

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Diana Roza de Oliveira

**MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE FOSFATO EM MEIO DE CULTIVO DE
MICROALGAS:**

Projeto de instrumentação e metodologia para o controle físico-químico de processos de
produção de microalgas

Rio de Janeiro

Abril 2017

Diana Roza de Oliveira

MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE FOSFATO EM MEIO DE CULTIVO DE
MICROALGAS:

Projeto de instrumentação e metodologia para o controle físico-químico de processos de
produção de microalgas

Projeto de Graduação apresentado ao Curso
Química, Instituto de Química da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do título de
Químico Tecnológico.

Orientadores:

João Alfredo Medeiros, Dr.rer.nat.

Maria Lúcia Couto Corrêa Pinto, D. Sc.

Rio de Janeiro

Abril de 2017

À minha família, a base de tudo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais, Leila Terezinha Roza de Oliveira e Ivan Vieira de Oliveira, pelo exemplo de caráter, dedicação, carinho e por todo apoio durante essa jornada. Além disso, gostaria de agradecer também ao meu irmão, Diogo Vieira de Oliveira e a todos meus familiares, pelo tempo que deixamos de estar juntos ao longo dessa graduação.

Aos meus amigos, que estiveram ao meu lado e fizeram esse tempo na graduação algo mais leve e divertido. Em especial, eu gostaria de citar Thayon Tayson Corrêa de Alcantara, Suanne Nascimento Araújo, Rodrigo Macedo, Pedro Henrique Sevenini, Guilherme Barbosa, Bárbara Masello, Pedro Borges, João Paulo Resende Queiroz, Vitor Daniel Costa Madureira e Diogo Puga Reis.

Em agradecimento póstumo, gostaria de expressar minha gratidão aos amigos Maira Nudelman e Rafael Campos, que fizeram parte do meu crescimento pessoal e profissional durante o tempo em que integrei o corpo do Centro Acadêmico do Instituto de Química.

Aos professores Maria Lucia Couto Correia Pinto e João Alfredo Medeiros, meus exemplos de profissionalismo, ética e amor a ciência, a educação e a química.

Por fim, gostaria de mostrar uma imensa gratidão à todas as trabalhadoras terceirizadas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que trabalharam incessantemente, muitas vezes sem o seu devido reconhecimento, para garantir as condições de utilização do espaço físico da universidade. Em especial às terceirizadas lotadas no Instituto de Química que hoje tenho como amigas e tornaram meu tempo nessa instituição mais agradável. Destas, cito com carinho Mônica Duarte e Rosangela Raphael.

RESUMO

Fosfato é nutriente essencial para os seres vivos e deve ser controlado nos meios de cultura de microalgas. O LAM vem desenvolvendo e otimizando metodologias e instrumentação para o controle físico-químico em meios salinos da produção de microalgas desde 2008, utilizando águas produzidas, em cooperação com a PETROBRAS/CENPES. Os meios contêm altas concentrações de cloreto e bicarbonato-carbonato, cálcio, magnésio, além de uma série de íons metálicos como micronutrientes. O controle analítico de fosfato é feito por espectrofotometria íon com molibdato em meio ácido.

Cloreto complexa Mo(VI), enquanto Ca^{2+} e Mg^{2+} , além de todos os íons M^{2+} e M^{3+} , são associados fortemente a espécies de fosfato, por formação de complexos e precipitados, sendo interferentes, causando erros sistemáticos na análise. Porém, a formação do ácido fosfomolibdico ocorre em meio ácido, onde as frações molares dos íons de fosfato são muito baixas, predominando H_3PO_4 . Isso praticamente elimina a formação de fosfato-complexos de Mg e Ca.

O objetivo deste trabalho foi simplificar e otimizar metodologias analíticas para determinação de fosfato de modo a viabilizar um controle físico-químico do meio de cultivo para a produção de microalgas.

O trabalho apresenta a determinação de fosfato na faixa de em meio de cultura de microalgas pelo método de reação do fosfato com o molibdato, em meio ácido, formando o ácido fosfomolibdico. Essa determinação pode ser feita com e sem extração com isobutanol, e posterior leitura da sua absorvância em 380nm e 320nm, respectivamente. Os métodos foram otimizados para que fosse possível a determinação de fosfato em campo, sendo necessário apenas os reagentes, seringas descartáveis, tubos de ensaio com marcação para 10 mL, água destilada e espectrofotômetro portátil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1 - Diagrama esquemático de um espectrofotômetro	13
Figure 2 - Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico em solução aquosa, contra o branco do reagente - Sem extração (fonte: BABKO, 1974, p. 85)	15
Figure 3 - Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico em mistura de butano e clorofórmio 1:4 - Com extração (fonte: BABKO, 1974, p. 87).....	16
Figure 4 - Preparação da curva para a determinação de fosfato.....	24
Figure 5 - Espectrofotômetro CamSpec modelo M501 Single Beam UV/Vis.....	24
Figure 6 - Espectrofotômetro portátil com célula de imersão da StellarNet modelo SL5-DH Deuterium+Halogen Lamps	25
Figure 7 - Espectro de absorção dos reagentes, ácido sulfúrico 0,3 M e molibdato de amônio, usando água destilada como branco	30
Figure 8 - Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico com fosfato $5,00 \times 10^{-5}$ M usando água como branco.....	31
Figure 9 - Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico com fosfato $5,00 \times 10^{-5}$ M usando reagentes sem fosfato como branco.....	32
Figure 10 - Cultura de microalgas R1, R2, e R3	36
Figure 11 - Espectro de absorção de onda do ácido fosfomolibdico com concentração de fosfato de $1,00 \times 10^{-5}$ M em isobutanol, com o cursor marcando 315 nm.....	39
Figure 12 - Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico com concentração de fosfato de $1,00 \times 10^{-5}$ M em isobutanol, com o cursor marcando 320 nm	40
Gráfico 1 - Curva analítica para determinação de fosfato utilizando o espectrofotômetro CAMSPEC modelo M501 single beam UV/Vis	33
Gráfico 2 - Curva analítica de fosfato utilizando o espectrofotômetro portátil de imersão StellarNet modelo SL5-DH Deuterium+Halogen e seringas no lugar de pipetas.....	34
Gráfico 3 - Acompanhamento da concentração de fosfato no meio do dia 10/dez ao dia 14/dez	37
Gráfico 4 - Curva analítica para determinação de fosfato extraído em isobutanol, no comprimento de onda 315 nm	41
Gráfico 5 - Curva analítica para determinação de fosfato extraído em isobutanol, no comprimento de onda 320 nm	42
Gráfico 6 - Curva analítica para determinação de fosfato extraído em isobutanol, no comprimento de onda 315 nm, usando isobutanol como branco	44
Gráfico 7 - Curva analítica para determinação de fosfato extraído em isobutanol, no comprimento de onda 320 nm, usando isobutanol como branco	45
Gráfico 8 - Curva analítica de extração com isobutanol medida em 320 nm para meios mais diluídos	46
Gráfico 9 - Curva de especiação do ácido fosfórico.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Absorvância do fosfato 5×10^{-5} M com as composições de reagentes A, B e C em 380 nm	29
Tabela 2 - Curva analítica para determinação de fosfato em 380 nm utilizando o espectrofotômetro CAMSPEC modelo M501 Single Beam UV/Vis	33
Tabela 3 - Curva analítica de fosfato utilizando o espectrofotômetro portátil de imersão StellarNet modelo SL5-DH Deuterium+Halogen e seringas no lugar de pipetas	34
Tabela 4 - Determinação do fosfato no meio de cultura com 2mM de fosfato (A1) e o mesmo meio sem fosfato (A2)	35
Tabela 5 - Acompanhamento da concentração de fosfato no meio do dia 10/dez ao dia 14/dez	36
Tabela 6 - Curva analítica para determinação de fosfato extraído em isobutanol no comprimento de onda 315 nm	41
Tabela 7 - Curva analítica para determinação de fosfato com extração em isobutanol no comprimento de onda 320 nm	42
Tabela 8 - Curva analítica para determinação de fosfato extraído em isobutanol, no comprimento de onda 315 nm, usando isobutanol como branco	43
Tabela 9 - Curva analítica para determinação de fosfato extraído em isobutanol, no comprimento de onda 320 nm, usando isobutanol como branco	44
Tabela 10 - Curva analítica de extração com isobutanol medida em 320 nm para meios mais diluídos	46
Tabela 11 - Determinação de fosfato com extração em isobutanol em amostras de água do mar com proliferação de microalgas.....	47
Tabela 12- Concentração de cada íon presente no meio LAM-02	50
Tabela 13 - Constantes de sais e complexos de espécies fosfatos (LURE, 1975).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA

A	Absorvância
ABS	Absorvância
b	Caminho óptico
c	Concentração
CENPES	Centro de Pesquisa da Petrobrás
cm	Centímetro
c_z	Concentração de molar de z
d	Discrepância
dn	Número de moléculas na espessura dx
dx	Espessura de uma amostra
ϵ	Absortividade molar
g	Gramas
L	Litro
LAM	Laboratório de Análise Ambiental e Mineral
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
μg	Micrograma
N	Normal (normalidade)
nm	Nanômetro
I	Intensidade da radiação que atravessa a amostra
I_0	Intensidade da radiação emitida
T	Transmitância
UV/Vis	Ultravioleta-Visível
PETROBRÁS	Petróleo Brasileiro S.A
z	Molécula fictícia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA	11
1.2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	12
1.2.1 Espectrofotometria	12
1.2.2 Determinação de fosfato como ácido fosfomolibdico	14
1.2.3 O meio de cultura e possíveis interferentes	17
2 OBJETIVO DO TRABALHO	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 REGENTES	20
3.2 MATERIAIS	20
3.3 MÉTODOS	21
3.3.1 Determinação de fosfato como ácido fosfomolibdico em meio aquoso.....	21
3.3.1.1 Preparação de soluções:	21
3.3.1.2 Quantidades e concentrações dos reagentes para volume final 10 mL	22
3.3.1.3 Espectro de absorção dos reagentes nas condições definidas (C) do item 3.3.1.2, usando água destilada como branco	22
3.3.1.4 Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico nas condições definidas (C), com a concentração de fosfato $5,0 \times 10^{-5}M$ usando como branco água destilada ou os reagentes	23
3.3.1.5 Procedimento para o preparo da curva analítica.....	23
3.3.1.7 Interferência dos componentes do meio de cultura na determinação de fosfato	25
3.3.1.8 Procedimento para amostras.....	26
3.3.2 Determinação de fosfato como ácido fosfomolibdico extraído com isobutanol	26
3.3.2.1 Preparação de soluções:	26
- Solução padrão de ácido sulfúrico 3 M.....	27
3.3.2.2 Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico na fase orgânica da extração em isobutanol de uma solução de fosfato $1,00 \times 10^{-5}M$	27
3.3.2.3 Procedimento para o preparo da curva analítica.....	28
3.3.2.4 Procedimento para o preparo da curva analítica em concentrações mais baixas	28
3.3.2.5 Procedimento para amostras.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO:	29
4.1 DETERMINAÇÃO DO FOSFATO, BASEADO NA FORMAÇÃO DO ÁCIDO FOSFOMOLÍBDICO.....	29

4.1.1	Quantidades e concentrações dos reagentes que devem ser utilizadas para volume final 10 mL	29
4.1.2	Espectro de absorção dos reagentes nas condições definidas (C), usando água destilada como branco, no espectrofotômetro CamSpec modelo M501 Single Beam UV/Vis	30
4.1.3	Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico nas condições definidas (C) com a concentração de fosfato $5,0 \times 10^{-5}M$, usando água destilada como branco, no espectrofotômetro CamSpec modelo M501 Single Beam UV/Vis	31
4.1.4	Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico nas condições definidas (C) com a concentração de fosfato $5,0 \times 10^{-5}M$, usando os reagentes menos o fosfato como branco, no espectrofotômetro CamSpec modelo M501 Single Beam UV/Vis	32
4.1.5	Curva analítica de ácido fosfomolibdico em 380 nm	33
4.1.6	Interferência da composição do meio de cultura utilizado na determinação de fosfato pela formação do ácido fosfomolibdico	35
4.1.7	Determinação de fosfato em meio de cultivo de microalgas	36
4.1.7.1	Acompanhamento da concentração de fosfato no meio de microalga por dia	36
4.2	DETERMINAÇÃO DE FOSFATO BASEADA NA FORMAÇÃO DE ÁCIDO FOSFOMOLÍBDICO EXTRAÍDO EM ISOBUTANOL	38
4.2.1	Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico na fase orgânica da extração com isobutanol de uma solução de fosfato $1,00 \times 10^{-5}M$	38
4.2.2	Curvas analíticas de extração com isobutanol com os reagentes sem o fosfato como branco	41
4.2.2.1	Curva analítica no comprimento de onda da luz de 315 nm	41
4.2.2.2	Curva analítica no comprimento de onda da luz de 320 nm	42
4.2.3	Curvas analíticas da determinação de fosfato extraído em isobutanol e utilizando o próprio isobutanol como branco	43
4.2.3.1	Curva analítica no comprimento de onda da luz de 315nm	43
4.2.3.2	Curva analítica no comprimento de onda da luz de 320nm	44
4.2.4	Curva analítica da determinação de fosfato extraído em isobutanol, utilizando a os reagentes sem adição de fosfato como branco em 320 nm para meios mais diluídos	46
4.2.5	Exemplo de determinação de fosfato com extração em isobutanol em meios salinos:	47
5	CONCLUSÃO:	48
	ANEXO 1 – Meio de cultura LAM-02	50
	ANEXO 2 – Curva de especiação do ácido fosfórico	51
	ANEXO 3 – Algumas constantes de sais e complexos formados por espécies de fosfato e íons Cálcio e Magnésio	52
	ANEXO 4 – Dedução da lei de Lambert Beer	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA

As microalgas têm sido um produto de grande interesse por seu potencial de produção de biomassa e óleo e podem ser utilizadas também como alimento de alto valor nutricional para animais e até para suplementação alimentar de seres humanos. Além disso, as promessas são de alta produtividade a baixo custo, com as vantagens de não competir por terra com a produção de alimentos e absorver CO₂, um dos gases do efeito estufa. Apesar das promessas de baixo custo, os estudos e as tecnologias ainda encontram-se em desenvolvimento. O que torna o cultivo de microalgas ainda caro para produção em larga escala (BENEMANN, 2008).

Uma das formas de se reduzir esses custos é o controle das quantidades de nutrientes que devem ser fornecidos as microalgas. Pois, se conhecendo a relação entre o consumo dos nutrientes e a taxa de crescimento das microalgas, pode-se otimizar os meios de cultivo, de acordo com o resultado que se deseja alcançar. O Laboratório de Análise Ambiental e Mineral (LAM) vem desenvolvendo e otimizando metodologias e instrumentação para o controle físico-químico da produção de microalgas desde 2008, em meios salinos, utilizando águas produzidas, em cooperação com a PETROBRAS/CENPES.

O fosfato é um nutriente essencial para o crescimento das microalgas, visto que ele faz parte da constituição da membrana fosfolipídica, que envolve a célula (RICHMOND,2004). Assim, é de suma importância obter metodologias eficientes, que possam ser utilizadas para determinar a quantidade de fosfato nos meios de cultura de microalgas.

Como é um meio salino, além do fosfato como fonte de fósforo, ele contém alta concentração de cloreto de sódio e vários outros íons, como pode ser observado no anexo 1. Entre esses íons, o Ca²⁺ e Mg²⁺, que são nutrientes importantes para o desenvolvimento saudável das microalgas, além de todos os íons M²⁺ e M³⁺, são associados fortemente a espécies de fosfato (H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻ e PO₄³⁻), por formação de complexos e precipitados, sendo interferentes, causando erros sistemáticos na análise. Assim, o estudo deve levar em consideração essas possíveis interferências e ser capaz de evitá-las.

