

# Otimização de Metodologia da AOCS (Official Method Ca 12 55) para Determinação de Conteúdo de Fósforo em Óleos

R. Antoniassi<sup>1</sup> & W. Esteves<sup>2</sup>

<sup>1</sup> - EMBRAPA CTAA Av. das Américas, 29501 CEP 23.020-470 Rio de Janeiro - R.J. - BRASIL <sup>2</sup> - FEA/UNICAMP C.P.6091 - CEP 13.081-970 Campinas - S.P. - BRASIL

**Abstract:** *AOCS methodology optimization (Official Method Ca 12-55) for determination of phosphorus content in oils*

The determination of phosphorus content is extremely important in oil refining. Colorimetric procedures have been used after the formation of complexes such as phosphomolybdic (AOCS, DGF, HARTMAN *et alli*, 1980) and molybdovanadophosphate (IUPAC). The conditions for the formation of "molybdenum blue" were studied. The reducing agents hydrazine sulfate, metol and ascorbic acid were compared. The AOCS Official Method conditions were optimized for oils with a phosphorus content of less than 100 ppm.

## RESUMO

A determinação do conteúdo de fósforo em óleos é de extrema importância no monitoramento das etapas de refino. Os métodos espectrofotométricos têm sido os mais utilizados e estão baseados na formação dos complexos fosfomolibdico (Métodos AOCS, DGF e HARTMAN *et alli* (1980) e fosfomolibdovanadato (Método IUPAC). Foram estudadas as condições para a formação do complexo fosfomolibdico e os catalisadores da reação, sulfato de hidrazina, metol e ácido ascórbico foram comparados quanto aos efeitos batocrômico, hipocrômico, hiperocrômico e hipocrômico. A metodologia da AOCS foi otimizada para determinação de fósforo em óleos branqueados e desodorizados, através da mudança do comprimento de onda de 650 para 830 nm, ajuste do volume de diluição após incineração e alíquotas para formação do complexo.

## INTRODUÇÃO

Os métodos espectrofotométricos de determinação do conteúdo de fósforo em óleos estão baseados na conversão dos fosfolípidios em fósforo inorgânico para posterior formação de um cromóforo.

Existem diversos meios para obtenção do fósforo inorgânico a partir do óleo através da incineração na mufla (métodos da AOCS, IUPAC e DGF), por saponificação (método HARTMAN *et alli*, 1980); por separação em cromatografia de camada delgada, com posterior digestão dos fosfolípidios com ácido perclórico (método ROUSER *et alli*, 1970) etc.

A partir do fósforo inorgânico forma-se o cromóforo que pode ser o conhecido "molibdênio blue", ou complexo fosfomolibdico, como ocorre nos métodos oficiais de determinação de fósforo da AOCS, DGF e no método HARTMAN *et alli* (1980). Enquanto que, o método oficial da IUPAC (2.421) baseia-se na formação do complexo fosfomolibdovanadato de cor amarela que ocorre entre ácido fosfórico, molibdato de amônio e vanadato de amônio.

A formação do cromóforo "molibdênio blue" consiste essencialmente na adição de molibdato de amônio ou sódio a uma solução ácida de fosfato e a consequente redução do complexo fosfo-molibdato para um mais baixo estado de oxidação, com

consequente formação do composto azul de seguinte composição:  $(\text{MoO}_2 \cdot 4\text{MoO}_3)_2 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$ .

O método de formação desse complexo foi primeiro sugerido por OSMOND (1887), que usou cloreto de estanho como agente redutor, e a partir daí, um grande número de trabalhos foi publicado com modificações no método. Em 1914, TAYLOR & MILLER propuseram o uso de fenilhidrazina como agente redutor. Mas provavelmente, o melhor redutor para aplicações gerais é o para-metil amino fenol sulfato ("metol" fotográfico) (ALLPORT & BROCKSOPE, 1963).

Atualmente, nos métodos oficiais da AOCS e DGF, utiliza-se o sulfato de hidrazina como agente redutor.

O método de saponificação desenvolvido por HARTMAN *et alli* (1980) utiliza o metol. Nos métodos de digestão com ácido perclórico, propostos por ALLEN (1940) e BARTLETT (1950), o agente redutor utilizado foi o 2,4 diaminophenoldihydrochloride, ou amidol (KATES, 1972). Enquanto que, ROUSER *et alli* (1970) utilizaram o ácido ascórbico.

