

ERICA TERCEIRO CARDOSO

AVALIAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO  
DISPERSIVA PARA DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO EM ÁGUAS  
NATURAIS

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como exigência para obtenção  
do grau de Bacharel em Química, ao Centro  
de Ciências Naturais e Humanas da  
Universidade Federal do ABC – Santo  
André

Orientador: Diogo Librandi da Rocha

Santo André – SP

2018

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC  
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Terceiro Cardoso, Erica  
AVALIAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO  
DISPERSIVA PARA DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO EM ÁGUAS  
NATURAIS / Erica Terceiro Cardoso. — 2018.

25 fls. : il.

Orientador: Diogo Librandi da Rocha

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do ABC,  
Bacharelado em Química, Santo André, 2018.

1. microextração. 2. fosfato. 3. aumento de sensibilidade. 4. separação. I.  
Librandi da Rocha, Diogo. II. Bacharelado em Química, 2018. III. Título.

ERICA TERCEIRO CARDOSO

**AVALIAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA  
PARA DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO EM ÁGUAS NATURAIS**

Monografia apresentada ao curso do Bacharelado em Química do Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC, como requisito à conclusão do curso.

Aprovada em 10 de agosto de 2018

Banca Examinadora

  
Prof. Dr. Alexandre Zatkovskis Carvalho  
Examinador UFABC

  
Prof.ª. Dra. Juliara Marchi  
Examinadora UFABC

  
Prof. Dr. Diego Librandi da Rocha  
Orientador

## RESUMO

O impacto ambiental causado pelo aumento da concentração de fósforo em águas naturais (*e.g.* eutrofização) exige constante monitoramento dessa espécie, principalmente da forma inorgânica. Para esse fim, são necessários procedimentos analíticos sensíveis devido às baixas concentrações normalmente encontradas. A microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD) exige quantidades mínimas de solvente orgânico (na ordem de  $\mu\text{L}$ ) para a extração, sendo uma técnica alternativa mais limpa e rápida em comparação com as extrações líquido-líquido clássicas. Neste trabalho, foi proposto um procedimento analítico baseado na determinação de fósforo com o método espectrofotométrico do azul de molibdênio após MELLD utilizando  $\text{CHCl}_3$  e etanol como agentes extrator e dispersor, respectivamente. As condições químicas iniciais foram baseadas no procedimento recomendado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC). Alguns parâmetros foram otimizados pelo método univariado, buscando máxima sensibilidade e frequência analítica. Após a otimização, foi observada faixa linear entre 20 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , descrita pela equação  $A = 0,0030 C_P + 0,025$  ( $R^2 = 0,990$ ), onde  $A$  é absorvância e  $C_P$  é a concentração de fósforo em  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O limite de detecção e o coeficiente de variação foram estimados em 4,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $n = 12$ ; 99,7% de confiança) e  $< 5,7\%$  ( $n = 3$ ). Por determinação, foram consumidos 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{CHCl}_3$ . O procedimento é quatro vezes mais sensível que o recomendado pela AOAC. A avaliação da exatidão foi realizada através de estudos de adição e recuperação. Recuperações de 84% foram observadas para uma amostra de rio, indicando recuperação adequada, porém muito próxima do limite inferior normalmente aceitável. Para água de mar, a recuperação foi de 52%. Isto comprovou que ocorreram efeitos de matriz.

**Palavras-chave:** microextração; fosfato; aumento de sensibilidade; separação.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação das frações de fósforo em águas naturais.....	7
Figura 2. Diagrama simplificado de injeção da solução extratora na amostra e da interação envolvida na extração. ....	10
Figura 3. Fotografias de misturas obtidas após MELLD utilizando 2 mL de solução extratora composta por $\text{CHCl}_3:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ nas proporções 50% (A), 1% (B) e 10% (C). Condições: 5,0 (A), 10 (B) e 1,0 (C) $\text{mg L}^{-1}$ $\text{P}_I$ , molibdato $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , $\text{H}_2\text{SO}_4$ $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido ascórbico $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ .....	15
Figura 4. Variação do volume de solução extratora em um mesmo volume reacional. Condições foram as mesmas descritas na Figura 3, exceto pela proporção $\text{CHCl}_3:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ que foi fixada em 10% v/v .....	16
Figura 5. Espectro de absorção da fase orgânica proveniente da extração do azul de molibdênio pela solução extratora em solução $60 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de $\text{P}_I$ . Condições: 2 mL de solução extratora composta por $\text{CHCl}_3:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ a 10% (v/v), molibdato $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , $\text{H}_2\text{SO}_4$ , $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido ascórbico $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ .....	17
Figura 6. Efeito do tempo de reação sobre o sinal da solução de $\text{P}_I$ $40 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (linha cinza) e do branco (linha preta). Demais condições foram as mesmas apresentadas na Figura 5.....	18
Figura 7. Comparação dos tempos de 5 e 30 minutos de reação. Demais condições foram as mesmas apresentadas na Figura 5.....	19
Figura 8. Comparação das curvas analíticas do método de referência e do método proposto. ....	20

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos solventes extrator e dispersor escolhidos para estudos. ....	14
Tabela 2. Valores de recuperação de PI em amostras de águas naturais (n = 3) utilizando os procedimentos proposto e de referência (AOAC, 1990).....	20

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	6
1.1. Fósforo em águas naturais.....	6
1.2. Procedimentos analíticos para a determinação de fósforo em águas naturais.....	8
1.3. Microextração líquido-líquido dispersiva - MELLD .....	9
2. OBJETIVOS .....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	11
3.1. Reagentes e Soluções .....	11
3.2. Equipamentos e acessórios.....	12
3.3. Procedimentos .....	12
3.3.1. Procedimento proposto (MELLD) .....	12
3.3.2. Procedimento de Referência (AOAC).....	13
3.3.3. Estudos preliminares e otimização .....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	14
4.1. Estudos preliminares e otimização .....	14
4.2. Características analíticas .....	19
4.3. Aplicação.....	20
5. CONCLUSÕES.....	22
6. PERSPECTIVAS .....	22
7. REFERÊNCIAS .....	23