1.2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Os métodos descritos na literatura para a determinação de pequenas quantidades de fosfato são métodos espectrofotométricos baseados na formação do ácido fosfomolibdico.

1.2.1 Espectrofotometria

A espectrofotometria (espectrometria de absorção molecular UV/Visível) é largamente utilizada para a determinação quantitativa de um grande número de espécies inorgânicas, orgânicas e biológicas. Essa técnica baseia-se na medida da transmitância ou absorvância de uma solução, numa faixa muito estreita de comprimento de onda (SKOOG, 2009).

A transmitância T é definida como “a fração da luz incidente que passa por uma amostra” (HARRIS, 2011, p. 358). Assim temos:

$$T = I/I_0$$

Onde I_0 é a intensidade da radiação que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que a atravessa. Em geral, a transmitância é expressa em porcentagem, uma vez que I_0 seria a energia radiante total emitida pela fonte e I seria a fração que passou desse total. Dessa forma, em 100% de transmitância teremos toda a luz passando e em 0% de transmitância toda luz absorvida.

Por sua vez, define-se a absorvância A como o $\log(I_0/I)$, ou seja:

$$A = -\log T$$

Quando nenhuma luz for absorvida, logo $I_0=I$, teremos $A=0$. Se 90% da luz for absorvida, $A=1$ (HARRIS, 2011). Uma vez que a absorção de luz pela matéria é exponencial, trabalhar com a absorvância nos possibilita encontrar uma relação linear com a concentração. O que simplifica modelos para a previsão da absorção de uma molécula em uma solução.

Em geral, a absorvância é proporcional à concentração de moléculas que absorvem luz de um determinado comprimento ou faixa de comprimento de onda. Essa grandeza também é proporcional ao caminho óptico da substância através da qual a luz viaja. A dependência linear da absorvância com a concentração e o caminho óptico é mostrada na Lei de Lambert Beer (sua dedução é encontrada no anexo 4):

$$A = \epsilon bc$$

Onde b é o caminho óptico da amostra, c é a concentração da molécula absorvente e ϵ é a absorvidade molar, uma constante de proporcionalidade que é característica intrínseca de cada molécula. (HARRIS, 2011)

Assim, medindo-se a absorvância de uma solução com concentração conhecida da molécula absorvedora, em um determinado comprimento de onda, e um caminho óptico constante e conhecido, podemos conhecer sua absorvidade molar. Esta, uma vez determinada, pode ser utilizada para descobrir a concentração da molécula em uma solução problema. Isso é realizado medindo-se sua absorvância em uma célula com caminho óptico conhecido.

$$c = \epsilon b / A$$

Experimentalmente, constrói-se um gráfico A (adimensional) x c (molar, M), onde o coeficiente angular é igual a ϵb . Conhecendo-se o caminho óptico (cm), temos o ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$). Esse gráfico é chamado de curva analítica.

Para medir a absorvância de uma solução em determinados comprimentos, ou faixa de comprimentos, de onda utiliza-se um espectrofotômetro. O diagrama esquemático de um espectrofotômetro é apresentado a seguir:

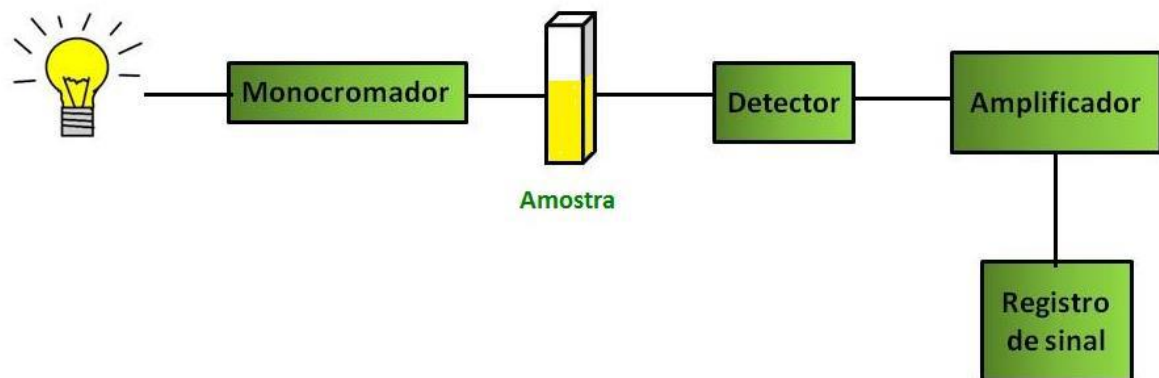


Figura 1 - Diagrama esquemático de um espectrofotômetro

Como pode-se ver no esquema acima, a luz é emitida de uma fonte de radiação, em geral uma lâmpada de deutério para emissões em comprimentos de onda entre 200 nm até 400 nm, para espectroscopia na região do ultravioleta, e uma lâmpada de tungstênio para emissões entre 320 nm até 1100 nm (HARRIS, 2011).

Em seguida, a luz passa por um dispositivo que separa e seleciona uma faixa de comprimento de onda. Essa separação pode ser realizada utilizando-se filtros ópticos ou monocromadores. Os filtros ópticos selecionam uma faixa espectral relativamente estreita da

radiação contínua emitida. Eles se dividem em filtros de absorção, que selecionam bandas com cerca de 50 nm de espessura e estão restritos aos comprimentos de onda da luz visível, e os filtros de interferência, que selecionam bandas com largura de cerca de 20 nm e podem operar no ultravioleta e no visível. Já os monocromadores separam uma radiação policromática em linhas ou bandas espectrais muito estreitas e permitem a variação contínua do comprimento de onda da radiação em uma faixa ampla, cobrindo o ultravioleta e o visível. Um monocromador consiste em uma fenda de entrada que produz uma imagem regular, uma lente ou espelho colimador, um prisma ou rede de difração que dispersa a radiação emitida em seus comprimentos de onda constituintes, um segundo elemento de focalização e uma fenda de saída que isola a banda espectral desejada. Atualmente, os monocromadores comerciais utilizados são principalmente as redes de difração, porque elas são fabricadas com custos mais baixos e fornecem uma melhor separação dos comprimentos de onda para o mesmo tamanho de elemento dispersivo (SKOOG, 2009).

No geral, uma banda mais estreita aumenta a sensibilidade das medidas de absorvância, pode produzir uma maior seletividade nos métodos e é frequentemente desejável para garantir a relação linear da absorvância com a concentração, mostrada na lei de Lambert Beer. Porém, é preciso um cuidado para se não buscar bandas cada vez mais estreitas sem necessidade, pois nem todos os métodos exigem as mesmas sensibilidades e seletividades. Alguns métodos podem ser otimizados para se trabalhar em espectrofotômetros ou até fotocolorímetros (utiliza filtros para selecionar a banda de comprimento de onda) com bandas de larguras um pouco maiores, sem afetar a qualidade do método.

Por fim, após passar pelo monocromador, a luz, agora monocromática, passa pela amostra e a luz que consegue atravessar é recebida pelo detector. Após o sinal ser amplificado, ele vai para o registrador, onde podemos ver os resultados.

1.2.2 Determinação de fosfato como ácido fosfomolibdico

Dos métodos espectrofotométricos, dois grupos podem ser relacionados para determinação quantitativa de fosfato: (1) os métodos baseados na formação do ácido fosfomolibdico (composto amarelo), por reação do molibdato com o fosfato em meio ácido e posterior leitura da sua absorvância em comprimentos de onda de 300 a 400 nm, e (2) os métodos baseados na formação do mesmo composto, porém com redução parcial do Mo(VI) para Mo(V), formando um composto de composição variável, contendo as duas espécies,

conhecido como “Azul de Fosfomolibdênio”. Este composto azul absorve em comprimentos de onda de 650 a 700 nm (BABKO, 1974).

Dentre esses, escolheu-se trabalhar com o grupo de métodos (1). Pois embora sejam menos sensíveis, estes são mais confiáveis por terem composição definida. Além disso, sua sensibilidade é suficiente para as faixas de concentração de fosfato que geralmente são usadas nos meios de cultura de microalgas (Anexo 2). A sensibilidade inferior é explicada pelo fato do excesso de molibdato absorver fortemente no UV, onde fica o máximo da banda (entre 310-330 nm) do ácido fosfomolibdico. Por essa razão, na determinação do fosfato sem redução, a absorvância é medida em 380-410 nm. Nessa região, a absorvidade molar é da ordem de $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (BABKO, 1974).

A reação de formação do ácido fosfomolibdico é:



Em meio com excesso de H^+ : $\text{H}_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$

O espectro de absorção esperado para o ácido fosfomolibdico em meio aquoso usando o molibdato em meio ácido como branco é:

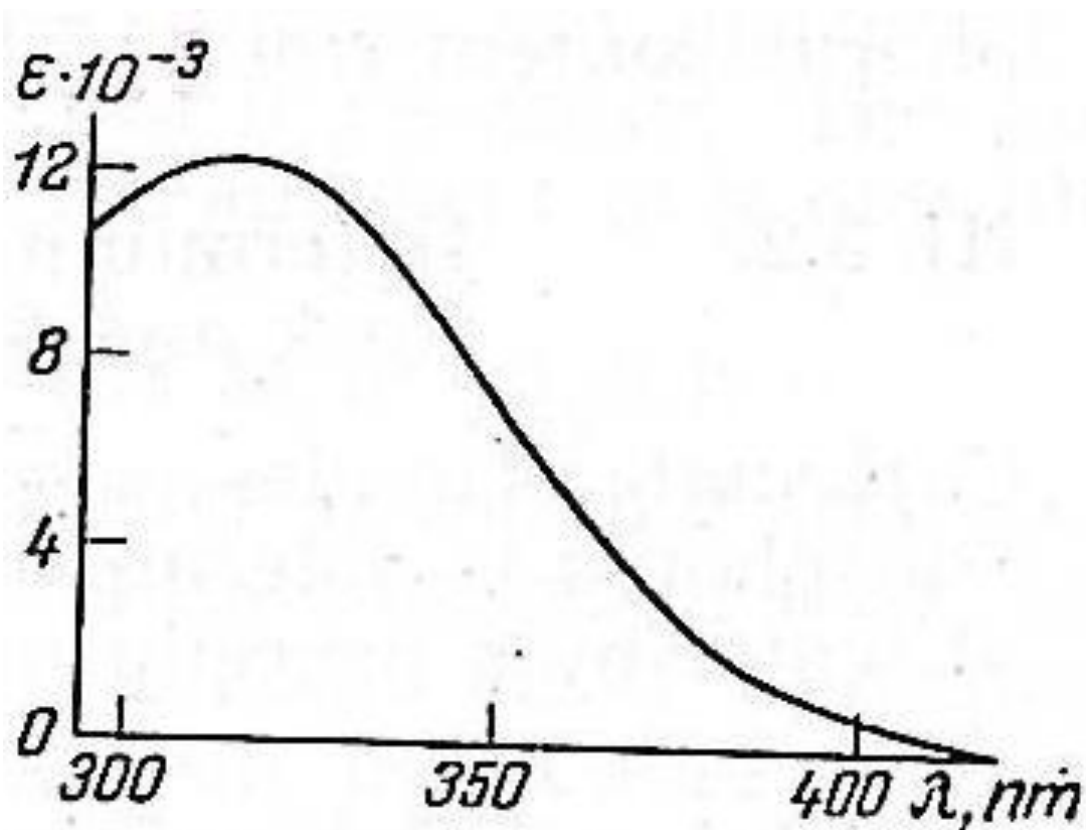


Figura 2 - Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico em solução aquosa, contra o branco do reagente - Sem extração (fonte: BABKO, 1974, p. 85)

Porém, dependendo do excesso de molibdato essa curva pode ficar distorcida nos comprimentos de onda entre 300 nm e 330 nm. Isso ocorre por causa da absorção do molibdato, que pode reter mais que 99,999%, deixando passar menos de 0,001% da luz incidida, o que está abaixo da capacidade de detecção da maioria dos espectrofotômetros usados atualmente.

A extração com solvente orgânico possibilita o aumento da sensibilidade, extraindo o ácido fosfomolibdico e deixando o excesso de molibdato na fase aquosa. Isso possibilita medir a absorvância em 310-330 nm, ou seja, onde fica o máximo de absorção do composto. Nessas condições, a absorvidade molar é da ordem de $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (BABKO, 1974). A desvantagem é que a extração acrescenta-se mais etapas a determinação, o que implica em uma análise mais demorada.

O espectro de absorção esperado para o ácido fosfomolibdico em uma mistura 1:4 de butanol e clorofórmio:

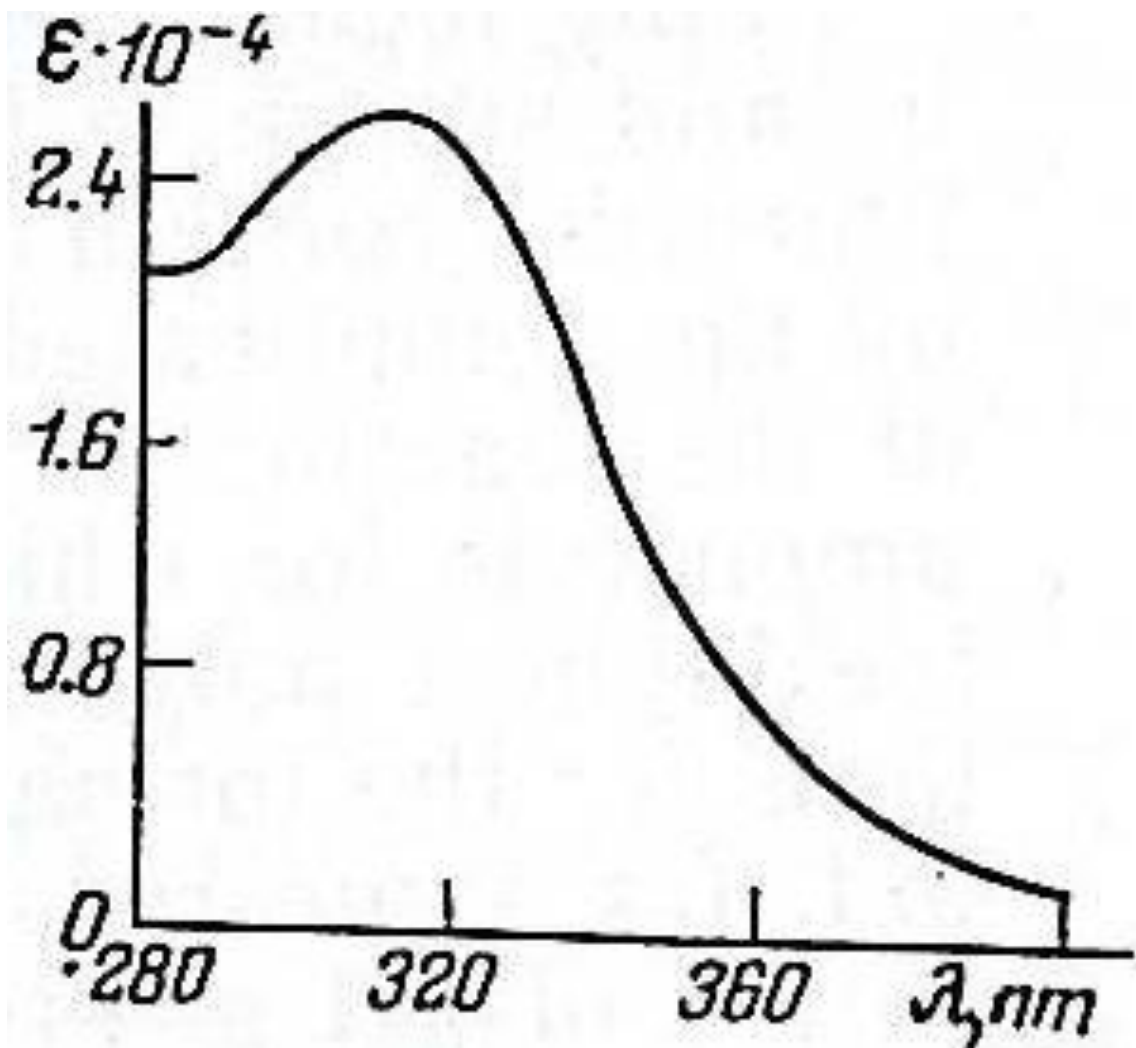


Figura 3 - Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico em mistura de butano e clorofórmio 1:4 - Com extração (fonte: BABKO, 1974, p. 87)

Segundo a literatura, a curva analítica para o composto amarelo em água deve ser feita na faixa de 0,5 até 5 mg de fosfato/25mL de água (BABKO, 1974). O que em molar é aproximadamente $6,5 \times 10^{-4} \text{ M} - 6,5 \times 10^{-3} \text{ M}$. Já o mesmo composto extraído com solvente orgânico tem um limite de detecção de 10 μg de fosfato/10 mL de solvente orgânico e a sua faixa de determinação é 10 até 100 μg de fosfato/10 mL de solvente orgânico (BABKO, 1974). O que em molar é aproximadamente $3,2 \times 10^{-5} \text{ M} - 3,2 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Para a formação do ácido fosfomolibdico, como já citado acima, são necessários meio ácido e a presença do molibdato em excesso. Para o método sem extração, é recomendado 5 mL de uma solução de molibdato de amônio 0,04 M, para um volume final na determinação de 25 mL, e ácido com a concentração final de 0,25 N (BABKO, 1974). Isso, em mol.L^{-1} é $8 \times 10^{-3} \text{ M}$ de molibdato de amônio.

