

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC  
Trabalho de Conclusão de Curso | Bacharelado em Química

CAIO CEZAR VERONEZI MACEDO

**AVALIAÇÃO DE SISTEMAS DE ANÁLISES EM  
FLUXO COM O MÉTODO DO AZUL DE  
MOLIBDÊNIO PARA DETERMINAÇÃO DE  
FÓSFORO EM MATERIAIS VEGETAIS E  
DERIVADOS**

Santo André  
NOVEMBRO – 2020

CAIO CEZAR VERONEZI MACEDO

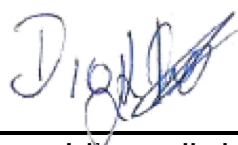
**AVALIAÇÃO DE SISTEMAS DE ANÁLISES EM  
FLUXO COM O MÉTODO DO AZUL DE  
MOLIBDÊNIO PARA DETERMINAÇÃO DE  
FÓSFORO EM MATERIAIS VEGETAIS E  
DERIVADOS**

Monografia de Trabalho de  
Conclusão de Curso, apresentado ao  
Bacharelado em Química da UFABC  
para obtenção do título de Bacharel  
em Química  
Orientador: Diogo Librandi da Rocha



---

Caio Cezar Veronezi Macedo  
Discente



---

Diogo Librandi da Rocha  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Diogo Librandi da Rocha, pela supervisão e orientação extremamente profissional que tornou este trabalho possível, por todo apoio e paciência.

Aos meus pais Carlos Alberto Marques Macedo e Caren Aparecida Veronezi Macedo, e minha irmã Carla Beatriz Veronezi Macedo, pelo apoio emocional e incentivo em continuar minha jornada.

Aos meus colegas de laboratório, por todo o companheirismo e suporte.

Aos técnicos de laboratório da UFABC que auxiliaram no manuseio de equipamentos durante toda a graduação.

Aos membros da banca pela disponibilidade e sugestões apresentadas.

A todos os meus amigos e amigas que me acompanharam ao longo da graduação.

A todos da UFABC que cooperam com o desenvolvimento da ciência e humanidade.

## RESUMO

A determinação de fósforo em materiais vegetais e alimentos é importante para avaliar sua disponibilidade. Essa quantificação também é importante em óleos vegetais e combustíveis, visto que compostos fosforados podem alterar propriedades organolépticas de óleos comestíveis e afetar o funcionamento de catalisadores automotivos em motores movidos a biodiesel. Na maioria desses casos, o preparo de amostras envolvendo extrações e decomposições é necessário. Essas etapas são críticas porque demandam mais tempo e são uma grande fonte de erros sistemáticos. O preparo de amostras em linha e em microescala podem melhorar a frequência analítica, minimizar o consumo de reagentes e minimizar os erros sistemáticos. Neste trabalho, foram avaliados sistemas em fluxo para determinação espectrofotométrica de fósforo em materiais vegetais e derivados utilizando o método do azul de molibdênio. Para a quantificação de fósforo inorgânico solúvel em plantas, a extração sólido-líquido em linha foi desenvolvida, sendo o tempo de extração e volume de extrator ótimos fixados em 60 s e 2,5 mL. Para a determinação, foi adaptado um procedimento em fluxo proposto anteriormente com penetração de zonas. O curto tempo para o preparo foi possível devido à extração incompleta do analito, estimada em 65%. Para determinação de fósforo total em biodiesel e óleos vegetais, foi desenvolvido um procedimento sensível em fluxo empregando microbombas solenoide e cela de longo caminho óptico. Após otimização, foi observada resposta linear entre 10 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  P. O limite de detecção e a frequência de determinação foram estimados em 1,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 83  $\text{h}^{-1}$ , respectivamente. O preparo de amostra foi baseado na microdigestão empregando 20 mg de óleo ou biodiesel, 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  e 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O processo levou 5 min e foi efetuado em forno de micro-ondas doméstico. A supressão do sinal devido à acidez foi minimizada pela alcalinização do meio com acetato de sódio. Estudos relativos à microdecomposição precisam ser conduzidos previamente à validação. Os procedimentos desenvolvidos foram promissores para a determinação de fósforo em materiais vegetais e derivados empregando estratégias inovadoras para o preparo de amostras.

**Palavras-Chave:** Análise em fluxo, fósforo inorgânico, química verde, microdigestão, azul de molibdênio, extração sólido-líquido em linha, microbombas solenoide.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Fósforo em materiais vegetais .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Sistemas de análises em fluxo e extrações em linha .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Sistemas de análises em fluxo para determinação de fósforo em materiais vegetais e derivados .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4 Fósforo em derivados de materiais vegetais e procedimentos para determinação.....</b>	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1. Equipamentos e acessórios .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2. Reagentes e soluções.....</b>	<b>11</b>
<b>3.3. Procedimentos propostos .....</b>	<b>11</b>
3.3.1 <i>Extração em linha e determinação de fósforo em material vegetal.....</i>	11
3.3.2 <i>Procedimento de referência.....</i>	13
3.3.3 <i>Sistema de análises em fluxo para determinação de P total em óleos comestíveis e biodiesel .</i>	13
3.3.4 <i>Microdecomposição das amostras .....</i>	14
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>4.1. Extração em linha de P<sub>i</sub> em material vegetal .....</b>	<b>14</b>
4.1.1 <i>Otimização .....</i>	14
4.1.2 <i>Características analíticas, avaliação da exatidão e comparação crítica .....</i>	16
<b>4.2. Procedimento analítico em fluxo com alta sensibilidade para determinação de P em biodiesel e óleos vegetais após microdecomposição.....</b>	<b>19</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>23</b>
<b>6. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>23</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>24</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Fósforo em materiais vegetais

O fósforo participa de diversos processos vitais em vegetais, como a fotossíntese e as conversões energéticas, além de compor algumas moléculas importantes como a adenosina trifosfato, os nucleotídeos, e os fosfolipídios (SCHACHTMAN, 1998). As espécies de fósforo podem ser classificadas de acordo com a afinidade com o meio aquoso (solúveis ou insolúveis). O fósforo insolúvel pode ser exemplificado pelos fosfolipídios. A fração solúvel compreende o ortofosfato (fração inorgânica,  $P_i$ ) e os fitatos (fração orgânica,  $P_o$ ). A última é composta por mais de 90% de hexakisinositol fosfato (ácido fítico, AF).

O fósforo é absorvido pelas plantas na forma inorgânica não condensada através das raízes. O AF (também em maior quantidade no solo) é enzimaticamente convertido a ortofosfato pela fitase sob condições específicas de temperatura (50 a 60°) e pH (4,5 e 5,5) (ROCHA, 2013). Tal enzima está presente nas raízes das plantas, portanto, aumentando a acessibilidade de fósforo para os vegetais. Após metabolizado, o fósforo pode ser armazenado nas plantas na forma de ácido fítico ou de  $Ca_3(PO_4)_2$  (Bieleski, 1973).

A lixiviação pela água da chuva e de irrigação e a dificuldade de adsorção ao solo faz do  $P_i$  um dos nutrientes mais difíceis de se manter no solo, sendo necessária adição dessa espécie ao cultivo. Os fertilizantes inorgânicos são compostos por sais de fosfato e o carregamento do excesso de fósforo pode aumentar a concentração do nutriente em corpos aquáticos, implicando em desequilíbrios ambientais, como a eutrofização.

Uma alternativa para melhorar as condições do solo para o cultivo é a adubação verde (EMBRAPA, 2016). Essa estratégia consiste em utilizar a folhagem de um cultivo anterior ou de uma espécie para fornecer nutrientes ao solo e aumentar a carga de matéria orgânica. Uma das espécies utilizadas para esse fim é a planta conhecida como xique-xique (*Crotalaria juncea*), que apresenta rápido crescimento e altos teores de nutrientes, incluindo o fósforo (MARSOLA, 2008). Dependendo do tipo de adubo verde, a acessibilidade de nutrientes é alterada, exigindo estudos agronômicos para avaliar a eficiência do material utilizado.

O método mais empregado para determinação de  $P_i$  em material vegetal foi desenvolvido há mais de 40 anos (HOGUE, 1970). O analito é extraído em solução de  $HClO_4$  e posteriormente determinado pelo método do azul de molibdênio. A frequência

analítica é relativamente baixa porque é necessário no mínimo 30 min para que a reação atinja o equilíbrio químico. Além disso, as etapas realizadas em sistemas abertos são altamente suscetíveis a perdas e contaminações. Essas desvantagens podem ser superadas com a mecanização do procedimento utilizando sistemas de análises em fluxo.