## **1. Introdução**

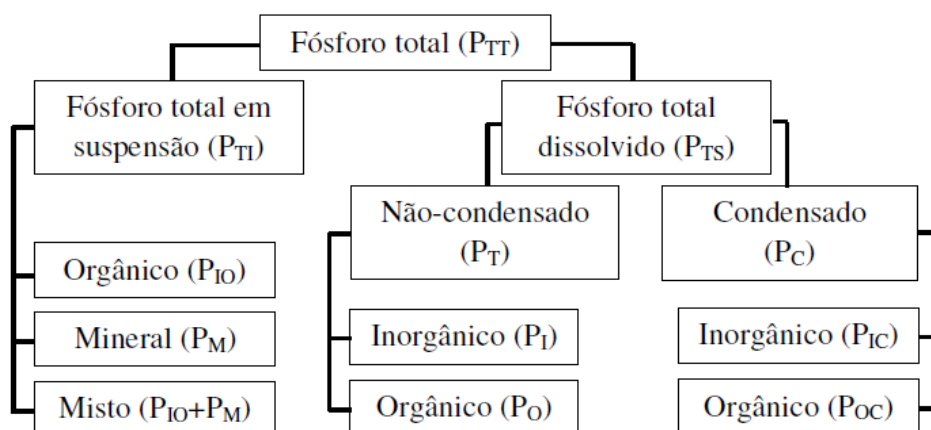
### **1.1. Fósforo em águas naturais**

O fósforo é um nutriente importante para todos os seres vivos e limitante para o desenvolvimento de produtores primários em ecossistemas aquáticos e terrestres (WORSFOLD, 2016). O aumento do uso de compostos de fósforo na indústria e, principalmente, na agricultura acarreta na maior concentração dessa espécie em efluentes despejados nos ambientes aquáticos e lixiviados do solo (WORSFOLD, 2016). O aumento excessivo da concentração de fósforo em águas naturais impacta negativamente esses ecossistemas (WORSFOLD, 2016; ROCHA, 2013). Por ser um nutriente limitante no crescimento de algas, um pequeno excesso causa a proliferação desses seres diminuindo a zona fótica e as demandas química e bioquímica de oxigênio por interferir na troca gasosa com a atmosfera. Isso aumenta a mortalidade da biota e promove odor, sabor e coloração indesejados à água (WORSFOLD, 2016).

O fósforo se apresenta sob diversas formas químicas na natureza. A especiação altera a sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, o impacto deste elemento na qualidade das águas (WORSFOLD, 2016). Dentre as formas possíveis, o fósforo pode estar presente solubilizado em águas naturais ou em suspensão, sendo classificadas como frações dissolvida (filtráveis) e particulada (não filtráveis), respectivamente (ROCHA, 2013). Na Figura 1, é apresentado um diagrama de blocos da classificação das frações de fósforo em águas naturais. O fósforo inorgânico dissolvido e não condensado ( $P_i$ ), ortofosfato, é facilmente assimilável por organismos produtores primários, sendo a forma mais bioacessível. Entretanto, formas orgânicas dissolvidas também são acessíveis a poucos micro-organismos, sendo ainda alvo de estudos de biodisponibilidade (ROCHA, 2013; NAGUL, 2015).



**Figura 1.** Classificação das frações de fósforo em águas naturais.



Fonte: Adaptado de ROCHA, 2013

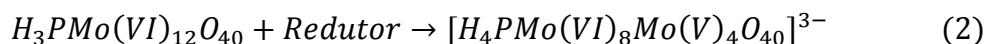
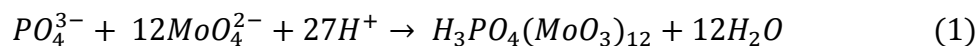
Baixas concentrações de fósforo bioacessível já afetam a qualidade das águas e sua potabilidade. Segundo a resolução Nº 357 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), a concentração permitida de fósforo em águas que serão tratadas para consumo humano varia entre 20 e 150  $\mu\text{g L}^{-1}$  (CONAMA, 2005). Em leitos isentos de despejos de esgoto a concentração de fósforo normalmente não ultrapassa 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (ROCHA 2013). Sendo assim, são necessários procedimentos analíticos sensíveis, robustos e com alta frequência analítica para a determinação de fósforo em amostras de águas naturais (WORSFOLD, 2016; NAGUL, 2015).

O método de azul de molibdênio (MB) é o mais utilizado para determinação de  $\text{P}_I$ . Esta fração também é denominada como fósforo reativo. Essa reação também é utilizada para a determinação de arseniados, silicatos e germanatos, que são considerados interferentes na análise de fósforo (NAGUL, 2015). Porém, a formação do MB a partir dessas espécies é mais lenta que aqueles gerados com fósforo (ROCHA, 2013). Para minimizar essas interferências, pode-se adicionar outros reagentes, como o tartarato, controlar a relação entre a concentração de ácido e molibdato e alterar o estado de oxidação de alguns concomitantes (como o arsênio).

A reação de formação do MB se dá pela formação de uma espécie de polioxometalato, um heteropoliácido de estrutura de íon Keggin provenientes de ortofosfato e molibdato em meio ácido, que posteriormente são reduzidos formando o MB (NAGUL, 2015).

A formação do MB ocorre em duas etapas que podem ser expressas de forma genérica de acordo com as Reações 1 e 2. Na reação 1, em meio ácido, há a formação

do ácido fosfomolibdico que gera o MB na reação 2. Na segunda etapa, alguns átomos de molibdênio (Mo) são reduzidos, formando uma estrutura contendo o elemento em ambos os estados de oxidação. A intensidade da coloração varia com a concentração de fósforo no meio (WORSFOLD, 2016 e NAGUL, 2015)



O tipo de espécie formada depende do pH, da natureza do agente redutor e da pureza do reagente de Mo. Por conta disso, a estequiometria da reação não é bem definida. (WORSFOLD, 2016; NAGUL, 2015). Sendo assim, o MB se refere a diversos compostos de molibdênio, que podem ou não conter o heteroátomo, como o fósforo, e ainda assim apresentar a coloração azul. Essas alterações influenciam no perfil do espectro de absorção. Este fato torna importante o estudo das condições reacionais no desenvolvimento de procedimentos analíticos (NAGUL, 2015).

### 1.2.Procedimentos analíticos para a determinação de fósforo em águas naturais

O método recomendado pela *Association of Official Analytical Chemists* - AOAC para determinação de fósforo se baseia na quantificação de  $P_I$  pelo método espectrofotométrico do azul de molibdênio. Neste método, utiliza-se ácido sulfúrico para acidificar o meio e ácido ascórbico como agente redutor (AOAC, 1990). Embora com sensibilidade adequada para determinação de fósforo em águas de rio, a variação do sinal é pequena frente à variação da concentração dentro da faixa linear. Sendo assim, o erro instrumental pode afetar drasticamente as medidas (ROCHA, 2013). Adicionalmente, a leitura deve ser realizada de 10 a 30 min após a reação, mantendo o mesmo tempo para as amostras e replicatas. Dessa forma, erros sistemáticos podem ocorrer uma vez que o procedimento não é mecanizado.

Técnicas de pré-concentração tem sido utilizadas para o aumento de sensibilidade dos procedimentos devido à baixa concentração de fósforo em corpos d'água (na ordem de  $\mu g L^{-1}$ ). Para o método do azul de molibdênio, foram relatadas extrações em fase líquida (EATON, 2005; AFKHAMI, 2009; WORSFOLD, 2016) e em fase sólida (FREMMAN,1990; UDNAN,2005; LIANG, 2006) para o aumento de sensibilidade (WORSFOLD, 2016).

