



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

GEOVANI CARDOSO BRANDÃO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE
ESPÉCIES INORGÂNICAS DE NITROGÊNIO EM ÁGUAS NATURAIS
POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR EM FASE
GASOSA COM FONTE CONTÍNUA DE ALTA RESOLUÇÃO**

Salvador
Março de 2013

GEOVANI CARDOSO BRANDÃO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE
ESPÉCIES INORGÂNICAS DE NITROGÊNIO EM ÁGUAS NATURAIS
POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR EM FASE
GASOSA COM FONTE CONTÍNUA DE ALTA RESOLUÇÃO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira

Salvador

Março de 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho durante esta jornada.

Aos meus pais, Washington e Vicencia, por toda a dedicação e educação que me deram.

Ao Prof. Sérgio Luis da Costa Ferreira pela confiança, amizade, paciência e por todos os ensinamentos e valorosa orientação.

Ao meu amigo Geraldo Matos pelos momentos de descontração, ensinamentos e valiosa colaboração para o desenvolvimento do primeiro trabalho desta Tese.

Ao meu amigo Daniel Lima pelos momentos de descontração e fundamental contribuição para o desenvolvimento do segundo trabalho desta Tese.

Ao meu amigo Tiago Barbosa pelos momentos de descontração e auxílio no desenvolvimento do terceiro trabalho desta Tese.

Aos meus amigos Gabriel e Jorginho pela amizade, companheirismo e ótimos momentos de descontração.

Aos Profs. Anderson Sousa e Fábio Amorim pela amizade e ensinamentos durante a iniciação científica.

Aos companheiros de grupo (GRPQQ): Laiana, Fernanda, Arlene, Robson, Danilo, Mário, Douglas, Jeane, Débora, Adriana, Daniela, Prof. Walter, Profa. Neyla, Profa. Ana, Raineldes, Augusto, Gabriele, Alexandre, Kléber, e, em especial, a Uenderson e Ivanice pelas amostras de água coletadas na cidade de Cachoeira.

Aos ex-companheiros de grupo: Lindomar, Samuel, Cléber, João, Rogete, Dalita, Lidiane, Raildo, Valdinei, Erik, Renan, Marcos, Pedro, Domingos, Elecy, Hadla, Sarah, Giovani, Marcelo, Ana Carolina, André, Márcio, Vitor e Ed.

À Profa. Maria das Graças Korn pela amizade e valiosos ensinamentos.

Às companheiras do grupo GPQA: Geysa, Fernanda, Milena, Larissa, Flávia, Taís e Chris.

Ao Raimundo Nouta pelas amostras cedidas de água subterrânea.

Aos funcionários Cristóvão, Charlize, Wilson, Conceição, Margarida e Roque.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante o curso de Doutorado.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

RESUMO

No presente trabalho foram desenvolvidos métodos analíticos baseados na geração de óxido nítrico (NO) e detecção por espectrometria de absorção molecular com fonte contínua de alta resolução (HR-CS MAS) para a determinação de nitrito, nitrato e amônio. No primeiro método, foi desenvolvido um procedimento para a determinação de nitrito e nitrato em forno de grafite, o qual foi baseado na diferença de estabilidade térmica das espécies em meio ácido. Foi observado que nitrito pode ser eliminado durante a etapa de pirólise com a co-injeção de 5 μL de HCl 0,35% (v/v), permitindo a determinação de nitrato. A determinação total foi possível após a oxidação de nitrito a nitrato com H_2O_2 0,75% (v/v), sendo nitrito obtido por diferença. Um limite de quantificação de 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrogênio foi obtido sob estas condições. O método foi aplicado para a análise de dez amostras de água subterrânea. Concentrações de N-nitrato variaram na faixa de 0,58-15,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que as concentrações de N-nitrito ficaram abaixo do limite de quantificação. Estes resultados foram concordantes com aqueles obtidos por cromatografia de íons. No segundo método, nitrito foi determinado após a sua redução à NO por ácido ascórbico 1,5% (m/v) em HCl 0,4 mol L^{-1} . O gás NO foi separado da fase líquida e transportado por um fluxo de gás argônio para uma célula de quartzo posicionada no caminho óptico do espectrômetro. Limite de quantificação de 0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi obtido para nitrito e o método aplicado para a análise de água de poço, água de rio e água potável. Um método espectrofotométrico empregando a reação de Griess também foi aplicado para a análise das amostras de água. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os resultados obtidos por ambos os métodos. No terceiro método, foi proposto um procedimento para a determinação de nitrito e amônio a partir da geração química de NO, mediante a redução do nitrito. Para isso, o íon amônio foi oxidado a nitrito sob as seguintes condições experimentais estabelecidas: NaClO 0,0015 mol L^{-1} , KBr 0,06% (m/v), NaOH 0,02 mol L^{-1} e tempo de reação de 20 min. Limites de quantificação foram de 0,030 e 0,060 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para N-nitrito e N-amônio, respectivamente.

Palavras-chave: absorção molecular de NO, HR-CS MAS, nitrito, nitrato e amônio.

ABSTRACT

In this work were developed analytical methods based on the generation of nitric oxide (NO) and detection by high-resolution continuous source molecular absorption spectrometry (HR-CS MAS) for the determination of nitrite, nitrate and ammonium. In the first method, a procedure was developed for the determination of nitrate and nitrite in graphite furnace which was based on the difference of thermal stability of the species in acidic media. It was observed that nitrite can be eliminated during pyrolysis step with co-injection of 5 μL of 0.35% (v/v) HCl, allowing the determination of nitrate. The total determination was possible after complete oxidation of nitrite to nitrate with 0.75% (v/v) H_2O_2 , being nitrite determined by difference. A limit of quantitation of 0.33 mg mL^{-1} of nitrogen was obtained under these conditions. The method was applied to the analysis of ten groundwater samples. Nitrate-N concentrations were in the range of 0.58-15.2 mg mL^{-1} , whereas the nitrite-N concentrations were below of the limit of quantification. These results were in agreement with those obtained by ion chromatography. In the second method, nitrite was determined after reduction to NO by 1.5% (w/v) ascorbic acid in 0.4 mol L^{-1} HCl. The NO gas was separated from the liquid phase and transported by a flow of argon to a quartz cell positioned in the optical path of the spectrometer. Limit of quantification of 0.15 mg mL^{-1} was obtained for nitrite and the method applied to the analysis of well water, river water and drinking water. A spectrophotometric method using the Griess reaction was also applied to the analysis of water samples. No significant difference was observed between the results obtained by both methods. In the third method it was proposed a procedure for the determination of nitrite and ammonia based on the chemical generation of NO by the reduction of nitrite. For this, the ammonium ion was oxidized to nitrite under the following experimental conditions established: 0.0015 mol L^{-1} NaClO, 0.06% (w/v) KBr, 0.02 mol L^{-1} NaOH and reaction time of 20 min. Limits of quantification were of 0.030 and 0.060 mg mL^{-1} for nitrite-N and N-ammonium, respectively.

Keywords: NO molecular absorption, HR-CS MAS, nitrite, nitrate and ammonium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático para determinação de nitrito e nitrato em fase gasosa.....	23
Figura 2. Diagrama esquemático para a reação de Griess.	25
Figura 3. Esquema das etapas da reação de Berthelot.....	37
Figura 4. Esquema da reação envolvida no método modificado de Roth.....	40
Figura 5. Espectrômetro com fonte contínua de alta resolução usado para as medidas de absorção molecular de NO.	48
Figura 6. Diagrama esquemático do procedimento proposto para a determinação de nitrito e nitrato por HR-CS ET MAS.....	50
Figura 7. Efeito das temperaturas de pirólise e vaporização sobre o sinal analítico de NO para uma solução de nitrato contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de N e Ca como modificador..	52
Figura 8. Efeito da concentração de HCl sobre o sinal analítico de absorção molecular de NO de soluções de nitrito e nitrato contendo $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de N, em forno de grafite.	53
Figura 9. Estudo da concentração de H_2O_2 usado para a oxidação de nitrito a nitrato em soluções contendo $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de N, como nitrito, e medida realizada por absorção molecular de NO, em forno de grafite.....	54
Figura 10. Curvas de calibração obtidas para diferentes sistemas.	56
Figura 11. Sistema HS 50, acoplado ao HR-CS AAS, usado para a geração química de NO a partir da redução de nitrito.	60
Figura 12. Diagrama esquemático do procedimento proposto para a determinação de nitrito a partir da geração química de NO.....	62
Figura 13. Estudo do tipo e concentração de redutor na geração química de NO. ...	63
Figura 14. Estudo da concentração de HCl para a geração química de NO.	64
Figura 15. Efeito da pressão do gás de transporte sobre o sinal analítico de NO gerado a partir da redução de nitrito.	64
Figura 16. Influência da pressão do gás de transporte sobre o perfil do sinal analítico de NO gerado a partir da redução de nitrito: (a) 0,03, (b) 0,06 (c) 0,09, (d) 0,12 e (e) 0,15 MPa.....	65
Figura 17. Influência do tempo de injeção de ácido ascórbico sobre a geração química de NO a partir da redução de nitrito.....	66

Figura 18. Estudo da distribuição das espécies de nitrito a partir da medida do sinal analítico de NO como função do pH do meio.	67
Figura 19. Estudo de potenciais interferentes na geração química de NO a partir da redução de nitrito.....	68
Figura 20. Espectros de absorção molecular obtidos durante o estudo de interferentes: (a) espectro obtido ao redor da linha de NO em 215,360 nm e (b) interferência espectral de SO ₂ na linha de NO em 215,360 nm.	68
Figura 21. Efeito da salinidade sobre o sinal analítico de NO.	69
Figura 22. Curva de calibração obtida para nitrito usando o método proposto.....	70
Figura 23. Diagrama esquemático do procedimento proposto para determinação de nitrito e amônio a partir da geração química de NO.	75
Figura 24. Gráfico de Pareto obtido para o planejamento fatorial aplicado para a reação de oxidação do íon amônio a nitrito.....	77
Figura 25. Estudo do tempo de reação de oxidação do íon amônio a nitrito.	78
Figura 26. Gráfico de Pareto obtido para o planejamento fatorial aplicado no estudo da geração química de NO.....	79
Figura 27. Estudo do tempo de injeção da solução redutora para geração química de NO.....	79
Figura 28. Efeito da salinidade sobre o sinal analítico de NO para nitrito.	81
Figura 29. Efeito da salinidade sobre o sinal analítico de NO para amônio.	81
Figura 30. Espectros de absorção molecular de NO obtidos para uma solução contendo 1,0 µg mL ⁻¹ de N-nitrito: (a) linha 214,803 nm e (b) linha 215,360 nm.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limites máximos estipulados para nitrito e nitrato em águas por agências nacionais e internacionais.	20
Tabela 2. Limites máximos estipulados para amônio e nitrogênio amoniacal total em águas.	20
Tabela 3. Limites máximos estipulados para nitrito e nitrato adicionados em produtos cárneos por diferentes agências nacionais e internacionais.	21
Tabela 4. Métodos baseados na absorção molecular em chama empregando espectrômetros com fonte contínua de alta resolução.	45
Tabela 5. Métodos baseados na absorção molecular em forno de grafite empregando espectrômetro com fonte contínua de alta resolução.	46
Tabela 6. Programa de aquecimento do forno usado no método proposto.	51
Tabela 7. Inclinações das curvas e coeficientes de correlação.	56
Tabela 8. Resultados da determinação de nitrito e nitrato em água subterrânea por HR-CS ET MAS e por cromatografia de íons.	58
Tabela 9. Comparação do método proposto com outros métodos reportados na literatura.	71
Tabela 10. Determinação de nitrito em amostras de água coletadas na cidade de Cachoeira, Bahia, pelo método proposto e por espectrofotometria usando a reação de Griess ($n = 3$, nível de confiança de 95%).	72
Tabela 11. Matriz do planejamento fatorial 2^3 aplicado para a avaliação dos fatores químicos envolvidos na reação de oxidação de amônio a nitrito. Valores codificados entre parênteses.	76
Tabela 12. Matriz do planejamento fatorial 2^3 aplicado para avaliação dos fatores envolvidos na geração química de NO. Valores codificados entre parênteses.	78
Tabela 13. Curvas de calibração obtidas para nitrito e amônio pelo método proposto.	80
Tabela 14. Inclinações das curvas analíticas para nitrito na ausência e na presença dos reagentes usados para a oxidação do íon amônio.	80
Tabela 15. Inclinações das curvas, limites de detecção e quantificação para o método proposto usando as linhas de NO em 214,803 e 215,360 nm para a medida de absorção molecular.	82