## **1.2 Sistemas de análises em fluxo e extrações em linha**

Os sistemas de análises em fluxo são extensamente utilizados para o desenvolvimento de procedimentos analíticos devido às vantagens da mecanização. Esses sistemas processam soluções com mínima intervenção do analista e minimizam contaminações da amostra e perdas do analito (TROJANOWICZ e KOŁACIŃSKA, 2016). Os procedimentos exigem o emprego de pequenas quantidades de soluções, minimizando o consumo de reagentes e amostras e a geração de resíduos (ROCHA *et al*, 2015). Nesses sistemas, a amostra em solução é introduzida em um fluido carregador que a transporta ao sistema de detecção. Durante o transporte, a amostra pode receber reagentes, sofrer reações químicas e passar por diferentes etapas como separação, pré-concentração e decomposição.

Os sistemas de análises em fluxo com multicomutação apresentam vantagens em relação a adição contínua de reagentes. O emprego de dispositivos discretos controlados eletronicamente (válvulas e microbombas solenoide) atuam no gerenciamento independente de cada solução, o que proporciona maior versatilidade. Em sistemas com microbombas, a propulsão e a inserção de soluções são realizadas por ciclos de ativação e desligamento dos dispositivos, dispensando outros dispositivos como as bombas peristálticas (ROCHA *et al*, 2002; LIMA *et al*, 2004). O consumo de reagentes e a geração de resíduos também é minimizada porque cada dispositivo dispensa volumes da ordem de microlitros apenas quando ativados.

A versatilidade dos sistemas FIA permite que etapas demoradas de preparo de amostras sejam executadas de forma mais rápida. As aplicações envolvem desde simples diluições (ROCHA e ROCHA, 2010) até decomposições quantitativas em linha (ROCHA e ROCHA, 2013a). Normalmente, o tempo de decomposição é diminuído principalmente devido aos pequenos volumes de amostra. Extrações realizadas em linha normalmente possuem o objetivo de separar e pré-concentrar o analito, seja utilizando um sorbente ou a amostra sólida (MARQUES *et al.*, 2019). Procedimentos de extração sólido-líquido em

sistemas abertos são suscetíveis a perdas de analito e contaminações. Geralmente, o  $\text{HClO}_4$  é utilizado para extração do  $\text{P}_i$ , seguido da remoção da matéria orgânica com carvão ativado (HOGUE *et al.*, 1970). Entretanto, a acidez influencia no desenvolvimento do método de azul de molibdênio, podendo acarretar erros sistemáticos (NAGUL, 2015). Além disso, são gerados resíduos contendo ácido mineral. Alternativamente, o ácido tricloroacético foi proposto para esta extração, no entanto, erros sistemáticos também foram observados (NOACK *et al.*, 2014). A extração em meio aquoso também tem sido proposta, porém para os vegetais com maior armazenamento de  $\text{P}_i$  na forma de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , a extração pode ser incompleta. Isso pode ser um a razão pela qual a extração em meio aquoso de  $\text{P}_i$  de diferentes vegetais resultou em tempos diferentes de preparo de amostra (MARUCH *et al.*, 2006; ROCHA *et al.*, 2003), sendo necessário menor tempo para extração em meio ácido.

Apesar dos estudos envolvendo a extração de  $\text{P}_i$  com diferentes estratégias, procedimentos com extração sólido-líquido em linha de  $\text{P}_i$  em materiais vegetais ainda não foram propostos. Essa estratégia beneficiaria procedimentos analíticos visando aos estudos agrônômicos devido às vantagens da execução do preparo de amostras em linha.

### **1.3 Sistemas de análises em fluxo para determinação de fósforo em materiais vegetais e derivados**

A determinação de  $\text{P}_i$  em materiais vegetais é geralmente realizada por potenciometria, volumetria, gravimetria e, especialmente, espectrofotometria. Os procedimentos oficiais recomendados pela *Association of Official Analytical Chemists*, AOAC (HORWITZ, 2000), para a determinação de fósforo em materiais vegetais e derivados visam à quantificação de fósforo total ( $\text{P}_T$ ). Em sua maioria, os métodos são baseados na calcinação da amostra, seguida da dissolução e filtração das cinzas. Estes procedimentos requerem, no mínimo, 4 h de calcinação a temperaturas de até  $500^\circ\text{C}$ , o que consome muito tempo e energia. Além disto, o pré-tratamento é realizado em sistema aberto.

Sistemas em fluxo têm sido propostos para determinação de  $\text{P}_i$  em plantas, inclusive permitindo a diferenciação entre  $\text{P}_i$  e  $\text{P}_o$ , com módulos de análise com adição contínua de reagentes (VIEIRA e NOGUEIRA, 2004) ou multicomutação (ROCHA e ROCHA, 2013b). Um sistema em fluxo monossegmentado também foi utilizado para a determinação de  $\text{P}_i$



(MARUCHI, 2006) com vantagens em relação ao procedimento em batelada. Nesse caso, a contenção da zona de amostra entre bolhas de ar minimizou consideravelmente a dispersão, permitindo o aumento do tempo de residência e, conseqüentemente, o tempo para o desenvolvimento da reação do azul de molibdênio. Dessa forma, os limites de quantificação podem ser variados com a extensão do reator, limitado às condições químicas do meio. Com as condições otimizadas, foi observada resposta linear entre 0,5 e 25 mg L<sup>-1</sup> de P<sub>I</sub>. Por outro lado, a frequência analítica diminuiu com o maior tempo de residência. Em todos os casos, foram garantidas adequadas precisão e frequência analítica com baixo consumo de reagentes e geração de resíduos.

#### **1.4 Fósforo em derivados de materiais vegetais e procedimentos para determinação.**

O biodiesel é um combustível biodegradável produzido a partir da transesterificação de óleos vegetais ou animais. A queima deste tipo de combustível emite menos poluentes, o que torna o seu uso ambientalmente mais amigável que o do óleo diesel (RAMADHAS *et al*, 2004). Entretanto, um dos problemas encontrados na produção e comercialização do biodiesel está na sua instabilidade a depender das condições de armazenamento, como temperatura, luminosidade e oxidação catalisada por alguns metais (KNOTHE, DUNN, 2003; PALIGOVÁ *et al*, 2008; KNOTHE, 2007).

A presença de certos elementos no biodiesel está atrelada a obtenção dos óleos vegetais empregados como matéria-prima. Tais óleos são obtidos a partir de grãos, como os de soja, que apresentam diferentes teores de elementos químicos a depender da região onde foram cultivados, como o solo foi tratado e como o processamento e armazenamento foram realizados. Adicionalmente, pesticidas e fertilizantes também podem estar presentes (ANSARI *et al*, 2009). Além da produção de biodiesel, os óleos vegetais são extensamente comercializados pela indústria alimentícia. Nesse caso, o controle de qualidade é necessário para garantir que as propriedades dos óleos comestíveis não sejam alteradas.

O fósforo é um dos elementos naturalmente presentes em óleos comestíveis e no biodiesel que exige monitoramento. No biodiesel, esse elemento advém dos fosfolípidos da matéria-prima e a sua queima com excesso de P causa mau funcionamento em catalisadores automotivos (MENDOW *et al.*, 2008). De acordo com a Agência Nacional do Petróleo (ANP), o teor máximo permitido de P<sub>T</sub> em biodiesel (ANP, 2012) é de 10 mg kg<sup>-1</sup>.

Em óleos vegetais refinados (HAMM *et al.*, 2013), o  $P_T$  pode atingir de 2,0 a 5,0 mg kg<sup>-1</sup>, não podendo ultrapassar 200 mg kg<sup>-1</sup> para que as propriedades organolépticas não sejam alteradas.

O método oficial para determinação de P em óleos comestíveis e biodiesel é baseado na espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado, ICP OES (CHAVES *et al.*, 2010). Este procedimento exige o uso de equipamento com alto custo de aquisição e manutenção. Além disso, para o biodiesel, o limite de quantificação de  $P_T$  é próximo ao limite permitido pela ANP.

Alguns métodos com limites de quantificação mais baixos e menores consumos de reagentes foram propostos. Um exemplo foi o procedimento em fluxo utilizado para determinação espectrofotométrica de  $P_T$  em biodiesel após decomposição em bloco digestor (LIRA *et al.* 2011). Esse procedimento permitiu a quantificação de 4,6 mg kg<sup>-1</sup>  $P_T$  utilizando digestão da amostra em meio ácido por 3 h. Além disso, a geração de efluentes foi diminuída em 10 vezes em relação ao procedimento oficial.

