

GENY DE FÁTIMA TOLEDO MANFREDINI FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM
FLUXO PARA A DETERMINAÇÃO DE AMÔNIO E NITRITO EM ÁGUAS**

Orientador: Dr. Heberth Juliano Vieira

Co-Orientador: Dr. Edegar Benedetti-Filho

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia, na área de concentração: **Ciência Ambiental**.

**DOURADOS/MS
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da UFGD, Dourados, MS, Brasil

F383d Ferreira, Geny de Fátima Toledo Manfredini.
Desenvolvimento de procedimentos de análise por
injeção em fluxo para a determinação de amônio e nitrito
em águas / Geny de Fátima Toledo Manfredini Ferreira.
– Dourados, MS : UFGD, 2013.
55 f.

Orientadora: Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia
Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Análise por injeção (Química). 2. Amônio em
água. 3. Nitrito em água. I. Vieira, Heberth Juliano. II.
Título.

CDD: 543



Termo de Aprovação

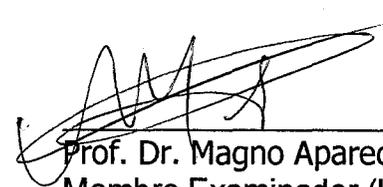
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “Desenvolvimento de procedimentos de análise por injeção em fluxo para determinação de amônio e nitrito em águas”, de autoria de **Geny de Fátima Toledo Manfredini Ferreira**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. Heberth/Juliano Vieira
(Orientador - UFGD)
Presidente da Banca Examinadora



Prof. Dr. Antonio Rogério Fiorucci
Membro Examinador (UEMS)



Prof. Dr. Magno Aparecido Gonçalves Trindade
Membro Examinador (UFGD)

*Dedico este trabalho à minha filha
Laura, ao meu marido Eduardo e aos
meus familiares pelo apoio em todos os
momentos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho.

À minha mãe, Helena e minha sogra, Edna, pelas orações e apoio.

Ao meu marido, Eduardo pelo incentivo e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira, pela orientação e incentivo durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade da realização deste trabalho.

À UEMS e ao Prof. Dr. Edemar Benedetti Filho por ceder equipamentos para as análises.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Aos secretários da PPG-CTA pela atenção nesses anos.

Aos amigos do LECA: Cássia, Jéssica, Herbert Lee, Vanessa pelo auxílio e companheirismo.

Aos amigos que conviveram comigo durante esses anos.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

*“Transportai um punhado de terra todos
os dias e fareis uma montanha.”
(Confúcio).*

RESUMO

Os procedimentos de análise por injeção em fluxo são uma importante ferramenta analítica adequadas para a obtenção de dados de amostras ambientais em consequência da alta frequência analítica e possibilidade de acoplamento de dispositivos para o tratamento das amostras em linha. No presente trabalho visou-se o desenvolvimento de sistemas de análise por injeção em fluxo para a determinação de íons amônio e nitrito em amostras de águas naturais. O sistema em fluxo para a determinação de amônio baseia-se na conversão do íon à amônia, seguida da difusão por uma membrana polimérica de Teflon[®] na câmara de difusão e detecção condutométrica no fluxo receptor. Uma curva analítica com uma faixa linear de concentração de $2,78 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,10 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ NH}_4^+$ e um limite de detecção $1,60 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foram obtidas. O procedimento proposto apresentou uma frequência analítica de 60 determinações por hora. Na segunda parte do trabalho, um sistema de análise por injeção em fluxo reverso foi proposto para a determinação de nitrito em águas superficiais empregando sulfanilamida e α -naftilamina como reagentes cromóforos. Nesse sistema em fluxo reverso, a amostra atua como solução carregadora e a solução cromófora é injetada no sistema, sendo a absorbância do azo-corante produzida proporcional à concentração de nitrito, que é detectado em espectrofotômetro acoplado ao sistema em $\lambda = 516 \text{ nm}$. Após a otimização do procedimento empregando um planejamento univariado, uma curva analítica com uma faixa linear variando de $1,00 \times 10^{-6}$ e $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ NO}_2^-$ e um limite de detecção de $2,15 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ foram obtidos. Um desvio padrão relativo para a determinação de nitrito menor que 2% ($n=10$) e frequência de amostragem de 45 determinações por hora foram obtidos. Os procedimentos mecanizados desenvolvidos são simples, apresentaram exatidão exigida para as amostras avaliadas e principalmente, permitiram a determinação do analito com a redução significativa do consumo dos reagentes.

PALAVRAS CHAVE: Análise por injeção em fluxo. Amônia. Nitrito. Espectrofotometria. Condutometria.

ABSTRACT

The flow injection procedures are the important analytical tool to obtain environmental data due to high analytical frequency and possibility of coupling devices for in line sample treatment. The aim of this study was to development of flow injection systems for the determination of ammonium and nitrite in natural waters. The flow injection system for ammonium determination are based on the conversion of ammonium ion into ammonia, followed by diffusion of ammonia through TEFLON™ polymeric membrane at diffusion chamber and conductometric detection on receptor flow. Under the experimental conditions were optimized an analytical curve obtained in the range of $2.78 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ to $1.10 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ and a detection limit of $1.60 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. The proposed procedure proved to be precise, accurate and presented an analytical frequency of 60 samples per hour. A system of flow injection analysis reverse been proposed for determining nitrite in surface waters using sulfanilamide and α -naphthylamine in acetic acid medium as reagents chromophores. In this system in reverse flow, acts as the sample carrier solution and the solution is injected into the chromophoric system, and the absorbance of the azo dye produced proportional to the nitrite concentration, which is detected by spectrophotometer system coupled to at $\lambda=516 \text{ nm}$. After optimization using a univariate planning gave an analytical curve between 1.00×10^{-6} and $5.00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ and a detection limit of $2.15 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Relative standard deviation were obtained for determination of nitrite less than 2% ($n = 10$) and sampling frequency of 45 samples per hour. The mechanized developed procedures are simple and showed adequate accuracy for the determination of these ions in the water samples evaluated with considerable reduced consumption of reagents.

KEYWORDS: Flow injection analysis. Ammonium. Nitrite. Spectrophotometry, Conductometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1–Principais processos envolvidos no ciclo do nitrogênio ²	2
Figura 2– Mecanismo de reação de Berthelot ³	5
Figura 3 – Esquema da reação de Griess ³⁴	7
Figura 4 – Sistema de análise por injeção em fluxo proposto para determinação de amônio. Solução de NaOH 0,01 mol L ⁻¹ a vazão de 1,3 mL min ⁻¹ ; I, injetor comutador (25 cm, 125 µL); C ₁ , solução receptora (água destilada 1,2 mL min ⁻¹); C ₂ , solução transportadora (água destilada) com vazão de 4,5 mL min ⁻¹ ; BP, bomba peristáltica; X, confluência; B, reator helicoidal (100 cm x 0,8 mm d.i.); CD, câmara de difusão de gás; C, condutivímetro; D, descarte.....	18
Figura 5 – Sistema de análise por injeção em fluxo proposto para estudo de interferentes. NaOH: solução de NaOH 0,01 mol L ⁻¹ (1,3 mL min ⁻¹); soluções de referência NH ₄ Cl 1,1 x 10 ⁻² mol L ⁻¹ ; alça de amostragem e de interferentes (25 cm, 125 µL); C ₁ , solução receptora (água destilada), vazão de 1,2 mL min ⁻¹ e C ₂ , solução transportadora (água destilada) com vazão de 4,5 mL min ⁻¹ ; BP, bomba peristáltica; Interf., soluções contendo íons interferentes; I, injetor; X e Y, ponto de confluências; B, reator helicoidal (100 cm x 0,8 mm d.i.); CD, câmara de difusão de gás; C, condutivímetro; D, descarte.	19
Figura 6 –Otimização química do sistema FIA-r.....	20
Figura 7– Sistema de análise por injeção em fluxo reverso empregado para determinação de nitrito e estudo da recuperação	21
Figura 8–Gráfico de superfície de resposta para a otimização do procedimento em fluxo para determinação de amônia proposto.	27
Figura 9–Curva analítica do procedimento em fluxo proposto (n = 3).	29
Figura 10–Curva analítica do procedimento em fluxo proposto (n = 3).	29
Figura 11–Efeito da concentração de α-naftilamina sobre o sinal analítico de uma solução padrão de nitrito 1x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	35
Figura 12– Efeito da concentração de sulfanilamida sobre o sinal analítico de uma solução padrão de nitrito 1x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	36
Figura 13– Estudo do efeito da concentração de ácido acético sobre o sinal analítico	37
Figura 14– Estudo do efeito da vazão da solução de amostra sobre o sinal analítico.	38
Figura 15– Estudo do efeito do volume dos reagentes sob o sinal analítico	39

Figura 16– Avaliação do efeito do comprimento da bobina reacional	40
Figura 17 – Curva analítica para determinação de nitrito empregando o sistema FIA-r com detecção espectrofotométrica.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros avaliados na otimização do procedimento em fluxo.....	24
Tabela 2 – Planejamento fatorial 2^3 para avaliação do efeito e interação dos parâmetros selecionados na determinação do íon amônio	24
Tabela 3 – Parâmetros avaliados na otimização do procedimento em fluxo.....	25
Tabela 4 – Planejamento fatorial 2^2 com ponto central para avaliação do efeito e interação dos parâmetros selecionados na determinação do íon amônio.....	26
Tabela 5 – Análise de variância para a regressão dos dados obtidos na otimização do sistema em fluxo	27
Tabela 6 – Estudo da seletividade na determinação de NH_4Cl empregando o sistema de análise por injeção em fluxo com detecção condutométrica	30
Tabela 7 – Recuperação de amônio nas amostras de água e vinhaça empregando o procedimento em fluxo proposto	31
Tabela 8 – Consumo de NaOH por determinação de íon amônio.....	32
Tabela 9 – Figuras de mérito de procedimentos analíticos para a determinação de amônia	33
Tabela 10 - Recuperação de nitrito na amostra empregando o sistema FIA-r proposto	42
Tabela 11 – Parâmetros de confiabilidade analítica obtidos na determinação de nitrito	43
Tabela 12 – Determinação de nitrito em amostras de águas empregando o procedimento proposto.....	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Nitrogênio	2
1.2 Amônia	3
1.2.1 Aspectos Gerais	3
1.2.2 Métodos clássicos para a determinação do amônio.....	3
1.2.2.1 Metodologia empregando o Reagente de Nessler	4
1.2.2.2 Método do Azul do indofenol – Berthelot.....	4
1.3 Nitrito	6
1.3.1 Aspectos Gerais	6
1.3.2 Métodos clássicos para a determinação de nitrito	7
1.3.2.1 Métodos discretos (batelada) de determinação de nitrito.	8
1.4 Sistema de análise por injeção em fluxo (FIA).....	9
1.4.1 Procedimentos analíticos para determinação de íons amônio e nitrito	10
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivos Gerais	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. PARTE EXPERIMENTAL	15
3.1 Instrumentação.....	16
3.2 Sistema de análise em fluxo	16
3.3 Procedimento em fluxo para determinação de íon amônio em amostras de água com detecção condutométrica.....	17
3.4 Reagentes e Soluções	17
3.4.1.1 Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação íon amônio com detecção condutométrica	17
3.4.2 Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção condutométrica para a determinação de interferentes em solução ou amostra contendo íon amônio.....	18
3.4.3 Desenvolvimento de um sistema análise por injeção em fluxo reverso (FIA-r) para a determinação de nitrito em amostras de águas	19
3.4.4 Reagentes e Soluções	19

3.4.5 Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo reverso para determinação de nitrito.....	20
4. Resultados e discussão	22
4.1.1 Sistema de análise por injeção em fluxo.....	23
4.1.2 Otimização da metodologia proposta	23
4.1.3 Linearidade	28
4.1.4 Estudo de interferentes	30
4.1.5 Teste de adição e recuperação	31
4.2 Determinação do íon nitrito.....	34
4.2.1 Sistema de análise por injeção em fluxo reverso	34
4.2.2 Otimização dos parâmetros químicos do sistema FIA-r	34
4.2.2.1 Avaliação da concentração de α -naftilamina sob a intensidade do sinal analítico	35
4.2.2.2 Avaliação da concentração de sulfanilamida sob o sinal analítico	35
4.2.2.3 Avaliação do efeito da concentração da solução de ácido acético.....	36
4.2.3 Otimização dos parâmetros físicos do sistema FIA-r	37
4.2.3.1 Estudo do efeito da vazão da solução de amostra sob o sinal	37
4.2.3.2 Estudo do efeito do volume dos reagentes sob o sinal analítico	38
4.2.3.3 Avaliação do efeito do comprimento da bobina reacional	39
4.2.3.4 Parâmetros analíticos do sistema FIA-reverso para a determinação de nitrito.....	40
4.2.3.5 Estudo da recuperação de nitrito em amostras de águas empregando o sistema FIA-r proposto	41
4.1.1 Análise comparativa.....	45
4.1.2 Análise de amostras	45
5. CONCLUSÕES.....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

1.1 Nitrogênio

Nitrogênio é um nutriente essencial tanto para os animais quanto para os vegetais^{1,2} sendo um dos elementos de maior abundância na natureza. Cerca de 78% dos gases que compõem a atmosfera e é encontrado apenas na forma molecular (N_2)^{3,4}.

Animais necessitam de compostos nitrogenados na forma orgânica, principalmente nas formas de aminoácidos e proteínas. Já os vegetais necessitam do elemento na forma iônica, como íon amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-). A conversão do nitrogênio molecular a compostos orgânicos nitrogenados e compostos iônicos se dá de forma dinâmica através de fixações, formando assim, um ciclo o qual é conhecido como um dos mais importantes ciclos biogeoquímico^{3,4}. A Figura 1 apresenta um esquema do ciclo do nitrogênio.

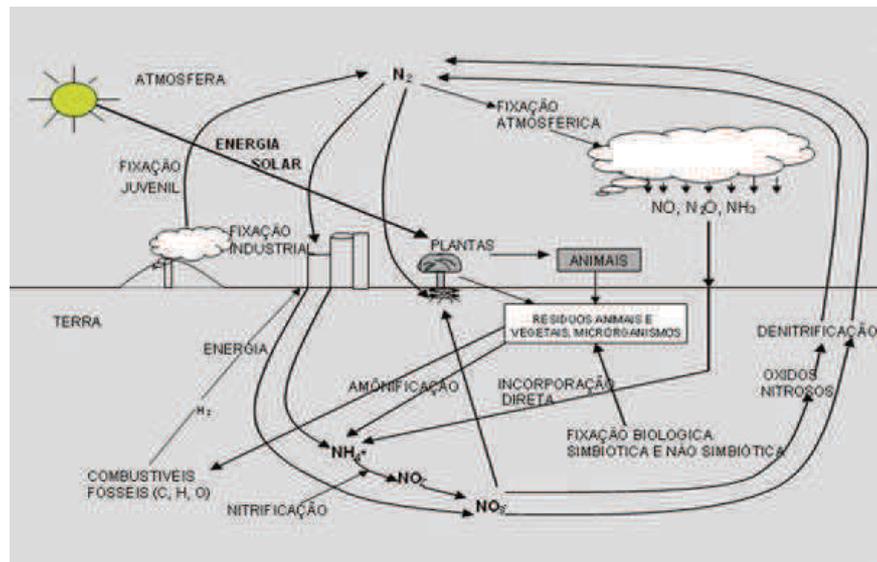


Figura 1–Principais processos envolvidos no ciclo do nitrogênio².

