L⁻¹ with a detection limit of 2.0 µg L⁻¹. Coefficient of variation of 1.8% and sampling rate of 40 determinations per hour were achieved. Per determination, 160 µg of (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 10 µg of SnCl₂, 640 µg of K₂S₂O₈ and 10 mg of NaOH were consumed, generating 4.0 mL of waste. Slopes of analytical curves obtained for four different P_O species agreed with those obtained for orthophosphate, indicating quantitative conversion and the results for five freshwater samples agreed with those obtained by the AOAC reference procedure at 95% confidence level. A green procedure for chloride determination in urine and natural waters was also developed, avoiding hazardous chemicals. The analyte was on-line photo-converted to chlorine which was spectrophotometrically detected by methyl orange discoloration. The analytical response was linear from 2.0 to 20 mg L⁻¹ Cl with a detection limit of 0.7 mg L⁻¹. The coefficient of variation was 1.6% with a sampling rate of 75 determinations per hour, consuming 7.5 µg of the dye per determination. Usual concomitant species did not cause significant interference even in excess in relation to their highest concentration expected in the samples. The results for urine and water samples agreed with those obtained by the reference procedures at the 95% confidence level. The proposed procedures are environmentally friendly and fast alternatives for phosphorus fractionation and chloride determination.

Keywords: Flow analysis; Green Chemistry; Photo-oxidation; Phosphorus fractionation Chloride; Waters; Urine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Absorbância

AA – Ácido ascórbico

AF – Ácido fítico

AM – Alaranjado de metila

AOAC – Associação Oficial de Químicos Analíticos (do inglês *Association of Official Analytical Chemists*)

C_P – Concentração de fósforo

C_{PI} – Concentração de fósforo inorgânico

C_{PO} – Concentração de fósforo orgânico

C_{Cl} – Concentração de cloreto (mg L⁻¹)

CCD – Dispositivos de carga acoplada (do inglês *Charge-coupled devices*)

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CV – Coeficiente de variação

d.i. – Diâmetro interno

e⁻_{bc} – Elétron da banda de condução

e⁻_{bv} – Elétron da banda de valência

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês *Ethylenediaminetetracetic acid*)

E_L – Energia de ligação

EPA – Agência de Proteção Ambiental (do inglês *Environmental Protection Agency*)

FIA – Análise por injeção em fluxo (do inglês *Flow Injection Analysis*)

h⁺_{bv} – Lacuna da banda de valência

HPLC – Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

LD – Limite de detecção

LED – Diodo emissor de luz (do inglês *Light Emitting Diode*)

n – Número de replicatas

P_C – Fósforo total dissolvido condensado

P_I – Fósforo inorgânico dissolvido ou solúvel

P_{IC} – Fósforo inorgânico condensado

P_{IO} – Fósforo orgânico em suspensão

P_M – Fósforo mineral em suspensão

P_O – Fósforo orgânico dissolvido ou solúvel

P_{OC} – Fósforo orgânico condensado

P_T – Fósforo total dissolvido não-condensado

P_{TI} – Fósforo total em suspensão

P_{TS} – Fósforo total dissolvido ou solúvel

P_{TT} – Fósforo total

PTFE – Politetrafluoroetileno

QDs – *Quantum Dots*

S – Sinal analítico

SIA – Análise por injeção sequencial (do inglês *Sequential Injection Analysis*)

SMEW – Métodos oficiais de análise de águas e despejos (do inglês *Standard Methods of Examination of Waters and Wastewaters*)

USB – Porta serial universal (do inglês *Universal serial bus*)

UV – Ultravioleta

Lista de Tabelas

TABELA 2.1 – Rotina de acionamento das microbombas solenoide para o fracionamento de fósforo em extratos de cereais e leguminosas.....	47
TABELA 2.2 – Respostas obtidas com diferentes tratamentos para conversão de ácido fítico.....	52
TABELA 2.3 – Parâmetros avaliados durante a otimização do fracionamento de fósforo solúvel em alimentos.....	66
TABELA 2.4 – Características analíticas de alguns procedimentos para a determinação de espécies de fósforo.....	70
TABELA 2.5 – Teores médios e incertezas obtidos no fracionamento de fósforo em extratos de derivados de cereais e leguminosas.....	74
TABELA 3.1 – Rotina de acionamento das microbombas solenoide para o fracionamento de fósforo solúvel em águas naturais.....	91
TABELA 3.2 – Parâmetros avaliados durante a otimização do fracionamento de fósforo dissolvido em águas naturais.....	105
TABELA 3.3 – Parâmetros de regressão linear das curvas analíticas obtidas com diferentes espécies de fósforo.....	107
TABELA 3.4 – Características analíticas de procedimentos para a determinação de fósforo total ou fracionamento em águas naturais e residuais.....	109
TABELA 3.5 – Teores médios e incertezas obtidos no fracionamento de fósforo em águas naturais pelos procedimentos proposto e de referência.....	114
TABELA 4.1 – Rotina de acionamento das microbombas solenoide para a determinação de cloreto em urina e águas naturais.....	127
TABELA 4.2 – Respostas obtidas com alaranjado de metila na presença e ausência de oxidante, irradiação UV e cloreto.....	130
TABELA 4.3 – Parâmetros avaliados durante a otimização da determinação de cloreto em águas naturais e urina.....	138
TABELA 4.4 – Comparação das características analíticas de alguns procedimentos para a determinação de cloreto.....	140
TABELA 4.5 – Efeito de espécies concomitantes sobre o sinal analítico.....	145
TABELA 4.6 – Valores médios e incertezas obtidos na determinação de cloreto em urina e águas naturais.....	146

Lista de Figuras

FIGURA 1.1.	Classificação de algumas estratégias para o preparo de amostras.....	19
FIGURA 1.2.	Etapas de funcionamento de uma microbomba solenoide.....	27
FIGURA 2.1.	Diagrama do circuito eletrônico para o controle dos dispositivos.....	43
FIGURA 2.2.	Fotografia dos equipamentos para medidas espectrofotométricas.....	44
FIGURA 2.3.	Fotografia do fotorreator de 125 W.....	45
FIGURA 2.4.	Diagrama do sistema de análises em fluxo para o fracionamento de fósforo em extratos de cereais e leguminosas.....	46
FIGURA 2.5.	Espectro de emissão da lâmpada de vapor de mercúrio de 125 W.....	52
FIGURA 2.6.	Efeito do número de ciclos de amostragem sobre o sinal de P_I e do branco.....	54
FIGURA 2.7.	Efeito do volume de solução de heptamolibdato sobre o sinal de P_I e do branco.....	55
FIGURA 2.8.	Efeito do volume de solução de ácido ascórbico sobre o sinal de P_I e do branco.....	57
FIGURA 2.9.	Efeito da concentração de $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ sobre o sinal de 20 mg L ⁻¹ P_I e do branco para o fracionamento de fósforo em alimentos.....	58
FIGURA 2.10.	Efeito da concentração de ácido ascórbico sobre o sinal de P_I e do branco.....	59
FIGURA 2.11.	Efeito da concentração de HNO_3 sobre o sinal de P_I e do branco.....	60
FIGURA 2.12.	Efeito da concentração de $K_2S_2O_8$ sobre os sinais de P_I , P_O e do branco.....	61
FIGURA 2.13.	Efeito do tempo de parada de fluxo sobre o sinal de P_O e do branco..	63
FIGURA 2.14.	Efeito do volume de amostra sobre o sinal de P_I e do branco.....	64
FIGURA 2.15.	Efeito do volume do digerido sobre o sinal de P_I e do branco.....	65
FIGURA 2.16.	Curva analítica obtida com ácido fítico.....	67
FIGURA 2.17.	Curvas analíticas obtidas com ortofosfato e ácido fítico.....	68
FIGURA 2.18.	Sinais transientes para P_I e P_{TS} obtidos com solução de ácido fítico e com extratos de arroz e de farinhas de trigo, soja e aveia.....	73
FIGURA 3.1.	Classificação das frações de fósforo em águas naturais.....	79
FIGURA 3.2.	Estruturas químicas de compostos modelo de fósforo orgânico.....	80
FIGURA 3.3.	Fotografia do fotorreator com lâmpada de 13 W.....	88

FIGURA 3.4.	Diagrama do sistema de análises em fluxo para o fracionamento de fósforo em águas naturais.....	90
FIGURA 3.5.	Espectro de emissão da lâmpada de vapor de mercúrio de 13 W.....	93
FIGURA 3.6.	Curvas analíticas obtidas com ortofosfato e ácido fítico empregando lâmpada de 13 W.....	94
FIGURA 3.7.	Efeito da concentração de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ sobre o sinal de P_I e do branco para o fracionamento de fósforo em águas naturais.....	97
FIGURA 3.8.	Efeito da concentração de SnCl_2 sobre o sinal de P_I e do branco.....	99
FIGURA 3.9.	Efeito da concentração de HCl sobre o sinal de P_I e do branco.....	100
FIGURA 3.10.	Efeito do volume de amostra sobre o sinal de P_O e do branco.....	101
FIGURA 3.11.	Efeito da concentração de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ sobre os sinais de P_I , P_O e branco	104
FIGURA 3.12.	Efeito do tempo de parada de fluxo sobre os sinais de P_I , P_O e branco.....	105
FIGURA 3.13.	Curvas analíticas obtidas com diferentes espécies de fósforo.....	106
FIGURA 3.14.	Efeito de ácido húmico sobre o sinal analítico.....	112
FIGURA 3.15.	Sinais transientes referentes a amostras de águas de rio para o fracionamento de fósforo.....	113
FIGURA 4.1.	Diagrama do sistema de análises em fluxo para a determinação de cloreto.....	126
FIGURA 4.2.	Efeito do volume do digerido sobre os sinais de cloreto e do branco	132
FIGURA 4.3.	Efeito da concentração de alaranjado de metila sobre os sinais de cloreto e do branco.....	133
FIGURA 4.4.	Efeito das concentrações de HNO_3 nos reagentes sobre os sinais de cloreto e do branco.....	134
FIGURA 4.5.	Efeito do volume de amostra sobre os sinais de cloreto e do branco	135
FIGURA 4.6.	Efeito da concentração de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ sobre os sinais de cloreto e do branco.....	136
FIGURA 4.7.	Efeito do tempo de parada de fluxo sobre os sinais de cloreto e do branco.....	137
FIGURA 4.8.	Sinais transientes e curva analítica para a determinação de cloreto....	139

SUMÁRIO

1	ASPECTOS GERAIS.....	18
1.1	Preparo de amostras.....	19
1.1.1	<i>Decomposições sob aquecimento convectivo e assistidas por micro-ondas.....</i>	<i>20</i>
1.1.2	<i>Decomposições com radiação ultravioleta.....</i>	<i>21</i>
1.2	Sistemas de análises em fluxo com multicomutação.....	26
1.3	Sistemas de análises em fluxo com foto-oxidação em linha.....	29
2	SISTEMA DE ANÁLISES EM FLUXO PARA O FRACIONAMENTO DE FÓSFORO EM EXTRATOS DE CEREAIS E LEGUMINOSAS.....	35
2.1	Introdução.....	37
2.1.1	<i>Fósforo em materiais vegetais e alimentos derivados.....</i>	<i>37</i>
2.1.2	<i>Procedimentos analíticos para a determinação de espécies de fósforo em materiais vegetais e alimentos derivados.....</i>	<i>38</i>
2.2	Parte Experimental.....	43
2.2.1	<i>Equipamentos e acessórios.....</i>	<i>43</i>
2.2.2	<i>Reagentes e soluções.....</i>	<i>45</i>
2.2.3	<i>Procedimentos.....</i>	<i>46</i>
2.2.4	<i>Preparo dos extratos de alimentos derivados de cereais e leguminosas.....</i>	<i>48</i>
2.2.5	<i>Procedimento de referência.....</i>	<i>48</i>
2.3	Resultados e discussão.....	49
2.3.1	<i>Aspectos gerais.....</i>	<i>49</i>
2.3.2	<i>Estudos preliminares.....</i>	<i>51</i>

2.3.3	<i>Otimização do procedimento.....</i>	53
2.3.4	<i>Avaliação das características analíticas.....</i>	66
2.3.5	<i>Análise dos extratos de alimentos derivados de cereais e leguminosas.....</i>	72
2.4	Conclusões.....	75
3	PROCEDIMENTO ANALÍTICO EM FLUXO COM ALTA SENSIBILIDADE PARA O FRACIONAMENTO DE FÓSFORO EM ÁGUAS NATURAIS.....	77
3.1	Introdução	79
3.1.1	<i>Fósforo em águas naturais.....</i>	79
3.1.2	<i>Procedimentos analíticos para a determinação de fósforo em águas naturais</i>	83
3.2	Parte experimental.....	87
3.2.1	<i>Equipamentos e acessórios.....</i>	87
3.2.2	<i>Reagentes e soluções.....</i>	89
3.2.3	<i>Procedimentos.....</i>	89
3.2.4	<i>Preparo das amostras.....</i>	91
3.2.5	<i>Procedimento de referência.....</i>	92
3.3	Resultados e discussão.....	92
3.3.1	<i>Aspectos gerais.....</i>	92
3.3.2	<i>Estudos preliminares.....</i>	93
3.3.3	<i>Otimização do procedimento.....</i>	95
3.3.4	<i>Avaliação das características analíticas.....</i>	106
3.3.5	<i>Efeito de espécies potencialmente interferentes.....</i>	111
3.3.6	<i>Fracionamento de fósforo em águas naturais.....</i>	112
3.4	Conclusões.....	114

4	PROCEDIMENTO ANALÍTICO LIMPO EM FLUXO PARA A DETERMINAÇÃO DE CLORETO EM URINA E ÁGUAS NATURAIS.....	117
4.1	Introdução	119
4.1.1	<i>Cloreto em urina e águas naturais.....</i>	119
4.1.2	<i>Procedimentos analíticos para a determinação de cloreto.....</i>	120
4.2	Parte Experimental.....	125
4.2.1	<i>Equipamentos e acessórios.....</i>	125
4.2.2	<i>Reagentes e soluções.....</i>	125
4.2.3	<i>Procedimentos.....</i>	126
4.2.4	<i>Efeito de espécies potencialmente interferentes.....</i>	128
4.2.5	<i>Análise das amostras e comparação com procedimento de referência.....</i>	128
4.3	Resultados e discussão.....	128
4.3.1	<i>Aspectos gerais.....</i>	128
4.3.2	<i>Estudos preliminares.....</i>	130
4.3.3	<i>Otimização do procedimento.....</i>	131
4.3.4	<i>Avaliação das características analíticas.....</i>	138
4.3.5	<i>Efeito de espécies potencialmente interferentes.....</i>	144
4.3.6	<i>Análise das amostras e comparação com procedimento de referência.....</i>	145
4.4	Conclusões.....	146
5	CONCLUSÕES GERAIS.....	149
6	REFERÊNCIAS.....	153

1

ASPECTOS GERAIS

1.1 Preparo de amostras

O preparo de amostras é uma das etapas mais importantes da sequência analítica¹. As transformações físicas e químicas da amostra viabilizam a detecção ou melhoram a detectabilidade do analito², além de contribuírem para a eliminação de interferentes. Este preparo exige desde diluições até a decomposição quantitativa de espécies, que pode consumir a maior parte do tempo do analista. Além disto, é uma etapa altamente suscetível a perdas do analito e contaminações, principalmente quando executada em sistemas abertos por longos períodos.

O preparo de amostras pode ocorrer por vias seca ou úmida¹, que são caracterizadas pela ausência ou presença de solventes, respectivamente, enquanto ocorrem as reações químicas. Na Figura 1.1, está apresentada a classificação de algumas estratégias para o preparo de amostras.

Figura 1.1. Classificação de algumas estratégias para o preparo de amostras.

O preparo de amostras por via úmida é o mais utilizado devido à maior eficiência e menor tempo e, geralmente, as reações ocorrem em meio do solvente mais apropriado para as determinações^{1,3}. Além disto, não são atingidas temperaturas tão altas quanto nos processos por via seca (*e.g.* combustão, que pode atingir 800 °C), minimizando riscos de perdas de analito. O preparo por via úmida abrange usualmente a dissolução da amostra e a decomposição, pré-concentração e separação de espécies. Nas decomposições e dissoluções, as transformações geralmente ocorrem na presença de reagentes oxidantes, complexantes ou substâncias que permitam atingir altos pontos de ebulição para favorecer a degradação de espécies sob aquecimento convectivo ou ação de radiações nas regiões das micro-ondas, infravermelho ou ultravioleta. Desta forma, a oxidação das espécies em solução é acelerada³ e a matéria orgânica é eficientemente decomposta.

1.1.1 Decomposições sob aquecimento convectivo e assistidas por micro-ondas

O preparo de amostras sob aquecimento convectivo é normalmente conduzido em sistemas abertos (*e.g.* blocos digestores), sendo mais moroso e requerendo misturas de ácidos minerais concentrados (*e.g.* H₂SO₄, HNO₃ e HClO₄), além de oxidantes fortes, como o H₂O₂. A decomposição em frascos abertos exige muitos cuidados, pois reações violentas podem ocorrer especialmente quando há um aquecimento brusco do meio ou quando um oxidante forte entra em contato com matéria orgânica facilmente oxidável¹. Devido ao aquecimento brando das misturas, estes procedimentos são normalmente muito demorados.

As desvantagens das decomposições com ácidos concentrados em sistemas abertos levaram à busca por procedimentos mais rápidos e menos suscetíveis a perdas do analito e contaminações, os quais foram alcançados utilizando-se outras fontes de energia. A decomposição assistida por radiação micro-ondas foi empregada pela primeira vez em 1975 visando à determinação elementar em amostras biológicas⁴. Os efeitos das micro-ondas sobre

íons e moléculas com dipolos geram o calor necessário para atingir altas temperaturas, favorecendo a ação dos reagentes para dissolução e quebra de ligações químicas. O preparo ocorre em frascos fechados ou abertos, em fornos que possuem um magnetron para a geração das micro-ondas. O tempo de preparo de amostras pode ser reduzido quando comparado com procedimentos em blocos digestores (*e.g.* de 24 para 2 horas para amostras geológicas⁵). Além disto, são consumidas menores quantidades de ácidos minerais e os riscos de contaminação e perdas do analito são minimizados⁶, quando a decomposição é conduzida em sistemas fechados.

Para difundir o processo, foi necessário o desenvolvimento de materiais que suportassem as altas pressões atingidas em frascos fechados e sistemas de segurança que evitassem explosões devido à evolução de gases e vapores durante a decomposição. Sendo assim, os fornos exigem alto custo para manutenção e segurança para evitar acidentes. Frascos abertos também são utilizados para o preparo de amostras em micro-ondas e apresentam vantagens como a possibilidade de adicionar reagentes durante o processo. Os ácidos minerais concentrados, embora normalmente sejam utilizados alguns mililitros, podem afetar a integridade do analista. A elevada acidez pode prejudicar a quantificação, dependendo do método analítico utilizado. A decomposição com ácidos minerais diluídos é eficiente em muitos casos, minimizando estes inconvenientes⁷. Algumas desvantagens do uso do aquecimento convectivo e assistido por micro-ondas foram superadas com a utilização da radiação ultravioleta para o preparo de amostras, especialmente empregando processos de foto-oxidação^{2,8}.

1.1.2 Decomposições com radiação ultravioleta

A radiação da região UV entre 190 e 380 nm é bastante utilizada para o preparo de amostras. Nesta região do espectro eletromagnético, a radiação apresenta energia suficiente

para quebrar ligações químicas. Radiações com comprimento de onda de 250 nm correspondem a *ca.* 544 kJ mol^{-1} , que é suficiente para o rompimento de ligações como C – C (*ca.* 450 kJ mol^{-1})¹.

A radiação UV pode promover oxidação ou redução de espécies⁹. A foto-oxidação é a alternativa mais explorada visando ao preparo de amostras, que normalmente envolve a eliminação da matéria orgânica e conversão de espécies às respectivas formas inorgânicas. Um procedimento pioneiro foi proposto em 1961, empregando foto-oxidação para a determinação de carbono orgânico total em águas marinhas. Íons Fe^{3+} foram utilizados para acelerar a geração de radicais oxidantes, atingindo decomposição quantitativa em 3 h¹⁰.

A foto-oxidação é baseada na geração de radicais oxidantes a partir da quebra homolítica de ligações químicas da matéria orgânica dissolvida^{1,8}, que atacam outras espécies, causando reações em cadeia entre radicais oxidantes e espécies oxidáveis. Os processos geralmente ocorrem a temperaturas menores que 90 °C, minimizando riscos, porém podem ser necessárias horas ou dias para decompor quantitativamente a matéria orgânica. Para acelerar as decomposições, são adicionadas espécies que favoreçam a geração de radicais com a irradiação, sendo estes sistemas classificados como homogêneos (*e.g.* $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$, H_2O_2 , reagente de Fenton e O_3) ou heterogêneos (semicondutores, como o TiO_2). A presença de O_2 dissolvido contribui para a geração de radicais devido à formação do oxigênio singlete e posterior transferência de energia para as moléculas orgânicas⁸.

As espécies geradoras de radicais oxidantes diminuem drasticamente o tempo para a degradação⁸, mineralizando amostras em minutos. Estes reagentes apresentam baixa toxicidade e não são corrosivos como ácidos minerais concentrados, por exemplo. Além disto, os resíduos podem ser descartados após mínimo tratamento. Geralmente, o digerido apresenta características favoráveis para a determinação pela maioria das técnicas analíticas, principalmente devido à acidez final das soluções. As equações 1 – 17^{1,2,8} representam

reações envolvidas em diferentes sistemas de fotoconversão quando radiação UV entre 190 e 380 nm é utilizada.

H_2O_2

Fe^{3+}

NO_3^- e NO_2^-

O_3

$S_2O_8^{2-}$

TiO₂

A principal espécie oxidante envolvida nos processos de foto-oxidação é o radical hidroxila ($E^\circ_{\text{OH}^\bullet/\text{H}_2\text{O}} = 2,8 \text{ V}$)⁹, que é gerado por diversos mecanismos de reação (*e.g.* equações 1, 3 – 5, 11, 13 e 17). A escolha do agente oxidante deve levar em conta o analito a ser determinado. O peróxido de hidrogênio gera oxigênio e água como produtos finais (equações 1 e 2), o que minimiza riscos de interferências. A utilização de K₂S₂O₈ e Fe(III), por exemplo, pode causar interferências na determinação elementar e de alguns ânions, dependendo da técnica analítica. Na maioria dos casos, a espécie fotossensível deve ser utilizada em grande excesso, uma vez que os radicais podem reagir entre si (reações de recombinação) ou com outras espécies geradas a partir dos oxidantes, minimizando a interação com as espécies alvo (*e.g.* equações 2 e 15).

O persulfato de potássio tem sido amplamente empregado como gerador de radicais⁹ e os mecanismos envolvidos dependem da acidez. Em meio aquoso, a conversão dos íons S₂O₈²⁻ em oxigênio molecular e hidrogenossulfato (equações 12 – 15) é termodinamicamente favorável. Entretanto, este processo é lento e o aquecimento ou irradiação UV causam a ruptura da ligação O – O do íon persulfato ($E_L = 138 \text{ kJ mol}^{-1}$)¹¹, acelerando o processo e gerando dois radicais sulfato (equação 12). Estes radicais favorecem a formação do radical hidroxila, como apresentado na equação 13. Em meio ácido, a decomposição é mais eficiente, pois ocorre a formação do ácido de Caro (H₂S₂O₅), que torna o meio oxidante devido à geração de H₂O₂ (equações 18-20)¹¹. Os radicais hidroxila, também provenientes do H₂O₂ (equação 1), favorecem a foto-oxidação.

Halogênios foram empregados para fotoconversão em algumas aplicações. O I_2 é convertido ao radical $\text{I}^\bullet$, que atua sobre a matéria orgânica. Esta estratégia foi utilizada para a determinação de Hg(II) em soluções de limpeza de lentes de contato¹², explorando o efeito inibidor do analito sobre a decomposição do EDTA pelo I_2 na presença da radiação UV.

As equações 16 e 17 representam simplificadaamente os mecanismos envolvidos na foto-oxidação heterogênea. Dentre os mecanismos propostos para processos foto-oxidativos com TiO_2 , o mais aceito é baseado na formação de radicais hidroxila na superfície do semiconductor, após a adsorção de moléculas de água¹³. Na presença de radiação UV, elétrons da estrutura cristalina do TiO_2 são promovidos da banda de valência (e^-_{bv}) para a banda de condução (e^-_{bc}), deixando uma lacuna na banda de valência (h^+_{bv}). A carga positiva gerada induz a quebra homolítica da molécula de água, gerando o radical hidroxila. As outras propostas envolvem atuação direta da lacuna da banda de condução sobre a matéria orgânica ou que ambos os mecanismos podem ocorrer dependendo do meio (água ou solventes orgânicos). Sistemas heterogêneos apresentam grande aplicação na determinação inorgânica por métodos que tolerem espécies em suspensão, como os eletroquímicos, evitando o isolamento do semiconductor. Usualmente são utilizadas partículas de pequeno diâmetro, o que dificulta a posterior separação e o preparo de colunas para foto-oxidação de maneira dinâmica.

Nos processos foto-oxidativos, são utilizados fotorreatores construídos com lâmpadas de vapor de mercúrio de baixa, média ou alta pressão, que apresentam intensas linhas de emissão em 254 nm⁸. Outras fontes podem ser empregadas (*e.g.* lâmpadas de xenônio e laser), porém com maiores custos de aquisição e manutenção. Além disto, algumas fontes de radiação UV não apresentam intensidade necessária para que o processo seja eficaz (*e.g.*

lâmpadas de deutério). Os recipientes contendo a amostra são normalmente posicionados na posição vertical e paralelamente à lâmpada e devem ser constituídos de materiais que não absorvam quantidades significativas de radiação UV (*e.g.* quartzo e PTFE), de forma a maximizar a irradiação da amostra.

O aumento da temperatura devido ao calor gerado com a operação da lâmpada de vapor de mercúrio também pode auxiliar nos processos de decomposição. Entretanto, os fotorreatores usualmente possuem temperatura estabilizada por um dispositivo de refrigeração, que pode ser construído com ventoinhas (*coolers*) utilizadas em microcomputadores. O fluxo de ar é direcionado para o recipiente da amostra de forma a manter a temperatura constante, evitando a ebulição da amostra. Entretanto, o resfriamento afeta a intensidade de emissão da lâmpada. Todos os dispositivos devem ser inseridos em um invólucro escuro, preferencialmente com revestimento interno reflexível para minimizar perdas de radiação. Equipamentos para fotodecomposição são disponíveis comercialmente¹⁴ ou podem ser construídos no laboratório. Com algumas adaptações, os fotorreatores podem ser utilizados para o preparo da amostra em sistemas de análises em fluxo.

1.2 Sistemas de análises em fluxo com multicomutação

Na análise por injeção em fluxo (FIA), um volume fixo de amostra é introduzido em tubulações que contêm um fluido a uma vazão constante e em regime laminar, que proporciona dispersão controlada. O controle preciso do tempo de residência da zona de amostra no percurso analítico garante a repetibilidade dos sinais. Devido aos gradientes de concentração decorrentes da dispersão da amostra, o sinal analítico é transiente e pode ser relacionado com a concentração da espécie de interesse¹⁵. Com estes sistemas, é possível implementar procedimentos sem que a reação atinja o estado de equilíbrio químico, o que minimiza o tempo de análise e permite a exploração de aspectos cinéticos das reações¹⁶.

Adicionalmente, sistemas de análises em fluxo podem assumir diversas configurações para realizar tarefas, como decomposições em linha⁷.

Os dispositivos normalmente utilizados para a construção dos módulos de análises são simples^{15,17}. A propulsão dos fluidos e a injeção da amostra são geralmente realizadas por dispositivos distintos (*e.g.* bombas peristáltica e injetor proporcional). A dispersão e mistura com reagentes ocorrem em tubos usualmente constituídos de material polimérico durante o transporte até o sistema de detecção¹⁷, que pode ser baseado em métodos espectro ou eletroquímicos.

Sistemas com multicomutação expandiram as vantagens das análises em fluxo¹⁸. O emprego de dispositivos discretos controlados eletronicamente (válvulas ou microbombas solenoide) para o gerenciamento independente de cada solução permitiu que o desempenho analítico fosse melhorado, além de proporcionar maior versatilidade. Em sistemas FIA com microbombas solenoide, a inserção e a propulsão das soluções são realizadas durante ciclos de ativação e desligamento dos dispositivos¹⁹, dispensando o emprego de outros componentes para a inserção de amostras e reagentes. O esquema de funcionamento de uma microbomba solenoide é ilustrado na Figura 1.2.

Figura 1.2. Esquema das etapas de funcionamento de uma microbomba solenoide. A – Suporte fixo, B – Mola compressível, C – Barra ferromagnética, D – Solenoide, E – Diafragma flexível, F – Válvula de entrada, G – Invólucro, H – Via para passagem de soluções, I – Válvula de saída, S – Solução. Microbomba desligada (1 e 3) ou acionada (2).

De acordo com o diagrama apresentado na Figura 1.2, cada microbomba contém um suporte para manter os componentes internos fixos (A). Uma mola compressível (B) é posicionada sobre uma barra metálica ferromagnética (C), conectada a um diafragma flexível (E) e com um solenoide (D) ao seu redor. Os componentes são envolvidos por um invólucro metálico isolado (G) e a parte inferior é recoberta por material polimérico resistente ao calor, à passagem de corrente e ao choque mecânico. A passagem do fluido (H) é obstruída pelo diafragma e por uma válvula de entrada (F) enquanto o dispositivo permanece desligado (sem aplicação de corrente ao solenoide), como é apresentado na Figura 1.2.1. Quando um pulso de corrente (*ca.* 100 mA) é aplicado ao solenoide da microbomba (Figura 1.2.2), um campo eletromagnético é gerado, deslocando a barra metálica verticalmente e pressionando a mola situada na parte superior. Este movimento é responsável pela expansão do diafragma, gerando uma diferença de pressão na câmara interna que causa o preenchimento do canal H com a solução (S). Simultaneamente, ocorre a abertura da válvula F e o fechamento da válvula I. Em seguida, a microbomba é desligada e a barra retorna à sua posição inicial pela ação da mola na parte superior, dispensando o volume fixo da solução que preenchia a câmara interna (Figura 1.2.3), devido à abertura da válvula I e fechamento da válvula F. O tempo de atuação do mecanismo da microbomba solenoide é da ordem de milissegundos e um volume fixo de solução, da ordem de microlitros, é dispensado de maneira precisa a cada pulso aplicado ao solenoide¹⁹. Desta forma, o uso de microbombas minimiza o consumo de reagentes e a geração de resíduos em comparação com procedimentos desenvolvidos em sistemas de análises em fluxo com adição contínua de reagentes. O gerenciamento de pequenos volumes de solução em sistemas que empregam outros dispositivos de propulsão, como bombas peristálticas, é dificultado pela pulsação que afeta a precisão na amostragem²⁰.