A pré-concentração com interações líquido-líquido foi utilizada tanto para extração do ácido fosfomolibdico (EATON, 2005) quanto do MB (STRICKLAND, 1972). Como exemplos de extratores, foram relatados os álcoois (*e.g.* iso-propanol, n-butanol e n-hexanol), misturas de solventes, como isobutanol/benzeno (WORSFOLD, 2016), e tensoativos, como o Triton X-114 (AFKHAMI, 2009). Este último apresentou fator de pré-concentração de 20 vezes, faixa linear de 0,5 a 125  $\mu\text{g L}^{-1}$  e limite de detecção de 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  (AFKHAMI, 2009), se mostrando mais sensível e com faixa linear mais ampla que o método de referência (AOAC, 1990).

A extração em fase sólida também tem sido explorada para determinação de  $\text{P}_i$ , especialmente associada às análises em fluxo (WORSFOLD, 2016). Um procedimento foi baseado na retenção do ácido fosfomolibdico em uma coluna cromatográfica para posterior reação e leitura, atingindo limite de detecção de 0,04  $\mu\text{g L}^{-1}$  apesar da baixa frequência de determinação de 2  $\text{h}^{-1}$  (LIANG, 2006). Alternativamente, colunas de troca iônica foram empregadas para a pré-concentração do  $\text{P}_i$  em águas doces (FREMMAN, 1990 e UDNAN, 2005). Estes procedimentos apresentam interferência do íon cloreto, sendo necessária a sua remoção prévia (WORSFOLD, 2016).

Uma estratégia moderna para extração de espécies é baseada na extração líquido-líquido dispersiva que ainda não foi explorada para a determinação de fósforo em baixas concentrações.

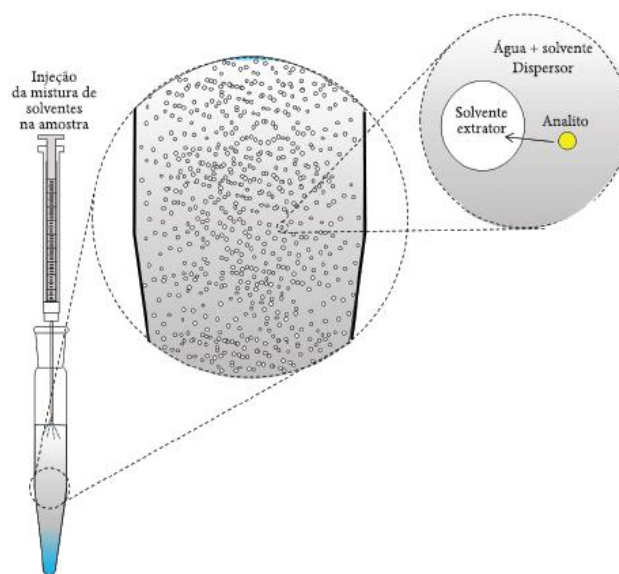
### **1.3. Microextração líquido-líquido dispersiva - MELLD**

A microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD) baseia-se no princípio das extrações líquido-líquido clássicas (ELL) de partição por polaridade (HARRIS, 2008; MARTINS, 2012) Porém, o volume de solução extratora, bem como o tempo e o número de extrações, é drasticamente minimizado (MARTINS, 2012).

Na MELLD, a solução extratora é composta por uma mistura de dois solventes (extrator e dispersor). Normalmente, são utilizados volumes da ordem de microlitros do extrator, que precisa ter afinidade pelo analito, baixa solubilidade na amostra (fase aquosa) e diferença de densidade que permita o seu isolamento (REZAEI, 2006). O dispersor deve ser solúvel em ambos os meios, ter baixa afinidade com o analito e densidade diferente à do solvente extrator. O dispersor proporcionará o aumento da interação entre a fase aquosa e a fase orgânica (MARTINS, 2012). Ao adicionar a solução extratora, o que normalmente é feito com uma seringa e de forma abrupta, são geradas gotículas do extrator onde ocorre a rápida transferência de massa. Como a

superfície de contato é grande, o tempo de extração é reduzido e com alta eficiência (Figura 2) (MARTINS, 2012). Portanto o estado de equilíbrio é atingido rapidamente, fazendo o tempo de extração ser bem menor que na ELL (REZAEI, 2010). Por conta da diferença de solubilidade entre o solvente extrator e a fase aquosa, após centrifugação, o solvente extrator pode ser isolado, recolhido e analisado (MARTINS, 2012).

**Figura 2.** Diagrama simplificado de injeção da solução extratora na amostra e da interação envolvida na extração.



Fonte: Adaptado de MARTINS, 2012.

Na MELLD, a extração é feita em apenas uma etapa e com considerável rendimento, o que economiza tempo e minimiza as perdas do analito. Isso é uma grande vantagem em relação a ELL que utiliza geralmente etapas consecutivas de extração para aumentar a eficiência.

Essa técnica moderna foi descrita pela primeira vez em 2006, e faz parte da miniaturização do preparo de amostras para a determinação de compostos orgânicos (REZAEI, 2006). A partir de então, diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas, com o objetivo de diminuir custos, quantidade de reagentes e resíduos, aumento da eficiência e possibilidade de automação. Tem como vantagem a rapidez, miniaturização, baixo custo, eficiência de extração e altos fatores de pré-concentração (REZAEI, 2006) Apesar dessas vantagens e do seu alto potencial de uso em campo (MARTINS, 2012), a automação da técnica não é tão simples em relação às técnicas clássicas, especialmente utilizando analisadores em fluxo. Isso ocorre por conta da dificuldade de isolar volumes

tão pequenos de solvente que se encontram dispersos na amostra e por conta da necessidade de centrifugação e separação de fases (MARTINS, 2012).

Um exemplo do potencial da técnica foi a determinação de cobre e cádmio em águas naturais após pré-concentração utilizando a mistura clorofórmio:etanol 1:1 (v/v) com detecção por espectrometria de absorção atômica com chama. O fator de pré-concentração foi estimado em 20, gerando 500 µL de resíduo organoclorado por determinação (BOSCH, 2014).

## **2. OBJETIVOS**

Desenvolver um procedimento analítico espectrofotométrico para determinação de fósforo em águas naturais após microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD).

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1.Reagentes e Soluções**

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico, com água deionizada e mantidos sob refrigeração quando estocados.