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica (<i>Atomic absorption spectrometry</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CRM	Material de referência certificado (<i>Certified reference material</i>)
DANDS	Ácido 5,6-diamino-1,3-naftaleno dissulfônico (<i>5,6-diamino-1,3-naphthalene disulfonic acid</i>)
EPA	Agência de Proteção Ambiental (<i>Environmental Protection Agency</i>)
EPR	Espectrometria de ressonância paramagnética de elétron (<i>Electron paramagnetic resonance spectrometry</i>)
ET AAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (<i>Electrothermal atomic absorption spectrometry</i>)
EU	União Européia (<i>European Union</i>)
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama (<i>Flame atomic absorption spectrometry</i>)
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FIA	Análise por injeção em fluxo (<i>Flow injection analysis</i>)
GP MAS	Espectrometria de absorção molecular em fase gasosa (<i>Gas phase molecular absorption spectrometry</i>)
HR-CS MAS	Espectrometria de absorção molecular de fonte contínua e alta resolução (<i>High-resolution continuum source molecular absorption spectrometry</i>)
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (<i>Inductivel coupled plasma optical emission spectrometry</i>)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LD	Limite de detecção
LED	Diodo emissor de luz (<i>Light emitting diode</i>)
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MECA	Análise de emissão molecular em cavidade (<i>Molecular emission cavity analysis</i>)
MIBK	Metilisobutilcetona (<i>Methyl isobutyl ketone</i>)
MS	Ministério da Saúde
N-amônio	Nitrogênio sob a forma de amônio
N-nitrato	Nitrogênio sob a forma de nitrato
N-nitrito	Nitrogênio sob a forma de nitrito
NBS	N-bromosuccinimida (<i>N-bromosuccinimide</i>)
NED	Dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina (<i>Naphthylethylenediamine dihydrochloride</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPA	o-Ftaldialdeído (<i>o-phthaldialdehyde</i>)
PTFE	Politetrafluoretileno (<i>Polytetrafluorethylene</i>)
RSD	Desvio padrão relativo (<i>Relative standard deviation</i>)
SIA	Análise por injeção seqüencial (<i>Sequential injection analysis</i>)
TCPO	Bis(2,4,6 triclorofenil) oxalato (<i>Bis(2,4,6 trichlorophenyl) oxalate</i>)
UV/Vis	Ultravioleta/Visível

SUMÁRIO

PARTE I: FUNDAMENTOS TEÓRICOS	14
CAPÍTULO I: NITRITO, NITRATO E AMÔNIO.....	14
INTRODUÇÃO	14
Efeitos tóxicos de nitrito, nitrato e amônio.....	16
Ambientes aquáticos.....	16
Saúde humana	17
Legislação.....	19
CAPÍTULO II: TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS USADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE NITRITO, NITRATO E AMÔNIO	22
NITRITO E NITRATO.....	22
Aspectos gerais	22
Espectrofotometria no UV/Vis	24
Quimiluminescência.....	29
Espectrofluorimetria molecular	30
Espectrometria de absorção atômica	31
Métodos indiretos	32
Métodos baseados na absorção molecular	34
Outras técnicas espectrométricas	35
AMÔNIO.....	36
Espectrofotometria de absorção molecular no UV/Vis	36
Quimiluminescência.....	39
Espectrofluorimetria molecular.....	40
Outras técnicas espectrométricas	41
CAPÍTULO III: ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR COM FONTE CONTÍNUA DE ALTA RESOLUÇÃO	43
OBJETIVOS.....	47
OBJETIVO GERAL	47
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
PARTE II: TRABALHO EXPERIMENTAL DESENVOLVIDO.....	48
CAPÍTULO I: DETERMINAÇÃO DE NITRITO E NITRATO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR COM FONTE CONTÍNUA DE ALTA RESOLUÇÃO USANDO VAPORIZAÇÃO ELETROTÉRMICA	48

1.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	48
1.1.1. Instrumentação.....	48
1.1.2. Preparo de soluções padrões, reagentes e amostras	49
1.1.4. Procedimento para determinação de nitrito e nitrato por HR-CS ET MAS	50
1.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
1.2.1. Otimização das condições eletrotérmicas.....	52
1.2.2. Otimização das condições químicas.....	53
1.2.3. Estudo de interferência	54
1.2.4. Características analíticas do método	55
1.2.5. Aplicação do método proposto.....	57
1.3. CONCLUSÕES	59
CAPÍTULO II: GERAÇÃO QUÍMICA DE NO PARA A DETERMINAÇÃO DE NITRITO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR COM FONTE CONTÍNUA DE ALTA RESOLUÇÃO	60
2.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	60
2.1.1. Instrumentação.....	60
2.1.2. Reagentes, padrões e amostras	61
2.1.3. Procedimento para otimização do método proposto.....	61
2.1.5. Procedimento para determinação de nitrito pelo método proposto..	62
2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
2.2.1. Estudo das condições para geração química de NO	63
2.2.2. Estudos complementares.....	66
2.2.2.1. Conversão de NO_2^- a HNO_2	66
2.2.2.2. Estudo de interferentes	67
2.2.3. Características analíticas do método	69
2.2.4. Aplicação do método proposto.....	72
2.3. CONCLUSÕES	73
CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO BASEADO NA GERAÇÃO QUÍMICA DE NO PARA A DETERMINAÇÃO DE NITRITO E AMÔNIO POR HR-CR MAS	74
3.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	74
3.1.1. Instrumentação.....	74
3.1.2. Reagentes e padrões	74

3.1.3 Otimização das condições experimentais	74
3.1.4. Procedimento para determinação de nitrito e amônio por HR-CS MAS	75
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.2.1. Estudo das condições para oxidação de amônio a nitrito	76
3.2.2. Estudo das condições para geração química de NO	78
2.2.2. Estudos complementares.....	80
2.2.2.1. Conversão de amônio a nitrito.....	80
2.2.2.2. Estudo da oxidação de nitrito a nitrato	80
2.2.2.3. Efeito da salinidade.....	81
2.2.3. Características analíticas do método	82
2.3. CONCLUSÕES	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
REFERÊNCIAS.....	85

PARTE I: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO I: NITRITO, NITRATO E AMÔNIO

INTRODUÇÃO

Nitrito, nitrato e amônio são importantes espécies inorgânicas de nitrogênio que podem causar uma série de efeitos adversos em sistemas ambientais e também para a saúde humana. Ambas as espécies podem ser encontradas naturalmente no meio ambiente, em solos, atmosfera, vegetais, águas naturais e sistemas fisiológicos, sendo importantes constituintes do ciclo do nitrogênio [1-3].

Bactérias nitrificantes (*Nitrosomonas* e *Nitrobacter*) presentes em alguns solos realizam a oxidação da amônia a nitrito e nitrato, enquanto que bactérias desnitrificantes (*Pseudomonas* e *Achromobacter*) realizam a conversão de nitratos nos gases nitrogênio e amônia. A presença natural destas espécies em solos ocorre também pela decomposição de matéria orgânica [2,4].

Em ecossistemas aquáticos, estes íons estão naturalmente presentes como resultado de processos de precipitação de chuvas, dissolução de depósitos geológicos e também através do processo de degradação da matéria orgânica [4]. Na atmosfera, nitrito e nitrato se fazem naturalmente presentes principalmente por meio da formação de óxidos de nitrogênio (óxido nítrico e dióxido de nitrogênio), em pequenas quantidades, através da ação de relâmpagos e processos fotoquímicos pela ação da radiação UV na atmosfera superior [2].

Em vegetais, nitrato é um constituinte natural e pode ser encontrado em elevados níveis, pois esta espécie é um nutriente essencial para o desenvolvimento das plantas, como fonte de nitrogênio [3,5,6]. Exemplos de vegetais da dieta humana que apresentam altas concentrações deste íon são: espinafre, beterraba, rabanete, berinjela, aipo, alface, couve e nabo. Os principais fatores que podem favorecer o acúmulo de nitrato nos vegetais são: nível de concentração de nitrato no solo, ou de sua fertilização; propensão da planta em acumular nitrato; deficiência de certos nutrientes, como molibdênio; e condições de baixa disponibilidade de água e luz [6,7].

Nitrito e nitrato estão naturalmente presentes também em sistemas fisiológicos de humanos. Estas espécies configuram como os principais produtos da oxidação do

óxido nítrico (NO) no organismo humano. Estudos têm demonstrado que o óxido nítrico está envolvido em diversos processos fisiológicos, tais como: regulação do tônus vascular, neurotransmissão, processos inflamatórios, inibição da agregação de plaquetas e também em processos do sistema imunológico [1]. A medida de nitrito e nitrato pode ser então uma forma de se monitorar a ação do óxido nítrico no organismo humano [8]. Sendo assim, algumas pesquisas têm obtido informações importantes a cerca de determinadas enfermidades, como meningites [9], doenças de Parkinson e Alzheimer [10], a partir dos níveis de nitrito e nitrato.

Nitrito, nitrato e amônio configuram também como importantes espécies para diversos processos industriais. Sais de nitrato e amônio são bastante empregados na fabricação de fogos de artifícios, explosivos e, principalmente, na fabricação de fertilizantes [1-3]. Por apresentarem características antimicrobianas, nitrito e nitrato têm sido também empregados como aditivos pela indústria alimentícia para a conservação de produtos cárneos. São frequentemente adicionados sob a forma de sais de sódio ou potássio com o objetivo de inibir o crescimento de esporos da bactéria *Clostridium botulinum*, a qual é responsável por intoxicações alimentares. Além disso, o processo de adição destes íons se deve em parte também para conferir cor e sabor característicos a estes alimentos [1-3,6]. Em ambas as situações, nitrito é o agente responsável tanto pela ação antimicrobiana, como também pela formação de cor e sabor, seja diretamente adicionado, ou indiretamente pela redução do nitrato adicionado [2,6].

Nos últimos dois séculos, atividades antropogênicas tem sido a principal forma de introdução de largas quantidades de espécies nitrogenadas no meio ambiente. Isto tem acarretado profundas alterações no ciclo do nitrogênio, seja em escala local ou global. O uso contínuo de fertilizantes nitrogenados em atividades agrícolas, as emissões de gases automotivos e o contínuo lançamento de dejetos industriais e domésticos, representam as principais fontes de contaminação do meio ambiente por nitrito, nitrato e amônio decorrentes de atividades antropogênicas [1,4].

Efeitos tóxicos de nitrito, nitrato e amônio

Ambientes aquáticos

O principal impacto ambiental causado por compostos inorgânicos de nitrogênio, como nitrito, nitrato e amônio, está relacionado com a contaminação de ecossistemas aquáticos [4]. Como já dito anteriormente, uma das principais fontes atuais de introdução destas espécies no meio ambiente tem sido através da utilização de fertilizantes nitrogenadas na agricultura. Este fato, aliado com a alta solubilidade e mobilidade destes íons em solos, torna-se preocupante quando atividades agrícolas são realizadas nas proximidades de águas subterrâneas e superficiais [1]. A contaminação destes ambientes por compostos inorgânicos de nitrogênio tem causado efeitos significativos para muitos organismos aquáticos, além de contribuir para a degradação destes ecossistemas [4].

Altos níveis de compostos inorgânicos de nitrogênio provenientes de fontes antropogênicas podem estimular a proliferação de produtores primários, tais como fitoplânctons, algas bentônicas e macrófitas, acarretando o processo de eutrofização dos ecossistemas aquáticos. O baixo nível de oxigênio dissolvido nesses ambientes promove extensiva morte de peixes e invertebrados, além de contribuir para a redução da área de *habitat* adequado para o crescimento e reprodução de organismos nestes meios. Outro efeito causado pela deficiência de oxigênio em ambientes eutróficos é a formação de compostos reduzidos, como sulfeto de hidrogênio, o qual causa a mortalidade aguda de animais aquáticos devido a sua elevada toxicidade [4].

O desenvolvimento de algas tóxicas em ambientes eutróficos também é uma grave consequência associada com a poluição por nutrientes nitrogenados, o qual contribui significativamente para a mortalidade de animais aquáticos. Algas podem ser tóxicas devido à síntese de certas toxinas, as quais podem permanecer no interior das células das algas ou podem ser liberadas para o ambiente. Desta forma, organismos aquáticos podem estar diretamente expostos às toxinas, seja por absorção de água ou por ingestão de algas. Animais terrestres também podem estar indiretamente expostos às toxinas de algas devido ao consumo de animais contaminados através da cadeia alimentar, representando também riscos à saúde humana [4].

Finalmente, a contaminação de ambientes aquáticos por espécies nitrogenadas se dá também através da liberação de óxidos de nitrogênio através de emissões automotivas e atividades industriais. Dentre estes, dióxido de nitrogênio (NO_2) e óxido nítrico (NO) se apresentam como os principais poluidores ácidos de rios e lagos. Uma vez presentes na atmosfera, estes poluentes gasosos serão convertidos a ácido nítrico, o qual será depositado em águas superficiais, contribuindo para a elevação da concentração de H^+ em ecossistemas com baixa capacidade de neutralização de ácidos. Isto pode levar ao aumento da solubilidade de determinadas espécies metálicas, como, por exemplo, alumínio, chumbo, cádmio, cobre e zinco, alterando a taxa de mobilização ou sedimentação destas espécies, além de interferir também no ciclo de outros elementos, como o fósforo [4].

Diante de tudo que foi exposto, a contaminação de ecossistemas aquáticos por compostos inorgânicos de nitrogênio, como nitrito, nitrato e amônio, pode levar a degradação desses ecossistemas, causando impactos socioeconômicos às comunidades locais afetadas e, também, sérios riscos à saúde humana.

Saúde humana

A ingestão de quantidades demasiadamente altas de nitrito e nitrato a partir da alimentação pode acarretar sérias implicações à saúde humana. As principais fontes de ingestão destas espécies na dieta humana provém do consumo de água, vegetais e de produtos cárneos processados [6].