As válvulas solenoide são dispositivos extensamente utilizados na construção de sistemas de análises em fluxo com multicomutação¹⁸. Assim como as microbombas, as

válvulas são ativadas eletronicamente e permitem a alteração da direção do fluxo das soluções por intervalos de tempo pré-estabelecidos. Seu emprego requer um dispositivo adicional para a propulsão de fluidos, como uma bomba peristáltica, ou a exploração da ação da gravidade.

Em sistemas com multicomutação, pode-se explorar a amostragem binária²⁰, que consiste em inserir pequenas alíquotas de amostra e reagentes de maneira intercalada, o que aumenta o número de interfaces entre as soluções ($2x-1$ interfaces são geradas para x pares de alíquotas amostra/reagente). A sequência das etapas de inserção de soluções é denominada ciclo de amostragem. Esta estratégia e o fluxo pulsado característico das microbombas solenoide promovem melhores condições de mistura entre amostra e reagentes²¹. Com isso, a dimensão dos reatores pode ser reduzida e as perturbações causadas pelas diferenças de índice de refração das soluções (efeito Schlieren²²) podem ser atenuadas.

Na literatura, foram propostos sistemas de análises em fluxo para o preparo de amostra ou fotoconversão de espécies, entretanto, sistemas com microbombas solenoide para este fim são escassos²³ e ainda podem ser amplamente explorados devido às vantagens inerentes.

1.3 Sistemas de análises em fluxo com foto-oxidação em linha

As perdas do analito (por volatilização ou em etapas de transferência), contaminação e a exposição do analista a situações de risco (*e.g.* radiação ultravioleta) são problemas que podem ser superados com o processamento das amostras em sistemas de análises em fluxo²⁴, adaptando os fotorreatores para foto-oxidação em linha⁸.

A maioria dos fotorreatores é construída com tubos de quartzo ou de PTFE posicionados ao redor do bulbo da fonte de radiação, que geralmente é uma lâmpada de vapor de mercúrio. A eliminação de bolhas da zona de amostra é mais crítica neste caso devido à evolução de gases dissolvidos ou provenientes da decomposição da matéria orgânica (*e.g.* CO₂), exigindo a utilização de desborbulhadores. Alternativamente, o resfriamento da zona de

amostra com *coolers* ou banhos de gelo também pode ser utilizado para minimizar a presença de bolhas durante a detecção.

A eficiência da fotodegradação é diretamente afetada pelo tempo de residência, bem como pela quantidade de radiação que incide sobre a amostra. Com o uso de espécies geradoras de radicais, o processo é acelerado e, devido aos pequenos volumes de amostra utilizados, a decomposição pode ocorrer em alguns segundos¹. Isto permite a obtenção de altas eficiências de degradação sem afetar a frequência de amostragem.

Como exemplo da aplicabilidade de processos foto-oxidativos em linha, a determinação de quantidades traço de Hg(II) foi realizada após foto-oxidação da matéria orgânica²⁵. A amostra contendo H₂O₂ 1,0 % (v/v) previamente adicionado foi direcionada para o fotorreator. O tempo de residência, estimado em 6 min, foi suficiente para degradar quantitativamente até 15 mg L⁻¹ C e liberar os íons Hg(II) para a quantificação por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor a frio, com limite de quantificação de 0,15 ng L⁻¹ Hg.

Além do preparo de amostras visando à determinação total, a fotoconversão em linha tem sido utilizada para fracionamento de espécies, como as de arsênio²⁶, principalmente em amostras ambientais. Em geral, o fracionamento é obtido através da determinação sequencial das frações inorgânica e total. Um sistema de análises em fluxo com multicomutação e foto-oxidação em linha foi empregado para o fracionamento de arsênio em extratos de tecidos de peixes²⁶. Primeiramente, o extrato (1,6 mL) foi transportado diretamente para um espectrômetro de absorção atômica com geração de hidretos para a determinação do arsênio inorgânico [As(III) e As(V)]. Em seguida, uma segunda alíquota do extrato foi misturada com K₂S₂O₈ em linha e a zona de amostra foi direcionada para o fotorreator previamente à detecção (quantificação de As inorgânico e dimetilarsênio). Apesar de apresentar baixos limites de detecção (0,09 µg L⁻¹), o procedimento não permitiu a especiação do arsênio

inorgânico, que é importante devido às diferenças de toxicidade do As dependendo de seu estado de oxidação²⁷. Além disto, algumas espécies de arsênio não são suscetíveis à foto-oxidação (*e.g.* arsenobetaína), sendo necessário determinar As total por decomposição ácida assistida por micro-ondas. Um sistema em fluxo com foto-oxidação seguida de aquecimento da zona de amostra (UV-térmico) poderia ser explorado para quantificar As total.

Em alguns casos, a foto-oxidação foi utilizada após separação cromatográfica para melhorar a seletividade e obter análise de especiação. Esta estratégia foi aplicada à especiação de compostos de fósforo em urina²⁸ e águas naturais²⁹ após separação cromatográfica das espécies e detecção do ortofosfato gerado por fluorimetria. Como inconveniente, foram utilizadas bombas de alta pressão e colunas cromatográficas, que apresentam maior custo de aquisição e manutenção.

Sistemas heterogêneos têm sido explorados visando à fotoconversão de espécies em linha. Devido à formação de suspensões do semicondutor (*e.g.* TiO_2), a utilização de alguns detectores, como os espectrofotométricos, é dificultada. A determinação de Cd^{2+} em águas de rios foi realizada em um sistema de análises em fluxo em que a amostra foi misturada em linha com uma suspensão de TiO_2 ³⁰. Após decomposição da matéria orgânica, os íons Cd^{2+} foram quantificados por voltametria de redissolução anódica, não sendo observada a interação do semicondutor com o eletrodo. O complexo $[\text{Cd}(\text{EDTA})]^{2-}$ foi o modelo usado para simular a complexação do Cd pela matéria orgânica, sendo observadas recuperações próximas de 100% com tempo de residência de 150 s.

Um sistema em fluxo miniaturizado foi desenvolvido para a fotodegradação de matéria orgânica e determinação de íons $\text{Cu}(\text{II})$ ³¹. Um microeletrodo de ouro modificado com TiO_2 foi inserido em uma placa com microcanais e um LED com máximo de emissão em 365 nm foi utilizado para a fotodegradação. O complexo $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ foi degradado ao

atingir o eletrodo, liberando íons Cu^{2+} para a determinação voltamétrica. Por determinação, foram utilizados 20 nL de amostra e o tempo de residência foi *ca.* 4 min.

Além da mineralização, a radiação UV tem sido empregada para fotoconversão de compostos orgânicos, sem causar degradação total, melhorando a detectabilidade do analito. Esta estratégia foi aplicada à determinação de carbaril³² e de fungicidas ditiocarbamatos³³ em formulações de pesticidas. A foto-oxidação do analito pode gerar espécies luminescentes ou o reagente pode ser convertido em linha para gerar espécies instáveis em solução aquosa³². A foto-oxidação pode também ser aplicada para análises de especiação. Entretanto, esta estratégia usualmente requer separação cromatográfica previamente à determinação⁹.

Nanopartículas de semicondutores (*Quantum Dots*, QDs) têm sido utilizadas para gerar radicais oxidantes (*e.g.* $\text{OH}^\bullet$), que reagem com o analito para melhorar sua detectabilidade. Os QDs apresentam vantagens em relação a outros semicondutores, pois geram radicais oxidantes com a incidência de radiação em uma ampla faixa de comprimentos de onda³⁴. Isto permite que sejam utilizadas fontes de radiação na região do visível para foto-oxidação. Explorando esta alternativa, um sistema de análises em fluxo com microbombas solenoide foi utilizado para a determinação de adrenalina em formulações farmacêuticas³⁵. Os QDs foram introduzidos no percurso analítico e transportados através de um fotorreator constituído de dois LEDs com máximo de emissão em 380 nm. Isto resultou na geração de radicais hidroxila, responsáveis pela oxidação do luminol, que foi monitorada por quimiluminescência. Os radicais hidroxila foram consumidos pela adrenalina, resultando na supressão da quimiluminescência.

De modo geral, sistemas de análises em fluxo trazem vantagens para o uso de foto-oxidação em linha visando à degradação de matéria orgânica para o fracionamento de espécies e a fotoconversão de compostos para melhorar sua detectabilidade. O tempo de preparo de amostras é normalmente mais curto quando são utilizados fotorreatores acoplados

a sistemas em fluxo devido à maior eficiência de irradiação, à utilização de menores volumes de amostra e à possibilidade da aplicação analítica mesmo sem atingir fotoconversão quantitativa.

2

**SISTEMA DE ANÁLISES
EM FLUXO PARA O
FRACIONAMENTO DE
FÓSFORO SOLÚVEL EM
ALIMENTOS DERIVADOS DE
CEREAIS E LEGUMINOSAS**

2.1 Introdução

O fósforo é um elemento essencial para os seres vivos, pois faz parte de processos biológicos importantes, como crescimento de vegetais e controle do pH do sangue de animais²⁴. Nos seres humanos, *ca.* 85% do fósforo é armazenado na estrutura intercelular dos ossos, na forma $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (hidroxiapatita). Além de oferecer rigidez aos ossos, estes depósitos atuam como reserva deste nutriente, que é reabsorvido pela corrente sanguínea caso necessário³⁶. O restante do fósforo no organismo humano encontra-se como fosfolipídios em membranas celulares, nos ácidos nucleicos e são responsáveis pela ativação de hormônios a partir da fosforilação. O ortofosfato é a espécie mais prontamente biodisponível para animais e plantas^{36,37}, embora alguns organismos utilizem outras espécies de fósforo, convertendo-as completa ou parcialmente a ortofosfato³⁸.

2.1.1 Fósforo em materiais vegetais e alimentos derivados

Nos vegetais, o fósforo está presente nas folhas, sementes e frutos³⁹. O fósforo hidrossolúvel é encontrado nas formas inorgânica (ortofosfato, P_i) nas folhas e orgânica (majoritariamente como ácido fítico⁴⁰, P_o) em grãos de cereais e sementes de leguminosas⁴¹. As demais formas de P_o são derivações da molécula de ácido fítico, diferenciadas pela substituição dos grupos fosfato por hidroxila.

Dependendo dos processos pelos quais os cereais são submetidos previamente à comercialização (*e.g.* remoção do farelo e polimento), o ácido fítico pode ser decomposto, gerando ortofosfato. Na literatura, foi demonstrado que, sob algumas condições de temperatura (entre 50 e 60 °C) e de pH (4,5 a 5,5), o ácido fítico pode ser degradado sob ação da enzima fitase proveniente do próprio material vegetal⁴¹. Este fato pode acarretar no aumento da concentração de P_i nos alimentos, o que aumenta a disponibilidade do fósforo. O ácido fítico não fornece grandes quantidades deste nutriente aos animais pela ausência de

O trabalho discutido neste capítulo gerou o artigo publicado

ROCHA, D. L.; ROCHA, F. R. P. Photochemical micro-digestion in a multi-pumping flow system for phosphorus fractionation in cereals. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 139-144, 2013.

fitase em grande parte do sistema digestório, sendo o cólon o único sítio que disponibiliza esta enzima. Isto faz com que quantidades maiores que 70% do fósforo orgânico ingerido pelos seres humanos sejam excretadas de forma inalterada⁴¹.

Os processos de polimento aos quais grãos (*e.g.* arroz) são submetidos fazem com que parte do P_O seja perdida, como a fração que se encontra na aleurona, camada rica em ácido fítico⁴¹ e próxima à casca e ao farelo do grão de arroz. Devido às conversões e perdas do fósforo durante processos industriais e às diferenças na biodisponibilidade das formas orgânica e inorgânica aos animais, é importante que seja realizado o fracionamento do fósforo em alimentos derivados de cereais e leguminosas. A determinação total não pode ser utilizada para a estimativa de valores de ingestão diária⁴².

2.1.2 Procedimentos analíticos para a determinação de espécies de fósforo em materiais vegetais e alimentos derivados

No preparo de amostras para a determinação total ou o fracionamento de fósforo em materiais vegetais são utilizadas fusão, aquecimento convectivo e decomposições assistidas por micro-ondas ou radiação UV. A determinação é geralmente baseada na quantificação de ortofosfato por potenciometria, volumetria, gravimetria e, especialmente, espectrofotometria.

Os procedimentos oficiais recomendados pela *Association of Official Analytical Chemists*⁴³ (AOAC) para a determinação de fósforo em materiais vegetais e derivados (*e.g.* farinha de trigo) visam à quantificação de fósforo total. Geralmente, são baseados na calcinação da amostra, seguida da dissolução e filtração das cinzas. Em seguida, é realizada a determinação gravimétrica (formação de cristais do ácido fosfovanadomolibdico), volumétrica (titulação do excesso de base adicionada à solução contendo ácido fosfomolibdico) ou espectrofotométrica (formação do azul de molibdênio). Estes procedimentos requerem, no mínimo, 4 horas de calcinação a temperaturas de até 500°C, o

que consome muito tempo e energia e impossibilita o fracionamento de fósforo. Além disto, apresentam desvantagens do pré-tratamento em sistemas abertos.

A maioria das alternativas para a determinação de P_O é baseada na quantificação de fitato em extratos de materiais vegetais, sendo realizadas tanto em batelada⁴⁴ quanto em sistemas de análises em fluxo^{45,46}. Um destes procedimentos foi baseado no aquecimento dos extratos na presença de Fe^{3+} e posterior formação do azul de molibdênio, que foi quantificado por espectrofotometria⁴⁴. O precipitado formado entre fitato e ferro(III) foi utilizado para extrair o P_O dos extratos. Após aquecimento a 95°C em meio de heptamolibdato de amônio, H_2SO_4 0,5 mol L⁻¹ e HCl 0,1 mol L⁻¹, foi formado o azul de molibdênio. Apesar dos autores enfatizarem que os extratos de cereais não sofreram pré-tratamento, a etapa de aquecimento durante 30 min em meio de H_2SO_4 pode ter favorecido a conversão de P_O a P_I , fazendo desta etapa uma digestão por via úmida com aquecimento convectivo.

Um procedimento em fluxo explorou a separação em linha do ácido fítico dos extratos vegetais⁴⁵. O extrato obtido em meio ácido passou por uma coluna de troca aniônica (AG1-X8) para reter os íons ortofosfato e fitato e soluções de NaCl 0,1 e 0,7 mol L⁻¹ foram utilizadas para a eluição destas espécies, respectivamente. A quantificação do fitato foi baseada na injeção do eluato em um sistema de análises em fluxo com microbombas solenoide, em que houve a dissociação do complexo Fe^{3+} /salicilato devido à complexação do analito com Fe^{3+} . Sendo assim, a concentração de ácido fítico foi relacionada com a atenuação do sinal analítico. O procedimento apresenta potencial para o fracionamento de fósforo em extratos de cereais, entretanto, a fração contendo ortofosfato foi descartada após eluição.

A retenção/eluição de íons fitato foi explorada em um sistema de análise por injeção sequencial (SIA)⁴⁶. Um volume de suspensão de resina aniônica foi introduzido e retido no percurso analítico. O extrato foi transportado através da coluna recém-formada para retenção dos íons fitato. Subsequentemente, uma solução do complexo Fe^{3+} /salicilato e íons Cl^- foi

utilizada como eluente e reagente colorimétrico. As medidas foram baseadas na descoloração da solução devido à dissociação do complexo Fe^{3+} /salicilato. Apesar de mecanizar a etapa de extração, a introdução da resina na forma de suspensão pode acarretar na perda de repetibilidade caso haja variação no empacotamento das partículas sólidas ou na homogeneidade da suspensão.

Um procedimento turbidimétrico empregando sistema SIA foi desenvolvido para a determinação de ácido fítico⁴⁷. Este trabalho foi baseado na geração em linha do CaC_2O_4 ($K_{ps} = 2,6 \times 10^{-9}$)⁴⁸ e posterior dissolução do sal na presença do analito, monitorada pela diminuição de turbidância. O tratamento da amostra foi semelhante aos aplicados em outros trabalhos, utilizando resina de troca aniônica para separar previamente o analito. Apesar de limite de detecção adequado para a quantificação de ácido fítico em grãos de trigo e derivados ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), contaminações entre as injeções e a deriva da linha base devido ao depósito de CaC_2O_4 devem ser evitadas com limpeza constante do percurso analítico e da cela de fluxo.

A determinação de ácido fítico também foi realizada empregando cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC). Apesar das vantagens da separação cromatográfica, os procedimentos normalmente exigem derivação química previamente à injeção⁴⁹, tratamento de amostra para isolamento do ácido fítico em resinas de troca iônica⁵⁰ ou adição de enzimas⁵¹ para degradar interferentes em alguns alimentos derivados de cereais e leguminosas, como o glicerol. O tratamento prévio dos extratos com resina de troca iônica possibilitou a determinação de ácido fítico, por espectrofotometria^{45,46}, que exige instrumentação com menor custo para obtenção e aquisição em relação à cromatografia a líquido. O uso de enzimas também aumenta o custo do preparo de amostra e exige condições rígidas de temperatura e pH para utilização e armazenamento. Portanto, procedimentos baseados na separação do ácido fítico e determinação por técnicas espectro ou eletroanalíticas são mais vantajosos em relação às separações cromatográficas.

Algumas alternativas foram propostas para o fracionamento ou análise de especiação de fósforo em materiais vegetais. Uma das estratégias mais empregadas é baseada na quantificação de ortofosfato em extratos de folhas de tomate antes e após digestão nitro-perclórica em bloco digestor, sendo o P_O determinado através da diferença entre fósforo total solúvel (P_{TS}) e P_I ⁵². Apesar de permitir o fracionamento, o preparo de amostras é demorado, podendo levar horas ou dias, devido às etapas de evaporação. Além disto, são adicionados ácidos minerais concentrados aos extratos sob aquecimento, aumentando a exposição do analista a situações de risco.

Um procedimento em batelada foi desenvolvido para o fracionamento de fósforo em materiais vegetais empregando foto-oxidação de P_O , pela adição de $K_2S_2O_8$ e irradiação ultravioleta por 20 minutos⁴⁰. O fracionamento foi obtido com medidas de ortofosfato nos extratos em sistema de análises em fluxo monossegmentado antes ou após a foto-oxidação. Apesar da mecanização da etapa de determinação de fósforo, o preparo da amostra foi conduzido em sistema aberto, apresentando maiores riscos de contaminação e suscetibilidade a erros.

Procedimentos mecanizados para o fracionamento de fósforo em materiais vegetais são escassos. Um sistema de análises em fluxo foi proposto para a determinação de ortofosfato e ácido fítico em extratos de cereais⁵³. A diferenciação foi realizada em linha com a quantificação direta de ortofosfato ou após a passagem da amostra através de uma coluna contendo fitase imobilizada, que exige cuidados especiais para o uso (banho termostático a 37 °C) e armazenamento (refrigeração a -20 °C). Na quantificação de P_I , a zona de amostra foi redirecionada para outra bobina de reação que apresentava condições semelhantes de dispersão e mistura.

A especiação de ortofosfato e ácido fítico foi realizada em um sistema de análises em fluxo após a separação das espécies em coluna de troca aniônica⁵⁴, de forma semelhante à

descrita anteriormente⁴⁵, empregando a formação do azul de molibdênio. Neste procedimento, não foi realizada decomposição de espécies e foi relatado que tanto o ortofosfato quanto o ácido fítico formaram o azul de molibdênio. Esta hipótese é contrária a outros procedimentos que exigem a decomposição do P_O para a quantificação na forma de ortofosfato. Outro fato discrepante relatado foi a resposta referente à formação do azul de molibdênio em função da temperatura (25 a 75°C). Normalmente, utilizando ácido ascórbico como agente redutor, espera-se que a temperatura apresente grande influência sobre a formação do azul de molibdênio⁵⁵ e, no trabalho descrito, a variação do sinal foi inferior a 5% dentro de toda a faixa avaliada.

Um procedimento em fluxo com detecção potenciométrica foi desenvolvido para a determinação de ácido fítico e ortofosfato em extratos de cereais⁵⁶. Alíquotas do extrato foram injetadas simultaneamente em fluxos de soluções transportadoras distintas. Em ambas as linhas, foram empregados eletrodos de cobalto como detector potenciométrico. Em valores de pH iguais a 4 e 8, o eletrodo respondeu seletivamente a ortofosfato e ácido fítico, respectivamente, sendo as soluções transportadoras preparadas nos devidos valores de pH. Apesar de não exigir tratamento prévio dos extratos, foi necessária a utilização de dois detectores para que a análise de especiação fosse obtida. Além disto, não foi avaliado se a presença de matéria orgânica afetaria as respostas dos eletrodos, o que exigiria tratamento prévio das amostras.

Na literatura, há escassez quanto à utilização da foto-oxidação para o fracionamento de fósforo em extratos de alimentos derivados de cereais e leguminosas. O tratamento necessário para estas determinações pode ser realizado em sistemas de análises em fluxo, que trazem diversas vantagens em relação aos procedimentos em batelada.

2.2 Parte experimental

2.2.1 Equipamentos e acessórios

O sistema de análises em fluxo com multicomutação foi construído com cinco microbombas (Biochem) e uma válvula solenoide (NRResearch), uma cela de fluxo de quartzo (Hellma) com 1,0 cm de caminho óptico, tubos de polietileno ou de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,8 mm *d.i.* e confluências construídas em acrílico. Os volumes dispensados pelas microbombas (P_1 a P_5) foram aferidos pela massa de água dispensada em 100 pulsos, sendo a incerteza em relação a estes volumes inferior a 1,2%. Estes dispositivos foram controlados eletronicamente por um microcomputador Pentium I através de uma das interfaces paralelas disponíveis. Para o acionamento dos dispositivos, um circuito integrado ULN2803 foi empregado e a alimentação foi realizada através de uma fonte de diferença de potencial constante (12 V). O diagrama do circuito eletrônico é apresentado na Figura 2.1. O programa para o controle dos dispositivos foi desenvolvido em linguagem Visual Basic 6.0 (Microsoft) e permitiu a variação do número de pulsos aplicados a cada microbomba, do número de ciclos de amostragem e de replicatas, além do tempo de parada de fluxos.

Figura 2.1. Diagrama do circuito eletrônico para o controle das válvulas e microbombas solenoide (D_i) através de uma das portas paralelas (P) do computador.

Para as medidas dos sinais, foi empregado um espectrofotômetro multicanal que consiste de um arranjo linear de 2048 fotodetectores do tipo CCD (*Charge-coupled devices*, Ocean Optics), diretamente acoplado a um microcomputador (Intel Pentium), permitindo medidas entre 200 e 800 nm. Cabos de fibra óptica foram utilizados para o transporte da radiação proveniente de uma lâmpada de tungstênio-halogênio (Ocean Optics) até a cela de fluxo e da saída desta até o sistema de detecção (Figura 2.2). A aquisição dos dados foi realizada com o software fornecido pelo fabricante.

Para a fotodegradação, foi empregado um reator de PTFE de 30 cm (150 μ L), fixado a um suporte de madeira revestido por papel alumínio e posicionado a 2,0 cm do bulbo da lâmpada de vapor de mercúrio (Osram, HQL E27), apresentado na Figura 2.3. A fonte foi alimentada por um reator (Helfont, 127 V, 2 A, 60 Hz).

Figura 2.2. Fotografia dos equipamentos empregados para medidas espectrofotométricas. (a) espectrômetro multicanal; (b) cabos de fibra óptica; (c) fonte de radiação (lâmpada tungstênio-halogênio) e (d) suporte contendo a cela de fluxo.

Figura 2.3. Fotografia do fotorreator: (a) bulbo da lâmpada de 125 W, (b) reator de PTFE (30 cm, 0,8 mm *d.i.*) posicionado logo abaixo do bulbo e (c) suporte de madeira revestido com papel alumínio para fixar o fotorreator.

Para o preparo das amostras de cereais, foi empregada uma mesa agitadora orbital (Tecnal), tubos de vidro com capacidade de 50 mL e bloco digestor com capacidade para 40 tubos (Tecnal).

2.2.2 Reagentes e soluções

As soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água desionizada. Uma alíquota de 15 mL de água foi adicionada à massa do sal $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Reagen), seguida da adição de HNO_3 concentrado (Merck). A solução foi avolumada com água a fim de se obter $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (1,0% m/v) de heptamolibdato de amônio em HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Soluções de ácido ascórbico (Biosoma) e de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Merck) 60 e 150 mmol L^{-1} , respectivamente, foram preparadas diariamente por dissolução dos reagentes em água. As soluções de KH_2PO_4 (Merck) e de fitato de sódio (Sigma), ambas contendo 20 mg L^{-1} P, foram preparadas em água. Soluções mais diluídas dos reagentes foram preparadas a partir das soluções descritas. Solução estoque de H_2SO_4 $5,0 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck) foi preparada por

diluição do ácido concentrado em água. Carvão ativado (Merck) foi utilizado para a remoção de matéria orgânica dos extratos de alimentos.

2.2.3 Procedimentos

O diagrama da Figura 2.4 representa o módulo de análises utilizado para o desenvolvimento do procedimento analítico. A rotina de acionamento para o fracionamento de fósforo é descrita na Tabela 2.1.

Figura 2.4. Diagrama do sistema de análises em fluxo empregado para o fracionamento de fósforo em alimentos derivados de vegetais. A: amostra; R_1 : $K_2S_2O_8$ 150 mmol L^{-1} ou H_2O ; R_2 : $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; R_3 : ácido ascórbico 60 mmol L^{-1} ; C: H_2O ; $P_1 - P_5$: microbombas solenoide; V: válvula solenoide; FR: fotoreator; x e y: pontos de confluência; B: reator de 50 cm; D: cela de fluxos acoplada ao espectrofotômetro e W: recipientes de descarte.

Tabela 2.1 – Rotina de acionamento das microbombas solenoide para o fracionamento de fósforo solúvel em extratos de alimentos^a.

<i>Etapa</i>	<i>Descrição</i>	<i>Microbomba</i>	<i>Volume por pulso(μL)</i>	<i>Nº de pulsos</i>
1 ^b	Inserção da amostra	P ₁	7,8	5
2 ^b	Inserção de K ₂ S ₂ O ₈ ou H ₂ O	P ₂	9,6	1
3	Transporte através do fotorreator	P ₃	15,6	14
4 ^c	Inserção do digerido	P ₃	15,6	2
5 ^c	Inserção do (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	P ₄	10,0	1
6 ^c	Inserção do ácido ascórbico	P ₅	15,0	1
7	Transporte e detecção	P ₃	15,6	120
8 ^d	Substituição da amostra ou R ₁	P ₁ ou P ₂	7,8 ou 9,6	100
		P ₃	15,6	30

a) A frequência de acionamento das microbombas foi de 5 Hz, exceto na etapa 3 (frequência de 3 Hz); b) 2 ciclos de amostragem; c) 4 ciclos de amostragem; d) Válvula V acionada.

A zona de amostra foi formada por duas repetições das etapas 1 e 2 (dois ciclos de amostragem) e foi transportada para o fotorreator com 14 pulsos da solução transportadora a frequência de 3 Hz, que corresponde à vazão de 3,0 mL min⁻¹ (etapa 3). Alíquotas do digerido (zona de amostra após tratamento no fotorreator) foram então inseridas no reator B (etapa 4), seguidas de alíquotas dos reagentes R₂ (etapa 5) e R₃ (etapa 6). Este ciclo foi repetido por quatro vezes e a zona de amostra foi transportada até a cela de fluxos para a medida espectrofotométrica ($\lambda = 700$ nm). Para que o fotorreator atingisse o equilíbrio térmico, a fonte UV foi ligada com 10 minutos de antecedência às determinações.

Na substituição da amostra ou soluções de referência, foi necessário garantir que a solução preenchesse a tubulação até o ponto de confluência **x**. Sendo assim, 100 pulsos foram aplicados à microbomba P₁ e, simultaneamente, a válvula solenoide V foi acionada, direcionando a amostra para o descarte (etapa 8). O volume de amostra entre o ponto de confluência **x** e a válvula V, foi removido empregando 30 pulsos da solução transportadora

(etapa 8). Dessa forma, foi evitada a passagem de fluidos através da cela de detecção durante a substituição da amostra, minimizando riscos de contaminação.

Os efeitos da concentração dos reagentes, número de pulsos de cada microbomba, número de ciclos de amostragem e tempo de digestão foram avaliados, a fim de maximizar a sensibilidade, obter faixa de resposta linear adequada e minimizar o sinal referente ao branco e o consumo de reagentes. A diferença entre os sinais referentes ao fósforo e ao branco (sinal analítico) e o desvio das medidas foram levados em consideração na etapa de otimização. Em seguida, foram estimadas as características analíticas do procedimento e analisados extratos de alimentos.

2.2.4 Preparo dos extratos de alimentos derivados de cereais e leguminosas

Foram analisadas amostras de arroz (diâmetro de partícula de 60 μm) e de farinhas de soja, trigo e aveia. Os extratos foram preparados de acordo com procedimento para a determinação de ortofosfato e de ácido fítico em cereais⁵³. A *ca.* 3,0 g de amostra foram adicionados 30 mL de H_2O desionizada e as suspensões foram agitadas em mesa agitadora orbital por 60 minutos. As misturas foram filtradas em filtros quantitativos para retirada do material particulado de maior diâmetro e em filtros de acetato de celulose com porosidade de 0,45 μm para a remoção do material particulado remanescente. Os extratos foram avolumados para 50 mL e analisados pelos procedimentos desenvolvido e de referência.

Previamente às medidas pelo procedimento desenvolvido, foi adicionado 1,0 g de carvão ativado aos extratos. A mistura foi submetida à agitação orbital por 10 minutos, seguida de filtração. O extrato foi avolumado e submetido ao fracionamento de P utilizando o sistema de análises em fluxo com multicomutação apresentado na Figura 2.4.