A solução ácida fonte de íons molibdato foi preparada a partir da mistura de 6,8 mL de ácido sulfúrico 98% (Vetec, Sigma Aldrich e Carlo Erba) e 0,0927 g de heptamolibdato de amônio tetrahidratado (Acros), em 50 mL de água, resultando em concentração de 2,5 mol L<sup>-1</sup> e 0,015 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. A solução redutora foi preparada a partir de 0,1760 g de L-ácido ascórbico (Carlo Erba) em 100 mL de água e mantido em frasco âmbar, resultando em uma concentração de 0,01 mol L<sup>-1</sup>. A solução de tartarato de amônio e potássio (0,008 mol L<sup>-1</sup>) foi preparada com 0,2672 g de reagente (Vetec) em 100mL de água e mantido em frasco âmbar.

A solução estoque de fósforo de concentração 1000 mg L<sup>-1</sup> (67 mmol L<sup>-1</sup>) foi preparada a partir da mistura de 0,2197 g de fosfato de potássio monobásico (Vetec) diluídas para 50 mL de água. Foram feitas diluições sucessivas da solução estoque de fósforo para as concentrações conhecidas de 100, 10 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>.

A mistura de solventes foi preparada a partir de 10 mL de clorofórmio (Synth) diluídos para 100 mL com etanol (Honeywell e Synth).

A amostra de água de rio foi coletada na cidade de Ibiúna, no interior de São Paulo, em uma fazenda produtora de vegetais orgânicos. A amostra de água do mar foi coletada na beira de uma praia em Praia Grande, São Paulo.

A solução de ácido sulfúrico  $2,5 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada com 6,8 mL de reagente 98% (Vetec, Sigma Aldrich e Carlo Erba) diluídos para 50 mL de água.

A solução fonte de íons molibdato foi preparada a partir de 2 g de heptamolibdato de amônio tetrahidratado (Acros), em 50 mL de água, resultando em concentração de  $0,032 \text{ mol.L}^{-1}$  de molibdato.

Todas as vidrarias e materiais utilizados foram lavados com água corrente, água deionizada, e em seguida submetidas a banho em ácido nítrico 5% v/v (Alphatec) por 24 horas. Após este tempo, foram novamente lavadas com água deionizada e secas a temperatura ambiente.

### **3.2. Equipamentos e acessórios**

Para as medidas espectrofotométricas, foi utilizado um espectrofotômetro modular composto por uma fonte de radiação de tungstênio/halogênio (StellarNet), uma unidade para conter uma cubeta de até 10 mm de caminho óptico e um espectrômetro do tipo CCD (*charge-coupled devices*, Ocean Optics) que permite obtenção de espectros entre 200 e 800 nm. Cabos de fibra óptica foram utilizados para transportar a radiação da fonte até o compartimento da amostra e até o espectrômetro. Um microcomputador Intel Pentium IV (Hewlett-Packard) foi utilizado para aquisição de dados através da conexão do espectrômetro por uma das entradas USB utilizando o *software* SpectraSuite. Para as medidas, foi utilizada uma cubeta de fluxo em quartzo com 10 mm de caminho óptico e volume interno de 80  $\mu\text{L}$ . Para a extração, foram utilizados tubos poliméricos graduados de 15 ou de 50 mL. A centrifugação para o isolamento das fases foi realizada em centrífuga Hettich.

### **3.3. Procedimentos**

#### **3.3.1. Procedimento proposto (MELLD)**

Em um tubo cônico de 15 mL, com uma micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$  adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  da mistura de ácido sulfúrico e molibdato, 150  $\mu\text{L}$  da solução de antimônio, 250  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico, e o volume adequado de  $P_1$ , dependendo da concentração desejada. A mistura foi avolumada para 5 mL e, em seguida, foram aguardados os 5 minutos de reação. Subsequentemente, foram adicionados 2,0 mL da solução extratora utilizando uma micropipeta de 5000  $\mu\text{L}$ . A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 3800 rpm para o isolamento das fases. Em seguida, a fase aquosa foi removida e foi

adicionado 200  $\mu\text{L}$  de etanol na fase orgânica, sendo realizada determinação espectrofotométrica em 687 nm.

Para avaliar a exatidão, foram utilizadas amostras previamente filtradas em celulose 0,45  $\mu\text{m}$  (Chromafil Xtra). Após filtração, procedeu-se com o mesmo procedimento realizado com as soluções de referência, utilizando 5,0 mL de amostra. Para os estudos de adição e recuperação, foi adicionado 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{P}_\text{I}$  às amostras.

### **3.3.2. Procedimento de Referência (AOAC)**

Em um tubo cônico de 50 mL, foi adicionado 25 mL de amostra, seguida de 4,0 mL da mistura de reagentes descrita no item 3.1. Foram obtidas medidas espectrofotométricas em 880nm após 30 min de reação.

### **3.3.3. Estudos preliminares e otimização**

Verificou-se o volume ideal de solução extratora em relação ao volume de amostra. A extração foi realizada em 10 mL de solução de referência contendo 1, 5 e 10  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{P}_\text{I}$  para avaliar visualmente a extração. Após a adição de reagentes nas condições descritas no item 3.3.1, foi adicionado 2 mL de solução extratora com concentrações variando de 1 a 50 % v/v de clorofórmio em etanol.

Após a pré-concentração do analito, foi obtido o espectro de absorção da fase orgânica para determinação do comprimento de onda de máxima absorção por meio do procedimento descrito no item 3.3.1.

Visando otimizar a frequência analítica, variou-se o tempo de reação de 0 a 30 minutos. Com o tempo reacional que apresentou maior diferença entre os sinais do branco e amostra, foi desenvolvida uma curva analítica de 0 a 100 ppb de fósforo na amostra e comparado com o tempo utilizado no método de referência. Com as características analíticas determinadas, analisou-se duas amostras de água provenientes de rio e mar e realizados estudos de adição e recuperação.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Estudos preliminares e otimização

No desenvolvimento de um procedimento empregando MELLD, deve-se escolher a melhor composição da solução extratora. Os solventes devem se dissolver para formar uma mistura compatível com a técnica analítica. O analito deve ter afinidade solvente extrator, que deve apresentar densidade adequada para o isolamento. (MARTINS, 2012; HERRERA, 2010; ZANG, 2009).