De forma geral, a determinação de P em óleos vegetais e biodiesel exige a decomposição da amostra, pois o P na matéria orgânica não forma o complexo com o molibdênio (NAGUL *et al.*, 2015; GEDANSKY *et al.*, 1960). Tanto a decomposição por via seca quanto por via úmida são relativamente demoradas, consumindo, no mínimo 40 min para atingir a decomposição quantitativa. No caso do procedimento por combustão (GEDANSKY *et al.*, 1960), são necessários, no mínimo, 16 min para o preparo. No entanto existem riscos atrelados a combustão e as temperaturas altas atingidas.

No caso da decomposição assistida por micro-ondas, há o consumo de ácidos minerais e oxidantes concentrados, o que torna o procedimento ambientalmente agressivo e perigoso. Esse tipo de preparo é vantajoso quando realizado em escalas menores de (ROCHA *et al.*, 2013), como observado anteriormente para decomposição de amostras biológicas visando determinações elementares (FLORES *et al.*, 2001; CAMPOS *et al.*, 2009). Nesses trabalhos, quantidades menores que 200 mg de amostra e 200 µL de reagentes foram empregados empregando micro-ondas doméstico (FLORES *et al.*, 2001) ou um bloco digestor construído em laboratório (CAMPOS *et al.*, 2009). Devido às quantidades de amostras e reagentes empregadas, essa estratégia é denominada microdigestão ou microdecomposição.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar sistemas de análises em fluxo para determinação de ortofosfato em material vegetal e derivados empregando o método do azul de molibdênio. Os objetivos específicos incluem:

- Otimização de extração sólido-líquido em linha para determinação de fósforo inorgânico em material vegetal;
- Otimização de um sistema de análises em fluxo com alta sensibilidade para determinação de fósforo total em óleos comestíveis e biodiesel;
- Avaliação da microdecomposição assistida por micro-ondas para mineralizar amostras de óleos e biodiesel.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Equipamentos e acessórios

O sistema em fluxo com penetração de zonas com extração em linha foi construído com uma bomba peristáltica de oito canais, modelo ICP-8 (Ismatec, Cole Parmer, Wertheim, Alemanha), equipado com tubos Tygon® de 1,8 mm e de 4,0 mm d.i. (Ismatec), tubos de polietileno e politetrafluoroetileno (0,76 mm i. d), dois injetores proporcionais confeccionados em acrílico e juntas de confluência de seis vias construídas em PEEK®(Ismatec). O sistema em fluxo para determinação de P em óleos e biodiesel foi construído com microbombas solenoide (Biochem) com volumes nominais de 20 e 40 µL e tubos de politetrafluoroetileno. O controle das microbombas foi realizado através de um microcontrolador Arduino UNO®, sendo a rotina de controle escrita em linguagem aberta compatível. O driver de corrente foi obtido através de uma interface a qual foi construída no laboratório (ROCHA, 2013) baseada em um dispositivo ULN 2803.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas utilizando um espectrofotômetro modular multicanal (Ocean Optics, Dunelin, FL, EUA) composto por uma fonte luminosa de tungstênio-halogênio, cabos de fibra óptica de 600 µm e suporte de 10 mm para cubeta de fluxo (Hellma, Müllheim, Germany; volume interno 80 µL) ou uma cela de longo caminho óptico de 100 cm com volume interno de 250 µL (Ocean Optics). Para a aquisição de dados foi utilizado o software SpectraSuite® (Ocean Optics) em um computador HP intel core i3.

Um agitador magnético (Quimis, Diadema, SP, Brazil), uma centrífuga (Hettich Kirchlengern, Germany) e um micro-ondas doméstico de 31 L e 900 W (Electrolux) também foram empregados.

### 3.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada e reagentes químicos de grau analítico. Soluções estoque  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Sigma, St. Louis, MO, USA)  $12 \text{ mmol L}^{-1}$  ou  $8 \text{ mmol L}^{-1}$  foram preparadas através da dissolução do reagente em  $\text{HNO}_3$   $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (ambos Sigma), respectivamente. Soluções dos agentes redutores ácido ascórbico  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  (Sigma) e  $\text{SnCl}_2$   $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$  (Sigma) foram preparadas após dissolução dos reagentes, respectivamente, em água e  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ . A solução estoque de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma) foi diariamente preparada a partir da dissolução do sal em água para se obter concentração de fósforo de  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ . Uma solução de  $\text{NaOH}$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  também foi preparada a partir da dissolução da base em água. Ácido nítrico e  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrados foram utilizados para a microdecomposição de amostras.

As amostras de óleo de soja foram adquiridas em mercado local. O material vegetal (caule e folha de xique-xique, trigo e soja) e o biodiesel foram doados por pesquisadores do Centro Nuclear de Energia na Agricultura da Universidade de São Paulo. As amostras sólidas foram previamente moídas em moinho de facas para obtenção de partículas menores que  $60 \mu\text{m}$  e secas a  $80^\circ\text{C}$  por duas horas em estufa. Após o tratamento, foram armazenadas em dessecadores contendo sílica como material secante.

### 3.3. Procedimentos propostos

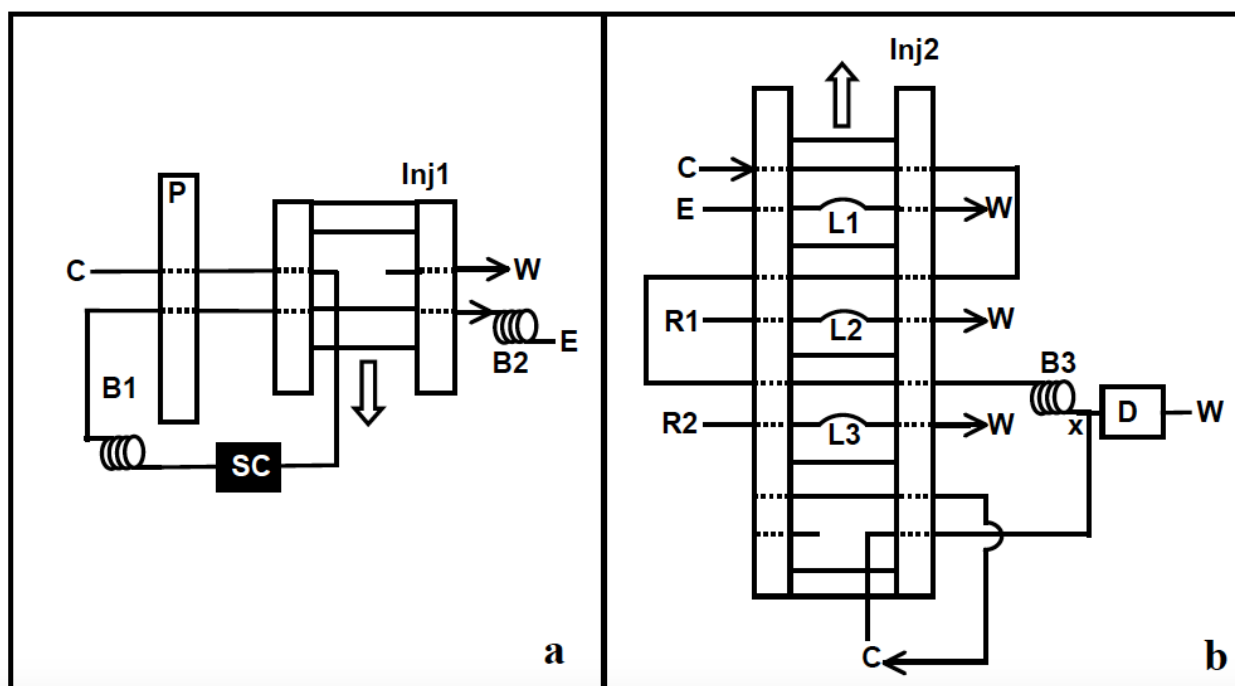
#### 3.3.1 *Extração em linha e determinação de fósforo em material vegetal.*

Para a determinação de  $\text{P}_i$ , foi utilizado um sistema de análises em fluxo com penetração de zonas (Figura 1) que foi desenvolvido previamente (ARAKAKI, 2016). A determinação espectrofotométrica foi baseada no método do azul de molibdênio.

O sistema apresentado na Figura 1a representa a seção onde foi realizada a extração em linha. Inicialmente,  $20 \text{ mg}$  de amostra sólida seca foi pesada com exatidão e inserida em um segmento de tubo polimérico de  $4 \text{ cm}$  e  $4 \text{ mm d.i.}$  Em seguida, a coluna construída (SC) foi inserida no percurso para a extração em linha. Inicialmente, o extrator

foi inserido no sistema utilizando a posição do injetor apresentada na Figura 1a. Após o preenchimento do percurso B1, o injetor foi comutado e a extração foi realizada por 60 s. A seguir, o injetor foi novamente comutado e a bomba peristáltica foi mantida ligada por 50 s, que foi o tempo necessário para que uma porção do extrato atravessasse a bobina B2 e preenchesse a alça de amostragem L1 da Figura 1b.