A grande maioria dos métodos disponíveis na literatura utilizam balões de 25 ou 50 mL. (BABKO, 1974; GREENDEBERG, 1992). Isso para campo é crítico, uma vez que balões são mais caros, grandes e frágeis. Uma vez que se pretende utilizar o método em campo, o ideal é que se busque materiais volumétricos menores e mais robustos. Um tubo de ensaio aferido para volume final de 10 mL, por exemplo, é muito menor e mais barato.

Além das vidrarias, as quantidades de reagentes também são muito grandes. Para a extração com isobutanol, por exemplo, a literatura recomenda 40 mL de isobutanol em funil de extração de 125 mL. Reduzir esses volumes e substituir vidrarias maiores, como o funil de extração é de suma importância. Uma seringa, por exemplo, pode servir perfeitamente como recipiente para a extração.

1.2.3 O meio de cultura e possíveis interferentes

Como exposto no anexo 1, o meio contém alta concentração de cloreto de sódio. O cloreto complexa Mo(VI), portanto, deve-se estudar experimentalmente se na concentração do meio, a determinação de fosfato pela formação do ácido fosfomolibdico será afetada.

Além de cloreto de sódio, o meio contém vários outros íons. Entre esses íons, o Ca^{2+} e Mg^{2+} , além de todos os íons M^{2+} e M^{3+} , são associados fortemente a espécies de fosfato (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} e PO_4^{3-}), por formação de complexos e precipitados (Anexo 3), sendo interferentes, podendo causar erros sistemáticos na análise.

A formação do ácido fosfomolibdico é em meio ácido, seu ótimo é em pH abaixo de 1,5, onde as frações molares dos íons de fosfato são muito baixas, predominando H_3PO_4 ,

como podemos ver no anexo 2, o que praticamente elimina a formação de fosfato-complexos de Mg e Ca.

O fosfato no meio está na concentração de $2 \times 10^{-3} \text{M}$. Portanto, pretendendo-se utilizar vidraria com volume final 10 mL, e estabelecendo-se que se deseja utilizar 1 mL de alíquota das amostras nas medidas, a curva analítica para a determinação de fosfato deve ser na faixa de $\sim 10^{-5} \text{M}$ até $2 \times 10^{-4} \text{M}$ de fosfato.

2 OBJETIVO DO TRABALHO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi selecionar e otimizar um método para determinação de fosfato em meio de cultivo microalgas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar métodos adequados para determinação de fosfato em meio de cultura de microalgas;
- Ajustar os métodos de acordo com as condições do meio;
- Simplificar os métodos para possibilitar a determinação de fosfato em campo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REGENTES

- KH_2PO_4 PA
- Molibdato de amônio PA
- H_2SO_4 PA 95% - 99%

3.2 MATERIAIS

- Béqueres;
- Balões volumétricos;
- Pipetas volumétricas;
- Pipetas graduadas;
- Bastão de vidro;
- Funil;
- Água destilada;
- Chapa aquecedora;
- Cubeta de 1 cm de caminho óptico;
- Tubo de ensaio com marcação para 10 mL;
- Seringas;
- Balanças;
- Espectrofotômetro CamSpec modelo M501 Single3 Beam UV/Vis;
- Espectrofotômetro portátil de imersão StellarNet modelo SL5-DH Deuterium+Halogen Lamps.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 **Determinação de fosfato como ácido fosfomolibdico em meio aquoso**

3.3.1.1 Preparação de soluções:

- *Solução padrão de KH_2PO_4 0,1 M*

Pesou-se a massa de 1,3881 de KH_2PO_4 para 100 mL de volume final em água destilada.

- *Solução de KH_2PO_4 0,01 M*

Mediu-se o volume de 10 mL da solução de KH_2PO_4 0,1 M para 100 mL em água destilada.

- *Solução de KH_2PO_4 0,001 M*

Mediu-se o volume de 10 mL da solução de KH_2PO_4 0,01 M para 100 mL em água destilada.

- *Solução padrão de molibdato de amônio 0,1 M*

Pesou-se a massa de 12,36 g do molibdato de amônio para 100 mL de volume final em água destilada.

- *Solução padrão de ácido sulfúrico 3 M*

Mediu-se o volume de 82,5 mL do ácido sulfúrico concentrado para 500 mL em água destilada.

- *Solução padrão de molibdato de amônio 0,02 M em ácido sulfúrico 2,5M*

Mediu-se o volume de 10 mL do molibdato de amônio e 6,9 mL do ácido sulfúrico concentrado para 50 mL em água destilada.

- *Solução padrão de molibdato de amônio 0,1 M em ácido sulfúrico 3 M*

Pesou-se a massa de 12,36 g do molibdato de amônio e o volume de 16,5 mL do ácido sulfúrico concentrado para 100 mL de volume final em água destilada.

3.3.1.2 Quantidades e concentrações dos reagentes para volume final 10 mL

Seguindo as concentrações finais dos reagentes encontradas na literatura, molibdato $\approx 0,008$ e ácido $\approx 0,25$ N (BABKO, 1974), chegou-se as seguintes possíveis concentrações das soluções dos reagentes, considerando-se 10 mL de volume final da análise:

- (A) 3 mL de uma solução de molibdato de Amônio 0,02 M em ácido sulfúrico 2,5 M;
- (B) 1 mL de uma solução de molibdato de Amônio 0,1 M em ácido sulfúrico 3 M;
- (C) 1 mL de uma solução molibdato de Amônio 0,1 M + 1 mL de uma solução de ácido sulfúrico 3 M.

Em tubos de ensaio com marcação para 10 mL, adicionaram-se os volumes de solução para cada uma das possibilidades. Em seguida, colocou-se em cada tubo de ensaio 0,5 mL de solução de fosfato $1,020 \times 10^{-3}$ M. Aferiu-se com água destilada cada tubo para volume final 10 mL. Os tubos foram fechados e homogeneizados. Por fim, fez-se a leitura da absorvância a 380 nm no espectrofotômetro CamSpec modelo M501 Single Beam UV/Vis, utilizando cubeta de 1 cm de caminho óptico. Foram feitas duplicatas para cada possibilidade de combinação dos reagentes. Para o “branco”, repetiram-se as quantidades de reagentes e sem a adição de solução de fosfato.

3.3.1.3 Espectro de absorção dos reagentes nas condições definidas (C) do item 3.3.1.2, usando água destilada como branco

Em tubo de ensaio com marcação para 10 mL, adicionou-se 1 mL de solução de molibdato de amônio 0,1 M e 1 mL de ácido sulfúrico 3 M em cada tubo. Aferiu-se com água destilada o tubo para volume final 10 mL. O tubo foi fechado e homogeneizado. Por fim, fez-se a leitura da absorvância a 380 nm no espectrofotômetro CamSpec modelo M501 Single Beam UV/Vis, utilizando cubeta de 1 cm de caminho óptico, com a água destilada como branco.

3.3.1.4 Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico nas condições definidas (C), com a concentração de fosfato $5,0 \times 10^{-5}M$ usando como branco água destilada ou os reagentes

Em tubo de ensaio com marcação para 10 mL, adicionou-se 1 mL de solução de molibdato de amônio 0,1 M e 1 mL de ácido sulfúrico 3 M em cada tubo. Em seguida, colocou-se no tubo de ensaio 0,5 mL de solução de KH_2PO_4 $1,020 \times 10^{-3}M$. Aferiu-se com água destilada o tubo para volume final 10 mL. O tubo foi fechado e homogeneizado. Por fim, fez-se a leitura da absorvância a 380 nm no espectrofotômetro CamSpec modelo M501 Single Beam UV/Vis, utilizando cubeta de 1 cm de caminho óptico, com a água destilada como branco.

Repetiu-se o procedimento, porém para o “branco”, repetiram-se as quantidades de reagentes, sem a adição de solução de fosfato.

3.3.1.5 Procedimento para o preparo da curva analítica

Em tubos de ensaio com marcação para 10 mL, adicionou-se 1 mL de solução de molibdato de amônio 0,1 M e 1 mL de ácido sulfúrico 3 M em cada tubo. Em seguida, colocou-se em cada tubo de ensaio os volumes de 0 mL, 0,3 mL, 0,5 mL, 0,8 mL, 1,0 mL, 1,5 mL, 2,0 mL, 2,5 mL e 3,0 mL de solução de KH_2PO_4 $1,020 \times 10^{-3}M$. Fizeram-se triplicatas para cada ponto da curva. Aferiu-se com água destilada cada tubo até volume final 10 mL. Estes foram fechados e homogeneizados.



Figura 4 - Preparação da curva para a determinação de fosfato

Por fim, fez-se a leitura da absorvância a 380 nm no espectrofotômetro CamSpec modelo M501 Single Beam UV/Vis, utilizando cubeta de 1 cm de caminho óptico, utilizando o volume 0 mL de solução de fosfato $1,020 \times 10^{-3} \text{M}$ como branco. A partir das absorvância medidas, construiu-se um gráfico ABS x Concentração (M).



Figura 5 - Espectrofotômetro CamSpec modelo M501 Single Beam UV/Vis

Repetiu-se o procedimento para preparo da curva analítica, porém com os volumes 0 mL, 0,5 mL, 1,0 mL, 1,5 mL, 2,0 mL, 2,5 mL de solução de KH_2PO_4 $1,000 \times 10^{-3} \text{M}$, medidos em uma seringa de 3 mL. As leituras das absorvâncias foram feitas em 380 nm, no espectrofotômetro portátil de imersão da StellarNet modelo SL5-DH Deuterium+Halogen Lamps. A partir das absorvância medidas construiu-se um gráfico ABS x Concentração (M).



Figura 6 - Espectrofotômetro portátil com célula de imersão da StellarNet modelo SL5-DH Deuterium+Halogen Lamps

3.3.1.7 Interferência dos componentes do meio de cultura na determinação de fosfato

Preparou-se um meio de cultura de acordo com as concentrações expostas no anexo 1, utilizando-se a concentração de fosfato $2,0 \times 10^{-3} \text{M}$ (meio A₁). Mediu-se 1 mL desse meio em pipeta volumétrica e colocou-se em um tubo de ensaio com marcação para volume final de 10 mL para fazer a prévia. Adicionou-se, então, 1 mL de solução de molibdato de amônio 0,1 M e 1 mL de ácido sulfúrico 3 M. Avolumou-se com água destilada o tubo para volume final 10 mL e homogeneizou-se. Foram feitas quatro replicatas. A leitura da absorvância foi feita a 380 nm em espectrofotômetro CamSpec, usando cubeta de 1 cm de caminho óptico.

Utilizou-se o gráfico da curva analítica para estimar a concentração molar a partir da absorvância de cada replicata.

Repetiu-se o procedimento para o meio preparado, porém sem a adição de fosfato (meio A₂).

3.3.1.8 Procedimento para amostras

Centrifugou-se a amostra retirada do meio de microalgas. Em seguida, filtrou-se o decantado em seringa com filtro acoplado. Desse filtrado, tirou-se uma alíquota de 1 mL em pipeta volumétrica e colocou-se em um tubo de ensaio com marcação para volume final de 10 mL para fazer a prévia. Adicionou-se, então, 1 mL de solução de molibdato de amônio 0,1 M e 1 mL de ácido sulfúrico 3 M. Avolumou-se com água destilada o tubo para volume final 10 mL e homogeneizou-se. A leitura da absorvância foi feita a 380 nm em espectrofotômetro CamSpec, usando cubeta de 1 cm de caminho óptico.

Foi observado se o valor da absorvância medido estava fora da curva, e diluiu-se ou mudou-se o volume de amostra de meio de microalgas, nos casos necessários, para que a absorvância ficasse dentro da curva.

Mediu-se agora 1 mL em pipeta volumétrica da solução amostra com a concentração ajustada após a diluição, caso necessário. Seguiu-se da mesma forma como indicado acima. Fazendo triplicatas para cada amostra.

Utilizou-se o gráfico da curva analítica para estimar a concentração molar a partir das absorvâncias.

3.3.2 **Determinação de fosfato como ácido fosfomolibdico extraído com isobutanol**

3.3.2.1 Preparação de soluções:

- *Solução padrão de KH_2PO_4 0,1 M*

Pesou-se a massa de 1,361 de KH_2PO_4 para 100 mL de volume final em água destilada.

- *Solução de KH_2PO_4 0,01 M*

Mediu-se o volume de 10 mL da solução de KH_2PO_4 0,1 M para 100 mL em água destilada.

- *Solução de KH_2PO_4 0,001 M*

Mediu-se o volume de 10 mL da solução de KH_2PO_4 0,01 M para 100 mL em água destilada.

- Solução de KH_2PO_4 0,0001 M

Mediu-se o volume de 10 mL da solução de KH_2PO_4 0,001 M para 100 mL em água destilada.

- Solução padrão de molibdato de amônio 0,1 M

Pesou-se a massa de 12,360 g do molibdato de amônio para 100 mL de volume final em água destilada.

- Solução padrão de ácido sulfúrico 3 M

Mediu-se o volume de 82,5 mL do ácido sulfúrico concentrado para 500 mL em água destilada.

3.3.2.2 Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico na fase orgânica da extração em isobutanol de uma solução de fosfato $1,00 \times 10^{-5} M$

Em tubo de ensaio com marcação para 10 mL adicionou-se 1 mL de solução de molibdato de amônio 0,1 M e 1 mL de ácido sulfúrico 3 M para cada tubo. Adicionou-se 1 mL de solução de fosfato $1,00 \times 10^{-4} M$. Aferiu-se o tubo com água destilada para volume final 10 mL, que em seguida fechou-se o tubo e homogeneizou-se.

A seguir, uma de cada vez, verteu-se a solução do tubo de ensaio em um béquer de 15 mL, mediu-se o pH, garantindo que estivesse em 1,1. Em seguida, mediu-se (em seringa de 10 mL) 4 mL da solução que estava no béquer de 15 mL. Secou-se a parte externa da seringa e mediu-se na mesma seringa 4 mL de isobutanol. Com a ponta da seringa apontando para cima, puxou-se o embolo de modo a sobrar um espaço com ar dentro da seringa. Fechou-se o buraco da ponta da seringa e agitou-se por 10 minutos, deixou-se repousar por 5 minutos.