2.2.5 Procedimento de referência

Para comparar os resultados obtidos com o procedimento proposto, foi realizada a digestão nitro-perclórica dos extratos⁵², obtidos de acordo com o procedimento de extração descrito na seção 2.2.4⁵³. Foram adicionados 20 mL dos extratos em tubos de vidro, que foram submetidos a aquecimento convectivo em bloco digestor a 110 °C até evaporação quase total do solvente. Em seguida, foram adicionados 5,0 mL de HNO₃ concentrado e, após aquecimento (180 °C) quase à secura, 0,7 mL de HClO₄ concentrado. O extrato foi novamente mantido no bloco digestor para a evaporação quase completa do ácido. Em seguida, o digerido foi avolumado para 20 mL e analisado em sistema de análises em fluxo com adição contínua de reagentes para a determinação de ortofosfato. O fósforo inorgânico foi determinado diretamente na amostra pelo método do azul de molibdênio.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Aspectos gerais

O ortofosfato foi quantificado através da reação com heptamolibdato de amônio, formando o ácido fosfomolibdico (Equação 21), que foi reduzido pelo ácido ascórbico ao azul de molibdênio (Equações 22 e 23), que apresenta máximo de absorção em 700 nm⁵⁷. O sal sódico do ácido fítico (C₆H₆O₂₄P₆Na₁₂) foi selecionado como espécie modelo por ser a forma majoritária de fósforo orgânico em materiais vegetais⁴¹.

Apesar da ampla aplicação à determinação de ortofosfato, a estequiometria e os mecanismos de reação da formação do azul de molibdênio ainda não foram completamente elucidados⁵⁸. Na etapa de redução do ácido fosfomolibdico, apenas parte do Mo(VI) é reduzido a Mo(V), resultando na geração das espécies $\text{H}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{39}]$ (MB1) e $\text{H}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{38}]$ (MB2), com absorvidades molares iguais a 2300 e 17000 $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente, que foram identificadas após separação cromatográfica⁵⁸. As fórmulas moleculares também podem ser representadas como $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 10\text{MoO}_3 \cdot \text{Mo}_2\text{O}_5$ e $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 8\text{MoO}_3 \cdot 2\text{Mo}_2\text{O}_5$ para MB1 e MB2, respectivamente, porém não são as mais recomendadas para serem utilizadas⁴⁸. A velocidade de reação para a formação dos produtos é diferente e depende de parâmetros químicos como concentração de heptamolibdato e pH. Em estudos da literatura, o tempo necessário para a conversão quantitativa do $\text{H}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ a MB2 foi de 2 horas empregando ácido ascórbico como agente redutor. Entretanto, a velocidade de reação é diretamente afetada pela concentração de heptamolibdato⁵⁹. Ambas as espécies são formadas independentemente do agente redutor empregado (ácido ascórbico, SnCl_2 ou hidroxilamina), porém, a velocidade de formação de MB1 é influenciada pela natureza do agente redutor. Uma hipótese de estequiometria das reações é apresentada nas equações 22 e 23, considerando que o fósforo não atua como catalisador⁵⁸. Entretanto, esta hipótese não deve ser descartada, pois um composto azul é formado mesmo na ausência de fósforo quando o heptamolibdato de amônio é misturado a um agente redutor, porém com menor velocidade de reação.

Com o emprego do ácido ascórbico como agente redutor, houve favorecimento da formação de MB1, indicando que os resultados obtidos podem ser explicados com base na equação 22, uma vez que sistemas de análises em fluxo se caracterizam por curtos tempos de residência (usualmente inferiores a 30 s)¹⁵.

O $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ foi empregado em diversos procedimentos de fotodegradação da matéria orgânica, pois gera espécies fortemente oxidantes⁸, como o $\text{SO}_4^{\bullet-}$, H_2O_2 e $\text{OH}^{\bullet}$ (equações

12-15, seção 1.1.2). Para se obter boa eficiência de fotodegradação, altas concentrações de persulfato são necessárias, uma vez que os radicais sulfato e hidroxila reagem para formar hidrogenossulfato e oxigênio molecular, não havendo aproveitamento total dos radicais gerados no processo.

2.3.2 Estudos preliminares

Estudos de foto-oxidação com ácido fítico foram conduzidos com uma lâmpada de vapor de mercúrio de 125 W, cujo espectro de emissão é mostrado na Figura 2.5. Inicialmente, foram adotadas as condições do procedimento analítico para o fracionamento de fósforo em materiais vegetais após foto-oxidação⁴⁰. Em um béquer, foram adicionados 8,0 mL de solução de ácido fítico (equivalente a 20 mg L⁻¹ P_O), 30 µL de H₂SO₄ concentrado e 0,25 g de K₂S₂O₈. A mistura foi homogeneizada e irradiada por 20 minutos, sob agitação magnética. Em seguida, o digerido foi analisado em um sistema de análises em fluxo com adição contínua de reagentes para a determinação de ortofosfato e a resposta foi comparada com a obtida com uma solução de KH₂PO₄ (20 mg L⁻¹ P_I). Os sinais referentes a P_I, digerido e branco foram (0,203 ± 0,003), (0,210 ± 0,001) e (0,075 ± 0,005), respectivamente, indicando a conversão quantitativa do P_O a P_I. A degradação do ácido fítico poderia ter sido causada tanto pela irradiação UV (especialmente pela emissão da lâmpada de vapor de mercúrio em 254 nm), quanto pelo calor gerado durante a operação da fonte. Sendo assim, a decomposição foi conduzida em meio de persulfato, tanto com aquecimento convectivo, quanto com irradiação UV. No experimento sem irradiação, uma chapa de aquecimento manteve a temperatura da solução em (60 ± 3) °C, similar à observada durante a foto-oxidação. As respostas obtidas estão apresentadas na Tabela 2.2.

Figura 2.5. Espectro de emissão da lâmpada de vapor de mercúrio de 125 W, apresentada na fotografia da Figura 2.3.

Tabela 2.2 – Respostas obtidas com ácido fítico ($20 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$) após tratamento com aquecimento convectivo ou irradiação UV em diferentes tempos.

<i>Procedimento</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Absorbância</i>
Aquecimento convectivo	5	$(0,102 \pm 0,004)$
	20	$(0,204 \pm 0,003)$
Irradiação UV	5	$(0,133 \pm 0,004)$
	20	$(0,210 \pm 0,001)$

Nos estudos apresentados na Tabela 2.2, os sinais referentes ao branco foram $< 0,08$. As respostas para ambos os tratamentos não apresentaram diferenças significativas após 20 minutos, indicando a predominância do efeito térmico para o tratamento em condições de equilíbrio. Entretanto, com tempo de preparo de 5 minutos, foi observado sinal *ca.* 35% maior quando a foto-oxidação foi utilizada, indicando que a radiação UV apresentou influência sobre a conversão do ácido fítico. Desta forma, foi demonstrado potencial para foto-oxidação

em linha, em que o aquecimento da amostra não seria tão pronunciado como em batelada, devido ao curto tempo de residência. Após os estudos preliminares, a lâmpada de vapor de mercúrio de 125 W foi utilizada para construir o fotorreator apresentado na Figura 2.3, acoplado ao sistema de análises em fluxo para o fracionamento de fósforo solúvel em extratos de alimentos (Figura 2.4).

2.3.3 Otimização do procedimento

Para o fracionamento de P solúvel em cereais, foi empregado o sistema de análises em fluxo com multicomutação representado na Figura 2.4. Geralmente, em procedimentos com fotodegradação em linha são empregados fotorreatores constituídos por bobinas de PTFE ou quartzo com, no mínimo, 300 cm (*ca.* 1,5 mL de volume interno)^{23,60}. Adicionalmente, sistemas de refrigeração são empregados (*e.g.* *cooler* de microcomputadores) para dissipar o calor gerado durante a operação da lâmpada e minimizar a formação de bolhas de gás na zona de amostra. Usualmente, emprega-se também um dispositivo para a remoção das bolhas geradas durante o processo. No procedimento proposto, foi empregado um reator de PTFE de 30 cm (150 μ L), posicionado a 2,0 cm do bulbo da lâmpada de vapor de mercúrio de 125 W (Figura 2.3). Desta forma, não foi observada a formação de bolhas com tempos de residência inferior a 15 s, dispensando a utilização de dispositivos de refrigeração ou de remoção de bolhas de gás.

Os estudos iniciais foram realizados com a lâmpada de vapor de mercúrio desligada, a fim de otimizar o procedimento para a determinação de ortofosfato. Inicialmente, foram fixados 2 ciclos de amostragem, cada um constituído por 24 μ L de amostra (3 pulsos de P_1) e 10 μ L de H_2O (1 pulso de P_2). A zona de amostra foi transportada do ponto de confluência **x** através do fotorreator até **y**. Para a inserção dos reagentes cromogênicos, foram utilizados 75 μ L desta zona (5 pulsos de P_3), simulando a solução que teria sido digerida no fotorreator,

20 μL de R_2 (2 pulsos de P_4) e 30 μL de R_3 (2 pulsos de P_5) em cada ciclo de amostragem. Em seguida, a zona de amostra foi transportada para a cela de fluxos (D) com 120 pulsos do transportador. As concentrações iniciais de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, ácido ascórbico e HNO_3 foram fixadas em 7,5; 60 e 500 mmol L^{-1} , respectivamente.

O número de ciclos de amostragem para a formação do azul de molibdênio no reator B (Figura 2.4) foi variado até 3 ciclos (375 μL da zona de amostra). A Figura 2.6 representa a variação dos sinais referentes ao branco e a uma solução 20 mg L^{-1} P_I (0,65 mmol L^{-1}). Foi observado aumento significativo do sinal analítico com a alteração de 1 para 2 ciclos de amostragem devido à menor dispersão da zona de amostra no reator B, apesar do branco ter aumentado *ca.* 2 vezes. Com 3 ciclos, houve aumento do branco e o sinal referente ao P_I não variou significativamente, pois a zona de amostra (375 μL) preenchia totalmente o reator B (250 μL). O aumento do branco ocorreu devido à menor dispersão com o aumento do número de ciclos, que aumentou o sinal referente ao produto azul formado na ausência de ortofosfato. Sendo assim, foram escolhidos 2 ciclos de amostragem para os estudos posteriores.

Figura 2.6. Efeito do número de ciclos de amostragem sobre o sinal de P_I (-■-) e do branco (-○-).

Solução de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 7,5 mmol L^{-1} em 0,50 mol L^{-1} de HNO_3 , ácido ascórbico 60 mmol L^{-1} , 20 mg L^{-1} P_I , reator de 50 cm. Solução transportadora H_2O .

Em seguida, foi avaliada a influência do volume do reagente R_2 (heptamolibdato de amônio) sobre o sinal analítico (Figura 2.7). O número de pulsos de P_4 foi variado de 1 a 4, resultando na inserção de 10 a 40 μL de R_2 por ciclo de amostragem. Com 10 μL do reagente por ciclo, não foi observada perda significativa de sensibilidade em relação ao emprego de 20 μL (*ca.* 6%), o que não justifica o maior consumo de reagente.

Figura 2.7. Efeito do volume de R_2 sobre o sinal de P_1 (-■-) e do branco (-○-). Solução de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 7,5 mmol L^{-1} em 0,50 mol L^{-1} de HNO_3 , ácido ascórbico 60 mmol L^{-1} , 20 mg L^{-1} P_1 , reator de 50 cm, empregando 2 ciclos de amostragem. Solução transportadora H_2O .

Estimando-se a concentração das espécies a partir das diluições, foi observado o excesso de heptamolibdato de 3 vezes em relação ao P_1 , quando inseridos 10 μL de R_2 por ciclo. De acordo com a equação 21, este excesso é suficiente para a conversão quantitativa de P_1 para formar o ácido fosfomolibdico. Nestas mesmas condições, o excesso de ácido ascórbico em relação ao analito foi estimado em *ca.* 30 vezes, que também seria suficiente para a conversão quantitativa do ácido fosfomolibdico a MB1. Entretanto, isto não ocorreu devido ao limitado tempo de residência e à baixa velocidade da reação de redução do Mo(VI)

a Mo(V). Para volumes maiores de R_2 , o excesso de heptamolibdato em relação a P_1 foi maior que 7 vezes. O excesso de ácido ascórbico em relação ao P_1 caiu para 20 vezes, o que afetou a velocidade da reação, causando diminuição do sinal analítico a partir de 30 μL de R_2 . A maior diluição do analito no ponto de confluência também contribuiu para diminuição do sinal. Perturbações por efeito Schlieren também foram observadas para volumes maiores de R_2 , devido às concentrações elevadas de reagentes (9,0 g L^{-1} de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ e 0,5 mol L^{-1} HNO_3). Consequentemente, houve aumento da magnitude do branco e a precisão das medidas foi afetada. Sendo assim, foram escolhidos 10 μL de R_2 (1 pulso de P_4) por ciclo para os estudos posteriores. A estratégia de compensar as perturbações por efeito Schlieren com medidas em dois comprimentos de onda²² não foi utilizada devido à ampla faixa de absorção do produto formado, que dificulta a seleção de um comprimento de onda de referência. Por exemplo, subtraindo os sinais medidos simultaneamente em 700 nm e em 450 nm (região em que a espécie apresenta mínima absorção de radiação), o sinal analítico diminuiu em *ca.* 60%.

Com as condições definidas anteriormente, foi avaliado o efeito do volume de ácido ascórbico, com 1 a 5 pulsos de P_5 , equivalente ao intervalo de 15 a 75 μL por ciclo (Figura 2.8). Foi observada diminuição significativa do sinal analítico com o volume de R_3 . O aumento do branco ocorreu devido à maior concentração de AA na zona de amostra, favorecendo a formação do produto azul na ausência de fósforo e o surgimento de perturbações por efeito Schlieren. Portanto, 1 pulso de P_5 (15 μL de R_3) por ciclo foi selecionado.

Figura 2.8. Efeito do volume de R₃ sobre o sinal de P₁ (-■-) e do branco (-○-). Solução de (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 7,5 mmol L⁻¹ em 0,50 mol L⁻¹ de HNO₃, ácido ascórbico 60 mmol L⁻¹, 20 mg L⁻¹ P_I, reator de 50 cm, empregando 2 ciclos de amostragem. Solução transportadora H₂O.

Os efeitos das concentrações dos reagentes também foram avaliados, iniciando pelo heptamolibdato de amônio (Figura 2.9). Foi observada variação significativa do sinal analítico (*ca.* 200%) com a concentração de (NH₄)₆Mo₇O₂₄ até 7,5 mmol L⁻¹. Nesta condição, o heptamolibdato está *ca.* 2 vezes em excesso em relação ao ortofosfato, o que é maior que a proporção necessária para formação do ácido fosfomolibdico (Equação 21). Em concentração de 7,5 mmol L⁻¹, o excesso de heptamolibdato foi de 20%, indicando que, em concentrações maiores, a diminuição do sinal analítico ocorreu devido à falta de reagente. Com maior excesso de heptamolibdato, não houve variação significativa do sinal analítico, não compensando o consumo duas ou três vezes maior de reagente. Além disto, a concentração de heptamolibdato de 24,0 mmol L⁻¹ resultou em maiores desvios devido às perturbações por efeito Schlieren. Sendo assim, foi selecionada a concentração 7,5 mmol L⁻¹ de (NH₄)₆Mo₇O₂₄.

Figura 2.9. Efeito da concentração de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ sobre o sinal de P_1 (■) e do branco (○). Solução de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ em $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 , ácido ascórbico 60 mmol L^{-1} , 20 mg L^{-1} P_1 , reator de 50 cm , empregando 2 ciclos de amostragem. Solução transportadora H_2O .

A variação do sinal analítico foi significativa com o aumento da concentração de ácido ascórbico até 60 mmol L^{-1} ($1,0\% \text{ m/v}$), Figura 2.10. Mesmo na menor concentração avaliada, o ácido ascórbico estava em excesso em relação ao ácido fosfomolibdico formado (*ca.* 3 vezes). Entretanto, foi observado um efeito na formação do azul de molibdênio com maior excesso do redutor. O íon ascorbato é a principal espécie responsável pela redução do ácido fosfomolibdico. Na faixa de acidez do experimento, a forma associada do ácido ascórbico ($\text{pK}_1 = 4,04$ e $\text{pK}_2 = 11,3$)⁶¹ correspondia a $> 99,9\%$ das espécies, resultando em menor velocidade de reação redox com Mo(VI) . Comparando as respostas obtidas para 35 e 60 mmol L^{-1} de ácido ascórbico, houve aumento de *ca.* 15% no sinal analítico. Em concentrações maiores, foi observada variação do sinal analítico $< 2,0\%$ e aumento do branco, sendo a concentração de 60 mmol L^{-1} selecionada para os estudos posteriores.

Figura 2.10. Efeito da concentração de ácido ascórbico sobre o sinal de P₁ (■) e do branco (○). Solução de (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 7,5 mmol L⁻¹ em 0,50 mol L⁻¹ de HNO₃, 20 mg L⁻¹ P₁, reator de 50 cm, empregando 2 ciclos de amostragem. Solução transportadora H₂O.

A acidez do meio é uma condição de compromisso, uma vez que a formação do ácido fosfomolibdico ocorre em meio ácido e, por outro lado, o ascorbato é a espécie redutora dos íons Mo(VI). Portanto, foi avaliado o efeito da concentração de HNO₃ em R₂ (Figura 2.11). Em trabalho anterior⁵⁷, foi obtida melhor resposta para a determinação de P₁ através da formação do azul de molibdênio em valores de pH entre 0,6 e 0,9 e com fração molar H₃O⁺/heptamolibdato = 70. Nos resultados descritos na Figura 2.11, houve aumento significativo do sinal analítico com concentrações entre 0,2 e 0,5 mol L⁻¹ (ca. 50%). A melhor resposta foi obtida com HNO₃ 0,5 mol L⁻¹, que corresponde à fração H₃O⁺/heptamolibdato = 63. Com HNO₃ 0,1 mol L⁻¹, o sinal analítico não foi significativamente diferente do sinal do branco, pois a concentração de H₃O⁺ não foi suficiente para que fosse formado o ácido fosfomolibdico, devido à diluição do ácido de aproximadamente 7 vezes e do efeito da dispersão. Em acidez mais elevada, o sinal do branco

aumentou devido à maior formação do produto na ausência de P. Além disto, não foi observado aumento do sinal analítico porque a velocidade de formação do azul de molibdênio é inversamente proporcional à acidez. Perturbações por efeito Schlieren foram mais pronunciadas quando foi empregado $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 .

Figura 2.11. Efeito da concentração de HNO_3 em R_2 sobre o sinal de P_1 (■-) e do branco (-○-). Solução de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em HNO_3 , ácido ascórbico 60 mmol L^{-1} , 20 mg L^{-1} P_1 , reator de 50 cm , empregando 2 ciclos de amostragem. Solução transportadora H_2O .

A otimização do sistema para a determinação de P_1 foi realizada inserindo água ao invés do oxidante através da microbomba P_2 . O efeito de persulfato sobre o sinal analítico foi avaliado com uma solução $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (40 g L^{-1}) e 20 mg L^{-1} P_1 . Foram obtidos sinais analíticos ($0,094 \pm 0,006$) e ($0,102 \pm 0,011$) na ausência e presença de persulfato, respectivamente, indicando que não ocorreu competição do persulfato com o Mo(VI) na oxidação do ácido ascórbico. Foi observado aumento do branco devido às perturbações por

efeito Schlieren que surgiram devido à presença do oxidante em altas concentrações na zona de amostra. Contudo, a precisão das medidas do branco não foi afetada.

A concentração de $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ do oxidante foi empregada inicialmente por ser a mais utilizada em procedimentos em fluxo com fotodegradação em linha^{60,62}. Para otimizar a concentração de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, a lâmpada do fotorreator foi ligada e implementada parada de fluxo por 15 s para aumentar o tempo de residência e favorecer a foto-oxidação. Foram utilizadas soluções de KH_2PO_4 e ácido fítico em concentrações equivalentes a 20 mg L^{-1} P. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 2.12. Foi observado aumento de *ca.* 50% do sinal referente ao P_I com o aquecimento da zona de amostra pela fonte de radiação, devido à etapa de redução do ácido fosfomolibdico por ácido ascórbico ser relativamente lenta. A variação do branco foi pouco significativa, não afetando a quantificação de ortofosfato.

Figura 2.12. Efeito da concentração de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ sobre os sinais referentes ao P_I (■), P_O (●) e ao branco (○). Solução de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 , ácido ascórbico 60 mmol L^{-1} , reator de 50 cm. Solução transportadora H_2O . Tempo de parada de fluxo de 15 s.

De acordo com a Figura 2.12, não foram observadas diferenças significativas do sinal referente ao P_I na presença de persulfato mesmo com excesso de oxidante de 60 vezes em relação ao analito. Como esperado, na ausência do oxidante, o sinal referente ao ácido fítico não apresentou diferenças significativas do branco, indicando que a degradação direta pela radiação UV não foi significativa. Este estudo também confirmou a necessidade da conversão do P_O a P_I para formar o azul de molibdênio, ao contrário de um relatado na literatura⁵⁴. A diferença entre os sinais de P_O e P_I diminuiu significativamente com a concentração de oxidante até 40 mmol L^{-1} (10 g L^{-1}). A partir deste valor, a eficiência de conversão foi constante, sendo esta concentração selecionada para os estudos posteriores. Devido ao curto tempo de residência, a conversão de P_O a P_I não foi quantitativa, como observado na Figura 2.12, sendo estimada em *ca.* 45% através da razão entre os sinais de P_O e P_I . Apesar disto, o procedimento pode ser aplicado no fracionamento de fósforo devido à temporização reprodutível dos sistemas de análises em fluxo e pelo ácido fítico representar a maior parte do P_O em materiais vegetais.

A etapa de parada de fluxo foi avaliada para aumentar o tempo de residência da zona de amostra e, conseqüentemente, a eficiência de conversão do P_O a P_I (Figura 2.13). Com a incidência de radiação UV, houve geração significativa de ortofosfato resultante da degradação do P_O . Com tempo de parada de fluxo de 15 s, o sinal referente ao P_O aumentou *ca.* 30%, não sendo observado aumento significativo do sinal em tempos maiores de parada de fluxo. Além disto, o aquecimento da zona de amostra acarretou na geração de bolhas devido à diminuição da solubilidade dos gases dissolvidos, afetando a precisão das medidas.

Figura 2.13. Efeito do tempo de parada de fluxo com a zona de amostra no fotorreator. Sinais referentes ao P₁ (■-), P₀ com K₂S₂O₈ 38 mmol L⁻¹ (●-) ou sem oxidante (□-) e ao branco (○-). Solução de (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 7,5 mmol L⁻¹ em 0,50 mol L⁻¹ de HNO₃, ácido ascórbico 60 mmol L⁻¹, reator de 50 cm. Solução transportadora H₂O.

Com tempo de parada de fluxo de 15 s, eventualmente foi observada a geração de bolhas, devido ao superaquecimento de alguns segmentos da zona de amostra. Sendo assim, a parada de fluxo foi substituída pela diminuição da vazão do transportador durante a etapa de foto-oxidação. Desta forma, a solução no interior do fotorreator foi constantemente renovada, evitando superaquecimento e permitindo incidência mais uniforme de radiação UV sobre a zona de amostra. A vazão do transportador foi diminuída através da alteração da frequência de acionamento da microbomba P₃ de 5 para 3 Hz, correspondendo a vazões de 4,5 e 3,2 mL min⁻¹, respectivamente. Com esta estratégia, o tempo para fotodegradação foi de *ca.* 10 s e os sinais obtidos nesta condição e com parada de fluxo de 15 s não apresentaram diferenças significativas (variação < 5,0%). Além disto, o coeficiente de variação diminuiu de 10 para 3,2% para P₀ e de 3,6 para 1,2% para P₁. Portanto, esta estratégia foi adotada para a foto-oxidação de P₀.

Quando água desionizada foi inserida no fotorreator em substituição ao oxidante, não foram observadas diferenças significativas entre o branco e o sinal referente ao P_O . Isto permitiu a obtenção de sinais referentes a P_I na ausência de $K_2S_2O_8$ e, sequencialmente, P_{TS} ($P_I + P_O$) na presença do oxidante. Como as condições de dispersão e mistura foram mantidas, o P_O foi quantificado diretamente pela diferença entre os sinais referentes ao P_{TS} e P_I .

Os volumes de amostra e do digerido foram otimizados empregando solução de ácido fítico, visando maximizar a eficiência de degradação. Na Figura 2.14, estão apresentados os resultados obtidos com a variação do volume de amostra empregando 2 ciclos de amostragem e solução de ácido fítico 20 mg L^{-1} P. Foi observado aumento do sinal analítico até $55 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra (7 pulsos de P_I) por ciclo. Volumes maiores acarretaram em perda de eficiência de conversão, pois frações da zona de amostra permaneceram fora da câmara devido à dispersão e não foram irradiadas. Foram escolhidos 5 pulsos de P_I ($40 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra) por ciclo para os estudos posteriores por apresentar menores desvios em relação aos volumes maiores.

Figura 2.14. Efeito do volume de amostra sobre os sinais referentes ao ácido fítico 20 mg L^{-1} P (■) e ao branco (○), com frequência de P_3 alterada para 3 Hz durante foto-oxidação. Solução de $K_2S_2O_8$ 38 mmol L^{-1} , $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 , ácido ascórbico 60 mmol L^{-1} , reator de 50 cm. Solução transportadora H_2O .

Foi também avaliado o efeito do volume do digerido a ser introduzido no reator B (Tabela 2.1, etapa 4) para a adição dos reagentes (Figura 2.15). Neste estudo, foram empregados 4 ciclos de amostragem para formação do azul de molibdênio, visando melhorar as condições de mistura entre digerido e reagentes. Com esta modificação, o volume do digerido foi diminuído de 75 para 30 μL por ciclo para que o volume do reator B não fosse ultrapassado. Isto permitiu dobrar os volumes dos reagentes e o sinal analítico aumentou em *ca.* 30% devido às melhores condições de mistura com o aumento do número de interfaces entre as soluções.

Figura 2.15. Efeito do volume do digerido sobre os sinais referentes ao ácido fítico 20 mg L^{-1} P (-■-) e ao branco (-○-). Solução de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 38 mmol L^{-1} , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 7,5 mmol L^{-1} em 0,50 mol L^{-1} de HNO_3 , ácido ascórbico 60 mmol L^{-1} , reator de 50 cm. Solução transportadora H_2O .

De acordo com a Figura 2.15, a partir de 46 μL do digerido (3 pulsos de P_3) por ciclo, foi observada tendência à diminuição do sinal analítico. Isto ocorreu devido à diluição dos reagentes, que desfavoreceu a formação do azul de molibdênio. Comparando os sinais obtidos

para 15 e 30 μL de digerido, não houve variação significativa. Entretanto, como houve perda de precisão com 15 μL de digerido, foram selecionados 30 μL (2 pulsos por ciclo) para os estudos posteriores.

Na Tabela 2.3, está apresentado um resumo dos parâmetros otimizados, as faixas avaliadas e os valores selecionados.

Tabela 2.3 – Faixas avaliadas e valores selecionados dos parâmetros otimizados do sistema de análises em fluxo para o fracionamento de fósforo em extratos de alimentos.

<i>Parâmetro</i>	<i>Faixa avaliada</i>	<i>Valor selecionado</i>
Ciclos de amostragem	1 – 3	2
Volume de R_2 (μL) ^a	10 – 40	10
Volume de R_3 (μL) ^a	14 – 70	14
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (mmol L^{-1})	2,0 – 24,0	7,5
Ácido ascórbico (mmol L^{-1})	15 – 120	60
HNO_3 em R_2 (mol L^{-1})	0,1 – 1,0	0,5
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (mmol L^{-1})	0 – 150	150
Tempo de digestão (s)	0 – 45	10
Volume de amostra (μL) ^a	23 – 70	40
Volume do digerido (μL) ^a	15 – 80	30

a) volume inserido a cada ciclo de amostragem.

2.3.4 Avaliação das características analíticas

Após a otimização dos parâmetros relevantes, foi obtida uma curva analítica com ácido fítico (Figura 2.16). A perda de linearidade deve-se à concentração insuficiente do agente oxidante, evidenciada pelas respostas similares para concentrações de Po superiores a 30 mg L^{-1} . Nesta condição, a concentração do oxidante na zona de amostra é *ca.* 55 vezes maior que a de ácido fítico. Entretanto, de acordo com as Equações 14 e 15, apresentadas na seção 1.1.3, os radicais hidroxila e sulfato reagem para formar hidrogenossulfato e oxigênio, diminuindo a quantidade de radicais oxidantes e consequentemente afetando a eficiência de

degradação. A concentração de $K_2S_2O_8$ foi então aumentada de 10 para 40 g L^{-1} , visando manter constante a eficiência de conversão do ácido fítico em concentrações maiores que $20\text{ mg L}^{-1} P_O$. Na Figura 2.17, estão apresentadas as curvas analíticas para P_I (R_I : água) e para P_O (R_I : $K_2S_2O_8\ 40\text{ g L}^{-1}$).

Figura 2.16. Curva analítica obtida com soluções de ácido fítico, empregando fotodegradação com $80\ \mu\text{L}$ de amostra e $20\ \mu\text{L}$ de $K_2S_2O_8\ 10\text{ g L}^{-1}$ (2 ciclos de amostragem) e formação do azul de molibdênio com $120\ \mu\text{L}$ do digerido, $40\ \mu\text{L}$ de R_1 e $60\ \mu\text{L}$ de R_2 (4 ciclos de amostragem).

Figura 2.17. Curvas analíticas obtidas com soluções de KH_2PO_4 (-■-) e ácido fítico (-○-), empregando as condições descritas na Figura 2.16, exceto pela substituição de R_1 por água para a medida P_I e por $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 40 g L^{-1} para a medida P_O .

Com o aumento da concentração do oxidante, foi observada resposta linear entre 5 e 40 $\text{mg L}^{-1} \text{P}_O$, descrita pela equação $A = 0,00970 C_{\text{P}_O} + 0,0827$ ($r = 0,999$), em que A é absorbância e C_{P_O} é a concentração de fósforo orgânico em mg L^{-1} , confirmando que a falta de linearidade era devida à falta de oxidante. Substituindo o $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ por água, foram obtidas medidas para P_I , em que foi observada resposta linear entre 5 e 40 $\text{mg L}^{-1} \text{P}_I$, descrita pela equação $A = 0,0207 C_{\text{P}_I} + 0,0366$, em que C_{P_I} é a concentração de fósforo inorgânico em mg L^{-1} . A eficiência de conversão foi estimada em $(46 \pm 1)\%$, com base na razão entre os coeficientes angulares das curvas analíticas de P_O e P_I .

As médias de 20 medidas utilizando soluções 20 mg L^{-1} de P_O e P_I foram iguais a $(0,212 \pm 0,007)$ e $(0,455 \pm 0,007)$, respectivamente, resultando em coeficientes de variação de 3,0% para P_O e 1,2% para P_I . Os limites de detecção, estimados a partir de 20 medidas do

branco, com 99,7% de confiança, foram $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ para P_I e $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ para P_O . Por determinação, foram gerados 2,5 mL de resíduos, consumindo 380 μg de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 620 μg de ácido ascórbico e 790 μg de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. A frequência de amostragem foi estimada em 80 determinações por hora. Na Tabela 2.4, estão apresentadas as características analíticas de alguns procedimentos cujo preparo de amostra visa o fracionamento de fósforo ou determinação de ácido fítico em materiais vegetais. As alternativas para o fracionamento de fósforo em materiais vegetais e derivados são escassas e requerem procedimentos distintos para diferenciar as frações. Assim como na digestão nitro-perclórica⁵², no procedimento proposto, a determinação de P_I e P_O foram sequenciais, porém empregando um único sistema de análises em fluxo. O preparo de amostra consumiu 10 s em comparação com várias horas da digestão nitro-perclórica. Além disto, os riscos de contaminações e ao analista foram minimizados pelo processamento da amostra em sistema fechado, sem o emprego de ácidos minerais concentrados sob aquecimento.

