



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
Centro de Ciências Naturais e Humanas
Bacharelado em Química

MAYARA APARECIDA CAMPOS

**Determinação espectrofotométrica de fósforo em materiais vegetais
empregando microdigestão e sistema de análises em fluxo**

Trabalho de Conclusão de Curso

Santo André
2019

MAYARA APARECIDA CAMPOS

**Determinação espectrofotométrica de fósforo em materiais vegetais
empregando microdigestão e sistema de análises em fluxo**

Trabalho de Conclusão de Curso

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: Prof. Dr. Diogo Librandi da Rocha

Santo André

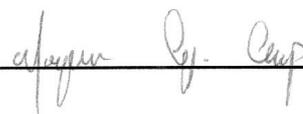
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

**Determinação espectrofotométrica de fósforo em materiais vegetais
empregando microdigestão e sistema de análises em fluxo**

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

Aluna: Mayara Aparecida Campos



Orientador: Diogo Librandi da Rocha



Santo André

2019

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Diogo Librandi da Rocha, pela oportunidade e confiança em mim na execução deste trabalho. Pelo conhecimento e experiência compartilhado. Pela sua paciência, disponibilidade, empenho e suporte prestados.

À querida Universidade Federal do ABC, por sua existência e de seu corpo docente, que permitiram minha formação na graduação.

Ao Prof. Dr. Bruno Lemos Batista, por ceder o bloco digestor e a Fernanda Pollo pela gentileza, disponibilidade e apoio.

Ao Caio, pelo auxílio com o manuseio de alguns equipamento e procedimentos.

Aos meus amigos e colegas que tive o privilégio de conhecer e compartilhar experiência. Em especial Beatriz, Jennifer pela excelente relação pessoal que criamos e que espero não se perca com o tempo.

Aos meus familiares por serem grandes incentivadores, que sempre acreditaram nos meus sonhos. Em especial Rogério, pelo incansável apoio compreensão e paciência durante todos esses anos de minha vida acadêmica, e pelas conversas enriquecedoras de todos os dias.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Absorbância.

AFM – 12-molibdofosfórico, ou ácido fosfomolibdico.

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

AM – Azul de molibdênio.

CCD – Dispositivo de carga acoplada (do inglês, *Charge-coupled devices*).

C_p – Concentração de fósforo em mg L^{-1} .

FIA – Análises por injeção em fluxo (do inglês, *Flow Injection Analysis*).

MCFA – Análises em fluxo com multicomutação (do inglês, *multicommutated flow analysis*).

P_i – Fósforo inorgânico.

P_o – Fósforo orgânico.

P_T – Fósforo total.

PTFE – Politetrafluoroetileno.

RESUMO

O fósforo é de vital importância, visto sua participação em processos biológicos de plantas e animais. A determinação total desse nutriente é essencial para estudos agronômicos e requer a decomposição da fração orgânica, sendo atualmente utilizados procedimentos demorados e com alto consumo de reagentes. A microdigestão é uma alternativa para diminuir o tempo de preparo, consumo de ácidos e agentes oxidantes, além disso não foi explorada para material vegetal. Para análises químicas, sistemas em fluxo com multicomutação permitem o processamento de amostras de forma simples, rápida e precisa, possibilitando a construção de módulos de análise compactos e versáteis. Neste trabalho, foi desenvolvido um procedimento analítico para determinação de fósforo total em material vegetal e alimento empregando o método do azul de molibdênio em um sistema de análises em fluxo com multicomutação. Faixa linear entre 0,50 e 10 mg L⁻¹ P foi obtida, sendo estimados frequência de determinação, limite de detecção e coeficiente de variação de 81 determinações por hora, 0,22 mg L⁻¹ P e 1,1 %, respectivamente. Previamente às determinações, foi realizado a microdigestão das amostras desenvolvida neste trabalho, utilizando 20 mg de amostra, 600 µL de HNO₃ concentrado e 150 µL de H₂O₂ 30% v/v. O tempo total do preparo foi de 20 min utilizando um micro-ondas doméstico. Os resultados das análises de amostras de plantas e de café comercial pelos procedimentos proposto e de referência não apresentaram diferenças significativas com nível de confiança de 95%. Portanto, foi desenvolvido um procedimento analítico rápido, ambientalmente amigável e confiável para determinação de fósforo total em material vegetal.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 7 |
| 1.1 | Fósforo em material vegetal | 7 |
| 1.2 | Preparo de amostras e microdecomposições | 8 |
| 1.3 | Sistemas de análises em fluxo com multicomutação | 10 |
| 1.4 | Determinação de fósforo em material vegetal e derivados | 11 |
| 2 | OBJETIVO | 13 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 13 |
| 3.1 | Reagentes e Soluções | 13 |
| 3.2 | Equipamentos e acessórios | 13 |
| 3.3 | Procedimento proposto | 14 |
| 3.3.1 | Sistema em fluxo para determinação de fósforo total | 14 |
| 3.3.2 | Microdigestão das amostras | 16 |
| 3.4 | Procedimento de referência | 17 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 17 |
| 4.1 | Otimização do procedimento para determinação de fósforo | 18 |
| 4.2 | Características analíticas | 24 |
| 4.3 | Otimização da microdigestão | 24 |
| 4.4 | Aplicação do procedimento e comparação crítica | 28 |
| 5 | CONCLUSÕES | 29 |
| 6 | PERSPECTIVAS | 29 |
| 7 | REFERÊNCIAS | 30 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fósforo em material vegetal

O fósforo é de vital importância biológica porque participa de processos importantes como a fotossíntese e as transformações energéticas essenciais para desenvolvimento de plantas e animais (MARUCHI, 2005). No corpo humano, toda energia produzida e armazenada depende de compostos fosforilados, como a ATP. O DNA e o RNA, que são moléculas responsáveis pela transmissão e armazenamento da informação genética, também contêm fósforo. Além disso, esse nutriente é importante para a manutenção do pH de fluidos dos seres vivos. Dependendo da função biológica, diferentes formas de fósforo são necessárias, sendo classificadas como inorgânica e orgânica (ESTELA; CERDA, 2005).

Nas plantas, o fósforo inorgânico (P_i) pode ser encontrado como ortofosfato e a forma orgânica (P_o), cerca de 85 %, majoritariamente como ácido fítico ($C_6H_{18}O_{24}P_6$), sendo essa última a principal forma de armazenamento desse nutriente para liberação a longo prazo. Dependendo das condições de temperatura e do pH, o ácido fítico é convertido a P_i sob ação da enzima fitase presente no próprio material vegetal, resultando no aumento da concentração e disponibilidade de P_i (ROCHA, 2013). O fósforo ainda pode ser encontrado nas células vegetais como fosfolipídios e como sais inorgânicos de baixa solubilidade, como o $Ca_3(PO_4)_2$ (BIELESKI, 1973). A última forma é a aquela que prontamente fornece P_i para a planta (ROCHA, 2013).

No corpo humano, o fósforo ocorre nas forma inorgânica e, em minoria, como fosfolipídios em membranas celulares e ácidos nucleicos, sendo armazenado na estrutura intercelular dos ossos na forma $Ca_5(PO_4)_3OH$ para oferecer rigidez e reserva. Com a ausência da enzima fitase no sistema digestório dos seres humanos, a degradação do ácido fítico não ocorre e, conseqüentemente, o P_o ingerido a partir de vegetais não é absorvido. Por isso, a determinação de fósforo total (P_T), não pode ser unicamente considerada para a estimativa de valores de ingestão diária, embora seja um parâmetro muito importante para fins agrônômicos.

A determinação de P_T em plantas e alimentos requer etapas de preparo de

amostras que envolvem decomposição do P_O , o que torna o fósforo presente no material vegetal facilmente detectável por diversas técnicas analíticas.

1.2 Preparo de amostras e microdecomposições

O preparo da amostra para análises químicas permite a conversão do analito em uma forma mais facilmente detectável, para separá-lo da matriz, ou até mesmo concentrar a espécie de interesse, melhorando a seletividade e minimizando interferências. Entretanto, muitas vezes é a etapa da análise química que consome maior tempo (KRUG e ROCHA, 2016; ROCHA *et al.*, 2015).

Para uma análise química, a homogeneidade da amostra deve ser garantida, além das condições que evitem contaminação, incidência de luz, absorção de umidade e variações de temperatura (IAL; 2008). Os procedimentos analíticos para determinação total são muitas vezes demorados devido à necessidade da conversão das espécies para as respectivas formas inorgânicas. É importante considerar que as amostras contendo alto teor de compostos orgânicos (como plantas e alimentos) contém moléculas competidoras que afetam a exatidão do procedimento (BURGUERA; BURGUERA, 1998; ESTELA; CERDA, 2005). Isso exige a decomposição da matriz orgânica através de processos eficientes de preparo de amostras, normalmente sob aquecimento e irradiação. Dentre as estratégias, uma das mais utilizadas é a decomposição assistida por radiação micro-ondas (BURGUERA; BURGUERA, 1998).