O nitrogênio é assimilado pelas plantas na forma de íon nitrato, que ocorre através do processo de nitrificação; neste caso, o N_2 é oxidado a NH_3 e convertido por nitrobactérias e nitrossomas, por meio da oxidação de sais de amônio aplicados sob a forma de fertilizantes no solo, ou ainda através da descarga de relâmpagos³. O processo de nitrificação é de suma importância para o desenvolvimento dos vegetais.

1.2 Amônia

1.2.1 Aspectos Gerais

A amônia (NH_3) e o íon amônio (NH_4^+) são formados pela fixação biológica promovidas por bactérias *Rhizobium*, por de um processo de simbiose, atividades biológicas, decomposição enzimáticas da uréia (urina e excrementos de animais), por subprodutos originados da atividade agrícolas (excesso na aplicação de fertilizantes) e emissão do solo ⁴.

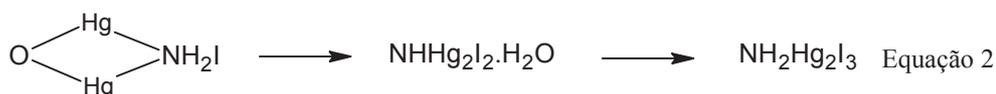
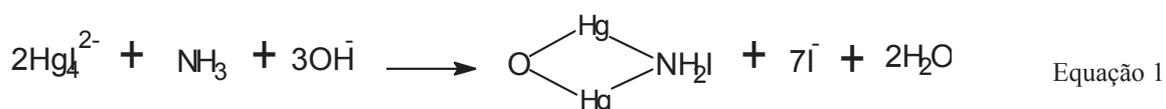
Amônia é um produto químico muito utilizado na indústria, principalmente na fabricação de gás refrigerante e ainda, em ração animal, explosivos, síntese de fibras, plásticos, fertilizantes, inseticidas, detergentes e limpadores domésticos^{5,6}. Em altas concentrações é considerado como um indicador de presença de material orgânico em decomposição ou contaminação fecal ⁷. Na Resolução 357 de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA)⁸, a concentração máxima permitida de nitrogênio amoniacal em água é de $3,7 \text{ mg L}^{-1}$, em $\text{pH} < 7,5$ e para a Agência de Proteção Ambiental Americana (United States Environmental Protection Agency – EPA)⁹ é de $2,9 \text{ mg L}^{-1}$ em $\text{pH} 8,0$.

1.2.2 Métodos clássicos para a determinação do amônio

Alguns procedimentos analíticos são descritos para a determinação do íon amônio em amostras de interesse ambiental ^{1,5,10-13} e alimentícia ¹⁴. Os procedimentos clássicos são baseados no método do indofenol ou Berthelot, ou empregando o reagente de Nessler. Há ainda outros procedimentos, como processo Kjeldahl, empregado a determinação de nitrogênio total; neste caso, é feita digestão do material orgânico contendo compostos nitrogenados pela adição de ácido sulfúrico e catalisador, seguida de destilação e análise volumétrica.^{15,16}

1.2.2.1 Metodologia empregando o Reagente de Nessler

A amônia pode ser determinada qualitativa e quantitativamente^{15,17} por meio da reação de Nessler, na qual o iodeto de mercúrio(II) e iodeto de potássio reagem em solução alcalina com a amônia gerando um complexo colorido. Este método é descrito em procedimentos analíticos de batelada e em sistemas automatizados em fluxo. Em concentrações menores que 0,1 ppm de NH₃, é formado o composto NH₂Hg₂I₃ de acordo com as Equações Equação 1 e Equação 2.



A sensibilidade do procedimento analítico que emprega o reagente de Nessler é baixa para muitas aplicações¹⁰. O principal problema deste procedimento analítico é o emprego de Hg(II) como reagente gerando resíduos com alta concentração mercúrio (II)¹⁸, sendo utilizado para determinação em amostras de águas naturais e extrato de solo¹⁷.

1.2.2.2 Método do Azul do indofenol – Berthelot

O método de Berthelot¹⁹ usado em procedimentos colorimétricos para a determinação de nitrogênio consiste na reação entre fenol e amônia, na presença de hipoclorito em meio alcalino, obtendo como produto final o azul de indofenol, conforme o mecanismo de reação apresentado na

Figura 2^{20,21}.

1.3 Nitrito

1.3.1 Aspectos Gerais

O nitrito ocorre na natureza resultado da oxidação incompleta da amônia e da redução de nitrato²². É formado por meio da fixação biológica⁴ e, também através fontes antropogênicas.

Sua formação ocorre como produto intermediário da nitrificação, na qual forma nitrato. A esta etapa é dado o nome denitrosação, onde apresenta-se proteobactérias nitrosomonas como catalisadores. Estas bacterias convertem amônia que não foi absorvida pelo solo, originada principalmente de resíduos animais e vegetais em decomposição, de acordo com a reação Equação 3:



O nitrito é utilizado em alimentos como conservante e fixador de cor em carnes e cura de embutidos, além de dar proteção à ação de microorganismos, como *Clostridium botulinum*, causador de botulismo. Também é usado em processos industriais, como inibidor de corrosão, o que, explica sua presença em esgotos. No entanto, a origem artificial do nitrito em cursos d'água se deve à lixiviação do solo em que nitrato de amônio não absorvido de fertilizantes é reduzido a nitrito e contribui para o aumento de sua concentração nesse meio²³. De acordo com o CONAMA⁸, o limite máximo de nitrito permitido em água doce é de 1 mg L⁻¹.

Quando presente em concentração acima dos limites recomendados, o íon nitrito causa preocupações, justificando a necessidade do seu monitoramento tanto em águas quanto em alimentos. Nitrito pode causar danos à saúde, tais como metahemoglobinemia, conhecida popularmente como cianose ou “síndrome do bebê azul”, diminuição da eficácia de uma dieta nutritiva, inibição das enzimas microsossomais e da fosforilação oxidativa. Nitrito pode ainda combinar-se com enzimas secundárias, resultando em nitrosaminas carcinogênicas²² e outro tipo de reação enzimática na saliva é a redução do nitrato em nitrito, catalisada por bactérias²³, conforme a Equação 4.



1.3.2 Métodos clássicos para a determinação de nitrito

A determinação do íon nitrito pode ser realizada em amostras ambientais²²⁻²⁵, alimentícias²⁶⁻²⁸ e biológicas (fluido animal e vegetal)²⁹⁻³¹, por meio de diversos procedimentos analíticos. O nitrito também é determinado quando o objetivo é a determinação indireta de nitrato³².

Dentre as várias metodologias empregadas para a determinação de nitrito, destacam-se as baseadas em espectrofotometria^{23,25,29,30,33}, nas quais são usados reagentes, em meio ácido que promovem a diazotação da sulfanilamida e o seu produto é acoplado ao diidrocloreto de N-(1-naftil)etilenodiamina¹⁵, produzindo um composto de coloração vermelho intenso. Esta reação foi proposta por J. P. Griess³¹ em 1879, de acordo com a Figura 3:

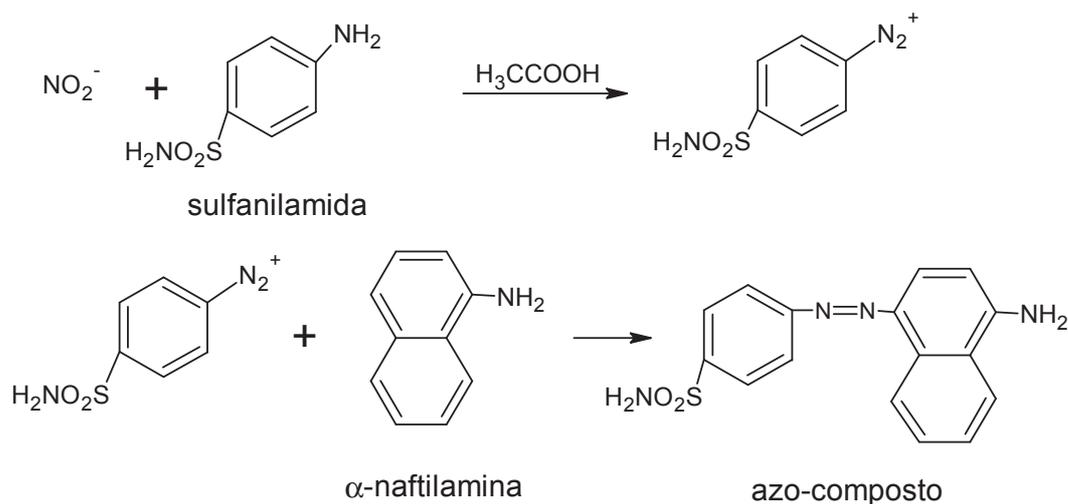


Figura 3 – Esquema da reação de Griess³⁴

A reação de Griess original foi adaptada buscando aumento de sensibilidade, avaliando-se diferentes reagentes, concentrações, cinética química e é chamada atualmente de reação de Griess modificada^{25,29,31}. Há ainda, procedimentos que utilizam outros reagentes cromóforos³³ que também são empregados utilizando-se de técnicas de detecção como espectrofluorimetria^{22,34} e quimiluminescência²⁴.

A cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massa (CG-EM) é uma metodologia com limite de detecção na ordem de ppb ou ppt, com alta precisão, porém os custos de reagentes e preparo de amostras são muito altos²⁹.

1.3.2.1 Métodos discretos (batelada) de determinação de nitrito.

Os métodos em bateladas são amplamente usados em laboratórios tanto para análises ambientais, quanto alimentícias ou biológicas. São relatados na literatura mais recente, trabalhos que empregaram diversas metodologias para a determinação de íon nitrito.

CROITORU (2012)²⁹ determinou simultaneamente nitrato e nitrito em amostras biológicas de maneira simples, sensível, de baixo custo e rápida. Para as análises, foi usado reagentes de Griess e um cromatógrafo líquido (HPLC) com detecção espectrofotométrica. Esta metodologia foi empregada em investigação biomédica e toxicológica, apresentando uma linearidade na resposta obtida entre $1,30 \times 10^{-7}$ a $8,70 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de nitrito.

AYDIN et al (2005) desenvolveram um procedimento analítico com detecção espectrofotométrica para a determinação de nitrito em águas naturais. Este procedimento foi baseado na reação do nitrito com ácido barbitúrico, formando ácido isonitrosobarbitúrico. Neste procedimento, um limite de detecção de $3,61 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e curva analítica na faixa de concentração de 0 a $7,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ foram obtidos.

Uma metodologia para análise simultânea de amostras de água doce e do mar foi desenvolvida por SALHIE VON GUNTEN(1999)³⁵. O procedimento combina separação cromatográfica de troca iônica com análise sequencial, empregando a detecção condutométrica e reação de oxidação do I⁻/I₃⁻ pós-coluna, seguida pela detecção espectrofotométrica em uma mesma batelada de análises sem pré-tratamento da amostra. O limite de detecção de $1,09 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e uma curva analítica linear na faixa de concentração de $4,35 \times 10^{-8}$ a $2,17 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ foram obtidos.

Na procedimento proposto por HE et al. (2011)³⁰, o nitrito foi determinado em amostras de água e amostras biológicas, utilizando a p-nitroanilina em presença de difenilamina em meio ácido. Neste procedimento foi utilizado o enriquecimento por meio do líquido iônico em micro-extração líquido-líquido em cromatografia líquida dispersiva (IL-DLLME-HPLC). O procedimento proposto apresentou uma curva analítica com faixa linear variando entre $8,70 \times 10^{-9}$ a $1,09 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. O limite de detecção obtido foi de $1,09 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹.

LUIZ et al. (2012)²⁸ propôs a determinação de nitrito em água e produtos à base de carne por um procedimento baseado na espectroscopia de refletância difusa. Neste trabalho, a luz refletida pelo produto da reação de nitrito e reagentes cromóforos (azo-corantes) foi proporcional a concentração do nitrito nas amostras. Um ensaio de mancha (spot test) sobre o

filtro de papel e a detecção foi realizado utilizando-se de um espectrofotômetro contendo uma fibra ótica acoplada. A linearidade da curva analítica foi obtida entre as concentrações de nitrito variando entre $6,30 \times 10^{-6}$ a $1,09 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O limite de detecção obtido foi de $1,96 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Um procedimento para a determinação de nitrito em amostras de água potável foi proposto por MONTES e LASERNA (1991)²². O procedimento foi baseado no monitoramento da emissão de fluorescência do produto formado pela bromação da piridina-2-aldeído. Neste procedimento foi obtido um limite de detecção de $1,03 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

A determinação de nitrito por um procedimento com detecção fluorimétrica foi proposta por HELALEH e KORENAGA (2000)³⁴. Este procedimento baseia-se na reação de acetaminofeno (paracetamol) com nitrito em meio ácido, seguido da alcalinização da solução final. O produto obtido apresenta fluorescência. Neste trabalho, uma linearidade da curva analítica foi obtida entre as concentrações de nitrito de $1,74 \times 10^{-6}$ a $2,83 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. O limite de detecção de $5,87 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ foi obtido.

KODAMATANI et al.(2009)²⁴ relatam em seu trabalho a determinação simultânea de nitrito e nitrato em amostras de águas utilizando cromatógrafo HPLC e reação fotoquímica pós-coluna com detecção por quimiluminescência. Nitrito e nitrato foram reduzidos a óxido nítrico (NO) e peroxinitrito (ONOOH/ONOO⁻), gerado sob irradiação UV. Um limite de detecção de $2,00 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e uma curva analítica linear entre $2,00 \times 10^{-9}$ e $2,50 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ foram obtidos depois da otimização do procedimento. Segundo os autores, os resultados obtidos com esta metodologia estão de acordo com os métodos clássicos.

1.4 Sistema de análise por injeção em fluxo (FIA)

Os sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês Flow Injection Analysis) surgiram da necessidade de automação dos sistemas analíticos, tanto em laboratórios de química, como em laboratórios de análise clínicas, devido à crescente demanda de análises e grande variedade de analito^{36,37}. Outros fatores também favorecem a sua implementação, foi a obtenção de resultados com enorme redução de custos de análise através da diminuição do tempo de análise, aumento de produtividade, menor interferência do analista na análise química e aumento da precisão e exatidão³⁸. O custo das análises é favorecido pela redução na quantidade de reagentes consumido por determinação, quando comparada com os métodos em

batelada. Na literatura há relatos de sistemas de análise por injeção em fluxo que permitem até 300 análises por hora³⁹.