Em um procedimento que explorou a fotodegradação de espécies de fósforo⁴⁰, o fracionamento foi obtido empregando $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ e tempo curto de preparo de amostra (20 minutos) em comparação à digestão nitro-perclórica. Entretanto, no procedimento desenvolvido, o tempo de digestão foi diminuído em 120 vezes devido à possibilidade de explorar analiticamente a conversão parcial do P_O a P_I . O consumo de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ por determinação diminuiu de 100 mg para 790 μg (*ca.* 125 vezes), não exigindo o emprego de H_2SO_4 . As desvantagens do uso de sistemas abertos (*e.g.* perdas e contaminações) também foram superadas com a mecanização do procedimento de preparo de amostras.

Tabela 2.4 – Características analíticas de alguns procedimentos para a determinação de espécies de fósforo.

<i>Procedimento</i>	<i>Descrição</i>	<i>Consumo de reagentes (mg)^a</i>	<i>Tempo de preparo (s)</i>	<i>Faixa linear (mg L⁻¹)</i>	<i>Referência</i>
Foto-oxidação em sistema em fluxo com multicomutação ^b	Conversão fotoquímica parcial em linha do fósforo orgânico	0,79 (K ₂ S ₂ O ₈) 1,5 (carvão)	10	5,0 – 40,0	Este trabalho
Foto-oxidação em batelada ^b	Degradação quantitativa da matéria orgânica após irradiação UV	100 (K ₂ S ₂ O ₈)	1200	0,5 – 25,0	40
Digestão nitro-perclórica em batelada ^b	Degradação quantitativa de matéria orgânica em frascos abertos	4500 (HNO ₃) 2200 (HClO ₄)	> 3600	10 – 40	52
Conversão enzimática em sistema de análises em fluxo ^b	Hidrólise enzimática do fitato e detecção espectrofotométrica de fósforo inorgânico	—	8	0,25 – 6,0	53
Extração sólido-líquido em batelada ^c	Separação do ácido fítico e determinação espectrofotométrica em sistema FIA com microbombas solenoide	500 (resina de troca iônica) 700 (NaCl)	> 1800	25 – 100	45
Extração sólido-líquido em fluxo ^c	Separação e determinação espectrofotométrica de ácido fítico em sistema SIA	4,0 (resina de troca iônica) 400 (NaCl)	60	50 – 200	46
Análise direta do extrato em fluxo ^b	Determinação potenciométrica de ortofosfato e de ácido fítico	—	—	10 – 1000	56

a) consumo por determinação; b) fracionamento de fósforo ($P_O = P_{TS} - P_I$); c) determinação de ácido fítico.

O sistema mecanizado com coluna preenchida com fitase imobilizada⁵³ para o fracionamento de P apresentou menor limite de detecção ($0,07 \text{ mg L}^{-1}$) em comparação com o procedimento proposto, o que não é uma desvantagem considerando as concentrações de P_i e P_o geralmente encontradas em cereais e leguminosas⁴¹. A faixa linear foi mais estreita, apesar de apresentar limites inferiores e superiores menores ($0,25$ a $6,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$) que no procedimento proposto ($5,0$ a $40,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$). A frequência de amostragem de ambos foi comparável (72 h^{-1} para o procedimento enzimático). A desvantagem deste procedimento é a especificidade da enzima fitase, que não permite a quantificação de outras espécies orgânicas contendo fósforo, que correspondem a 10-30% do fósforo orgânico. É importante que o fósforo orgânico proveniente de outras espécies seja levado em consideração no fracionamento, uma vez que algumas delas também formam complexos com alguns micronutrientes⁶³, alterando a biodisponibilidade.

O procedimento proposto viabilizou o fracionamento de fósforo após a remoção da matéria orgânica dos extratos. No procedimento potenciométrico⁵⁶, apesar de ter sido demonstrada a potencialidade para a determinação de P_i e ácido fítico, não foram realizados estudos com matéria orgânica, que poderia interferir e exigir sua remoção prévia. Além disto, o eletrodo de cobalto necessita de constante renovação devido ao contato com as soluções transportadoras. Esta desvantagem se torna mais crítica neste procedimento porque dois eletrodos distintos foram empregados para a quantificação de ambas as espécies.

Em relação aos procedimentos com separação do ácido fítico empregando resina de troca aniônica⁴⁵⁻⁴⁷, não foi obtido fracionamento de fósforo porque as derivações envolviam as reações de complexação entre ácido fítico e íons metálicos (*e.g.* Ca^{2+} e Fe^{3+}). Além disto, os tempos de preparo de amostra e os limites de quantificação foram, respectivamente, até 200 e 10 vezes superiores que no procedimento proposto.

2.3.5 Análise dos extratos de alimentos derivados de cereais e leguminosas

Para obter os extratos para análise pelo procedimento proposto, foi empregada a extração da fração solúvel de fósforo utilizada para a determinação enzimática de ácido fítico⁵³. Água deionizada foi utilizada como extrator, uma vez que não há necessidade de se tamponar o meio previamente às análises como no procedimento enzimático. O tempo de agitação foi igual ao descrito na literatura (60 minutos) e foram utilizados *ca.* 3,0 g de cada amostra, suspensas em 30 mL de água. Após filtração, os extratos apresentaram coloração amarelada devido à presença de matéria orgânica solúvel em meio aquoso.

Para a análise dos extratos pelo procedimento proposto, foi adicionado carvão ativado para eliminar a matéria orgânica que poderia competir com o ácido fítico no processo de degradação. Após o tratamento, os extratos não apresentavam coloração, indicando a remoção da maior parte da matéria orgânica. Esta estratégia foi anteriormente empregada para a eliminação de matéria orgânica de amostras de urina previamente à determinação de ácido fítico por espectrofotometria de absorção molecular⁶⁴ ou por fluorimetria⁶⁵.

Previamente às análises (Figura 2.18), os extratos foram diluídos 4 (farinhas de trigo e soja) ou 2 vezes (arroz e farinha de aveia). Inicialmente, foi realizada a determinação de P_I na ausência de $K_2S_2O_8$. Em sequência, o oxidante foi empregado para a quantificação de P_{TS} . Os valores dos sinais de P_I e P_O ($P_{TS} - P_I$) foram interpolados das curvas analíticas apresentadas na Figura 2.17.

Figura 2.18. Sinais transientes para P_I e P_T , obtidos com solução de ácido fítico 50 mg L^{-1} (a), com extratos de farinhas de soja (b – c), trigo (d – g), aveia (h – i) e arroz (j – k) e com o branco (l).

Para avaliar a exatidão do procedimento desenvolvido, o extrato foi também analisado pelo procedimento de referência⁵² (determinação espectrofotométrica de ortofosfato antes e após digestão nitro-perclórica), descrito na seção 2.2.4. As amostras foram analisadas em sistema de análises em fluxo com adição contínua de reagentes, empregado para a determinação de ortofosfato. Solução de ácido fítico 250 mg L^{-1} foi submetida aos mesmos tratamentos que as amostras (concentração final de 10 mg L^{-1} P) e recuperação de 96% foi observada, confirmando a conversão quantitativa na decomposição nitro-perclórica. Os resultados obtidos nas análises do extratos estão apresentados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Teores médios e incertezas ($n = 3$) obtidos no fracionamento de fósforo solúvel em amostras de materiais vegetais pelos procedimentos proposto e de referência^{52,53}. Os valores referem-se a duplicatas do procedimento de extração para cada amostra.

<i>Amostra</i>	<i>Fósforo inorgânico</i> ($\text{mg g}^{-1} \text{P}$)		<i>Fósforo orgânico</i> ($\text{mg g}^{-1} \text{P}$)	
	<i>Proposto</i>	<i>Referência</i>	<i>Proposto</i>	<i>Referência</i>
Farinha de soja	1,21 $\pm$ 0,01	1,24 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,07	1,14 $\pm$ 0,03
	1,24 $\pm$ 0,01	1,24 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,07	1,05 $\pm$ 0,01
Farinha de trigo A	1,12 $\pm$ 0,02	1,14 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,06	0,65 $\pm$ 0,02
	1,23 $\pm$ 0,01	1,24 $\pm$ 0,02	0,78 $\pm$ 0,09	0,78 $\pm$ 0,02
Farinha de trigo B	0,69 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,04	0,64 $\pm$ 0,02
	0,68 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,05	0,66 $\pm$ 0,04
Farinha de aveia	0,32 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,02
	0,31 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,03	0,40 $\pm$ 0,01
Arroz	0,10 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01
	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,02

Resultados para P_O em um dos extratos das amostras de arroz e farinha de soja foram mais baixos que os obtidos pelo procedimento de referência. Estas diferenças podem ser devidas ao ácido fítico que não foi eficientemente decomposto durante o tratamento da amostra, embora valores concordantes tenham sido obtidos para outro extrato do mesmo material. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os procedimentos, com nível de confiança de 95%. Os resultados confirmam que a espécie orgânica predominante nos cereais era o ácido fítico, embora resultados semelhantes fossem obtidos a partir de espécies mais facilmente degradáveis. Outras espécies presentes em cereais e derivados se diferenciam do ácido fítico apenas pelas quantidades de grupos fosfato ligadas ao anel cíclico. Com base nos mecanismos descritos na literatura¹, o rompimento da ligação $\text{C} - \text{OPO}_3$ pode ocorrer preferencialmente ao das ligações $\text{C} - \text{C}$ do anel. Estudos na literatura indicam que o radical hidroxila atua em reações de substituição em compostos cíclicos¹. Sendo assim, é possível que ocorram reações de substituição dos grupos fosfato ligados ao

anel cíclico por grupos hidroxila. Desta forma, a conversão do P_O a P_I seria independente da forma em que as espécies se encontram nas amostras, o que está de acordo com os resultados obtidos.

Os resultados comparativos confirmaram que o tratamento com carvão ativado não removeu quantidades significativas de ácido fítico ou ortofosfato, uma vez que não foi adicionado carvão ativado ao extrato submetido às análises pelo procedimento de referência.

2.4 Conclusões

A microdigestão em um sistema com microbombas solenoide permitiu o rápido fracionamento de fósforo solúvel em alimentos derivados de cereais e leguminosas. Resultados exatos e precisos foram obtidos devido às condições de reação e tempo altamente reprodutíveis, além de serem evitadas perdas do analito e contaminações durante a foto-oxidação do extrato em sistema fechado. A integridade do analista é assegurada devido às condições amenas para degradação do fósforo orgânico.

O fluxo pulsado proporcionado pelas microbombas melhora as condições de mistura, permitindo a utilização de reatores de volumes reduzidos, minimizando o consumo de amostras e reagentes, devido à mínima dispersão. Adicionalmente, aquecimentos pontuais da zona de amostra foram evitados, diminuindo a geração de bolhas de gás e dispensando a utilização de sistemas de resfriamento ou de degaseificação. Diferentemente de outros procedimentos com foto-oxidação em linha, a substituição do oxidante por água permitiu que as calibrações fossem realizadas sob as mesmas condições de dispersão. O fracionamento foi obtido sem o desligamento da lâmpada de vapor de mercúrio, que aumenta o tempo de vida útil da fonte e evita flutuações do sinal analítico devido a mudanças da temperatura para formação do azul de molibdênio.

Um aspecto crítico para foto-oxidação com $K_2S_2O_8$ é a necessidade de grande excesso do oxidante, devido à possibilidade de recombinação dos radicais formados, que pode afetar a decomposição da matéria orgânica. Este aspecto é mais crítico em procedimentos com preparo de amostras em batelada, que são mais demorados.

Os resultados obtidos pelos procedimentos proposto e de referência foram concordantes. A predominância do ácido fítico nos extratos e o rompimento preferencial das ligações C – OPO_3 permitiu que o fósforo orgânico fosse quantificado, mesmo com conversão incompleta de P_O a P_I (46%).

As características analíticas fazem com que o procedimento desenvolvido seja uma alternativa mais limpa e rápida para o fracionamento de fósforo em alimentos derivados de cereais e leguminosas, minimizando o consumo de reagentes e a geração de resíduos.

3

**SISTEMA DE ANÁLISES
EM FLUXO PARA O
FRACIONAMENTO DE
FÓSFORO DISSOLVIDO EM
ÁGUAS NATURAIS**

3.1 Introdução

3.1.1 Fósforo em águas naturais

As espécies de fósforo são encontradas solubilizadas ou em suspensão nos ambientes aquáticos e são classificadas em frações dissolvida ou filtrável (P_{TS}) e particulada ou não filtrável⁶⁶ (P_{TT}). O ortofosfato (P_I) é a forma inorgânica dissolvida predominante²⁴ em águas naturais, sendo a espécie prontamente biodisponível para a maioria dos seres vivos^{36,37}. É proveniente da lixiviação de rochas e solos e da degradação de outras espécies fosforadas.

O P_{TS} é mais facilmente absorvido por seres vivos e por isto apresenta maior importância para estudos de biodisponibilidade. Esta fração abrange as espécies inorgânicas e orgânicas, incluindo os compostos condensados de fósforo (Figura 3.1). A grande variabilidade de compostos fosforados em águas exige o uso de compostos modelo (Figura 3.2) para avaliar o desempenho de procedimentos analíticos para o fracionamento ou análise de especiação de fósforo.

Figura 3.1. Classificação das frações de fósforo em águas naturais. Adaptada da referência 66.

O trabalho discutido neste capítulo gerou o artigo:

ROCHA, D. L.; ROCHA, F. R. P. A multi-pumping flow system with on-line photochemical conversion and improved sensitivity for phosphorus fractionation in freshwaters. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, DOI: 10.180/03067319.2012.746324.

Figura 3.2. Estruturas químicas de alguns compostos modelo de fósforo inorgânico (A e G) e orgânico (B – F): (A) ortofosfato, (B) ácido fítico, (C) fosfoserina, (D) glicose-6-fosfato, (E) ácido fosfonofórmico, (F) hexametafosfato e (G) adenosina-5-difosfato. Os compostos F e G são também classificados como fósforo condensado. Adaptada da referência 57.

A quebra das ligações de moléculas orgânicas fosforadas ocorre naturalmente no meio aquático. Entretanto, algumas espécies provenientes do despejo de efluentes são mais dificilmente degradadas, apresentando tempo de meia vida de até 500 anos³⁸. Um dos processos que favorece a degradação das espécies é a hidrólise, que resulta na substituição do grupo fosfato por hidroxila. As reações são catalisadas por íons metálicos ou óxidos com baixa solubilidade (*e.g.* Fe(III) e MnO₂) ou são mediadas por micro-organismos³⁸. A foto-oxidação também contribui para a degradação de espécies orgânicas, especialmente em águas superficiais, onde há maior incidência de radiação solar³⁸. Os processos de degradação geralmente resultam na liberação de ortofosfato.

O fósforo também pode estar associado a cadeias carbônicas e pode estar solubilizado (*e.g.* ácido fítico e glicose-6-fosfato) ou emulsionado/suspenso (*e.g.* fosfolipídios e fosfoproteínas) em corpos aquáticos. Os grupos fosfato pertencentes às espécies de P_O apresentam diferentes tipos de ligação. Ligações C – O – P são encontradas em diversos compostos, que são classificados como refratários (*e.g.* ácido fítico e fosfoserina) ou lábeis (*e.g.* glicose-1-fosfato), dependendo da suscetibilidade aos processos de degradação nos corpos aquáticos. Moléculas contendo ligações C – P – O, como o ácido fosfonofórmico, são mais raras⁵⁷ e menos suscetíveis aos processos de degradação no ambiente.

O P_O não era considerado como fonte de fósforo para os seres vivos. Atualmente, sabe-se que algumas bactérias e parte do fitoplâncton utilizam espécies orgânicas fosforadas para nutrição³⁸. Geralmente, enzimas são necessárias para gerar P_I, a partir de P_O seja utilizado diretamente por algumas bactérias. Portanto, a quantificação do fósforo orgânico é importante por ser uma fonte direta ou indireta de nutriente e sua concentração deve ser controlada em rios, lagos e costas marítimas.

Em águas naturais, o fósforo também é encontrado na forma condensada (polifosfatos, P_C), que contêm ligações P – O – P. Em meio aquoso, o P_C é convertido a P_I, principalmente

os polímeros inorgânicos de alta massa molecular, devido à incidência de radiação solar e à hidrólise, que é favorecida a altas temperaturas e baixos valores de pH⁶⁷. As espécies de baixa massa molecular são menos suscetíveis à decomposição. Os polifosfatos não apresentam fósforo prontamente biodisponível, sendo necessária a conversão a ortofosfato no meio aquático para participar de atividades biológicas. Contudo, os seres vivos utilizam estes compostos (tanto inorgânicos quanto orgânicos) como reserva de energia, que fornece *ca.* 10 kcal mol⁻¹ a cada rompimento de ligação de fósforo condensado⁶⁷. Exemplos destas espécies são hexametáfosfato (inorgânico) e adenosina-5-difosfato (orgânico), apresentados na Figura 3.2. Apesar de ocorrerem naturalmente, a principal fonte em águas naturais é antropogênica, pois efluentes domésticos e industriais possuem resíduos de detergentes, que contêm polifosfatos para complexar íons metálicos e aumentar o pH do meio durante a lavagem, facilitando a higienização⁶⁸.

Por ser um nutriente, fósforo em excesso favorece a eutrofização de corpos d'água⁶⁹. O crescimento desenfreado de algas e plantas aquáticas causa efeitos indesejáveis. O aumento da biomassa do fitoplâncton desequilibra o balanço da cadeia alimentar, uma vez que seres herbívoros não consomem quantidades suficientes de algas para evitar seu alastramento. O aumento da quantidade de algas suspensas na superfície dos rios, lagos e costas marítimas contribui para o bloqueio da penetração da luz solar, dificultando a fotossíntese e as trocas gasosas com a atmosfera. Consequentemente, a concentração de oxigênio dissolvido diminui e provoca a morte de organismos heterótrofos, como os peixes⁶⁹. Além disto, a grande quantidade de cianobactérias altera a coloração, odor e sabor da água e produz cianotoxinas, que apresentam efeitos hepatotóxicos, tornando a água imprópria para o consumo humano. Este fator também torna importante o fracionamento de fósforo em águas naturais, principalmente a diferenciação entre P_I e P_O.

Portanto, o fracionamento de fósforo em águas naturais apresenta diferentes desafios em relação ao fracionamento em materiais vegetais e derivados. A variabilidade das espécies em águas naturais é maior, devido às diferentes origens dos compostos, sendo necessária a conversão quantitativa das espécies para se obter o fracionamento. A concentração de fósforo total em águas naturais geralmente não ultrapassa $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em leitos isentos de despejo industrial e doméstico^{70,71}, tornando indispensável um procedimento com alta sensibilidade para a determinação de ortofosfato.

3.1.2 Procedimentos analíticos para a determinação de fósforo em águas naturais

De acordo com a resolução nº 357, do Conselho Nacional do Meio Ambiente⁷⁰ (CONAMA), a concentração de fósforo total em águas naturais deve se situar entre 20 e $150 \mu\text{g L}^{-1}$, dependendo da classificação do corpo aquático. Estes valores são próximos ao limite de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ estabelecido pela *United States Environmental Protection Agency* (USEPA)⁷¹. Entretanto, os valores de concentração de fósforo total em águas naturais são inconclusivos na avaliação das condições de eutrofização de corpos aquáticos, pois a biodisponibilidade do fósforo é alterada com a forma química. Sendo assim, o fracionamento das espécies fosforadas permite melhor caracterização da poluição do meio aquático.

O procedimento oficial recomendado pela *Association of Official Analytical Chemists*⁴³ (AOAC) para a análise de águas naturais baseia-se na determinação de ortofosfato pelo método do azul de molibdênio. Para a quantificação da soma das frações orgânica e inorgânica, a amostra (50 mL) é aquecida em meio de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ até a redução do volume para 10 mL. O fracionamento é obtido analisando tanto a amostra sem tratamento quanto após a foto-oxidação. Com a adição de H_2SO_4 à amostra, P_C também é quantificado. Apesar de apresentar limite adequado para quantificação de baixas concentrações de fósforo de acordo com a legislação⁷⁰, o procedimento demanda muito tempo para o preparo de amostra e

determinação espectrofotométrica (*ca.* 60 minutos). Além disto, apresenta desvantagens do pré-tratamento em sistemas abertos (*e.g.* riscos de contaminação e perdas de analito). A utilização de um analisador em fluxo segmentado para a formação do azul de molibdênio também é uma alternativa⁴³, embora apresente desvantagens como a ocorrência de intercontaminação entre os segmentos, levando à perda da exatidão.

Para a determinação de ortofosfato, o *Standard Methods for the Examination of Waters and Wastewaters* (SMEW)⁷² recomenda a formação do ácido fosfomolibdico e subsequente redução a azul de molibdênio empregando ácido ascórbico ou SnCl_2 . A digestão nitro-sulfúrica ou a foto-oxidação com persulfato em sistemas de análises em fluxo são indicadas como estratégias para decomposição de espécies de fósforo, dependendo do teor de matéria orgânica da amostra. Apesar de oferecer uma alternativa mecanizada para o preparo de amostras com adequado limite de quantificação ($20 \mu\text{g L}^{-1} \text{ P}$), o procedimento não contempla o fracionamento de fósforo. Além disto, utilizam-se longos reatores para o preparo de amostra (6,0 e 3,0 mL para decomposição ácida e foto-oxidação, respectivamente), prejudicando a frequência de amostragem e exigindo o uso de unidades para remoção de bolhas de gás.

Procedimentos analíticos alternativos em sistemas de análises em fluxo têm sido propostos para a determinação de baixas concentrações de fósforo em águas naturais. Para o aumento de sensibilidade, foi explorada a espectrofotometria de longo caminho óptico⁷³, visando apenas à determinação de ortofosfato^{74–76}. As celas de longo caminho óptico são dispositivos constituídos de um tubo de sílica revestido com um polímero amorfo com índice de refração menor que o da água⁷³ (*e.g.* Teflon® AF1600 ou AF2400), atuando como um guia de ondas. Uma vez preenchido com solução aquosa, transmite radiação com mínimas perdas e possibilita a construção de celas espectrofotométricas de até 500 cm e com volume interno de $250 \mu\text{L/m}$ ⁷³.

Para a determinação de P_T ou fracionamento de fósforo (P_I e P_O), foram propostos procedimentos mecanizados com preparo de amostra em linha, empregando enzimas⁷⁷ ou decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas⁷⁸⁻⁸¹ ou ultravioleta^{23,60,82,83}. A maioria dos procedimentos foi aplicada à determinação de fósforo total em águas residuais, pois os limites de detecção não foram adequados para aplicação em águas naturais.

Um procedimento em fluxo foi utilizado para diferenciar o P_I das espécies hidrolisáveis pela enzima 3-fitase⁷⁷. As espécies orgânicas foram convertidas a ortofosfato e determinadas por espectrofotometria através da formação do azul de molibdênio. Neste procedimento, não foram consideradas as espécies orgânicas inertes à enzima, que atua seletivamente na quebra de ligações C – O – P. Além disto, não houve degradação quantitativa do ácido fítico, que é uma das espécies orgânicas de fósforo em maiores quantidades em águas doces²⁴.

Para a determinação de fósforo total, foram propostos procedimentos com decomposição em linha assistida por micro-ondas empregando sistema FIA com adição contínua de reagentes⁷⁸⁻⁸⁰ ou multicomutação⁸¹. Estes procedimentos não foram aplicados à análise de águas naturais, também por limitação de sensibilidade. Apesar do curto tempo de residência (de 20 a 75 s), a geração de bolhas na zona de amostra devido ao aquecimento exigiu a utilização de unidades para desgaseificação ou resfriamento. O emprego de ácidos minerais na decomposição das espécies⁷⁹ prejudicou a aplicação do procedimento para o fracionamento, uma vez que nestes sistemas a hidrólise das espécies de fósforo condensadas não é quantitativa e a conversão incompleta pode afetar a exatidão da determinação de P_O . Nos procedimentos que empregam $K_2S_2O_8$ e etapa de digestão em linha^{78,80,81} a interferência de espécies condensadas foi minimizada preparando o oxidante em meio ácido mais diluído. No procedimento em que é utilizado um sistema de análises em fluxo com multisseringas⁸¹, a aplicação se restringiu à determinação de P_T em águas residuais, sem explorar o

fracionamento ou estratégias para aumento de sensibilidade visando à aplicação em águas naturais.

Foto-oxidação também foi empregada para a determinação de espécies de fósforo em águas naturais e residuais. Em batelada, o preparo de amostras pode consumir até 50 minutos⁸⁴, além de ser mais suscetível a perdas do analito e contaminações. Nos procedimentos com fotoconversão em linha, são empregados menores volumes de amostra para a digestão, aumentando a eficiência do processo e diminuindo o tempo de preparo⁸. De maneira geral, espécies geradoras de radicais na presença da radiação UV (especialmente $K_2S_2O_8$) são empregadas para minimizar o tempo de degradação.

O ortofosfato gerado após o tratamento em linha tem sido quantificado por espectrofotometria através da formação do azul de molibdênio^{82,83} ou do vanadomolibdato de amônio²³. Nos procedimentos em que são empregadas lâmpadas de vapor de mercúrio de média ou alta pressão, utilizam-se tempos mais curtos para o preparo de amostra para minimizar a geração de bolhas (volatilização de gases dissolvidos e geração química de oxigênio), como na determinação de P_T em águas residuais empregando sistema de análises em fluxo⁸². Neste trabalho, o emprego de desborbulhador foi necessário, mesmo com curto tempo de residência da amostra (*ca.* 10 s). Além disto, este procedimento não permitiu o fracionamento de espécies e apresenta limite de detecção inadequado para quantificação de P em águas naturais.

Lâmpadas com menor potência foram empregadas em alguns procedimentos^{23,83} e os tempos de preparo de amostra variaram entre 30 e 240 s. Alguns destes procedimentos não exploraram o fracionamento das espécies⁸³ ou não apresentaram sensibilidade adequada para a determinação de P_T em águas naturais²³.

Para aumentar a sensibilidade, detecção fluorimétrica foi empregada em um sistema em fluxo com foto-oxidação em linha para o fracionamento de fósforo em águas naturais⁶⁰. O

ortofosfato gerado foi quantificado através da oxidação da tiamina a tiocromo pelo ácido fosfomolibdico e o sinal de fluorescência do tiocromo foi proporcional à concentração de fósforo na amostra. Apesar do limite de detecção adequado para o fracionamento em águas naturais ($0,3 \mu\text{g L}^{-1}$), o método não foi seletivo para fósforo, apresentando interferência positiva na presença de íons metálicos (*e.g.* Cu^{2+} e Fe^{3+}). Por este motivo, separação com coluna de troca catiônica foi realizada previamente à injeção. Além disto, as duas lâmpadas de vapor de mercúrio do fotorreator foram desligadas para a determinação de fósforo inorgânico, o que afeta o tempo de vida da fonte.

Apesar das propostas para a determinação de fósforo total com digestão em linha, melhorias ainda podem ser realizadas, tornando os sistemas mais seletivos e compactos, aumentando a sensibilidade e minimizando o consumo de reagentes e a geração de resíduos.

3.2 Parte experimental

3.2.1 Equipamentos e acessórios

Os sistemas de análises em fluxo com multicomutação foram construídos empregando tubos de polietileno ou de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,8 mm *d.i.*, 6 microbombas (Biochem) e uma válvula solenoide (NResearch) e cela de fluxo de quartzo recoberto com Teflon AF-1600[®] (Ocean Optics) com 100 cm de caminho óptico e volume interno de 250 μL . Para a obtenção dos sinais, foi empregado um espectrofotômetro multicanal que consiste de um arranjo linear de 2048 fotodetectores do tipo CCD (*Charge-coupled devices*, Ocean Optics), diretamente acoplado a um microcomputador (Intel Pentium), permitindo medidas entre 200 nm e 800 nm. Cabos de fibra óptica foram utilizados para o transporte da radiação proveniente de uma lâmpada de tungstênio-halogênio (Ocean Optics) até a cela de fluxo e da saída desta até o sistema de detecção (Figura 2.4). O módulo de análises foi controlado eletronicamente por um microcomputador através de uma das interfaces paralelas

disponíveis. A alimentação dos dispositivos foi feita por uma fonte de diferença de potencial constante (12 V). Para o acionamento dos dispositivos foram empregados circuitos integrados ULN2803 (Figura 2.1) e o programa para o controle foi desenvolvido em linguagem Visual Basic 6.0 (Microsoft). A aquisição dos dados foi realizada com o software fornecido pelo fabricante. Para a fotoconversão, foi empregada uma lâmpada de vapor de mercúrio de uso germicida de 13 W (Philips, TUV PL-S) com um tubo de PTFE de 70 cm (350 μ L) enrolado ao redor do bulbo (Figura 3.3). A fonte foi posicionada sobre um suporte de madeira revestido com papel alumínio e o conjunto foi coberto por uma caixa escura.

Figura 3.3. Fotografia do fotorreator empregado. Estão indicados o bulbo da lâmpada de 13 W (a) e o reator de PTFE posicionado ao redor do bulbo (b).

Para testes iniciais com aquecimento da zona de amostra em linha, foi empregado um dispositivo de aquecimento construído no laboratório, que consiste de uma resistência metálica acoplada a um circuito temporizador. Para a determinação de P_T em águas naturais pelo procedimento de referência, o preparo de amostra foi realizado com uma chapa de aquecimento (Quimis).

3.2.2 Reagentes e soluções

As soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água desionizada. Uma alíquota de 15 mL de água foi adicionada a massa do sal $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck), seguida da adição de HNO_3 concentrado (Merck). A solução foi avolumada com água a fim de se obter $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de heptamolibdato de amônio em HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Soluções de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 78 mmol L^{-1} (20 g L^{-1}) e de SnCl_2 $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (ambas Merck) foram preparadas diariamente por dissolução dos reagentes em água e HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck), respectivamente. Foram utilizados compostos modelo de fósforo inorgânico [KH_2PO_4 , (Merck)], orgânico [fitato de sódio (Merck), fosfoserina, glicose-6-fosfato e fosfonoformiato de sódio (Sigma)], orgânico condensado [adenosina-5-difosfato, (Sigma)] e inorgânico condensado [hexametáfosfato e trimetáfosfato (Merck)]. Soluções estoque 1000 mg L^{-1} P desses compostos foram preparadas em água, sendo as soluções mais diluídas preparadas a partir das soluções estoque. Soluções de NaOH (Merck) foram preparadas a partir da dissolução da base em água.