**Figura 1.** Diagrama do sistema de análises em fluxo para determinação de  $P_i$  em material vegetal, englobando o sistema de extração (a) e o de determinação de fósforo (b). Inj1 e Inj2: Injetores proporcionais; B1, B2 e B3: bobinas helicoidais; L1-L3: alças de amostragem; P: bomba peristáltica; R1:  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} + H_2SO_4$ ; R2: ácido ascórbico; C: carregador ( $H_2O$ ); D: célula de detecção espectrofotométrica em fluxo; SC: coluna contendo 20 mg de amostra sólida; E: saída e entrada entre os módulos; W: recipientes de descarte. As setas brancas indicam o sentido de comutação dos dispositivos.



**FONTE:** Adaptado de ARAKAKI, 2016

A Figura 1b representa o diagrama de fluxos empregado para a determinação que foi desenvolvido previamente (ARAKAKI, 2016). As alças L1, L2 e L3 continham o extrato aquoso, o molibdato de amônio e o ácido ascórbico, respectivamente. Ao comutar o injetor, o carregador (água) transportava as zonas de amostra e de reagentes para a bobina B3, causando a mistura devida à penetração de zonas, seguindo para o sistema de detecção espectrofotométrica (700 nm).

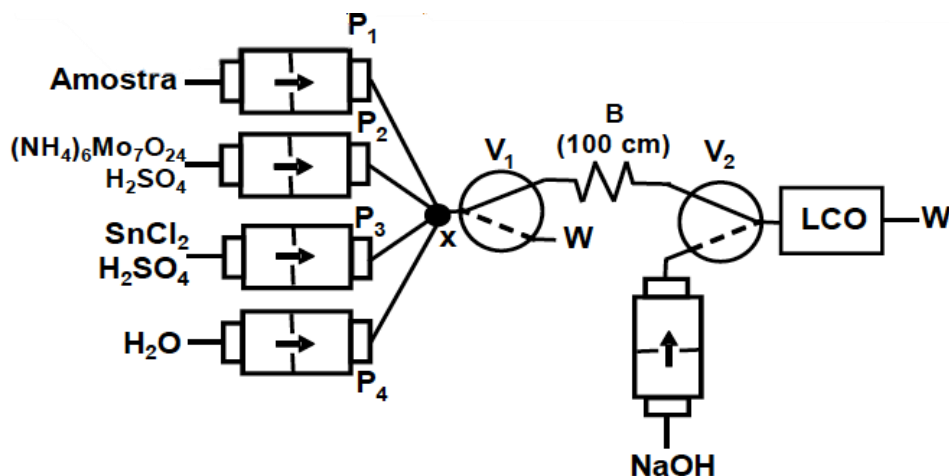
### 3.3.2. Procedimento de referência

Para avaliar a exatidão do procedimento proposto para determinação de  $P_I$  em material vegetal, um procedimento alternativo devidamente validado foi utilizado (MARUCH *et al.*, 2006). Em um frasco de polipropileno de 50 mL, 200 mg de amostra e 15 mL de água foram misturados e submetidos a agitação constante durante 10 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e filtradas. O volume foi completado com água para 20 mL antes da determinação espectrofotométrica de  $P_I$  pelo método do azul de molibdênio. As determinações foram realizadas usando as mesmas condições de reação presentes no procedimento de referência, misturando 1 mL de amostra em 1 mL de heptamolibdato 2,5 mmol L<sup>-1</sup> em ácido sulfúrico 0,25 mol L<sup>-1</sup> e 1 mL de ácido ascórbico, 0,15 mol L<sup>-1</sup>. A mistura foi mantida em repouso por 10 min e o volume foi completado até 5,0 mL com água. As determinações espectrofotométricas foram realizadas em 730 nm.

### 3.3.3. Sistema de análises em fluxo para determinação de $P$ total em óleos comestíveis e biodiesel

O sistema de análises em fluxo com alta sensibilidade para determinação de  $P_T$  está apresentado na Figura 2. Primeiramente a amostra e os reagentes foram inseridos pelo acionamento das microbombas P1 (6 pulsos, totalizando 120  $\mu$ L), P2 e P3 (1 pulso em ambas, totalizando 20  $\mu$ L, cada), o que configurou um ciclo de amostragem. Este ciclo foi repetido mais uma vez antes do acionamento de P4 (90 pulsos, totalizando 3600  $\mu$ L de carregador). Assim, a zona de amostra atravessou a bobina B de 100 cm, atingiu o detector espectrofotométrico e, por fim, o descarte (W). Posteriormente uma etapa de limpeza é iniciada para evitar a deriva da linha base. A microbomba P5 inseriu 300  $\mu$ L de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> (15 pulsos), seguido do acionamento de P4 para a remoção da solução de limpeza com 3600  $\mu$ L de água. Os parâmetros como volume de amostra, ciclos de amostragem, volume e concentração de reagentes foram otimizados utilizando de forma univariada.

**Figura 2.** Diagrama do sistema de análise em fluxo utilizando microbombas. P1: Amostras; P2 e P3: Reagentes 1 e 2, respectivamente; P4: Carregador, H<sub>2</sub>O; V1 e V2: Válvulas para controle de injeção de reagentes; B: Reator de 100 cm; LCO: Aparatos de detecção como célula de longo caminho óptico e espectrofotômetro; W: Recipiente para descarte.



FONTE: Autoria própria

### 3.3.4. Microdecomposição das amostras

As amostras de biodiesel e de óleo vegetal foram mineralizadas a partir de um procedimento em microescala com um micro-ondas doméstico. Em um tubo Falcon® de 50 mL, foram adicionados 20 mg de amostra (aproximadamente 20 µL) e 150 µL de HNO<sub>3</sub> concentrado. O tubo foi tampado e submetido ao aquecimento em forno de micro-ondas (mantido na capela) em potência máxima (900 W) por 2 min. Em seguida, mais 150 µL de HNO<sub>3</sub> foi adicionado, sendo a mistura novamente submetida a 2 min de aquecimento. Por fim, foi adicionado 150 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrado, sendo repetido o aquecimento por 2 min. A seguir, o digerido foi avolumado para 5,0 mL previamente à determinação de P<sub>T</sub>.

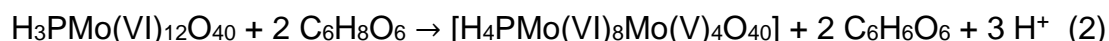
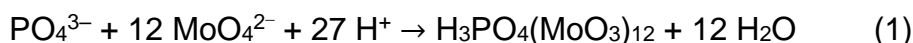
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Extração em linha de P<sub>I</sub> em material vegetal

#### 4.1.1 Otimização

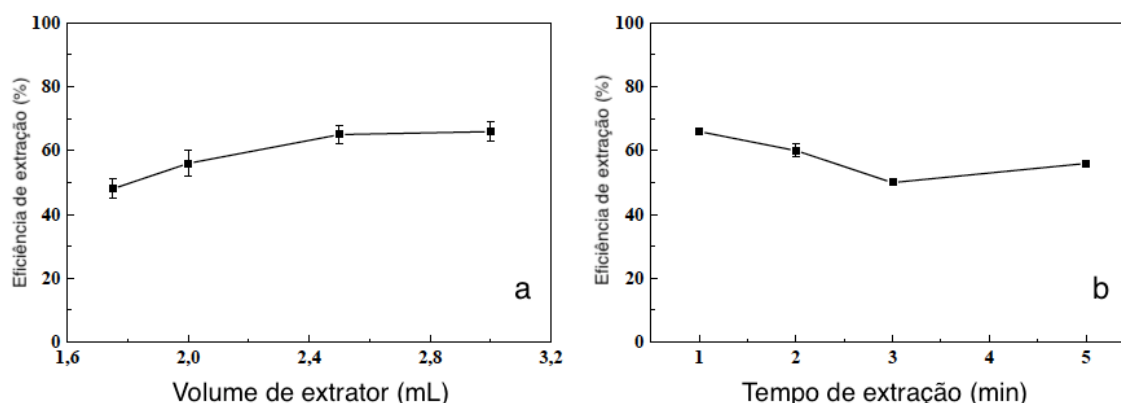
O método do azul de molibdênio foi empregado para a quantificação de P<sub>I</sub> solúvel em extratos de materiais vegetais (folha e caule) obtidos após extração em linha. As reações simplificadas e genéricas 1 e 2 representam a derivação química utilizando heptamolibdato e ácido ascórbico (NAGUL *et al.*, 2015). O módulo de extração (Figura 1a)

foi otimizado com algumas alterações em relação ao utilizado anteriormente (ARAKAKI, 2016), i.e. a etapa de coleta e injeção do extrato feita manualmente foi substituída pela extração em linha e injeção sequencial do extrato na etapa de determinação de  $P_I$  (Figura 1).