Leonard Skegs desenvolveu a primeira configuração disponível comercialmente dos sistemas de análise em fluxo, o Auto Analyser[®], com intuito de diminuir o tempo das análises em amostras biológicas⁴⁰.

A essência dos sistemas de análise por injeção em fluxo é a mesma desde o Auto Analyser[®] até os sistemas mais recentes, como a multicomutação e o Lab-on-valve, que é um sistema de análise por injeção em fluxo totalmente automatizado e portátil, programado através computadores. Esse sistema permite várias configurações³⁸ de acordo com o analito, cinética de reação, entre outros fatores e acoplamento de diversos dispositivos, tais como câmara de difusão de gás^{10,41}, lâmpadas UV⁴², fornos de micro-ondas⁴³ – podendo ainda ser acoplado a diferentes técnicas de detecção, como espectrofotometria¹¹, amperometria, potenciometria³⁶, cromatografia iônica^{12,41,44}, e espectrofluorimetria¹⁰, quimiluminescência^{5,45}.

Os sistemas de análises por injeção em fluxo podem ainda serem classificados como (i) fluxo normal (FIA-n), na qual um volume de amostra é injetada em um fluxo de solução carregadora, e em (ii) fluxo reverso (FIA-r), no qual um volume de reagente é injetado em um fluxo de amostra que atua como carregador. Este sistema foi proposto inicialmente por JOHNSON e PETTY (1982)⁴⁶ para a determinação de fosfato em água do mar, no qual foi empregado o método do azul de molibdênio.

O uso do sistema FIA-r é recomendado quando a amostra é abundante e apresenta como principal vantagem o baixo consumo de reagentes, pois ocorre a injeção do reagente no sistema. No processo de dispersão da zona de amostra há uma melhora na eficiência da mistura entre reagente e analito⁴⁷, quando comparada aos FIA-n. Ainda pode-se destacar a possibilidade de minimização de diluições de amostras e o aumento da sensibilidade do procedimento analítico⁴⁸.

Em trabalho recente, MANSOUR e DANIELSON (2012)⁴⁷, apresentaram várias técnicas do sistema r-FIA e aplicações em amostras de águas, farmacêuticas e biomédicas.

1.4.1 Procedimentos analíticos para determinação de íons amônio e nitrito

Um sistema de multicomutação envolvendo análise por injeção em fluxo foi empregado por BORGES et al.(2009)¹¹, na determinação de amônia e cloroaminas em águas

residuais, empregando o método do indofenol. A curva analítica do íon amônio apresentou uma faixa linear com concentrações entre $5,60 \times 10^{-6}$ e $1,60 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de NH₄⁺.

MANA e SPOHN (2000)¹⁰, desenvolveram um sistema de análise em fluxo contendo câmara de difusão de gás para a determinação de íon amônio em água de rio e urina. Neste sistema, o amônio reage com o-ftaldeído (OPA) e tioglicolato, sendo o produto formado monitorado com espectrofluorímetro. Foi obtida uma curva analítica para o íon amônio com uma faixa linear entre $1,00 \times 10^{-6}$ e $2,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

Cromatografia iônica é uma técnica descrita inicialmente na década de 1970 para a separação de íons, NH₄⁺, NO₃⁻, NO₂⁻, entre outros⁴⁴ até espécies moleculares hidrofílicas, como etanol e ácidos carboxílicos alifáticos⁴⁹ e é muito usada e bem estabelecida^{49,50} nos dias atuais. O monitoramento de amônia em esgoto hospitalar, empregou-se a cromatografia iônica acoplada à uma câmara de diálise on-line, para pré-tratamento de amostras. Este procedimento forneceu uma curva analítica com uma faixa linear entre $6,25 \times 10^{-6}$ e $6,25 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O pré-tratamento da amostra, através da câmara de difusão de gás, mostrou-se simples e rápido⁴¹.

A determinação de íon amônio em amostras de água por cromatografia líquida e com detecção por fluorescência foi realizada por MUNIRAJ et al. (2012)⁵¹. Foi desenvolvida uma nova derivatização simultânea e um método de extração para a pré-concentração de amoníaco utilizando *headspace* (camada de ar no alto da seringa) dinâmico na microextração em fase líquida com a derivatização *in situ*. O procedimento apresentou uma curva analítica com as concentrações de amônio variando entre $0,62 \times 10^{-6}$ e $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Um procedimento cromatográfico foi desenvolvido por MESEGUER-LLORET et al. (2005)⁵ para a determinação de amônia em amostras de água. O método baseia-se na derivatização do analito em cromatografia líquida com detecção quimiluminescente. Neste trabalho, uma curva analítica com faixa linear variando de $1,50 \times 10^{-6}$ e $4,17 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Um limite de detecção de 120×10^{-9} mol L⁻¹ foi obtido.

A detecção por amônio empregando a detecção da radiação quimiluminescente¹³ em amostras complexas como água do mar, forneceu uma curva analítica na mesma faixa de concentração para os íons nitrato, nitrito, amônia. Os íons foram separados através de cromatografia iônica e o sistema em fluxo diretamente ligado ao detector. A curva linear obtida ficou na faixa de $5,00 \times 10^{-6}$ a $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Amônia e nitrito foram determinados simultaneamente em amostras de água do mar, empregando um sistema em fluxo portátil, com detecção potenciométrica por MOSCHOU et

al. (2000)⁵². O módulo de análise completo foi otimizado para operar dentro da faixa de concentração de amônia e nitrito entre 0,05 e 10 ppm. O limite de detecção obtido foi de $5,88 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ e $8,70 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ para amônia e nitrito, respectivamente.

Um procedimento empregando sistema de análise por injeção em fluxo contínuo foi desenvolvido para a determinação de íon nitrito e nitrato em uma ampla variedade de amostras ambientais e alimentícias, através da foto-redução do nitrato em nitrito, sob irradiação de lâmpada de baixa pressão de mercúrio e não utilizou reagentes de Griess que são tóxicos ou carcinogênicos¹⁵. O sistema proposto por GIL TORRÓ et al. (1998) possui uma célula em fluxo, com detecção bi-amperométrica composta por dois eletrodos de platina polarizados por diferença de potencial de 100 mV, que detecta o íon nitrito de forma indireta através do sistema I₃⁻/I⁻. A frequência analítica obtida foi de 27 determinações por hora e limite de detecção de $5,43 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹²⁷.

AYALA et al.(2012)²⁵ desenvolveram um sistema multiparâmetro em fluxo de análise com injeção sequencial (SIA) com detecção espectrofotométrica para a determinação de nitrato, nitrito e sulfato em amostras ambientais. Nitrato foi reduzido a nitrito em coluna de cádmio e o nitrito foi determinado diretamente utilizando a reação de Griess-Ilosvay. Este trabalho obteve frequência analítica de 15 determinações por hora, linearidade de $2,17 \times 10^{-7}$ a $9,13 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e limite de detecção de $4,78 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver procedimentos de análise por injeção em fluxo para determinações de nitrito e amônio em amostras de águas de superfícies visando a diminuição do consumo de reagentes.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos são os seguintes:

- Otimizar um sistema de análise por injeção em fluxo para determinação de íon amônio, empregando planejamento fatorial e a metodologia de superfície de resposta, para a seleção dos parâmetros químicos e de fluxo para o sistema em fluxo.
- Otimizar um sistema de análise por injeção em fluxo reverso para determinação de nitrito, empregando planejamento univariado para seleção dos parâmetros químicos e físicos e a seleção das variáveis otimizadas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação

Todas as pesagens foram realizadas utilizando-se uma balança analítica modelo FA104N com precisão de 0,1 mg.

As determinações de pH das soluções foram feitas em um medidor de pH (marca HANNA), conectado a um eletrodo de vidro combinado e sensor de temperatura em aço inox, previamente calibrado com o uso de soluções tampão de pH 4,00 e 7,00.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro de Absorção Molecular UV-Vis Cary, modelo 50 CONC (Varian) com cubeta de quartzo de 3,5 mL (caminho óptico 10 mm).

3.2 Sistema de análise em fluxo

Os tubos e conexões de polietileno empregados no sistema apresentavam diâmetro interno de 0,8 mm para confecção das bobinas reacionais, alças de amostragem e linhas de condução das soluções de referência e amostras. Para a propulsão foram utilizados tubos de Tygon[®] com diferentes diâmetros internos.

As soluções de referência e amostras foram introduzidas no sistema de fluxo utilizando-se um duplo injetor comutador manual 2-3-2 construído em acrílico⁵⁵.

Para a propulsão das soluções de referência, reagentes e amostras utilizou-se uma bomba peristáltica Ismatec[®], modelo IPC-8 (Zurique, Suíça).

Todas as medidas de condutividade realizadas foram feitas empregando um condutivímetro Tecnal[®], modelo Tec-4MP.

Todas as medidas espectrofotométricas realizadas no módulo de análise para determinação de nitrito foram feitas empregando um espectrofotômetro Femto 600 Plus (São Paulo-SP).

3.3 Procedimento em fluxo para determinação de íon amônio em amostras de água com detecção condutométrica

3.4 Reagentes e Soluções

A solução estoque de cloreto de amônio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 1,3400 g de NH_4Cl (Vetec, Rio de Janeiro) em um balão volumétrico de 50,0 mL com água destilada, sendo acondicionada em frascos de cor âmbar. As soluções padrão de cloreto de amônio, empregadas para construção da curva analítica, foram preparadas com concentrações finais variando de $2,8 \times 10^{-3}$ a $2,3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ a partir da solução estoque.

A solução estoque de hidróxido de sódio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparados dissolvendo-se o sal (Vetec, Rio de Janeiro) em um balão volumétrico de 500 mL e o volume foi completado com água destilada. A solução de trabalho foi obtida diluindo-se a solução estoque.

As soluções preparadas para avaliação da seletividade na determinação de amônio foram: FeCl_3 , EDTA-Na, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , K_2CO_3 , CaCl_2 , Na_2CO_3 , NaNO_3 , KCl e NaCl .

3.4.1.1 Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação íon amônio com detecção condutométrica

A Figura 4 apresenta o esquema do sistema de análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes sincronizadas utilizadas neste trabalho. Este sistema é baseado na injeção de uma solução contendo amônio.

Na posição de amostragem, um fluxo de NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ é propulsionado pela bomba peristáltica a $1,3 \text{ mL min}^{-1}$, na qual recebe um fluxo de H_2O destilada no ponto de confluência X, a uma vazão de $4,5 \text{ mL min}^{-1}$. O fluxo contendo a mistura é carregado pela bobina reacional (0,8 mm de di x 100 cm) até a câmara de difusão de gases (CD). A câmara de gases recebe o fluxo de H_2O (C1), que funcionará como fluxo receptor de gases ($1,2 \text{ mL min}^{-1}$). A mistura de gás difundida é transportada até o condutivímetro (C).

Na posição de injeção, a zona de amostra dispersa (125 μL) contendo amônio (NH_4^+) é transportada pelo carregador até a confluência X, onde recebe um fluxo de solução NaOH. A mistura dispersa é carregada até a bobina reacional, onde ocorrerá a formação de amônia (NH_3). A amônia formada é transportada até a câmara de difusão de gás contendo membrana de PTFE, na qual permite a difusão do NH_3 para um fluxo receptor (água destilada). A amônia difundida sofre hidrólise, na qual o íon amônio formado será monitorado por um condutivímetro acoplado ao sistema em fluxo.

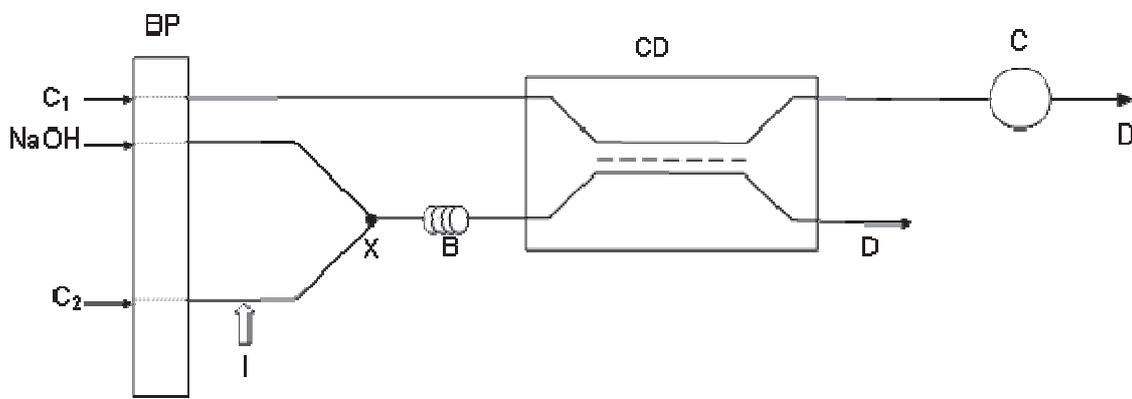


Figura 4 – Sistema de análise por injeção em fluxo proposto para determinação de amônio. Solução de NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a vazão de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$; I, injetor comutador (25 cm, 125 μL); C_1 , solução receptora (água destilada $1,2 \text{ mL min}^{-1}$); C_2 , solução transportadora (água destilada) com vazão de $4,5 \text{ mL min}^{-1}$; BP, bomba peristáltica; X, confluência; B, reator helicoidal (100 cm x 0,8 mm d.i.); CD, câmara de difusão de gás; C, condutivímetro; D, descarte.

3.4.2 Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com detecção condutométrica para a determinação de interferentes em solução ou amostra contendo íon amônio

Para avaliação dos possíveis interferentes na determinação de amônio em amostras de águas empregou-se a mesma configuração da Figura 5. Neste sistema, a solução padrão de amônio é injetada de maneira sincronizada com um volume de solução do possível interferente. Os volumes injetados coalescem no ponto de confluência X, no qual há uma mistura dessas soluções. Após o ponto de confluência Y, haverá uma mistura dessa solução com a solução reagente NaOH.

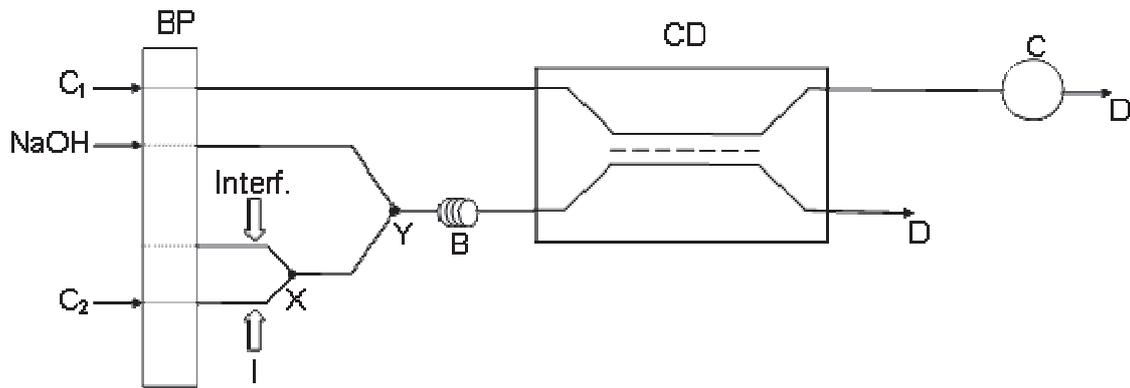


Figura 5 – Sistema de análise por injeção em fluxo proposto para estudo de interferentes. NaOH: solução de NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ($1,3 \text{ mL min}^{-1}$); soluções de referência NH_4Cl $1,1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; alça de amostragem e de interferentes (25 cm , $125 \mu\text{L}$); C1, solução receptora (água destilada), vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e C2, solução transportadora (água destilada) com vazão de $4,5 \text{ mL min}^{-1}$; BP, bomba peristáltica; Interf., soluções contendo íons interferentes; I, injetor; X e Y, ponto de confluências; B, reator helicoidal ($100 \text{ cm} \times 0,8 \text{ mm d.i.}$); CD, câmara de difusão de gás; C, condutivímetro; D, descarte.