Embora não seja o agente precursor dos efeitos adversos causados em humanos, nitrato torna-se potencialmente tóxico quando ingerido em quantidades excessivas e em condições favoráveis à sua redução a nitrito [6]. De fato, este processo ocorre no trato digestivo de humanos, onde as condições anaeróbicas favorecem a redução de nitrato a nitrito devido à ação de micro-organismos ali presentes [1]. Estima-se que a maior parte da exposição humana ao nitrito seja exatamente devido à redução de nitrato pela ação de bactérias da via oral e à sua formação no intestino a partir de aminoácidos [8]. Este fato torna-se ainda mais preocupante para crianças menores do que quatro meses de idade, as quais apresentam condições estomacais mais favoráveis a presença de bactérias devido a menor acidez estomacal [1]. Além disso, a redução de nitrato a nitrito também pode

ocorrer em certos alimentos, como espinafre, quando armazenados sob condições que favorecem o surgimento de micro-organismos [6,7].

Seja por ingestão direta ou indiretamente formado pela redução de nitrato, a toxicidade de nitrito para humanos reside no fato de que esta espécie pode reagir com determinadas aminas para formar as nitrosaminas. Estas substâncias são reconhecidas por serem agentes potencialmente carcinogênicos para humanos, podendo também agir como precursores de outros agentes carcinogênicos a partir de sua degradação metabólica [1,4,6]. O processo de formação de nitrosaminas pode ocorrer tanto nos alimentos processados, nos quais nitrito é adicionado para conservação, como também pode ocorrer de forma endógena no trato gastrointestinal humano, a partir de nitrito e aminas ingeridos ou seus precursores. Inicialmente, considerava-se que o processo de nitrosação ocorria somente com aminas secundárias, mas estudos recentes têm demonstrado que a formação de nitrosaminas ocorre também com aminas terciárias e até mesmo com compostos de quaternário de amônio naturalmente presentes nos alimentos [6]. Alguns estudos reportados na literatura têm associado a ingestão de quantidades excessivas de nitrito e nitrato com a incidência de câncer gástrico [1,4].

Quando presente na corrente sanguínea, nitrito pode oxidar o ferro (II) da hemoglobina a ferro (III), formando a metemoglobina, a qual não tem a capacidade de transportar oxigênio [1,4]. Dependendo do nível de metemoglobina no sangue, a metemoglobinemia pode apresentar como sintomas: cianose, dor de cabeça, fadiga, taquicardia, coma, convulsões, asfixia e por fim a morte [4]. A metemoglobinemia é particularmente preocupante para crianças, as quais possuem limitada estatura física e desenvolvimento neural mais susceptível a limitações de transporte de oxigênio [1]. Além disso, crianças com menos de 4 meses de idade são mais suscetíveis a ocorrência de metemoglobinemia devido aos seguintes fatores: maior ingestão de líquido relativo ao seu peso corpóreo; maior proporção de hemoglobina fetal, a qual é mais facilmente oxidada a metemoglobina; menor capacidade de redução para converter metemoglobina em hemoglobina; e seu pH estomacal mais alto, o que favorece a presença de bactérias responsáveis pela redução de nitrato a nitrito [3,4,11]. A metemoglobinemia também tem sido reportada na literatura como a “síndrome do bebê azul” em decorrência da coloração azulada da pele e mucosas de crianças acometidas por esta doença, em virtude da deficiência do transporte de oxigênio [3,12]. Diversos estudos clínicos têm reportado casos fatais de recém-

nascidos por metemoglobinemia, estando estes casos associados com o consumo de água [11] e vegetais [7] contendo elevados níveis de nitrato.

Legislação

Em vista dos efeitos adversos que nitrito, nitrato e amônio podem causar ao meio ambiente, bem como do potencial tóxico que podem apresentar à saúde humana, limites máximos destas espécies em águas e alimentos têm sido estipulados e constantemente revisados por órgãos governamentais e agências ambientes de vários países.

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) através da Portaria Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, estabelece normas e padrões de potabilidade para a água destinada ao consumo humano [13]. Já a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução RDC Nº 274, de 2 de setembro de 2005, estabelece características mínimas de qualidade para água mineral natural e água natural [14]. Por fim, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece condições e padrões de qualidade para diferentes classes de água (águas doces, águas salinas e águas salobras) através da Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005 [15].

Assim como no Brasil, vários órgãos em todo mundo também tem imposto através da legislação limites para níveis de nitrito e nitrato em água destinada ao consumo humano. Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) determina níveis máximos de contaminantes que a água potável pode apresentar sem que estes representem riscos à saúde humana [16]. Na Europa, a União Européia (EU) estabelece normas de qualidade para a água destinada ao consumo humano a partir da Diretiva 98/83/CE, de 3 de novembro de 1998 [17]. Além disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) também tem estipulado limites máximos para nitrito, nitrato em água potável [18]. As Tabelas 1 e 2 apresentam os limites máximos estabelecidos para nitrito, nitrato e nitrogênio amoniacal total em águas e os respectivos órgãos regulamentadores.

Tabela 1. Limites máximos estipulados para nitrito e nitrato em águas por agências nacionais e internacionais.

Órgão	Matriz	Teor máximo permitido ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
		Nitrito	Nitrato	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻
ANVISA	Água mineral e natural	0,02	50	-	-
CONAMA	Águas doces	3,3	44	1	10
	Águas salinas	0,23	1,8	0,07	0,40
	Águas salobras	0,23	1,8	0,07	0,40
MS	Água potável	3,3	44	1	10
EPA	Água potável	3,3	44	1	10
EU	Água potável	0,50	50	-	-
OMS	Água potável	3	50	-	-

Tabela 2. Limites máximos estipulados para amônio e nitrogênio amoniacal total em águas.

Órgão	Matriz	pH	Teor máximo permitido ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
			N amoniacal total	Amônio
CONAMA	Águas doces	$\leq 7,5$	3,7	-
		7,5 – 8,0	2,0	-
		8,0 – 8,5	1,0	-
		> 8,5	0,5	-
	Águas salinas	-	0,40	-
	Águas salobras	-	0,40	-
MS	Água potável	-	-	1,5*
EU	Água potável	-	-	0,5

* Como NH₃

A adição de nitrito e nitrato como aditivos para a conservação de produtos de carne processada, também é objeto de controle por parte de entidades regulamentadoras, em âmbito nacional e internacional. No Brasil, a ANVISA através da Portaria Nº 1.004, de 11 de novembro de 1998 [19], e o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) através da Instrução Normativa Nº 51, de 29 de dezembro de 2006 [20], possuem regulamentos que controlam os níveis máximos de nitrito e nitrato adicionados em carnes e produtos cárneos, sob a forma de sais de sódio ou potássio. Nos Estados Unidos, esse controle é feito pela FDA (*Food and*

Drug Administration) a partir do Código de Regulamentações Federal, Título 21, Capítulo I, Parte 172, de 1º de abril de 2011, o qual determina os teores máximos de nitrito e nitrato, sob a forma de sais de potássio, que podem ser adicionados em carnes e produtos cárneos [21]. Na Europa, a União Européia regulamenta os níveis de nitrito e nitrato adicionados nas carnes e produtos cárneos por meio da Diretiva 95/2/CE, de 5 de julho de 2006 [22]. A Tabela 3 apresenta os teores máximos para nitrito e nitrato em carnes e produtos cárneos.

Tabela 3. Limites máximos estipulados para nitrito e nitrato adicionados em produtos cárneos por diferentes agências nacionais e internacionais.

Órgão	Teor máximo adicionado (mg Kg ⁻¹)			
	NaNO ₂	NaNO ₃	KNO ₂	KNO ₃
ANVISA	150	300	150	300
MAPA	150	300	150	300
FDA	200	500	-	-
EU	150	150	150	150

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; FDA: Administração de Alimentos e medicamentos; EU: União Européia.

Em todos os casos, observa-se que a legislação vigente é relativamente atual, o que reflete a preocupação das autoridades governamentais em constantemente realizar a revisão de suas leis diante das pesquisas científicas e descobertas relacionadas à toxicidade destas espécies nitrogenadas.

CAPÍTULO II: TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS USADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE NITRITO, NITRATO E AMÔNIO

NITRITO E NITRATO

A determinação de nitrito e nitrato em diversas matrizes tem sido o foco de inúmeros trabalhos, abrangendo uma ampla gama de técnicas analíticas. Dentre estas, as técnicas espectrométricas são as mais amplamente empregadas para a determinação de nitrito e nitrato por proporcionarem baixos limites de detecção, simplicidade de seus protocolos analíticos e baixo custo instrumental relativo. As principais técnicas espectrométricas que têm sido usadas para a determinação de nitrito e nitrato incluem: espectrofotometria de absorção molecular no UV/Vis, quimiluminescência, espectrofluorimetria molecular e espectrometria de absorção atômica (AAS). Outras técnicas que podem ser encontradas na literatura incluem: análise de emissão molecular em cavidade (MECA) e espectrometria de ressonância paramagnética de elétrons (EPR), mas estas são muito pouco exploradas [1].

A seguir, serão discutidos alguns aspectos gerais envolvidos na determinação de nitrito e nitrato quando técnicas espectrométricas são empregadas para a detecção destas espécies.

Aspectos gerais

Métodos desenvolvidos para a determinação de nitrito e nitrato podem ser divididos em dois tipos: métodos simultâneos e métodos sequenciais. Em métodos simultâneos, cada espécie é determinada individualmente numa mesma medida. Já a abordagem sequencial é geralmente realizada efetuando-se primeiro a medida de nitrito, seguindo-se pela redução do nitrato a nitrito com a medida total das espécies. Nitrato então pode ser quantificado pela diferença entre a medida total e a medida do nitrito. Os métodos pelos quais são realizadas medidas simultâneas são aqueles que empregam técnicas eletroquímicas ou eletroforese capilar, enquanto que medidas sequenciais são efetuadas em métodos que empregam técnicas espectrométricas para a detecção [1].

A medida sequencial se deve muito ao fato da diferença de reatividade que existe entre as duas espécies. Enquanto que nitrito apresenta uma alta versatilidade

química, nitrato apresenta uma maior inércia química. Desta forma, quando técnicas espectrométricas são empregadas para a detecção de nitrito e nitrato, existe a necessidade de se realizar a conversão de nitrato em nitrito e diferentes tipos de estratégias têm sido adotadas: uso de cádmio metálico, cádmio metálico amalgamado ou coperizado [23], zinco metálico [24,25] e hidrazina na presença de íons cobre (II) como catalisador [26-28]. Estas abordagens de redução têm sido usadas tanto em procedimentos em batelada, como também em sistemas em fluxo. No entanto, a redução de nitrato a nitrito tem sido frequentemente realizada em colunas de cádmio, uma vez que este procedimento possibilita uma taxa de conversão de nitrato em nitrito próxima de 100% [1]. Uma elegante alternativa para a redução de nitrato a nitrito foi proposta por Takeda et al. [29]. Nitrato é fotorreduzido a nitrito pela radiação UV na faixa de comprimento de onda entre 200 e 300 nm. Trata-se de uma estratégia simples e ambientalmente amigável, pois não são utilizados reagentes tóxicos, estando em acordo com os princípios da Química Verde [30-32].

Uma interessante estratégia analítica para a determinação de nitrito e nitrato empregando técnicas espectrométricas é aquela baseada na geração química de espécies gasosas nitrogenadas, como óxido nítrico (NO), dióxido de nitrogênio (NO₂) e cloreto de nitrosila (NOCl). As espécies gasosas geradas são separadas do meio líquido através de um separador gás-líquido e transportadas para uma célula posicionada no caminho óptico do instrumento usado para detecção (Figura 1).

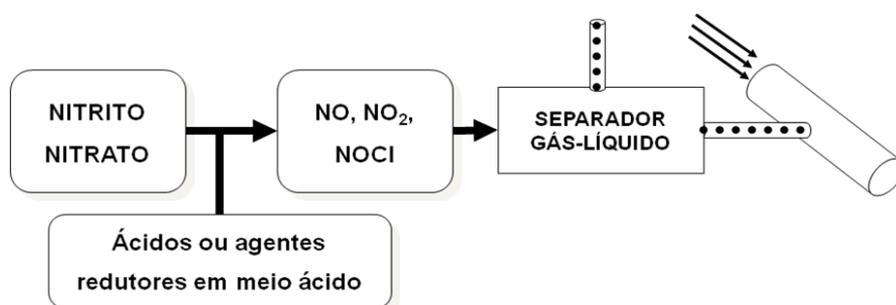


Figura 1. Diagrama esquemático para determinação de nitrito e nitrato em fase gasosa.

As técnicas espectrométricas geralmente usadas neste procedimento alternativo são: espectrofotometria no UV/Vis, quimiluminescência e espectrometria de absorção atômica. A conversão de nitrito e nitrato nas espécies gasosas pode ser realizada por meio de soluções de ácidos ou de agentes redutores em meio ácido.

Essa estratégia, denominada de espectrometria de absorção molecular em fase gasosa (GP-MAS), oferece algumas vantagens em relação à determinação convencional de nitrito e nitrato em fase líquida, como: minimização de interferências causadas pela matriz da amostra, uma vez que ocorre a separação do analito por sua conversão numa espécie gasosa; eliminação do uso de reagentes tóxicos e potencialmente cancerígenos para o operador; maior simplicidade; e frequência analítica relativamente mais alta [33- 37].

Métodos envolvendo sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) ou análise por injeção sequencial (SIA) têm sido extensivamente desenvolvidos para a determinação de nitrito e nitrato por técnicas espectrométricas. O interesse pelo desenvolvimento de tais métodos se fundamenta nas inerentes vantagens que estes procedimentos oferecem, como: reduzido consumo de reagentes e amostras, alta frequência analítica e possibilidade de automação do método. Além do mais, estes sistemas permitem o fácil acoplamento de colunas para a redução de nitrato, bem como o acoplamento das técnicas espectrométricas empregadas para a detecção destes íons [38 –48].