A comparação entre métodos de determinação de fósforo em óleos foi realizada por DAUN *et alli* (1981), chegando as seguintes conclusões:

- o método oficial da AOCS que envolve queima do óleo com posterior incineração na mufla, é excessivamente longo.
- o método de digestão com ácido perclórico, também longo, devido ao processo anterior de separação dos fosfolípidios por cromatografia de camada delgada. E ainda, os resultados obtidos foram inferiores aos da AOCS, com as desvantagens da falta de precisão e dos riscos de explosão.
- o método de saponificação desenvolvido por HARTMAN *et alli* (1985), é muito moroso e com resultados na faixa de +/- 10% em relação ao método da AOCS.

Além das diferenças entre os reagentes de redução utilizados, os métodos sugerem comprimentos de onda diferentes para leitura do cromóforo na faixa de 650 a 830 nm. No método oficial da AOCS a leitura ocorre a 650; no método oficial da DGF e no método modificado por BARTLETT (1959) a 830nm; no método modificado por ALLEN (1940), em 680nm; no método HARTMAN *et alli* (1980) a 750 nm e no método de ROUSER *et alli* em 797nm.

## MATERIAL E MÉTODOS

Comparação entre os agentes redutores para formação do "molibdênio blue": Foram construídos espectros do cromóforo a partir de padrões de concentração conhecida, nas seguintes condições dos métodos: Official Method AOCS - Ca 12 55 (1989); HARTMAN *et alli* (1980) e ROUSER *et alli* (1970).

Construção de curva de calibração de fósforo para o método da AOCS. Foram preparadas soluções de concentração conhecidas de fósforo com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , e a reação realizada de acordo com a metodologia citada. Foram efetuadas leituras em 650 e 830 nm.

Otimização da metodologia oficial da AOCS (Official Method Ca 12 55 -1989). Após incineração na mufla as cinzas

sofreram digestão com ácido clorídrico, e o extrato foi recolhido em balões volumétricos de 100 e 50 mL. Para a reação de cor foram coletados volumes dos extratos de 5, 10, 20 e 30 mL, e o agente redutor foi utilizado nas proporções indicadas e o dobro dos volumes do molibdato e do sulfato de hidrazina.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram construídos espectros do composto "molibdênio-blue" obtido com três redutores diferentes: sulfato de hidrazina do método da AOCS; metol do método HARTMAN e ácido ascórbico do método ROUSER (Figuras, 1, 2 e 3).

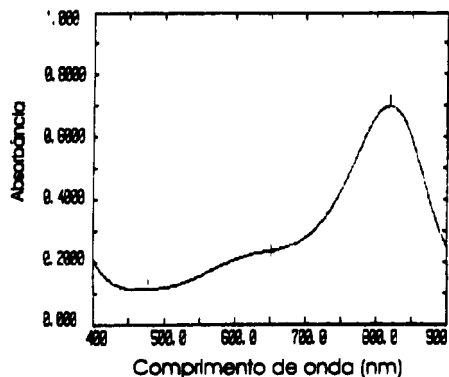


Figura 01. Espectro de absorção do complexo fosfo-molibdato (900 a 400 nm) quando ácido ascórbico foi utilizado como agente redutor, numa solução de 20 µgramas de fósforo/25 mL.

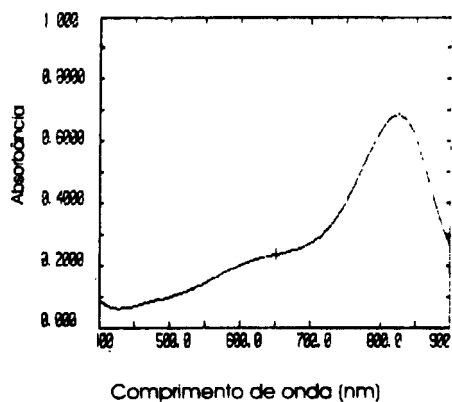


Figura 02. Espectro de absorção do complexo fosfo-molibdato (900 a 400 nm) utilizando-se sulfato de hidrazina como agente redutor, numa solução de 20 µgramas de fósforo/25 mL.