3.4.3 Desenvolvimento de um sistema análise por injeção em fluxo reverso (FIA-r) para a determinação de nitrito em amostras de águas

3.4.4 Reagentes e Soluções

Todas as soluções para a determinação de nitrito em FIA-r foram preparadas com reagentes P.A. e água destilada.

Os reagentes cromóforos foram preparados em várias concentrações diferentes para o planejamento univariado. Preparou-se quatro soluções de $50,0 \text{ mL}$ de α -naftilamina, pesando-se $0,022 \text{ g}$, $0,082 \text{ g}$, $0,125 \text{ g}$ e $0,202 \text{ g}$, dissolvidas em solução de ácido acético $1,74 \text{ mol L}^{-1}$. As soluções foram completadas até a marca com mesma solução de ácido acético.

As soluções de sulfanilamida foram preparadas pela dissolução da substância em ácido acético $1,74 \text{ mol L}^{-1}$ e o volume completado até a marca de $50,0 \text{ mL}$ com a mesma solução ácida. As massas pesadas foram as seguintes: $0,024 \text{ g}$, $0,082 \text{ g}$, $0,128 \text{ g}$, $0,203 \text{ g}$.

As soluções padrões de nitrito de sódio foram preparadas com concentrações variando de $1,00 \times 10^{-6}$ a $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a partir da solução estoque $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Para a análise comparativa do nitrito, a solução cromófora foi preparada de acordo com MANTOVANI (2005), com algumas alterações, pesando-se 0,1230g α -naftilamina, 0,1260 g de sulfanilamida, dissolvidas em ácido acético $1,74 \text{ mol L}^{-1}$ e completado o volume para 50 mL com a mesma solução ácida⁵⁶. As concentrações finais de α -naftilamina e sulfanilamida foram respectivamente, $1,74 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,48 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

As soluções padrões para a construção da curva analítica foi preparada adicionando-se alíquotas da solução padrão estoque de nitrito, $500,0 \mu\text{L}$ da solução cromófora e completado o balão com água destilada até a marca de $25,0 \text{ mL}$, obtendo concentrações finais na faixa de $1,40 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,40 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

3.4.5 Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo reverso para determinação de nitrito

A otimização do sistema de análise por injeção em fluxo foi realizada em um módulo conforme mostrado na Figura 6 abaixo. Neste sistema, um volume de solução de α -naftilamina(R1) e solução de sulfanilamida (R2) são injetados simultaneamente em um fluxo de solução padrão contendo nitrito. As zonas de reagentes dispersas confluem por coalescência no ponto de confluência X e recebem um fluxo de solução de ácido acético na confluência Y. A zona de reagente dispersa reage com o nitrito na bobina reacional e o cromóforo formado é detectado espectrofotometricamente em 516 nm .

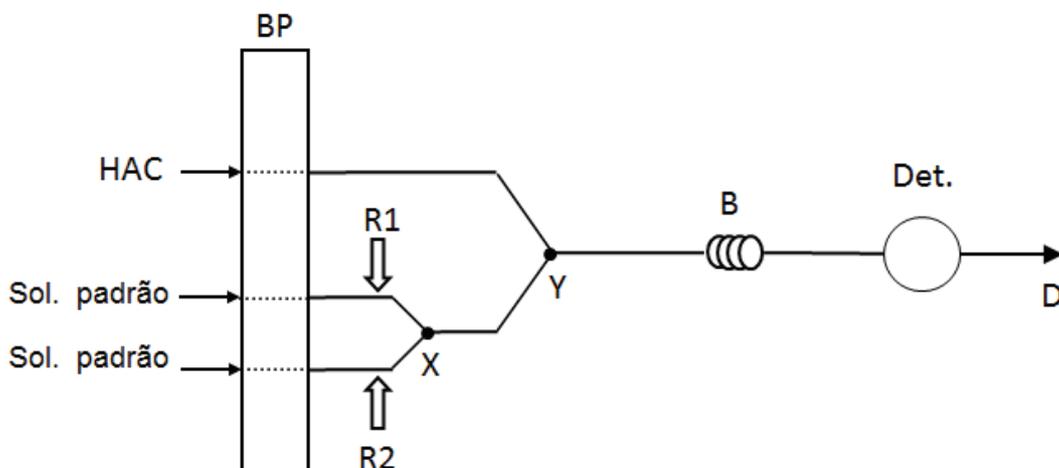


Figura 6 – Diagrama do sistema em fluxo empregado para determinação de nitrito. BP, bomba peristáltica; R1, solução de α -naftilamina de $1,76 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; R2, solução de sulfanilamida de $2,38 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; solução de ácido acético $1,74 \text{ mol L}^{-1}$ ($1,2 \text{ mL min}^{-1}$); volume das alças

de reagentes 125 μ L (50 cm); B, reator helicoidal de 100 cm; I, injetor; X, confluência de mistura (nitrito, α -naftilamina e sulfanilamida); Y, confluência de mistura (nitrito, α -naftilamina e sulfanilamida e ácido acético); Det., detector espectrofotômetro; D, descarte.

O sistema de análise por injeção em fluxo reverso utilizado para determinação de nitrito nas amostras de águas apresenta a configuração abaixo. Neste sistema, um volume de solução reagente contendo α -naftilamina e sulfanilamida em meio de ácido acético são injetados num fluxo de solução padrão ou amostra, sendo o cromóforo formado na bobina reacional detectado em 516 nm. Para a determinação de nitrito empregando a curva analítica, utilizou água destilada na alça S1, variando a concentração da solução de nitrito propulsionada pela bomba peristáltica.

A mesma configuração do FIA-r foi empregada para determinação da recuperação das amostras de águas. Neste caso, uma solução de amostra é propulsionada pela bomba peristáltica sendo a concentração de nitrito determinada empregando a injeção do reagente e água em S1. Na sequência, são injetadas em S1, diferentes soluções padrões contendo concentração entre a faixa de concentração da curva analítica.

Esta configuração do FIA-r proposta permite ainda, a determinação da concentração de nitrito pelo método da adição de padrão.

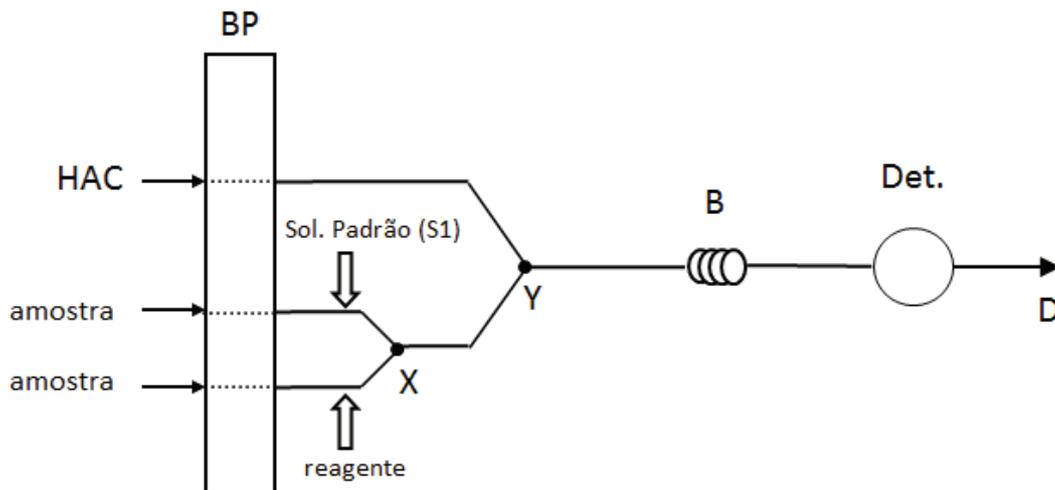


Figura 7– Diagrama do sistema em fluxo empregado para avaliação. BP, bomba peristáltica; R, solução de α -naftilamina de $1,76 \times 10^{-2}$ mol L $^{-1}$ e sulfanilamida de $2,38 \times 10^{-2}$ mol L $^{-1}$ em meio de ácido acético $1,74$ mol L $^{-1}$ ($1,2$ mL min $^{-1}$); S1: volume de solução padrão de nitrito 125 μ L (50 cm); volume das alças de reagentes 125 μ L (50 cm); B, reator helicoidal de 100 cm; I, injetor; X, confluência de mistura (nitrito, α -naftilamina e sulfanilamida); Y, confluência de mistura (nitrito, α -naftilamina e sulfanilamida e ácido acético); Det., detector espectrofotômetro; D, descarte.

4. Resultados e discussão

4.1.1 Sistema de análise por injeção em fluxo

A câmara de difusão de gás é um dispositivo que acoplado ao sistema em fluxo é mais limpo, sendo possível substituir reagentes tóxicos por até mesmo água ou minimizar a quantidade de resíduos tóxicos gerados.

O sistema de análise em fluxo, empregado para a determinação de amônio em vinhaça e águas de rio baseia-se na formação de amônia e na difusão desse gás através da membrana polimérica politereftalato (PTFE). A amônia difundida pela membrana reage como uma base fraca, dissociando-se em íons que são monitorados com um condutivímetro acoplado, de acordo com as equações 5 e 6 sendo seu sinal analítico obtido é proporcional à concentração do amônio⁵⁷.



4.1.2 Otimização da metodologia proposta

Neste procedimento proposto, o único reagente usado é a solução de hidróxido de sódio⁵⁷. Essa metodologia proposta é um procedimento analítico alternativo aos procedimentos que empregam metodologias tradicionais, como o método do indofenol (reação de Berthelot), no qual fenol reage com amônia e hipoclorito em meio hidróxido de sódio¹⁴.

Para otimização dos parâmetros químicos e de fluxo empregou-se uma matriz de planejamento experimental 2³, no qual foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Concentração de NaOH;
- Vazão da solução receptora;
- Vazão do carregador.

Foram excluídos dessa matriz os parâmetros vazão da solução de NaOH, comprimento da bobina reacional e o volume da alça de amostragem. A vazão da solução de NaOH foi mantida a menor possível, para evitar a dispersão da zona de amostra a partir do ponto de confluência X. O comprimento da bobina reacional foi mantido no menor comprimento possível (100 cm), pois a reação apresenta um valor de constante de equilíbrio elevado. Dessa maneira, aumenta-se a frequência analítica do procedimento devido à diminuição do tempo de residência da zona de amostra no sistema FIA. Já o volume da alça de amostragem, será determinado de acordo com o nível de concentração do analito na amostra, pois quanto menor o volume, menor o tempo de residência da zona de amostra no sistema.

Medidas condutométrica foram feitas utilizando soluções padrão NH_4Cl $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ descrita no item 3.4, em triplicata através de repetições autênticas e de maneira aleatória. Na Tabela 1 são mostrados os diferentes fatores (parâmetros) selecionados e a concentração dos níveis avaliados, partindo-se de valores relatados na literatura.

Tabela 1 – Parâmetros avaliados na otimização do procedimento em fluxo

Variável	Níveis	
	-1	+1
NaOH (mol L^{-1})	1×10^{-2}	1×10^{-1}
Vazão do receptor (mL min^{-1})	1,2	4,5
Vazão do carregador (mL min^{-1})	1,5	4,5

Com o objetivo de verificar o efeito de cada um desses parâmetros e as interações entre eles, foram realizados 8 experimentos em triplicata, conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Planejamento fatorial 2^3 para avaliação do efeito e interação dos parâmetros selecionados na determinação do íon amônio

Ensaio	NaOH (mol L^{-1})	Vazão do receptor (mL min^{-1})	Vazão do carregador (mL min^{-1})	$\mu\text{S/cm}$
--------	---------------------------------	---	---	------------------

1	-1	-1	-1	$6,11 \pm 0,31$
2	+1	-1	-1	$3,77 \pm 0,04$
3	-1	+1	-1	$2,73 \pm 0,42$
4	+1	+1	-1	$2,12 \pm 0,26$
5	-1	-1	+1	$9,97 \pm 0,07$
6	+1	-1	+1	$3,86 \pm 0,30$
7	-1	+1	+1	$2,98 \pm 0,32$
8	+1	+1	+1	$0,85 \pm 0,17$

n=3.

Após selecionar os parâmetros concentração da solução de NaOH e a vazão da solução receptora, realizou-se um planejamento experimental 2^2 com ponto central.

A metodologia de superfície de resposta foi empregada na otimização do procedimento, utilizando um planejamento 2^2 com ponto central. Verificando-se que, entre os parâmetros avaliados a vazão da solução carregadora não tinha efeito significativo, fixou-a em $4,5 \text{ mL min}^{-1}$. Para a solução de NH_4Cl foi escolhida a concentração de $2,78 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Medidas condutométricas foram feitas novamente, utilizando soluções padrão NH_4Cl , em triplicata através de repetições autênticas e de maneira aleatória. Na Tabela 3 são mostrados os diferentes fatores selecionados e a magnitude da correspondente perturbação realizada em seus níveis, os símbolos “+”, “0” “-”, “-1,41” e “+1,41” mostram os níveis avaliados neste planejamento.

Tabela 3 – Parâmetros avaliados na otimização do procedimento em fluxo

Variável	Níveis				
	-1	0	+1	-1,41	+1,41
NaOH (mol L^{-1})	1×10^{-3}	1×10^{-2}	1×10^{-1}	$7,5 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-1}$
Vazão do receptor (mL min^{-1})	0,7	1,2	4,5	0,6	2,0

Com o objetivo de verificar o efeito de cada um desses parâmetros e as interações entre eles, foram realizados 11 experimentos em triplicata, conforme apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Planejamento fatorial 2^2 com ponto central para avaliação do efeito e interação dos parâmetros selecionados na determinação do íon amônio

Ensaio	NaOH/ mol L ⁻¹	Vazão do receptor mL min ⁻¹	Sinal μS/cm
1	-1	-1	0,14 ± 0,01
2	+1	-1	1,98 ± 0,08
3	-1	+1	0,02 ± 0,02
4	+1	+1	0,96 ± 0,49
5	0	0	5,13 ± 0,55
6	0	0	4,91 ± 0,10
7	0	0	4,62 ± 0,61
8	-1,41	0	0,12 ± 0,01
9	+1,41	0	2,65 ± 0,04
10	0	-1,41	1,39 ± 0,04
11	0	+1,41	2,85 ± 0,56

n=3.