Espectrofotometria no UV/Vis

Indubitavelmente, a espectrofotometria de absorção molecular no UV/Vis é a técnica espectrométrica que tem sido mais empregada para a determinação de nitrito e nitrato [1]. Dentre os métodos espectrofotométricos, o mais extensivamente utilizado é aquele baseado na reação de Griess, a qual foi estabelecida em 1879 por Johann Peter Griess [49]. Esta reação consiste basicamente de duas etapas: uma reação de diazotização entre uma amina aromática e nitrito em meio ácido, formando um sal de diazônio, seguida de uma reação de acoplamento para formar um azocomposto altamente colorido, a partir do qual é realizada a medida. Nitrato é convencionalmente determinado como nitrito após sua redução em uma coluna de cádmio, sendo a sua concentração obtida por diferença [1,49].

Dependendo dos reagentes utilizados para a reação, a máxima absorvância produzida pelo azocomposto ocorre na faixa de comprimento de onda entre 500-600 nm. Para a reação de diazotização, a amina aromática mais frequentemente utilizada tem sido a sulfanilamida, enquanto que dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina (NED) tem sido amplamente utilizado como reagente de acoplamento, conforme a

sequência de reações a seguir (Figura 2). A medida do produto obtido usando estes reagentes é feita em 540 nm [1]. Outros reagentes também têm sido empregados para esta reação. Para a reação de formação de sal de diazônio, as seguintes aminas aromáticas têm sido usadas: ácido sulfanílico, nitroanilina e *p*-aminoacetofenona; enquanto que fenol, 1-naftol, 1-naftol-4-sulfonato, 1-amino naftaleno e 1,3-diaminobenzeno têm sido investigados como reagentes de acoplamento [1,49].

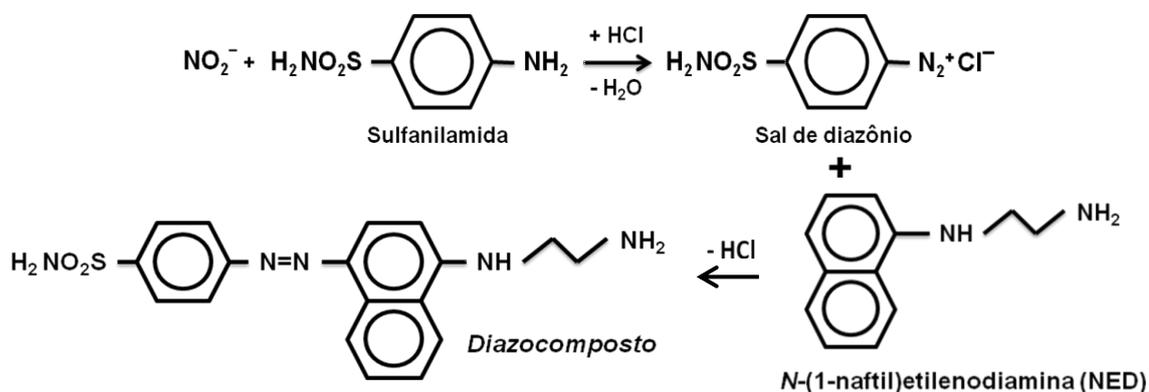


Figura 2. Diagrama esquemático para a reação de Griess.

Métodos espectrofotométricos baseados na reação de Griess apresentam alta sensibilidade para a determinação de nitrito, com limites de detecção entre 0,02 e 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, conforme os reagentes empregados para a reação [1]. Entretanto, a reação de Griess apresenta uma série de limitações. Alguns parâmetros de reação devem ser rigorosamente controlados, bem como temperatura, pH e concentração dos reagentes. O tempo de reação para o desenvolvimento da cor também deve ser rigorosamente controlado devido à instabilidade do corante formado e às numerosas reações laterais. Cuidados também devem ser tomados quanto aos reagentes utilizados, uma vez que estes sofrem deterioração mesmo quando estocados sob refrigeração. A reação sofre de interferências pela presença de determinadas espécies na amostra, como agentes redutores, agentes oxidantes e espécies coloridas. Além disso, amostras que apresentam turbidez ou opalescência acarretam interferências na medida, sendo imprescindível o uso de agentes clarificantes. A presença de íons metálicos também pode ser um sério inconveniente para esta reação. Íons cobre (II) promovem a decomposição do sal de diazônio, enquanto que diversos outros íons podem interferir por precipitação [35,37,49].

Uma série de estratégias analíticas baseadas na reação de nitrito com outros reagentes para a formação de produtos coloridos também têm sido desenvolvidas para a determinação de nitrito e nitrato por detecção espectrofotométrica. Davis et al. investigaram reações de uma única etapa baseadas na nitrosação de nitrito com diferentes compostos fenólicos, como fenol, resorcinol e floroglucinol [50]. Um método FIA baseado na reação de nitrito com sulfato de 3,6-diamino acridina (sulfato de provalina) foi proposto por Guerrero et al. para a determinação de nitrito e nitrato em amostras de água. Nitrato foi determinado após sua redução a nitrito em coluna de cádmio [51]. A reação entre nitrito e ácido barbitúrico produzindo um derivado nitroso, o ácido violúrico, foi proposta por Aydin et al. para a determinação de nitrito em água [52]. Uma interessante alternativa tem sido proposta por Andrade et al. Nitrito é reduzido a óxido nítrico, o qual reage com ferro (II) e tiocianato em meio ácido, formando a espécie FeSCNNO^+ . Este complexo exibe um máximo de absorvância em 460 nm, sendo proporcional à concentração de nitrito. Nitrato foi determinado após sua redução a nitrito em uma coluna redutora de cádmio coperizado. Nitrito e nitrato foram determinados em amostras de vegetais e produtos cárneos por este método [53].

Um método indireto envolvendo a determinação espectrofotométrica de nitrito pode também ser encontrado na literatura. Monser et al. desenvolveram um método espectrofotométrico FIA baseado na oxidação do complexo de azul de fosfomolibdênio por íons nitrito. O decréscimo do sinal de absorvância do complexo azul foi monitorado em 820 nm e nitrato foi reduzido a nitrito em uma coluna redutora de cádmio coperizado. O método foi aplicado para a determinação de nitrito e nitrato em amostras de água e peixe [54].

Métodos cinéticos também têm sido estabelecidos para a determinação de nitrito e nitrato usando detecção espectrofotométrica no UV/Vis. Estes métodos se baseiam na influência que nitrito pode causar na cinética de determinadas reações envolvendo compostos coloridos, tendo efeito catalítico sobre estas reações. Neste sentido, Pettas et al. descreveram um método espectrofotométrico cinético para determinação de nitrito baseado em seu efeito catalítico sobre a reação entre azul de timol e íons bromato na presença de ácido sulfúrico [55]. A oxidação de vermelho de metila por íon bromato tem sua cinética aumentada na presença de nitrito. Baseado neste fato, Ghasemi et al. desenvolveram um método espectrofotométrico catalítico para a determinação de nitrito em produtos cárneos [56]. Barzegar et al.

desenvolveram um método para a determinação de nitrito em amostras de água baseado na cinética de oxidação do ácido molibdossilícico por íons nitrito [57].

Métodos empregando a espectrofotometria no UV/Vis para determinação de nitrito e nitrato através da geração de espécies gasosas nitrogenadas têm sido também reportados na literatura. Haghighi e Tavassoli propuseram um método FIA baseado na absorção molecular em fase gasosa. Nitrito foi convertido em espécies gasosas, como NO, NO₂, HNO₂ e NOCl, após sua reação com solução de HCl 2 mol L⁻¹. Os produtos gasosos foram separados da fase líquida por meio de uma corrente de O₂ em um separador gás-líquido. Em seguida, os produtos gasosos foram transportados para uma célula posicionada no caminho óptico de um espectrofotômetro UV/Vis e a medida de absorvância realizada em 205 nm. Um limite de detecção de 7,5 µg mL⁻¹ foi obtido para nitrito sob estas condições. O método foi aplicado para a determinação de nitrito em amostras de produtos cárneos, urina e amostras de água [35]. Os mesmos autores desenvolveram outro método envolvendo também a determinação de nitrato após a sua redução a nitrito. Dois procedimentos foram investigados para a redução de nitrato: reação com hidrazina na presença de íons Cu (II) e passagem através de uma coluna de cádmio coperizada. Uma relação linear entre concentração de nitrato e sinal analítico foi obtida usando a coluna de Cd-Cu. Este procedimento então foi adotado para a redução de nitrato, obtendo-se um limite de quantificação de 2,97 µg. Nitrato e nitrito foram determinados em produtos cárneos, vegetais, urina e amostras de água [34].

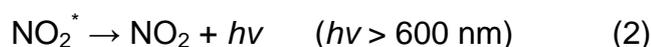
Embora os mais diversos tipos de estratégias apresentadas até o momento sejam todos baseados na versatilidade química do nitrito, métodos espectrofotométricos para a quantificação de nitrato, sem a necessidade de sua conversão a nitrito, também são reportados na literatura. Estes métodos são baseados em reações de nitração e diferentes compostos têm sido empregados como reagentes: ácido salicílico, compostos fenólicos, ácidos cromotrópicos, 2,4-xilenol, 2,6-xilenol, 3,4-xilenol, ácido fenoldissulfônico e brucina [58,59]. No entanto, a maioria destes métodos requer aquecimento, demandam tempo e são bastante complicados [59].

Com o intuito de alcançar limites de detecção mais inferiores, alguns autores têm desenvolvido métodos que exploram procedimentos de extração e pré-concentração. Nesse contexto, Horita et al. desenvolveram um método de pré-concentração em coluna para a determinação espectrofotométrica de nitrito e nitrato

em amostras de água. O método foi baseado na retenção de azocompostos em adsorventes sólidos. Como reagente de diazotação foi usado o ácido sulfanílico, enquanto que 1-naftol-4-sulfonato de sódio, 1-naftol, e fenol foram usados como reagentes de acoplamento. Iodeto de naftaleno-tetradecildimetilbenzilamônio ou cloreto e bromato de bifenil-trioctilmetilamônio foram usados como adsorventes. Nitrato foi determinado como nitrito após a sua redução em coluna de Cd-Cu. A massa do sólido adsorvente foi dissolvida da coluna com 5 mL de solução de dimetilformamida e a absorvância foi medida em 526, 480 ou 418 nm, dependendo do reagente de acoplamento utilizado [60]. Um método SIA foi desenvolvido por Miró et al. para a determinação espectrofotométrica de nitrito em águas naturais usando extração e pré-concentração em fase sólida. O sistema realizava a formação do corante, a partir da reação de nitrito com sulfanilamida e NED, seguida de sua extração em sílica gel modificada quimicamente. O corante coletado foi eluído com metanol 80% (v/v) e conduzido para a medida em 540 nm. Um fator de pré-concentração de 170 vezes e um limite de detecção de $0,32 \text{ ng mL}^{-1}$ foram obtidos para um volume de amostra de 10 mL [61]. Abbas e Mustafa descreveram um simples e sensível método para a determinação de nitrito e nitrato em amostras de água empregando a espectrofotometria de fase sólida. O método consistia da sorção de um corante formado a partir da reação do nitrito com 4-nitroanilina e 1-naftol, em uma fina camada de espuma de poliuretano, na qual foi efetuada diretamente a medida espectrofotométrica. Nitrato foi reduzido a nitrito em coluna redutora de cádmio amalgamado. Fator de pré-concentração de 140 vezes e limites de detecção de 5 e 40 ng mL^{-1} para nitrito e nitrato, respectivamente, foram obtidos para 100 mL de amostra [62]. Um método baseado na extração em ponto nuvem de um corante formado através da reação de nitrito com Safranin O e pirrogalol foi proposto por Filik et al. A extração foi realizada por meio da mistura de dois surfactantes: Triton X-114 e dodecilssulfato de sódio. Um fator de pré-concentração de 20 vezes e um limite de detecção de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ foram obtidos. O método foi aplicado para a determinação de nitrito em amostras de leite, água potável e água de lago [63].

Quimiluminescência

A maioria dos métodos quimiluminescentes reportados na literatura envolve a determinação de nitrito e nitrato em fase gasosa após a redução destas espécies a óxido nítrico (NO) [1]. O sinal quimiluminescente é produzido após a reação de NO com ozônio, produzindo dióxido de nitrogênio em um estado excitado (Equação 1). Esta espécie excitada sofre decaimento, retornando ao seu estado fundamental, produzindo quimiluminescência infravermelha acima de 600 nm (Equação 2).



A conversão de nitrito e nitrato a NO é feita empregando-se agentes redutores em meio ácido. Para nitrito, iodeto de potássio ou ácido ascórbico tem sido empregado como agente redutor. Para nitrato, agentes redutores mais fortes têm sido empregados, como o cloreto de titânio (III). A concentração de nitrato é obtida, então, por diferença [36,64,65]. Outros agentes redutores que também têm sido empregados para a redução de nitrato a NO são o cloreto de vanádio (III) e o molibdato de amônio com sulfato ferroso amoniacal, mas aquecimento do meio reacional torna-se necessário nestes casos [66-69]. Estes métodos quimiluminescentes têm sido frequentemente desenvolvidos empregando-se sistemas de análise por injeção em fluxo, proporcionando alta frequência analítica e limites de detecção similares e até mesmo mais baixos do que os métodos que empregam espectrofotometria UV/Vis [1].