O módulo de extração foi construído com um injetor proporcional de modo a permitir a entrada de água no sistema em uma das posições. Ao comutar o injetor, uma bobina situada em um circuito fechado permitia a passagem do extrator pela coluna contendo a amostra sólida, de forma a possibilitar o contato do extrator com a amostra. O tempo de extração pôde ser controlado pela vazão da bomba peristáltica ou pelo tempo em que o extrator foi mantido em recirculação. Além disso, o volume do extrator também é um parâmetro importante porque pode afetar a extração do  $P_I$ . Sendo assim, tanto o volume do extrator quanto o tempo de extração fixando uma vazão de  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ , foram otimizados. A otimização foi realizada com amostra de xique-xique que apresentou teor de P igual a  $1,66 \text{ mg g}^{-1}$ , obtido com um procedimento de referência (MARUCHI, 2006). Dessa forma, os resultados foram expressos em porcentagem de extração (Figura 3). O tempo de extração foi definido pelo cronômetro da bomba peristáltica e a variação de volume do extrator foi realizada alterando o comprimento da bobina B1 na Figura 1a.

**Figura 3.** Parâmetros otimizados para extração em fluxo. Eficiência de extração obtida após variação do volume de extrator (a) e do tempo de extração (b). Os sinais foram obtidos em triplicata.



**Fonte:** Autoria própria



De acordo com a Figura 3a, a eficiência de extração (EE) aumentou até 2,5 mL de extrator (equivalente a um percurso de 500 cm). Acima desse valor, a EE não variou significativamente. Por esse motivo, o volume de 2,5 mL de extrator foi selecionado para estudos posteriores. O aumento do volume permitiu que uma maior quantidade de água isenta de analito entrasse em contato com a amostra, o que favoreceu a extração do Pi. Por outro lado, o tempo de extração diminuiu a EE (Figura 3b). Tempos maiores permitiram uma homogeneização do extrato dentro do *loop*. Com tempos menores, a frente do extrato apresentava o perfil de dispersão normalmente observado em sistemas em fluxo, i.e. com um centro contendo maior concentração do analito. Sendo assim, 60 s foi selecionado para extração. Esse tempo foi o mínimo para que todo extrato atravessasse a coluna contendo a amostra por, no mínimo, uma vez.

Os parâmetros foram otimizados em função de 20 mg de amostra. Com o aumento dessa quantidade para 40 mg, como esperado, houve diminuição da EE. O dobro de massa de amostra necessitaria aproximadamente o dobro do volume de extrator para que fosse obtida uma extração com EE semelhantes. Resumidamente, foi estabelecido o emprego de 2,5 mL de extrator mantido em recirculação por 60 s utilizando 20 mg de amostra.

#### 4.1.2. Características analíticas, avaliação da exatidão e comparação crítica

O procedimento utilizado apresentou faixa linear de 2,0 a 30,0 mg L<sup>-1</sup>, descrita pela equação  $A = 0,049 C_P + 0,067$ ,  $r = 0,999$ , onde o A é a absorbância e C<sub>P</sub> é a concentração de fósforo em mg L<sup>-1</sup> utilizando parâmetros empregados anteriormente (ARAKAKI, 2016). O coeficiente de variação (n = 20), limite de detecção (n = 20, 99,7% de confiança) e frequência de determinação foram estimados em 1,2 %, 0,50 mg L<sup>-1</sup> e 40 h<sup>-1</sup>, respectivamente. Considerando o tempo para extração, a frequência de determinação diminuiu para 18 determinações por hora, entretanto, com a realização da extração em linha. Para cada determinação foram gerados aproximadamente 5,5 mL de resíduos, sendo 3 mL para a quantificação e 2,5 mL para extração.

A eficiência de extração para a xique-xique foi estimada em (65 ± 3) %, n = 5. Visando uma aplicação analítica para outras amostras, a comparação se estendeu para determinação de folhas e caule de café, e figueira (n = 5) obtendo-se eficiências de extração de (65 ± 3) % e (65 ± 5) %, respectivamente. No entanto, a extração em grãos de soja foi

de  $(80 \pm 4) \%$ , indicando que a aplicação deste método para alimentos requer estudo prévio das eficiências de extração.

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos da determinação de fósforo através dos procedimentos proposto e de referência (em batelada). Utilizando ambas as extrações, os resultados obtidos foram estatisticamente equivalentes (nível de confiança de 95%).

**Tabela 1.** Valores obtidos de fósforo inorgânico, em  $\text{mg g}^{-1}$ , na determinação de amostras de planta utilizando método em batelada e em fluxo, utilizando extração em fluxo e em batelada. As amostras foram analisadas em triplicata.

Amostra	Fósforo inorgânico / ( $\text{mg g}^{-1}$ )	
	Método em fluxo	Método em batelada
Crotalária 1	$1,75 \pm 0,01$	$1,73 \pm 0,03$
Crotalária 2	$1,49 \pm 0,01$	$1,59 \pm 0,02$
Crotalária 3	$1,80 \pm 0,01$	$1,79 \pm 0,01$
Café	$0,260 \pm 0,01$	$0,270 \pm 0,01$
Figueira	$1,11 \pm 0,03$	$1,14 \pm 0,02$
Soja 1	$1,13 \pm 0,02$	$1,17 \pm 0,02$
Soja 2	$1,27 \pm 0,02$	$1,19 \pm 0,02$

Os resultados mostraram uma boa exatidão para a extração em linha e determinação de  $\text{P}_i$ , sendo uma alternativa confiável e mais limpa, visto que o consumo de reagentes e produção de resíduos foram reduzidos. Em comparação com a extração em batelada, o volume do extrator e o tempo de extração foram diminuídos em *c.a.* 10 vezes e 20 vezes, respectivamente. Outros procedimentos analíticos para extração sólido-líquido em fluxo já foram propostos utilizando câmaras de extração capazes de realizar agitação e filtração (GAVIS-SÁNCHEZ *et al.*, 2016; ALMEIDA *et al.*, 2006; TIMOFEEVA *et al.*, 2015). O procedimento proposto não exigiu a construção de tais câmaras para etapas de agitação e lavagem por explorar extrações incompletas de maneira reprodutível e dinâmica. Além disso, a filtração não foi necessária, pois lã de vidro foi inserida nas extremidades do suporte de amostra, evitando a circulação de detritos no sistema. A Tabela 2 apresenta a comparação de algumas características da extração em linha proposta com outras estratégias da literatura.

**Tabela 2.** Comparativo entre o método proposto e métodos encontrados na literatura para extração sólido-líquido.

<i>Método</i>	<i>Princípio da extração</i>	<i>Massa da amostra (mg)</i>	<i>Volume de extrator (<math>\mu</math>L)</i>	<i>RSD (%)</i>	<i>Tempo de extração (s)</i>	<i>Referência</i>
Pi em plantas e alimentos	Suporte em tubo Tygon®	20	2500	< 3,0	60	Método proposto
Nitrato em vegetais	Amostra aprisionada em uma câmara de acrílico com filtro de papel	10	500	4,0	120	(MAIA <i>et al.</i> , 2015)
Potássio permutável em solos	Formação de suspensão sob agitação magnética, aspiração e filtração	1800	9000	< 5,4	360	(TIMOFEEVA <i>et al.</i> , 2015)
Amônia em materiais de construção	Amostra e extrator em banho ultrassônico. Adição manual de reagente e transporte de analito com fluxo de gás inerte	200	3000	< 6,0	300	(CHOMCHOEI <i>et al.</i> , 2005)
Antioxidantes em cereais	Suporte da amostra entre dois filtros de seringa conectados a uma membrana de celulose. Coleta em frascos previamente à determinação	40	5000	< 2,0	900	(ROSENDE <i>et al.</i> , 2010)

**RSD:** Desvio padrão relativo.

É importante ressaltar que a análise direta do extrato logo após a extração é vantajosa porque não exige etapas adicionais de limpeza do sistema, como a troca periódica de filtros.