Primeiramente, foi avaliada a mistura de etanol e clorofórmio como solução extratora. O etanol foi escolhido como dispersor por conta da sua solubilidade tanto na amostra (fase aquosa) quanto no clorofórmio (fase orgânica) e sua menor periculosidade em relação ao metanol (BOSCH, 2014). O clorofórmio foi utilizado como extrator por sua baixa solubilidade em água e pela afinidade com o azul de molibdênio. Apesar do uso de solventes clorados ser evitado por sua toxicidade, seu uso se justifica no baixo volume utilizado por determinação (MARTINS, 2012). Os solventes possuem pressão de vapor relativamente baixa e temperatura de ebulição alta o que minimiza evaporação durante as análises. As características dos solventes encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas dos solventes extrator (clorofórmio) e dispersor (etanol) escolhidos para estudos de eficiência da mistura

<i>Solvente</i>	<i>Solubilidade (g L<sup>-1</sup>, 20°C)</i>	<i>Densidade (g cm<sup>-3</sup>, 20°C)</i>	<i>PE (°C, 1013hPa)</i>	<i>PV (mmHg, 20°C)</i>
Clorofórmio	8	1,47	61,0	158
Etanol	solúvel	0,79	78,3	44

PE: ponto de ebulição; PV: pressão de vapor

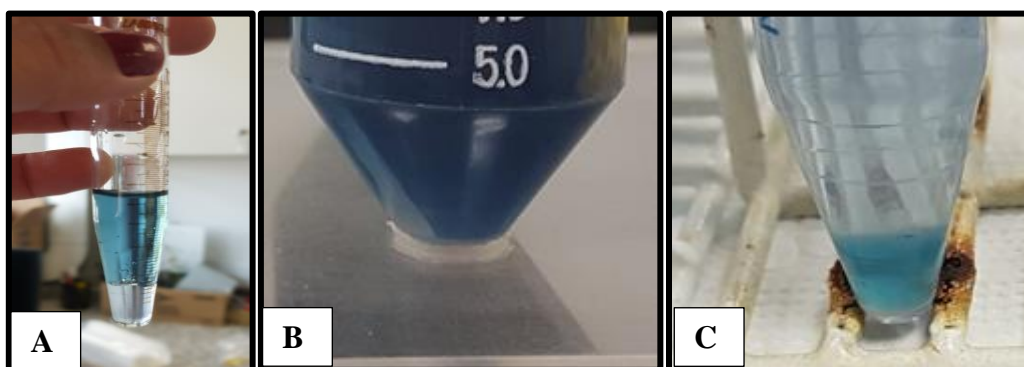
**Fonte:** Adaptado de (MARTINS, 2012)

O volume e a concentração da mistura de solventes devem ser avaliados para promover a máxima eficiência. É necessária uma quantidade ótima de dispersor para se atingir a máxima superfície de contato do extrator com a amostra. Adicionalmente, o meio não deve solubilizar demasiadamente o extrator, o que diminui o volume de fase orgânica (HERRERA, 2010). Como esperado, a extração visivelmente não ocorreu com concentrações altas de clorofórmio (Figura 3A), sendo observada a fase orgânica incolor. A quantidade muito pequena de dispersor não gerou superfície de contato



suficiente para a rápida transferência de massa, gerando uma baixa eficiência de extração.

**Figura 3.** Fotografias de misturas obtidas após MELLD utilizando 2 mL de solução extratora composta por  $\text{CHCl}_3:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  nas proporções 50% (A), 1% (B) e 10% (C). Condições: 5,0 (A), 10 (B) e 1,0 (C)  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{P}_i$ , molibdato 1,5  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,25  $\text{mol L}^{-1}$  e ácido ascórbico 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$ .



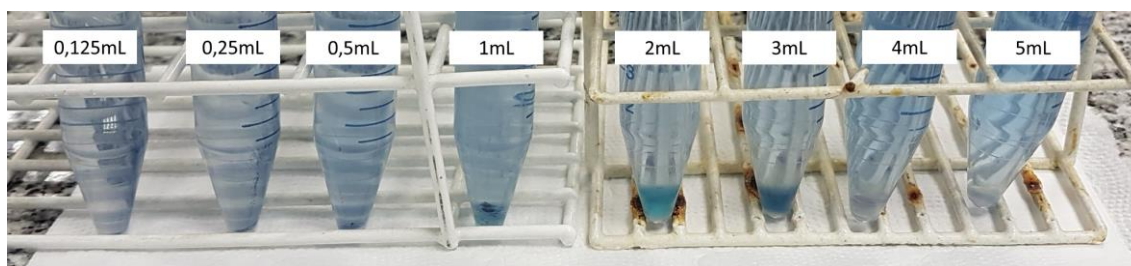
Fonte: Autoria própria.

Ao diminuir drasticamente a concentração de clorofórmio para 1% (Figura 3B), também não foi visualmente observada extração devido à formação de apenas uma fase na mistura, indicando que o etanol em excesso no meio solubilizou o extrator. A concentração da solução extratora que apresentou a separação de fases visível e com coloração azulada foi aquela com 10% v/v de clorofórmio em etanol (Figura 3C). Sendo assim, essa condição foi mantida para estudos posteriores.

O próximo parâmetro avaliado foi o volume adicionado de solução extratora, que foi variado de 0,125 a 5,0 mL, mantendo o volume de amostra de 5,0 mL com 1,0  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{P}_i$ . Visualmente, os melhores resultados foram observados com a adição de 2,0 e de 3,0 mL (Figura 4), pois foi observado maior volume de fase orgânica e eficiência de extração. Foi selecionado o volume de 2,0 mL de solução extratora para estudos posteriores por apresentar menor consumo de clorofórmio e maior volume de fase orgânica, o que diminui a diluição previamente à determinação. Além disso, foi observada a falta de homogeneidade na fase orgânica com a utilização de 3,0 mL de solução extratora. Esse resultado mostra que existe uma relação ótima entre o volume de solução extratora e amostra devido à polaridade do sistema terciário de solventes. Em volumes muito baixos de solução extratora (125 a 500  $\mu\text{L}$ ) o clorofórmio foi dissolvido, não sendo formadas as duas fases. Conforme a quantidade de clorofórmio e etanol aumentou, e conseqüentemente diminuiu-se a quantidade de água, o meio ficou saturado com clorofórmio, promovendo a separação de fases e o arraste do azul de molibdênio,

que tem afinidade pela fase orgânica. Por outro lado, o aumento sucessivo do volume de solução extratora promoveu a diminuição no volume de fase orgânica devido a solubilização do clorofórmio em meio alcoólico (uma vez que o volume de fase aquosa foi diminuído) e a separação imediata do extrator, não havendo interação entre a fase aquosa e orgânica, o que afetou a extração.