Para uma concentração de fósforo de 20 gramas de fósforo/25 ml o comprimento de onda de absorção máxima do cromóforo foi de 824 nm para a reação realizada com sulfato de hidrazina e 820 nm para a reação com ácido ascórbico, com valores de absorbância máxima de 0,686 e 0,701, respectivamente. Observou-se que para o metol, ocorreu uma redução da intensidade de absorção, em relação ao sulfato de hidrazina e ácido ascórbico. Já que, numa solução de 100 gramas de fósforo/25 mL o valor de absorbância máximo é de 0,5. Comparando-se os espectros obtidos, ocorreu deslocamento da banda de absorção do cromóforo e ainda, uma redução significativa da intensidade de absorção

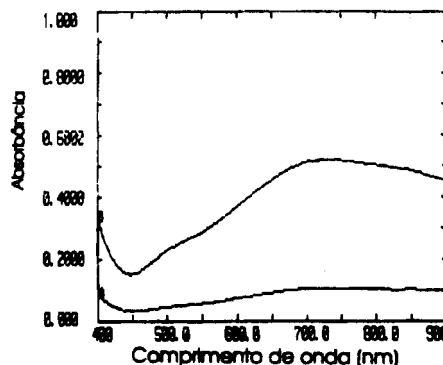


Figura 03. Espectro de absorção do complexo fosfo-molibdato (900 a 400 nm) utilizando-se METOL como agente redutor:  
A - solução de 20 µgramas de fósforo/25 mL.  
B - solução de 100 µgramas de fósforo/25 mL.

quando metol foi utilizado como agente redutor, nas condições do método HARTMAN.

A região de absorção máxima do cromóforo ocorreu na região de 800 a 830nm quando o sulfato de hidrazina e ácido ascórbico foram utilizados como agentes redutores. Assim, o método da AOCS sugere a leitura longe do pico máximo, o que implica na utilização de maiores quantidades de amostra.

Foram construídas curvas de calibração para o fósforo com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  nas condições do método da AOCS, com leituras em 650 e 830nm (Tabela 1 e Figura 4). Para as leituras realizadas em 650nm observou-se que o intervalo de linearidade vai até 0,6 de absorbância, enquanto que em 830nm a faixa de linearidade é mais ampla. Assim, quando se faz leituras em 650nm, acima de 0,6 de absorbância ocorre um desvio nos valores finais de fósforo das amostras.

Amostras de óleo bruto, degomado e branqueado de arroz e milho foram analisadas quanto ao teor de fósforo pelo método da AOCS, tendo-se como padrão as seguintes condições de diluição: todo o fósforo foi recolhido em balão volumétrico de 100 mL e para a reação de cor foram coletados 10 mL.

As condições de ajuste da acidez não foram alteradas em função da mudança da diluição de 100 para 50 mL.

De acordo com os resultados obtidos nas tabelas 2, 3 e 4 não observadas diferenças significativas entre os teores de fósforo para 10 e 42 amostras de óleo de arroz e milho, respectivamente, quando:

- o extrato das cinzas foi coletado em 50 mL;
- o volume coletado para a reação foi de 5, 10, 20 e 30 mL.

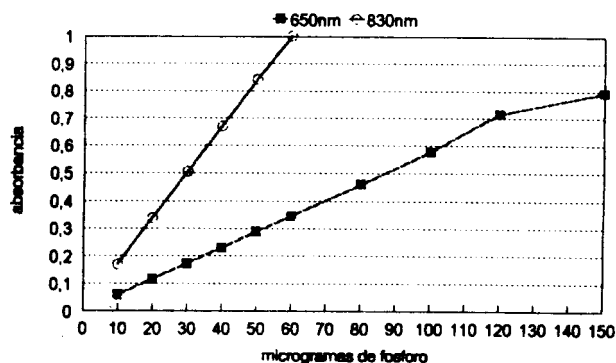


Figura 04. Curvas padrão de fósforo com leitura de absorbância em 650 e 830 nm.

**Tabela 01.** Faixa de absorvância de solução padrão de fósforo em 650 e 830nm, nas condições do método da AOCS (Ca 12 55, 1989)

Concentração de fósforo ( $\mu\text{g}$ de /50 mL)	Faixa de Absorvância*	
	comprimentos de onda(nm)	
	650	830
10	0,058 - 0,060	0,168 - 0,170
20	0,114 - 0,119	0,328 - 0,339
30	0,172 - 0,175	0,497 - 0,509
40	0,223 - 0,238	0,655 - 0,679
50	0,285 - 0,292	0,820 - 0,850
60	0,343 - 0,360	1,003
80	0,458 - 0,472	-
100	0,548 - 0,588	-
120	0,715	-
150	0,793	-

\* - 10 curvas de calibração diferentes

**Tabela 02.** Determinação de fósforo pelo método da AOCS (Ca 12 55) em 10 amostras diferentes de óleo de arroz degomado, utilizando-se diferentes diluições e leitura de absorvância a 650nm.