#### **4.2. Procedimento analítico em fluxo com alta sensibilidade para determinação de P em biodiesel e óleos vegetais após microdecomposição**

O método do azul de molibdênio foi utilizado para determinação de  $P_T$  em derivados de material vegetal. O procedimento empregado para determinação de  $P_I$  não apresentou limite de quantificação adequado para a determinação de P nessas amostras sendo assim, o aumento de sensibilidade foi estudado com uma cela de longo caminho óptico de 100 cm. O ácido ascórbico utilizado anteriormente (ARAKAKI, 2016) foi substituído pelo  $\text{SnCl}_2$  porque esse promove uma redução mais rápida do  $\text{Mo(VI)}$ . Além disso, foi observado que a geração do azul de molibdênio foi muito mais influenciada por pequenas variações de temperatura quando os reagentes foram empregados em baixas concentrações, o que afetou a precisão (ROCHA, 2013). Os parâmetros otimizados foram concentração de reagentes, volume de amostra e número de ciclos de amostragem. Uma microbomba com  $\text{NaOH}$  foi inserida no sistema para uma etapa de limpeza após a obtenção de cada triplicata, uma vez que o azul de molibdênio fica impregnado nas tubulações e na parede da cela, causando deriva de linha base.

Os ciclos de amostragem foram variados de 1 a 3, sendo escolhido 2 ciclos. Acima desse valor, o sinal diminuiu devido à maior dispersão da zona de amostra. Por outro lado, 3 ciclos apresentaram a condição de volume infinito, sendo o que o sinal foi observado enquanto a zona de amostra estava em formação. O perfil da linha de tendência do volume de amostra apresentou aumento até 240  $\mu\text{L}$ . Acima desse valor, volume infinito também foi observado, sendo o nível máximo avaliado selecionado para estudos posteriores.

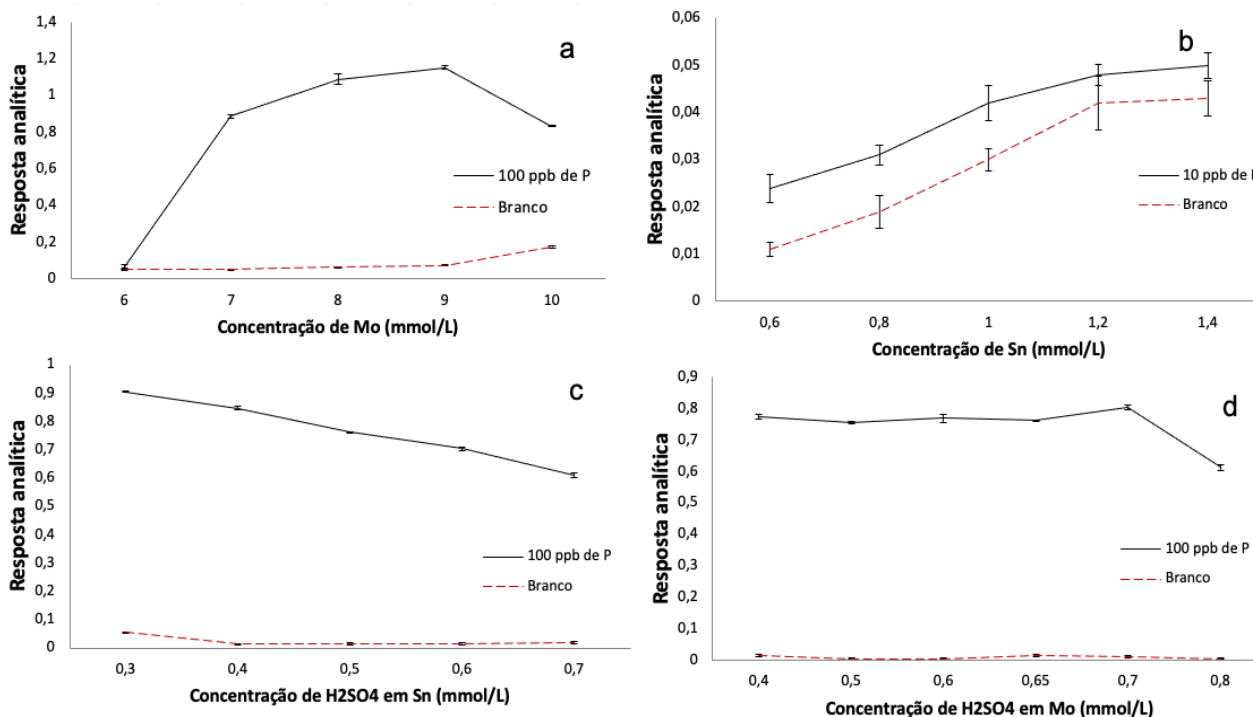
O efeito da concentração de reagentes sobre o sinal está apresentado na Figura 4. As concentrações selecionadas dos reagentes foram 8,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de heptamolibdato de amônio em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  e 0,6  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{SnCl}_2$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,4  $\text{mmol L}^{-1}$ . De acordo com a Figura 4a, a resposta analítica aumentou com a concentração de molibdênio até 8,0  $\text{mmol L}^{-1}$ , com a tendência a diminuir acima dessa concentração por causa da acidez do meio. A formação do azul de molibdênio depende de uma razão entre as concentrações de Mo e  $\text{H}^+$  (NAGUL *et al.*, 2015), podendo o sinal diminuir com a variação dessa proporção

que gera diferentes espécies químicas de azul de molibdênio com variadas absorvidades. O aumento da concentração de Mo também causou o aumento do branco, o que era esperado porque com altas concentrações de Mo causam a formação do composto azul na ausência de P.

O aumento da concentração  $\text{SnCl}_2$  aumentou tanto o sinal do branco quanto do P (Figura 4b). Ao realizar este estudo, foi observado que o resíduo apresentou uma suspensão de coloração branca, provavelmente devido à precipitação de hidróxido de Sn(II) e/ou Sn(IV). Isso poderia ter sido evitado com a preparação do reagente em HCl, onde a formação de cloro complexos evitaria a precipitação do cátion. Entretanto, para  $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ , o sinal do branco não foi baixo, não sendo necessária a mudança do meio. Além disso, o uso de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  proporciona maior taxa de formação de espécies de azul de molibdênio com maior absorvidade em comparação com outros ácidos minerais (NAGUL *et al.*, 2015).

Apesar de necessária para a formação do ácido fosfomolibdico, a acidez muito elevada do meio também contribuiu para diminuição do sinal. Em certas razões de concentração de Mo e  $\text{H}^+$ , há alteração da velocidade de formação de diferentes espécies de azul de molibdênio, que apresentam diferentes absorvidades. Sendo assim, a diminuição do sinal observado nas Figuras 4c e 4d ocorreu devido às alterações cinéticas proporcionadas pela alta acidez.

**Figura 4.** Efeito da variação da concentração de molibdato (a), SnCl<sub>2</sub> (b) e de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no SnCl<sub>2</sub> (c) e no molibdato (d) sobre as respostas do branco (- -) e da solução de P (—), n = 3 para todos os pontos. Demais condições: 240 µL de amostra, 2 ciclos de amostragem e 40 µL de cada reagente. Detecção em 750 nm.

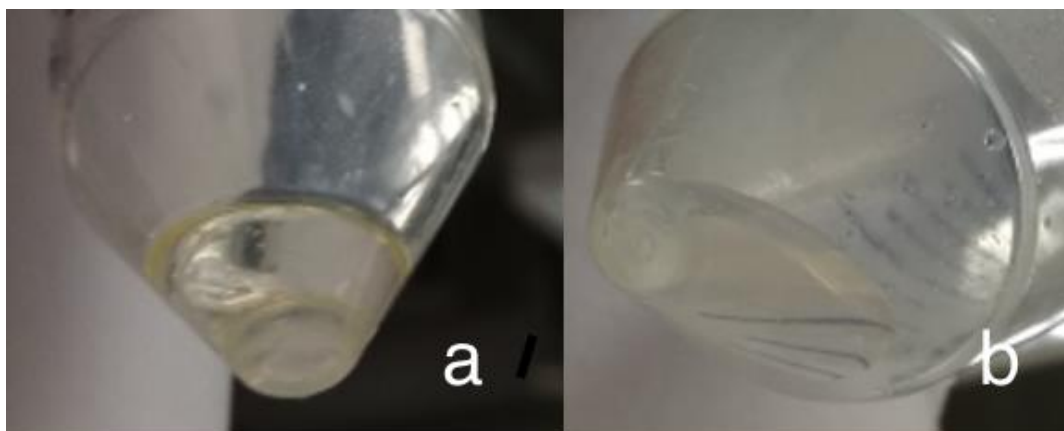


**FONTE:** Autoria própria.

Após a otimização dos principais parâmetros, foi obtida uma curva analítica descrita pela equação  $A = 0,0064 C_P + 0,067$  ( $R^2 = 0,996$ ), onde A é a resposta analítica e  $C_P$  é a concentração de P<sub>I</sub> em  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Foi observada faixa linear entre 10 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , limite de detecção de 1,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $n = 20$ , 99,7% de confiança) e coeficiente de variação de 2,7% ( $n = 5$ , 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). O sistema foi capaz de realizar 83 determinações por hora, gerando e 2,5 mL de efluentes por determinação.