Métodos quimiluminescentes para a determinação de nitrito e nitrato em fase líquida também podem ser encontrados na literatura. Mikuska e Vecera desenvolveram um método FIA para determinação de nitrito e nitrato em amostras de água por detecção quimiluminescente. Nitrito foi determinado após sua oxidação a ácido peroxinítrico em uma reação quimiluminescente com luminol. A concentração de nitrato foi obtida por diferença após sua foto-redução a nitrito empregando radiação ultravioleta. Limites de detecção foram de 2×10^{-9} e 4×10^{-9} mol L⁻¹ para nitrito e nitrato, respectivamente [45]. Rehman et al. descreveram um método FIA para determinação de nitrito e nitrato em água doce baseado no efeito supressor de nitrito sobre o sistema quimiluminescente constituído por luminol e

hipoclorito. Nitrato foi reduzido a nitrito usando coluna de cádmio. Um limite de detecção de $4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ foi obtido para nitrito [46].

Espectrofluorimetria molecular

Métodos espectrofluorimétricos apresentam alta sensibilidade para a determinação de nitrito e nitrato, com limites de detecção similares ou até mesmo mais baixos do que os métodos espectrofotométricos e quimiluminescentes [70]. Como não poderia ser diferente, métodos espectrofluorimétricos para a determinação de nitrito e nitrato também são baseados na reatividade química do nitrito. Neste caso, íon nitrito tanto pode atuar como uma espécie quimicamente reativa com diversos reagentes, formando produtos altamente fluorescentes, como apresentar efeito supressor sobre a atividade fluorescente de diversas compostos que exibem fluorescência [70-73].

A reação de nitrito com diversos compostos tem sido a base para o desenvolvimento de vários métodos espectrofluorimétricos. Dentre estes compostos podemos citar: resorcinol, 5-aminofluoresceína, benzidina, 4-hidroxycoumarina, triptofano, 2,6-diaminopiridina, 2,3-diaminonaftaleno, entre outros. No entanto, a maioria destes métodos requer aquecimento do meio reacional, uso de reagentes tóxicos, necessidade de extração, procedimentos morosos e controle de pH. Além disso, estes métodos podem sofrer com interferências e alguns ainda envolvem a síntese do reagente [70-73].

Wang et al. desenvolveram um método espectrofluorimétrico para determinação de nitrito baseado na reação seletiva de nitrito com ácido 5,6-diamino-1,3-naftaleno dissulfônico (DANDS) em meio ácido para formar o ácido 1-[H]-naftotriazol-6,8-dissulfônico, o qual é um composto altamente fluorescente em meio alcalino. A medida da intensidade relativa de fluorescência foi realizada em 428,8 nm, com excitação em 297,6 nm. Um limite de detecção de $0,09 \text{ ng mL}^{-1}$ foi obtido e o método aplicado para a determinação de nitrito em amostras de água de lago e potável [71]. Helaleh e Korenaga descreveram um método espectrofluorimétrico simples, seletivo e de alta sensibilidade para determinação de nitrito. A determinação fluorimétrica foi baseada na reação de acetaminofeno com nitrito em meio ácido para formar um derivado nitroso que apresenta alta fluorescência em meio alcalino. Limite

de detecção de $2,7 \text{ ng mL}^{-1}$ foi obtido e o método aplicado para a determinação de nitrito em amostras de água [72].

A reação de nitrito com compostos fluorescentes promovendo a supressão da fluorescência também tem sido a base para o desenvolvimento de métodos para a determinação espectrofluorimétrica indireta de nitrito e nitrato. Neste sentido, Biswas et al. desenvolveram um método de alta sensibilidade para a determinação espectrofluorimétrica de nitrito e nitrato [73]. O método foi baseado no efeito supressor que nitrito produz sobre a fluorescência do purpurato de amônio (murexida) na faixa de concentração de H_2SO_4 de $0,045\text{-}0,315 \text{ mol L}^{-1}$. A medida da intensidade fluorescente foi realizada em $444,5 \text{ nm}$, enquanto que o comprimento de onda de excitação foi de $349,0 \text{ nm}$. A concentração de nitrito foi determinada a partir da diferença entre a intensidade fluorescente da solução medida na ausência e na presença de nitrito. Nitrato foi reduzido a nitrito com zinco em pó na presença de hidróxido de manganês como catalisador. O limite de detecção do método foi de $0,6 \text{ ng mL}^{-1}$. O método foi aplicado para a determinação de nitrito e nitrato em amostras de água, solos, ar e amostras forense. Um método baseado na supressão da fluorescência também foi desenvolvido por Jie et al. para a determinação de nitrito em amostras de água e alimentos [74]. O reagente usado foi o indol, o qual é uma espécie fluorescente que apresenta excitação e emissão em comprimentos de onda de 285 e 350 nm , respectivamente. No entanto, a reação de nitrito com indol forma um composto que não apresenta fluorescência em meio ácido. Dessa forma, o método foi baseado no decréscimo da fluorescência do indol devido à sua reação com nitrito. O limite de detecção do método foi de $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$.

Outros métodos espectrofluorimétricos que têm sido descritos na literatura para a determinação de nitrito e nitrato envolvem o desenvolvimento de sensor [75], sondas [70,76] e também a abordagem cinética [77].

Espectrometria de absorção atômica

A espectrometria de absorção atômica (AAS), seja com atomização em chama ou em forno de grafite, é uma técnica já bastante consagrada e bem estabelecida para a determinação de cerca de 70 elementos em diversas matrizes. Oferece baixo custo instrumental relativo, apresenta alta sensibilidade e seletividade, estando presente na maioria dos laboratórios que lidam com análises de rotina [78- 80]. No

entanto, com relação à determinação de espécies não-metálicas, tais como nitrito e nitrato, esta técnica não apresenta parâmetros analíticos adequados, como sensibilidade e seletividade, em sua forma convencional, ou então necessita de condições especiais para a sua aplicação prática, tornando a análise dispendiosa ou mesmo inviável [78,81,82]. Dentro deste contexto, algumas estratégias analíticas têm sido estabelecidas ao longo das últimas décadas no sentido de superar esta limitação e estender a faixa de aplicabilidade da AAS para a determinação de espécies não-metálicas. Com base nos trabalhos reportados na literatura, as estratégias desenvolvidas para a determinação de espécies não-metálicas, como nitrito e nitrato, por técnicas de AAS podem ser divididas em duas abordagens principais: métodos indiretos [78,83] e métodos baseados na absorção molecular [81,82,84].

Métodos indiretos

Em métodos indiretos empregando AAS, nitrito ou nitrato interage com alguma espécie metálica (ou algum composto contendo um íon metálico) a partir de uma reação específica, a qual pode ser uma reação de oxi-redução ou complexação. A quantidade de metal que reagiu é então quantificada, sendo diretamente proporcional à concentração de nitrito ou nitrato [78]. Os trabalhos reportados na literatura que usam esta abordagem para a determinação de nitrito e nitrato são baseados em dois tipos de procedimentos: os que envolvem a extração líquido-líquido e os que envolvem o emprego de agentes redutores ou oxidantes.

Silva et al. reportaram um método para a determinação sequencial de nitrito e nitrato em produtos cárneos baseado na extração líquido-líquido contínua. Nitrato reage com bis(2,9-dimetil-1,10-fenantrolinato) de cobre (I) para formar um complexo hidrofóbico, o qual foi extraído com 4-metil-2-pentanona em um sistema FIA. Nitrito foi determinado por diferença após sua oxidação a nitrato por sulfato de cério (IV). Para assegurar a quantificação de somente nitrato, nitrito foi convertido em nitrogênio por ácido sulfâmico. A determinação indireta foi realizada pela medida do sinal de cobre por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) [85]. Houser e Fauth realizaram a determinação de nitrito e nitrato baseada na complexação de nitrato com neocuproína e a extração líquido-líquido do complexo hidrofóbico com metilisobutilcetona (MIBK). Nitrito foi oxidado a nitrato por sulfato de

cério (IV) ou permanganato de potássio. A medida dos íons de cobre complexado foi realizada por FAAS [86].

Métodos indiretos que utilizam agentes redutores, ou oxidantes, são geralmente realizados em fluxo com o emprego de microcolunas. Um simples e rápido método FIA foi desenvolvido por Noroozifar et al. para a determinação indireta de nitrito por FAAS. O método indireto foi baseado na oxidação de nitrito a nitrato usando uma microcoluna oxidante contendo dióxido de chumbo (IV) em uma fase sólida. Dessa forma, PbO_2 era reduzido a íons Pb (II) por nitrito e a medida do Pb (II) feita por FAAS. A absorvância de chumbo era então proporcional à concentração de nitrito na amostra. Um limite de detecção de $0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi obtido e o método foi adequado para a determinação de nitrito em amostras de alimentos e águas residuais [87]. Os mesmos autores usaram esta abordagem também para a determinação indireta de nitrito e nitrato em produtos cárneos e amostras de água por FAAS. No método FIA foi utilizada uma microcoluna oxidante de dióxido de manganês e a concentração de nitrito nas amostras foi proporcional à concentração do manganês liberado da fase sólida. Nitrato foi reduzido a nitrito no mesmo sistema FIA pela passagem da amostra em uma coluna redutora de cádmio coperizado e quantificado como nitrito. Limites de detecção de $0,07$ e $0,14 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram obtidos para nitrito e nitrato, respectivamente [88].

Um método automatizado empregando a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS) para a determinação indireta de nitrato usando uma microcoluna redutora de cádmio foi desenvolvido por Alonso et al. O método indireto foi baseado na redução de nitrato a nitrito usando uma microcoluna redutora de cádmio. Deste modo, cádmio metálico era oxidado a Cd (II), o qual foi medido por ET AAS na linha atômica de Cd em $228,8 \text{ nm}$, sendo proporcional a concentração de nitrato. O fato da microcoluna de cádmio ter sido integrada ao sistema do autoamostrador do espectrômetro, por sua inserção na ponta da micropipeta, faz deste método uma alternativa simples e elegante para a determinação de nitrato, proporcionando um sistema totalmente automatizado e evitando qualquer trabalho manual ao operador. O método apresentou limite de detecção de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo aplicado para a determinação de nitrato em amostras de água mineral e água de lagoa. Técnica de adição de analito foi usada para minimizar efeitos de matriz, uma vez que determinados íons, como sódio, cálcio e magnésio, causaram interferência [89].

Métodos baseados na absorção molecular

Nesta abordagem, nitrito e nitrato são convertidos em espécies gasosas e a medida de absorção molecular destas espécies é realizada por equipamentos de AAS [81,82,84]. Poucos trabalhos usando este tipo de estratégia têm sido reportados na literatura. Syty e Simmons realizaram a determinação de nitrito por espectrometria de absorção molecular em fase gasosa empregando um equipamento de AAS para a detecção [37]. O espectrômetro foi modificado para medidas de absorção molecular em fase gasosa pela remoção do queimador e sua substituição por uma célula de quartzo de 15 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro, a qual foi mantida em um suporte. Uma lâmpada de arco de deutério, que normalmente tem a função de correção de fundo em AAS, foi usada como fonte de radiação para a medida de absorção molecular das espécies gasosas de nitrogênio. Nitrito foi convertido em espécies gasosas, principalmente cloreto de nitrosila, após sua reação com $\text{HCl } 8 \text{ mol L}^{-1}$. Os produtos gasosos foram separados da fase líquida por um fluxo de gás nitrogênio em um separador gás/líquido e transportados para uma célula de quartzo posicionada no caminho óptico do espectrômetro. O sinal transiente de absorção molecular dos produtos gasosos foi medido em 195 nm. Limite de detecção foi de $0,23 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrito e a curva de calibração foi linear até uma concentração de nitrito de $65 \mu\text{g mL}^{-1}$. Interferências não foram observadas para a maioria das espécies estudadas, tais como carbonato, nitrato, sulfato, brometo, cianeto, cianato e íon amônio, mas tiocianato, iodeto, sulfeto e sulfito ocasionaram interferências.

Huang et al. investigaram o espectro de absorção molecular de NO produzido por uma solução de HNO_3 5% (v/v) em chama de ar-acetileno usando um espectrômetro com fonte contínua de alta resolução (HR-CS) [90]. Os autores observaram que as bandas de absorção vibracional decorrentes da transição eletrônica consistiam de múltiplas linhas de absorção rotacional. Algumas destas linhas foram investigadas com o intuito de sua aplicação para propósitos analíticos. Um método para a determinação de nitrato baseado na absorção molecular de NO usando vaporização eletrotérmica em forno de grafite foi desenvolvido pelos autores. Temperaturas de pirólise e vaporização do método foram 300 e 700 °C, respectivamente. Cálcio na concentração de 1% (m/v) foi usado como modificador químico. Sob estas condições, nenhuma interferência de natureza espectral foi

observada devido à baixa temperatura de vaporização. Limite de detecção de 5 ng de N-NO_3^- foi obtido usando a linha de NO em 215,360 nm, sendo a curva de calibração linear até 3000 ng de N-NO_3^- . O método foi validado por meio da análise de materiais de referência certificados de água subterrânea e fertilizante. A técnica de adição de analito foi usada para a calibração.

Outras técnicas espectrométricas

A MECA e a EPR são também técnicas espectrométricas que têm sido empregadas para a determinação de nitrito e nitrato. No entanto, poucos são os trabalhos reportados na literatura referentes a estas técnicas, sendo também que estes trabalhos são pouco recentes.