Os resultados obtidos a partir deste planejamento foram ajustados para um modelo quadrático descrito pela equação abaixo:

$$Z = 5,028 + 0,6875 \times x + 0,0068 \times y - 2,128 \times x^2 - 1,758 \times y^2 - 0,441 \times x \times y$$

Equação 7

Nesta equação Z representa a condutividade e as variáveis x e y correspondem as variáveis concentração de NaOH e vazão da solução receptora, respectivamente. Com essa equação, obteve-se o gráfico de superfície de resposta, no qual se estabeleceu os parâmetros que proporcionaram a maior resposta e estão mostrados na legenda da Figura 4.

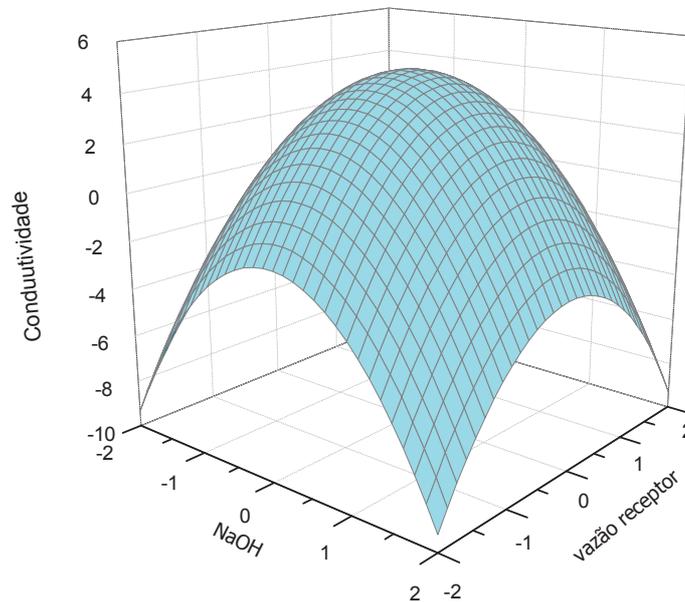


Figura 8 – Gráfico de superfície de resposta para a otimização do procedimento em fluxo para determinação de amônia proposto.

A análise da Figura 8 indica que dentro do intervalo em que as variáveis independentes foram avaliadas, o valor da variável dependente passa por uma região de máximo, situada na área mais escura do gráfico, a qual representa a os parâmetros ótimos para serem selecionados na configuração do sistema em fluxo. De acordo com estes resultados, os maiores sinais analíticos são obtidos empregando solução NaOH 1×10^{-2} mol L⁻¹ e vazão da solução receptora de 1,2 mL min⁻¹.

A análise de variância (ANOVA) do modelo matemático obtido é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 – Análise de variância para a regressão dos dados obtidos na otimização do sistema em fluxo

	SQ	nGL	MQ	F _{calc}	F _{crit}	<i>p</i>
Regressão	29,10	5	5,820	4,49	6,256	0,0852
Resíduos	5,186	4	1,295			
F. Ajuste	5,1571	3	1,711	69,76	215,737	0,0877
Erro puro	0,0246	1	0,0246			
TOTAL	34,283	9				

% variação explicada	84,883
%máxima de variação explicável	99,928

Verificamos a partir da análise de variância que a regressão do modelo matemático quadrático, mostrado na Figura 8, apresenta uma regressão não significativa ($F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}}$), ou seja, o modelo matemático não está bem ajustado com os dados obtidos no planejamento. Calculando o coeficiente de regressão, encontra-se um $r = 0,84$. Apesar do tratamento estatístico não mostrar-se adequado, verifica-se na equação do modelo Equação 7 que a região que apresenta maior sinal analítico está nas proximidades dos níveis zeros, ou seja, solução de NaOH $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e vazão da solução carregadora $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. Desta maneira, selecionaram-se estas condições como ótimas para a análise das amostras.

4.1.3 Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico refere-se à capacidade do procedimento em produzir respostas proporcionais a concentração do analito nas amostras em uma determinada faixa de concentração. A linearidade deve ser obtida empregando 6 (seis) soluções padrões e deve ser definida pelo coeficiente de regressão do modelo matemático adotado. A equação da curva analítica deve se obtida pelo método dos mínimos quadrados e o coeficiente de correlação deve ser maior que 0,99⁵⁶.

Neste procedimento, a curva analítica foi obtida pela leitura em triplicata de soluções padrão de NH_4Cl nas concentrações de $2,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 9) e em concentrações variando entre $1,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 10).

Nas condições otimizadas, a curva analítica com concentrações variando de $2,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ é descrita pela equação $C = 1.490,25 (\pm 66,10) \times [\text{NH}_4^+] - 0,362 (\pm 0,509)$, $r = 0,998$; onde C é a condutância em $\mu\text{S cm}^{-1}$ e $[\text{NH}_4^+]$ a concentração de íon amônio (mol L^{-1}). O procedimento proposto apresentou um limite de detecção (3σ branco/inclinação da curva analítica) de $1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e o desvio padrão relativo para uma concentração de $5,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, foi de 5,4 % ($n=10$).

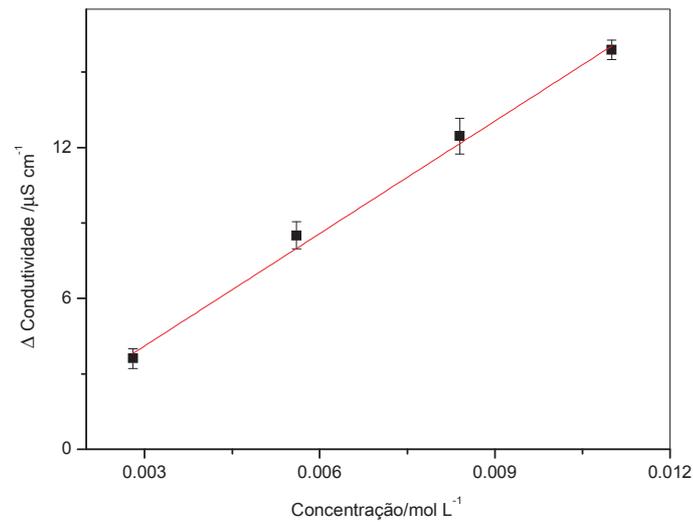


Figura 9 – Curva analítica do procedimento em fluxo proposto (n = 3).

Na faixa de concentração maior variando de $1,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 10), obteve-se a seguinte equação da curva: $C = 1.506,88 (\pm 589,96) \times [\text{NH}_4^+] + 209,94(\pm 11,65)$, $r = 0,737$; onde C é a condutância em μS e $[\text{NH}_4^+]$ a concentração de íon amônio (mol L^{-1}). Nesta faixa de concentração, verifica-se que a regressão apresentou um coeficiente de correlação inadequado para quantificações analíticas.

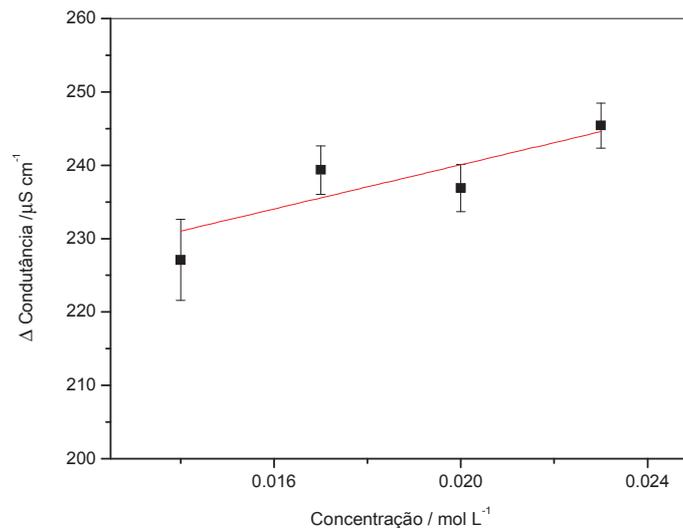


Figura 10 – Curva analítica do procedimento em fluxo proposto (n = 3).

4.1.4 Estudo de interferentes

A seletividade de um procedimento analítico refere-se à capacidade do procedimento determinar o analito na presença de uma substância específica presente na matriz de amostra⁵⁸.

A seletividade do sistema em fluxo proposto foi avaliada avaliando-se o efeito de substâncias possivelmente interferentes na determinação de solução padrão de NH_4Cl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Entre os interferentes avaliados, verificou-se que o íon Fe(III) apresentou uma interferência de $-10,5\%$, na concentração de $5,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Na Tabela 6, são apresentados a variação do sinal analítico de cada substância avaliada. Verifica-se que soluções de K_2CO_3 $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e NaNO_3 $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ interferem negativamente na determinação de uma solução padrão de NH_4Cl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Vale lembrar que estas concentrações dos interferentes não são usuais nas amostras de águas avaliadas neste trabalho.

Tabela 6 – Estudo da seletividade na determinação de NH_4Cl empregando o sistema de análise por injeção em fluxo com detecção condutométrica

Interferente	Concentração ^a / mol L^{-1}	%
FeCl_3	$5,1 \times 10^{-5}$	-10
K_2CO_3	$1,0 \times 10^{-2}$	-5,1
NaNO_3	$2,0 \times 10^{-2}$	-4,2
Na_2CO_3	$2,0 \times 10^{-2}$	-4,5
EDTA^b	$2,2 \times 10^{-4}$	-4,3
CaCl_2	$1,8 \times 10^{-2}$	-3,8
Na_2HPO_4	$7,4 \times 10^{-3}$	-3,1
KCl	$2,7 \times 10^{-2}$	-0,62
Na_2SO_4	$1,4 \times 10^{-2}$	-0,28
NaCl	$3,5 \times 10^{-2}$	-0,19

n=3,

^a $[\text{NH}_4^+] = 1,1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$;

^b EDTA= edeteato dissódico

4.1.5 Teste de adição e recuperação

A exatidão do procedimento proposto é definida como o grau com o qual o analito determinado pelo procedimento na amostra corresponde ao valor exato⁵⁸. Neste trabalho, a exatidão foi avaliada estudando-se a interferência de diferentes matrizes de amostras na determinação de amônio. Uma alíquota de solução padrão de amônio foi adicionada a um volume de amostra, e a resposta obtida foi comparada com uma solução de mesmo volume da amostra, sem a adição da solução padrão de amônio.

Os resultados estão apresentados na Tabela 7. Verifica-se que as recuperações variaram entre 110 a 117% para as amostras de águas, e de 111 a 116% para as amostras de vinhaça. Utilizou-se o teste de hipótese para confirmar a exatidão do procedimento, sendo estabelecida a hipótese nula (H_0 : recuperação=100%) e como hipótese alternativa (H_1 : recuperação \neq 100%). O teste t aplicado, com 98% de confiança e n-1 graus de liberdade, apresentou valores calculados entre os intervalos estabelecidos pelo valor tabelado (6,965), indicando que não há diferença significativa na recuperação para este nível de significância.

Os valores de recuperação estão entre os valores aceitáveis de 80 a 120%, para determinações de analito entre 0,1 a 1%, segundo o Guia para Validação de Métodos Analíticos para Constituintes Ativos em Produtos Agrícolas, Veterinário ou Produtos Químicos⁵⁸.

Tabela 7 – Recuperação de amônio nas amostras de água e vinhaça empregando o procedimento em fluxo proposto

Amostras	$\text{NH}_4^+ / 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$		Recuperação/%	$t_{\text{calculado}}$
	Adicionado	Encontrado		
Água de rio	5,6	$6,2 \pm 0,61$	110	4,6
	8,4	$9,8 \pm 0,36$	117	
Vinhaça	5,6	$6,2 \pm 0,27$	110	5,5
	8,4	$9,7 \pm 0,23$	116	

n = 3; $\bar{x} \pm$ desvio padrão;

H_0 , recuperação = 100% e H_1 , recuperação \neq 100%;

$t_{\text{crítico}} = 6,965$ (nível de significância de 98%).

A metodologia proposta, além de não usar reagentes de baixa toxicidade, apresentou um consumo de 0,52 mg de NaOH por determinação. Como pode ser verificado na Tabela 8, verifica-se que resultado obtido é bastante satisfatório quando comparados com resultados descritos em trabalhos com a finalidade de determinar amônio utilizando câmara de difusão de gases.

Tabela 8 – Consumo de NaOH por determinação de íon amônio

Amostra	Método	Detecção	Consumo de NaOH (mg)	Ref.
Água de rio	FIA com membrana de difusão de gás	Fluorimétrica	8,6	10
Leite e carne de galinha	FIA com membrana de difusão de gás	Condutométrica	275	16
Efluente e afluente	FIA múltipla-injeções com membrana de difusão de gás	Espectrofotométrica	200	59
Água superficial e vinhaça	FIA com membrana de difusão de gás	Condutométrica	0,52	^a

^a: trabalho proposto.

Um levantamento das metodologias e suas respectivas figuras de mérito para a determinação de íon amônio é apresentado na Tabela 9. Foram realizadas determinações em amostras águas naturais, plantas, utilizando metodologias e detectores variados.

Tabela 9 – Figuras de mérito de procedimentos analíticos para a determinação de amônia

Amostra	Método	Detector	Linearidade mol L ⁻¹	LD/ mol L ⁻¹	Recuperação (%)	Ref.
Água de rio	Extração em ponto nuvem	Espectrofotômetro	1,1x10 ⁻⁷ a 6,9x10 ⁻⁶	5,5x10 ⁻⁸	94 a 102	¹
Água de rio	FIA com membrana de difusão de gás	Fluorímetro	1,0x10 ⁻⁶ a 2,0x10 ⁻³	3x10 ⁻⁷	98,1 a 100	¹⁰
Efluente e afluente	FIA múltipla-injeções com membrana de difusão de gás	Espectrofotômetro	5,5x10 ⁻⁴ a 2,8x10 ⁻³	1,2x10 ⁻⁴	91,5 a 109	⁵⁹
Água de rio e esgoto	Eletroforese com detecção direta	Espectrofotômetro	0 a 2,8x10 ⁻³	1,3x10 ⁻⁵	ND	⁶⁰
Água de rio	FIA multicomutação	Fotômetro	ND ^a	3,9x10 ⁻⁷	ND	⁶¹
Água de rio	FIA multicomutação binária	Fotômetro	5,6x10 ⁻⁶ a 1,1x10 ⁻⁴	1,4x10 ⁻⁸	ND	⁶²
Água do mar	Módulo multiparâmetro – LFA	Colorímetro	1,1x10 ⁻⁷ a 8,3x10 ⁻⁷	2,8x10 ⁻⁷	ND	⁶³
Plantas (N total)	FIA – mini coluna AgCl	EAA ^b	ND	ND	ND	⁶⁴
Água de rio	Eletrodo íon seletivo	Potenciômetro	7,7x10 ⁻⁷ a 4,0x10 ⁻²	1,58x10 ⁻⁷	ND	⁶⁵
Água superficial e vinhaça	FIA com membrana de difusão de gás	Condutímetro	2,8 x 10 ⁻³ a 1,1x10 ⁻²	1,3x10 ⁻⁴	110 a 116	^c

^aND, Não divulgado; ^bEAA, Espectrometria de absorção atômica; ^ctrabalho proposto.