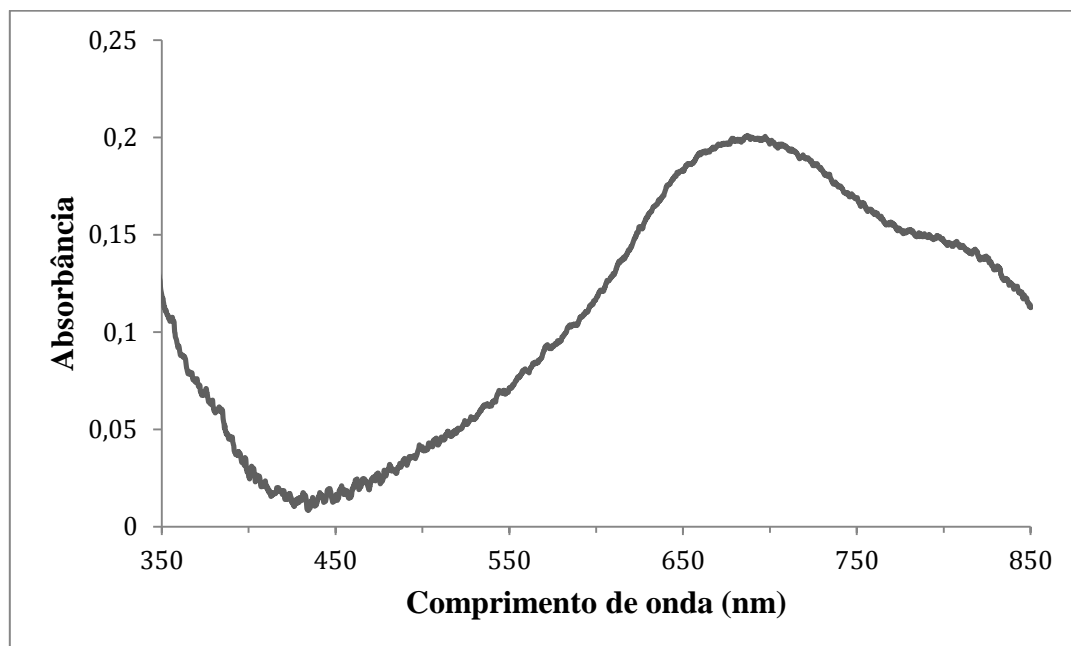
**Figura 4.** Variação do volume de solução extratora em um mesmo volume reacional. Condições foram as mesmas descritas na Figura 3, exceto pela proporção  $\text{CHCl}_3:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  que foi fixada em 10% v/v



**Fonte:** Autoria própria.

Após a otimização da composição e volume da solução extratora, foi obtido um espectro de absorção da fase orgânica (Figura 5), que foi diluída com 200  $\mu\text{L}$  de etanol previamente à determinação. Essa diluição foi necessária pois com as condições empregadas, o volume esperado de fase orgânica era de 200  $\mu\text{L}$ , entretanto, foram obtidos aproximadamente 100  $\mu\text{L}$ . Este volume não foi suficiente para a leitura em espectrofotômetro com cubetas de 3,5 mL e o uso de uma cubeta para análises em fluxo (volume interno de 80  $\mu\text{L}$ ), se mostrou inadequado para as medidas, pois frequentemente foram observadas bolhas de ar alojadas no caminho ótico. Além disso, havia evaporação do clorofórmio durante o manuseio do extrato. Com a diluição com etanol, a cela de fluxo foi utilizada com maior eficiência e a evaporação minimizada.

**Figura 5.** Espectro de absorção da fase orgânica proveniente da extração do azul de molibdênio pela solução extratora em solução  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{P}_1$ . Condições: 2 mL de solução extratora composta por  $\text{CHCl}_3:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  a 10% (v/v), molibdato  $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  e ácido ascórbico  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ .

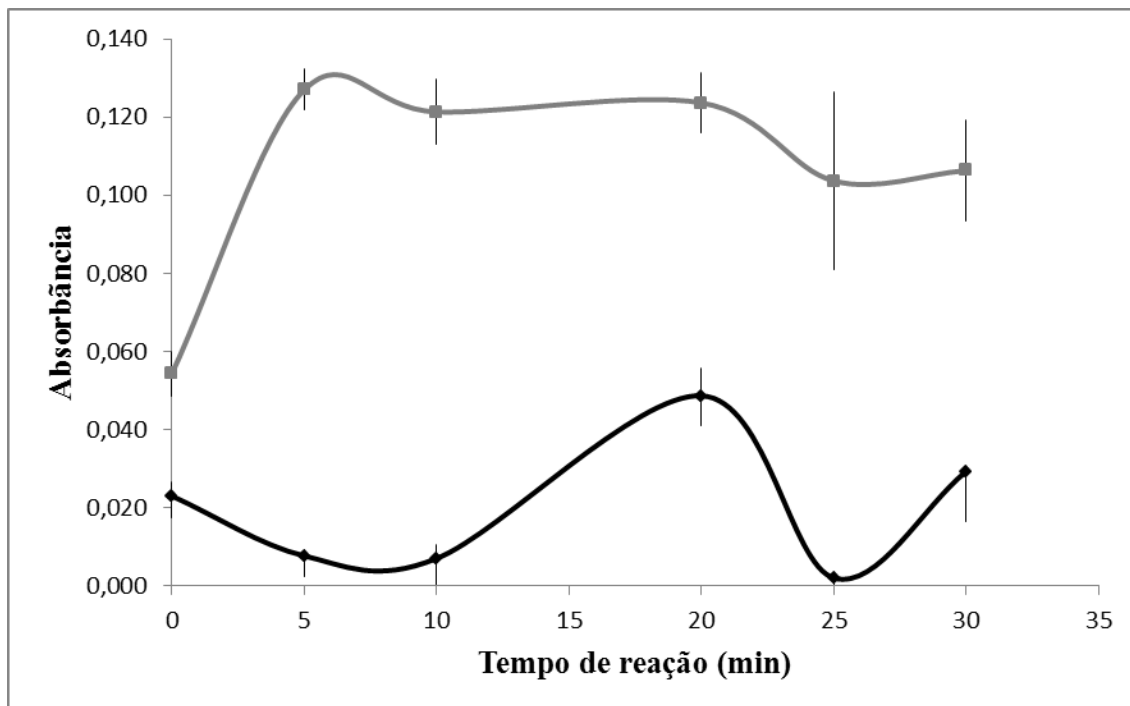


**Fonte:** Autoria própria

De acordo com a Figura 5, a solução apresentou máximo de absorção em 687 nm, sendo esse o comprimento de onda selecionado para todas as determinações das amostras seguintes.

Em todos os estudos, foi utilizado 30 min de reação, que é o tempo máximo recomendado pelo método de referência (AOAC, 1990). Com o intuito de aumentar a frequência analítica, foi avaliado o tempo de reação previamente à MELLD (Figura 6).

**Figura 6.** Efeito do tempo de reação sobre o sinal da solução de  $P_I$   $40 \mu\text{g L}^{-1}$  (linha cinza) e do branco (linha preta). Demais condições foram as mesmas apresentadas na Figura 5.