O sistema apresentou baixo limite de detecção, alta frequência de determinação, baixo consumo de reagentes e baixa produção de resíduos, sendo adequado para quantificação de baixas concentrações de fósforo. Sendo assim, a microdecomposição foi aplicada de forma similar àquela desenvolvida para amostra de material vegetal (CAMPOS, 2019). A digestão foi realizada com 20 mg de amostra, seguida de adição de HNO<sub>3</sub> concentrado e aquecimento por 2 min (realizada duas vezes). A seguir, foi adicionado 150 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrado e aquecido por 2 min. Em seguida, o digerido foi avolumado a 5 mL. A fase orgânica, que era visível quando misturada com água (Figura 5a), desapareceu após o tratamento da amostra (Figura 5b), indicando uma degradação eficiente.

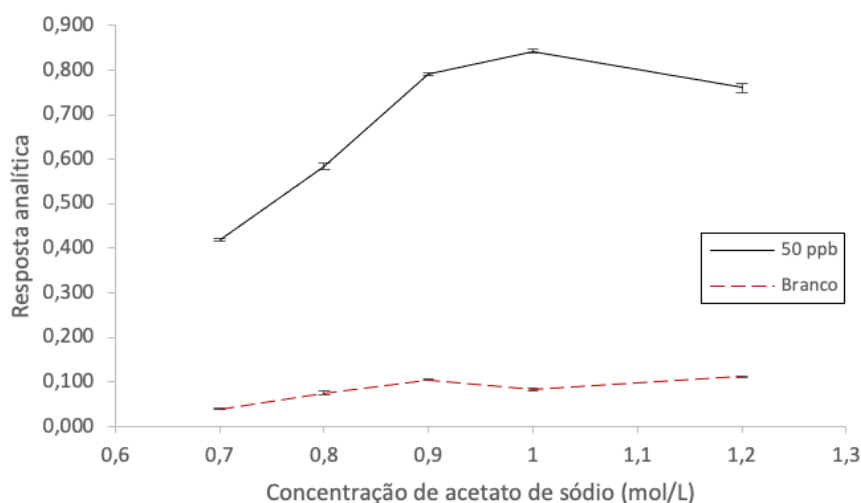
**Figura 5.** Fotografias da mistura de amostra de biodiesel e água (a) e do digerido após decomposição em microescala (b).



**FONTE:** Autoria própria.

Apesar de visualmente ter apresentado uma boa eficiência de decomposição, as recuperações do analito foram  $< 10\%$ . Para identificar a fonte da interferência, foram obtidos sinais com solução de fósforo  $50\ \mu\text{g L}^{-1}$  na presença de  $\text{HNO}_3\ 0,84\ \text{mol L}^{-1}$ , que seria a concentração final do ácido sem a decomposição. Nessa condição, foi observada a supressão da resposta. Para superar essa interferência, o ajuste de acidez foi avaliado com a adição de acetato de sódio. Esse reagente foi escolhido porque forma uma solução tampão com pH em torno de 4,5, sendo o ajuste mais simples do que se fosse adicionada uma base forte. A Figura 6 mostra o comportamento do sinal após a adição de diferentes concentrações de acetato de sódio.

**Figura 6.** Resposta analítica para  $50\ \mu\text{g L}^{-1}$  de fósforo (—), e seu respectivo branco (- - -), pela concentração de acetato de sódio, com a presença de ácido nítrico concentrado ( $300\ \mu\text{L}$ ) proveniente do tratamento de amostra ( $n = 3$ ).



**FONTE:** Autoria própria.

De acordo com a Figura 6, o sinal foi observado com o ajuste do pH utilizando concentrações de acetato de sódio maiores que  $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ . O valor ótimo foi observado com  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ , apresentando variação de ca. 6,0 % quando  $0,9 \text{ mol L}^{-1}$  foi empregado. Sendo assim, foi selecionado  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  de acetato de sódio.

O mesmo estudo foi realizado na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que causou diminuição do sinal de 90 %. Visualmente, foi perceptível que mesmo pequenas quantidades de peróxido inviabilizavam a formação do azul de molibdênio. Isso ocorreu porque o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ter reoxidado o Mo(V) a Mo(VI), decompondo o composto azul formado. O excesso desse reagente pode ser eliminado com adição de KI, por exemplo. A seguir, o  $\text{I}_3^-$  gerado pode ser convertido a iodeto novamente com tiosulfato de sódio, por exemplo, para evitar interferência espectral. Entretanto, como o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é bastante suscetível à decomposição durante o preparo, estudos de recuperação nas amostras devem ser conduzidos previamente à eliminação dessa interferência.

## 5. CONCLUSÕES

Para fins analíticos a extração incompleta em fluxo (estimada em 65% de eficiência) é uma excelente alternativa para ser acoplada a uma determinação em fluxo, oferecendo menos consumo de reagentes e menor produção de resíduos contribuindo para uma química mais verde.

O procedimento analítico adotando cela de longo caminho óptico e microbombas apresentou alta sensibilidade para determinação de P, consumo ainda menor de reagentes e uma alta frequência de determinação. No entanto, estudos ainda devem ser realizados para eliminar interferências para determinação de P em biodiesel e óleo vegetal.

## 6. PERSPECTIVAS

Estudos envolvendo fotoconversão podem ser realizadas a fim de acoplar uma etapa de digestão em linha de fósforo orgânico após a extração, visando ao fracionamento de fósforo em material vegetal. Adicionalmente, um sistema empregando microbombas solenoide será mais facilmente explorada para a realização de multitarefas.



Futuramente, a os principais parâmetros da microdigestão devem ser avaliados, como tempo e concentração dos reagentes. A análise de carbono orgânico total nos digeridos será o indicativo da eficiência da decomposição da matéria orgânica. Alternativas serão exploradas para anular a interferência do peróxido de hidrogênio na formação do azul de molibdênio para a determinação de P. Por fim, a comparação com procedimentos de referência deve ser realizada.

## 7. REFERÊNCIAS

Agência Nacional do Petróleo, ANP. Resolução 14/2012, disponível em <http://nxt.anp.gov.br>, acesso em 17/07/2018.

ALMEIDA M.I.G.S., SEGUNDO M.A., LIMA J.L.F.C., RANGEL A.O.S.S., Potentiometric multisyringe flow injection system for determination of exchangeable potassium in soils with inline extraction. **Microchem. J.**, 83 (2006), 75-80.

ANSARI R., KAZI T.G., JAMALI M.K., ARAIN M.B., WAGAN M.D., JALBANI N., AFRIDI H.I., SHAH A.Q., Variation in accumulation of heavy metals in different varieties of sunflower seed oil with the aid of multivariate technique, **Food Chemistry**, 115 (2009), 318–323.

ARAKAKI, C. Y. **Extração sólido-líquido em sistema de análise em fluxo para a determinação de fósforo solúvel em materiais vegetais**. Trabalho de Conclusão de Curso. Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal Do ABC (UFABC), Santo André, 2016.

BARRA, C. M, SANTELLI, R. E., ABRÃO, J. J., & GUARDIA, M. de la. Especificação de arsênio: uma revisão. **Química Nova**, 23 (2000), 58-70.

BIELESKI, R. L. Phosphate Pools, Phosphate Transport, and Phosphate Availability. **Annual Review of Plant Physiology**, 24(1973), 225–252.

CAMPOS, M. A. **Determinação espectrofotométrica de fósforo em materiais vegetais empregando microdigestão e sistema de análise em fluxo**. Trabalho de Conclusão de Curso. Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC (UFABC), Santo André, 2019.

CAMPOS, R., C., VEGUERIA, S., F., J., GONÇALVES, R., A., WAGENER, Â., L., R. A microdigestion procedure directly performed in the autosampler cups for the determination of trace elements in biological samples by GF AAS. **J. Braz. Chem. Soc**, 20 (2009), 1925-1930.

CARNEIRO, J. M. T. *et al.* Spectrophotometric determination of phytic acid in plant extracts using a multi-pumping flow system. **Analytica Chimica Acta**, 474 (2002), 161-166.

CHAPARRO, L. L., *et al.* Automated system for on-line determination of dimethylarsinic and inorganic arsenic by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 404 (2012), 1589-1595.