O procedimento proposto apresentou uma linearidade comparável aos procedimentos com detecção espectrofotométrica apresentados na Tabela 9. A frequência analítica foi maior que os trabalhos divulgados por ALMEIDA et al. (2011)⁵⁹ e AZZARO et al. (2006)⁶³ e limite de detecção comparável ao de ALMEIDA et al (2011)⁵⁹. A recuperação de amônio nas amostras de águas avaliadas foi adequada para a determinação de amônio em águas.

4.2 Determinação do íon nitrito

4.2.1 Sistema de análise por injeção em fluxo reverso

O sistema de análise por injeção em fluxo com fluxo reverso tem como principal característica a propulsão da solução contendo o analito, sendo os reagentes cromóforos, α -naftilamina e sulfanilamida, injetados no fluxo e transportados em direção à confluência X. Neste sistema uma solução de ácido acético era bombeada diretamente para confluência Y, no qual todos os reagentes e amostras confluíam e na bobina reacional se dava a reação. A solução resultante é propulsionada até o espectrofotômetro e a absorbância medida no comprimento de onda de 516 nm. A absorbância obtida foi proporcional à concentração de nitrito.

Primeiramente, foram estabelecidos alguns parâmetros e realizou-se um planejamento univariado, em que cada variável foi estudada isoladamente e, a partir dos resultados obtidos em cada uma delas, foram selecionadas e inseridas nas demais até que, finalmente, foram obtidas as condições ótimas do sistema.

4.2.2 Otimização dos parâmetros químicos do sistema FIA-r

Os estudos dos parâmetros químicos foram avaliados empregando as seguintes condições do sistema de análise por injeção em fluxo: vazão da solução de amostra, ou solução padrão de nitrito $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $2,5 \text{ ml min}^{-1}$, vazão da solução de ácido acético $1,74 \text{ mol L}^{-1}$ de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume da alça de reagentes, α -naftilamina e sulfanilamida de $125 \text{ }\mu\text{L}$ e comprimento da bobina reacional $100,0 \text{ cm}$.

4.2.2.1 Avaliação da concentração de α -naftilamina sob a intensidade do sinal analítico

Avaliou-se o efeito da concentração de α -naftilamina, sobre a intensidade do sinal analítico, na faixa de concentração entre $3,05 \times 10^{-3}$ a $2,84 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ empregando-se uma solução de sulfanilamida de concentração $2,38 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Verificou-se um aumento da intensidade do sinal com o aumento da concentração até a concentração de $1,76 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, sendo que, o aumento do sinal da concentração superior, foi menos intenso. Desta maneira, considerando uma relação de sinal e consumo de reagente, fixou-se a concentração de α -naftilamina de $1,76 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para os demais experimentos.

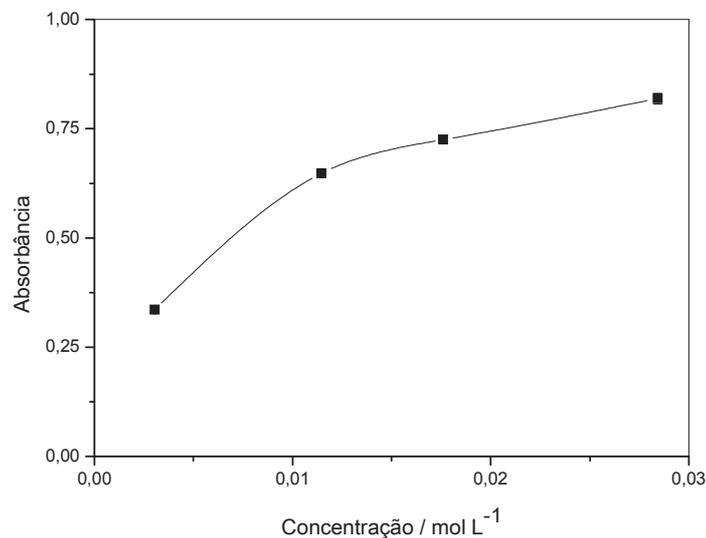


Figura 11 – Efeito da concentração de α -naftilamina sobre o sinal analítico de uma solução padrão de nitrito $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

4.2.2.2 Avaliação da concentração de sulfanilamida sob o sinal analítico

O estudo do efeito da concentração de sulfanilamida sobre o sinal analítico foi avaliado empregando uma solução de α -naftilamina de $1,76 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Neste estudo variou-se a concentração entre $2,86 \times 10^{-3}$ a $2,38 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Verificou-se um aumento linear da intensidade do sinal com o aumento da concentração de sulfanilamida até a concentração superior estudada. Desta maneira, selecionou-se a concentração de $2,38 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para os demais experimentos.

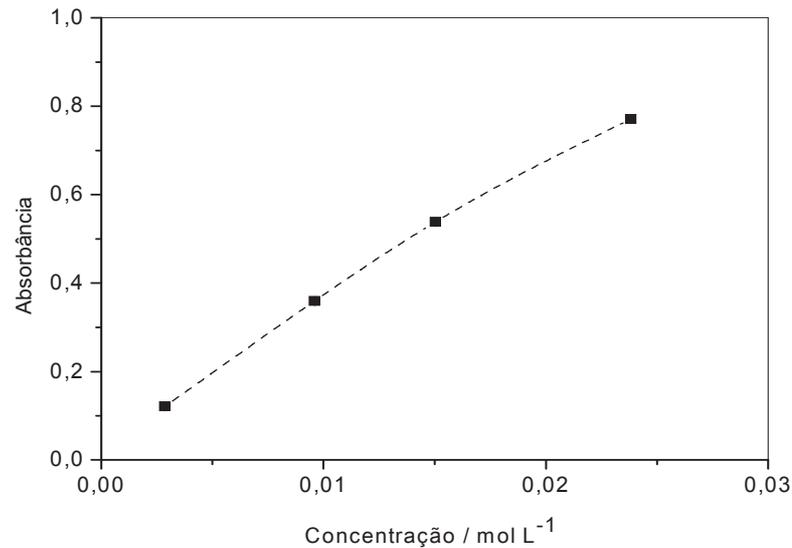


Figura 12 – Efeito da concentração de sulfanilamida sobre o sinal analítico de uma solução padrão de nitrito $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

4.2.2.3 Avaliação do efeito da concentração da solução de ácido acético

Na sequência, avaliou-se o efeito da concentração da solução de ácido acético nas concentrações de 0,506, 0,994 e $1,74 \text{ mol L}^{-1}$, sobre o sinal analítico de uma solução padrão de nitrito $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, solução de α -naftilamina $1,76 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e sulfanilamida $2,38 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Verificou-se um aumento linear do sinal analítico com o aumento da concentração da solução de ácido acético até a concentração de $1,74 \text{ mol L}^{-1}$. Considerando-se a razão entre sinal analítico e consumo de reagente, selecionou-se esta concentração para os demais experimentos.

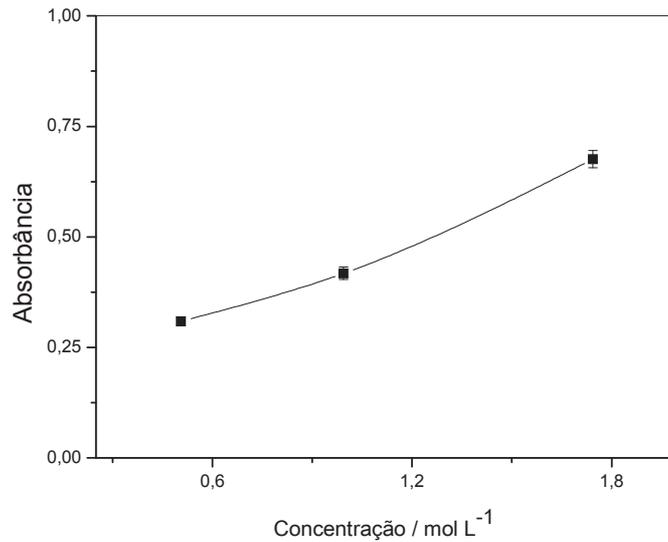


Figura 13 – Estudo do efeito da concentração de ácido acético sobre o sinal analítico.

4.2.3 Otimização dos parâmetros físicos do sistema FIA-r

O estudo dos efeitos dos parâmetros físicos foi realizado com os seguintes parâmetros químicos selecionados: solução de ácido acético na concentração de $1,74 \text{ mol L}^{-1}$, solução de α -naftilaminana concentração de $1,76 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e solução de sulfanilamida na concentração de $2,38 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Os parâmetros físicos, ou de fluxo, foram os seguintes: vazão das soluções, volume de reagente e comprimento da bobina reacional.

4.2.3.1 Estudo do efeito da vazão da solução de amostra sob o sinal

Avaliou-se o efeito da vazão das soluções de amostras sobre o sinal analítico nas vazões entre $1,0$ e $2,5 \text{ mL min}^{-1}$, no sinal analítico de uma solução padrão de nitrito de $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Verificou-se que o sinal analítico permaneceu constante nas vazões de $1,0$ e $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. Com o aumento da vazão houve uma diminuição significativa do sinal analítico, devido ao aumento da dispersão da zona de reagente ocasionada pelo aumento da vazão. Desta maneira, selecionou-se a vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ para os demais experimentos.

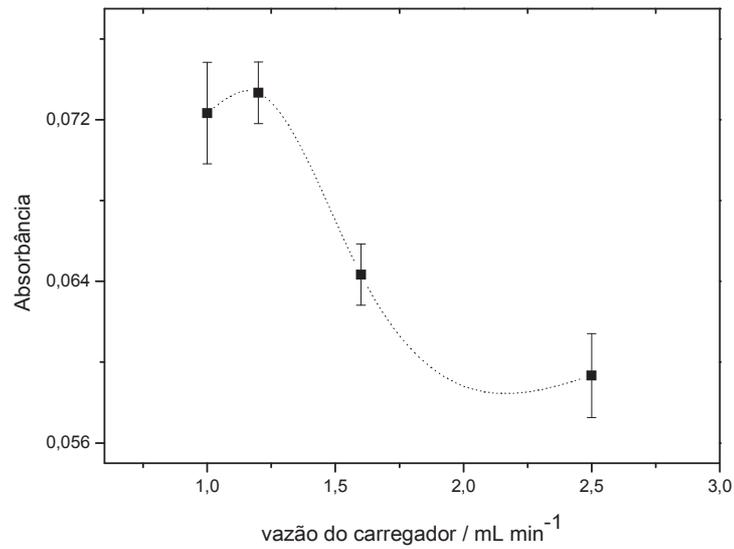


Figura 14 – Estudo do efeito da vazão da solução de amostra sobre o sinal analítico.

4.2.3.2 Estudo do efeito do volume dos reagentes sob o sinal analítico

As soluções de reagentes são injetadas em um fluxo de solução de amostra, sofrem mistura no ponto de confluência e são transportadas até o detector. Os volumes de solução dos reagentes deve ser avaliado, pois um volume muito grande não permitiria a dispersão completa da zona de reagente dispersa, ocasionando um pico duplo, de menor intensidade. Neste caso foi avaliada a influencia de três volumes de reagentes sobre o sinal analítico, a saber: 62,5 μL (25 cm); 125 μL (50 cm) e 187,5 μL (75 cm). O efeito dos volumes de α -naftilamina $1,76 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e sulfanilamida $2,38 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, variados simultaneamente, de 25,0 50,0 e 75,0 cm foram estudados injetando sobre uma solução padrão de nitrito $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Conforme pode ser verificado na Figura 15, ocorre um aumento significativo do sinal analítico no volume de 50,0, diminuindo levemente no volume superior. Desta maneira, selecionou-se o volume de alça dos reagentes de 50 cm (125 μL) para os demais experimentos.

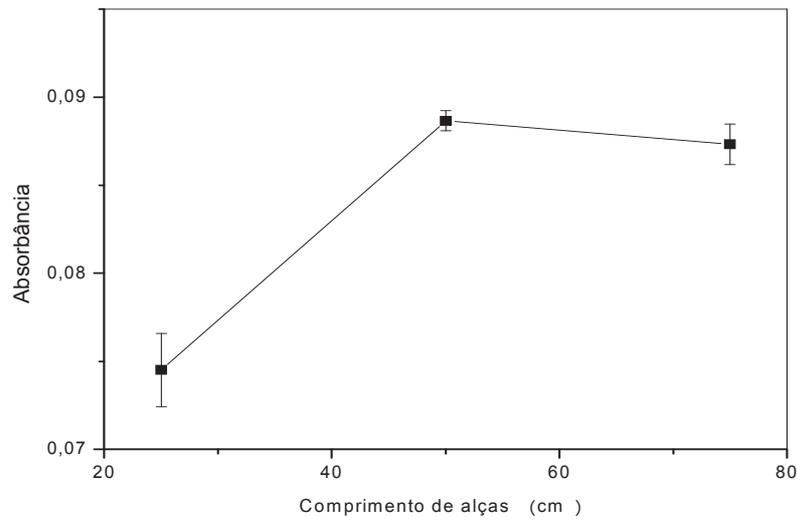


Figura 15 – Estudo do efeito do volume dos reagentes sob o sinal analítico.

4.2.3.3 Avaliação do efeito do comprimento da bobina reacional

O efeito do comprimento da bobina reacional sobre o sinal analítico foi avaliado entre 75 e 175 cm. A bobina reacional permite a homogeneização dos volumes de reagente e amostras, bem como o tempo de reação para a formação do cromóforo. Verificou-se que não houve aumento do sinal analítico quando se aumentou o comprimento da bobina de 75,0 para 100,0 cm. O aumento verificado para o comprimento de 175 cm deve-se ao maior tempo de residência da solução para formação do cromóforo. Considerando-se a razão entre sinal analítico e frequência analítica, selecionou-se o comprimento de bobina reacional de 100 cm para os demais experimentos.

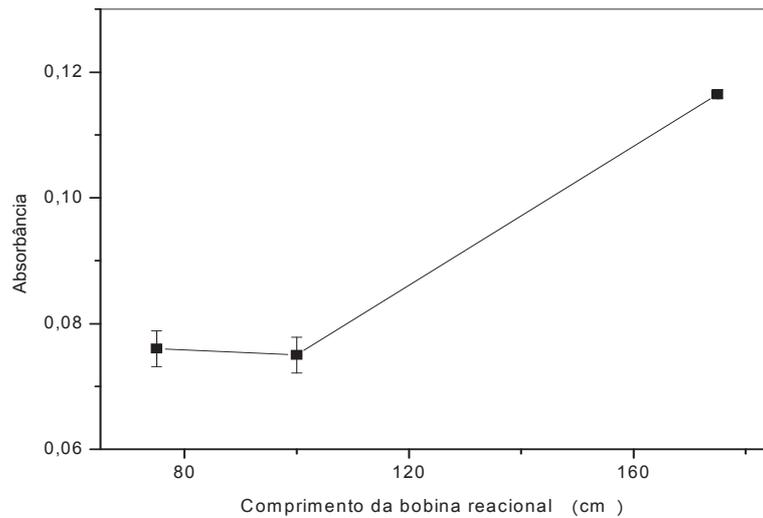


Figura 16 – Avaliação do efeito do comprimento da bobina reacional.