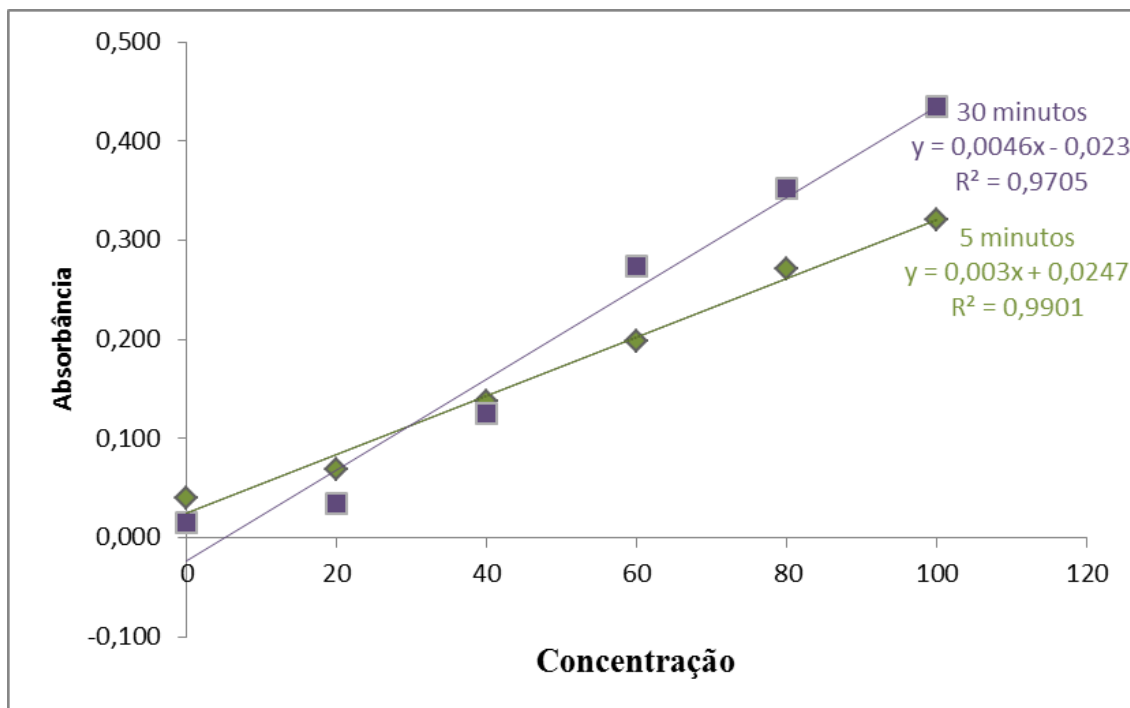


**Fonte:** Autoria própria

As condições do meio, como pureza dos reagentes e pH podem alterar o tipo de composto formado, que apresentam aspectos cinéticos diferentes como os apresentados na figura 6. Com 5 minutos de reação, foi observado o maior sinal, bem como melhor precisão entre os tempos analisados. Eventuais valores altos do branco foram atribuídos à presença de emulsões na fase orgânica.

Para se obter um estudo comparativo minucioso com relação ao tempo de reação, foram construídas curvas analíticas utilizando os tempos de 5 e de 30 minutos. No primeiro caso, foi observado coeficiente angular igual a  $0,0030 \text{ L mg}^{-1}$ , que foi 35 % menor do que a utilização de 30 minutos de reação. Apesar da diferença, com 30 minutos foi observada perda de linearidade abaixo de  $40 \mu\text{g L}^{-1}$ , ao passo que com 5 minutos de reação foi observada faixa linear entre 20 e  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Adicionalmente, os coeficientes de determinação para 5 e 30 minutos foram 0,990 e 0,970, respectivamente. Sendo assim, 5 minutos de reação foi mantido como parâmetro ótimo (Figura 7).

**Figura 7.** Comparação dos tempos de 5 e 30 minutos de reação. Demais condições foram as mesmas apresentadas na Figura 5.

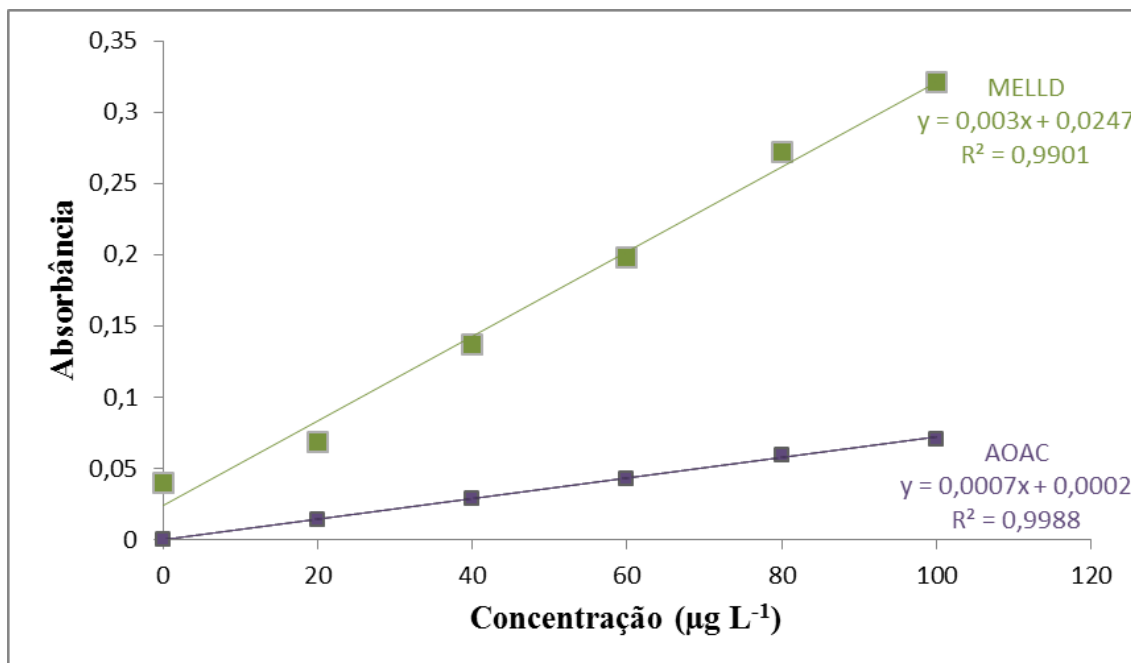


Fonte: Autoria própria

#### 4.2. Características analíticas

Após a otimização do procedimento, foi observada faixa linear entre 20 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$   $\text{P}_i$ , regida pela equação  $A = 0,0030 C_P + 0,025$  ( $R^2 = 0,990$ ), em que  $A$  é absorbância e  $C_P$  é a concentração de  $\text{P}_i$  em  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O limite de detecção (HARRIS, 2008) ( $n = 12$ ; 99,7 % de confiança) e o coeficiente de variação ( $n = 3$ , 40  $\mu\text{g L}^{-1}$   $\text{P}_i$ ) foram estimados em 4,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  e < 5,7 %, respectivamente. Foram consumidos 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{CHCl}_3$  por amostra analisada. O método proposto apresentou coeficiente angular quatro vezes maior que o método de referência (Figura 8) mostrando uma significativa maior sensibilidade para a determinação de fósforo.