O aquecimento assistido por micro-ondas acelera e favorece drasticamente algumas reações químicas, melhorando o processo de decomposição da matéria orgânica e diminuindo o tempo dessa etapa. O uso de sistemas fechados sob pressões mais altas também acelera a decomposição e minimiza contaminações. A radiação micro-ondas não é absorvida pelas paredes dos recipientes, mas apenas pela mistura a ser aquecida, também contribuindo para acelerar o preparo. Amostras sólidas normalmente devem ser digeridas na presença de ácidos concentrados para a destruição das matrizes orgânicas (BURGUERA; BURGUERA, 1998). Dentre os ácidos mais usados está o HNO_3 , que em altas temperaturas e pressões (até 280 °C e 80 atm) apresenta alto poder oxidante, tornando desnecessário o uso de reagentes

mais perigosos como HClO_4 . A decomposição normalmente permite o uso de massas de amostra entre 10 e 1500 mg, sendo o volume normalmente empregado de ácidos de 2 a 50 mL, dependendo da amostra. Um cuidado a ser tomado são as proporções amostra/ácido, uma vez que a diluição do digerido pode colocar as concentrações dos analitos próxima, ou abaixo dos limites de detecção (VON BOHLEN *et al.*, 2002; MARCO *et al.*, 2001).

O uso de sistemas fechados para decomposições assistidas por micro-ondas também é vantajoso para minimizar o consumo de ácidos concentrados (KORN *et al.*, 2008), uma vez que não ocorre evaporação significativa dos reagentes como em sistemas abertos (*e.g.* decomposições em blocos digestores). Dessa forma, ácidos diluídos têm sido empregados para a decomposição de matéria orgânica. Alternativamente, a diminuição drástica do volume dos ácidos minimiza o consumo de reagentes e a geração de resíduos, sendo denominada de microdigestão.

A microdigestão, ou microdecomposição, é caracterizada pela utilização de mínimas quantidades de amostra (que variam entre 5 e 20 mg, normalmente) empregando volumes de reagentes oxidantes da ordem de algumas centenas de microlitros (o que originou o termo microdigestão). Essa é uma alternativa para utilizar pequenas massas de amostra e implementar etapas mais rápidas com quantidades reduzidas de reagentes (ROCHA *et al.*, 2013). Esse processo pode ser realizado através da adição direta de ácido à amostra ou do contato do ácido em fase de vapor com a matéria orgânica (CAMPOS, 2009; OLIZ *et al.*, 2013).

O emprego de pequenas quantidades de amostras sólidas agrava algumas dificuldades normalmente encontradas nessa estratégia, como a heterogeneidade da amostra, que acarreta a falta de representatividade. Adicionalmente, as contaminações e perdas podem ser mais significativas, tanto durante etapas de transferência quanto de aquecimento. Portanto, a microdigestão exige um controle ainda mais cuidadoso das condições de preparo para evitar perdas de precisão e exatidão. (CAMPOS, 2009; MARCO *et al.*, 2001).

Nas microdigestões, assim como em procedimentos mais convencionais, é possível adicionar pequenos volumes de reagentes auxiliares, como H_2SO_4 , HCl e H_2O_2 visando maximizar a eficiência de decomposição. Como as reações ocorrem

em escala reduzida e, em muitos casos, sob pressões próximas da atmosférica, a integridade física do analista é mais facilmente assegurada (ROCHA *et al.*, 2013; OLIZ *et al.*, 2013), minimizando drasticamente o risco de acidentes.

1.3 Sistemas de análises em fluxo com multicomutação

O preparo das amostras altamente cuidadoso e adequado de nada servirá se a determinação do analito não ocorrer de forma precisa e exata. Essas características, bem como outras vantagens, são facilmente obtidas utilizando o processamento de amostras em sistemas de análises em fluxo.

O processamento das amostras em fluxo contínuo surgiu a partir dos procedimentos em fluxo segmentado desenvolvidos na década de 1960 (HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009), onde a mistura amostra/reagente era transportada em solução aquosa com seu volume limitado por bolhas de ar. Isso minimizava a dispersão da zona de amostra, promovia a mistura entre amostra e reagentes e permitia o processamento de várias amostras sequencialmente. Entretanto, as bolhas de ar precisavam ser removidas antes da detecção, o que raramente era totalmente eficaz (HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009).

A análise por injeção em fluxo contínuo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*) permite o processamento de amostras de forma mais simplificada com relação aos sistemas segmentados por não exigir a introdução de bolhas de ar. São obtidas melhores respostas e tempos mais curtos para iniciar e encerrar as análises, bem como são usados módulos mais simples e versáteis. Devido à temporização reproduzível, com dispersão controlada, as reações não precisam atingir o equilíbrio químico, tornando as determinações mais rápidas (HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009).

Em sistemas FIA convencionais, a amostra e o reagente são bombeados a uma vazão constante em regime laminar com o auxílio de uma unidade de propulsão, a qual permita a produção de um fluxo contínuo com mínima pulsação (HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009; ROCHA, 2013). A amostra líquida é injetada no fluxo contínuo de um líquido transportador, geralmente aquoso, que é bombeada do injetor para o detector. Durante esse percurso, a amostra pode ser submetida a

diversos tratamentos para melhorar a detectabilidade do analito (HARRIS, 2016). Uma desvantagem desse tipo de processamento, é a necessidade de reconfiguração física do sistema para cada determinação.

Os sistemas em fluxo com multicomutação (MCFA, do inglês *multicommutated flow analysis*) apresentam maior versatilidade por não exigirem reconfigurações físicas do sistema para determinações diversas (ROCHA *et al.*, 2002). Esses sistemas são caracterizados pelo uso de dispositivos controlados eletronicamente, como válvulas e microbombas solenoide, permitindo o controle independente de cada solução e melhorando o desempenho analítico. Os sistemas MCFA permitem também a injeção intercalada de pequenas alíquotas de amostra e reagente para a formação da zona de amostra, sendo esta estratégia denominada de amostragem binária (KRONKA *et al.*, 1996). Isso promove melhores condições de mistura entre amostra e reagente devido à formação de maior número de interfaces entre as soluções, auxiliando, por exemplo, na minimização do efeito Schlieren (GOMES *et al.*, 2005), que normalmente causa interferências nos sinais em medidas espectrofotométricas quando são usados reatores mais curtos.

As microbombas solenoide possibilitam a inserção e a propulsão das soluções em ciclos de ativação e desligamento dos dispositivos, dispensando um volume fixo e preciso de solução da ordem de microlitros a cada pulso de corrente aplicado ao solenoide da microbomba. O tempo de atuação é da ordem de milissegundos. O consumo de reagentes e a geração de resíduos é minimizado em comparação com o uso do fluxo contínuo (ROCHA, 2013).

1.4 Determinação de fósforo em material vegetal e derivados

Para a determinação total de fósforo em material vegetal e alimentos derivados é necessária uma prévia decomposição da amostra para a conversão quantitativa da fração orgânica a P_i . Esta etapa pode ser realizada através da combustão e fusão a altas temperaturas, sendo estes os procedimentos recomendados pela AOAC (do inglês, *Association of Official Analytical Chemists*) (HORWITZ, CHICHILO e REYNOLDS, 1970), bem como através da irradiação micro-ondas (WOO e MAHER, 1995; HINKAMP e SCHWEDT, 1990; WILLIAMS *et*

al., 1993; BENSON *et al.*, 1994) e ultravioleta (GOLIMOWSKI e GOLIMOWSKA, 1996; ARMSTRONG, WILLIAMS e STRICKLAND, 1966; HENRIKSEN, 1970; MCKELVIE *et al.*, 1968; MARUCHI, 2005) e por métodos combinados de hidrólise térmica e foto-oxidação (BENSON *et al.*, 1996). Os procedimentos são normalmente demorados, especialmente aqueles baseados na decomposição por via seca, tornando-os pouco adequados para laboratórios com alta demanda por análises (ESTELA e CERDA, 2005).

O preparo de amostras para determinação de P_T empregando blocos digestores (HOGUE, WILCOX e CANTILIFFE, 1970; MORGANO *et al.*, 2002) normalmente gera grandes quantidades de resíduos ácidos que requer tratamento adequado, aumentando o custo das análises. Além disso, a decomposição demora algumas horas ou dias para atingir a mineralização quantitativa da amostra. Os procedimentos assistidos por micro-ondas em sistemas fechados contribuem para minimizar o consumo de ácidos minerais (ROCHA *et al.*, 2013) e tornam os procedimentos mais rápidos, embora geralmente seja necessário mais de 60 min para finalizar a decomposição. Adicionalmente, os ácidos utilizados são mantidos em contato com as amostras por longos períodos (pelo menos 6 h) para decompor parte da matéria orgânica mais facilmente oxidável, visando minimizar riscos de explosões durante o preparo.