Na análise por emissão molecular em cavidade, nitrito e nitrato são reduzidos a NO e esta espécie é transportada por um fluxo de gás nitrogênio para uma chama de hidrogênio-nitrogênio. Usando esta técnica espectrométrica, Al-Zamil e Townshend desenvolveram um método para a determinação de nitrito e nitrato após a redução destas espécies a NO. Nitrito foi reduzido a NO por iodeto, enquanto que nitrato foi reduzido a NO após sua redução a nitrito usando zinco metálico com manganês (IV) como catalisador. A emissão produzida por NO na chama foi medida em 526 nm. O método apresentou limites de detecção de 0,5 e 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para nitrito e nitrato como nitrogênio, respectivamente [91]. Celik e Henden também realizaram a determinação de nitrito e nitrato por MECA. Nitrito foi determinado após sua conversão a NO por iodeto. Nitrato foi reduzido a nitrito em coluna redutora de cádmio coperizado e então determinado como nitrito. Limite de detecção de 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrogênio foi obtido e o método aplicado para a determinação de nitrito e nitrato em produtos cárneos e nitrato em amostras de água potável [92].

Wennmalm e Petersson desenvolveram um método para a determinação de nitrito empregando a EPR. O método foi baseado na medida das propriedades paramagnéticas de NO fortemente ligado ao ferro (II) de proteínas contendo o grupo heme [93].

AMÔNIO

As principais técnicas espectrométricas empregadas para a determinação de amônio são: a espectrofotometria de absorção molecular no UV/Vis, a quimiluminescência e a espectrofluorimetria molecular. Outras técnicas reportadas na literatura incluem: a AAS, a MECA, a espectroscopia de reflectância difusa e a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES).

Espectrofotometria de absorção molecular no UV/Vis

Assim como nitrito e nitrato, a técnica espectrométrica mais empregada para a determinação de amônio tem sido a espectrofotometria de absorção molecular no UV/Vis. Dentre os métodos espectrofotométricos, destacam-se os métodos baseados no reagente de Nessler e na reação de Berthelot, sendo este último também conhecido como método do Azul de Indofenol.

O reagente de Nessler é um dos mais usados para a determinação de nitrogênio amoniacal (íon amônio e amônia), pois se trata de um método que apresenta alta sensibilidade e seletividade [94]. O reagente é uma solução alcalina de tetraiodomercurato de potássio (K_2HgI_4), a qual é obtida a partir da mistura de soluções de iodeto de potássio, iodeto de mercúrio (II) e hidróxido de sódio. A reação do reagente de Nessler com amônia produz um complexo de fórmula $NH_2-Hg_2I_3$, o qual possui coloração amarelo-pálido e é pouco solúvel em solução aquosa [95,96]. A medida do complexo formado é frequentemente realizada entre 400-450 nm, sendo proporcional à concentração de amônio [94].

Embora apresente alta sensibilidade e seletividade, este método sofre de diversos inconvenientes. Um deles é o fato de que o complexo formado é muito pouco solúvel em meio aquoso, sendo necessário um meio coloidal para a sua formação [94,95]. A reação necessita de condições bem controladas, caso contrário, a determinação pode produzir resultados errôneos. Sendo assim, alguns fatores devem ser bem controlados, como pH, temperatura da solução, tempo de desenvolvimento da cor, entre outros [95]. O método também sofre bastante com interferências devido à salinidade da amostra, presença de compostos orgânicos, espécies metálicas e turbidez da solução [95,97]. A determinação de amônio em baixas concentrações é bastante dificultada, porque o reagente de Nessler

apresenta por si próprio uma coloração amarela, mascarando o produto de reação e limitando sua detecção [94].

Cuidados com o próprio reagente de Nessler também devem ser tomados. A presença de metais na solução do reagente é crítico, pois causa turbidez na solução [95]. O reagente deve ser estocado no escuro, pois a sua exposição à luz aumenta a intensidade da cor do reagente, devido à oxidação de íons iodeto a iodo molecular [94]. No entanto, o principal inconveniente do reagente de Nessler está relacionado com a manipulação de um de seus componentes: o mercúrio. Trata-se, portanto, de um reagente altamente tóxico e poluente, gerando resíduos de difícil descartabilidade.

Outro método espectrofotométrico de ampla aplicação para a determinação de amônio é baseado na reação de Berthelot. Reportado pela primeira vez por Berthelot em 1859, este método de derivatização consiste das seguintes etapas: inicialmente, o íon amônio reage com hipoclorito em meio básico formando monocloramina, a qual reage com uma molécula de fenol formando a quinonacloramina. Nitroprussiato de sódio tem sido frequentemente empregado para acelerar esta primeira etapa do processo. Em seguida, a quinonacloramina formada reage com outra molécula de fenol produzindo o indofenol, o qual é um composto de azul intenso em meio básico [98–102]. Devido ao produto formado, este método também é conhecido como método do Azul de Indofenol. O conjunto de reações anteriormente descrito está esquematizado abaixo (Figura 3).

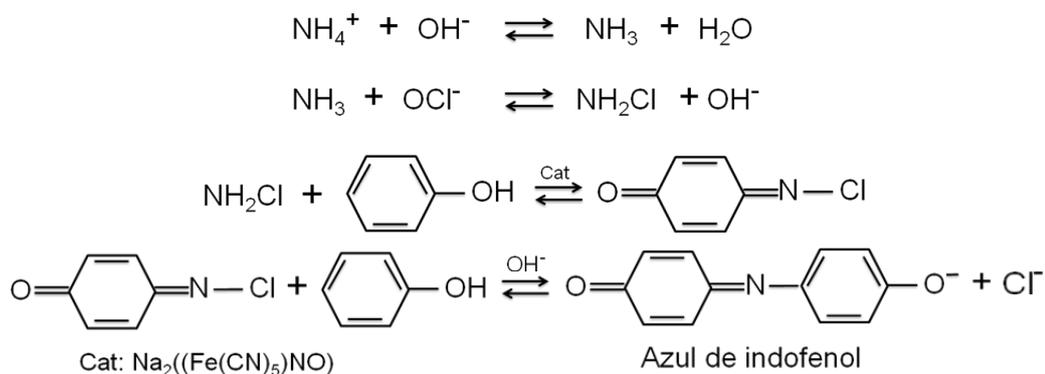


Figura 3. Esquema das etapas da reação de Berthelot.

Em sua versão original, a reação de Berthelot emprega o fenol como reagente, mas devido à sua toxicidade, a reação vem sofrendo modificações no sentido de substituir o fenol por outros reagentes, como, por exemplo, o timol. Neste caso, o

método passa a ser denominado método do Azul de Indotimol. Salicilato de sódio também tem sido empregado para a reação de Berthelot em substituição ao fenol. Outras modificações incluem: a ordem de adição dos reagentes; o emprego de outros agentes oxidantes, como o diclorocianurato de sódio e a cloramina T; e o emprego de outros catalisadores para acelerar a reação, como manganês (II) e pentacianonitrosilferrato de sódio [98–105].

Embora apresente alta seletividade e sensibilidade para a determinação de amônio, a reação de Berthelot também sofre com algumas limitações. Os valores de branco analítico são geralmente altos e variáveis. O método apresenta uma baixa precisão, com desvios em torno de 10%. A reação é bastante dependente do pH, da temperatura, da ordem de adição e concentração dos reagentes, além de sofrer com interferências de metais e alguns compostos nitrogenados [98,100,104].

Assim como o método baseado no reagente de Nessler, a reação de Berthelot também envolve a manipulação de reagentes tóxicos em sua versão original, na qual é empregado o fenol como reagente e o nitroprussiato de sódio como catalisador. Trata-se de compostos tóxicos e poluentes. Além disso, compostos intermediários ainda mais tóxicos que o fenol são formados durante a reação, a exemplo do ortoclorofenol [101,102].

Diversas estratégias têm sido desenvolvidas para aumentar a sensibilidade de métodos espectrofotométricos baseados na reação de Berthelot, a partir de procedimentos de extração e pré-concentração do indofenol ou indothimol. Métodos baseados na extração em fase sólida [106–111], na extração em ponto nuvem [112] e na extração líquido-líquido [113,114] são reportados na literatura para este propósito.

Métodos espectrofotométricos baseados na difusão gasosa através de membranas semi-permeáveis também são descritos na literatura para a determinação de amônio. Nestes métodos, o íon amônio é convertido em amônia com solução de NaOH. O gás NH_3 é permeado através de uma membrana semi-permeável para uma solução contendo um indicador ácido-base e a mudança de cor do indicador é monitorada, ou pode-se também usar a reação de Berthelot. Estes métodos têm sido frequentemente desenvolvidos em sistemas de análise em fluxo [109,115- 118].

Uma alternativa aos métodos espectrofotométricos convencionais consiste na oxidação de amônio a nitrito. A oxidação é realizada com íon hipoclorito em meio

básico na presença de íon brometo como catalisador. O nitrito formado a partir da oxidação de amônio é frequentemente determinado por meio da reação de Griess [119- 122].

A espectrofotometria em fase gasosa é também outra abordagem que tem sido usada para a determinação de amônio. Neste caso, o íon amônio é convertido a amônia pela mistura da amostra com solução de NaOH. O gás NH_3 formado é separado da fase líquida em um separador gás-líquido e conduzido para a medida de absorção molecular numa célula de quartzo [123].

Alguns autores também tem proposto o desenvolvimento de métodos indiretos para a quantificação de amônio [124,125].

Por fim, métodos espectrofotométricos baseados em sistemas de FIA e SIA para a determinação de amônio são extensivamente reportados na literatura [126-129].

Quimiluminescência

Métodos quimiluminescentes apresentam alta sensibilidade para a determinação de amônio, proporcionando limites de detecção que podem ser até mais baixos do que os métodos espectrofotométricos convencionais baseados na reação de Berthelot e Nessler [130]. Os métodos quimiluminescentes mais comuns são aqueles baseados no sistema de reagentes hipoclorito-luminol.

No método do luminol, o íon amônio é determinado indiretamente a partir da reação de oxidação com hipoclorito presente na reação quimiluminescente entre hipoclorito e luminol. O consumo de hipoclorito por amônio promove o decréscimo do sinal quimiluminescente. Diferentes estratégias usando sistemas em fluxo têm sido desenvolvidas empregando esta reação: luminol imobilizado sobre resina de troca aniônica com geração eletroquímica de cloro [131], uso de guias de onda com geração eletroquímica de hipoclorito [132], sistema em fluxo usando multi-bombas com unidade de difusão de gás [133] e sistema de análise em fluxo miniaturizado [134].

Outras reações quimiluminescentes também têm sido propostas para a determinação de amônio: a oxidação de amônio pelo íon hipobromito [135- 138], a reação de amônio com bis(2,4,6 triclorofenil) oxalato (TCPO) [139], com N-

bromosuccinimida (NBS) [137] e com o sistema de reagentes NBS-diclorofluoresceína [140].

A determinação de amônio por quimiluminescência em fase gasosa é mais outra proposta reportada na literatura. Inicialmente, íon amônio é oxidado por hipoclorito formando cloraminas. As cloraminas são separadas da fase líquida por um fluxo de ar e oxidadas a óxido nítrico, na temperatura de 600 °C, em um conversor de NO. Em seguida, o NO gerado reage com ozônio produzindo um sinal quimiluminescente [64].

Espectrofluorimetria molecular

Assim como os métodos quimiluminescentes, métodos fluorimétricos apresentam alta sensibilidade para a determinação de amônio, com limites de detecção menores que os métodos espectrofotométricos convencionais [130]. O método fluorimétrico baseado na reação de amônio com *o*-ftaldialdeído (OPA) na presença de um agente redutor, conhecido também como método de Roth, é o mais amplamente usado [141]. Este método foi primeiramente descrito por Marc Roth em 1971 [142] para a determinação fluorimétrica de aminoácidos, sendo posteriormente usado para a determinação de amônio [143].

Na reação original, Roth usou como redutor o 2-mercaptoetanol. Nesta reação, aminoácidos reagem com OPA na presença de 2-mercaptoetanol em meio básico produzindo compostos fluorescentes. De modo similar, amônio reage com OPA em meio básico formando um composto isoindol fluorescente, com medida da intensidade em 486 nm e excitação em 370 nm [141]. Atualmente, modificações na reação de Roth têm sido realizadas pela substituição do 2-mercaptoetanol por outros agentes redutores, tais como: sulfito [144- 147], N-acetil-cisteína [130,148,149], tioglicolato [150] e 1-tiol-D-glucose [148]. Abaixo, está esquematizada a reação de amônio com OPA em meio básico, tendo-se sulfito como agente redutor (Figura 4).

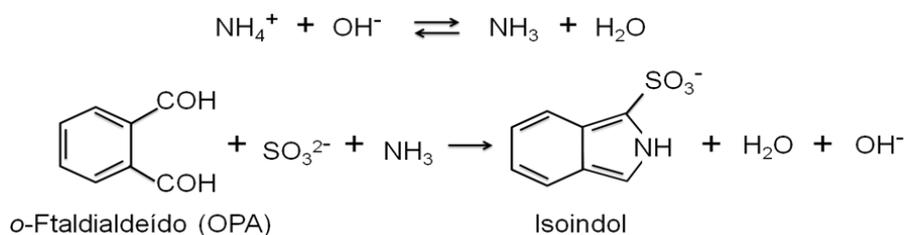


Figura 4. Esquema da reação envolvida no método modificado de Roth.