Após o tempo indicado, girou-se a seringa lenta e delicadamente, para evitar que bolhas de água ficassem presas na parede onde estava o Isobutanol e aguardou-se mais 1 minuto. Descartou-se a fase aquosa (mais densa) e colocou-se a fase orgânica na cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Em seguida, foi feito um espectro de varredura na faixa de 270 nm a 400 nm de comprimento de onda da luz incidente. Usou-se o isobutanol como branco.

3.3.2.3 Procedimento para o preparo da curva analítica

Em tubos de ensaio com marcação para 10 mL, adicionou-se 1 mL de solução de molibdato de amônio 0,1 M e 1 mL de ácido sulfúrico 3 M para cada tubo. Colocou-se em cada tubo de ensaio os volumes de 0 mL (branco), 0,3 mL, 0,5 mL, 0,7 mL e 1 mL de solução de KH_2PO_4 $1,0 \times 10^{-3}\text{M}$. Fazendo triplicatas para cada volume. Procedeu-se a extração da mesma forma indicada no item 3.3.2.2. Em seguida, as leituras da absorvância foram feitas contra o branco no espectrofotômetro CamSpec, nos comprimentos de onda 315 e 320 nm.

Em outra cubeta, também de 1 cm de caminho óptico, colocou-se isobutanol e zerou-se o espectrofotômetro com este. E leu-se novamente a absorvância das fases orgânicas, porém dessa vez usando o isobutanol como branco nos mesmos comprimentos de ondas citados acima.

A partir das absorvância medidas, construiu-se um gráfico ABS x Concentração (M).

3.3.2.4 Procedimento para o preparo da curva analítica em concentrações mais baixas

Repetiu-se o procedimento do item 3.3.2.3, porém utilizando-se os volumes de 0mL (branco), 0,2mL, 0,5mL, 1,0mL, 2,0 mL e 4,0mL de solução de KH_2PO_4 $1,0 \times 10^{-4}\text{M}$ para cada tubo de ensaio.

3.3.2.5 Procedimento para amostras

Centrifugou-se a amostra retirada do meio de microalgas. Em seguida, filtrou-se o decantado em seringa com filtro acoplado. Desse filtrado, mediu-se 1 mL em pipeta volumétrica e colocou-se em um tubo de ensaio com marcação para volume final de 10 mL para fazer a prévia. Adicionou-se, então, 1 mL de solução de molibdato de amônio 0,1 M e 1 mL de ácido sulfúrico 3 M. Avolumou-se com água destilada o tubo para volume final 10 mL e homogeneizou-se. Fazendo triplicatas para cada amostra. Procedeu-se a extração da mesma forma indicada no item 3.3.2.2 e usar a absorvância para determinar a concentração a partir da curva de analítica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1 DETERMINAÇÃO DO FOSFATO, BASEADO NA FORMAÇÃO DO ÁCIDO FOSFOMOLÍBDICO

4.1.1 Quantidades e concentrações dos reagentes que devem ser utilizadas para volume final 10 mL

Tabela 1 - Absorvância do fosfato 5×10^{-5} M com as composições de reagentes A, B e C em 380 nm

Reagentes	Absorvância 1	Absorvância 2
(A)	0,037	-0,024
(B)	0,026	0,051
(C)	0,112	0,109

Como podemos observar, apenas para os reagentes com a composição (C) houve absorção mensurável da ordem de $A \approx 0,1$ no comprimento de onda de interesse de 380nm.

Assim, a composição dos reagentes escolhida foi a (C).

4.1.2 Espectro de absorção dos reagentes nas condições definidas (C), usando água destilada como branco, no espectrofotômetro CamSpec modelo M501 Single Beam UV/Vis

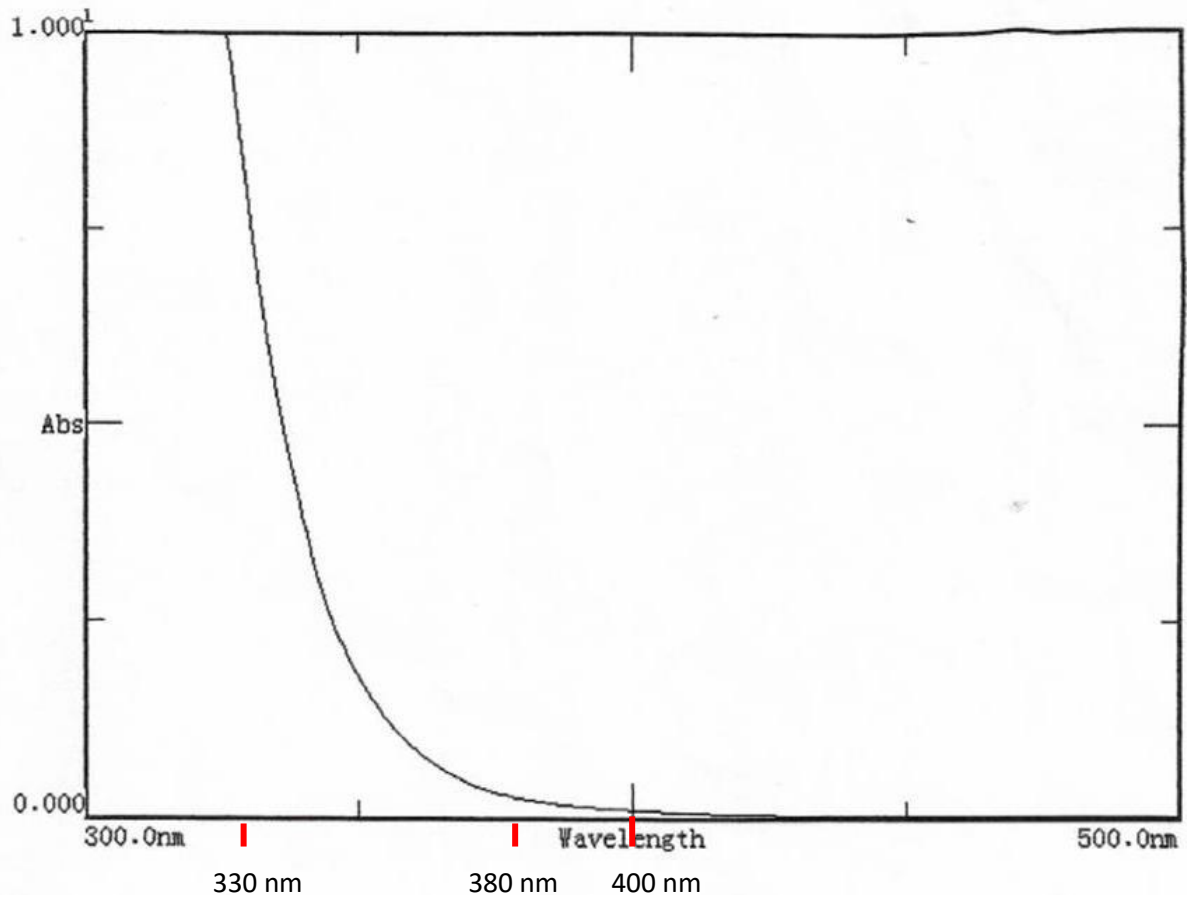


Figura 7 - Espectro de absorção dos reagentes, ácido sulfúrico 0,3 M e molibdato de amônio, usando água destilada como branco

Como podemos observar, a absorvância em 380-400 nm dos reagentes nas condições escolhidas é muito pequena. Já em 300-330 nm, a absorvância ultrapassa a escala de $A=1$, ou seja, mais de 90% da luz é absorvida só pela mistura dos reagentes.

4.1.3 Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico nas condições definidas (C) com a concentração de fosfato $5,0 \times 10^{-5} \text{M}$, usando água destilada como branco, no espectrofotômetro CamSpec modelo M501 Single Beam UV/Vis

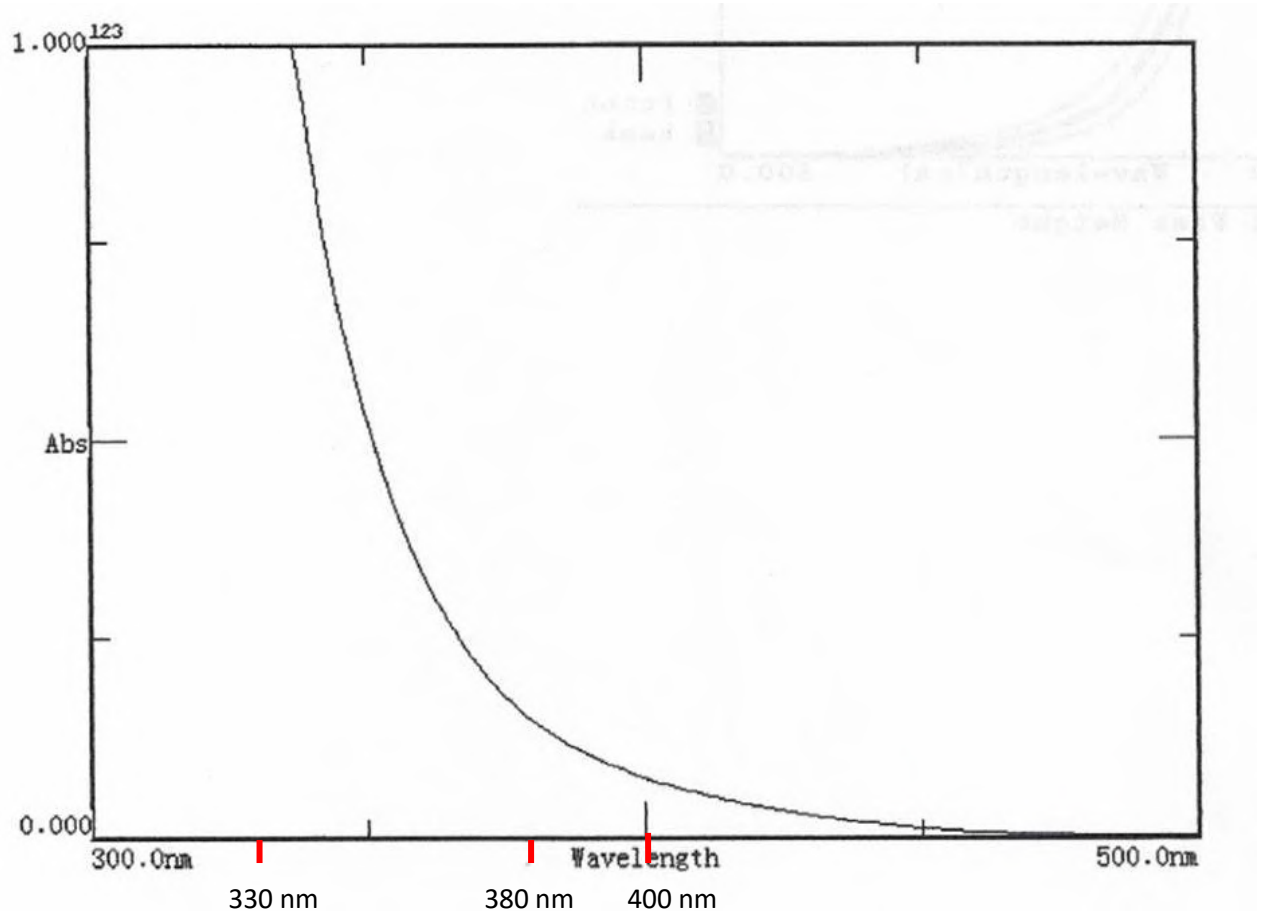


Figura 8 - Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico com fosfato $5,00 \times 10^{-5} \text{M}$ usando água como branco

É possível observar que a absorvância em 380-400 nm nas condições escolhidas (C) aumenta na concentração de fosfato $5,0 \times 10^{-5} \text{M}$. E em 300-330 nm, a absorvância continua ultrapassando a escala de $A=1$.

4.1.4 Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico nas condições definidas (C) com a concentração de fosfato $5,0 \times 10^{-5} \text{M}$, usando os reagentes menos o fosfato como branco, no espectrofotômetro CamSpec modelo M501 Single Beam UV/Vis

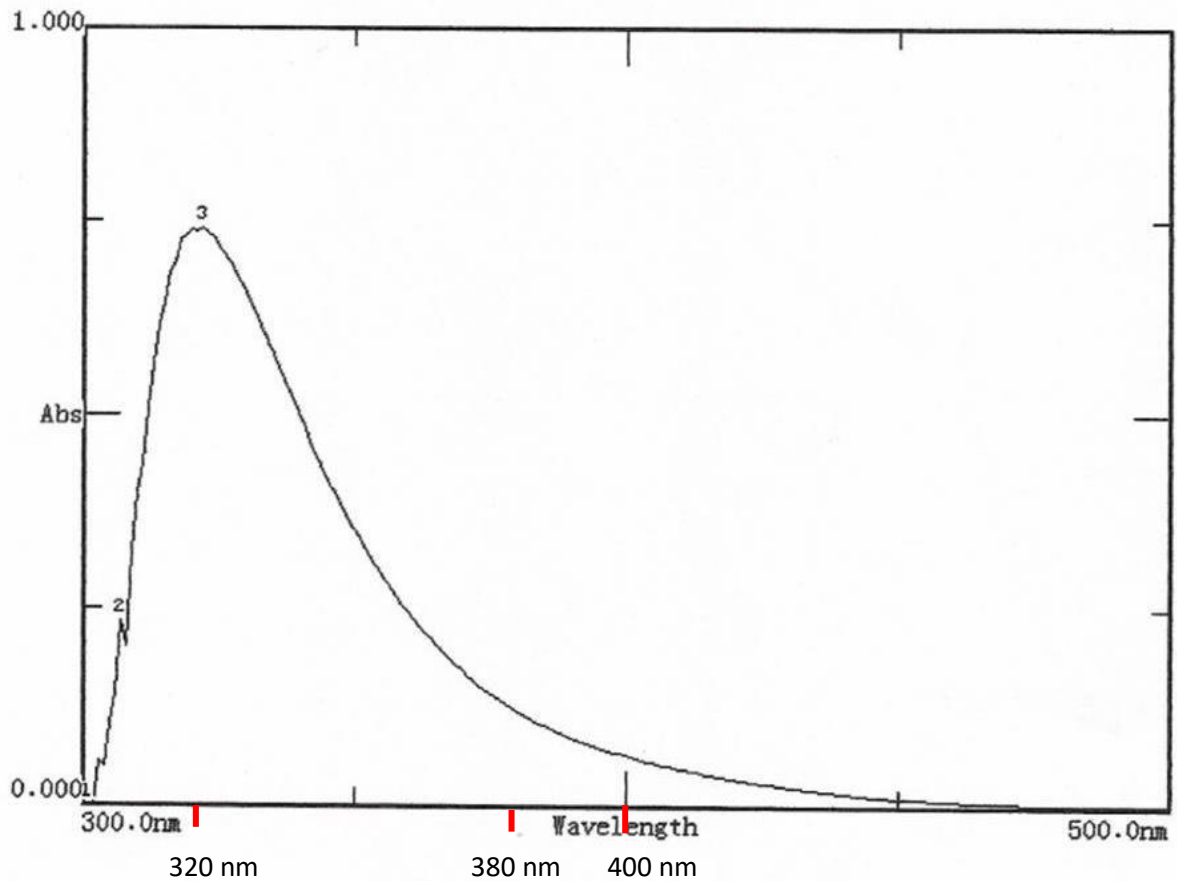


Figura 9 - Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico com fosfato $5,00 \times 10^{-5} \text{M}$ usando reagentes sem fosfato como branco

Observe que o máximo fica entre 310 – 320 nm, porém o excesso de molibdato absorve sensivelmente nessa região, como se pode verificar na figura 7, e por isso, escolheu-se trabalhar em 380 nm. Onde há baixíssima absorção do reagente e uma considerável absorção do ácido fosfomolibdico.