4.2.3.4 Parâmetros analíticos do sistema FIA-reverso para a determinação de nitrito

A curva analítica foi obtida por injeções sucessivas de 6 soluções padrões de nitrito nas concentrações variando de $1,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $5,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. A curva analítica obtida pode ser descrita pela equação obtida pelo método dos mínimos quadrados: $Abs = 0,011 (\pm 0,002) + 10306,6 (\pm 126,25) \times [NO_2^-]$, $r = 0,999$, onde Abs é a absorbância e $[NO_2^-]$ é a concentração de nitrito em mol L⁻¹. A curva analítica é apresentada na Figura 17.

Um limite de detecção de $2,15 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (três vezes o sinal do branco/inclinação da curva analítica) e desvios padrão menores que 2% para as concentrações de solução padrão de 2×10^{-5} e 3×10^{-5} mol L⁻¹ (n=10) foram obtidos. A frequência de amostragem obtida foi de 45 amostras por hora.

As quantidades de reagentes consumidos por determinação de nitrito em amostras de águas foram 1,01 mg de sulfanilamida e 0,60 mg de α -naftilamina por determinação.

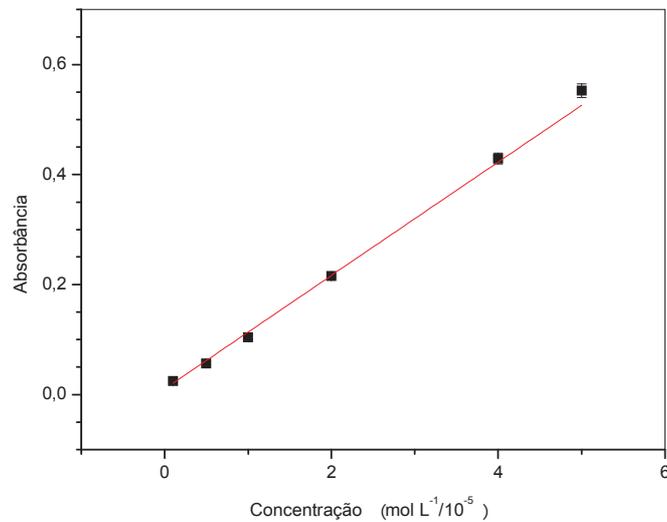


Figura 17 – Curva analítica para determinação de nitrito empregando o sistema FIA-r com detecção espectrofotométrica.

4.2.3.5 Estudo da recuperação de nitrito em amostras de águas empregando o sistema FIA-r proposto

A exatidão do procedimento proposto foi avaliada com um módulo de análise apresentado na Figura 7. Neste estudo, injetou-se na solução de amostra propulsionada pela bomba peristáltica, 3 alíquotas de soluções padrões de diferentes concentrações de nitrito (1×10^{-5} , 2×10^{-5} e 4×10^{-5} mol L⁻¹). O sinal obtido foi comparado com aquele sinal obtido na qual uma solução de água destilada foi injetada no lugar das soluções padrão de nitrito. Os resultados de recuperação variaram de 93,4 a 132% (n=3). Aplicando o teste de hipótese no qual $\mu_0=100\%$ de recuperação, encontramos um valor de $t_{\text{calculado}}$ de 0,936. Este resultado indica que os dados de recuperação não é estatisticamente diferente de 100%, indicando que a matriz da amostra avaliada não interfere na determinação de nitrito. Os resultados estão apresentados na tabela abaixo.

Tabela 10 - Recuperação de nitrito na amostra empregando o sistema FIA-r proposto

Amostras	$\text{NO}_2^- / 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$		Recuperação / %
	Adicionado	Encontrado	
	1,00	$0,93 \pm 0,03$	93,3
Água de rio	2,00	$2,66 \pm 0,07$	132
	4,00	$4,55 \pm 0,09$	114

$n=3$;

$\bar{x} \pm$ desvio-padrão;

$t_{\text{calculado}}=0,936$; $t_{\text{crítico}}=4,300$ (nível de confiança de 95%)

Um levantamento dos parâmetros de confiabilidade analítica para procedimentos descritos para a determinação de nitrito é apresentado na Tabela 11. Foram realizadas determinações em amostras ambientais, biológicas e alimentícias, utilizando metodologias e detectores variados.

Tabela 11 – Parâmetros de confiabilidade analítica obtidos na determinação de nitrito

Amostra	Método	Deteção	Linearidade / mol L ⁻¹	LD/ mol L ⁻¹	Recuperação / (%)	Ref.
Água potável	Fluorescência – bromação com PAPH	Espectrofluorimétrica	$> 6,52 \times 10^{-7b}$	$1,03 \times 10^{-7}$	92 a 105	22
Água mineral	Reação com cromóforo natural (flores <i>Macrotidium</i>)	Espectrofotométrica	$> 2,17 \times 10^{-5}$	ND ^a	100 a 104	23
Água de rio, tanque, chuva mineral e potável	HPLC – pós coluna fotoquímica	Quimiluminescente	$2,0 \times 10^{-9}$ a $2,5 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-9}$	99,7 a 101,3	24
Água de beber e residual	SIA multiparâmetro – Griess-Ilosvay	Espectrofotométrica	$2,17 \times 10^{-7}$ a $9,13 \times 10^{-6}$	$4,78 \times 10^{-8}$	92 a 107	25
Água residual e salsicha	FIA	Amperimétrico	$2,17 \times 10^{-6}$ a $2,17 \times 10^{-5}$ $4,35 \times 10^{-5}$ a $1,09 \times 10^{-4}$	$5,43 \times 10^{-7}$	ND	27
Produtos à base de carne e água	Refletância difusa	Espectrofotométrica	$6,3 \times 10^{-6}$ a $1,09 \times 10^{-4}$	$1,96 \times 10^{-6}$	89,3 a 106,0	28
Sangue de coelho, urina (humano, coelho e rato) e vegetais	HPLC – Griess	Espectrofotométrica	$1,30 \times 10^{-7}$ a $8,70 \times 10^{-6}$	ND	98,29 a 104,05	29
Águas (potável, poço e rio) Biológica (saliva)	HPLC	Espectrofotométrica	$8,70 \times 10^{-9}$ a $1,09 \times 10^{-5}$	$1,09 \times 10^{-9}$	96,5 a 107,3	30
Plasma humano	Griess	Espectrofotométrica	ND	ND	ND	31
Águas de beber	Fotólise do nitrato, Griess modificado	Espectrofluorimétrica	ND	ND	ND	32
Águas naturais	Batelada Ácido barbitúrico	Espectrofotométrica	0 a $7,0 \times 10^{-5}$	$3,61 \times 10^{-7}$	99,38 a 108,0	33

Água potável	Fluorimetria(acetoaminofenol)	Espectrofluorimétrica	$1,74 \times 10^{-6}$ a $2,83 \times 10^{-5}$	$5,87 \times 10^{-8}$	98,3 a 100,0	34
Água doce e do mar	HPLC – crom iônica	Espectrofotométrica	$4,35 \times 10^{-8}$ a $2,17 \times 10^{-7}$	$1,09 \times 10^{-8}$	ND	35
Água e fruta	Coluna Cd-Cu	Espectrofotométrica	$4,35 \times 10^{-8}$ a $8,70 \times 10^{-7}$	$3,04 \times 10^{-8}$	ND	41
Lago	r-PLC o-fosfato octilamônio	Espectrofotométrica	ND	ND	ND	66
Águas naturais	FIA (Coluna Cd-Cu)	Espectrofotométrica	0 a $2,17 \times 10^{-4}$	$2,17 \times 10^{-6}$	ND	67
Água residual	Sensor sem reagentes online	Espectrofotométrica	$1,09 \times 10^{-5}$ a $2,98 \times 10^{-4}$	-	89,0 a 108,1	68
Água naturais	FIA-r	Espectrofotométrica	$1,00 \times 10^{-6}$ a $5,00 \times 10^{-5}$	$2,15 \times 10^{-6}$	80,0 a 112,2	Proposto

^aND, Não divulgado;

^b método da indução;

PAPH:piridina-2-aldeído-2-piridilhidrazona; r-PLC: cromatografia em fase reversa.

Como pode ser verificada na Tabela 11, nas condições otimizadas o sistema de análise por injeção em fluxo proposto apresentou figuras de mérito comparáveis aos demais procedimentos descritos na literatura. A linearidade foi inferior apenas ao procedimento em batelada³³. Já o limite de detecção foi comparável aos procedimentos que empregam espectrofotômetro como detector, enquanto aqueles que utilizam a espectrofluorímetro apresentaram um limite de detecção muito menor, característica esta inerente à técnica de detecção.

4.1.1 Análise comparativa

A análise comparativa para a determinação de nitrito foi realizada empregando a metodologia em batelada, através do método de Griess-Ilosvay modificado^{26,54}, com algumas alterações.

Neste procedimento foi utilizada uma solução cromófora, de α -naftilamina, $1,74 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, sulfanilamida $1,48 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, dissolvidas em solução de ácido acético $1,74$ mol L⁻¹.

A curva analítica foi obtida entre as concentrações de $1,40 \times 10^{-6}$ e $1,40 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ obtendo-se as absorvâncias em 516 nm após 20 minutos de efetuada a adição de reagentes.

4.1.2 Análise de amostras

O sistema de análise por injeção em fluxo com fluxo reverso proposto foi empregado para a determinação de nitrito em amostra de água e o resultado obtido no presente trabalho foi comparado com o resultado empregando o procedimento comparativo com detecção espectrofotométrica. Aplicando-se o teste-t pareado para os resultados obtidos utilizando-se os dois procedimentos, verificou-se que não há diferença significativa entre os resultados encontrados a um nível de 95% de confiança. O erro de 21 % encontrado deve-se ao fato de que a análise da amostra foi realizada com os procedimentos em batelada e em fluxo em dias diferentes. Devido à instabilidade do nitrito que em solução, forma ácido nitroso, um composto volátil e portanto, as amostras devem ser analisadas em seguida a sua amostragem.

Os valores de recuperação encontrados no estudo da exatidão nos indicam que a matriz da amostra não interfere na obtenção do sinal analítico.

Tabela 12 – Determinação de nitrito em amostras de águas empregando o procedimento proposto

Amostra	[NO ₂ ⁻] / 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹		Er / %
	Procedimento Comparativo (n = 2)	Procedimento Proposto (n = 3)	
Água	2,99 ± 0,241	2,37 ± 0,453	21

Er: erro relativo; $t_{cal} = 0,184$; $t_{critico} = 12,70$.

5. CONCLUSÕES

Os procedimentos em fluxo propostos para determinações de amônio e nitrito podem ser empregados como procedimentos analíticos limpos, apresentam satisfatória sensibilidade, precisão, exatidão e evitam, ainda, o contato do analista com compostos tóxicos.

O sistema em fluxo utilizado para a determinação de amônio apresentou uma frequência analítica de 60 determinações por hora, enquanto que o sistema em fluxo reverso utilizado para a determinação de nitrito obteve frequência analítica de 45 determinações por hora.

A quantidade consumida de reagentes foi baixa, sendo 0,52 mg de NaOH para cada determinação de amônio e 0,62 mg de sulfanilamida e 1,01 mg de α -naftilamina para cada determinação de nitrito.

As metodologias em fluxo propostas para determinações de amônio e nitrito podem ser empregadas como procedimentos analíticos limpos, evitam, ainda, o contato do analista com compostos tóxicos. Para a determinação de amônio foi usado apenas NaOH como reagente, substituindo compostos fenólicos utilizados nas metodologias tradicionais, método de Berthelot ou compostos de mercúrio (reagente de Nessler). O nitrito foi determinado através da metodologia empregando reagente de Griess, utilizando fluxo reverso, no qual a amostra (água) em abundância é o carregador e os reagentes são injetados somente no momento de cada medida, sendo o seu consumo, minimizados. Para ambas a metodologias, o consumo de reagente foi baixo e a geração de resíduos minimizada.

O presente trabalho apresentou satisfatória sensibilidade, precisão, exatidão e limites de detecção de $2,3 \text{ mg L}^{-1}$ (amônio) e $9,89 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$ (nitrito), abaixo dos limites máximos estabelecidos pelo CONAMA, sendo uma metodologia adequada para a detecção de amônio e nitrito em águas superficiais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução à química ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2004.
- 2 MARTINS, C. R.; de PAULA PEREIRA, P. A.; LOPES, W. A.; DE ANDRADE, J. B. Ciclos globais de carbono, nitrogênio e enxofre. **Cadernos temáticos de Química Nova na Escola–Química, Vida e Ambiente**, 2003. p. 28–41.
- 3 AFKHAMI, A.; NOROOZ-ASL, R. Micelle-mediated extraction and spectrophotometric determination of ammonia in water samples utilizing indophenol dye formation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, jan. 2008. v. 19, n. 8, p. 1546–1552.
- 4 SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F. Perdas de nutrientes. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CO NTAG01_38_210200792814.html>. Acesso em: 30 out. 2012.
- 5 MESEGUER-LLORET, S.; MOLINS-LEGUA, C.; CAMPÍNS-FALCÓ, P. Selective determination of ammonium in water based on HPLC and chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta**, 22 abr. 2005. v. 536, n. 1–2, p. 121–127.
- 6 ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES & DISEASE REGISTRY. ToxFAQsTM: Ammonia. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tf.asp?id=10&tid=2>>. Acesso em: 6 nov. 2012.
- 7 INFANTE, C. M. C.; MASINI, J. C.; DOS SANTOS, A. C. V. Development of a spectrophotometric Sequential Injection Analysis (SIA) procedure for determination of ammonium: A Response Surface Methodology (RSM) approach. **Microchemical Journal**, maio. 2011. v. 98, n. 1, p. 97–102.
- 8 CONAMA. Resolução 357/2005, 17 mar. 2005. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2012.
- 9 US EPA, O. Aquatic Life Criteria - Ammonia. Policies & Guidance. Disponível em: <<http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/aqlife/ammonia/upload/99update.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2012.
- 10 MANA, H.; SPOHN, U. Rapid and selective determination of ammonium by fluorimetric flow injection analysis. PMID: 11227416: **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, abr. 2000. v. 366, n. 8, p. 825–829.
- 11 BORGES, S. DA S.; ACEVEDO, M. S. M. S. F.; KORN, M. Multicommutated flow system for ammonium and monochloramine determinations in wastewater and disinfection products. **Química Nova**, jan. 2009. v. 32, n. 5, p. 1175–1179.
- 12 SUN, Z.; SU, Y.; LU, Q. Determination of the sodium, ammonium, potassium, magnesium, calcium in the acid rain by ion chromatography. **Arid Environmental Monitoring**, 2012. v. 1, p. 004.