Apesar da microdigestão com adição direta de reagentes ter sido explorada para decomposição de amostras biológicas (CAMPOS *et al.*, 2009; MARCO *et al.*, 2001) e alimentos (OLIZ *et al.*, 2013) para determinação elementar, a quantificação de P_T em material vegetal e alimentos derivados ainda não foi reportada.

A determinação de P_I gerado após o preparo de amostras é geralmente realizada pelo método espectrofotométrico do azul de molibdênio (AM), inclusive com o processamento das amostras em sistemas FIA (WILLIAMS *et al.*, 1993; MCKELVIE *et al.*, 1989; MARUCHI, 2005; BURGUERA e BURGUERA, 1998) e MCFA (ROCHA, 2013). Alguns procedimentos permitem o preparo de amostras em linha para fracionamento de P, porém apenas considerando espécies hidrofílicas (ROCHA, 2013). O processamento de amostras sólidas em sistemas de análises em fluxo não é comum devido às dificuldades do gerenciamento de suspensões. Sendo assim, etapas em batelada são recorrentes para decomposição de sólidos para

determinação de P_T , sendo necessárias as estratégias supramencionadas para o preparo de amostras.

2 OBJETIVO

Desenvolver um procedimento analítico utilizando sistema de análises em fluxo com microbombas solenoide para a determinação espectrofotométrica de fósforo total em material vegetal e alimentos após microdigestão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

Os reagentes empregados nesse estudo foram de grau analítico, e no preparo de todas as soluções utilizou-se água desionizada.

A solução de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (Vetec) foi preparada a partir da dissolução do sal em água e adição de HNO_3 concentrado (Sigma-Aldrich), para se obter 11 mmol L^{-1} de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ em HNO_3 $0,45 \text{ mol L}^{-1}$. A solução de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) foi preparada diariamente na concentração 200 mmol L^{-1} a partir da dissolução do reagente em água. Soluções estoque de 1000 mg L^{-1} e 100 mg L^{-1} de P foram preparadas a partir da dissolução do sal KH_2PO_4 (Merck) em água. Para o preparo de amostras, foram utilizados HNO_3 65% m/v (Sigma) e H_2O_2 30% v/v (Merck). As amostras de material vegetal foram fornecidas pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA-USP). A amostra de café foi adquirida em comércio local de Santo André, SP.

3.2 Equipamentos e acessórios

Para o procedimento desenvolvido, foi construído um sistema de análises em fluxo com multicomutação constituído por quatro microbombas solenoide (Biochem) e uma válvula solenoide (NResearch), tubos de polietileno de 0,76 mm de

diâmetro interno e cela de fluxo de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico (Helma). Os dispositivos foram controlados eletronicamente por um microcomputador (Hewlett-Packard) através de uma interface construída em laboratório utilizando o microcontrolador ULN2803 e uma placa Arduino Uno[®]. A programação foi escrita no *software* de linguagem de programação aberta Arduino. A detecção dos sinais foi realizada através do espectrofotômetro modular (Ocean Optics) composto por um espectrômetro multicanal do tipo CCD (*Charge-coupled devices*) diretamente acoplado ao microcomputador através de uma das portas USB disponíveis. O transporte da radiação foi realizado por cabos de fibra óptica a partir de uma fonte contendo lâmpada de tungstênio-halogênio (Ocean Optics) até o suporte para cubeta espectrofotométrica e a partir desse suporte até o espectrômetro, permitindo a varredura do espectro entre 200 e 800 nm. A aquisição dos dados foi efetuada através do *software* SpectraSuite (Ocean Optics). Para a microdigestão das amostras, utilizou-se um forno de micro-ondas doméstico (Eletrolux - MEF41) e tubos de polipropileno graduados de 50 mL com tampa.

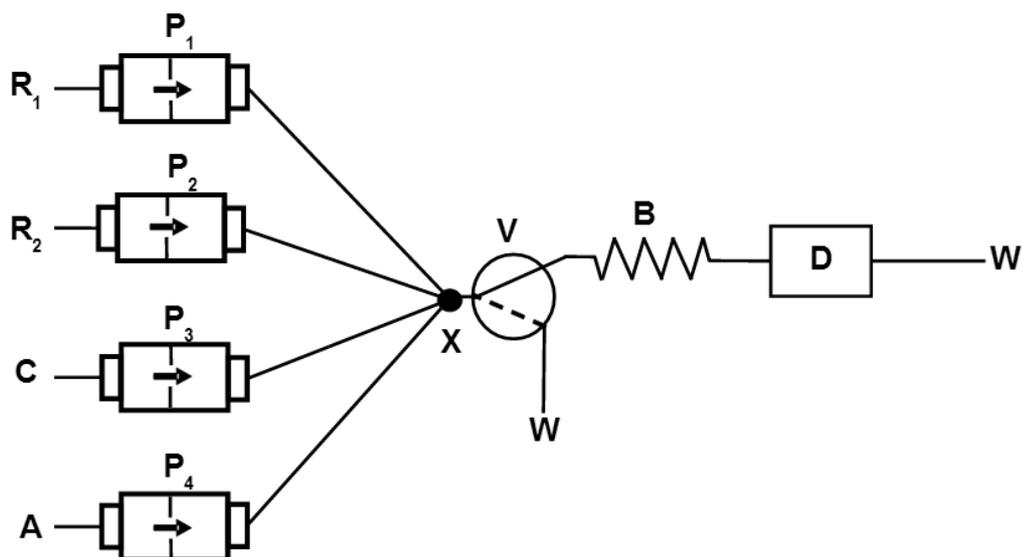
Para o procedimento de referência, empregou-se o sistema de análises em fluxo descrito por Arakaki (2016) e o preparo de amostras proposto por Morgano (2002). Foi utilizada uma bomba peristáltica (ISMATEC - IPC 8), tubos de polietileno de 0,76 mm de diâmetro interno, um injetor proporcional, confluências de acrílico e uma célula de fluxo de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico. Para a decomposição das amostras, foram utilizados tubos de PTFE de 50 mL e um bloco digestor (Analab - EasyDigest).

3.3 Procedimento proposto

3.3.1 Sistema em fluxo para determinação de fósforo total

O sistema de análise em fluxo utilizado para determinação de fósforo está esquematizado na Figura 1. As microbombas solenoide P_1 , P_2 , P_3 e P_4 foram aferidas, sendo obtidos $(21,3 \pm 0,1)$, $(18,0 \pm 0,1)$, $(25,5 \pm 0,3)$ e $(15,5 \pm 0,4)$ μL , respectivamente, por pulso.

Figura 1 - Diagrama do sistema de análises em fluxo empregado para a determinação de P_T em material vegetal. R_1 : ácido ascórbico 200 mmol L^{-1} ; R_2 : $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 11 mmol L^{-1} em HNO_3 $0,45 \text{ mol L}^{-1}$; C: H_2O ; A: amostra; $P_1 - P_4$: microbombas solenoide; V: válvula solenoide; x: ponto de confluência; B: reator de 100 cm; D: cela de fluxo acoplada ao espectrofotômetro; W: recipientes de descarte.



A zona de amostra foi formada por quatro ciclos de amostragem (etapas de 1 a 3). Cada ciclo consistiu na inserção sequencial dos reagentes R_1 e R_2 , seguidos da inserção da amostra através do acionamento das microbombas P_1 , P_2 e P_4 , respectivamente. Em seguida, foi aplicado um tempo de parada de fluxo por 10 s (etapa 4). Subsequentemente, através do acionamento da microbomba P_3 , a zona de amostra foi transportada através do reator até cela de fluxo, onde ocorreu a detecção espectrofotométrica em 730 nm (etapa 5). A válvula solenoide V foi acionada na etapa 6 para substituição de amostras para evitar a passagem de solução através do percurso analítico, minimizando os riscos de contaminação e acelerando a troca de soluções no sistema. A Tabela 1 mostra a sequência de acionamento dos dispositivos, bem como os volumes dispensados em cada etapa.

Foi realizada a otimização do procedimento a fim de maximizar a sensibilidade e obter faixa de resposta linear adequada. Para tanto, foram avaliados os efeitos da concentração dos reagentes, volume de amostra, número de ciclos de amostragem, tempo de parada de fluxo e tamanho do reator.