3.2.3 Procedimentos

O diagrama da Figura 3.4 representa o módulo de análises utilizado para o desenvolvimento do procedimento analítico. A rotina de acionamento e os volumes dispensados pelas microbombas estão descritos na Tabela 3.1.

A zona de amostra foi formada por duas repetições das etapas 1 e 2 (dois ciclos de amostragem) e transportada até o centro do fotorreator com 3 pulsos do transportador (etapa 3). Em seguida, as microbombas foram mantidas desligadas por 30 s (etapa 4). Um volume do digerido foi inserido no reator B (etapa 5) seguido de alíquotas dos reagentes R_2 (etapa 6) e R_3 (etapa 7), respectivamente, e a zona de amostra foi transportada até a cela de fluxo (etapa 8) para medida espectrofotométrica ($\lambda = 700 \text{ nm}$). Após a passagem do centro da zona de

amostra pela cela de fluxo, foi inserida solução de NaOH com 10 pulsos da microbomba P_6 . Em seguida, foi realizada limpeza do percurso analítico com a solução transportadora (120 pulsos de P_3). Para que o fotorreator atingisse o equilíbrio térmico, a fonte UV foi ligada com 10 minutos de antecedência às determinações.

Após a substituição da amostra ou do oxidante, foi necessário garantir o preenchimento da tubulação até o ponto de confluência x . Sendo assim, 100 pulsos foram aplicados à microbomba P_1 ou P_2 e, simultaneamente, a válvula solenoide V foi acionada, direcionando a solução para o descarte (etapa 9). O volume de amostra entre o ponto de confluência x e a válvula V foi removido empregando 30 pulsos da solução transportadora (etapa 9). Dessa forma, a passagem de fluidos através do percurso analítico e cela de fluxo durante a etapa de limpeza foi evitada, minimizando riscos de contaminação.

Figura 3.4. Diagrama do sistema de análises em fluxo para o fracionamento de fósforo em águas naturais. A: amostra; R₁: K₂S₂O₈ 75 mmol L⁻¹ ou H₂O; R₂: (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 2,0 mmol L⁻¹ em HNO₃ 1,0 mol L⁻¹; R₃: SnCl₂ 4,0 mmol L⁻¹ em HCl 0,3 mol L⁻¹; R₄: NaOH 1,0 mol L⁻¹; C: H₂O; P₁ – P₆: microbombas solenoide; V: válvula solenoide; FR: fotorreator; x e y : pontos de confluência; B: reator; D: cela de fluxos de longo caminho óptico acoplada ao espectrofotômetro e W: recipientes de descarte.

Tabela 3.1 – Rotina de acionamento das microbombas solenoide (P₁-P₆) para o fracionamento de fósforo solúvel em águas naturais.

<i>Etapa</i>	<i>Descrição</i>	<i>Microbomba</i>	<i>Volume por pulso (μL)</i>	<i>Pulsos</i>
1 ^a	Inserção da amostra	P ₁	7,0	11
2 ^a	Inserção de K ₂ S ₂ O ₈ ou H ₂ O	P ₂	9,6	2
3	Transporte da zona de amostra	P ₃	24,8	3
4 ^b	Fotoconversão	—	—	—
5	Transporte do digerido	P ₃	24,8	6
6	Inserção de (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	P ₄	7,9	8
7	Inserção de SnCl ₂	P ₅	14,0	1
8	Transporte, detecção e limpeza	P ₃	24,8	40
		P ₆	10,0	10
		P ₃	24,8	120
9 ^c	Substituição da amostra ou de R ₁	P ₁ ou P ₂	7,0 ou 9,6	100
		P ₃	24,8	30

a) 2 ciclos de amostragem; b) 30 s de parada de fluxo; c) acionamento da válvula V.

Os efeitos das concentrações dos reagentes, volume de amostra e tempo de digestão foram avaliados a fim de maximizar a diferença entre o sinal referente ao fósforo e ao branco (sinal analítico), obter fotoconversão quantitativa das espécies de fósforo orgânico, faixa de resposta linear adequada e minimizar a magnitude do branco e o consumo de reagentes. Os desvios das medidas foram também levados em consideração na etapa de otimização. Em seguida, foram estimadas as características analíticas do procedimento e analisadas amostras de águas de rio, sendo os resultados comparados com o procedimento de referência⁴³.

3.2.4 Preparo das amostras

Foram analisadas cinco amostras de águas naturais coletadas em diferentes pontos do Rio Guadium, em Piracicaba / SP. As amostras foram filtradas em membranas de acetato de

celulose de 0,45 μm para remoção do material particulado, restando a fração das espécies dissolvidas.

3.2.5 Procedimento de referência

Para avaliar a exatidão do procedimento proposto, foi utilizado o procedimento recomendado pela AOAC⁴³. Foram adicionados 50 mL de amostra previamente filtrada em membrana de acetato de celulose de 0,45 μm a um béquer contendo 0,48 g de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. A solução foi aquecida em chapa até redução do volume de solvente até *ca.* 10 mL. Em seguida, o digerido foi avolumado para 50 mL e analisado pelo método do azul de molibdênio em batelada. O reagente cromogênico era composto por H_2SO_4 1,2 mol L^{-1} , heptamolibdato de amônio 5,0 mmol L^{-1} , tartarato de potássio e antimônio 0,23 mmol L^{-1} e ácido ascórbico 30 mmol L^{-1} . Este reagente (1,4 mL) foi adicionado diretamente à amostra (10 mL) para se determinar o fósforo inorgânico livre (ortofosfato) ou ao digerido para a determinação de fósforo total (inorgânico e orgânico). As medidas espectrofotométricas (700 nm) foram realizadas 30 min após a adição do reagente para o desenvolvimento da reação.

3.3 Resultados e discussão

3.1.1 Aspectos gerais

Para o fracionamento de fósforo em águas naturais, o ortofosfato foi quantificado através da reação com heptamolibdato de amônio, formando o ácido fosfomolibdico, que foi reduzido pelo cloreto estanoso ao azul de molibdênio⁵⁷. O sal sódico do ácido fítico ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_{24}\text{P}_6\text{Na}_{12}$) foi selecionado para a maioria dos estudos, uma vez que esta é uma das mais resistentes espécies orgânicas suscetíveis à foto-oxidação⁵⁷. Entretanto, espécies com diferentes tipos de ligação (C–O–P e C–P–O) e com diferentes estabilidades frente à foto-oxidação também foram avaliadas.

3.3.2 Estudos preliminares

As espécies orgânicas de fósforo em águas naturais possuem diversas origens, apresentando grande variabilidade. Sendo assim, o fracionamento do fósforo dissolvido deve levar em conta todas as espécies orgânicas, o que exige estratégias de preparo de amostra para conversão quantitativa. A conversão incompleta exigiria a obtenção de diversas curvas analíticas para estimar a porcentagem de conversão das espécies individualmente, o que inviabilizaria a aplicação do procedimento.

No fracionamento de fósforo em extratos de cereais e leguminosas, o tempo de residência não pôde ultrapassar 10 s, devido ao calor gerado durante a operação lâmpada de vapor de mercúrio de 125 W, limitando a conversão de P_O a P_I a *ca.* 46%. Visando aumentar a eficiência de conversão, foi avaliada uma lâmpada de vapor de mercúrio de 13 W, que gerava menos calor e apresentava intensa emissão na região ultravioleta (Figura 3.5). Com esta lâmpada, foram obtidas curvas analíticas com soluções de KH_2PO_4 e ácido fítico (Figura 3.6).

Figura 3.5. Espectro de emissão da lâmpada de vapor de mercúrio de 13 W.

Figura 3.6. Curvas analíticas obtidas com soluções de KH_2PO_4 (■) ou ácido fítico (●), empregando as condições para o fracionamento de fósforo em materiais vegetais (Figura 2.3), exceto pelo tempo de parada de fluxo (30 s) e potência da fonte de radiação (13 W).

A emissão da radiação com comprimento de onda de 254 nm foi mais intensa com a lâmpada de 13 W em relação à fonte de 125 W (Figura 2.5). Além disto, o calor gerado pela lâmpada foi menor, permitindo a utilização de tempos de residência maiores. As curvas analíticas apresentadas na Figura 3.6 foram obtidas com os mesmos parâmetros químicos e físicos utilizados para o fracionamento de P em extratos de alimentos, com exceção do tempo de residência que foi aumentado para 30 s. Foi estimada eficiência de conversão de *ca.* 80 %, estimada pela razão entre os coeficientes angulares das curvas mostradas na Figura 3.6. Sendo assim, esta fonte foi utilizada na otimização do procedimento analítico para o fracionamento de fósforo em águas naturais. Como as concentrações de fósforo em águas naturais são inferiores às encontradas em materiais vegetais, uma cela de 100 cm de caminho óptico foi utilizada, visando aumentar a sensibilidade para o fracionamento de fósforo.

3.3.3 Otimização do procedimento

Como ponto de partida para a otimização, foram utilizados os parâmetros de um procedimento com alta sensibilidade para a determinação de P_I ⁸⁵ que emprega ácido ascórbico como redutor. Porém, foi empregada uma cela de fluxo com 100 cm de caminho óptico (ao invés de 30 cm como no procedimento da literatura), sendo observado alto sinal do branco (*ca.* 0,3). Sendo assim, as concentrações dos reagentes foram diminuídas em dez vezes para evitar a formação do composto na ausência de ortofosfato que também absorve em 700 nm⁵⁸. Nestas condições, foi observada a diminuição do sinal do branco, mas o sinal analítico para uma solução de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ P_I não foi significativamente diferente. Isto ocorreu devido à alteração na velocidade da reação, que é diretamente afetada pela concentração dos reagentes⁵⁸.

Para aumentar a taxa de formação do azul de molibdênio, foi empregada a unidade de aquecimento descrita na seção 3.2.1. O sinal do branco não foi alterado e foi observado aumento significativo do sinal analítico. A curva analítica obtida previamente à otimização apresentou boa linearidade ($r = 0,999$) e foi descrita pela equação $A = 0,0044 C_P + 0,052$, em que A é absorbância e C_P é a concentração de fósforo em $\mu\text{g L}^{-1}$. Porém, foram observados problemas com a reprodutibilidade, com variações de até 35% na resposta analítica em dias diferentes. A quantidade de calor fornecida pela unidade de aquecimento é constante, de forma que a temperatura final da zona de amostra depende das temperaturas iniciais das soluções. Como a reação de redução do ácido fosfomolibdico pelo ácido ascórbico é relativamente lenta, a variação dos sinais foi devida às diferenças de temperatura na zona de amostra. Para superar este problema, o ácido ascórbico foi substituído por SnCl_2 , que torna a redução do Mo(VI) a Mo(V) mais rápida, mesmo à temperatura ambiente, dispensando o aquecimento. Em um sistema empregando SnCl_2 como agente redutor, a formação do azul de molibdênio pode seguir a reações propostas nas equações 24 e 25.

O procedimento foi otimizado para a determinação de P_I com o sistema de análises em fluxo com microbombas solenoide apresentado na Figura 3.4, excluindo o fotorreator e a microbomba P_2 que gerenciava a solução de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. A microbomba P_1 , que dispensava 7,0 μL por pulso, foi utilizada para a inserção de P_I diretamente no ponto de confluência y, simulando a inserção do digerido. Inicialmente, foram utilizados 48 μL de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 1,0 mmol L^{-1} em HNO_3 1,0 mol L^{-1} e 28 μL de SnCl_2 4,0 mmol L^{-1} em HCl 0,3 mol L^{-1} . Os volumes foram próximos aos empregados em uma proposta anterior para a determinação de P_I em águas naturais⁸⁶. Entretanto, a concentração de HNO_3 foi diminuída pela metade em comparação com o procedimento da literatura, pois com acidez elevada o sinal analítico não foi diferente do branco. Nestas condições, com uma solução de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ P (3,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ P), foi obtida resposta analítica de *ca.* 0,4 e sinais do branco < 0,1.

Nas condições descritas anteriormente, foi observada deriva da linha base, que chegava a valores de até 0,1 de absorbância entre as replicatas, devido à adsorção do produto da reação na cela de fluxo. Soluções de glicerina 1,0% (m/v) têm sido utilizadas para evitar deriva da linha base⁵⁴ no método do azul de molibdênio. Entretanto, neste procedimento, esta estratégia não foi eficiente. Para evitar a adsorção do produto, o transportador foi substituído por soluções de NaOH 5,0, 10 ou 100 mmol L^{-1} , mas não foi observada remoção satisfatória do produto adsorvido. Com concentrações maiores de NaOH , a formação do azul de molibdênio foi afetada. Como alternativa, foi utilizada uma microbomba no sistema esquematizado na Figura 3.4 (P_6) para inserir uma solução de NaOH somente na etapa de limpeza. Para não afetar a frequência de amostragem, foi utilizado um volume pequeno de

solução de limpeza (100 μL) e foram avaliadas soluções de NaOH 0,1 e 1,0 mol L^{-1} . A limpeza foi eficiente com 1,0 mol L^{-1} , não sendo observada deriva de linha base nos estudos posteriores. A alta concentração de NaOH causou perturbações por efeito Schlieren, que não afetaram as medidas, uma vez que a solução de limpeza foi introduzida somente após a obtenção do máximo do sinal transiente.

O efeito da concentração de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ foi avaliado, mantendo a concentração de HNO_3 em 1,0 mol L^{-1} (Figura 3.7). Os volumes das soluções foram 70 μL de amostra, 48 μL de heptamolibdato e 28 μL de SnCl_2 . Levando em consideração as diluições e sem considerar a dispersão da zona de amostra, o efeito da concentração de heptamolibdato foi avaliado em excesso de 100, 200, 300 e 400 vezes em relação ao P_1 , na presença de um excesso de 500 vezes de SnCl_2 .

Figura 3.7. Efeito da concentração de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (em HNO_3 1,0 mol L^{-1}) sobre o sinal de P_1 (■) e do branco (○), empregando 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ P_1 ; SnCl_2 4,0 mmol L^{-1} em HCl 0,3 mol L^{-1} ; reator de 50 cm e H_2O como transportador.

Com o aumento do excesso de heptamolibdato de 100 para 400 vezes, o sinal analítico apresentou variação significativa, apesar do aumento do sinal do branco (*ca.* 0,1 para 0,3), devido à formação do produto na ausência de P. O aumento do sinal analítico observado na Figura 3.7 se deve ao aumento da velocidade de formação do $\text{H}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{38}]$ (MB2), que apresenta absorvidade diferente do $\text{H}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{39}]$ (MB1). A concentração ótima de heptamolibdato para a formação do azul de molibdênio depende da acidez e pureza do reagente, que pode diminuir a disponibilidade desta espécie devido a reações de polimerização do reagente⁵⁸. Por apresentar maior sinal analítico, foi selecionada $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de heptamolibdato. Concentrações maiores não foram avaliadas devido à tendência do aumento do sinal do branco.

A magnitude do branco diminuiu de *ca.* 0,300 para *ca.* 0,025, sem afetar o sinal analítico quando o volume de SnCl_2 foi diminuído de 28 para $14 \mu\text{L}$, mantendo os volumes de amostra e de R_2 . Nestas condições, o efeito da concentração de SnCl_2 foi avaliado, fixando a concentração de HCl em $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 3.8). O sinal analítico aumentou com a concentração de SnCl_2 até $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Acima deste valor, foi observado apenas o aumento do sinal do branco, devido à geração do composto azul na ausência de P, uma vez que o Mo(VI) pode ser reduzido a Mo(V) dependendo das condições do meio. Portanto, foi selecionado SnCl_2 $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para os estudos posteriores. A variação dos sinais foi menor em relação aos obtidos com diferentes concentrações de heptamolibdato, cujo efeito sobre a formação dos produtos foi mais pronunciado⁵⁹.

Figura 3.8. Efeito da concentração de SnCl_2 (em HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$) sobre o sinal analítico (■-) e do branco (○-), empregando $100 \mu\text{g L}^{-1}$ P; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; reator de 50 cm e H_2O como transportador.

Com a diminuição da concentração de HNO_3 na solução de heptamolibdato de $1,0$ para $0,8 \text{ mol L}^{-1}$, a absorbância referente ao branco aumentou para *ca.* $0,6$. Em contrapartida, o aumento da concentração de HNO_3 para $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ diminuiu o sinal analítico para a mesma magnitude do branco. Isto ocorreu porque a acidez do meio deve ser suficiente para favorecer a formação do heteropoliácido desfavorecer a redução do Mo(VI) a Mo(V) pelo SnCl_2 na ausência de P^{58} . Por outro lado, em condições drásticas de acidez, ocorrem mudanças na ordem de reação e a velocidade torna-se altamente dependente do pH^{58} . Portanto, a diminuição da concentração do ácido acarretou o aumento da geração do composto azul na ausência do P, aumentando o sinal do branco, e o aumento da acidez diminuiu a velocidade da reação e, portanto, o sinal analítico. A concentração de HNO_3 foi então mantida em $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. O efeito da concentração de HCl na solução de SnCl_2 também foi avaliado (Figura 3.9). Nas menores concentrações avaliadas, o sinal do branco aumentou

significativamente (*ca.* 0,2) e com o aumento da concentração, foi observada a diminuição do sinal analítico, conforme discussão apresentada anteriormente^{58,59}. Por apresentar maior sinal analítico, foi escolhida 0,3 mol L⁻¹ de HCl.

Figura 3.9. Efeito da concentração de HCl na solução de SnCl₂ 4,0 mmol L⁻¹ sobre o sinal analítico (■) e do branco (○), empregando 100 µg L⁻¹ P; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 2,0 mmol L⁻¹ em HNO₃ 1,0 mol L⁻¹; reator de 50 cm e H₂O como transportador.

Após a otimização da concentração dos reagentes, o efeito do volume de amostra (que simula o digerido) foi avaliado, sendo os resultados apresentados na Figura 3.10. O sinal analítico aumentou significativamente com o volume de amostra, devido ao aumento da concentração de fósforo na zona de amostra, uma vez que heptamolibdato e SnCl₂ foram mantidos, no mínimo, em excessos de 350 e 50 vezes, respectivamente. Foi selecionado 154 µL de amostra (22 pulsos de P₁) pois, acima deste valor, foi observada uma tendência assintótica e o volume da zona de amostra tornou-se maior que o do reator (250 µL), podendo afetar as condições de mistura.

Figura 3.10. Efeito do volume de amostra (simulando digerido) sobre o sinal de P₁ (-■-) e do branco (-○-), empregando 75 µg L⁻¹ P; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 2,0 mmol L⁻¹ em HNO₃ 1,0 mol L⁻¹; SnCl₂ 4,0 mmol L⁻¹ em HCl 0,3 mol L⁻¹; reator de 50 cm e H₂O como transportador.

A estratégia de amostragem empregada consistiu em introduzir, sequencialmente, amostra (154 µL), heptamolibdato (48 µL) e SnCl₂ (14 µL). Como a alíquota da amostra foi significativamente maior que a dos reagentes, foi avaliada a divisão dos volumes em 2 ciclos de amostragem para melhorar as condições de mistura. A zona de amostra foi então formada introduzindo 77 µL de amostra, 24 µL de (NH₄)₆Mo₇O₂₄ e 14 µL de SnCl₂ para cada ciclo. O volume do agente redutor foi definido por apenas um pulso da microbomba, sendo assim mantido em cada ciclo de amostragem. O sinal analítico não variou de maneira significativa empregando 1 e 2 ciclos de amostragem: (0,826 ± 0,020) e (0,772 ± 0,003). Com o aumento do número de ciclos, o sinal do branco aumentou de (0,078 ± 0,003) para (0,119 ± 0,006) devido à maior concentração de SnCl₂ na zona de amostra com o aumento do volume do reagente, o que está de acordo com os estudos anteriores. O fluxo pulsado gerado pelas microbombas garantiu boas condições de mistura mesmo com 1 ciclo de amostragem.

Duas ordens alternativas de inserção de soluções foram avaliadas, introduzindo a amostra após ou entre os reagentes. Inserindo a amostra ($50 \mu\text{g L}^{-1} \text{P}$) antes dos reagentes foi observado sinal analítico igual a $(0,772 \pm 0,003)$, que diminuiu para $(0,554 \pm 0,014)$ quando a amostra foi introduzida por último e para $(0,622 \pm 0,012)$ quando introduzida entre os reagentes. A mistura ocorre por dispersão e o sinal aumentou quando a amostra foi primeiramente introduzida devido à mistura de uma fração maior da amostra com os reagentes. O inverso ocorreu quando a amostra foi introduzida por último, ou seja, a fração mais diluída dos reagentes entra em contato com uma fração menor da amostra, diminuindo o sinal analítico. Como o volume de amostra é quase dez vezes maior que dos reagentes, quando introduzida entre R_2 e R_3 o sinal diminuiu devido à mistura ineficiente entre as alíquotas de reagentes. A estratégia selecionada foi aquela em que a amostra foi introduzida seguida dos reagentes.

Com as concentrações de reagentes e frações volumétricas otimizadas para a determinação de P_I , uma microbomba para o gerenciamento da solução oxidante (P_2) e o fotorreator (Figura 3.3) foram inseridos no sistema (Figura 3.4), para avaliar os efeitos dos parâmetros químicos e físicos sobre a foto-oxidação de espécies modelo de P_O . A partir deste ponto, a microbomba P_1 passou a gerenciar as soluções de P_I e P_O , inserindo-as diretamente no ponto de confluência x , mantendo o mesmo volume de amostra utilizado na otimização do procedimento para determinação de P_I . A zona de amostra, composta por 2 ciclos de amostragem, cada um formado por $77 \mu\text{L}$ de amostra (11 pulsos de P_1) e por $20 \mu\text{L}$ de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (2 pulsos de P_2), foi posicionada no centro do fotorreator. O fluxo foi interrompido por 30 s para aumentar o tempo de residência e, consequentemente, a eficiência de conversão. Em seguida, o digerido foi inserido no reator B, através da microbomba P_3 , para adição dos reagentes cromogênicos. Como o volume dispensado pela microbomba do transportador (P_3 , $25 \mu\text{L}$) era maior que o da amostra utilizada anteriormente (P_1 , $7,0 \mu\text{L}$), o número de pulsos

foi reduzido de 22 para 6, para manter o volume do digerido igual ao anteriormente otimizado com P_I .

Em relação ao sinal analítico obtido para P_I sem o fotorreator, foi observada uma diminuição de 23% devido à maior dispersão da amostra. Diminuição adicional do sinal analítico foi observada na presença de $K_2S_2O_8$ 10 g L^{-1} , devido ao consumo de $SnCl_2$ ou oxidação do Mo(V) gerado a Mo(VI) pelo excesso de oxidante. Com o aumento do número de pulsos de heptamolibdato de 6 para 8 (48 para $64\text{ }\mu\text{L}$), este problema foi minimizado e o sinal analítico referente ao ortofosfato não foi afetado pelo oxidante.

O efeito da concentração do oxidante sobre o sinal analítico e eficiência de conversão do ácido fítico foi avaliado (Figura 3.11). Conforme esperado, não foi observada resposta para o ácido fítico na ausência do oxidante (inserção de água ao invés de $K_2S_2O_8$ pela microbomba P_2). A partir de 37 mmol L^{-1} (10 g L^{-1}), não foram observadas diferenças significativas entre os sinais de P_I e P_O , indicando conversão quantitativa. A partir de 78 mmol L^{-1} (20 g L^{-1}), a conversão ainda foi quantitativa, porém o excesso de oxidante causou diminuição do sinal analítico por causa da reoxidação do Mo(V) ou consumo do $SnCl_2$. A concentração de 20 g L^{-1} foi selecionada visando evitar a perda da eficiência de conversão de P_O na presença de matéria orgânica isenta de fósforo.

Figura 3.11. Efeito da concentração de $K_2S_2O_8$ sobre o sinal analítico para soluções $50 \mu\text{g L}^{-1}$ P na forma de ortofosfato (-■-) ou de ácido fítico (-□-) e do branco (-○-), empregando $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; SnCl_2 $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$; reator de 50 cm (d.i. 0,8 mm) e H_2O como transportador. Parada de fluxo por 30 s.

Um grande excesso de oxidante, que varia de 150 a 15000 vezes em relação ao analito, é geralmente empregado em procedimentos com foto-oxidação em linha^{23,60,82,83}. Isto se deve à possibilidade de recombinação dos radicais gerados (Equações 2 e 14), à baixa estabilidade do $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ em temperaturas elevadas e com irradiação UV, além da possibilidade de consumo de oxidante pela matéria orgânica isenta de fósforo. Com grande excesso, garantem-se quantidades suficientes do oxidante para a conversão quantitativa do P_O .

O tempo de parada de fluxo foi variado (Figura 3.12) para avaliar o menor tempo de residência necessário para a conversão quantitativa do P_O a P_I . A conversão do ácido fítico foi estimada em *ca.* 2,0; 15 e 65 % para paradas de fluxo de 0; 5 e 15 s, respectivamente, e foi quantitativa com 30 s. Como tempos maiores implicaram na geração de bolhas pela diminuição da solubilidade dos gases dissolvidos com o aumento da temperatura, foi escolhida parada de fluxo por 30 s para a foto-oxidação.

Figura 3.12. Efeito do tempo de parada de fluxo na etapa de fotoconversão sobre o sinal analítico para soluções $50 \mu\text{g L}^{-1}$ P de ortofosfato (■), de ácido fítico (□) e do branco (○), empregando $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; SnCl_2 $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 75 mmol L^{-1} ; reator de 50 cm e H_2O como transportador.

Na Tabela 3.2, está apresentado um resumo dos parâmetros otimizados, as faixas avaliadas e os valores selecionados.

Tabela 3.2 – Faixas avaliadas e valores otimizados dos parâmetros do sistema de análises em fluxo para o fracionamento de fósforo em águas naturais.

<i>Parâmetro</i>	<i>Faixa avaliada</i>	<i>Valor selecionado</i>
Volume de amostra (μL) ^a	55 – 170	154
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (mmol L^{-1})	0 – 150	78
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (mmol L^{-1})	0,5 – 2,0	2,0
SnCl_2 (mmol L^{-1})	1,0 – 8,0	4,0
HNO_3 em R_2 (mol L^{-1})	0,8 – 1,2	1,0
HCl em R_3 , (mol L^{-1})	0,1 – 0,8	0,3
Tempo de digestão (s)	0 – 30	30

a) volume utilizado em cada ciclo de amostragem

3.3.4 Avaliação das características analíticas

Após a otimização dos principais parâmetros experimentais, foram obtidas curvas analíticas (Figura 3.13) com ortofosfato e 4 espécies modelo de fósforo orgânico: ácido fítico, fosfoserina, glicose-6-fosfato e fosfonoformiato. As três primeiras espécies apresentam ligações C – O – P e o fosfonoformiato ligação C – P – O⁵⁷, sendo o ácido fítico a espécie mais estável à fotodegradação. Os coeficientes angulares das curvas analíticas estão apresentados na Tabela 3.3. As razões entre os coeficientes angulares das curvas obtidas com P_I e compostos modelo de P_O foram próximas de 1,0, indicando degradação quantitativa das espécies orgânicas e a viabilidade do procedimento para quantificar P_O em águas naturais.

Figura 3.13. Curvas analíticas obtidas com soluções de KH₂PO₄ (-■-), ácido fítico (-■-), fosfoserina (-■-), glicose-6-fosfato (-■-) e fosfonoformiato (-■-), empregando 30 s de parada de fluxo; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 2,0 mmol L⁻¹ em HNO₃ 1,0 mol L⁻¹; SnCl₂ 4,0 mmol L⁻¹ em HCl 0,3 mol L⁻¹; K₂S₂O₈ 75 mmol L⁻¹; reator de 50 cm e H₂O como transportador.

Tabela 3.3 – Parâmetros de regressão linear das curvas analíticas obtidas empregando diferentes espécies de fósforo.

<i>Espécie</i>	<i>Coefficiente angular ($L \mu g^{-1}$)</i>	<i>Coefficiente linear</i>	<i>r</i>
Ortofosfato	$0,011 \pm 0,001$	$0,090 \pm 0,024$	0,997
Ácido fítico	$0,012 \pm 0,001$	$0,084 \pm 0,015$	0,989
Fosfoserina	$0,011 \pm 0,001$	$0,086 \pm 0,033$	0,999
Glicose-6-fosfato	$0,011 \pm 0,001$	$0,080 \pm 0,022$	0,998
Fosfonoformiato	$0,011 \pm 0,001$	$0,095 \pm 0,016$	0,999

Foram também avaliadas espécies de fósforo condensadas (P_C) inorgânicas (hexametafosfato e trimetafosfato) e orgânica (adenosina-5-difosfato). Para estas espécies, foi observada degradação inferior a 10% em concentrações equivalentes a $100 \mu g L^{-1} P$. Este comportamento era esperado porque o P_C não é suscetível à foto-oxidação^{60,83}. Para a conversão desta fração a P_i , a amostra é usualmente submetida ao aquecimento ($> 90 ^\circ C$) em meio ácido por *ca.* 1 h previamente à medida. A menos que seja realizada uma etapa prévia de tratamento de amostra, o sistema proposto não pode ser empregado para a quantificação destas espécies. As altas temperaturas necessárias e o longo tempo de reação limitam a execução desta etapa em sistemas de análises em fluxo.

Com o procedimento desenvolvido, foi obtida resposta linear entre 10 e $75 \mu g L^{-1} P$. O limite de detecção ($n = 20$, 99,7% de confiança), coeficiente de variação ($n = 20$; $50 \mu g L^{-1}$) e frequência de amostragem foram estimados em $2,0 \mu g L^{-1}$, 1,8% e 40 determinações por hora, respectivamente. O consumo de reagentes por determinação foi estimado em 640 μg de $K_2S_2O_8$, 160 μg de $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 13 μg de $SnCl_2$ e 10 mg de NaOH, gerando 4,0 mL de efluentes. Na Tabela 3.4 está apresentada uma comparação de algumas características do procedimento proposto em relação aos previamente descritos na literatura.

O procedimento desenvolvido apresentou maior detectabilidade e frequência de amostragem e menor consumo de oxidante em relação aos procedimentos que empregaram

digestão ácida assistida por micro-ondas em linha para a determinação de fósforo total em águas. Adicionalmente, o procedimento proposto evita o emprego de ácidos minerais concentrados⁷⁹. As altas temperaturas atingidas nas digestões assistidas por micro-ondas podem levar à hidrólise incompleta das espécies condensadas de fósforo, causando erros sistemáticos na quantificação do fósforo total.