4.1.5 Curva analítica de ácido fosfomolibdico em 380 nm

Tabela 2 - Curva analítica para determinação de fosfato em 380 nm utilizando o espectrofotômetro CAMSPEC modelo M501 Single Beam UV/Vis

X (mL) de KH_2PO_4	Mf KH_2PO_4	Replicada 1 (ABS)	Replicada 2 (ABS)	Replicada 3 (ABS)
0,3	$3,06 \times 10^{-5}$	0,066	0,080	0,068
0,5	$5,10 \times 10^{-5}$	0,095	0,096	0,101
0,8	$8,16 \times 10^{-5}$	0,155	0,149	0,157
1,0	$1,02 \times 10^{-4}$	0,201	0,214	0,207
1,5	$1,53 \times 10^{-4}$	0,329	0,328	0,325
2,0	$2,04 \times 10^{-4}$	0,415	0,426	0,426
2,5	$2,55 \times 10^{-4}$	0,501	0,521	0,508
3,0	$3,06 \times 10^{-4}$	0,626	0,637	0,624

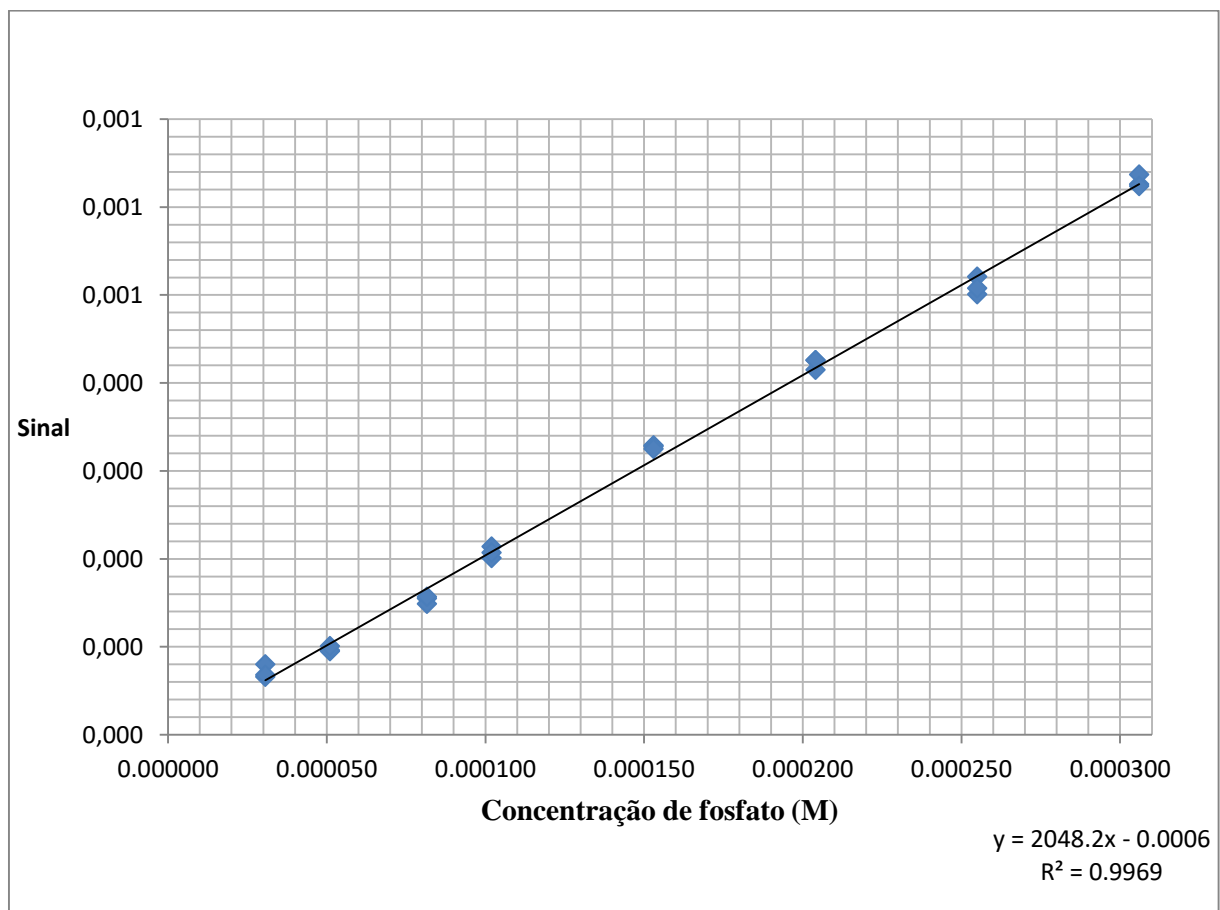


Gráfico 1 - Curva analítica para determinação de fosfato utilizando o espectrofotômetro CAMSPEC modelo M501 single beam UV/Vis

A absorvidade molar experimental nessas condições foi de $2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Esse valor concorda com o valor encontrado na literatura para esse molécula, que é de aproximadamente $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A curva apresentou uma boa linearidade, como podemos observar pelo R^2 de 0,997. Isso mostra que nessa concentração a absorção do ácido

fosfomolibdico segue a lei de Lambert Beer, assim podemos utilizar a equação da reta para determinar a concentração de fosfato nas amostras.

Tabela 3 - Curva analítica de fosfato utilizando o espectrofotômetro portátil de imersão StellarNet modelo SL5-DH Deuterium+Halogen e seringas no lugar de pipetas

X (mL) de KH ₂ PO ₄	Mf KH ₂ PO ₄ (M)	Replicada 1 (ABS)	Replicada 2 (ABS)	Replicada 3 (ABS)
0,0	0	BRANCO	BRANCO	BRANCO
0,5	5,0 x 10 ⁻⁵	0,098	0,098	0,117
1,0	1,0 x 10 ⁻⁴	0,189	0,205	0,207
1,5	1,5 x 10 ⁻⁴	0,295	0,302	0,285
2,0	2,0 x 10 ⁻⁴	0,378	0,360	0,362
2,5	2,5 x 10 ⁻⁴	0,566	0,566	0,561

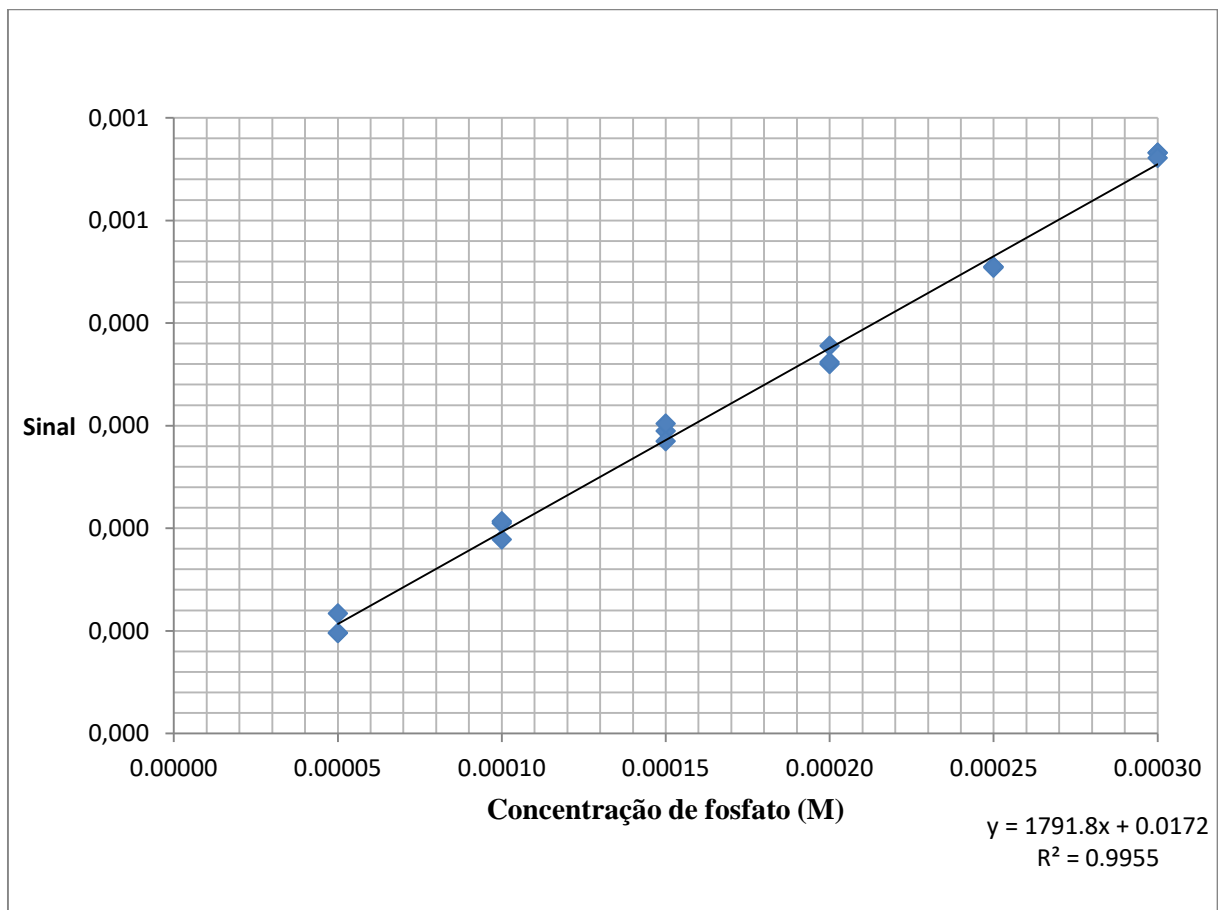


Gráfico 2 - Curva analítica de fosfato utilizando o espectrofotômetro portátil de imersão StellarNet modelo SL5-DH Deuterium+Halogen e seringas no lugar de pipetas

A absorvidade molar medida foi $1,8 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Podemos observar que o R^2 foi de 0,995, ou seja, a linearidade desse gráfico é um pouco pior que o do Gráfico 1, onde se utilizou pipetas e um espectrofotômetro de bancada. Ainda assim, para determinações no

campo, onde ferramentas mais simples e baratas são de grande importância e uma incerteza de 5 a 10% seria aceitável, é possível realizar a medida, com confiabilidade suficiente, usando seringas e um espectrofotômetro portátil.

4.1.6 Interferência da composição do meio de cultura utilizado na determinação de fosfato pela formação do ácido fosfomolibdico

Tabela 4 - Determinação do fosfato no meio de cultura com 2mM de fosfato (A1) e o mesmo meio sem fosfato (A2)

Meio	ABS	Concentração de fosfato na cubeta (mM)	Concentração de fosfato na amostra (mM)	Média ± desvio padrão (mM)
A1	0,403	0,192	1,92	1,96 ± 0,04
	0,421	0,201	2,01	
	0,409	0,195	1,95	
	0,413	0,197	1,97	
A2	0,013	0,003	0,03	-0,04 ± 0,05
	-0,002	-0,005	-0,05	
	-0,009	-0,008	-0,08	
	-0,001	-0,004	-0,04	

Calculando-se a discrepância d, temos:

$$d = \frac{2 - 1,96}{2} \times 100 = 2\%$$

Como podemos observar, utilizando-se o método ajustado para a determinação de fosfato em um meio de cultura com a concentração desse ânion conhecida, foi possível encontrar uma discrepância de 2% em relação ao valor esperado. Para um método experimental, este resultado é bastante satisfatório.

4.1.7 Determinação de fosfato em meio de cultivo de microalgas

4.1.7.1 Acompanhamento da concentração de fosfato no meio de microalga por dia

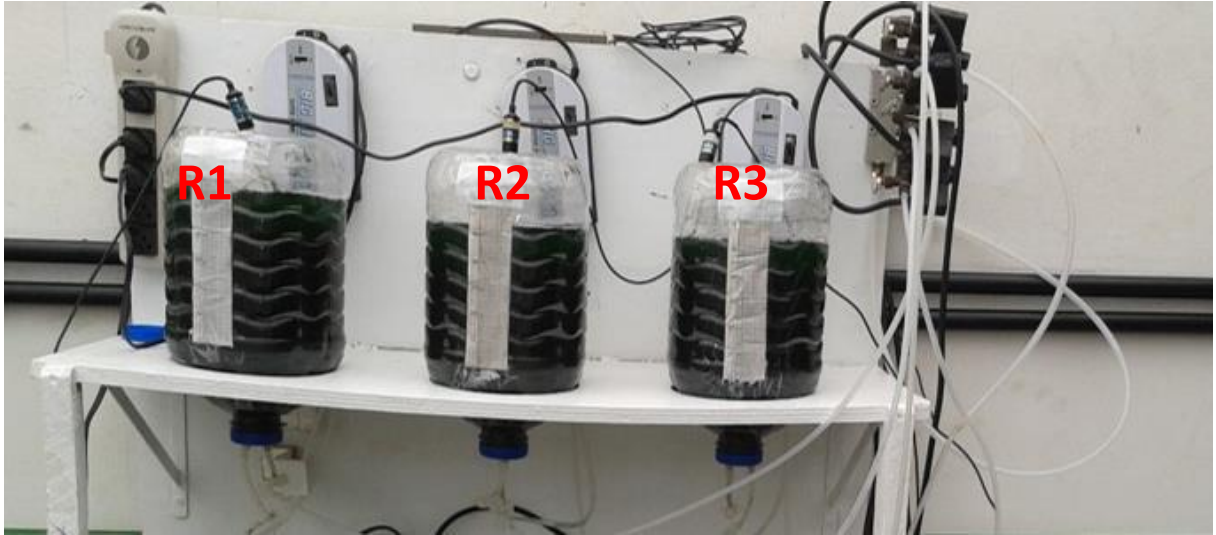


Figura 10 - Cultura de microalgas R1, R2, e R3

Tabela 5 - Acompanhamento da concentração de fosfato no meio do dia 10/dez ao dia 14/dez

Dia	Tempo (dias)	Reator 1 (mM)	Reator 2 (mM)	Reator 3 (mM)
Meio	0	1,88	1,88	1,88
10/dez	0	1,83	1,86	1,85
11/dez	1	1,76	1,59	1,69
12/dez	2	1,6	1,04	1,65
13/dez	3	1,74	1,53	1,72
14/dez	4	1,57	1,05	0,691