Amostra de óleo	Massa óleo	diluição	Absorvância	ppm de fósforo
A	3,0846	100/10	0,109	62,00
	3,3612	100/20*	0,247	63,01
	3,0671	100/20	0,213	59,70
B	4,0928	100/10	0,136	58,00
	4,5002	100/20*	0,309	58,60
	3,7691	100/20	0,257	58,40
C	4,1910	100/10	0,140	58,25
	3,4782	100/20*	0,238	58,70
	3,9520	100/20	0,264	57,20
D	3,3299	100/10	0,095	50,63
	3,2580	100/20*	0,190	50,33
	3,7652	100/20	0,238	54,24
E	3,7682	50/10	0,158	36,39
	4,0206	50/20	0,338	35,83
F	6,3410	50/10	0,297	40,01
	5,5367	50/20	0,480	38,77
G	4,3317	100/20	0,324	63,80
	5,2356	50/10	0,401	65,10
H	5,0259	50/10	0,439	74,18
	5,3110	100/20	0,447	71,40
I	5,9103	50/20	0,377	27,14
	6,9825	50/10	0,227	27,93
J	4,4321	50/10	0,166	31,16
	4,2200	50/20	0,320	32,11

\* - reação com o dobro da quantidade do reagente de cor

**Tabela 03 -** Determinação de fósforo pelo método da AOCS (Ca 12 55) em 9 amostras óleo de milho bruto e degomado, utilizando-se diferentes diluições e leitura da absorvância em 830 nm.

Amostra de óleo	Massa óleo	diluição	Absorvância	ppm de fósforo
1	1,9287	100/10	0,132	41,27
	1,9845	100/20	0,273	41,64
2	1,9803	50/10	0,184	28,07
	1,5781	100/10	0,080	30,41
3	1,7530	100/10	0,137	47,13
	2,0813	50/10	0,323	47,00
4	2,5770	100/10	0,306	71,92
	1,6829	50/10	0,388	69,87
5	2,0091	100/10	0,225	67,74
	1,8942	50/10	0,425	68,01
6	1,8224	100/10	0,175	58,01
	1,6842	50/10	0,308	55,38
7	2,0698	100/10	0,052	14,36
	2,7052	100/20	0,134	14,59
8	0,6531	100/10	0,413	377,40
	0,6724	100/5	0,215	374,36
9	2,5265	100/10	0,231	55,31
	2,5031	100/20	0,442	53,53

- o dobro do reagente de cor foi utilizado.

As alterações nas diluições não comprometeram o intervalo de pH onde ocorre a formação do complexo fosfomolibdico.

Ainda de acordo com os resultados constantes das tabelas, observa-se uma quantidade de amostra aproximadamente 4 vezes maior de óleo é necessária quando se faz a leitura em 650nm, em relação a 830nm. Enquanto que, quando se utiliza a diluição de

50/10 ao invés de 100/10, a quantidade de amostra cai pela metade, para um mesmo valor de absorvância.

A otimização da metodologia da AOCS torna-se uma necessidade para amostras de óleos com teores de fósforo abaixo de 100 ppm, já que o aumento da quantidade de amostra leva a um maior tempo dispendido na queima do óleo antes da incineração na mufla. Para um óleo teor de fósforo menor que 5 ppm, para se obter uma leitura de absorvância próximo a 0,1, são necessárias: 36 gramas de amostra, quando se faz a leitura em 650nm e diluição

100/10; enquanto que para 830nm e diluição 50/20 são necessárias, 3 gramas de óleo.

Para efeito de comparação entre esses dois comprimentos de onda as curvas de calibração para o fósforo foram realizadas para uma diluição final de 50 mL, mas para óleos com baixos teores de fósforo pode-se ainda, construir curvas com diluição final para 25 mL com conseqüente diluição das amostras após a reação de cor para 25 mL.

**Tabela 04.** Determinação de fósforo pelo método da AOCS (Ca 12 55) em 42 amostras de óleo de milho degomado e branqueado, utilizando-se diferentes diluições e leitura da absorvância em 830 nm.