Tabela 1 - Etapas de acionamento das microbombas solenoide para determinação de fósforo total em material vegetal^a

| Etapa | Descrição | Microbomba | Volume (µL/pulso) | Pulsos |
|----------------|---------------------------------|----------------|-------------------|--------|
| 1 ^b | Inserção de ácido ascórbico | P ₁ | 21,3 | 1 |
| 2 ^b | Inserção de molibdato | P ₂ | 18,0 | 1 |
| 3 ^b | Inserção de amostra | P ₄ | 15,5 | 4 |
| 4 ^a | Parada de fluxo | - | - | - |
| 5 ^a | Transporte, detecção e descarte | P ₃ | 25,5 | 150 |
| 6 ^c | Substituição de amostra | P ₃ | 25,5 | 50 |
| | | P ₄ | 15,5 | 30 |
| | | P ₃ | 25,5 | 50 |

a) microbombas operadas a 5 Hz; b) etapas repetidas por 4 vezes (4 ciclos de amostragem) em triplicatas; c) acionamento da válvula V durante a etapa.

3.3.2 Microdigestão das amostras

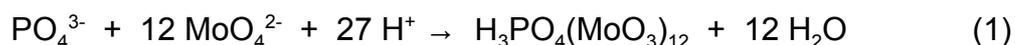
Foram analisadas amostras de café comercial e folhas e caule de xique-xique (*Crotalaria juncea*), manga, milho, cana e uma mistura de material vegetal com composição desconhecida. As amostras de plantas foram cortadas em moinho de facas (diâmetro de partícula igual a 60 µm) e secas em estufa a 120 °C por 2 h previamente às análises. Para a determinação de fósforo total, foi realizada a decomposição ácida assistida por micro-ondas. Em 20 mg de amostra, foram adicionados 600 µL de HNO₃ concentrado em 3 frações (150 µL; 150 µL; 300 µL). Após cada adição, a mistura foi aquecida em forno micro-ondas doméstico por 5 min. Em seguida, foi adicionado 150 µL de H₂O₂ 30% v/v e aquecido por 5 min no micro-ondas. O digerido foi avolumado para 25 mL com água deionizada e submetido à determinação de P total utilizando o sistema de análises em fluxo com multicomutação apresentado na Figura 1.

3.4 Procedimento de referência

A decomposição das amostras foi realizada utilizando o procedimento adaptado proposto por MORGANO *et al.* (2002). A amostra foi pesada (200 mg) e transferida para um tubo de PTFE. Foi acrescentado 2,0 mL de ácido nítrico concentrado para pré-digestão por 21 h. Em seguida, os tubos foram submetidos ao aquecimento em bloco digestor a 150° C por 1 h. Após a adição de 600 µL de peróxido de hidrogênio, as misturas foram aquecidas por 30 min. Em seguida, os digeridos foram avolumados para 10 mL com ácido clorídrico 0,5 mol L⁻¹ e analisados em triplicatas através de um sistema em fluxo com penetração de zonas e detecção espectrofotométrica (ARAKAKI, 2016).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método espectrofotométrico do azul de molibdênio (AM) utilizado para a determinação de P_T é baseado na reação entre íons ortofosfato e molibdato em meio ácido, formando o heteropoliácido 12-molibdofosfórico, ou ácido fosfomolibdico (AFM), que é reduzido para formar espécies azuis de fosfomolibdênio, conforme descrito nas reações químicas 1 e 2. A intensidade da cor azul é proporcional à quantidade de fósforo incorporada no complexo. O AM não se refere apenas a uma espécie, pois abrange um conjunto de compostos de molibdato reduzidos, que podem ou não conter heteroátomos, como o fósforo (NAGUL, 2015; SJOSTEN e BLOMQVIST, 1997).



As concentrações de ácido e molibdato são essenciais para a formação do heteropoliácido e para o controle de sua redução, sendo usualmente empregada a faixa de pH entre 0 e 1. O íon molibdato pode ser protonado para formar o ácido molibdico (reação 3). A etapa seguinte de protonação e hidratação do ácido

molíbdico (reação 4) requer concentração de íons H^+ cerca de dez vezes maior que a de Mo(VI). Apesar da alta acidez evitar a precipitação de MoO_3 , o meio ácido também favorece a dimerização do ácido molíbdico, impossibilitando a formação do AFM (NAGUL, 2015).



A formação do AM a partir da redução do AFM depende de diversos fatores como o pH, tempo de reação, temperatura e presença de alguns íons (NAGUL, 2015). Nesse aspecto, o método sofreu várias modificações ao longo dos anos, sendo atualmente mais empregados como agentes redutores o ácido ascórbico, o $SnCl_2$ e a hidrazina. (ESTELA, CERDA, 2005; SJOSTEN, BLOMQUIST, 1997). A redução do AFM apresenta diferentes velocidades de reação a depender do agente redutor. Além disso, esse reagente altera a banda de absorção molecular dessa espécie. O Sn, por exemplo, é incorporado na estrutura do AM, gerando uma espécie com máximo de absorção em 820 nm (NAGUL, 2015). Com o ácido ascórbico, o máximo de absorção ocorre em 730 nm. Adicionalmente, apenas parte dos átomos de molibdênio da estrutura química são reduzidos, o que dificulta o estabelecimento da estequiometria da reação. Sendo assim, é recomendável que o método do AM seja previamente otimizado para determinação de fósforo.

4.1 Otimização do procedimento para determinação de fósforo

Os parâmetros do sistema de análises em fluxo para determinação de P_T em material vegetal foram otimizados pelo método univariado, visando maximizar a sensibilidade e precisão e minimizar a geração de resíduos e o consumo de reagentes. Inicialmente, foi obtida uma resposta analítica utilizando 2 ciclos de amostragem, cada um constituído por 21,3 μL de ácido ascórbico 60 $mmol L^{-1}$ (1 pulso de corrente aplicado em P_1), 18,0 μL de $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 11,0 $mmol L^{-1}$ em HNO_3 0,25 $mol L^{-1}$ (1 pulso em P_2) e 15,5 μL de amostra, utilizando KH_2PO_4 15 $mg L^{-1}$ P (1

pulso em P_4). O tempo de parada de fluxo e o tamanho do reator foram 30 s e 200 cm, respectivamente. A zona de amostra foi transportada até a cela de fluxo com 150 pulsos em P_3 (3,8 mL do transportador).

Foi avaliada a variação do volume de amostra aumentando de 1 pulso (aproximadamente 15 μL) para 6 pulsos (aproximadamente 90 μL) aplicados na microbomba P_4 por ciclo de amostragem. Foi observado aumento do sinal analítico (diferença entre as respostas obtidas com a solução de P e com o branco) até 4 pulsos (aproximadamente 60 μL) de amostra. Volumes maiores causaram a diminuição do sinal analítico por causa da diluição dos reagentes.

O número de ciclos de amostragem foi avaliado (Figura 2) utilizando o reator de 200 cm (ca. 1000 μL de volume) e foi observado aumento significativo do sinal analítico até 7 ciclos de amostragem. O sinal do branco permaneceu praticamente constante durante o estudo. Com o aumento do número de ciclos, a dispersão diminuiu e, conseqüentemente, a resposta aumentou devido a maior concentração do AM no centro da zona de amostra. O volume total foi de aproximadamente 810 μL que, considerando a dispersão, foi suficiente para o preenchimento do reator de 1000 μL . Com o intuito de reduzir a geração de resíduos, foi avaliada a diminuição do tamanho do reator para 100 cm (500 μL), sendo avaliados 3 e 4 ciclos de amostragem nessa condição. Foram obtidos os sinais ($0,949 \pm 0,024$) e ($1,217 \pm 0,009$), respectivamente. Portanto, foram escolhidos 4 ciclos de amostragem e 100 cm de reator para estudos posteriores. Neste caso, a zona de amostra apresentou volume total de aproximadamente 400 μL .

O tempo de parada de fluxo foi avaliado a fim de aumentar o tempo de residência da zona de amostra para gerar mais AM (Figura 3). Como esperado, o sinal analítico aumentou com o tempo de parada, uma vez que a difusão axial das moléculas é mínima nesta condição. Considerando os desvios e as diferenças das médias dos sinais entre 10 e 50 s, não houve aumento significativo da resposta para P. O sinal do branco permaneceu praticamente inalterado em todas as condições. Sendo assim, foi escolhido 10 s de parada de fluxo, que apresentou sinal ca. 47 % maior que a condição sem parada. O ganho de sinal compensou a diminuição da frequência de amostragem estimada em ca. 23 %.

Figura 2 - Efeito do número de ciclos sobre os sinais referentes ao KH_2PO_4 15 mg L^{-1} P (—■—) e ao branco (—▲—), $n = 3$. Solução de ácido ascórbico 60 mmol L^{-1} ($21,3 \text{ }\mu\text{L}$ por ciclo), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ $11,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em HNO_3 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ($18,0 \text{ }\mu\text{L}$ por ciclo), $15,5 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra por ciclo e reator de 200 cm (ca. $1000 \text{ }\mu\text{L}$). Solução transportadora H_2O .