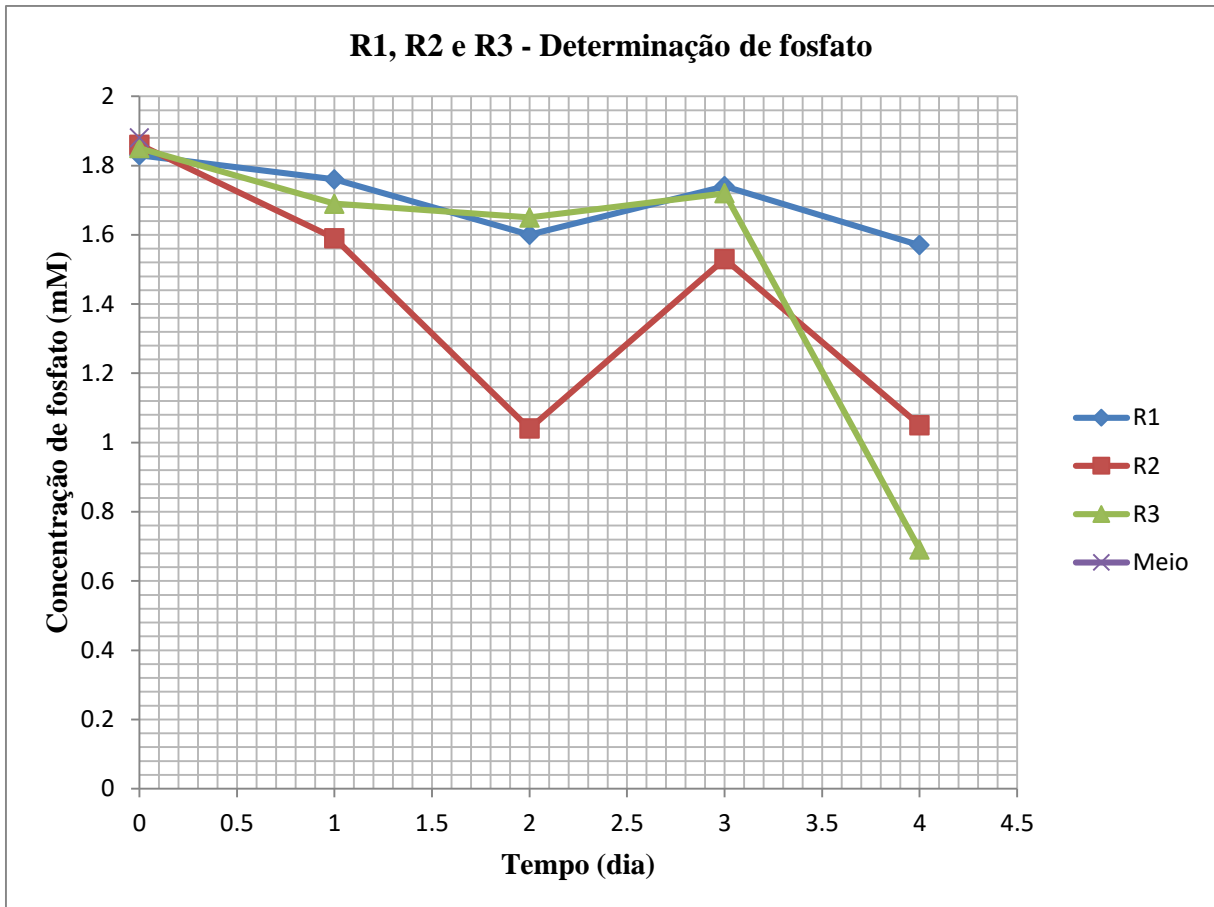


Gráfico 3 - Acompanhamento da concentração de fosfato no meio do dia 10/dez ao dia 14/dez

Estes são 3 reatores, R1, R2 e R3, partindo de um mesmo meio inicial, submetidos a disponibilidade de luz e CO_2 semelhantes, acompanhado por 4 dias. Como podemos observar, no segundo dia, houve uma queda de fosfato, seguida de um aumento de fosfato no meio no terceiro dia. É interessante ressaltar que do primeiro para o segundo dia houve um crescimento considerável das microalgas. Já do segundo para o terceiro dia, houve a morte de parte das microalgas devido a um aumento da temperatura ambiente. Assim. É possível que o fósforo que fazia parte das microalgas que foram mortas tenham sido liberados para o meio por decomposição das mesmas.

Apesar dos dados ainda serem poucos para qualquer afirmação, é muito promissora o acompanhamento da relação dos nutrientes os meios com as microalgas.

Ao observar os dados expostos acima, nota-se que, para uma análise rápida de campo, o método de determinação de fosfato pela reação do fósforo com o molibdato de amônio, formando o ácido fosfomolibdico e posterior medida da sua absorvância, mostrou-se eficiente. Em contra partida há desvantagens em se medir a absorvância em 380 nm, pois fica longe do máximo de absorvância (315 nm), o que diminui a sensibilidade do método.

Mesmo sendo lido em 380 nm, utilizando-se o método sem a extração foi possível determinar o fosfato na faixa de concentração desejada: a faixa de determinação ficou entre $3 \times 10^{-5} \text{M}$ e $3 \times 10^{-4} \text{M}$. Considerando-se a utilização de uma alíquota de 1 a 8 mL de na amostra para volume final 10 mL, a faixa determinação na amostra ficou entre $4 \times 10^{-5} \text{M}$ e $3 \times 10^{-3} \text{M}$. Essa faixa é o suficiente para a determinação de fosfato no meio de cultura LAM-02 (Anexo 1). A concentração do ânion nesse meio é, inicialmente, de $2 \times 10^{-3} \text{M}$, como o limite inferior de determinação na amostra é bem menor, $4 \times 10^{-5} \text{M}$, é possível acompanhar sua queda de concentração devido ao consumo progressivo de fosfato para o crescimento ao longo do tempo. O limite de determinação para o método nas condições escolhida foi de $3 \times 10^{-5} \text{M}$ na cubeta.

4.2 DETERMINAÇÃO DE FOSFATO BASEADA NA FORMAÇÃO DE ÁCIDO FOSFOMOLÍBDICO EXTRAÍDO EM ISOBUTANOL

4.2.1 Espectro de absorção do ácido fosfomolíbldico na fase orgânica da extração com isobutanol de uma solução de fosfato $1,00 \times 10^{-5} \text{M}$

A partir do espectro obtido, foram escolhidos 2 comprimentos de onda: 315 nm, que estava no máximo de absorvância, e 320 nm, que estava um pouco abaixo do máximo de absorvância.

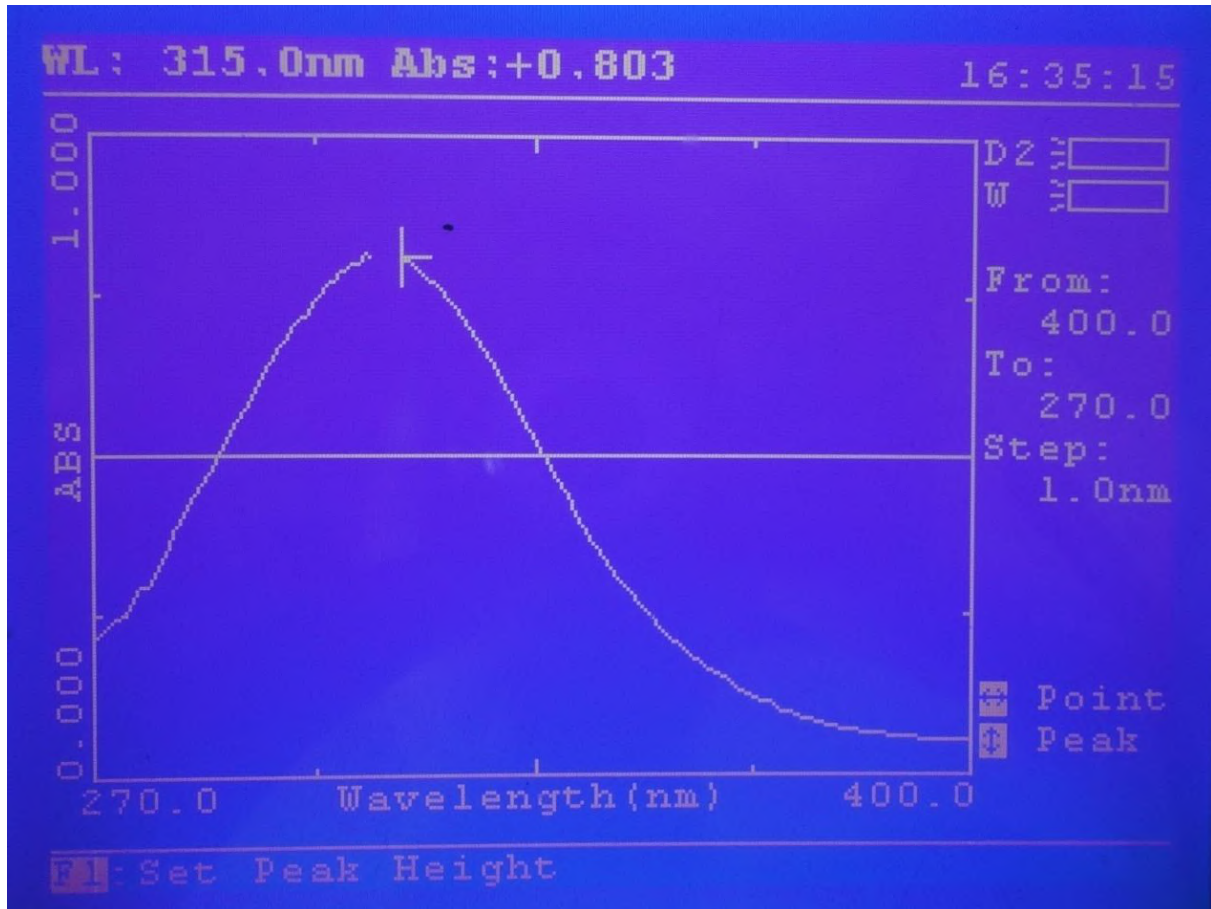


Figura 11 - Espectro de absorção de onda do ácido fosfomolibdico com concentração de fosfato de $1,00 \times 10^{-5}$ M em isobutanol, com o cursor marcando 315 nm

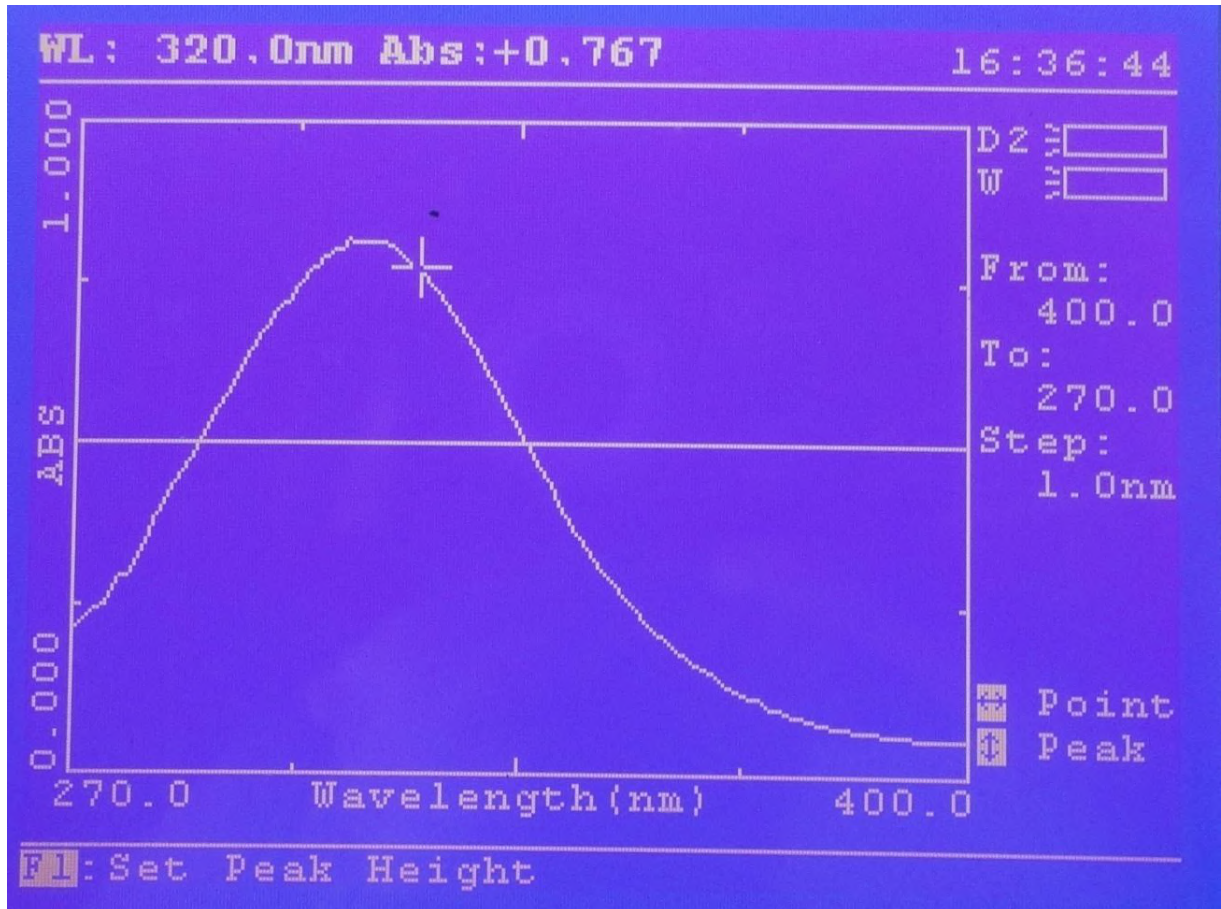


Figura 12 - Espectro de absorção do ácido fosfomolibdico com concentração de fosfato de $1,00 \times 10^{-5}$ M em isobutanol, com o cursor marcando 320 nm

Como já foi dito antes, o método permite que as concentrações de fosfato sejam determinadas no máximo de absorção do ácido fosfomolibdico, uma vez que a extração retira o excesso de molibdato, que absorve muito na mesma região do espectro. Isso possibilitou a escolha dos pontos para leitura no máximo da curva. Assim, foi escolhido o ponto 315 nm no máximo da curva, e um segundo ponto pouco abaixo do máximo, visto que alguns espectrofotômetros só chegam no comprimento de onda mínima de 320 nm.

4.2.2 Curvas analíticas de extração com isobutanol com os reagentes sem o fosfato como branco

4.2.2.1 Curva analítica no comprimento de onda da luz de 315 nm

Tabela 6 - Curva analítica para determinação de fosfato extraído em isobutanol no comprimento de onda 315 nm

X (mL) de KH ₂ PO ₄	Mf KH ₂ PO ₄ (M)	Replicada 1 (ABS)	Replicada 2 (ABS)	Replicada 3 (ABS)
0 mL	0	BRANCO	BRANCO	BRANCO
0,1 mL	0,00001	0,216	0,253	0,235
0,3 mL	0,00003	0,689	0,672	0,661
0,5 mL	0,00005	1,113	1,051	1,060
0,7 mL	0,00007	1,474	1,397	1,462

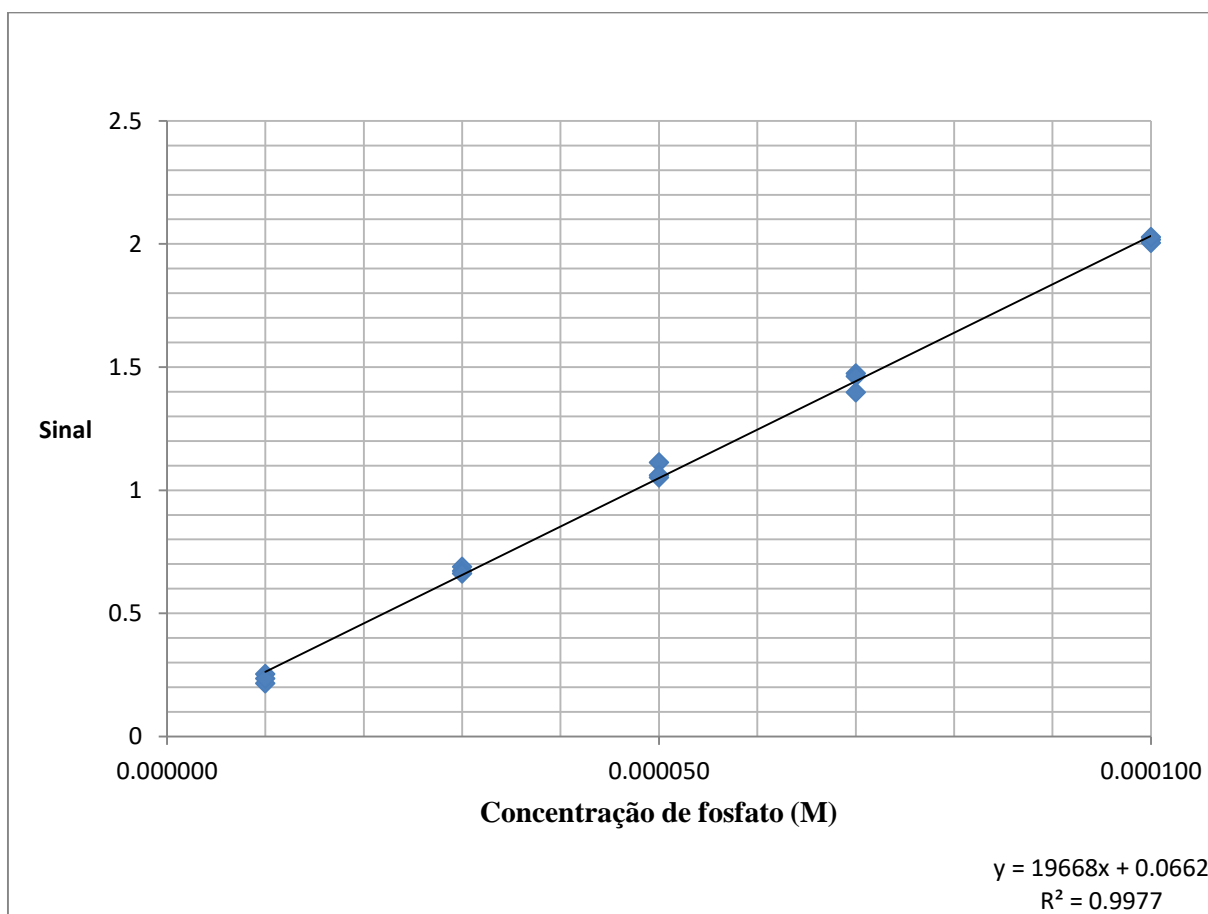


Gráfico 4 - Curva analítica para determinação de fosfato extraído em isobutanol, no comprimento de onda 315 nm

Absortividade molar, seguindo a lei de Lambert Beer, será a inclinação da reta nesse gráfico, assim, nessas condições em 315 nm será de $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Esse valor concorda com o valor encontrado na literatura para esse molécula, que também é de $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Uma

vez que a absorvidade molar é intrínseca de cada molécula, isso nos mostra que estamos realmente determinando o composto esperado. Também foi obtido um R^2 de 0,997, ou seja, a linearidade se mostrou adequada.