**Figura 8.** Comparação das curvas analíticas do método de referência e do método proposto.



**Fonte:** Autoria própria

### 4.3. Aplicação

Foram analisadas duas amostras de água, sendo uma de mar e a outra de rio, pelos procedimentos proposto e de referência (AOAC, 1990). Em todas as análises, a concentração de  $P_I$  estava abaixo dos limites de detecção. Sendo assim, foram realizados estudos de adição e recuperação, sendo as amostras analisadas por ambos os procedimentos. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Valores de recuperação de  $P_I$  em amostras de águas naturais ( $n = 3$ ) utilizando os procedimentos proposto e de referência (AOAC, 1990).

Amostra	$P_{I(adicionado)} (\mu\text{g L}^{-1})$	$P_{I(encontrado)} (\mu\text{g L}^{-1})$		Recuperação (%)	
		Proposto	Referência	Proposto	Referência
Mar	0	< LQ	< LQ	-	-
	40	21	47	53	118
Rio	0	< LQ	< LQ	-	-
	40	34	44	85	110

**Fonte:** Autoria própria

As recuperações obtidas para água do mar não foram satisfatórias para o procedimento proposto (53 %). Por outro lado, a recuperação de 85 % na água de rio

está no limite do que normalmente se aceita em estudos de recuperação. A diminuição da resposta esperada se deve à presença de matéria orgânica que pode competir com o MB durante a extração, afetando a eficiência do processo. Para minimizar esta interferência que poderia resultar em uma recuperação menor do que a esperada, foi feita uma extração prévia na amostra com a solução extratora para tentar retirar toda a matéria orgânica. Em seguida, foi realizada a reação e extração, onde não se obteve separação entre as fases, pois a proporção entre as quantidades de clorofórmio e etanol não é a ideal, conforme descrito na seção 4.1.

No procedimento de referência, foram observadas recuperações mais altas que as esperadas, especialmente para água do mar que atingiu um valor próximo a 120 %. Neste caso, a presença de alguns concomitantes, como o ortossilicato, pode ter atribuído erros sistemáticos às determinações.

As diferenças entre os resultados dos dois procedimentos foram significativas, o que exige uma avaliação de concomitantes para melhorar a exatidão. Além disso, é recomendável que mais um procedimento analítico seja utilizado para comparação das análises das amostras.

Apesar das recuperações observadas, o procedimento proposto apresenta frequência analítica e faixa linear similares às do procedimento de referência. Entretanto, este apresentou sensibilidade quatro vezes maior, sendo a principal vantagem do procedimento desenvolvido.

## 5. CONCLUSÕES

Os estudos mostraram que a MELLD tem potencial para a análise de águas naturais visando à determinação de  $P_1$ . Em comparação com o procedimento de referência, apesar de apresentar etapas adicionais, o procedimento proposto apresentou sensibilidade quatro vezes maior, o que é muito importante para a determinação de  $P_1$  em águas naturais.

A análise das amostras de água de rio e mar resultaram em recuperações pouco satisfatórias sendo necessários estudos adicionais para melhorar a exatidão do procedimento, como a avaliação da presença de matéria orgânica que pode competir com o MB durante a extração.

## 6. PERSPECTIVAS

Em continuidade a este trabalho, a aplicação da técnica para amostras reais se mostra como o principal objetivo, uma vez que a MELLD se mostrou efetiva para extração do azul de molibdênio, embora os estudos de recuperação não tenham mostrado resultados satisfatórios. Para tanto, deverá ser avaliada a presença de concomitantes como matéria orgânica, íons ferro (III), e ortossilicato. De acordo com esses estudos, serão avaliados procedimentos para preparo de amostras ou utilização de reagentes adicionais para minimizar as interferências.

Além disso, vale ressaltar que o clorofórmio é um solvente orgânico clorado, e sua substituição é desejável, apesar do volume utilizado por amostra ser de 200 $\mu$ L. Sendo assim, outros solventes, como álcoois de cadeia longa poderão ser avaliados. O tratamento dos efluentes também deve ser considerado, como por exemplo, a utilização processos oxidativos avançados.



## 7. REFERÊNCIAS

- AFKAHAMI, A. et al. Cloud point extraction for the spectrophotometric determination of phosphorus (V) in water samples. **Journal of Hazardous Materials**. v.167, p. 752-755, 2009.
- BOSCH, O., ROJAS, F.S. Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of cobalt and cadmium by flame atomic absorption spectrometry: application in water and food samples. **De Gruyter Open**, v.2, p.13-20, 2014.
- CONAMA, CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. n.357, de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n.53, p.58-63, mar.2005.
- EATON, D.A., CLESCERI, L.S, RICE, E,W, editores, **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21<sup>a</sup> ed., Centennial Edition, Washington, 2005.
- FREEMAN, P.R. et al. Flow-injection technique for the determination of low levels of phosphorus in natural waters, **Anal. Chim. Acta** v.234, p. 409-416, 1990.
- HARRIS, D.C., **Análise Química Quantitativa**, 7<sup>a</sup> ed., LTC-Livros Técnicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 2008.
- HELRICH, K; editor. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 15<sup>a</sup> ed. Arlingto, Virgínia, USA, AOAC International, 1990.
- HERRERA, H.A.V. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. **Trends in Analytical Chemistry**, v.29, p. 728-751, 2010.
- LIANG, Y. et al. Flow injection analysis of ultratrace orthophosphate in sweater with solid-phase enrichment and luminol chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta**. v. 571, p. 184-190, 2006.
- MARTINS, et al. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica** v.4, p. 35-51, 2012.
- NAGUL, E.A., et al. The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box. **Analytica Chimica Acta**. V 890, p. 60-82, out. 2015.

REZAEE, M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography**. v.1116, p. 1-9, mai 2006.

REZAEE, M. et.al. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography**. v.1217, p. 2342-2357, abr. 2010.

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**. 2013. 167p.Tese (Doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

STRICKLAND, J.D.H. PARSONS, T.R., Determination of Phosphorus. In: STRICKLAND, J.D.H. PARSONS, T.R., **Practical Handbook of Seawater Analysis**, 2 ed. Ottawa, Canadá: Fisheries Research Board of Canada, 1972. p.49-54;

UDNAN, Y. et. al. Evaluation of on-line preconcentration and flow-injection amperometry for phosphate determination in fresh and marine waters. **Talanta** v.66, p. 461-466, 2005.

WORSFOLD, P.; MCKELVIE I.; MONBET P.; Determination of phosphorus in natural waters: A historical review. **Analytica Chimica Acta**. V 918, p. 8-20, mar. 2016.

ZANG, X. et al. Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique, **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v.37, p.161-168, fev.2009.