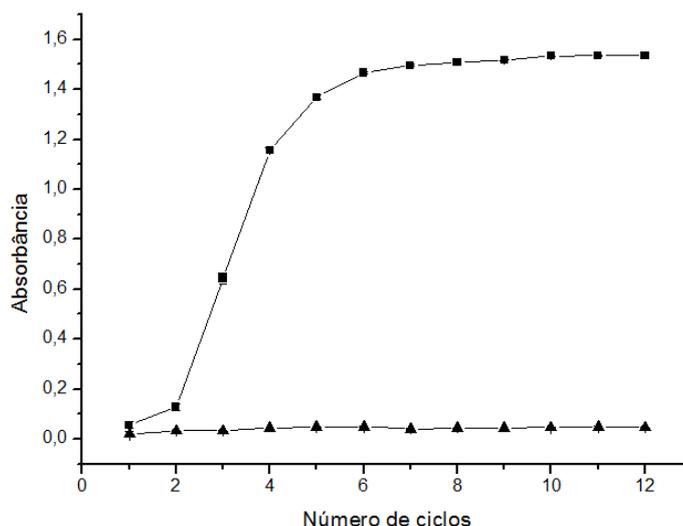
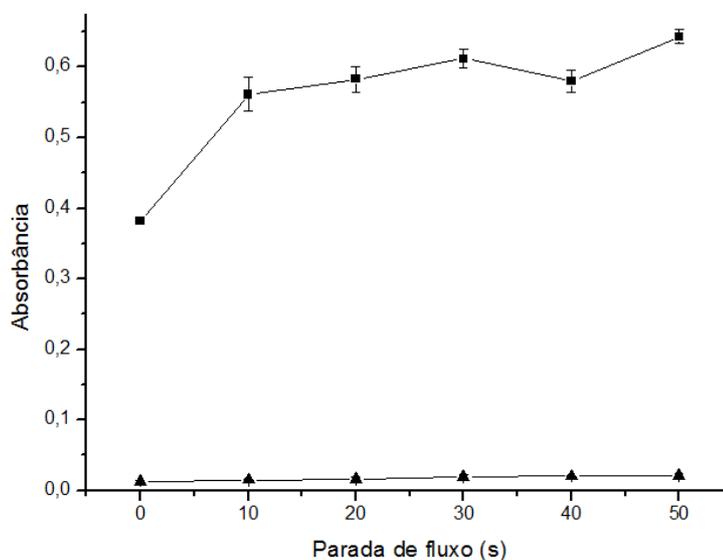


Figura 3 - Efeito do tempo de parada de fluxo sobre os sinais referentes ao KH_2PO_4 15 mg L^{-1} P (—■—) e ao branco (—▲—), $n = 3$. Solução de ácido ascórbico 60 mmol L^{-1} ($21,3 \text{ }\mu\text{L}$ por ciclo), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ $11,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em HNO_3 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ($18,0 \text{ }\mu\text{L}$ por ciclo), $15,5 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra por ciclo e reator de 200 cm (ca. $1000 \text{ }\mu\text{L}$), 4 ciclos de amostragem. Solução transportadora H_2O .



Em seguida, foi avaliada as concentrações dos reagentes em R_1 e R_2 . Primeiramente, variou-se a concentração de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ em R_2 (Figura 4) de 1 a 30 mmol L^{-1} (em $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3), sendo observado aumento significativo do sinal analítico até 11 mmol L^{-1} . Concentrações mais baixas forneceram menos íons

molibdato, prejudicando a formação do AM. Acima dessa concentração, foi observada a tendência de diminuição do sinal que se deve à polimerização do sal em meio ácido. Portanto, 11 mmol L^{-1} foi a concentração escolhida para estudos posteriores. Após fixar a concentração de heptamolibdato de amônio em 11 mmol L^{-1} , foi variada a concentração de ácido ascórbico em R_1 (Figura 5). Foi observada uma tendência de aumento do sinal analítico até 100 mmol L^{-1} . Baseado nas concentrações das espécies na zona de amostra (desconsiderando o efeito da dispersão), o ácido ascórbico estava *ca.* 13 vezes em excesso em relação ao molibdato, sendo essa quantidade normalmente observada nos procedimentos que empregam esse agente redutor (ROCHA, 2013). Quanto aos sinais do branco, a partir de 100 mmol L^{-1} houve um pequeno aumento porque o excesso de agente redutor normalmente favorece a geração da espécie azul na ausência de P. Portanto, os valores selecionados foram ácido ascórbico 100 mmol L^{-1} em R_1 e heptamolibdato de amônio 11 mmol L^{-1} em R_2 .

Figura 4 - Efeito da concentração de R_2 sobre os sinais referentes ao KH_2PO_4 15 mg L^{-1} P (—■—) e ao branco (—▲—), $n = 3$. Solução de ácido ascórbico 60 mmol L^{-1} ($21,3 \text{ } \mu\text{L}$ por ciclo), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ em HNO_3 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ($18,0 \text{ } \mu\text{L}$ por ciclo), $15,5 \text{ } \mu\text{L}$ de amostra por ciclo e reator de 200 cm (*ca.* $1000 \text{ } \mu\text{L}$), 4 ciclos de amostragem. Solução transportadora H_2O .

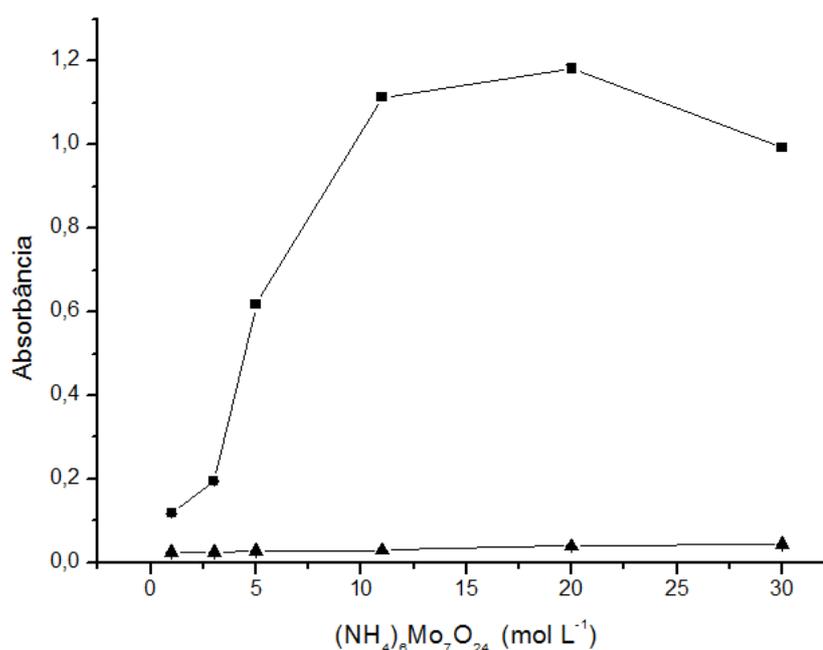
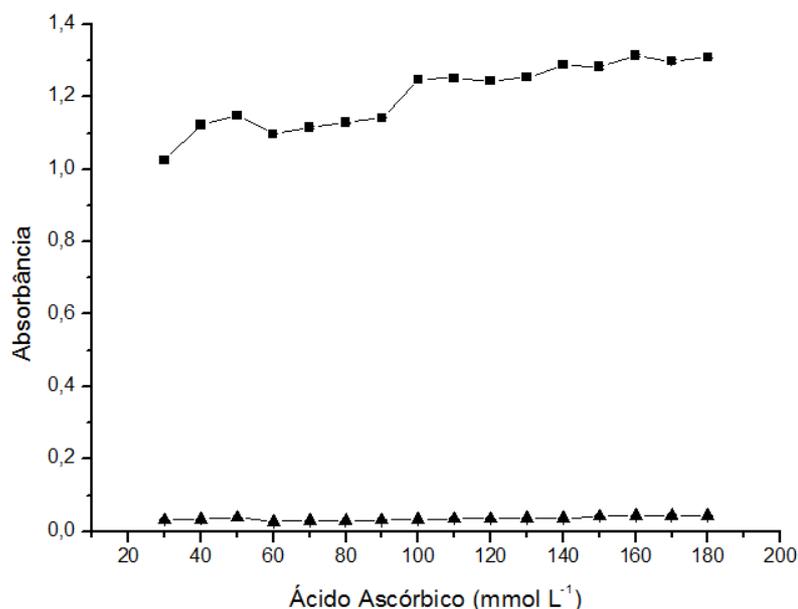
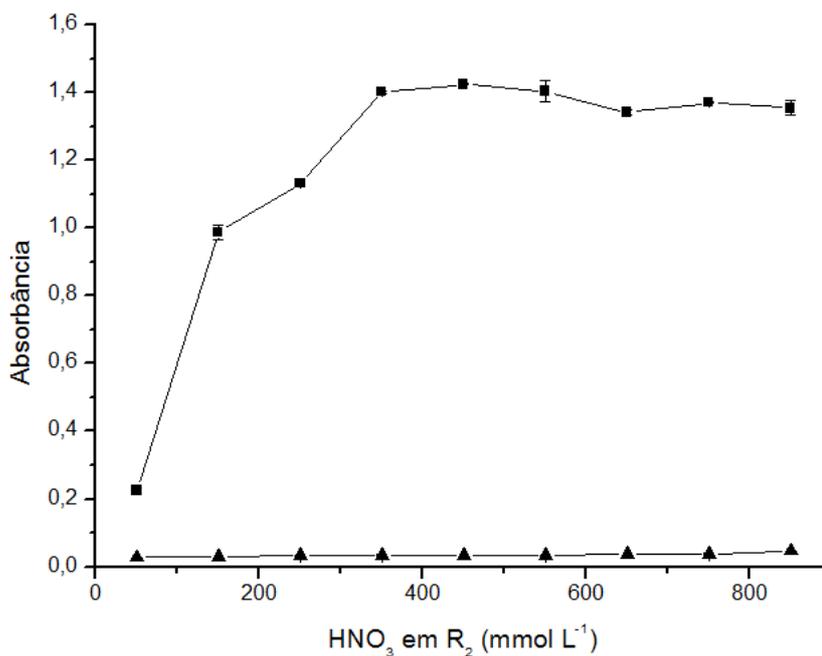