4.2.2.2 Curva analítica no comprimento de onda da luz de 320 nm

Tabela 7 - Curva analítica para determinação de fosfato com extração em isobutanol no comprimento de onda 320 nm

X (mL) de KH ₂ PO ₄	Mf KH ₂ PO ₄ (M)	Replicada 1 (ABS)	Replicada 2 (ABS)	Replicada 3 (ABS)
0 mL	0	BRANCO	BRANCO	BRANCO
0,1 mL	0,00001	0,905	0,917	0,888
0,3 mL	0,00003	1,338	1,283	1,280
0,5 mL	0,00005	1,721	1,669	1,658
0,7 mL	0,00007	2,036	1,981	2,047

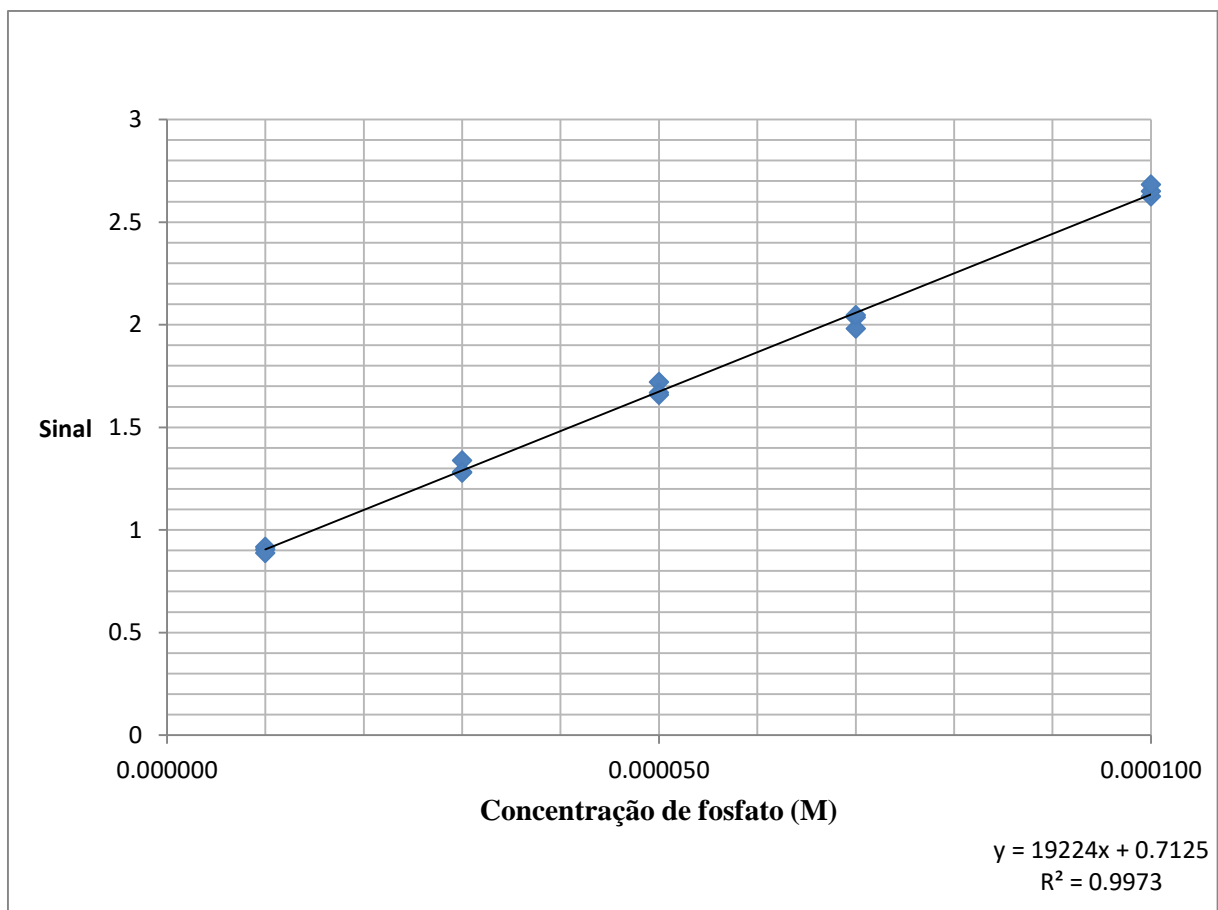


Gráfico 5 - Curva analítica para determinação de fosfato extraído em isobutanol, no comprimento de onda 320 nm

Absortividade molar, seguindo a lei de Lambert Beer, será a inclinação da reta nesse gráfico, assim, nessas condições em 320 nm será de $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, o esperado pela literatura. Além disso, foi obtido um R^2 de 0,997, ou seja, a linearidade se mostrou adequada.

Fazendo as leituras em 315nm, tem-se a vantagem de ler no máximo da banda, como mostra o gráfico na figura 9. Porém, lendo a absorvância em 320 nm aumenta-se a confiabilidade, pois reduz o espalhamento de luz. E por isso escolheu-se ler as amostras em 320 nm.

4.2.3 Curvas analíticas da determinação de fosfato extraído em isobutanol e utilizando o próprio isobutanol como branco

4.2.3.1 Curva analítica no comprimento de onda da luz de 315nm

Tabela 8 - Curva analítica para determinação de fosfato extraído em isobutanol, no comprimento de onda 315 nm, usando isobutanol como branco

X (mL) de KH ₂ PO ₄	Mf KH ₂ PO ₄ (M)	Replicada 1 (ABS)	Replicada 2 (ABS)	Replicada 3 (ABS)
0 mL	0	BRANCO	BRANCO	BRANCO
0,1 mL	0,00001	1,021	1,058	1,04
0,3 mL	0,00003	1,534	1,477	1,475
0,5 mL	0,00005	1,918	1,875	1,865
0,7 mL	0,00007	2,235	2,185	2,257

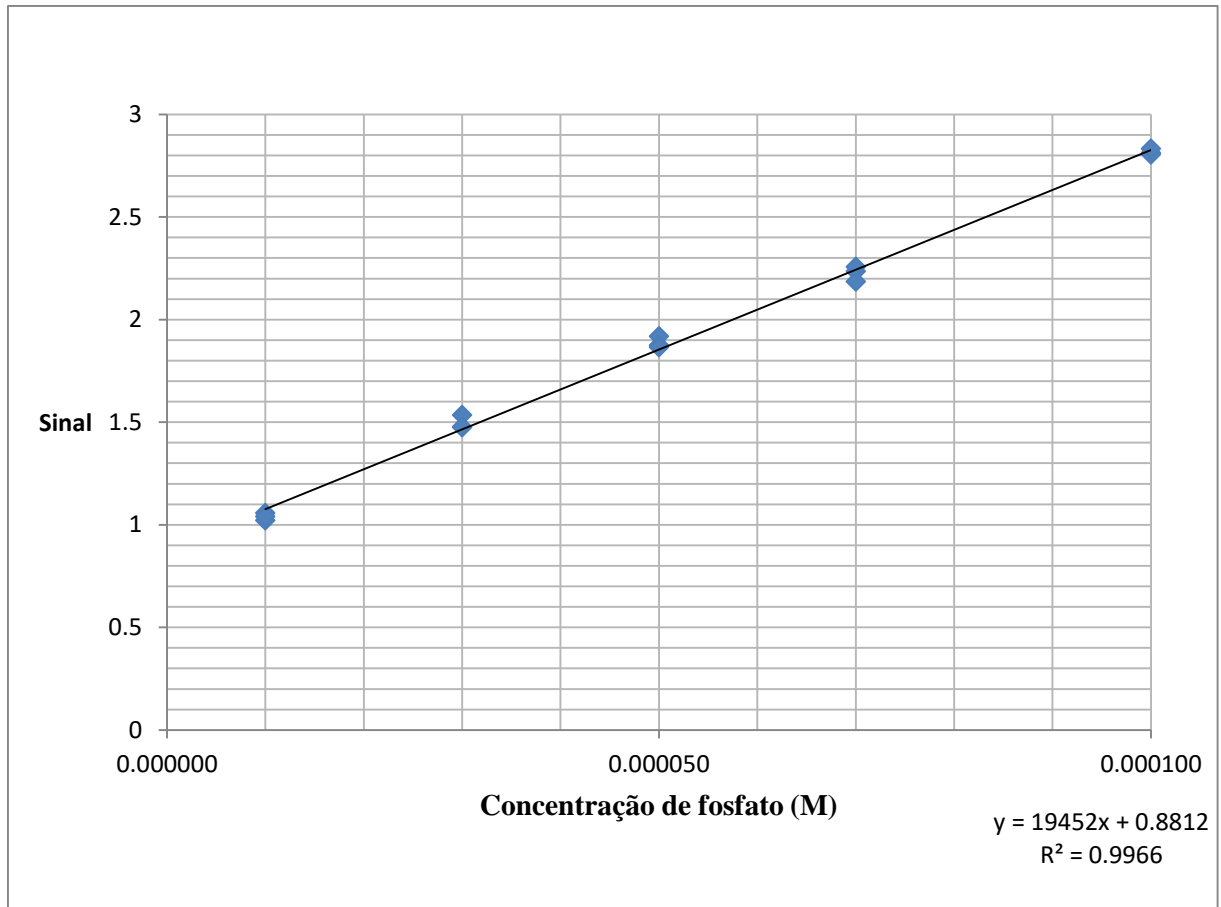


Gráfico 6 - Curva analítica para determinação de fosfato extraído em isobutanol, no comprimento de onda 315 nm, usando isobutanol como branco

Absortividade molar, seguindo a lei de Lambert Beer, será a inclinação da reta nesse gráfico, assim, nessas condições em 315 nm será de $2 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, o que concorda com o esperado da literatura. Também foi obtido um R^2 de 0,997, ou seja, a linearidade se mostrou adequada.

4.2.3.2 Curva analítica no comprimento de onda da luz de 320nm

Tabela 9 - Curva analítica para determinação de fosfato extraído em isobutanol, no comprimento de onda 320 nm, usando isobutanol como branco

X (mL) de KH ₂ PO ₄	Mf KH ₂ PO ₄ (M)	Replicada 1 (ABS)	Replicada 2 (ABS)	Replicada 3 (ABS)
0,1 mL	0,00001	0,905	0,917	0,888
0,3 mL	0,00003	1,338	1,283	1,280
0,5 mL	0,00005	1,721	1,669	1,658
0,7 mL	0,00007	2,036	1,981	2,047
1,0 mL	0,0001	2,625	2,625	2,625

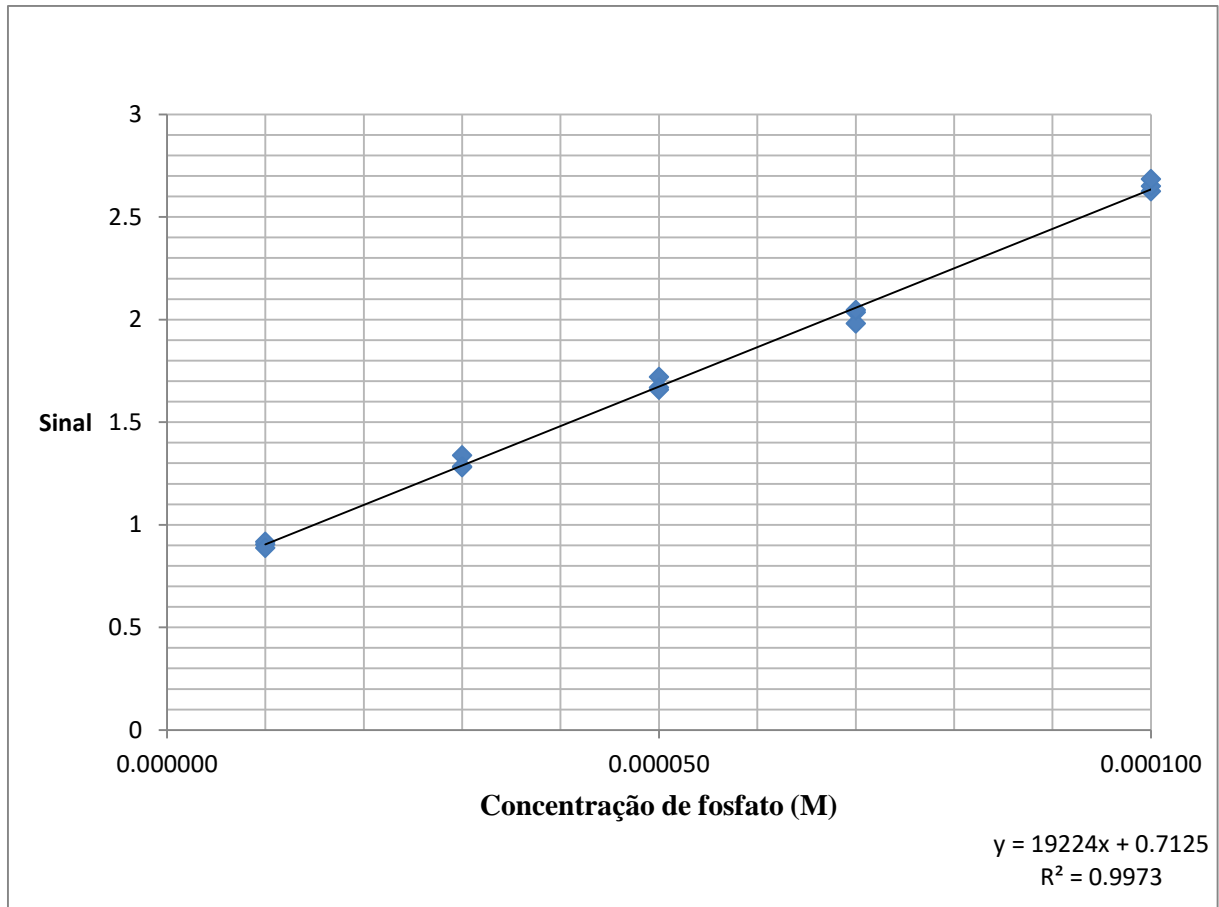


Gráfico 7 - Curva analítica para determinação de fosfato extraído em isobutanol, no comprimento de onda 320 nm, usando isobutanol como branco

Absortividade molar, seguindo a lei de Lambert Beer, será a inclinação da reta nesse gráfico, assim, nessas condições em 320 nm será de $2 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Também foi obtido um R^2 de 0,997, ou seja, a linearidade se mostrou adequada.