Outras propostas para a determinação fluorimétrica de amônio incluem: a determinação fluorimétrica baseada na excitação fotodissociativa de amônia [151], o desenvolvimento de sensores [75,152,153], o emprego de unidades de difusão de gás [144,154,155] o desenvolvimento de sistema em fluxo com guia de ondas [144] e sistema em fluxo miniaturizado usando multi-bombas [146].

Outras técnicas espectrométricas

Técnicas como a MECA, a AAS, a espectroscopia de reflectância difusa e ICP OES são também técnicas espectrométricas que têm sido empregadas para a determinação de amônio. No entanto, poucos são os métodos reportados na literatura que empregam estas técnicas.

Nos métodos que empregam MECA, íon amônio é convertido em amônia pela mistura da solução da amostra com NaOH sólido, o qual é adicionado no recipiente usado para a volatilização. A amônia formada é transferida por um fluxo de N₂ para dentro de uma cavidade, na qual é feita a medida de emissão em chama de hidrogênio-nitrogênio. Limites de detecção de 1,0 e 1,5 µg mL⁻¹ de N-amônio são reportados na literatura quando esta técnica é empregada [92,156].

Semelhante à determinação de nitrito e nitrato, amônio também pode ser determinado por métodos indiretos ou por medida de absorção molecular quando a técnica de AAS é empregada. Bond e Willis [157] observaram que a absorvância de zircônio em chama de ar-N₂O foi enriquecida na presença de amônio, sendo a magnitude do enriquecimento proporcional à concentração de amônio. Um método indireto foi desenvolvido pelos autores para a determinação indireta de amônio baseado na medida do enriquecimento da absorvância de Zr. A medida de absorção molecular tem sido realizada em fase gasosa após a conversão de amônio a amônia com solução de NaOH. Adaptação de equipamentos de AAS é feita pela remoção do cabeçote e substituição do mesmo por uma célula de absorção. Lâmpada de deutério ou de cátodo oco de H₂ pode ser usada para a medida de absorção molecular [158,159].

Moliner-Martínez et al. desenvolveram um método baseado na extração do azul de indotimol em membrana de fase sólida C-18 para a quantificação de amônio, mediante a medida direta sobre a superfície da membrana por espectroscopia de

reflectância difusa. Um limite de detecção de $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi obtido para amônio [160].

Métodos empregando a técnica de ICP OES também são encontrados na literatura. Alder et al. propuseram um método baseado na oxidação de íon amônio a nitrogênio por hipobromito. O gás N_2 gerado foi introduzido no plasma para medida da emissão de NH em 336 nm. O método apresentou um limite de detecção de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de N-amônio [161]. Um sistema de geração de hidreto foi usado em conjunção com um ICP OES por Jaber et al. [162] para a determinação quantitativa de amônio. Amônia gerada a partir da reação do íon amônio com NaOH, foi transferida para o plasma de argônio para a detecção em 174,273 nm. Limites de detecção na faixa de $10\text{-}25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de N-amônio.

CAPÍTULO III: ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR COM FONTE CONTÍNUA DE ALTA RESOLUÇÃO

O desenvolvimento de espectrômetros com fonte contínua de alta resolução representa o que a de mais novo e revolucionário no campo da AAS. Estes equipamentos utilizam uma lâmpada de arco curto de xenônio como fonte de radiação contínua, a qual apresenta emissão de radiação de alta intensidade em uma ampla faixa do espectro eletromagnético, entre 190 e 900 nm. Deste modo, uma única fonte de radiação é utilizada para todos os elementos, estando disponíveis linhas para a determinação de elementos para os quais as fontes de linha (lâmpadas de cátodo oco) não estão disponíveis em AAS convencional. Outra característica destes equipamentos é a alta resolução proporcionada por um monocromador duplo *Echelle* (DEMON) constituído por um prisma, o qual é responsável por uma pré-dispersão da radiação, e uma rede de difração *Echelle*, a qual realiza a fina dispersão dos comprimentos de onda, conferindo alta resolução à técnica. Este parâmetro torna a técnica mais livre de interferências espectrais. Além disso, estes equipamentos contam com um detector de arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD), o qual permite uma visualização do ambiente espectral ao redor da linha analítica, proporcionando informações analíticas bastante úteis.

O espectro gerado pela absorção de moléculas é relativamente mais complexo do que aquele gerado por átomos. Um espectro atômico é gerado exclusivamente pela transição eletrônica de seu estado fundamental para o estado excitado. Logo, esse tipo de espectro é caracterizado por linhas bastante estreitas. No caso de uma molécula, o espectro de absorção torna-se mais complexo devido às transições rotacional e vibracional. Desta forma, uma molécula possui um número de estados energéticos muito maior do que um átomo, apresentando o espectro molecular muito mais linhas e/ou bandas em uma ampla faixa espectral.

O emprego de uma lâmpada de arco curto de xenônio, como fonte de radiação, torna acessíveis “linhas” que são verdadeiramente de absorção de uma molécula. Esta característica faz da HR-CS AAS uma técnica bastante viável para a determinação de elementos não-metálicos a partir da medida de absorção molecular. No entanto, uma condição deve ser atendida: a absorção produzida pela molécula deve apresentar uma largura espectral compatível com aquelas produzidas por átomos. Esta é a situação produzida pela absorção de moléculas diatômicas, as

quais apresentam estrutura rotacional fina. Estas moléculas podem ser geradas a altas temperaturas em fornos de grafite e chamas. A técnica então passa a ser denominada de: espectrometria de absorção molecular com fonte contínua de alta resolução (HR-CS MAS).

Recentemente, o emprego de espectrômetros de HR-CS tem sido bastante promissor para o desenvolvimento de métodos visando a determinação de elementos não-metálicos, baseados na medida de absorção da radiação por moléculas diatômicas geradas em fornos de grafite e chama, tais como: fósforo, enxofre, nitrogênio e os halogênios. As Tabelas 4 e 5 apresentam uma breve revisão sobre estes métodos, incluindo informações sobre a molécula diatômica gerada, o comprimento de onda utilizado para a medida, limite de detecção e a matriz em que o método foi aplicado.

Tabela 4. Métodos baseados na absorção molecular em chama empregando espectrômetros com fonte contínua de alta resolução.

Elemento	Molécula diatômica	Comprimento de onda (nm)	Limite de detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Matriz	Referência
P	PO	324,62	1,3	CRM's de ferro fundido	163
S	CS	258,056	2,4	Vinho	164
S	CS	258,056	2,4	Vinho	165
S	CS	258,056	1,8	Vinho	166
S	CS	257,595; 257,958; e 258,056	15,1; 22,4; e 21.8	Fungicidas e fertilizantes	167
S	CS	258,056	21	Petróleo bruto e derivados	168
S	CS	258,056	0,03% (m/m)	Carvão	169
F	GaF	211,248	1,0	CRM de Superfosfato	170
F	AlF	227,4613	5,5	Creme dental	171
Cl	InCl	267,24	3,0	CRM's de sedimento marinho e leite em pó	172

Tabela 5. Métodos baseados na absorção molecular em forno de grafite empregando espectrômetro com fonte contínua de alta resolução.

Elemento	Molécula diatômica	Comprimento de onda (nm)	Limite de detecção	Massa característica	Matriz	Referência
N	NO	215,360	5 ng	-	CRM's de águas subterrâneas artificiais e fertilizante	90
P	PO	Nove linhas de PO monitoradas	20 µg g ⁻¹	-	CRM's de materiais biológicos	173
S	CS	258,056	0,015 µg	18 ng	CRM's de materiais biológicos	174
S	CS	258,056	14 ng	12 ng	Petróleo bruto e derivados	168
F	GaF	211,248	5,2 pg	7,4 pg	Água	175
F	GaF	211,248	5,2 pg	-	Creme dental	176
Br	AlBr	278,914	2 ng	-	Sal	177
Br	CaBr	625,315	2 ng	-	Soporífero (Bromazepam)	177
Br	CaBr	625,315	78 pg	-	Retardantes de chama polibromados	178
I	Bal	538,308	600 pg	-	Amostras farmacêuticas	179

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Desenvolver novos métodos baseados na geração de óxido nítrico (NO) para a determinação e análise de especiação de nitrogênio inorgânico em matrizes aquosas, empregando a espectrometria de absorção molecular com fonte contínua de alta resolução para a detecção.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver um método analítico para determinação de nitrito e nitrato em forno de grafite baseado na diferença de estabilidade térmica das espécies;

Desenvolver um método analítico baseado na geração química de NO para determinação de nitrito;

Desenvolver um método analítico baseado na geração química de NO para determinação de nitrito e amônio após a oxidação do íon amônio a nitrito;

Aplicar os métodos desenvolvidos para análise de amostras reais.

PARTE II: TRABALHO EXPERIMENTAL DESENVOLVIDO

CAPÍTULO I: DETERMINAÇÃO DE NITRITO E NITRATO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR COM FONTE CONTÍNUA DE ALTA RESOLUÇÃO USANDO VAPORIZAÇÃO ELETROTÉRMICA

1.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1.1.1. Instrumentação

O equipamento utilizado para as medidas de absorção molecular foi um espectrômetro com fonte contínua de alta resolução, Modelo ContrAA 700 da Analytik Jena AG (Jena, Alemanha), equipado com uma lâmpada de xenônio de arco curto XBO 301 com uma potência nominal de 300 W, operando no modo *hot-spot*, o qual é caracterizado pela formação de um pequeno plasma que emite radiação de alta intensidade (Figura 5). O equipamento dispõe de um atomizador eletrotérmico com tubo de grafite aquecido transversalmente e de um amostrador automático MPE 5 para a introdução de amostra (Analytik Jena AG). Tubos de grafite revestidos piroliticamente com plataforma integrada foram utilizados para as determinações e fornecidos pelo mesmo fabricante. Argônio (White Martins, Brasil) com 99,998% de pureza foi utilizado como gás de purga com uma vazão de 2,0 L min⁻¹ durante todas as etapas, exceto durante a vaporização, quando o fluxo foi interrompido. Todas as medidas foram realizadas por absorbância integrada usando a linha de NO em 215,360 nm e o sinal obtido com três pixels.



Figura 5. Espectrômetro com fonte contínua de alta resolução usado para as medidas de absorção molecular de NO.

O equipamento utilizado para as medidas cromatográficas de nitrito e nitrato foi um cromatógrafo de íons, Modelo ICS-1000, da Dionex (Thermo Scientific, São Paulo, Brasil). A quantificação foi realizada por medida de área dos picos cromatográficos.

1.1.2. Preparo de soluções padrões, reagentes e amostras

Todos os reagentes utilizados para o preparo de soluções foram de grau analítico. Água ultrapura foi obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio foram de qualidade Suprapur™ obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Toda a vidraria foi enxaguada com água deionizada e seca em um ambiente livre de poeira antes do uso.

Soluções estoque de nitrato e nitrito contendo $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrogênio foram preparadas pela dissolução de 607,1 mg de nitrato de sódio e 492,9 mg de nitrito de sódio, respectivamente, em água ultrapura. O volume foi completado com água ultrapura para 100 mL. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente a partir da diluição apropriada das soluções estoque em água ultrapura.

A solução de modificador de Ca 1% (m/v) foi preparada pela dissolução de 692,3 mg de cloreto de cálcio em água ultrapura para um volume final de 25 mL.

As amostras de água subterrânea foram coletadas na Cidade de Camaçari, Bahia, Brasil. Antes das análises, as amostras foram filtradas para remoção de partículas maiores que $0,2 \mu\text{m}$.

1.1.3. Procedimento para determinação de nitrito e nitrato por cromatografia de íons

Amostras de água subterrânea foram injetadas em uma corrente de eluente carbonato, o qual foi passado por uma coluna contendo um trocador de íons. Então, os íons de interesse foram separados com base nas suas afinidades relativas por um trocador de íons de baixa capacidade, fortemente básico. Em seguida, os íons separados foram passados por uma membrana de troca catiônica de fibra oca (supressor de fibra) ou por um supressor de micro membrana, banhados numa solução regeneradora em fluxo constante. Dessa forma, os íons separados foram convertidos em suas formas ácidas, altamente condutoras, enquanto que o eluente

carbonato foi convertido a ácido carbônico fracamente condutor. Os ânions separados foram identificados com base em tempos de retenção, por comparação com padrões, e medidos por condutividade. A quantificação foi realizada por medida de área dos picos cromatográficos.

1.1.4. Procedimento para determinação de nitrito e nitrato por HR-CS ET MAS

O procedimento para determinação de nitrato e nitrito por HR-CS ET MAS compreende duas etapas simples:

1) A primeira etapa consiste na determinação de nitrato, a qual é realizada pela injeção de 20 μL de amostra, mais 5 μL de modificador químico CaCl_2 e 5 μL de ácido clorídrico 0,3% (v/v) co-injetados;

2) A segunda etapa consiste na determinação total das espécies pela oxidação do nitrito a nitrato, a qual é realizada pela adição de peróxido de hidrogênio na amostra na concentração final de 0,75% (v/v).

A concentração de nitrito é obtida por diferença. A curva de calibração foi estabelecida utilizando padrões aquosos contendo nitrato. Para a análise, a solução de HNO_3 0,5% (v/v), que é frequentemente utilizada para a limpeza do sistema do amostrador automático, foi substituída por água deionizada, desde que ácido nítrico também gera moléculas de NO, contribuindo para significativos valores do branco analítico. Na Figura 6, é apresentado um diagrama esquemático do procedimento descrito. O programa de aquecimento do forno de grafite é mostrado na Tabela 6.