Figura 5 - Efeito da concentração de R_1 sobre os sinais referentes ao KH_2PO_4 15 mg L^{-1} P (—■—) e ao branco (—▲—), $n = 3$. Solução de ácido ascórbico ($21,3 \text{ } \mu\text{L}$ por ciclo), solução de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 11 mmol L^{-1} em HNO_3 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ($18,0 \text{ } \mu\text{L}$ por ciclo), $15,5 \text{ } \mu\text{L}$ de amostra por ciclo e reator de 200 cm (ca. $1000 \text{ } \mu\text{L}$), 4 ciclos de amostragem. Solução transportadora H_2O .



A principal espécie responsável pela redução do ácido fosfomolibdico é o íon ascorbato, e a acidez do meio é essencial para que haja a formação do AFM e a redução dos íons Mo(VI) (ROCHA, 2013). Por isso, foi avaliada a concentração de HNO_3 em R_2 (Figura 6). Foi observado um aumento significativo do sinal analítico até 450 mmol L^{-1} , uma vez que em meio mais alcalino não se forma o AFM. A tendência à diminuição acima de 450 mmol L^{-1} indica que o aumento excessivo da acidez prejudicou a geração do produto azul, uma vez que em meio extremamente ácido há favorecimento da formação de dímeros de molibdato (NAGUL, 2015). Sendo assim, a concentração de HNO_3 em R_2 foi mantida em 450 mmol L^{-1} .

Figura 6 - Efeito da concentração de HNO_3 em R_2 sobre os sinais referentes ao KH_2PO_4 $15 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$ (—■—) e ao branco (—▲—), $n = 3$. Solução de ácido ascórbico 100 mmol L^{-1} $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 11 mmol L^{-1} em HNO_3 , reator 200 cm, 4 ciclos de amostragem. Solução transportadora H_2O .



Após a otimização dos principais parâmetros do sistema em fluxo, que estão resumidos na Tabela 2, foram obtidas as características analíticas do procedimento.

Tabela 2 - Resumo dos parâmetros otimizados do sistema de análise em fluxo: faixas avaliadas e valores selecionados

| <i>Parâmetro</i> | <i>Faixa avaliada</i> | <i>Valor selecionado</i> |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Ciclos de amostragem | 1 – 12 | 4 |
| Tamanho do reator (cm) | 200 e 100 | 100 |
| Tempo de residência (s) | 0 – 40 | 10 |
| Concentração de R_1 (mmol L^{-1}) | 30 – 180 | 100 |
| Concentração de R_2 (mmol L^{-1}) | 1 – 30 | 11 |
| Concentração de HNO_3 em R_2 (mmol L^{-1}) | 50 – 850 | 450 |
| Volume de amostra (μL)* | 15 – 90 | 60 |

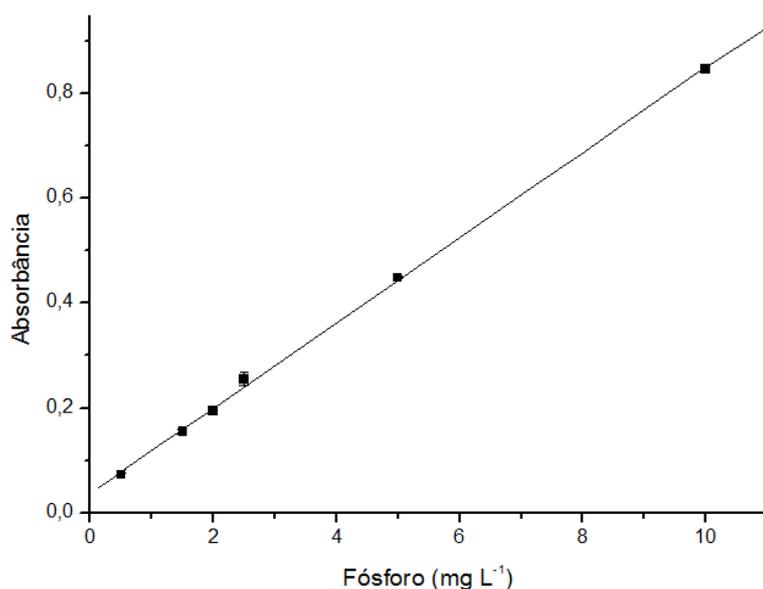
*a cada ciclo de amostragem

4.2 Características analíticas

Foi obtida uma curva analítica nas condições otimizadas (Figura 7), com resposta linear entre 0,5 e 10 mg L⁻¹ P (16 e 320 μmol L⁻¹ P). Acima dessa concentração, houve a perda da linearidade devido à falta de reagentes na zona de amostra, que limitou a formação do AM por restar parte do P não convertido.

A reta obtida foi descrita pela equação $A = 0,079 C_p + 0,040$ ($r = 0,998$), onde A é a absorbância e C_p é a concentração de fósforo em mg L⁻¹. A média de 20 medidas utilizando 10 mg L⁻¹ P foi de (0,847 ± 0,008), com coeficiente de variação de 1,1 %. O limite de detecção, estimado com 20 medidas do branco e 99,7 % de confiança, foi de 0,22 mg L⁻¹ P. Por determinação, foram gerados 5,8 mL de resíduo e consumidos 1,4 mg de ácido ascórbico e 1,0 mg de (NH₄)₆Mo₇O₂₄. A frequência de determinação foi estimada em 81 determinações por hora.

Figura 7 - Curva analítica obtida com soluções de KH₂PO₄ em uma pesagem (—■—), n = 3. Empregando as condições otimizadas descritas na Tabela 2.



4.3 Otimização da microdigestão

Os parâmetros iniciais para a microdigestão foram baseados no procedimento para determinação de Na e K em alimentos embutidos utilizando forno

micro-ondas doméstico (OLIZ, 2013). Inicialmente, foi adicionado 300 μL de HNO_3 concentrado em 20 mg de amostra de *Crotalaria* contidos em um tubo cônico de polipropileno de 50 mL. O tubo foi fechado e a mistura foi submetida ao aquecimento no forno micro-ondas por 5 min sob potência máxima (estimada em 600 W). Após o processo, foi observado resíduo sólido nas paredes do recipiente. Após avolumar o digerido para 3,0 mL com água deionizada, a mistura apresentou turbidez, também indicando que parte do sólido não foi digerido. Tempos maiores que 5 min causaram a evaporação do ácido. Durante o aquecimento, um béquer contendo 400 mL de água foi inserido no forno para evitar o superaquecimento.

Foi avaliado o volume de HNO_3 concentrado necessário para digerir as amostras, tendo como base a digestão anterior. Para 20 mg de amostra, foi avaliada a decomposição utilizando de 200 a 800 μL de HNO_3 por 5 min. Entretanto, foram observados resultados insatisfatórios (presença de sólidos). Mesmo aumentando o volume de HNO_3 , foi observada a vaporização de líquidos, o que evitou o contato do ácido com a amostra por tempo suficiente para que a decomposição ocorresse, tornando-a incompleta. Sendo assim, foi avaliado mais de um ciclo de decomposição utilizando volumes menores de ácido. O aumento do volume do ácido acima de 800 μL causou a explosão do tubo.