CHAVES E. S., Santos E., Araujo E., Oliveira R., Frescura J., Curtius V., A. Metals and phosphorus determination in vegetable seeds used in the production of biodiesel by ICP OES and ICP-MS. **Microchem. J.** 96 (2010), 71-76.

CHOMCHOEI R., MIRÓ M., HANSEN E.H., SHIOWATANA J., Sequential injection system incorporating a micro-extraction column for automatic fractionation of metal ions in solid samples. Comparison of the extraction profiles when employing uni-, bi-, and multi-bidirectional flow plus stopped-flow sequential extraction modes, **Anal. Chim. Acta**, 536 (2005), 183-190.

DALPONTE, I., Mathias, A. L., Jorge, R. M. M., & Weinschutz, R. Degradação fotocatalítica de tartrazina com TiO<sub>2</sub> imobilizado em esferas de alginato. **Quimica Nova**, 39 (2016), 1165-1169.

DOS ANJOS, S. L., ALVES, J. C., ROCHA SOARES, S. A., ARAUJO, R. G. O., DE OLIVEIRA, O. M. C., QUEIROZ, A. F. S., & FERREIRA, S. L. C. Multivariate optimization of a procedure employing microwave-assisted digestion for the determination of nickel and vanadium in crude oil by ICP OES. **Talanta**, 178 (2018), 842-846.

DOST, K.; TOKUL, O. Determination of phytic acid in wheat and wheat products by reverse phase high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, 558 (2006), 22-27.

ELLINGSON, D. *et al.* 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**, 95 (2012), 1469-1478.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Adubação verde**. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/documents/1355054/1527012/4a+-+folder+Aduba%C3%A7%C3%A3o+verde.pdf/6a472dad-6782-491b-8393-61fc6510bf7d>. Acesso em 11/07/2016.

FLORES, É., M., M., SAIDELLES, A., P., F., BARIN, J., S., MORTARI, S., R., MARTINS A., F. Hair sample decomposition using polypropylene vials for determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 16(2001), 1419-1423.

GALVIS-SÁNCHEZ A.C., SANTOS J.R., RANGEL A.O.S.S., A total analytical system featuring a novel solid–liquid extraction chamber for solid sample flow analysis, **Anal. Bioanal. Chem.**, 408 (2016), 7651-7661.

GEDANSKY, S. J., BOWEN, J. E., & MILNER, O. I. Rapid Combustion Method for Determination of Phosphorus in Petroleum Products. **Analytical Chemistry**, 32 (1970), 1447-1449.

GIMBERT LJ, HAYGARTH PM, WORSFOLD PJ. Determination of nanomolar concentrations of phosphate in natural waters using flow injection with a long path length liquid waveguide capillary cell and solid-state spectrophotometric detection. **Talanta**, 71(2007),1624-1628.

GRAF, E.; DINTZIS, F. R. Determination of phytic acid in foods by high performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 30 (1982), 1094-1097.

HAMM W, HAMILTON RJ, CALLIAUW G, eds. Edible Oil Processing. John Wiley & Sons Ltd. 2<sup>a</sup> ed. **West Sussex**, 2013.

HIGUCHI, K.; TAMANOUCI, 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**, 14 (1998), 941-946.

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**, 95 (1970), 174-176.

HORWITZ, W. editor. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17<sup>a</sup> ed. **Gaithersburg**, 2000.

KNOTHE G., DUNN R.O., Dependence of oil stability index of fatty compounds on their structure and concentration and presence of metals, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 80 (2003), 1021-1026.

KNOTHE G., Some aspects of biodiesel oxidative stability – Review, **Fuel Processing Technology**, 88, (2007) 669-677.

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**, 403 (2012), 2419-2428.

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**, 64 (2004), 1091-1098.

LIRA, L. F. B., SANTOS, D. C. M. B., GUIDA, M. A. B., STRAGEVITCH, L., KORN M. G. A., PIMENTEL, M. F., PAIM, A. P. S. Determination of phosphorus in biodiesel using FIA with spectrophotometric detection. **Fuel**, 11 (2011), 3254-3258.

MAIA M.A., SOARES T.R.P., MOTA A.I.P., ROSENDE M., MAGALHÃES L.M., MIRÓ M., SEGUNDO M.A., Dynamic flow-through approach to evaluate readily bioaccessible antioxidants in solid food samples, **Talanta**, 166 (2017), 162-168.

MARCH, J. G., *et al.* Indirect determination of phytic acid in urine. **Analytica Chimica Acta**, 367 (1998), 63-68.

MARQUES, T. L., NÓBREGA, J. A., & ROCHA, F. R. P. (2019). Flow-based solid sample preparation: advantages, limitations, and challenges. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 118 (2019), 677-685.

MARSOLA, T. **Mineralização de fósforo do adubo verde e sua absorção por plantas de arroz**. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 2008.

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**, 82 (2006), 207-213.

MENDOW G, MONELLA FC, PISARELLO ML, QUERINI CA. Biodiesel production from non-degummed vegetable oils: phosphorus balance throughout the process. **Fuel Process Technol**, 92 (2011), 864-70.

NAGUL E.A., MCKELVIE I.D., Worsfold P., Kolev S.D., The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box, **Anal. Chim. Acta**, 890 (2015), 60-82.

NOACK S.R., SMERNIK R.J., MCBEATH T.M., ARMSTRONG R.D., MCLAUGHLIN M.J., Assessing crop residue phosphorus speciation using chemical fractionation and solution <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy, **Talanta**, 126 (2014), 122-129.

PALIGOVÁ J., JORÍKOVÁ L., CVENGROS J., Study of FAME stability. **Energy Fuels**, 22 (2008), 1991-1996.

RAMADHAS A.S., JAYARAJ S., MURALEEDHARAN C., Use of vegetable oils as I.C. engine fuels: A review, **Renewable Energy**, 29 (2004), 727-742.

REIS, B.F.; GINÉ, M.F.; KRONKA, E.A.M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**, 12 (1989), 82-91.

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**, 468 (2002), 119-131.

ROCHA D.L., BATISTA A.D., ROCHA F.R.P., DONATI G.L., NÓBREGA J.A. Flow-based solid sample preparation: Advantages, limitations and challenges. **TrAC Trends Anal. Chem.**, 45, pp. 79-92, 2003.

ROCHA, D.L.; ROCHA, F.R.P. A flow-based procedure with solenoid micro-pumps for the spectrophotometric determination of uric acid in urine. **Microchemical Journal**, 94 (2010), 53-59.

\_\_\_\_\_. A multipumping flow system with on-line photochemical conversion and improved sensitivity for phosphorus fractionation in freshwaters. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 93 (2013a), 1389-1401.

\_\_\_\_\_. Photochemical micro-digestion in a multi-pumping flow system for phosphorus fractionation in cereals. **Microchemical Journal**, 109 (2013b), 139-144.

ROCHA, D. L. da. **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 (Doutorado em Química). Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ROCHA, D.L.; KAMOGAWA, M.Y.; ROCHA, F.R.P. A critical review on photochemical conversions in flow analysis, **Analytica Chimica Acta**, 896 (2015), 11-33.

ROSENDE M., MIRÓ M., CERDÀ V., Fluidized-bed column method for automatic dynamic extraction and determination of trace element bioaccessibility in highly heterogeneous solid wastes, **Anal. Chim. Acta**, 658 (2010), 41-48.

RUIZ, T. P., *et al.* Flow injection chemiluminescence determination of carbaryl using photolytic decomposition and photogenerated tris(2,2'-pyridyl)ruthenium(III). **Analytica Chimica Acta**, 476 (2003), 141-148.

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**, 18 (2002), 675-679.

SCHACHTMAN, D. P.; REID, R. J.; AYLING, S. M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant Physiology**, 116 (1998), 447-453.

TIMOFEEVA I.I., BULATOV A.V., MOSKVIN A.L., KOLEV S.D.A., A gas-diffusion flow injection method coupled with online solid-liquid extraction for the determination of ammonium in solid samples, **Talanta**, 142 (2015), 140-144.

Trenkel, M.E.; *Slow- and Controlled-release and Stabilized Fertilizers: An option for enhancing nutrient use efficiency in agriculture*. 2 ed., **Paris: International Fertilizer Industry**, 2010. 160p.

TROJANOWICZ M., KOŁACIŃSKA K., Recent advances in flow injection analysis, **Analyst**, 141 (2016), 2085-2139.

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**, 52 (2004), 1800-1803.

WASEEM, A.; YAQOUB, M.; NABI, A. Photodegradation and flow-injection determination of dithiocarbamate fungicides in natural water with chemiluminescence detection. **Analytical Sciences**, 25 (2009), 395-400.