Em relação ao procedimento enzimático⁷⁷, o procedimento proposto apresentou menor limite de detecção e frequência de amostragem comparável. A enzima empregada converte apenas algumas espécies de fósforo, limitando os estudos de fracionamento e, em alguns casos, a conversão não foi quantitativa. Além disto, o emprego e o armazenamento de enzimas exigem cuidados adicionais, como temperatura e pH controlados.

A maioria dos procedimentos que emprega foto-oxidação em linha visa à determinação de fósforo total em águas residuais, uma vez que não apresentam limites de detecção adequados para a aplicação em águas naturais. Um procedimento com baixo limite de detecção ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$) foi proposto⁸³, porém com menor frequência de amostragem (20 h^{-1}) em relação ao procedimento proposto. Aquecimento em banho com temperatura controlada foi utilizado para aumentar a taxa de conversão do Mo(VI) a Mo(V), que pode influenciar na reprodutibilidade do procedimento, como foi observado em estudos apresentados neste trabalho. Este procedimento também não explorou o fracionamento de espécies de fósforo.

Foto-oxidação em linha foi explorada para o fracionamento de fósforo em águas residuais²³ utilizando um sistema com microbombas solenoide. Em relação ao procedimento proposto, apresentou maior limite de detecção ($500 \mu\text{g L}^{-1}$), consumo de oxidante 16 vezes maior e menor frequência de amostragem (11 h^{-1}), com tempo de digestão de *ca.* 4,0 min. Além disto, duas curvas analíticas foram necessárias para o fracionamento, uma vez que as determinações de P_I e P_T foram realizadas em diferentes condições de dispersão e mistura.

Tabela 3.4 – Características analíticas de procedimentos para a determinação de fósforo total ou fracionamento em águas naturais e residuais.

<i>Procedimento</i>	<i>Limite de detecção</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	<i>Faixa linear</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	<i>Consumo de</i> $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (mg)	<i>Tempo de</i> <i>conversão</i> (s)	<i>Frequência de</i> <i>amostragem</i> (h^{-1})	<i>Referência</i>
Fracionamento com conversão enzimática	70	< 1200	–	60	40	77 ^b
Fósforo total com digestão	100	< 30000	25	80	20	78 ^c
em linha assistida por	100	< 20000	– ^a	30	30	79 ^c
micro-ondas	90	3000 – 36000	60	80	12	80 ^c
	900	< 18000	10	30	7	81 ^c
Fósforo total com foto- oxidação em linha	10	< 100	60	10	50	82 ^b
	1,0	< 100	7,5	60	20	83 ^{b,c}
Fracionamento de fósforo	0,3	1,5 – 350	50	30	40	60 ^b
com foto-oxidação em	500	< 40000	10	240	11	23 ^c
linha	2,0	10 – 75	0,6	30	40	Este trabalho ^b

a – 100 mg HNO_3 ; b – águas naturais; c – águas residuais.

Um procedimento em fluxo com detecção fluorimétrica apresentou limite de detecção ($0,3 \mu\text{g L}^{-1}$) adequado para o fracionamento de fósforo em águas naturais⁶⁰. A frequência de amostragem (40 h^{-1}) foi comparável com a do procedimento desenvolvido, mas o consumo do oxidante foi *ca.* 80 vezes maior. O procedimento fluorimétrico requer uma coluna de troca catiônica previamente à introdução da amostra, visando evitar interferências de íons metálicos (*e.g.* Fe^{3+} e Cu^{2+}) capazes de oxidar tiamina a tiocromo. Para o fracionamento das espécies de fósforo, foi necessário desligar a lâmpada de vapor de mercúrio para evitar a oxidação do P_O , que pode diminuir o tempo de vida do dispositivo e alterar a taxa de conversão do analito por diferenças de temperatura. No procedimento proposto, como a solução do oxidante é substituída por água desionizada, a lâmpada foi mantida em operação, aumentando o tempo de vida da fonte.

Em comparação com o procedimento recomendado pela AOAC⁴³, no procedimento desenvolvido o preparo de amostra foi mais rápido (30 s comparados com *ca.* 30 minutos do procedimento de referência). Previamente às medidas espectrofotométricas, foi necessário aguardar 30 minutos para a formação do azul de molibdênio, resultando em aproximadamente uma hora para análise de fósforo total. As desvantagens de sistemas abertos para o preparo de amostras (*e.g.* contaminação da amostra e perdas do analito) foram superadas com o uso do sistema fechado. Adicionalmente, o consumo de amostra foi diminuído de 5000 para $155 \mu\text{L}$ e o de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ de 6000 para $160 \mu\text{g}$. A redução do consumo de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ foi *ca.* 60%. No procedimento em batelada, foi necessária a utilização do reagente tartarato de potássio e antimônio: o tartarato mascara o ortossilicato, evitando interferências, enquanto o antimônio catalisa a reação de formação do azul de molibdênio.

3.3.5 Efeito de espécies potencialmente interferentes

Os potenciais interferentes para o fracionamento de fósforo em águas naturais são íons ortossilicato e matéria orgânica dissolvida isenta de fósforo. O ortossilicato forma um heteropoliácido similar ao ácido fosfomolibdico, gerando produto similar ao azul de molibdênio na presença de um agente redutor, resultando em interferência positiva. A mesma reação já foi empregada para a determinação de Si em águas naturais⁸⁷. Uma alternativa para eliminar a interferência é a utilização de ácido tartárico, que forma um complexo estável com silicato e evita a formação do ácido silicomolibdico, como no procedimento de referência⁴³.

Com o presente procedimento, foram obtidos sinais para $50 \mu\text{g L}^{-1} \text{P}_i$ na presença de $2,0 \text{ mg L}^{-1} \text{Si}$, que é a quantidade normalmente encontrada em águas de rios⁸⁸ e não foi observada variação significativa do sinal analítico ($< 5\%$). O limitado tempo de residência (30 s) e a acidez desfavoreceram a formação e redução do ácido silicomolibdico.

A matéria orgânica isenta de fósforo também pode ser foto-oxidada, afetando a eficiência de conversão devido ao consumo dos radicais oxidantes. Além disto, a absorção de radiação pela matéria orgânica pode causar interferências espectrais nas medidas espectrofotométricas de ortofosfato. Não foram observadas variações significativas na eficiência de conversão do fósforo orgânico a ortofosfato na presença de ácido húmico (Figura 3.14). A diferença entre os sinais de ortofosfato na ausência (*a*) e presença de ácido húmico (*c*) foi $< 1,0\%$, indicando que a matéria orgânica foi quantitativamente degradada na presença do oxidante. Comparando-se os sinais de ácido fítico na ausência (*b*) e na presença de ácido húmico (*d*), não foram observadas diferenças significativas (*ca.* $1,2\%$), indicando que com esta concentração de ácido húmico não houve alteração na eficiência de conversão do P_o . Foram obtidos também sinais na ausência do oxidante para avaliar a influência do ácido húmico na determinação de P_i . Foi observado sinal de $(0,887 \pm 0,002)$ para solução de ortofosfato na presença de ácido húmico (*e*) e $(0,270 \pm 0,007)$ apenas para o ácido húmico (*g*).

A diferença entre a somatória dos sinais *a* e *g* e o sinal *e* foi de 1,6%, indicando que se a amostra apresentasse quantidade de matéria orgânica significativa para causar absorção de radiação em 700 nm, a compensação do sinal poderia ser realizada medindo os sinais referentes à amostra na presença e ausência dos reagentes cromogênicos. Os sinais *f* e *g* foram concordantes (diferença de 7,0%) pois, na ausência do oxidante, os ácidos húmico e fítico não sofrem fotoconversão. Os estudos conduzidos indicam que o procedimento pode ser aplicado para o fracionamento de fósforo (P_I e P_O) em águas naturais.

Figura 3.14. Efeito de ácido húmico ($4 \text{ mg L}^{-1} \text{ C}$) sobre o sinal analítico para a determinação de fósforo ($50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ P}$). Sinais obtidos com soluções de KH_2PO_4 (**a**), ácido fítico (**b**), KH_2PO_4 + ácido húmico (**c**) e ácido fítico + ácido húmico (**d**) na presença de oxidante. Os demais sinais foram obtidos empregando água ao invés de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$: KH_2PO_4 + ácido húmico (**e**), ácido fítico + ácido húmico (**f**) e ácido húmico (**g**). A seta indica o sinal referente às perturbações por efeito Schlieren causadas pela inserção da solução de limpeza.

3.3.6 Fracionamento de fósforo em águas naturais

Foram analisadas cinco amostras de águas coletadas em diferentes pontos do Rio Guamium, na região de Piracicaba/SP. No procedimento proposto, as amostras foram

analisadas na ausência e na presença do $K_2S_2O_8$ para as medidas dos sinais referentes ao P_I e P_T , respectivamente. A determinação de P_O foi realizada através da diferença $P_T - P_I$. A Figura 3.15 representa os sinais analíticos obtidos para as cinco amostras de águas naturais. Para a determinação de P_I , não houve interferência da matéria orgânica, pois não foi observada resposta na ausência dos reagentes cromogênicos.

Figura 3.15. Sinais transientes referentes a cinco amostras de águas de rio ($A_1 - A_5$) para a determinação de fósforo inorgânico (P_I) e total (P_T), obtidos na ausência e presença de $K_2S_2O_8$, respectivamente.

Para avaliar a exatidão do procedimento proposto, as amostras foram também analisadas pelo procedimento de referência recomendado pela AOAC⁴³. A determinação de P_I foi realizada através da formação do azul de molibdênio, monitorado por espectrofotometria. O procedimento apresentou resposta linear entre 10 e 500 $\mu g L^{-1} P$, com absorbância máxima de *ca.* 0,2. Para a determinação de P_T , a amostra foi submetida ao aquecimento convectivo na presença de $K_2S_2O_8$ para a conversão de P_O a P_I . Na Tabela 3.5 estão apresentados os resultados obtidos, assim como os valores de F calculados para comparação das variâncias⁸⁹. Foram observadas diferenças significativas com 95% de confiança ($F_{crítico} = 19,0$) apenas para

os resultados da amostra A₄ e de P_T na amostra A₅, inviabilizando a utilização do teste *t* pareado para comparação dos valores médios obtidos pelos dois métodos. Sendo assim, para cada resultado foi empregado teste *t* em que o grau de liberdade é dependente dos desvios e do número de replicatas⁸⁹, não sendo observadas diferenças significativas com 95% de confiança.

Tabela 3.5 – Teores médios e incertezas (n = 3) obtidos no fracionamento de fósforo em águas naturais pelos procedimentos proposto e de referência⁴³.

Amostra	Fósforo inorgânico ($\mu\text{g L}^{-1} \text{P}_i$)			Fósforo total ($\mu\text{g L}^{-1} \text{P}_T$)		
	Proposto	Referência	F _{calc.} *	Proposto	Referência	F _{calc.} *
A ₁	55,0 ± 0,8	55,2 ± 1,2	2,2	63,1 ± 2,0	66,1 ± 3,2	2,5
A ₂	49,0 ± 1,6	51,1 ± 3,2	4,0	71,1 ± 1,3	73,2 ± 4,1	9,9
A ₃	53,1 ± 0,9	58,2 ± 2,4	7,1	71,9 ± 0,9	76,4 ± 2,9	10
A ₄	51,0 ± 0,8	48,9 ± 7,2	81	61,0 ± 0,8	58,5 ± 5,3	44
A ₅	44,8 ± 1,0	45,4 ± 3,0	9,0	68,0 ± 0,6	67,9 ± 7,0	136

*F_{crítico} = 19,0.

3.4 Conclusões

Um procedimento em sistema de análises em fluxo com microbombas solenoide e foto-oxidação em linha foi desenvolvido para o fracionamento de fósforo em águas de rios, com conversão quantitativa das espécies orgânicas em curto intervalo de tempo. A sensibilidade foi melhorada com espectrofotometria de longo caminho óptico, empregando cela construída com guia de ondas, possibilitando a aplicação à análise de águas de rios. O emprego do SnCl₂ foi vantajoso porque a formação do azul de molibdênio é mais rápida se comparada com outros agentes redutores (*e.g.* ácido ascórbico). Por outro lado, favorece a deposição do azul de molibdênio no percurso analítico e na cela de fluxo, o que foi superado no presente procedimento empregando solução de limpeza (NaOH) a cada replicata.

As espécies condensadas de fósforo não sofreram foto-oxidação, pois são convertidas a ortofosfato somente após hidrólise em meio ácido e a altas temperaturas por longos períodos, o que dificulta a aplicação em sistemas de análises em fluxo.

Ácido húmico e íons ortossilicato não interferiram no fracionamento de fósforo. A taxa de formação do ácido sílicomolibdico (e consequentemente do composto reduzido) é menor em comparação ao ácido fosfomolibdico e, devido ao curto tempo de residência, esta interferência foi evitada. Ácido húmico não afetou a conversão do P_O devido ao excesso de oxidante empregado. Adicionalmente, esta interferência na determinação de P_I pode ser compensada com sinais referentes à amostra na ausência dos reagentes.

O procedimento desenvolvido apresentou baixo consumo de reagentes e geração de resíduos e, devido ao processamento das amostras em sistema fechado, minimizou riscos de contaminação e perdas de analito. Em comparação com procedimentos propostos na literatura, apresentou configuração mais simples, dispensando o uso de unidades dissipadoras de calor e de desborbulhadores. A maioria dos procedimentos não explorou o fracionamento de fósforo e não foi aplicável a águas naturais devido aos altos limites de detecção. Portanto, o procedimento proposto é uma alternativa para o fracionamento de fósforo visando estudos de biodisponibilidade com rápido preparo de amostras e sensibilidade adequada para aplicação em águas naturais.

4

**PROCEDIMENTO ANALÍTICO
LIMPO PARA A
DETERMINAÇÃO DE
CLORETO EM URINA E ÁGUAS
NATURAIS**

4.1 Introdução

4.1.1 Cloreto em urina e águas naturais

O cloreto em corpos aquáticos possui origens naturais (*e.g.* lixiviação de rochas e solos e decomposição de seres vivos) e antropogênicas (*e.g.* despejo de esgoto doméstico e industrial). O excesso de cloreto em águas naturais e de abastecimento causa efeitos adversos, tornando importante o seu monitoramento. A salinidade decorrente da alta concentração de cloreto causa deterioração de encanamentos metálicos⁷², acarretando na necessidade de manutenção de estruturas e na contaminação da água por metais (*e.g.* Fe e Pb). Isto acarreta na alteração da qualidade (cor, odor e sabor), além de causar efeitos adversos à saúde. O cloreto também apresenta impacto agrônômico negativo quando em altas concentrações em águas para irrigação, uma vez que o metabolismo das plantas pode ser alterado com a absorção de grandes quantidades desta espécie⁹⁰.

O cloreto representa *ca.* 70% (m/m) dos íons nos fluídos biológicos humanos⁹¹, sendo responsável pelo balanceamento de cargas intra e extracelulares e pela retenção de água nos rins, juntamente com o sódio e o potássio⁹¹. Sendo assim, o excesso de cloreto leva à retenção demasiada de líquidos, que acarreta problemas à saúde. Este nutriente também compõe fluidos gástricos (*e.g.* HCl) responsáveis pela digestão do bolo alimentar e pela ativação de enzimas⁹².

A quantificação do cloreto em fluidos corpóreos é um indicativo para o diagnóstico de diversas disfunções⁹³, principalmente em relação à atividade renal, além de auxiliar no monitoramento de medicamentos diuréticos⁹². A hiperclorêmia (excesso de cloreto urinário) indica estados de desidratação (o cloreto não está sendo retido pelo organismo), de alcalose e de deficiência de magnésio e o surgimento de síndromes como as de Addison, Gitelman e Bartter⁹². A hipoclorêmia (deficiência de cloreto urinário) pode ser indicativo de vômitos constantes e do uso excessivo de formulações à base de penicilina⁹².

O trabalho discutido neste capítulo gerou o artigo:

ROCHA, D. L.; ROCHA, F. R. P. An environmentally friendly flow-based procedure with photo-induced oxidation for the spectrophotometric determination of chloride in urine and waters. *Microchemical Journal*, v. 108, p. 193-197, 2013.

Considerando os aspectos discutidos anteriormente, a análise de cloreto apresenta importância ambiental e clínica. A demanda por análises é alta devido à necessidade de se obter resultados em curto intervalo de tempo para auxiliar nas avaliações médicas⁹¹ e nas remediações de corpos aquáticos. Esta demanda motiva a mecanização de procedimentos analíticos, pois etapas cansativas e repetitivas geralmente estão envolvidas no preparo e análise das amostras, induzindo o analista a cometer erros que afetam a precisão e exatidão dos resultados^{91,94}.

Além de minimizar a variabilidade dos resultados, procedimentos mecanizados geram menores quantidades de resíduos, consumindo mínimas quantidades de amostras e reagentes. Desta forma, o custo com tratamento de resíduos é reduzido e os procedimentos atendem aos requisitos da Química Verde⁹⁵. Sistemas de análises em fluxo também destacam-se pelos menores custos de aquisição e manutenção.

4.1.2 Procedimentos analíticos para a determinação de cloreto

De acordo com o CONAMA⁷⁰ e EPA⁷¹, o limite máximo permitido de cloreto em águas naturais é de 250 mg L⁻¹. Em urina, a quantidade excretada de cloreto varia entre 55 e 240 mmol L⁻¹ (2,0 a 8,5 g L⁻¹), dependendo do volume urinário^{91,93}. Os principais procedimentos para a determinação de cloreto em urina e águas naturais apresentam a desvantagem da geração de efluentes contendo íons metálicos (*e.g.* Hg e Ag)^{43,72,91}, dificultando o descarte em laboratórios de rotina.

A cromatografia a líquido de troca iônica (IC) e a eletroforese capilar (CE) são recomendadas pelo SMEW⁷² para a determinação de íons em águas naturais, inclusive de cloreto. As etapas de limpeza para eliminação de matéria orgânica e os altos tempos de eluição (*ca.* 10 minutos) tornam os procedimentos demorados. Além disto, apresentam maiores custos de manutenção e aquisição em relação aos sistemas de análises em fluxo. Na

literatura, foram propostas alternativas para a determinação de cloreto por IC⁹⁶. Entretanto, não foram observadas vantagens em relação aos procedimentos oficiais, apresentando semelhantes tempos de eluição e limites de detecção.

Os manuais da AOAC⁴³, SMEW⁷² e de análises clínicas⁹¹ recomendam procedimentos volumétricos para a determinação de cloreto em águas naturais. A amostra é titulada com $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, gerando HgCl_2 . Na presença de difenilcarbazona, o excesso do titulante causa mudança da coloração devido à formação do íon complexo colorido com Hg^{2+} , indicando o ponto final. Alternativamente, também se recomenda a titulação da amostra com AgNO_3 na presença de K_2CrO_4 . O sal de baixa solubilidade Ag_2CrO_4 , de coloração alaranjada, é formado com excesso de íons Ag^+ , indicando o ponto final. A titulação argentométrica apresenta maior suscetibilidade a interferências (*e.g.* Br^- e I^-) que os métodos mercurimétricos. Em ambos os casos, são consumidas altas quantidades de reagentes contendo íons Hg^{2+} , Ag^+ ou CrO_4^{2-} , gerando grandes quantidades de efluentes que exigem tratamentos laboriosos.

As titulações potenciométricas e coulométricas são alternativas para a determinação de cloreto em águas⁷² e urina⁹¹, respectivamente. O AgNO_3 é empregado como titulante e o ponto final ocorre quando um excesso de Ag^+ causa aumento na diferença de potencial ou de corrente entre os eletrodos. Apesar de dispensar o uso de espécies como Hg^{2+} e CrO_4^{2-} , os procedimentos eletroanalíticos são os mais suscetíveis a interferências. Íons Br^- , I^- , CrO_4^{2-} formam sais de baixa solubilidade com Ag^+ , superestimando a concentração de cloreto. Por outro lado, íons Fe^{3+} formam complexos com o analito, causando interferência negativa. Eletrodos íon-seletivos também foram empregados para a determinação potenciométrica de cloreto em urina⁹¹. Entretanto, podem ocorrer interferências por íons Fe^{3+} .

Um dos métodos mais utilizados do SMEW⁷² e por manuais de análises clínicas^{91,93} é baseado na reação entre o analito e $\text{Hg}(\text{SCN})_2$, formando HgCl_2 e liberando íons SCN^- . Na presença de íons Fe^{3+} , forma-se $[\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+}$, monitorado por espectrofotometria. Este método

pode ser aplicado em sistemas mecanizados, tanto em analisadores de fluxo segmentado, quanto em sistemas FIA.

Um dos primeiros procedimentos para a determinação de cloreto em águas naturais baseado no sistema $\text{Hg}(\text{SCN})_2 / \text{Fe}^{3+}$ foi proposto na década de 1950⁹⁷. Desde então, a principal inovação dos procedimentos têm sido minimizar o consumo de Hg^{2+} , empregando sistemas SIA⁹⁸ ou FIA⁷², inclusive explorando coluna preenchida pelo reagente sólido puro⁹⁹ ou imobilizado em resina epóxi¹⁰⁰, membranas de diálise¹⁰¹, multicomutação^{102,103} e espectrofotometria de longo caminho óptico¹⁰⁴. As quantidades de mercúrio empregadas por determinação foram diminuídas para até 50 μg em comparação com o procedimento em batelada (450 μg). Entretanto, a geração de resíduos contendo íons metálicos ainda seria problemática para laboratórios de rotina. As melhorias dos procedimentos foram direcionadas principalmente à análise de águas naturais, sendo escassas para amostras biológicas.

Um procedimento em fluxo com inserção de reagentes através de membranas foi proposto para a determinação de cloreto¹⁰¹. A amostra foi injetada no transportador (H_2O) e atravessou três unidades de difusão distintas, nas quais permeavam sequencialmente soluções de HNO_3 , $[\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+}$ e $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$. O excesso de Hg^{2+} que não reagiu com o analito formou $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ e o $[\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+}$ remanescente foi monitorado por espectrofotometria. A permeação não foi restrita às quantidades que seriam efetivamente necessárias, acarretando no consumo de 270 μg de Hg^{2+} por determinação.

A imobilização do $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ ^{99,100} deveria consumir menos Hg^{2+} , pois apenas a quantidade necessária seria utilizada para a reação com o analito. As massas de Hg^{2+} consumidas com imobilização direta⁹⁹ ou em resina epóxi¹⁰⁰ foram estimadas em 4000 e 120 μg por determinação, respectivamente. No primeiro caso, a lixiviação do reagente foi responsável pelo maior consumo em comparação com procedimento em batelada, problema contornado com a imobilização do reagente em resina.

Procedimentos com multicomutação^{102,103} ou explorando espectrofotometria de longo caminho óptico¹⁰⁴ proporcionaram consumo ainda menor de reagentes em comparação com os que utilizam reagentes imobilizados. Sistemas de análises em fluxo com válvulas solenoide¹⁰² (MCFIA) ou multiseringas¹⁰³ (MSFIA) resultaram em consumo de Hg^{2+} estimado em 110 e 50 μg por determinação, respectivamente. O sistema MSFIA em conjunto com a espectrofotometria de longo caminho óptico foi explorado para minimização do consumo de reagentes¹⁰⁴. Devido ao aumento de sensibilidade proporcionado pelo guia de ondas, a concentração dos reagentes foi diminuída, consumindo *ca.* 200 μg de Hg por determinação.

A substituição do Hg^{2+} por Ag^+ foi proposta em diversos procedimentos alternativos, baseados na formação do AgCl, seguido de determinação turbidimétrica^{105,106} ou espectrofotométrica¹⁰⁷, porém ainda gerando efluentes com considerável toxicidade.

Um sistema FIA com recirculação de reagente foi proposto para minimizar a geração de resíduos tóxicos¹⁰⁶. Uma alíquota da amostra (100 μL) foi injetada em uma solução de $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ ($\beta = 1,5 \times 10^7$)⁸⁹ em recirculação, atravessando a cela de fluxo para a medida turbidimétrica do AgCl ($K_{\text{ps}} = 1,8 \times 10^{-10}$)⁸⁹. O desfavorecimento da formação do produto em meio amoniacal exigiu alto consumo de reagente, estimado em 4000 μg de Ag^+ por determinação.

A imobilização do cloranilato de prata ($\text{Ag}_2\text{C}_6\text{O}_4\text{Cl}_2$) acoplada à espectrofotometria de longo caminho óptico foi explorada para minimizar o consumo de reagentes na determinação de cloreto¹⁰⁷. O AgCl foi formado, permanecendo na coluna e liberando íons cloranilato, que foram monitorados em 530 nm. O ganho de sensibilidade não foi tão evidente em comparação com outros procedimentos, pois os íons cloranilato podem ter sido adsorvidos na superfície do AgCl retido na coluna.

Uma alternativa que substituiu os íons metálicos tóxicos está sendo avaliada para se tornar um procedimento de referência para a determinação de cloreto em amostras

biológicas^{91,108,109}. A proposta foi baseada na inativação da enzima α -amilase na presença de EDTA, seguida da reativação com a adição do analito¹⁰⁸. Esta enzima degrada o composto 2-cloro-4-nitrofenol- β -D-maltoheptaosídio na presença de α e β -glucosidase, gerando o 2-cloro-4-nitrofenol, com máximo de absorção em 405 nm. A concentração do produto final foi proporcional à concentração de cloreto utilizada para a reativação da enzima. Apesar de substituir reagentes tóxicos, este procedimento requer 7 minutos previamente às medidas, que foram realizadas à 37 °C.

A oxidação do Cl^- por KIO_4 é uma alternativa para a determinação de cloreto¹¹⁰. Após oxidação do analito, o Cl_2 gerado foi destilado e coletado em solução de alaranjado de metila, cuja descoloração foi monitorada por espectrofotometria. Apesar de gerar efluentes com baixa toxicidade e suscetíveis a processos de degradação, este procedimento é moroso e laborioso devido à necessidade de destilação, não sendo compatível com laboratórios de análises de rotina. Além disto, não foram demonstradas aplicações utilizando esta estratégia.

A foto-oxidação do Cl^- a Cl_2 foi observada na determinação voltamétrica de íons metálicos em amostras de águas marinhas¹¹¹. A geração de Cl_2 causava interferência positiva nas determinações devido ao sinal de corrente relativo a essa espécie. Apesar do potencial para o desenvolvimento de procedimentos analíticos limpos, a foto-conversão de íons Cl^- a Cl_2 ainda não foi explorada para fins analíticos.

Neste trabalho, foi proposto um procedimento analítico em fluxo com multicomutação e foto-oxidação em linha para a determinação de cloreto em urina e águas de rios. O procedimento foi baseado na foto-oxidação do analito e posterior descoloração do alaranjado de metila em meio ácido, monitorada por espectrofotometria. Este corante foi previamente empregado na determinação de cloro livre em águas marinhas¹¹² e residuais¹¹³.

4.2 Parte experimental

4.2.1 Equipamentos e acessórios

O sistema de análises em fluxo com multicomutação foi construído empregando tubos de polietileno ou de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,8 mm *d.i.*, quatro microbombas (Biochem), uma válvula solenoide (NResearch) e uma cela de fluxo de quartzo (Helma) com 1,0 cm de caminho óptico. Os volumes dispensados pelas microbombas (P_1 a P_4) foram aferidos com a pesagem do volume de água dispensado com 100 pulsos, obtendo-se coeficientes de variação menores que 0,8%. Para as medidas dos sinais, foi empregado um espectrofotômetro multicanal que consiste de um arranjo linear de 2048 fotodetectores do tipo CCD (*Charge-coupled devices*, Ocean Optics), diretamente acoplado a um microcomputador (Intel Pentium), permitindo medidas entre 200 e 800 nm. Cabos de fibra óptica foram utilizados para o transporte da radiação proveniente de uma lâmpada de tungstênio-halogênio (Ocean Optics) até a cela de fluxo e da saída desta até o sistema de detecção (Figura 2.3). O módulo de análises foi controlado eletronicamente por um microcomputador, através de uma das interfaces paralelas disponíveis. A alimentação dos dispositivos foi realizada por uma fonte de diferença de potencial constante (12 V). Para o acionamento dos dispositivos foram empregados circuitos integrados do tipo ULN2803 (Figura 2.2). O programa para o controle dos dispositivos foi desenvolvido em linguagem Visual Basic 6.0 (Microsoft). A aquisição dos dados foi realizada com o software fornecido pelo fabricante. Para a foto-oxidação, foi empregado um reator de PTFE de 70 cm (350 μ L), enrolado em torno do bulbo de uma lâmpada de vapor de mercúrio de 13 W, como apresentado na Figura 3.3.

4.2.2 Reagentes e soluções

As soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água desionizada. A solução do reagente R_1 foi preparada diariamente por dissolução de $K_2S_2O_8$ (Merck) em

HNO_3 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck). O reagente R_2 foi preparado a partir da dissolução do alaranjado de metila (Merck) em HNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Solução estoque de NaCl (Merck) contendo $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}$ foi preparada a partir da dissolução do sal (previamente seco em estufa a 110°C) em água.

4.2.3 Procedimentos

O diagrama da Figura 4.1 representa o módulo de análises utilizado para o desenvolvimento do procedimento analítico. A rotina de acionamento das microbombas solenoide para a determinação de cloreto está descrita na Tabela 4.1.

A zona de amostra foi formada por três repetições das etapas 1 e 2 (três ciclos de amostragem) e foi transportada até o fotorreator com 2 pulsos da solução transportadora (etapa 3). Após a foto-oxidação (etapa 4), a zona de amostra foi inserida no reator B (etapa 5), seguido de alíquotas do reagente R_2 (etapa 6). Em seguida, foi transportada até a cela de fluxo (etapa 7) para a medida espectrofotométrica ($\lambda = 510 \text{ nm}$). Para que o fotorreator atingisse o equilíbrio térmico, a fonte UV foi ligada com 10 minutos de antecedência às determinações.

Figura 4.1. Diagrama do sistema de análises em fluxo empregado para a determinação de cloreto.

A: amostra; R_1 : $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 75 mmol L^{-1} em HNO_3 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$; R_2 : alaranjado de metila $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ em HNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; C: H_2O ; $\text{P}_1 - \text{P}_4$: microbombas solenoide; V: válvula solenoide; FR: fotorreator; x e y: pontos de confluência; B: reator (100 cm); D: cela de fluxos acoplada ao espectrofotômetro e W: recipientes de descarte.

Tabela 4.1 – Rotina de acionamento das microbombas solenoide para determinação de cloreto em urina e águas naturais ^a.