Nos estudos posteriores, o volume mínimo empregado do ácido foi de 150 μL porque com volumes menores a amostra não foi totalmente coberta pelo líquido, diminuindo a superfície de contato que é extremamente importante para a decomposição. Sendo assim, a digestão por 5 min utilizando 150 μL de HNO_3 foi efetuada por duas vezes, ainda sendo observada uma suspensão ao final do processo. Outro ponto importante observado é que com o aumento do volume do ácido, parte do sólido não digerido ficou preso a partes mais altas da parede do tubo. Quanto maior o volume, mais alto o sólido ficava retido, dificultando a lavagem da parede com a nova porção do HNO_3 . Por esse motivo, o volume do ácido não foi aumentado nessas etapas. No terceiro ciclo, esse volume foi aumentado para que houvesse contato da amostra com o sólido remanescente na parede do tubo. Sendo assim, para a terceira repetição do aquecimento, foi adicionado 300 μL de HNO_3 ao tubo, que também foi submetido a 5 min de aquecimento.

Após as três repetições da microdigestão ácida assistida por micro-ondas,

não foi observada a presença de sólido. O digerido foi avolumado para 25 mL e analisado pelo procedimento desenvolvido para a determinação de P_T (Figura 1). O teor de P obtido para a *Crotalaria juncea* foi de $(0,945 \pm 0,034)$ mg g^{-1} , apresentando um erro relativo de - 30 % em relação ao teor obtido pelo procedimento de referência (MORGANO *et al.*, 2002; ARAKAKI, 2016).

Para avaliar a influência da acidez da amostra sobre o sinal analítico, foram obtidas curvas analíticas com soluções de P na presença e ausência de HNO_3 0,40 mol L^{-1} , que é a acidez mais extrema que o digerido poderia apresentar. Os coeficientes angular e linear (apresentados na Tabela 3) não foram significativamente diferentes com relação aos obtidos com a amostra em meio aquoso. A diferença observada entre os coeficientes angulares foi de 3,5 %. Portanto, isso foi um indicativo de que ainda existia material orgânico contendo fósforo que não havia sido digerido.

Visando melhorar a eficiência de decomposição, foi adicionado H_2O_2 30 % v/v para uma etapa adicional de aquecimento. O H_2O_2 normalmente auxilia a decomposição do ácido fítico de maneira eficiente devido à geração de radicais hidroxila (ROCHA, 2013). Após o processo, o teor de P_T na amostra ainda foi mais baixo que o obtido pelo procedimento de referência. Entretanto, a falta de exatidão foi atribuída ao excesso de H_2O_2 no digerido que causou a reoxidação do Mo(V) do AM a Mo(VI) ou o consumo do ácido ascórbico durante a determinação. Isso foi comprovado com uma solução de referência de 15 mg L^{-1} P, que apresentou uma diminuição muito próxima daquela observada no sinal do digerido em relação ao sinal esperado. Sendo assim, a concentração de ácido ascórbico em R_1 foi aumentada para 200 mmol L^{-1} para minimizar a interferência do H_2O_2 . A faixa linear, a sensibilidade e o coeficiente linear não foram significativamente afetados nessa condição (coeficientes angulares com diferença de 7 %), conforme observado na Tabela 3. A sobreposição das curvas analíticas pode ser observada na Figura 8.

Após as alterações na microdigestão e no procedimento para determinação de P_T , a amostra de Crotalária foi analisada, resultando em um teor de P_T de $(1,29 \pm 0,03)$ mg g^{-1} . Esse valor não foi significativamente diferente do valor de referência de $(1,34 \pm 0,03)$ mg g^{-1} , de acordo com o teste *t de student* com 95% de confiança.

Tabela 3 - Coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas com soluções de P sob diferentes condições ^a.

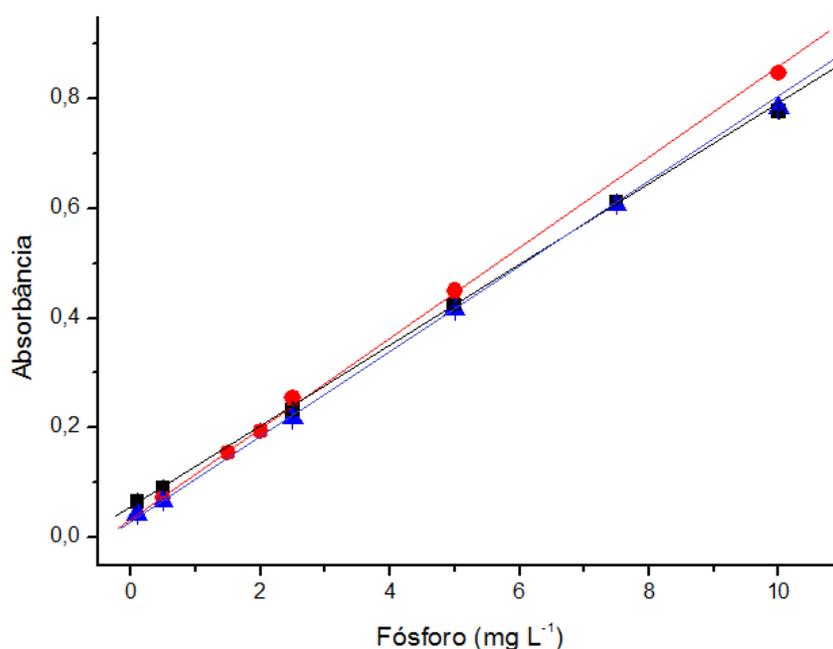
| Meio das soluções de P | Coeficiente angular | Coeficiente linear |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------|
| H ₂ O | 0,079 | 0,040 |
| HNO ₃ 0,40 mol L ⁻¹ | 0,076 | 0,033 |
| HNO ₃ 0,40 mol L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 0,2 % v/v ^b | 0,073 | 0,055 |

a) coeficientes de determinação iguais a 0,999; b) emprego de ácido ascórbico 200 mmol L⁻¹ em R₁.

| Meio das soluções de P | Equação da reta | r |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------|
| H ₂ O | $A = 0,079 C_p + 0,040$ | 0,040 |
| HNO ₃ 0,40 mol L ⁻¹ | $A = 0,076 C_p + 0,033$ | 0,033 |
| HNO ₃ 0,40 mol L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 0,2 % v/v ^b | $A = 0,073 C_p + 0,055$ | 0,055 |

a) coeficientes de determinação iguais a 0,999; b) emprego de ácido ascórbico 200 mmol L⁻¹ em R₁.

Figura 8 - Curvas analíticas obtidas com soluções de KH₂PO₄ em meio aquoso (●), meio ácido (▲) e meio ácido com H₂O₂ (■) com as condições otimizadas descritas na Tabela 2, exceto ácido ascórbico em R₁ (200 mmol L⁻¹), n = 3.



4.4 Aplicação do procedimento e comparação crítica

As amostras de folhas de plantas e de café foram digeridas e analisadas pelos procedimentos proposto e de referência (MORGANO *et al.*, 2002; ARAKAKI, 2016). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Médias e incertezas (n = 3) para determinação de fósforo total em plantas e alimentos pelos procedimentos proposto e de referência (MORGANO *et al.*, 2012; ARAKAKI, 2016)

| Amostra | Fósforo inorgânico (mg g ⁻¹ de P) | |
|---------------------------------|----------------------------------------------|-------------|
| | Proposto | Referência |
| Crotalária ^a | 1,29 ± 0,03 | 1,34 ± 0,03 |
| Manga ^a | 0,60 ± 0,01 | 0,56 ± 0,02 |
| Milho ^a | 0,95 ± 0,02 | 0,86 ± 0,04 |
| Mistura de plantas ^a | 1,05 ± 0,04 | 1,11 ± 0,08 |
| Cana ^a | 0,98 ± 0,03 | 0,92 ± 0,01 |
| Café comercial ^b | 0,93 ± 0,05 | 0,82 ± 0,06 |

a) material vegetal (folhas e caule); b) alimento comercial.

Os resultados das análises das amostras pelos procedimentos proposto e de referência não apresentaram diferenças significativas com nível de confiança de 95%. Entretanto, erros relativos de 10 % e 13 % para as amostras de milho e café foram observadas. Isso é um indicativo de artefatos no preparo ou determinação que precisam ser investigados. A presença de silicatos, por exemplo, acarreta o aumento do sinal devido à formação do AM a partir do ácido sílicomolíbico.

Em comparação com o procedimento de referência empregado, o tempo de preparo foi diminuído de 24 h para 20 min, além de exigir um micro-ondas doméstico, com custo de aquisição aproximadamente 10 vezes menor que um bloco digestor. Outros procedimentos ainda mais demorados e bastante empregados para

determinação de P_T em plantas também empregam blocos digestores (HOGUE, WILCOX e CANTILIFFE, 1970).