- 13 LUCY, C. A.; HARRISON, C. R. Chemiluminescence nitrogen detection in ion chromatography for the determination of nitrogen-containing anions. **Journal of Chromatography A**, 22 jun. 2001. v. 920, n. 1–2, p. 135–141.
- 14 ROCHA, J. C.; GRANER, C. A. F.; MAGNANI, R. Determinação espectrofotométrica de amônio em extratos de carne, com salicilato e hipoclorito, sem prévia neutralização dos digeridos sulfúricos. **Química Nova**, 1989. v. 12, p. 309–312.
- 15 VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa**. 5a.ed. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan, 1992. v. 2.
- 16 JUNSOMBOON, J.; JAKMUNEE, J. Flow injection conductometric system with gas diffusion separation for the determination of Kjeldahl nitrogen in milk and chicken meat. **Analytica Chimica Acta**, 10 out. 2008. v. 627, n. 2, p. 232–238.
- 17 KRUG, F. J.; RŮŽIČKA, J.; HANSEN, E. H. Determination of ammonia in low concentrations with Nessler's reagent by flow injection analysis. **Analyst**, 1 jan. 1979. v. 104, n. 1234, p. 47–54.
- 18 ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, J. A.; FATIBELLO FILHO, O. Flow analysis strategies to greener analytical chemistry. An overview. **Green Chemistry**, 5 set. 2001. p. 216–220.
- 19 BERTHELOT, M. **Violeted'aniline**. Société Chimique de Paris. Disponível em: <<http://archive.org/details/rpertoiredechim07parigoog>>. Acesso em: 13 nov. 2012.
- 20 PATTON, C. J.; CROUCH, S. R. Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, 1 mar. 1977. v. 49, n. 3, p. 464–469.
- 21 BOLLETER, W. T.; BUSHMAN, C. J.; TIDWELL, P. W. Spectrophotometric determination of ammonia as indophenol. **Analytical Chemistry**, 1961. v. 33, n. 4, p. 592–594.
- 22 MONTES, R.; LASERNA, J. J. Kinetic determination of nitrite in drinking water by fluorometry. **Analytical Sciences**, 1991. v. 7. Disponível em: <<http://pdf.lookchem.com/pdf/22/025ca964-7292-4447-a3d5-be49b464a67d.pdf>>. Acesso em: 6 fev. 2013.
- 23 RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, 2006. v. 29, n. 5, p. 1114.
- 24 KODAMATANI, H. ; YAMAZAKI, S.; SAITO, K.; TOMIYASU, T.; KOMATSU, Y. Selective determination method for measurement of nitrite and nitrate in water samples using high-performance liquid chromatography with post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, 10 abr. 2009. v. 1216, n. 15, p. 3163–3167.
- 25 AYALA, A.; LEAL, L. O.; FERRER, L.; CERDÀ, V. Multiparametric automated system for sulfate, nitrite and nitrate monitoring in drinking water and wastewater based on sequential injection analysis. **Microchemical Journal**, jan. 2012. v. 100, n. 0, p. 55–60.

- 26 BRUM, M. A. R.; TERRA, N. N. **Carne e seus derivados: tecnologia de controle de qualidade**. NBL Editora, 1988. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=nesuPwOwuz4C>>. Acesso em: 20 dez. 2012.
- 27 GIL TORRÓ, I.; GARCÍA MATEO, J. V.; CALATAYUD, J. M. Flow-injection biamperometric determination of nitrate (by photoreduction) and nitrite with the NO_2^-/I^- reaction. **Analytica Chimica Acta**, 1998. v. 366, n. 1, p. 241–249. Acesso em: 12 fev. 2013.
- 28 LUIZ, V. H. M.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determination of nitrite in meat products and water using dapsone with combined spot test/diffuse reflectance on filter paper. **Food Chemistry**, 15 out. 2012. v. 134, n. 4, p. 2546–2551.
- 29 CROITORU, M. D. Nitrite and nitrate can be accurately measured in samples of vegetal and animal origin using an HPLC-UV/VIS technique. **Journal of Chromatography B**, 12 dez. 2012. v. 911, n. 0, p. 154–161.
- 30 HE, L., L.; ZHANG, K.; WANG, C.; LUO, X.; ZHANG, S. Effective indirect enrichment and determination of nitrite ion in water and biological samples using ionic liquid-dispersive liquid–liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 10 jun. 2011. v. 1218, n. 23, p. 3595–3600.
- 31 YUCEL, A.; GULEN, S.; DINCER, S.; YUCEL, A.; YETKIN, G. COMPARISON OF TWO DIFFERENT applications of the Griess method for nitric oxide measurement. **Journal of Experimental and Integrative Medicine**, 2012.p. 1.
- 32 GOLDSTEIN, S.; RABANI, J. Mechanism of nitrite formation by nitrate photolysis in aqueous solutions: The role of peroxyxynitrite, nitrogen dioxide, and hydroxyl radical. **Journal of the American Chemical Society**, 2007. v. 129, n. 34, p. 10597–10601.
- 33 AYDIN, A.; ERCAN, Ö.; TAŞCIOĞLU, S. A novel method for the spectrophotometric determination of nitrite in water. **Talanta**, 15 jun. 2005. v. 66, n. 5, p. 1181–1186.
- 34 HELALEH, M. I. .; KORENAGA, T. Fluorometric determination of nitrite with acetaminophen. **Microchemical Journal**, 15 maio. 2000. v. 64, n. 3, p. 241–246.
- 35 SALHI, E.; GUNTEN, U. VON. Simultaneous determination of bromide, bromate and nitrite in low $\mu\text{g L}^{-1}$ levels by ion chromatography without sample pretreatment. **Water Research**, out. 1999. v. 33, n. 15, p. 3239–3244.
- 36 VAN DERLINDEN, W. E. Classification and definition of analytical methods based on flowing media (IUPAC Recommendations 1994). **Pure and Applied Chemistry**, 1994. v. 66, n. 12, p. 2493–2500.
- 37 ZAGATTO, ELIAS A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. H. Classification and definition of analytical methods based on flowing media. **Quimica Nova**, fev. 1999. v. 22, n. 1, p. 143–146.
- 38 MELCHERT, W. R.; REIS, BOAVENTURA F.; ROCHA, F. R. P. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. **Analytica Chimica Acta**, 10 fev. 2012. v. 714, p. 8–19.

- 39 RŮŽIČKA, J.; STEWART, J. W. B.; ZAGATTO, E. A. Flow injection analysis: Part IV. Stream sample splitting and its application to the continuous spectrophotometric determination of chloride in brackish waters. **Analytica Chimica Acta**, fev. 1976. v. 81, n. 2, p. 387–396.
- 40 SKEGGS JR, L. T. Persistence ... and Prayer: From the Artificial Kidney to the AutoAnalyzer. **Clinical Chemistry**, 9 jan. 2000. v. 46, n. 9, p. 1425–1436.
- 41 WANG, Y.; CHEN, S.; WANG, J. Determination of ammonium nitrogen in medical organization sewage by on-line dialysis with ion chromatography. **Journal of Environmental & Occupational Medicine**, 2012. v. 1, p. 010.
- 42 CHEREGI, M.; DANET, A. F. Flow Injection Determination of Chloride Ions with Spectrophotometric Detection. **Analytical Letters**, 1997. v. 30, n. 15, p. 2847–2858.
- 43 OLIVEIRA, A. F.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection spectrophotometric determination of reducing sugars using a focalized coiled reactor in a domestic microwave oven. **Talanta**, 15 nov. 1999. v. 50, n. 4, p. 899–904.
- 44 SMALL, H.; STEVENS, T. S.; BAUMAN, W. C. Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection. **Analytical Chemistry**, 1 set. 1975. v. 47, n. 11, p. 1801–1809.
- 45 LI, J.; DASGUPTA, P. K. Chemiluminescence detection with a liquid core waveguide: Determination of ammonium with electrogenerated hypochlorite based on the luminol-hypochlorite reaction. **Analytica Chimica Acta**, 11 out. 1999. v. 398, n. 1, p. 33–39.
- 46 JOHNSON, K. S.; PETTY, R. L. Determination of phosphate in seawater by flow injection analysis with injection of reagent. **Analytical Chemistry**, 1 jun. 1982. v. 54, n. 7, p. 1185–1187.
- 47 VIEIRA, H. J. **Desenvolvimento de procedimentos de análise por injeção em fluxo para a determinação de furosemida, paracetamol e acetilcisteína em formulações farmacêuticas**. São Carlos - SP: Universidade Federal de São Carlos, 2006.
- 48 MANSOUR, F. R.; DANIELSON, N. D. Reverse flow-injection analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, nov. 2012. v. 40, n. 0, p. 1–14.
- 49 MORI, M. HIRONAGA, T.; KAJIWARA, H.; NAKATANI, N.; KOZAKI, D.; ITABASHI, H.; TANAKA, K. Use of a Polystyrene-divinylbenzene-based Weakly Acidic Cation-Exchange Resin Column and Propionic Acid as an Eluent in Ion-Exclusion/Adsorption Chromatography of Aliphatic Carboxylic Acids and Ethanol in Food Samples. **Analytical Sciences**, 2011. v. 27, n. 5, p. 505–505.
- 50 LIU, Y.; DU, Q.; YANG, B.; ZHANG, F.; CHU, C.; LIANG, X. Silica based click amino stationary phase for ion chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography. **Analyst**, 2012. v. 137, n. 7, p. 1624.
- 51 MUNIRAJ, S.; YAN, C.-T.; SHIH, H.-K.; PONNUSAMY, V. K.; JEN, J.-F. Determination of ammonium in aqueous samples using new headspace dynamic in-syringe liquid-phase microextraction with in situ derivitization coupled with liquid

- chromatography–fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, 19 nov. 2012. v. 754, n. 0, p. 54–60.
- 52 MOSCHOU, E. A.; AZPIROZ LASARTE, U.; FOUSKAKI, M.; CHANIOTAKIS, N. A.; PAPANDROULAKIS, N.; DIVANACH, P. Direct electrochemical flow analysis system for simultaneous monitoring of total ammonia and nitrite in seawater. **Aquacultural Engineering**, 2000. v. 22, n. 4, p. 255–268.
- 53 BERGAMIN F^o, H.; ZAGATTO, E. A. G.; KRUG, F. J.; REIS, B. F. Merging zones in flow injection analysis: Part 1. Double proportional injector and reagent consumption. **Analytica Chimica Acta**, 1 out. 1978. v. 101, n. 1, p. 17–23.
- 54 MANTOVANI, J. R.; CRUZ, M. DA; FERREIRA, M. E.; BARBOSA, J. C. Comparação de procedimentos de quantificação de nitrato em tecido vegetal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2005. v. 40, n. 1, p. 53–59.
- 55 PASQUINI, C.; FARIA, L. C. DE. Flow-injection determination of ammonia in kjeldahl digests by gas diffusion and conductometry. **Analytica Chimica Acta**, 1987. v. 193, n. 0, p. 19–27.
- 56 BRASIL, M. S. ANVISA (2003) Resolução nº 899 de 29/05/2003, DOU de 02/06/2003. **Guia paravalidação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 1 mar. 2013.
- 57 AUSTRALIAN PESTICIDES & VETERINARY MEDICINES AUTHORITY. Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products. Disponível em: <http://cache-au.funnelback.com/search/cache.cgi?collection=fed-gov&doc=funnelback-web-crawl.warc&off=1097699723046&len=8156&url=http%3A%2F%2Fwww.apvma.gov.au%2Fpublications%2Fguidelines%2Fdocs%2Fgl_69_analytical_methods.pdf>. Acesso em: 7 dez. 2012.
- 58 ALMEIDA, M. I. G. S.; ESTELA, J. M.; SEGUNDO, M. A.; CERDÀ, V. A membraneless gas-diffusion unit – multisyringe flow injection spectrophotometric method for ammonium determination in untreated environmental samples. **Talanta**, 15 jun. 2011. v. 84, n. 5, p. 1244–1252.
- 59 FUKUSHI, K.; ITO, H.; KIMURA, K.; YOKOTA, K.; SAITO, K.; CHAYAMA, K.; TAKEDA, S.; WAKIDA, S. Determination of ammonium in river water and sewage samples by capillary zone electrophoresis with direct UV detection. **Journal of Chromatography A**, 17 fev. 2006. v. 1106, n. 1–2, p. 61–66.
- 60 FERNANDES, R. N.; REIS, BOAVENTURA F. Flow system exploiting multicommutation to increase sample residence time for improved sensitivity. Simultaneous determination of ammonium and ortho-phosphate in natural water. **Talanta**, 16 out. 2002. v. 58, n. 4, p. 729–737.
- 61 ROCHA, F. R. P.; REIS, BOAVENTURA F. A flow system exploiting multicommutation for speciation of inorganic nitrogen in waters. **Analytica Chimica Acta**, 23 mar. 2000. v. 409, n. 1–2, p. 227–235.

- 62 AZZARO, F.; GALLETTA, M. Automatic colorimetric analyzer prototype for high frequency measurement of nutrients in seawater. **Marine chemistry**, 2006. v. 99, n. 1-4, p. 191–198. Acesso em: 10 set. 2012.
- 63 CARNEIRO, J. M. T.; ZAGATTO, E. A. G.; MATTOS, I. L.; MELO, D. Determinação indireta de N-total em plantas por espectrometria de absorção atômica com chama empregando uma mini-coluna de AgCl(s). **Scientia Agricola**, 2001. v. 58, n. 1, p. 151–155.
- 64 COUTINHO, C. F. B.; MUXEL, A. A.; ROCHA, C. G.; DE JESUS, D. A.; ALFAYA, R. V. S.; ALMEIDA, F. A. S.; GUSHIKEM, Y.; ALFAYA, A. A. S. Ammonium ion sensor based on SiO₂/ZrO₂/phosphate-NH₄⁺ composite for quantification of ammonium ions in Natural Waters. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2007. v. 18, n. 1, p. 189–194.
- 65 RUŽICKA, J.; HANSEN, ELO HARALD. **Flow Injection Analysis**. Wiley, 1988. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=K2QQM1Krl6QC>>. Acesso em: 25 fev. 2013.
- 66 GENNARO, M. C.; BERTOLO, P. L.; CORDERO, A. Determination of nitrite and nitrate in Venice lagoon water by ion interaction reversed-phase liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, 1990. v. 239, n. 0, p. 203–209.
- 67 KOJŁO, A.; GORODKIEWICZ, E. Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in a flow-injection system. **Analytica Chimica Acta**, 20 fev. 1995. v. 302, n. 2–3, p. 283–287.
- 68 DROLC, A.; VRTOVŠEK, J. Nitrate and nitrite nitrogen determination in waste water using on-line UV spectrometric method. **Bioresource Technology**, jun. 2010. v. 101, n. 11, p. 4228–4233.