<i>Etapa</i>	<i>Descrição</i>	<i>Microbomba</i>	<i>Volume por pulso (μL)</i>	<i>Nº de pulsos</i>
1 ^b	Inserção da amostra	P ₁	10,1	6
2 ^b	Inserção de K ₂ S ₂ O ₈	P ₂	12,0	5
3	Transporte para o fotorreator	P ₃	20,0	2
4	Fotoconversão (15 s)	—	—	—
5	Transporte do digerido	P ₃	20,0	5
6	Inserção de alaranjado de metila	P ₄	19,7	1
7	Transporte e detecção	P ₃	20,0	80
8 ^c	Substituição da amostra	P ₁	10,0	100
		P ₃	20,0	30

a) Frequência de acionamento das microbombas de 5 Hz; b) 3 ciclos de amostragem; c) Válvula V acionada.

Após a substituição da amostra ou soluções de referência, foi necessário garantir o preenchimento da tubulação até o ponto de confluência **x**. Sendo assim, 100 pulsos foram aplicados à microbomba P₁ e, simultaneamente, a válvula solenoide V foi acionada, direcionando a amostra para o descarte (etapa 8). O volume de amostra entre o ponto de confluência **x** e a válvula V foi removido empregando 30 pulsos da solução transportadora (etapa 8). Desta forma, a passagem de fluidos através da cela de detecção durante a etapa de limpeza foi evitada, minimizando riscos de contaminação.

Os efeitos das concentrações dos reagentes, número de pulsos de cada micro-bomba, número de ciclos de amostragem e tempo de digestão foram avaliados, a fim de maximizar a sensibilidade, obter faixa de resposta linear adequada e minimizar o consumo de reagentes. A diferença entre os sinais de referência e do analito (definida como sinal analítico) e o desvio das medidas foram levados em consideração na etapa de otimização. Em seguida, foram estimadas as características analíticas do procedimento e foram analisadas amostras de urina e de águas naturais, sendo os resultados comparados com os obtidos em procedimentos de referência^{43,93}.

4.2.4 Efeito de espécies potencialmente interferentes

Na avaliação do efeito de espécies concomitantes foram considerados compostos normalmente presentes em urina (ácido úrico, ureia, glicose, creatinina, Ca^{2+} e ácido acético) e em águas naturais (Fe^{2+} , Fe^{3+} , NO_2^- , Br^- , ClO^- e ácido húmico), que poderiam afetar a eficiência de conversão do analito por consumirem os radicais oxidantes ou reagirem com o Cl_2 gerado. As concentrações das espécies foram avaliadas em excesso de, no mínimo, cinco vezes em relação às quantidades normalmente encontradas nas amostras.

4.2.5 Análise das amostras e comparação com procedimento de referência

Uma amostra de água de abastecimento e cinco de águas de rios (Tocantins, Saltão, Piracicaba, Capivara e Sorocaba) foram filtradas em acetato de celulose 0,45 μm para remoção do material particulado. Seis amostras de urina foram coletadas em tubos de polietileno de 50 mL e analisadas após diluição de 200 vezes, sem tratamento adicional.

Para comparar os resultados obtidos com o procedimento proposto, foram realizadas análises das amostras pelos procedimentos de referência recomendados pelo SMEW⁷² e pelos manuais de análises clínicas⁹¹. As determinações foram realizadas em sistema de análises em fluxo em confluência, utilizando água como transportador e reagente cromogênico composto por $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ 600 mg L^{-1} e íons Fe^{3+} 4,2 g L^{-1} , dissolvidos em etanol 0,15% e HNO_3 50 mmol L^{-1} . O produto formado foi monitorado por espectrofotometria em 480 nm.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Aspectos gerais

Uma nova estratégia foi empregada para a determinação de cloreto em águas naturais e urina explorando a foto-oxidação a cloro em meio de $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$. O Cl_2 reage com o alaranjado de metila (AM), causando um decréscimo da absorção de radiação em 500 nm pelo corante. Esta

reação foi citada na literatura como uma maneira de realizar a determinação de cloreto^{90,110}, embora não tenha sido demonstrada nenhuma aplicação.

Os mecanismos de reação entre AM e halogênios foram discutidos previamente¹¹⁴ e as espécies intermediárias formadas dependem da espécie (Cl₂, Br₂ ou I₂). Na presença de Cl₂, a cloração do anel aromático é favorecida com rendimento estimado em 70%¹¹⁵. Em contrapartida, o Br₂ causa a oxidação do corante, não sendo observados produtos de bromação. As equações 26 – 28 representam as possíveis reações entre Cl₂ e AM.

Assim como o I₂ gera I[•] após irradiação UV¹², o Cl₂ pode gerar Cl[•] (equação 29), sendo possível a oxidação do AM pelo Cl[•] (equação 30), dependendo do tempo de meia vida no meio. Radicais OH[•] também podem oxidar o corante (equações 31 e 32), porém este efeito é menos provável, pois os sinais de referência foram obtidos após a geração de grandes quantidades de OH[•]. Tanto na halogenação, quanto na oxidação, observa-se a descoloração do AM¹¹⁴.

4.3.2 Estudos preliminares

O alaranjado de metila é um indicador ácido-base⁸⁹ com máximo de absorção em 500 nm em valores de pH abaixo de 3,0. O sinal referente ao AM foi avaliado na ausência e presença de HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando o sistema de análises em fluxo apresentado na Figura 4.1. Os sinais transientes foram obtidos com $180 \mu\text{L}$ de AM 60 mg L^{-1} , substituindo os demais reagentes por água, de forma que o volume final da zona de amostra fosse $300 \mu\text{L}$. Em meio próximo à neutralidade e em meio ácido foram observadas absorbâncias iguais a $(1,22 \pm 0,05)$ e $(2,21 \pm 0,02)$, respectivamente. O reagente foi preparado em meio ácido em estudos posteriores para garantir a geração de Cl_2 ao invés de ClO^- . A concentração do corante foi diminuída para 30 mg L^{-1} para que os valores de absorbância fossem mantidos próximos a 1,0, visando minimizar erros nas medidas instrumentais.

O persulfato e os radicais oxidantes gerados após irradiação UV poderiam reagir com o AM, causando sua descoloração. Este efeito foi avaliado na presença e ausência de oxidante (gerenciado por P_2) e de irradiação UV (Tabela 4.2). A influência de cloreto sobre a resposta também foi avaliada empregando solução de NaCl 100 mg L^{-1} (gerenciada por P_1).

Tabela 4.2 – Respostas obtidas com AM 30 mg L^{-1} na presença ou ausência de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, irradiação UV e íons Cl^- .

<i>Fluído gerenciada por P_1</i>	<i>Fluído gerenciado por P_2</i>	<i>Resposta</i>
H_2O	H_2O	$1,39 \pm 0,01^a$
H_2O	$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	$1,39 \pm 0,01^a$
H_2O	$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	$1,27 \pm 0,02^b$
$\text{NaCl } 100 \text{ mg L}^{-1}$	$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	$0,116 \pm 0,009^b$

A lâmpada de vapor de mercúrio foi mantida (a) desligada ou (b) ligada durante os experimentos.

De acordo com a Tabela 4.2, não houve variação significativa da resposta sem irradiação UV, indicando que o AM não foi oxidado. Com irradiação, foi observada uma pequena diminuição do sinal (*ca.* 8,0 %) devido à geração dos radicais oxidantes a partir do

persulfato. Como o reagente foi misturado ao digerido após o fotorreator, a oxidação via radicalar não foi eficiente, uma vez que ocorrem reações de recombinação (equação 15). A inserção de íons Cl^- à zona de amostra causou significativo decréscimo no sinal de referência (*ca.* 90%), indicando a ocorrência de reações entre AM e Cl_2 ou $\text{Cl}^\bullet$ (Equações 26 – 30). Estes resultados indicaram que o procedimento era promissor para a determinação de cloreto com detecção por espectrofotometria.

4.3.3 Otimização do procedimento

A otimização do procedimento foi realizada com o sistema apresentado na Figura 4.1. A lâmpada de vapor de mercúrio foi mantida ligada durante os experimentos. Os estudos foram iniciados com a introdução da amostra e do oxidante (38 mmol L^{-1}) no fotorreator. A zona de amostra foi formada por 3 ciclos de amostragem, cada um constituído por $50 \text{ }\mu\text{L}$ (5 pulsos de P_1 por ciclo) de solução do analito ($840 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1} \text{ Cl}^-$), seguido por $60 \text{ }\mu\text{L}$ (5 pulsos de P_2 por ciclo) de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. A zona de amostra foi transportada até o centro do fotorreator com $60 \text{ }\mu\text{L}$ do transportador (3 pulsos de P_3). Em seguida, a zona de amostra foi inserida no reator B para adição de AM, empregando 3 ciclos de amostragem, sendo cada ciclo composto pelo reagente R_2 ($180 \text{ }\mu\text{L}$ de AM $80 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ + HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e pelo digerido, cujo volume foi avaliado (Figura 4.2).

Figura 4.2. Efeito do volume total do digerido sobre o sinal de referência (○) e de 30 mg L⁻¹ Cl⁻ (■), empregando 3 ciclos de amostragem, alaranjado de metila 80 µmol L⁻¹ em HNO₃ 0,5 mol L⁻¹; reator de 100 cm e H₂O como transportador.

Com o aumento do volume do digerido inserido em B, o sinal de referência sofreu diminuição de até 50% devido ao efeito da diluição de R₂. Entretanto, não foi observada variação significativa do sinal analítico a partir de 240 µL de digerido (4 pulsos de P₃ por ciclo de amostragem). Baseando-se nas reações de cloração da molécula do corante (equações 26 – 28), o analito estaria em excesso em toda a faixa avaliada, o que implicaria na supressão máxima do sinal, caso a conversão fosse quantitativa. Sendo assim, conclui-se que houve conversão incompleta do analito a Cl₂ (estimada em 10 %) ou que a descoloração foi devida à oxidação do AM por radicais cloro (equações 29 – 32). Em ambos os casos, para causar total supressão do sinal analítico devido ao consumo quantitativo do AM, a razão entre o analito e o corante (Cl⁻:AM) é 6:1. As proporções foram próximas a esta condição quando foram inseridos 240 e 300 µL do digerido. Com volumes maiores, o sinal referente ao cloreto foi < 0,05, indicando o consumo quantitativo do corante (proporção Cl⁻:AM de 8:1). Foi escolhido 300 µL de digerido para os estudos posteriores por proporcionar sinal de referência próximo de 1,0 sem suprimir totalmente o sinal referente ao analito.

Na avaliação do efeito da concentração do AM sobre o sinal analítico (Figura 4.3), a concentração de cloreto foi diminuída para 25 mg L^{-1} ($700 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) para evitar a supressão total do sinal na presença do analito. Com a inserção de AM 32 e $65 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, o analito estava em excesso superior a 6 vezes em relação ao reagente, causando supressão máxima do sinal. Com $80 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (25 mg L^{-1}) de AM, a razão $\text{Cl}^-:\text{AM}$ é próxima de 6:1, com pequeno excesso do corante. Acima deste valor, o excesso de AM chegou a duas vezes, causando a tendência à diminuição do sinal analítico. O ganho de 30% com $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de AM não era esperado, entretanto o sinal de referência sofreu um desvio da linearidade com o aumento da concentração do corante. Para manter os sinais de referência próximos a 1,0 e evitar a utilização de concentrações maiores de corante, foi escolhida $80 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de AM para os estudos posteriores.

Figura 4.3. Efeito da concentração de alaranjado de metila sobre o sinal de referência (-○-) e de $25 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}^-$ (-■-), empregando 3 ciclos de amostragem, alaranjado de metila em HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; reator de 100 cm e H_2O como transportador.

Os reagentes R_1 e R_2 (Figura 4.1) foram preparados em HNO_3 . O meio ácido torna o $K_2S_2O_8$ um oxidante mais eficiente¹¹ além de garantir que a maioria das espécies do corante esteja na forma protonada ($\lambda_{MAX} = 500$ nm). O efeito das concentrações de HNO_3 sobre o sinal analítico está apresentado na Figura 4.4. Com concentrações maiores que $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em R_2 , não houve variação significativa do sinal analítico, pois a acidez sofreu maior influência do ácido em R_1 . Isto foi evidenciado pela menor resposta do sinal de referência na ausência de ácido em R_1 em relação à obtida sem HNO_3 em R_2 . A maior acidez da solução de persulfato favoreceu o processo de oxidação do analito, pois na ausência de HNO_3 em R_1 , o sinal referente ao cloreto foi *ca.* 2 vezes maior que com HNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Portanto, foram selecionadas concentrações de HNO_3 de $0,25$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em R_1 e R_2 , respectivamente, visando maior sensibilidade e a geração de efluentes com menor acidez.

Figura 4.4. Efeito das concentrações de HNO_3 em R_1 (-□-) e R_2 (-○-) sobre o sinal de referência e em R_1 (-■-) e R_2 (-●-) sobre o sinal de $25 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}^-$, empregando 3 ciclos de amostragem para inserção da amostra e do digerido, alaranjado de metila $80 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; reator de 100 cm e H_2O como transportador.

O efeito do volume de amostra introduzido no fotorreator foi avaliado (Figura 4.5). Durante o estudo, o corante foi mantido em excesso em relação ao cloreto, sendo observada razão $\text{Cl}^-:\text{AM}$ máxima de 5:1. O sinal analítico aumentou significativamente com o volume de amostra até 50 μL por ciclo de amostragem (5 pulsos de P_1) devido à menor dispersão. Para volumes maiores, não foi observado aumento significativo do sinal porque a zona de amostra ultrapassou o volume do fotorreator, afetando a eficiência de oxidação de Cl^- a Cl_2 . Sendo assim, foram selecionados 50 μL de amostra por ciclo de amostragem para estudos posteriores. Nesta condição, o excesso do oxidante em relação ao analito foi estimado em 100 vezes, o que é coerente com o observado em outros procedimentos analíticos em fluxo com foto-oxidação em linha^{23,60}.

Figura 4.5. Efeito do volume de amostra sobre o sinal de referência ($\circ$) e de $15 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}^-$ ($\blacksquare$), empregando 3 ciclos de amostragem para inserção da amostra e do digerido, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 38 mmol L^{-1} em HNO_3 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, alaranjado de metila $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ em HNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; reator de 100 cm e H_2O como transportador.

Com respeito ao efeito da concentração do $K_2S_2O_8$ (Figura 4.6), conforme esperado, não houve supressão do sinal na ausência do oxidante porque o Cl^- não foi convertido a Cl_2 somente com irradiação. O aumento da concentração a partir de 38 mmol L^{-1} não causou variação significativa do sinal analítico, sendo um indicativo de conversão quantitativa do cloreto e de que ocorreram as reações apresentadas nas equações 29 – 30. Por outro lado, a concentração do persulfato pode ter alcançado um excesso que não afeta a eficiência de conversão, pois o aumento da concentração pode favorecer a ocorrência de reações de recombinação. O sinal de referência apresentou tendência a diminuir porque o corante é suscetível à oxidação na presença do persulfato, como foi observado nos estudos preliminares (Tabela 4.2). Apesar de apresentar resultados satisfatórios com 38 mmol L^{-1} , foi selecionada a concentração de 75 mmol L^{-1} de $K_2S_2O_8$, visando minimizar perdas de eficiência de conversão devido à matéria orgânica nas amostras.

Figura 4.6. Efeito da concentração de $K_2S_2O_8$ sobre o sinal de referência ($\circ$) e de $15 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}^{-}$ ($\blacksquare$), empregando 3 ciclos de amostragem para inserção da amostra e do digerido, $K_2S_2O_8$ em $HNO_3 \text{ } 0,25 \text{ mol L}^{-1}$, alaranjado de metila $80 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em $HNO_3 \text{ } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; reator de 100 cm e H_2O como transportador.

O efeito do tempo de parada de fluxo sobre a foto-oxidação está apresentado na Figura 4.7. Com o aumento até 15 s, o sinal analítico aumentou até 15 vezes, não sendo observadas diferenças significativas para tempos maiores, também sendo um indicativo de conversão quantitativa do analito. Além disto, parada de fluxo maior que 30 s gerou bolhas devido ao aumento de temperatura da zona de amostra.

Figura 4.7. Efeito do tempo de parada de fluxo sobre o sinal de referência (-○-) e de 15 mg L⁻¹ Cl⁻ (-■-), empregando 3 ciclos de amostragem para inserção da amostra e do digerido, K₂S₂O₈ 75 mmol L⁻¹ em HNO₃ 0,25 mol L⁻¹, alaranjado de metila 80 μmol L⁻¹ em HNO₃ 0,1 mol L⁻¹; reator de 100 cm e H₂O como transportador.

Embora alguns estudos evidenciem a conversão quantitativa do analito, principalmente quanto aos efeitos do tempo de parada de fluxo, a conversão incompleta dos íons cloreto também pode ter ocorrido. Não foi possível afirmar se, após a foto-oxidação do analito, foram gerados radicais cloro, que atuariam na descoloração do corante, pois o tempo de meia vida de radicais é geralmente muito curto. Além disto, ambos os processos podem ter ocorrido caso o tempo de meia vida dos radicais permitisse que a reação com o corante se desenvolvesse. A

estimativa da eficiência de conversão, diferentemente dos procedimentos anteriores, não é trivial. Uma curva analítica construída a partir de soluções de hipoclorito poderia trazer informações pouco confiáveis, pois diferentes processos estariam envolvidos, como a geração de radicais cloro que reagiriam com a água para formar radicais hidroxila e íons cloreto (equações 29 e 31), afetando a concentração de Cl_2 para posterior reação com AM. Medidas na ausência de radiação UV também não seriam comparáveis devido à diferença de temperatura e ausência de radicais (*e.g.* $\text{SO}_4^{\bullet-}$, $\text{OH}^{\bullet}$ e $\text{Cl}^{\bullet}$) no meio.

Na Tabela 4.3, estão apresentados os parâmetros otimizados, bem como as faixas avaliadas e os valores selecionados.

Tabela 4.3 – Faixas avaliadas e valores otimizados dos parâmetros do sistema de análises em fluxo para a determinação de cloreto.

<i>Parâmetro</i>	<i>Faixa avaliada</i>	<i>Valor selecionado</i>
Volume de amostra (μL) ^a	10 – 60	50
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (mmol L^{-1})	0 – 150	75
Alaranjado de metila ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	32 – 130	75
HNO_3 em R_1 (mol L^{-1})	0 – 1,0	0,25
HNO_3 em R_2 (mol L^{-1})	0 – 0,6	0,1
Volume do digerido (μL) ^a	125 – 360	240
Tempo de digestão (s)	0 – 30	15

a) volume inserido em cada respectivo ciclo de amostragem

4.3.4 Avaliação das características analíticas

As características analíticas foram avaliadas após a otimização do procedimento, resultando em faixa de resposta linear entre 2,0 e 20 $\text{mg L}^{-1} \text{Cl}^-$ (Figura 4.8), descrita pela equação $S = 0,0479 C_{\text{Cl}} + 0,0175$, em que C_{Cl} é a concentração de cloreto em mg L^{-1} e S é o sinal analítico (subtração entre os sinais de referência e do analito). O coeficiente de variação

($n = 20$, $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}^-$) e a frequência de amostragem foram estimados em 1,6% e 75 determinações por hora, respectivamente.

Para a estimativa do limite de detecção, a concentração de cloreto foi diminuída até que não fosse observada variação significativa do sinal analítico em relação ao sinal de referência, com 95% de confiança, resultando em $0,7 \text{ mg L}^{-1}$. Por determinação, foram consumidos $3,0 \text{ mg}$ de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ e $4,5 \text{ }\mu\text{g}$ de AM, gerando $2,5 \text{ mL}$ de efluente. Neste procedimento, o consumo de metais tóxicos (*e.g.* Hg^{2+} e Ag^+) foi evitado e a comparação das principais características com as de outros procedimentos da literatura está apresentada na Tabela 4.4.

Figura 4.8. Sinais transientes e curva analítica para a determinação de cloreto, utilizando reator de 100 cm e 3 ciclos de amostragem para inserção de amostra e de digerido, 75 mmol L^{-1} de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ em HNO_3 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e $75 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de alaranjado de metila em HNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. H_2O foi utilizada como transportador.

Tabela 4.4 – Comparação das características analíticas de alguns procedimentos para a determinação de cloreto.

<i>Procedimento</i>	<i>Limite de detecção</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	<i>Faixa linear</i> (mg L^{-1})	<i>Consumo de reagente</i> (μg)	<i>Frequência de amostragem</i> (h^{-1})	<i>Referência</i>
Volumétrico	100000	—	7000 (Hg)	—	72 ^d , 91 ^e
	100000	—	50000 (Ag)	—	72 ^d
Cromatográfico (IC)	100	0,3 – 1,2	—	6	72 ^d
Espectrofotométrico em batelada	50	Até 40	450 (Hg)	—	91 ^d , 97 ^e
Espectrofotométrico enzimático	15000	1500 – 5000	—	—	108 ^d
Espectrofotométrico, SIA	3000	Até 50	200 (Hg)	37	99 ^d
Espectrofotométrico, FIA	650	2,0 – 18,0	700 (Hg)	45	72 ^d , 91 ^e
Espectrofotométrico, FIA com reagentes imobilizados	500	2,0 – 8,0	200 (Hg)	100	100 ^d
	200	0,5 – 100,0	0,10 (Ag)	80	107 ^d
Espectrofotométrico, MSFIA ^a	200	1,0 – 40,0	80 (Hg)	130	103 ^d
Espectrofotométrico com cela de longo caminho óptico, MSFIA	60	0,2 – 2,0	200 (Hg)	21	104 ^d
Espectrofotométrico, MCFIA ^b	400	1,0 – 10,0	110 (Hg)	50	102 ^d
Espectrofotométrico, multicomutação ^c e foto-oxidação em linha	700	2,0 – 20,0	7,5 (AM)	75	Este trabalho ^{d,e}

Sistemas em fluxo com (a) multisseringas, (b) válvulas e (c) microbombas solenoide; análise de amostras ambientais (d) e biológicas (e).

Os procedimentos cromatográficos (IC e CE)⁹⁶ para a determinação de cloreto apresentaram limites de detecção ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) menores que o obtido com o procedimento proposto, também gerando efluentes com baixa toxicidade. Entretanto, a frequência de amostragem foi *ca.* 15 vezes menor e os custos de aquisição e manutenção são maiores. Além disto, foram exigidas etapas de pré-tratamento da amostra para remoção de matéria orgânica, visando aumentar o tempo de vida das colunas e dos capilares. A CE é mais suscetível à interferência de íons brometo, que apresentam tempo de migração próximo ao do cloreto. As determinações por IC podem apresentar interferências de alguns íons derivados de ácidos orgânicos (*e.g.* formiato). Estes compostos não apresentaram interferência significativa no procedimento proposto.

Em comparação com procedimentos volumétricos^{43,72,91}, o procedimento proposto apresentou as vantagens inerentes à mecanização, como o desenvolvimento de reações em sistemas fechados. Apesar da determinação de cloreto com alta precisão e exatidão, os procedimentos volumétricos apresentaram limites de quantificação mais altos (100 mg L^{-1}), limitando a aplicação para a análise de águas naturais. Além disto, são suscetíveis à interferência de outros haletos e a titulação com Ag^+ ainda apresenta interferência de íons PO_4^{3-} e Fe^{3+} em concentrações superiores a 25 e 10 mg L^{-1} , respectivamente. O procedimento proposto não requer reagentes com alta toxicidade, como o $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ e K_2CrO_4 , atendendo aos requisitos da Química Verde⁹⁵.

Apesar de requerer instrumentação mais simples e apresentar sensibilidade adequada para a determinação de cloreto nas amostras avaliadas, os procedimentos potenciométricos^{72,91} são os mais suscetíveis a interferências, especialmente devido a outros haletos. As etapas de limpeza do eletrodo e eliminação de matéria orgânica também são desvantagens inerentes destes procedimentos, que são evitadas no procedimento proposto.

Em comparação ao procedimento em batelada⁹⁷ baseado no sistema $\text{Hg}(\text{SCN})_2 / \text{Fe}^{3+}$, o procedimento proposto não empregou Hg^{2+} e o volume de efluentes foi diminuído em 8 vezes. O procedimento em fluxo com adição contínua de reagentes baseado no mesmo método, recomendado pelo SMEW⁷², apresentou comparáveis faixa de resposta linear, limite de detecção e volume de efluentes gerado em relação ao procedimento desenvolvido. Entretanto, foram consumidos 700 μg de Hg^{2+} por determinação, a frequência de amostragem foi 3 vezes menor e foram observadas perturbações por efeito Schlieren devido ao preparo do reagente em etanol.

Em comparação com o procedimento proposto, o limite de detecção obtido com sistema SIA ($3,0 \text{ mg L}^{-1}$) foi 4 vezes maior, o que limitou a aplicação em águas de rios. Além disto, não foi avaliado o efeito de matéria orgânica, que poderia causar interferências no procedimento (*e.g.* complexação de íons Fe^{3+} com ácidos húmicos e fúlvicos).

Os procedimentos empregando $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ imobilizado apresentaram limites de detecção e faixas de resposta linear comparáveis com o procedimento desenvolvido. Entretanto, os efluentes gerados pelo procedimento proposto são suscetíveis a tratamentos menos morosos e laboriosos, como a mineralização por processos foto-oxidativos, diferentemente dos resíduos contendo Hg.

Em relação ao procedimento em batelada⁹⁷, sistemas FIA com gerenciamento de soluções através de membranas¹⁰¹, MCFIA¹⁰² e MSFIA¹⁰³ proporcionaram a minimização do consumo de Hg em *ca.* 2, 4 e 10 vezes, respectivamente. Com o uso do MSFIA e cela de longo caminho óptico¹⁰⁴, o consumo foi reduzido pela metade. Entretanto, estes procedimentos ainda exigem o uso de Hg. Além disto, a aplicação não foi direcionada para análises clínicas em que a minimização da geração de efluentes com alta toxicidade também é de extrema importância.

O sistema SIA baseado na formação do AgCl e detecção turbidimétrica para a determinação de cloreto¹⁰⁵ consumiu 130 μg de Ag^+ por determinação, gerando volumes comparáveis de efluentes em relação ao procedimento proposto. Apesar da faixa linear adequada (2,0 a 400 mg L^{-1}), foi necessária a constante limpeza do percurso analítico e cela de fluxo para evitar deriva da linha base e intercontaminação das amostras devido à deposição de sólidos, que ocorre com o uso do fluxo laminar.

No sistema FIA com recirculação de reagente e detecção turbidimétrica de AgCl em meio amoniacal¹⁰⁶ foram consumidas grandes quantidades de íons Ag^+ (4,0 mg por determinação). Em relação ao procedimento proposto, apresentou maior limite de detecção (1,0 mg L^{-1}) e gerou volume de efluentes 3 vezes maior.

O procedimento com imobilização de $\text{Ag}_2(\text{C}_6\text{O}_4\text{Cl}_2)$ ¹⁰⁷ apresentou limite de detecção *ca.* 2 vezes menor que o procedimento proposto, devido ao emprego da cela de longo caminho óptico. O consumo de Ag^+ foi estimado em 110 ng, apresentando o menor consumo de íons metálicos para a determinação de cloreto. Entretanto, o resíduo ainda exigiu reciclagem, não sendo possível sua decomposição por processos foto-oxidativos, por exemplo.

O procedimento enzimático para a determinação de cloreto¹⁰⁸ apresentou limite de detecção 600 vezes maior (13 mmol L^{-1} ou 460 $\text{mg L}^{-1} \text{Cl}^-$) que o procedimento proposto, apresentando faixa de resposta linear entre 40 e 160 mmol L^{-1} , o que limitou a aplicação à análise de águas naturais. Além disto, enzimas exigem condições rigorosas de pH e temperatura para estocagem e utilização, tornando o procedimento suscetível a erros sistemáticos em caso de variações destes parâmetros. Previamente às medidas, foi necessário aguardar, no mínimo, 7 minutos para o desenvolvimento da reação, que corresponde a um tempo *ca.* 10 vezes maior que o necessário para a foto-oxidação no procedimento proposto. O tempo de espera para que ocorra a reação enzimática ainda deve ser rigorosamente avaliado,

uma vez que estudos na literatura indicaram que a resposta não foi estável acima de sete minutos¹⁰⁸.

O AM foi empregado anteriormente para a determinação de cloro livre em águas marinhas¹¹² e residuais¹¹³, em que o consumo foi 2 e 15 vezes maior que no procedimento proposto, respectivamente.

4.3.5 Efeito de espécies potencialmente interferentes

O efeito da presença de espécies concomitantes foi avaliado empregando uma solução de cloreto 5,0 mg L⁻¹ e concomitantes em concentração pelo menos cinco vezes maior que o máximo esperado em relação ao analito em amostras de urina e ao máximo estabelecido em águas naturais pelo CONAMA⁷⁰. Os sinais referentes à concentração de cloreto 5,0 mg L⁻¹ foram obtidos na ausência de concomitantes e na presença de ureia, creatinina, ácido úrico e glicose, que são os compostos orgânicos em maior concentração na urina que poderiam interferir na foto-oxidação do cloreto. Os sinais foram também obtidos na presença de NO₂⁻, Fe²⁺, Fe³⁺, Br⁻, ClO⁻ e ácidos húmicos, que são usualmente encontrados em águas naturais e podem consumir radicais oxidantes ou causar a oxidação do AM. O ácido acético foi avaliado como modelo de ácido carboxílico. A Tabela 4.5 apresenta a variação do sinal analítico na presença de cada uma destas espécies, que não causaram interferência significativa na determinação de cloreto (variação ≤ 5%). O excesso de oxidante permitiu que a eficiência de conversão do cloreto não fosse afetada por outros compostos orgânicos que poderiam consumir os radicais de maneira competitiva.

Tabela 4.5 – Efeito de espécies concomitantes sobre o sinal analítico de cloreto.

<i>Espécie</i> <i>Concomitante</i>	<i>Concentração máxima</i> <i>avaliada (mg L⁻¹)^a</i>	<i>Variação do</i> <i>sinal (%)</i>
Ureia	250	-4,0
Creatinina	5,0	1,4
Glicose	0,1	-3,7
Ácido úrico	0,5	-3,1
Ca ²⁺	2,5	0,3
Ácido acético	1,5	-1,1
NO ₂ ⁻	5,0	-4,8
Fe ²⁺	25	-2,7
Fe ³⁺	25	-0,2
ClO ⁻	1,5	4,5
Br ⁻	15	3,6
Ácidos húmicos	4,0 ^b	-2,1

a) As concentrações avaliadas foram baseadas em, no mínimo, cinco vezes o excesso do concomitante normalmente encontrado na urina para soluções contendo 5,0 mg L⁻¹ Cl⁻;

b) concentração baseada na porcentagem (m/m) de carbono.