Procedimentos de referência para decomposição via seca (HORWITZ, CHICHILO e REYNOLDS, 1970) empregam fundentes em grandes quantidades, o que aumenta o custo das análises, além da necessidade da aquisição de uma mufla. O tempo de preparo nesses procedimentos é de, no mínimo, 3 h, sendo ainda necessária uma etapa de filtração em alguns casos.

Em comparação com procedimentos envolvendo fornos de micro-ondas com cavidade e tubos fechados (MARUCHI, 2005), além do custo de aquisição do equipamento, o tempo de preparo também foi reduzido em 75 % (de 90 min para 20 min). Adicionalmente, os tubos utilizados na microdigestão são de poliestireno com custo unitário estimado em R\$ 1,30, podendo o analista optar pelo descarte do material após a microdigestão, assim como é feito em muitos laboratórios analíticos

5 CONCLUSÕES

O procedimento analítico para determinação de P_T através de um sistema de análise em fluxo com multicomutação permitiu a quantificação do analito de forma exata e precisa com baixo consumo de reagentes e geração de resíduos. Essas vantagens também foram destaques da microdigestão que também reduziu drasticamente o custo e o tempo da decomposição.

Alguns inconvenientes associados ao preparo em escala reduzida, como alta acidez do meio e presença de oxidantes foi superada com algumas modificações na determinação de P_T , preservando as características analíticas do procedimento e melhorando a exatidão. Sendo assim, o procedimento desenvolvido para determinação de P_T após microdigestão é uma alternativa confiável, rápida e mais ambientalmente amigável comparado aos procedimentos alternativos.

6 PERSPECTIVAS

Estudos adicionais são necessários para confirmar a decomposição do ácido fítico empregando a microdigestão, bem como experimentos de adição e

recuperação. Isso será um reforço para confirmar a eficiência do procedimento para a decomposição do material orgânico contendo fósforo. O estudo da presença de alguns concomitantes, como Fe, Ca, K e nitrato também devem ser conduzidos a fim de confirmar a ausência de interferência de algumas espécies químicas concomitantes ao fósforo nas amostras. Um estudo importante também envolve a moagem da amostra. O tamanho de partícula altera a superfície de contato e, conseqüentemente, o tempo da microdigestão. Sendo assim, é importante avaliar o tamanho máximo de partícula para a decomposição quantitativa do sólido.

O fracionamento de P em plantas poderá ser explorado em trabalhos futuros, pois após a extração da fração solúvel em água, o extrato pode ser submetido à microdigestão para posterior quantificação do fósforo total solúvel. Analogamente às amostras sólidas, alimentos como óleos comestíveis, também poderão ser digeridos em escala reduzida visando às determinações elementares.

7 REFERÊNCIA

ARAKAKI, C. Y. Extração sólido-líquido em sistema de análise em fluxo para a determinação de fósforo solúvel em materiais vegetais. 2016. 27f. Trabalho de conclusão de curso - Universidade Federal do ABC. Santo André, 2016.

ARMSTRONG, F. A. J.; WILLIAMS, Po M.; STRICKLAND, JD Ho. Photo-oxidation of organic matter in sea water by ultra-violet radiation, analytical and other applications. *Nature*, v. 211, p. 481, 1966.

BENSON, R. L.; MCKELVIE, I. D.; HART, B. T.; HAMILTON, I. C. Determination of total phosphorus in waters and wastewaters by on-line microwave-induced digestion and flow-injection analysis. *Analytica chimica acta*, v. 291, p. 233-242, 1994.

BENSON, R. L.; MCKELVIE, I. D.; HART, B. T.; TRUONG, Y. B.; HAMILTON, I. C. Determination of total phosphorus in waters and wastewaters by on-line UV/thermal induced digestion and flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, v. 326, p. 29-39, 1996.

BURGUERA, M.; BURGUERA, J. L. Microwave-assisted sample decomposition in flow analysis. *Analytica Chimica Acta*, v. 366, p. 63-80, 1998.

CAMPOS, R. C.; VEGUERIA, S. F. J.; GONÇALVES, R. A.; WAGENER, Â. L. A microdigestion procedure directly performed in the autosampler cups for the determination of trace elements in biological samples by GF AAS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, p. 1925-1930, 2009.

CHADHA, K. L.; SAMRA, J. S.; THAKUR, R. S. Standardization of leaf-sampling technique for mineral composition of leaves of mango cultivar 'Chausa'. *Scientia Horticulturae*, v. 13, p. 323-329, 1980.

ESTELA, J. M.; CERDA, V. Flow analysis techniques for phosphorus: an overview. *Talanta*, v. 66, p. 307-331, 2005.

GOLIMOWSKI, J.; GOLIMOWSKA, K. UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 325, p. 111-133, 1996.

HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. LTC, Rio de Janeiro, 8. edição, p. 456-458, 2016

HENRIKSEN, A. Determination of total nitrogen, phosphorus and iron in fresh water by photo-oxidation with ultraviolet radiation. *Analyst*, v. 95, p. 601-608, 1970.

HINKAMP, S.; SCHWEDT, G. Determination of total phosphorus in waters with amperometric detection by coupling of flow-injection analysis with continuous microwave oven digestion. *Analytica Chimica Acta*, v. 236, p. 345-350, 1990.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. *Princípios de Análise Química*. Bookman, Porto Alegre, 6. ed., p 945-955, 2009

HORWITZ, W.; CHICHILO, P.; REYNOLDS, H. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 1970

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 4. ed. São Paulo: IMESP, 2008. p 85. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosal_2008.pdf>. Acesso em: 11 de maio de 2018

KORN, M. G. A.; MORTE, E. S. B.; SANTOS, D. C. M. B.; CASTRO, J. T.; BARBOSA J. T. P.; TEIXEIRA, A. P.; FERNANDES, A. P.; WELZ, B.; SANTOS, W. P. C.; SANTOS, E. B. G. N. KORN, M. Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods - a review. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 43, p. 67-92, 2008.

MARCO, P. L. M.; CAPOTE, T.; HERNANDEZ C. E.A., GREAVESD E.D. Feasibility study on in situ microwave digestion prior to analysis of biological samples by total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 56, p. 2187-2193, 2001.

MARUCHI, A. K. Fracionamento de fósforo em plantas empregando diferentes procedimentos de preparo de amostras e sistemas de análise em fluxo monossegmentado. 2005. 80 f. Dissertação (mestrado), Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2005

MCKELVIE, I. D.; HART, B. T.; CARDWELL, T. J.; CATTRALL, R. W. Spectrophotometric determination of dissolved organic phosphorus in natural waters using in-line photo-oxidation and flow injection. *Analyst*, v. 114, p. 1459-1463, 1989.

MORGANO, M. A.; PAULUCI, L. F.; MANTOVANI, D. M. B.; MORY, E. E. M. Determinação de minerais em café cru. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, p. 19-23, 2002

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. *Analytica chimica acta*, v. 890, p. 60-82, 2015

OLIZ, C. M.; PEREIRA, C. C.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S.; NUNES, A. M. Avaliação de tratamentos da amostra em microescala para a determinação de K, Mg, Na e Zn em carnes por técnicas de espectrometria atômica. *Química Nova*, v. 36, p. 972-977, 2013.

ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A.; LIMA, J. L.; LAPA, R. A.; SANTOS, J. L.. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. *Analytica Chimica Acta*, v. 468, p. 119-131, 2002.

ROCHA, D. L.; BATISTA, A. D.; ROCHA, F. R.; DONATI, G. L.; NÓBREGA, J. A Greening sample preparation in inorganic analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, v 45, p 79-92, 2013

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

ŞEMEN, S.; MERCAN, S.; YAYLA, M.; AÇIKKOL, M. Elemental composition of green coffee and its contribution to dietary intake. *Food chemistry*, v. 215, p. 92-100, 2017.

SJOSTEN, A.; BLOMQVIST, S. Influence Of Phosphate Concentration And Reaction Temperature When Using The Molybdenum Blue Method For Determination Of Phosphate In Water. Elsevier Science Publishers, Suécia, p. 1818-1823, 1997.

VON BOHLEN, A.; KLOCKENKÄMPER, R.; MESSERSCHMIDT, J.; ALT, F. Development and application of a micro-digestion device for elemental analysis of biological samples. *Analytica chimica acta*, v. 451, p. 279-284, 2002.

WILLIAMS, K. E.; HASWELL, S. J.; BARCLAY, D. A.; PRESTON, G. Determination of total phosphate in waste waters by on-line microwave digestion incorporating colorimetric detection. *Analyst*, v. 118, p. 245-248, 1993.

WOO, L.; MAHER, W. Determination of phosphorus in turbid waters using alkaline potassium peroxodisulphate digestion. *Analytica Chimica Acta*, v. 315, p. 123-135, 1995.