A vantagem da metodologia aplicada em 4.2.3.1 e 4.2.3.2 é que, na hora de fazer as medições no meio de cultura de microalgas, é necessário apenas preparar as amostras e medir contra o Isobutanol. Já nos casos 4.2.2.1 e 4.2.2.2, além de preparar as amostras a serem medidas, teria de se preparar também um branco, para zerar. Por outro lado, medir contra o branco reduz a possibilidade de que outras variáveis possam interferir na absorvância. Porém, cada método tem suas vantagens, dependendo de como e em que situações será utilizado.

4.2.4 Curva analítica da determinação de fosfato extraído em isobutanol, utilizando a os reagentes sem adição de fosfato como branco em 320 nm para meios mais diluídos

Tabela 10 - Curva analítica de extração com isobutanol medida em 320 nm para meios mais diluídos

X (mL) de KH ₂ PO ₄	Mf KH ₂ PO ₄ (M)	Replicada 1 (ABS)	Replicada 2 (ABS)	Replicada 3 (ABS)
0,2 mL	0,0020	0,051	0,059	0,065
0,5 mL	0,0050	0,112	0,118	0,097
1,0 mL	0,010	0,208	0,217	0,226
2,0 mL	0,020	0,432	0,422	0,401
4,0 mL	0,040	0,838	0,826	0,809

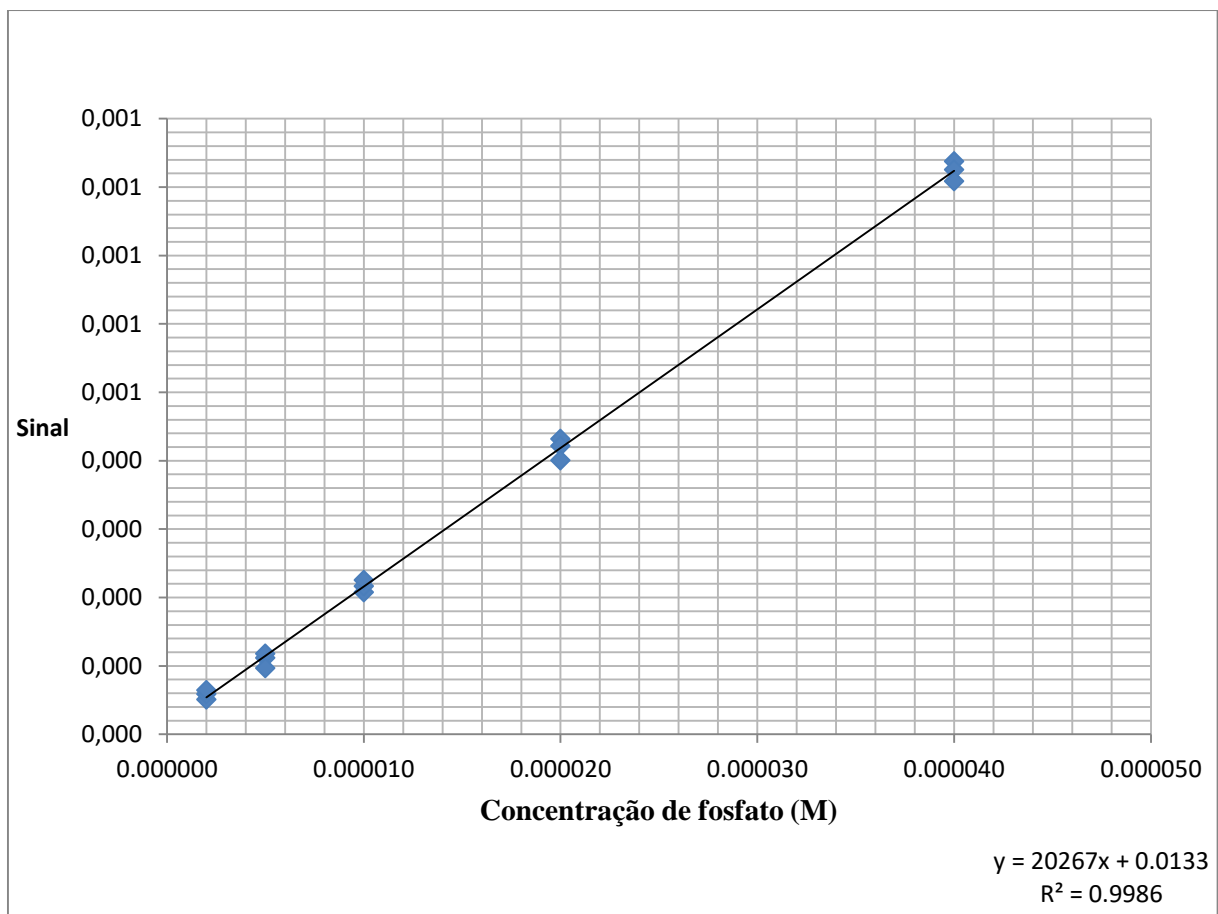


Gráfico 8 - Curva analítica de extração com isobutanol medida em 320 nm para meios mais diluídos

O método que utiliza a extração com isobutanol possibilita a leitura da absorvância no máximo. Assim, o limite de determinação obtido nessas condições para esse método foi de 2×10^{-6} M na cubeta. Porém, a extração aumenta o número de etapas, o que dificulta sua utilização no campo.

Considerando-se os dois métodos, teremos uma faixa de determinação de 2×10^{-6} M até 3×10^{-4} M na cubeta. E os métodos podem inclusive ser utilizados sequencialmente. Ou

seja, utiliza-se o método sem a extração e, caso a concentração de fosfato esteja abaixo do limite de determinação, pode-se fazer a extração com isobutanol.

4.2.5 Exemplo de determinação de fosfato com extração em isobutanol em meios salinos:

Concentração na leitura: 8 ml de amostra utilizados

Tabela 11 - Determinação de fosfato com extração em isobutanol em amostras de água do mar com proliferação de microalgas

Amostra:	ABS	Concentração na leitura (mM)	Concentração na Amostra (mM)	Concentração na amostra (μ M)
A1S	0,137	0,00600	0,00750	7,5
A3m	0,194	0,00865	0,01081	10,8
A4S	0,064	0,00260	0,00325	3,3
A4m	0,148	0,00651	0,00814	8,1
A5m	0,132	0,00576	0,00721	7,2
A6S	0,135	0,00590	0,00738	7,4
ARS	0,148	0,00651	0,00814	8,1
ARm	0,220	0,00986	0,01232	12,3

As amostras eram de água do mar de vários pontos ao longo da costa de Angra dos reis. Foi feito o estudo da concentração de fosfato, entre outros nutrientes, devido a uma proliferação anormal de microalgas na região. A ideia era se comparar a concentração de fosfato em locais onde não havia essa proliferação (ARS e ARm), com outros locais onde se encontravam uma grande quantidade de microalgas (A1S, A3m, A4S, A4m, A5m e A6S). Como pode-se observar, as concentrações de fosfato tinham ordem de grandezas muito próximas, não sendo possível relacionar essa proliferação a concentração do fosfato.

5 CONCLUSÃO:

Os métodos espectrofotométricos baseados na formação do ácido fosfomolibdico, com e sem extração em isobutanol, se mostraram adequados para a determinação de fosfato em um meio de cultura de microalga.

Nas condições estabelecidas, o método que utiliza a extração com isobutanol apresentou um limite de determinação bem menor, de $2 \times 10^{-6}M$, porém o método insere mais etapas, o que dificulta sua utilização em campo. Já o método sem extração apresentou um limite de quantificação bem mais alto, de $3 \times 10^{-5}M$, porém essa faixa é o suficiente para a determinação de fosfato no meio de cultura LAM-02.

Assim, utilizando-se os dois métodos, é possível chegar a uma vasta faixa de determinação, podendo-se utilizar os métodos de forma sequencial.

REFERÊNCIAS

BABKO, A. K. and PILIPENKO, A. T. **Photometric Analysis: Methods of determining non-metals**. Moscow: Khimiya, 1974.

BENEMANN, J. R. **Open ponds and closed photobioreactors: Comparative economics**. 5th Annual World Congress on Industrial Biotechnology, Chicago, 2008.

GREENDEBERG, A. E.; CLESCERI, L.S.; EATON, A.D. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 18 ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington. 1992.

HARRIS, D. C. **Explorando a Química Analítica**. Tradução de Carlos Afonso...[et al.]. 4ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2011.

LEVINE, I. N. **Físico-química**. Vol 2. Tradução de Edilson C. Silva e Oswaldo E. Barcia. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

LURE, J. **Handbook of Analytical Chemistry**. Tradução de Nicholas Bobrov. 1 ed. Moscow: Mir Publishers, 1975

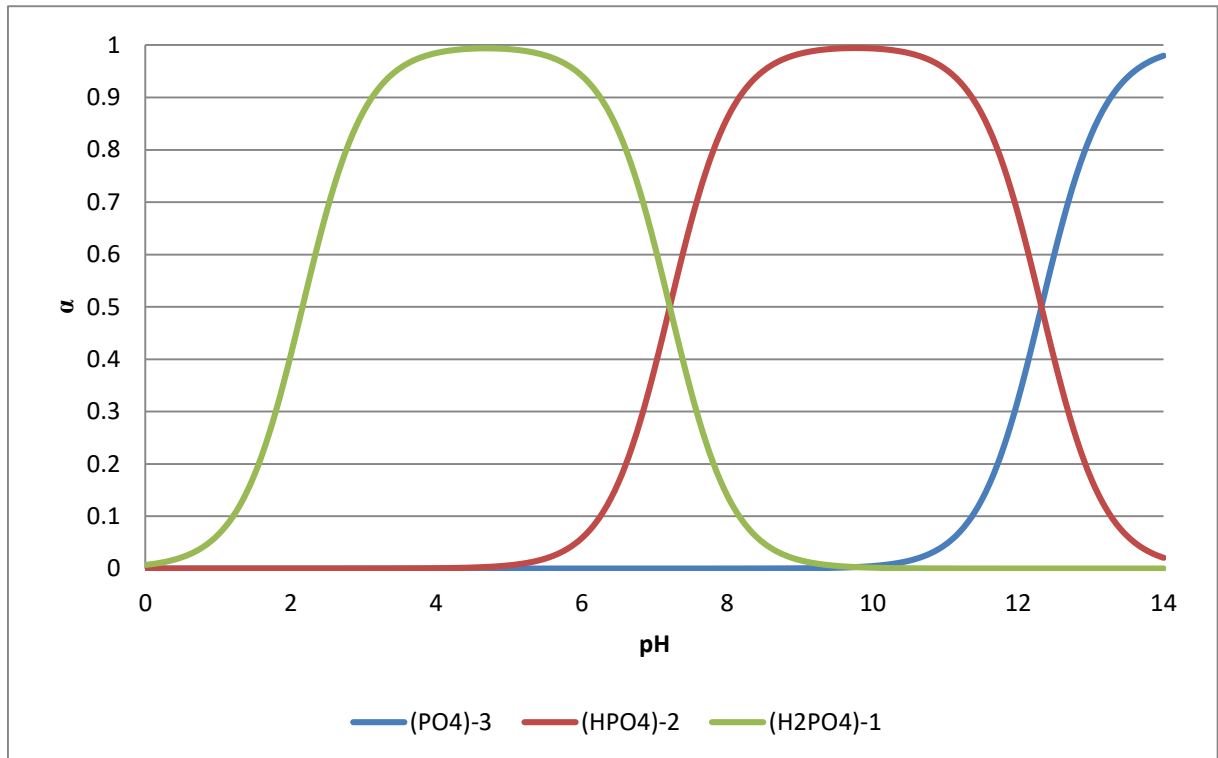
RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. 1 ed. Blackwell Science Ltda, 2004. 530 p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J. H.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise instrumental**. Tradução de Celio Pasquini...[et al.]. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

ANEXO 1 – Meio de cultura LAM-02

Tabela 12- Concentração de cada íon presente no meio LAM-02

Íons	Concentração (M)
Cl ⁻	0,4
HCO ³⁻	0,1
SO ₄ ²⁻	0,02
HPO ₄ ²⁻	2,00 x 10 ⁻⁰³
NH ₄ ⁺	5,00 x 10 ⁻⁰³
Na ⁺	0,3
K ⁺	0,03
Mg(II)	0,05
Ca(II)	0,01
Mn(II)	1,00 x 10 ⁻⁰⁵
Fe(II)	1,00 x 10 ⁻⁰⁵
Zn(II)	1,00 x 10 ⁻⁰⁶
Co(II)	5,00 x 10 ⁻⁰⁸
Cu(II)	5,00 x 10 ⁻⁰⁸
Mo(VI)	2,00 x 10 ⁻⁰⁷

ANEXO 2 – Curva de especiação do ácido fosfórico**Gráfico 9 - Curva de especiação do ácido fosfórico**

ANEXO 3 – Algumas constantes de sais e complexos formados por espécies de fosfato e íons Cálcio e Magnésio

Tabela 13 - Constantes de sais e complexos de espécies fosfatos (LURE, 1975)

Constata do produto de solubilidade (kps)		
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$2,0 \times 10^{-9}$	
$\text{Ca}(\text{HPO}_4)$	$2,7 \times 10^{-7}$	
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1×10^{-3}	
$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$	1×10^{-13}	

Constantes de formação		
	HPO_4^{2-}	H_2PO_4^-
Ca^{2+}	$5,012 \times 10^2$	12,023
Mg^{2+}	$3,123 \times 10^2$	-

ANEXO 4 – Dedução da lei de Lambert Beer

A absorção de luz UV/Visível é frequentemente descrita pela lei de Lambert Beer, que relaciona essa absorção a concentração de moléculas que absorvem luz em uma determinada pequena faixa de comprimento de onda.

Considere que um feixe de luz de faixa de comprimento de onda muito estreita, λ a $\lambda + d\lambda$, atravessa uma amostra composta por uma substância z dissolvida em um solvente que não absorve radiação e nem interage fortemente com z . Admita que I_0 é a intensidade de radiação incidente sobre a amostra e I_1 é a intensidade dessa radiação após atravessar uma distância x da amostra.

A variação da intensidade da luz, dI , será proporcional a intensidade de luz I e ao número de moléculas de z encontradas pelo feixe, dn , na espessura dx :

$$dI \propto -I \cdot dn$$

Por sua vez, dn é proporcional a concentração molar de z , c_z , e a sua espessura dx :

$$dI \propto -I \cdot c_z \cdot dx$$

Admitindo-se a constante de proporcionalidade k :

$$dI = -k I \cdot c_z \cdot dx$$

$$\frac{dI}{I} = -k \cdot c_z \cdot dx$$

Integrando ao longo do comprimento b da amostra teremos:

$$\int_{I_0}^{I_1} \frac{dI}{I} = -k \cdot c_z \cdot \int_0^b dx$$

$$\ln \frac{I_1}{I_0} = -k \cdot c_z \cdot b$$

$$2,303 \cdot \log_{10} \frac{I_1}{I_0} = -k \cdot c_z \cdot b$$

$$\log_{10} \frac{I_0}{I_1} = \frac{k}{2,303} \cdot c_z \cdot b$$

Assim, definimos absorvância $A = \log_{10} \frac{I_0}{I_1}$, que depende da intensidade de luz que intensidade na amostra e a intensidade de luz que atravessa a amostra. Definimos também a absortividade molar como $\epsilon = \frac{k}{2,303}$, uma constante que é característica intrínseca de cada molécula em um dado comprimento de onda (LEVINE, 2012). A lei de Lambert Beer fica então:

$$A = \epsilon bc$$