As espécies com maior potencial interferente na determinação de cloreto pelo procedimento proposto são os íons Br⁻ e ClO⁻, que não causaram variação significativa do sinal analítico em concentrações cinco e cem vezes maiores que as permitidas em águas naturais⁷⁰, respectivamente.

4.3.6 Análise das amostras e comparação com procedimento de referência

Para avaliar a exatidão do procedimento desenvolvido, foram analisadas seis amostras de urina, cinco de águas de rios e uma de água para abastecimento. Previamente às análises, as amostras de urina foram diluídas 200 vezes para situar a concentração de cloreto na faixa de resposta linear. As amostras de águas naturais foram filtradas em papel de filtro 0,45 µm para remoção de material particulado que poderia interferir na foto-oxidação e nas medidas

espectrofotométricas devido ao espalhamento de radiação. Na Tabela 4.6, estão apresentados os resultados da determinação de cloreto pelos procedimentos proposto e de referência, não sendo observadas diferenças significativas com nível de confiança de 95%.

Tabela 4.6 – Valores médios e incertezas (n=3) na determinação de cloreto em urina e águas de rios pelos procedimentos proposto e de referência^{72,91}.

<i>Amostra</i>	<i>Cloreto (mg L⁻¹)</i>			
	<i>Urina</i>		<i>Águas</i>	
	<i>Procedimento proposto</i>	<i>Procedimento de referência</i>	<i>Procedimento proposto</i>	<i>Procedimento de referência</i>
1	356 ± 10	308 ± 33	14 ± 1	13 ± 1
2	642 ± 12	648 ± 22	2,0 ± 0,8	2,0 ± 0,1
3	1470 ± 15	1478 ± 16	2,1 ± 0,9	2,3 ± 0,1
4	1992 ± 12	1970 ± 17	3,4 ± 0,9	3,5 ± 0,1
5	1176 ± 11	1186 ± 20	< 2,0	0,8 ± 0,1
6	1204 ± 9	1190 ± 23	2,9 ± 0,7	3,0 ± 0,2

Assim como o procedimento recomendado por manuais de análises clínicas e ambientais, o procedimento proposto apresentou seletividade para a determinação de cloreto, com limite de detecção comparável. Entretanto, no procedimento de referência são gerados efluentes com alta toxicidade devido ao emprego de Hg(SCN)₂. Além disto, a utilização de etanol no preparo do reagente acarreta em perturbações por efeito Schlieren, exigindo o emprego de longos reatores, o que diminuiu a frequência de amostragem.

4.4 Conclusões

A foto-oxidação do analito a Cl₂ foi explorada pela primeira vez para o desenvolvimento de um procedimento limpo para a determinação de cloreto. O sistema de análises em fluxo foi construído com microbombas solenoide para melhorar as condições de

mistura, minimizar o consumo de reagentes e facilitar a implementação de intervalos de parada de fluxo para aumentar o tempo de residência.

O fotorreator utilizado apresentou configuração simples, dispensando a utilização de unidades dissipadoras de calor e desborbulhadores devido ao mínimo tempo de residência da amostra para a fotoconversão do cloreto. Embora alguns resultados indiquem conversão quantitativa do analito, isto não seria necessário devido à alta reprodutibilidade das condições de reação e de tempo inerentes aos sistemas de análises em fluxo. Adicionalmente, esta estratégia seria mais difícil de ser aplicada em batelada devido aos riscos de perda do Cl_2 com o aquecimento causado pela irradiação.

Em comparação com outros procedimentos propostos, este procedimento consumiu mínimas quantidades de reagentes com menor toxicidade, além de gerar efluentes suscetíveis à mineralização, evitando a necessidade de processos de reciclagem. As espécies normalmente encontradas em urina e águas naturais não causaram interferência significativa na determinação de cloreto. Portanto, o procedimento proposto é uma alternativa ambientalmente amigável e de baixo custo para a determinação de cloreto em urina e águas naturais.

CONCLUSÕES GERAIS

A utilização de microbombas solenoide para o gerenciamento de soluções tornou os sistemas mais versáteis para o preparo de amostras em linha, sendo possível implementar diferentes tempos de parada de fluxo visando ao aumento do tempo de residência para a foto-oxidação. O fluxo pulsado proporcionado por estes dispositivos permitiu que fossem empregados fotorreatores curtos, como no fracionamento de fósforo em extratos de alimentos, diminuindo o tempo de preparo e aumentando a frequência de amostragem.

Diferentemente de outros procedimentos com foto-oxidação em linha, nos procedimentos propostos foram empregados fotorreatores mais simples, dispensando o uso de unidades dissipadoras de calor, uma vez que os tempos de residência não ultrapassaram 30 s para as fotoconversões. Além disto, não foi necessário o uso de desborbulhadores, uma vez que bolhas de gás não se formaram devido ao aquecimento brando da zona de amostra.

A foto-oxidação em sistema fechado trouxe vantagens como a minimização do tempo das análises e do risco de perdas do analito, principalmente no caso da determinação de cloreto, em que o Cl_2 poderia ser volatilizado caso o procedimento fosse desenvolvido em um sistema aberto. Procedimentos para a determinação de cloreto que não utilizam íons metálicos tóxicos são escassos e o presente trabalho demonstrou as potencialidades da foto-oxidação no desenvolvimento de procedimentos analíticos limpos.

Os tempos de conversão das espécies por foto-oxidação foram drasticamente reduzidos em comparação com a maioria dos procedimentos oficiais e alternativos. Em relação ao fracionamento de fósforo em extratos de derivados de cereais e leguminosas, o preparo de amostra foi drasticamente reduzido, em relação ao procedimento mais utilizado, baseado na digestão nitro-perclórica. Este processo é bastante demorado e suscetível a contaminações. Além disto, os riscos à segurança do analista foram minimizados.

Uma estratégia proposta pela primeira vez foi a utilização da foto-oxidação em linha acoplada à espectrofotometria de longo caminho óptico. O aumento de sensibilidade foi

necessário para a determinação de fósforo em águas naturais e, devido às menores quantidades de espécies orgânicas a serem convertidas, foi possível se obter conversão quantitativa das espécies em curtos intervalos de tempo.

Os procedimentos analíticos propostos com foto-oxidação em linha são alternativas rápidas para a determinação de espécies de interesse alimentício, ambiental e clínico, apresentando vantagens em relação a procedimentos de referência e aos alternativos propostos na literatura. O tempo para digestão foi curto, contribuindo para o aumento da frequência de amostragem. Além disto, o consumo de reagentes foi minimizado e resíduos com menor toxicidade foram gerados, além de serem suscetíveis a tratamentos menos morosos (*e.g.* foto-oxidação), dispensando a necessidade de reciclagem. Em todos os casos, foi possível atingir limites de detecção adequados para a quantificação das espécies de acordo com as concentrações normalmente encontradas nas amostras e com os limites estabelecidos por agências reguladoras.

REFERÊNCIAS

- 1) KRUG, F. J. editor. **Métodos de preparo de amostras**. 1ª ed. Piracicaba, 2008. 340 p.
- 2) CAVICCHIOLI, A.; GUTZ, I. G. R. O uso da radiação ultravioleta para o pré-tratamento de amostras em análise inorgânica. **Química Nova**, v. 26, p. 913-921, 2003.
- 3) OLIVEIRA, E. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 174-182, 2003.
- 4) SMITH, F. E.; ARSENAULT, E. A. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. **Talanta**, v. 43, p. 1207-1268, 1996.
- 5) KEMP, A. J.; BROWN, C. J. Microwave digestion of carbonate rock samples for chemical analysis. **Analyst**, v. 115, p. 1197-1199, 1990.
- 6) ARRUDA, M. A.; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por micro-ondas: o estado da arte. **Química Nova**, v. 20, p. 638-643, 1997.
- 7) ARAÚJO, G. C. L.; GONZALEZ, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant material. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, p. 2121-2132, 2002.
- 8) GOLIMOWSKI, J.; GOLIMOWSKA, K. UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 325, p. 111-133, 1996.
- 9) BENDICHO, C.; PENA, F.; COSTAS, M.; GIL, S.; LAVILLA, I. Photochemistry-based sample treatments as greener approaches for trace-element analysis and speciation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 681-691, 2010.
- 10) BEATTIE, J.; BRICKER, C.; GARVIN, D. Photolytic determination of trace amounts of organic material in water. **Analytical Chemistry**, v. 33, p. 1890-1892, 1961.

- 11) KOLTHOFF, I. M.; MILLER, I. K. The chemistry of persulfate. I. The kinetics and mechanism of the decomposition of persulfate ion in aqueous medium. **Journal of the American Chemical Society**, v. 73, p. 3055-3059, 1951.
- 12) SÁNCHEZ-PEDREÑO, C.; SIERRA, M. T.; SIERRA, M. I.; SANZ, A. Catalytic effect of mercury(II) on the photo-oxidation of EDTA by iodine: kinetic determination of mercury. **Analyst**, v. 113, p. 145-148, 1988.
- 13) ZIOLLI, R. L.; JARDIM, W. F. Mecanismo de fotodegradação de compostos orgânicos catalisada por TiO₂. **Química Nova**, v. 21, p. 319-325, 1998.
- 14) STARTOC, <http://www.tocsystemsinc.com/frames.htm>, acessado em 14 mar. 2013.
- 15) KARLBERG, B.; PACEY, G. E. **Flow injection analysis. A practical guide**. 1^a ed. Amsterdã: Elsevier, 1989. 372 p.
- 16) HANSEN, E. H.; MIRÓ, M. How flow-injection analysis (FIA) over the past 25 years has changed our way of performing chemical analyses. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 18-26, 2007.
- 17) REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; KRONKA, E. A. M. A análise química por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 12, p. 82-91, 1989.
- 18) ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S.; SANTOS, J. L. M. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 468, p. 119-131, 2002.
- 19) LIMA, J. L. F. C.; SANTOS, J. L. M.; DIAS, A. C. B.; RIBEIRO, M. F. T.; ZAGATTO, E. A. G. Multi-pumping flow systems: an automation tool. **Talanta**, v. 64, p. 1091-1098, 2004.

- 20) REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 293, p. 129-138, 1994.
- 21) DIAS, A. C. B.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C.; QUINTELLA, M. C.; LIMA, A. M. V.; ZAGATTO, E. A. G. A critical comparison of analytical flow systems exploiting streamlined and pulsed flows. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, p. 1303-1310, 2007.
- 22) ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, J. A. Efeito Schlieren em sistemas de análise por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 19, p. 636-640, 1996.
- 23) PONS, C.; TÓTH, I. V.; RANGEL, A. O. S. S.; FORTEZA, R.; CERDÁ, V. Multi-pumping flow system for the determination of dissolved phosphate and dissolved organic phosphorus in wastewater samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 572, p. 148-154, 2006.
- 24) ESTELA, J. M.; CERDÁ, V. Flow analysis techniques for phosphorus: an overview. **Talanta**, v. 66, p. 307-331, 2005.
- 25) LEOPOLD, K.; ZIERHUT, A.; HUBER, J. Ultra-trace determination of mercury in river waters after online UV digestion of humic matter. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, p. 2419-2428, 2012.
- 26) CHAPARRO, L. L.; FERRER, L.; CERDÁ, V.; LEAL, L. O. Automated system for on-line determination of dimethylarsinic and inorganic arsenic by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p. 1589-1595, 2012.
- 27) BARRA, C. M.; SANTELLI, R. E.; ABRÃO, J. J.; DE LA GUARDIA, M. Especificação de arsênio: uma revisão. **Química Nova**, v. 23, p. 58-70, 2000.

- 28) RUÍZ, T. P.; LOZANO, C. M. A sensitive post-column photochemical derivatization/fluorimetric detection system for HPLC determination of bisphosphonates. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 1312-1318, 2009.
- 29) RUÍZ, T. P.; LOZANO, C. M.; TOMÁZ, V. High performance liquid chromatographic assay of phosphate and organophosphorus pesticides using post-column photochemical reaction and fluorimetric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 540, p. 383-391, 2005.
- 30) CAVICCHIOLI, A.; GUTZ, I. G. R. In-line TiO₂-assisted photodigestion of organic matter in aqueous solution for voltametric flow analysis of heavy metals in water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 445, p. 127-138, 2001.
- 31) DANIEL, D.; GUTZ, I. G. R. Microfluidic cell with a TiO₂-modified gold electrode irradiated by an UV-LED for *in situ* photocatalytic decomposition of organic matter and its potentiality for voltammetric analysis of metal ions. **Electrochemistry Communications**, v. 9, p. 522-528, 2007.
- 32) RUIZ, T. P.; LOZANO, C. M.; TOMÁS, V.; MARTÍN, J. Flow injection chemiluminescence determination of carbaryl using photolytic decomposition and photogenerated tris(2,2'-pyridyl)ruthenium(III). **Analytica Chimica Acta**, v. 476, p. 141-148, 2003.
- 33) WASEEM, A.; YAQOOB, M.; NABI, A. Photodegradation and flow-injection determination of dithiocarbamate fungicides in natural water with chemiluminescence detection. **Analytical Sciences**, v. 25, p. 395-400, 2009.
- 34) FERNÁNDEZ, J. M. C.; PEREIRO, R.; MEDEL, A. S. The use of luminescent quantum dots for optical sensing. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 207-218, 2006.
- 35) RIBEIRO, D. S. M.; FRIGERIO, C.; SANTOS, J. L. M.; PRIOR, J. A. V. Photoactivation by visible light by CdTe quantum dots for inline generation of reactive oxygen species in an automated multipumping flow system. **Analytica Chimica Acta**, v. 735, p. 69-75, 2012.

- 36) ARNESON, W.; BRICKELL, J. editors. **Clinical Chemistry: a Laboratory Perspective**. 1^a ed. Filadélfia: F. A. Davis Co., 2007. 582p.
- 37) SCHACHTMAN, D. P.; REID, R. J.; AYLING, S. M. Phosphorus uptake by plants. **Plant Physiology**, v. 116, p. 447-453, 1998.
- 38) TURNER, B. L.; FROSSARD, E.; BALDWIN, D. S., editores. **Organic Phosphorus in the Environment**. 1^a ed. Wallingford: CABI Pub, 2005. 399 p.
- 39) KALRA, Y. P. editor; **Handbook of reference methods for plant analysis**. 1^a ed. Boca Raton, 1998. 287 p.
- 40) MARUCHI, A. K.; ROCHA, F. R. P. An improved procedure for phosphorus fractionation in plant materials exploiting sample preparation and monosegmented flow analysis. **Microchemical Journal**, v. 82, p. 207-213, 2006.
- 41) REDDY, N. R.; SATHE, S. K. editores. **Food phytates**. 1^a ed. Boca Raton, 2001. 280 p.
- 42) GIBNEY, M. J.; NEW, S. A. L.; CASSIDY, A.; VORSTER, H. H. editores. **Introduction to human nutrition**. 2^a ed. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell, 2009. 371 p.
- 43) HORWITZ, W.; LATIMER, G. W., editores. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18^a ed. Gaithersburg: AOAC International, 2000.
- 44) MOHAMED, A. I.; PERERA, P. A. J.; HAFEZ, Y. S. New chromophore for phytic acid determination. **American Association of Cereal Chemists**, v. 63, p. 475-478, 1986.
- 45) CARNEIRO, J. M. T.; ZAGATTO, E. A. G.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C. Spectrophotometric determination of phytic acid in plant extracts using a multi-pumping flow system. **Analytica Chimica Acta**, v. 474, p. 161-166, 2002.
- 46) SARTINI, R. P.; OLIVEIRA, C. C. A new strategy for exploiting ion exchange in sequential injection analysis: in-line phytic acid separation/determination in foods as an example. **Analytical Sciences**, v. 18, p. 675-679, 2002.

- 47) MARCH, J. G.; SIMONET, B. M.; GRASES, F. Kinetic-turbidimetric determination of phytic acid by sequential injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 409, p. 9-16, 2000.
- 48) VOGEL, A. I.; GIMENO, A. (trad). **Química Analítica Qualitativa**. 5ªed. São Paulo: Mestre Jou, 1981. 665p.
- 49) DOST, K.; TOKUL, O. Determination of phytic acid in wheat and wheat products by reverse phase high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 558, p. 22-27, 2006.
- 50) GRAF, E.; DINTZIS, F. R. Determination of phytic acid in foods by high performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, p. 1094-1097, 1982.
- 51) ELLINGSON, D.; PRITCHARD, T.; FOY, P.; KING, K.; MITCHELL, B.; AUSTAD, J.; WINTERS, D.; SULLIVAN, D. Analysis of free and total myo-inositol in foods, feeds and infant formula by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection, including a novel total extraction using microwave-assisted acid hydrolysis and enzymatic treatment. **Journal of AOAC International**, v. 95, p. 1469-1478, 2012.
- 52) HOGUE, E.; WILCOX, G. E.; CANTILIFFE, D. J. Effect of soil phosphorus levels on phosphate fractions in tomato leaves. **Journal of the American Society of Horticultural Sciences**, v. 95, p. 174-176, 1970.
- 53) VIEIRA, E. C., NOGUEIRA, A. R. A. Orthophosphate, phytate and total phosphorus determination in cereals by flow injection analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1800-1803, 2004.
- 54) KAMAYA, M.; FURUKI, T.; NAGAGSHIMA, K. Flow injection analysis of phytic acid by a modified molybdenum blue method. **Phytochemical Analysis**, v. 9, p. 119-123, 1998.

- 55) ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, J. A. Flow injection analysis in the undergraduate laboratory. **The Chemical Educator**, v. 4, p. 179-182, 1999.
- 56) PARRA, A.; RAMOS, M.; ALONSO, J.; LEMOS, S. G.; VIEIRA, E. C.; NOGUEIRA, A. R. A. Flow injection potentiometric system for the simultaneous determination of inositol phosphates and phosphate: phosphorus nutritional evaluation on seeds and grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7644-7648, 2005.
- 57) WORSFOLD, P. J.; GIMBERT, L. J.; MANKASINGH, U.; OMAKA, O. N.; HANHARAN, G.; GARDOLINSK, P. C. F. C.; HAYGARTH, P. M.; TURNER, B. J.; ROACH, M. J. K.; MCKELVIE, I. D. Sampling, sample treatment and quality assurance issues for the determination of phosphorus species in natural waters and soils. **Talanta**, v. 66, p. 273-293, 2005.
- 58) KOSHIISHI, I.; IMANARI, T. Study of the coloured substances in molybdenum blue using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 358, p. 195-200, 1986.
- 59) CROUCH, S. R.; MALMSTADT, H. V. A mechanistic investigation of molybdenum blue method for determination of phosphate. **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 1084-1089, 1967.
- 60) RUIZ, T. M.; LOZANO, C. M.; TOMÁS, V.; MARTÍN, J. Flow-injection spectrofluorimetric determination of dissolved inorganic and organic phosphorus in waters using on-line photo-oxidation. **Analytica Chimica Acta**, v. 442, p. 147-153, 2001.
- 61) TUR'YAN, Y. I.; KOHEN, R. Formal redox potentials of the dehydro-L-ascorbic acid / L-ascorbic acid system. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 380, p. 273-277, 1995.
- 62) PEAT, D. M. W.; MCKELVIE, I. D.; MATTHEWS, G. P.; HAYGARTH, P. M.; WORSFOLD, P. J. Rapid determination of dissolved organic phosphorus in soil leachates and runoff waters by flow injection analysis with on-line photo-oxidation. **Talanta**, v. 45, p. 47-55, 1997.

- 63) LEHRFELD, J.; MORRIS, E. R. Overestimation of phytic acid in foods by the AOAC anion-exchange method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2208-2210, 1992.
- 64) MARCH, J. G.; SIMONET, B. M.; GRASES, F.; SALVADOR, A. Indirect determination of phytic acid in urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 367, p. 63-68, 1998.
- 65) CHEN, Y.; CHEN, J.; MA, K.; CAO, S.; CHEN, X. Fluorimetric determination of phytic acid in urine based on replacement reaction. **Analytica Chimica Acta**, v. 605, p. 185-191, 2007.
- 66) MAHER, W.; WOO, L. Procedures for the storage and digestion of natural waters for the determination of filterable reactive phosphorus, total filterable phosphorus and total phosphorus. **Analytica Chimica Acta**, v. 375, p. 5-47, 1998.
- 67) PEREIRA, J. C. B. **Estudos físico-químicos do polifosfato de sódio visando sua aplicação em formulações para nutrição parenteral**. 2007, 100p. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências e Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.
- 68) GUALBERTO, F. F. **Otimização de processo de precipitação química na remoção de fósforo de esgotos sanitários mediante a utilização de sais de ferro como coagulante**. 2009, 143p. Dissertação (mestrado em Engenharia Hidráulica e Sanitária). Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- 69) SMITH, V. H. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems. A global problem. **Environmental Sciences and Pollution Research**, v. 10, p. 126-139, 2003.
- 70) CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente, resolução nº 357, disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>, acessado em 21 mar. 2013.
- 71) US-EPA, United States Environmental Protection Agency, disponível em <http://water.epa.gov/type/rsl/monitoring/vms56.cfm>, acessado em 21 mar. 2013.

- 72) CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. editores. **Standard Methods for the Examination of Waters and Wastewaters**. 21^a ed. American Public Health Association, Washington: 2005.
- 73) GIMBERT, L. J.; WORSFOLD, P. J. Environmental applications of liquid-waveguide-capillary cells coupled with spectroscopic detection. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 914-930, 2007.
- 74) ZHANG, J. Z.; CHI, A. J. Automated analysis of nanomolar concentrations of phosphate in natural waters with liquid waveguide. **Environmental Science and Technology**, v. 36, p. 1048-1053, 2002.
- 75) GIMBERT, L. J.; HAYGARTH, P. M.; WORSFOLD, P. J. Determination of nanomolar concentrations of phosphate in natural waters using flow injection with long pathlength liquid waveguide capillary cell and solid-state spectrophotometric detection. **Talanta**, v. 71, p. 1624-1628, 2007.
- 76) NEVES, M. S. A. C.; SOUTO, M. R. S.; TÓTH, I. V.; VICTAL, S. M. A.; DRUMOND, M. C.; RANGEL, A. O. S. S. Spectrophotometric flow system using vanadomolybdophosphate detection chemistry and a liquid waveguide capillary cell for the determination of phosphate with improved sensitivity in surface and ground water samples. **Talanta**, v. 77, p. 527-532, 2008.
- 77) McKELVIE, I. D.; HART, B. T.; CARDWELL, T. J.; CATTRAL, R. W. Use of immobilized 3-phytase and flow injection for the determination of phosphorus species in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 316, p. 277-289, 1995.
- 78) HINKAMP, S.; SCHWEDT, G. Determination of total phosphorus in waters with amperometric detection by coupling of flow-injection analysis with continuous microwave oven digestion. **Analytica Chimica Acta**, v. 236, p. 345-350, 1990.

- 79) WILLIAMS, K. E.; HASWELL, S. J.; BARCLAY, D. A.; PRESTON, G. Determination of total phosphate in waste waters by on-line microwave digestion incorporating colorimetric detection. **Analyst**, v. 118, p. 245-248, 1993.
- 80) BENSON, R. L.; McKELVIE, I. D.; HART, B. T.; HAMILTON, I. C. Determination of total phosphorus in waters and wastewaters by on-line microwave-induced digestion and flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 291, p. 233-242, 1994.
- 81) ALMEIDA, M. I. G. S.; SEGUNDO, M. A.; LIMA, J. L. F. C.; RANGEL, A. O. S. S. Multi-syringe flow injection system with in-line microwave digestion for the determination of phosphorus. **Talanta**, v. 64, p. 1283-1289, 2004.
- 82) McKELVIE, I. D.; HART, B. T.; CARDWELL, T. J.; CATTRALL, R. W. Spectrophotometric determination of dissolved organic phosphorus in natural waters using in-line photo-oxidation and flow injection. **Analyst**, v. 114, p. 1459-1463, 1989.
- 83) HIGUCHI, K.; TAMANOUCHI, H.; MOTOMIZU, S. 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. **Analytical Sciences**, v. 14, p. 941-946, 1998.
- 84) ZAIYOU, L.; LIMIN, W. Determination of total phosphorus in water by photochemical decomposition with ultraviolet irradiation. **Talanta**, v. 33, p. 98-100, 1986.
- 85) MELCHERT, W. R.; RAIMUNDO Jr., I. M.; REIS, B. F.; ROCHA, F. R. P. Construção de uma cela de fluxo de longo caminho óptico para medidas espectrofotométricas. **Química Nova**, v. 31, p. 427-429, 2008.
- 86) MARTELLI, P. B.; ROCHA, F. R. P.; GORGA, R. C. P.; REIS, B. F. A flow system for spectrophotometric multidetermination in water exploiting reagent injection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 642-646, 2002.

- 87) FERREIRA, J. R.; KRONKA, E. A. M.; JACINTHO, A. O. Determinação de silício em águas naturais pelo método do azul de molibdênio, através de sistema de análises por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 10, p. 270-273, 1987.
- 88) REEVE, R. N.; BARNES, J. D. **Environmental Analysis**. 1a ed. West Sussex: John Willey & Sons, 1994. 284p.
- 89) HARRIS, D. C. **Quantitative Chemical Analysis**. 6ª ed. Nova Iorque: W.H. Freeman, 2007. 876p.
- 90) JOHN, W. W. **Handbook of anion determination**. 1ªed., Londres: Butterworths, 1979. 630p.
- 91) HENRY, J. B. **Clinical diagnosis and management by laboratory methods**. 20th ed. Filadélfia: W. B. Saunders, 2001. 1512 p.
- 92) BEREND, K.; HULSTEIJN, L. H.; GANS, R. O. B. Chloride: the queen of electrolytes? **European Journal of Internal Medicine**, v. 23, p. 203-211, 2012.
- 93) BISHOP, M. L.; ENGELKIRK, J. L. D.; FODY, E. P. **Clinical Chemistry: principles, procedures and correlations**. 3ª ed. Filadélfia: Lippincott, 1996, 773p.
- 94) ABOUL-ENEIN, H. Y. **Separation techniques in clinical chemistry**. 10th ed. Nova Iorque: Marcel Decker, 2003. 522 p.
- 95) FARIA, L. A.; FÁVARO, D. I. T. Vinte anos de Química Verde: conquistas e desafios. **Química Nova**, v. 34, p. 1089-1093, 2011.
- 96) TABATABAI, M. A.; DICK, W. A. Simultaneous determination of nitrate, chloride, sulfate and phosphate in natural waters by ion chromatography. **Journal of Environmental Quality**, v. 12. p. 209-213. 1983.
- 97) ZALL, D. M.; FISHER, D.; GARNER, M. Q. Photometric determination of chloride in waters. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 1665-1668, 1956.

- 98) STADEN, J. F.; TLOWANA, S. I. Spectrophotometric determination of chloride in mineral and drinking waters using sequential injection analysis. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 371, p. 396-399, 2001.
- 99) ALMUAIBED, A. M.; TOWNSHEND, A. Flow-injection spectrophotometric determination of chloride with an on-line solid mercury(II) thiocyanate minicolumn and bromide with a silver thiocyanate minicolumn. **Analytica Chimica Acta**, v. 245, p. 115-119, 1991.
- 100) SILVA, C. R.; VIEIRA, H. J.; CANAES, L. S.; NÓBREGA, J. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection spectrophotometric method for chloride determination in natural waters using $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ immobilized in epoxy resin. **Talanta**, v. 65, p. 965-970, 2005.
- 101) CHALK, S. J.; TYSON, J. F. Determination of chloride by flow injection spectrophotometry with membrane reagent introduction. **Analytica Chimica Acta**, v. 366, p. 147-153, 1998.
- 102) ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B.; REIS, B. F. An improved flow system for spectrophotometric determination of anions exploiting multicommutation and multidetection. **Analytica Chimica Acta**, v. 438, p. 11-19, 2001.
- 103) MAYA, F.; ESTELA, J. M.; CERDÁ, V. Spectrophotometric determination of chloride in waters using a mutisyringe flow injection system. **Talanta**, v. 74, p. 1534-1538, 2008.
- 104) MAYA, F.; ESTELA, J. M.; CERDÁ, V. Multisyringe flow injection analysis hyphenated with liquid core waveguides for the development of cleaner spectroscopic analytical methods: improved determination of chloride in waters. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, p. 1577-1583, 2009.
- 105) MESQUITA, R. B. R.; FERNANDES, S. M. V.; RANGEL, A. O. S. S. Turbidimetric determination of chloride in different types of water using a single sequential injection analysis system. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 4, p. 458-461, 2002.

- 106) ZENKI, M.; IWADOU, Y. Repetitive determination of chloride using the circulation of the reagent solution in closed flow-through system. **Talanta**, v. 58, p. 1055-1061, 2002.
- 107) BONIFÁCIO, V. G.; FIGUEIREDO-FILHO, L. C.; MARCOLINO Jr., L. H.; FATIBELLO-FILHO, O. An improved flow system for chloride determination in natural waters exploiting solid-phase reactor and long pathlength spectrophotometry. **Talanta**, v. 72, p. 663-667, 2007.
- 108) ONO, T.; TENIGUCHI, J.; MITSUMAKI, H.; TAKAHATA, F.; SHIBUYA, A.; KASAHARA, Y.; KOSHIMTZU, F. A new enzymatic assay of chloride in serum. **Clinical Chemistry**, v. 34, p. 552-553, 1988.
- 109) TAYLOR, R. P.; JAMES, T. J. Enzymatic determination of sodium and chloride in sweat. **Clinical Biochemistry**, v. 29, p. 33-37, 1996.
- 110) BABKO, A. K.; PILIPENKO, A. T. **Photometric Analysis: Methods of determining non-metals**. 1a ed. Moscou: Mir Publishers, 1976. 374 p.
- 111) ACHTERBERG, E. P.; VAN DER BERG, M. G. In-line ultraviolet-digestion of natural water samples for trace metal determination using an automated voltammetric system. **Analytica Chimica Acta**, v. 291, p. 213-232, 1994.
- 112) ATHAVALLE, V. T.; KRISHNAN, C. V.; SUBRAMANIAN, A. R. Determination of residual chlorine in chlorinated sea water. **Analyst**, v. 87, p. 707-711, 1962.
- 113) LEGGETT, D. J.; CHEN, N. H.; MAHADEVAPPA, D. S. Rapid determination of residual chlorine by flow injection analysis. **Analyst**, v. 107, p. 433-441, 1982.
- 114) OAKES, J.; GRATTON, P. Kinetic investigations of the oxidation of methyl orange and substituted arylazonaphthol dyes by peracids in aqueous solution. **Journal of Chemical Society: Perkin Transactions**, v. 2, p. 2563-2568, 1998.
- 115) LAITINEN, H. A.; BOYER, K. W. Simultaneous determination of bromine and chlorine with methyl orange. **Analytical Chemistry**, v. 44, p. 920-926, 1972.