<i>Amostra de óleo</i>	<i>Massa óleo</i>	<i>diluição</i>	<i>Absorvância</i>	<i>ppm de fósforo</i>
10	3,7303	50/10	0,067	5,19
	3,1211	50/20	0,095	4,45
11	3,7877	50/10	0,055	3,68
	"	50/20	0,104	3,82
12	3,0058	50/10	0,029	1,99
	"	50/20	0,049	2,01
13	3,6114	50/10	0,046	3,10
	"	50/20	0,098	3,75
14	3,0428	50/10	0,076	7,79
	3,2051	50/20	0,175	8,25
15	3,1740	50/10	0,080	7,56
	3,0233	50/20	0,131	6,53
16	3,2351	50/10	0,051	4,69
	2,9645	50/20	0,108	5,48
17	2,7177	50/20	0,096	5,31
	2,5571	50/10	0,043	4,98
18	2,4122	50/10	0,036	4,40
	2,4103	50/20	0,072	4,47
19	3,3276	50/10	0,111	10,01
	3,0367	50/20	0,203	10,05
20	3,3034	50/10	0,068	6,15
	3,2379	50/20	0,131	6,07
21	3,5256	50/10	0,090	7,65
	3,6699	50/20	0,198	8,11
22	3,0741	50/10	0,042	4,06
	3,0729	50/20	0,087	4,24
23	3,0912	50/10	0,286	28,01
	3,0273	50/20	0,565	28,30
24	2,8158	50/10	0,095	10,14
	3,1577	50/20	0,221	10,58
25	2,8902	50/10	0,132	13,77
	3,1577	50/20	0,221	10,58
26	3,5448	50/10	0,120	9,95
	2,5621	50/20	0,155	9,11
27	2,8954	50/10	0,111	11,25
	2,3512	50/20	0,164	10,31
28	2,9867	50/10	0,110	10,80
	2,5334	50/20	0,168	9,80
29	2,7404	50/10	0,246	26,67
	2,3545	50/20	0,418	26,48
30	3,2431	50/10	0,083	7,45
	2,5013	50/20	0,114	6,69

Tabela 4. continuação

<i>Amostra de óleo</i>	<i>Massa óleo</i>	<i>diluição</i>	<i>Absorbância</i>	<i>ppm de fósforo</i>
31	3,1474	50/10	0,293	27,70
	2,6995	50/20	0,482	26,65
32	2,3400	50/10	0,218	27,64
	2,4418	50/20	0,444	27,13
33	3,3738	50/10	0,091	7,87
	3,0714	50/20	0,142	6,82
34	3,4443	50/10	0,099	8,41
	2,4679	50/20	0,144	8,80
35	3,1537	50/10	0,080	7,37
	2,7459	50/20	0,136	7,30
36	3,1351	50/10	0,077	7,13
	2,7416	50/20	0,160	8,62
37	3,1012	50/10	0,028	1,83
	"	50/20	0,057	2,35
38	2,7843	50/10	0,035	2,81
	2,8305	50/20	0,066	3,06
39	2,0546	50/10	0,085	12,43
	"	50/20	0,174	12,58
40	2,0781	50/10	0,081	11,71
	"	50/20	0,180	12,87
41	3,0644	50/20	0,027	1,08
	"	50/30	0,040	1,18
42	3,1439	50/20	0,045	1,92
	"	50/30	0,062	1,85

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLPORT, N.L. & BROCKSOPP, J.E. - Colorimetric analysis, volume II, página 246 a 250, Chapman & Hall Ltd., New York, 1963.
2. AOCS - Official Methods and Recommended practices of the American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, 3rd Ed., 1988, 1989.
3. DAUN, J.K.; DAVISON, L.D.; BLAKE, J.A.; YUEN, W. - Comparison of methods for the analysis of phosphorus in canola oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 58(10):914 - 916, 1981.
4. DGF - (Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaft) - Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, tensiden und verwandten Stoffen Abteilung A, B, C, F, Stuttgart, 1994.
5. HARTMAN, L.; ELIAS, M.C.; ESTEVES, W. - Method for the determination of phosphorus in lipid-containing materials. Analyst 105, 173 - 176, 1980.
6. IUPAC - Standards Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 7th Ed., 1987.
7. KATES, M. - Techniques of lipidology: Isolation, analysis and identification of lipids, American Elsevier Publishing Co. Inc., New York, 1972.
8. ROUSER, G.; FLEISHER, S.; YAMAMOTO, A. - Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination by phosphorus analysis of spots. Lipids 5(5):494 - 496, 1970.