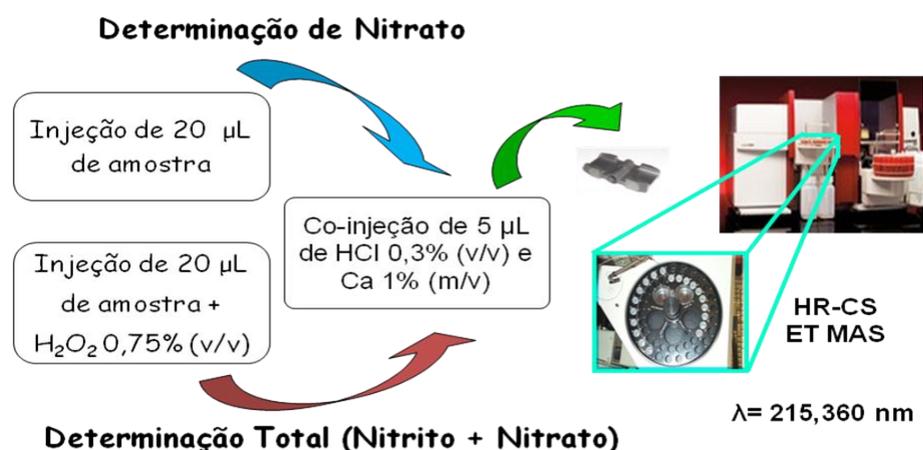


Figura 6. Diagrama esquemático do procedimento proposto para a determinação de nitrito e nitrato por HR-CS ET MAS.

Tabela 6. Programa de aquecimento do forno usado no método proposto.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Permanência (s)
Secagem1	90	3	20
Secagem2	110	5	20
Pirólise	150	50	20
Vaporização	1300	1500	8
Limpeza	2000	500	3

1.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.2.1. Otimização das condições eletrotérmicas

Inicialmente, estudou-se o efeito da temperatura de vaporização sobre a formação de moléculas de NO para o intervalo de temperatura de 900 a 2000 °C, usando uma solução de nitrato de sódio contendo $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrogênio. A temperatura de pirólise foi mantida em 300 °C para este estudo. A Figura 7 mostra a curva de vaporização de nitrato na faixa de temperatura estudada. Como pode ser observado, o sinal de absorvância integrada diminui com o aumento da temperatura de vaporização. Uma diminuição de aproximadamente 50% no sinal analítico foi observada na temperatura de 2000 °C. Este comportamento era esperado por causa da baixa estabilidade térmica das moléculas de NO. No entanto, melhor perfil de vaporização, caracterizado por um pico estreito e sinal de fundo baixo, foi obtido para temperaturas acima de 1000 °C. Desta forma, a temperatura de 1300 °C foi selecionada como um compromisso entre sensibilidade e perfil de vaporização. Na Figura 7 também é mostrada a curva de pirólise, a qual foi obtida entre 150 e 500 °C, com a temperatura de vaporização fixada em 1300 °C. Foi observada uma drástica redução do sinal de absorvância com o aumento da temperatura de pirólise. Esse resultado também já era esperado, uma vez que os sais de nitrato apresentam baixa estabilidade térmica. Assim, uma temperatura de pirólise de 150 °C foi estabelecida para estudos posteriores.

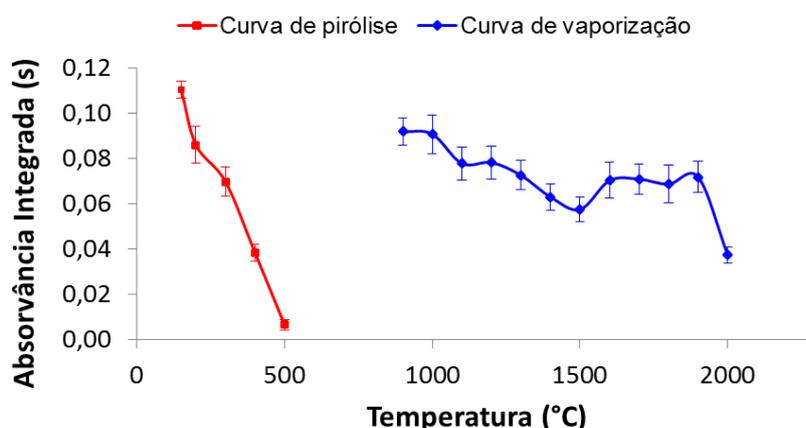


Figura 7. Efeito das temperaturas de pirólise e vaporização sobre o sinal analítico de NO para uma solução de nitrato contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de N e Ca como modificador.

1.2.2. Otimização das condições químicas

Têm-se aqui os parâmetros que foram essenciais para a determinação de nitrito e nitrato em forno de grafite: concentração de ácido clorídrico co-injetado e concentração de peróxido de hidrogênio adicionado ao padrão ou amostra.

Primeiro, o efeito da concentração de HCl sobre o comportamento térmico de nitrito e nitrato foi investigado no intervalo de 0 a 0,6% (v/v). Esse estudo foi realizado utilizando soluções de nitrito e nitrato contendo $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de nitrogênio. Os resultados deste estudo são apresentados na Figura 8. O sinal de nitrito foi de cerca de 80% do sinal de nitrato na ausência de ácido. No entanto, uma concentração de HCl de 0,1% foi suficiente para suprimir quase que completamente o sinal de nitrito, enquanto que o sinal de nitrato sofreu uma redução de apenas 20% até a concentração de ácido de 0,6% (v/v). A concentração de HCl co-injetado de 0,3% (v/v) foi selecionado para assegurar a robustez do método, já que o sinal de nitrito sofreu uma redução de 95% e o sinal de nitrato foi reduzido em apenas 8% nesta concentração de ácido.

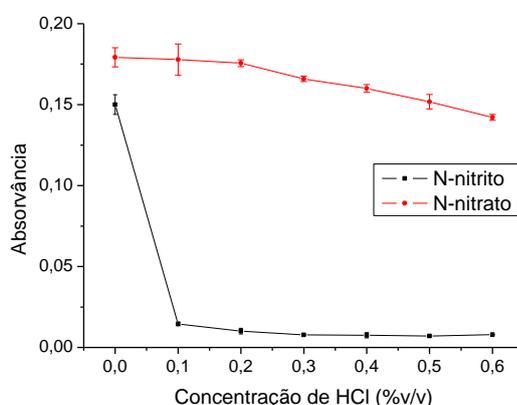


Figura 8. Efeito da concentração de HCl sobre o sinal analítico de absorção molecular de NO de soluções de nitrito e nitrato contendo $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de N, em forno de grafite.

Esta diferença de estabilidade térmica encontrada entre as espécies na presença de ácido pode ser explicada da seguinte maneira: íon nitrito é derivado de um ácido fraco, o ácido nitroso ($\text{pKa} = 3,29$). Quando presente em soluções de ácidos fortes, íon nitrito é facilmente convertido em ácido nitroso devido ao equilíbrio ácido-base. Ácido nitroso é uma espécie altamente volátil, sendo facilmente

eliminado durante a etapa de pirólise. Enquanto isso, íon nitrato é derivado de um ácido forte, o ácido nítrico. Assim, íon nitrato não é convertido em ácido nítrico como íon nitrito é convertido em ácido nitroso.

A segunda etapa consistiu em avaliar a influência da concentração de peróxido de hidrogênio sobre a oxidação do nitrito a nitrato. Este estudo foi realizado no intervalo de concentração de peróxido de hidrogênio de 0 a 1,5% (v/v) adicionado às soluções de nitrito e nitrato contendo $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de nitrogênio. Observou-se que uma concentração de 0,25% (v/v) de peróxido de hidrogênio já é suficiente para a oxidação do nitrito a nitrato, como mostrado na Figura 9. Desta forma, uma concentração de 0,75% (v/v) foi escolhida para assegurar a robustez do método.

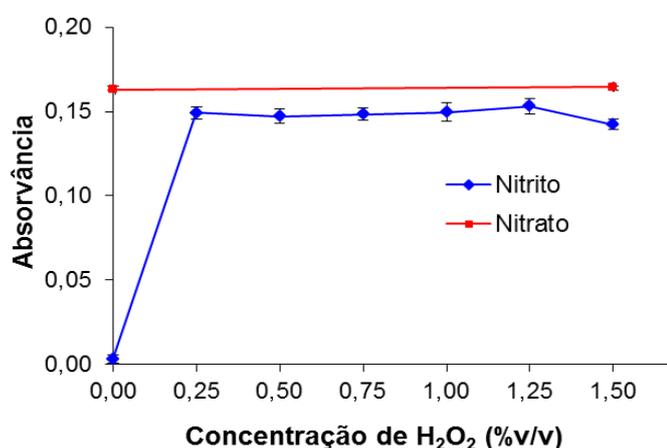


Figura 9. Estudo da concentração de H₂O₂ usado para a oxidação de nitrito a nitrato em soluções contendo $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de N, como nitrito, e medida realizada por absorção molecular de NO, em forno de grafite.

1.2.3. Estudo de interferência

O estudo de interferência foi realizado pela adição de potenciais interferentes às soluções de nitrito ou nitrato contendo $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrogênio. O sinal analítico de NO em cada uma destas soluções foi comparado com o sinal obtido a partir de soluções padrões de nitrito ou nitrato sem adição das espécies investigadas. Tolerância foi definida como a máxima proporção entre a concentração de nitrito ou nitrato e a concentração da espécie de potencial interferência, a qual produz um erro menor do que 10% no sinal de NO. Sendo assim, nenhuma interferência foi observada para nitrito e nitrato a partir de ânions, bem como:

carbonato, fosfato, sulfato, sulfito, fluoreto, brometo e iodeto, para uma proporção de 1:100. Alguns cátions metálicos também foram investigados como potenciais interferentes na determinação de nitrito e nitrato. Nenhuma interferência foi observada para nitrito a partir de cobre, potássio, níquel e zinco, para uma proporção de 1:100, e de manganês, para uma proporção de 1:10. Para nitrato, nenhuma interferência foi observada a partir de cobre, potássio e zinco, para uma proporção de 1:100, e de manganês e níquel, para uma proporção de 1:10. Ácidos húmico e fúlvico também foram investigados e nenhuma interferência foi observada para nitrito e nitrato, considerando uma proporção de 1:10.

A salinidade também foi investigada como uma fonte potencial de interferência na determinação de nitrito e nitrato por HR-CS ET MAS, no sentido de avaliar a viabilidade de aplicação do método para análises de amostras de águas salinas e salobras. Para isso, NaCl foi adicionado na faixa de concentração de 1-5% (m/v) em soluções de nitrito ou nitrato contendo $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrogênio, sendo adotado o mesmo critério de erro descrito no parágrafo anterior. Nenhuma interferência foi observada para ambos os analitos em todo o intervalo de concentração de NaCl avaliado. Isto significa que o método proposto também pode ser satisfatoriamente aplicado para a análise de amostras de águas salinas e salobras.

1.2.4. Características analíticas do método

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram de $0,10$ e $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrogênio, respectivamente, sendo calculados como três e dez vezes o desvio padrão de dez medidas do branco, divididos pela inclinação da curva obtida utilizando solução de nitrato. A precisão, estimada como desvio padrão relativo (RSD), foi de 7,5 e 3,8% ($n = 10$) para amostras de água subterrânea contendo 1,9 e $15,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de N-nitrato, respectivamente. A curva de calibração foi linear de LD até a concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de N-nitrato.

No sentido de verificar a eficiência de separação das espécies, bem como o processo de oxidação de nitrito a nitrato, três sistemas de calibração foram avaliados:

- 1) Curva analítica obtida a partir de uma solução de nitrato contendo $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrogênio;

2) Curva analítica obtida a partir de uma solução de nitrato mais nitrito contendo $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrogênio total, e;

3) Curva analítica obtida a partir de uma solução de nitrito contendo $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrogênio mais peróxido de hidrogênio 0,75% (v/v).

Todas as curvas analíticas foram obtidas para o intervalo de concentração de nitrogênio entre $2,0$ e $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, as quais são apresentadas na Figura 10.

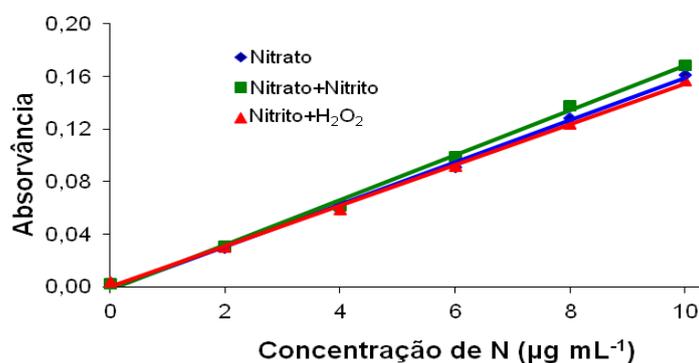


Figura 10. Curvas de calibração obtidas para diferentes sistemas.

A Tabela 7 também apresenta as inclinações das curvas com seus respectivos coeficientes de correlação, como intervalo de confiança. As inclinações das curvas obtidas para os três sistemas avaliados não apresentaram diferenças significativas ao nível de confiança de 95%. A concordância encontrada entre as inclinações das curvas demonstra que nitrito é completamente eliminado no sistema 2 e completamente oxidado a nitrato no sistema 3. Estes resultados mostram que a calibração do método pode ser realizada utilizando uma solução de padrão contendo apenas nitrato para a quantificação de ambas as espécies de nitrogênio.

Tabela 7. Inclinações das curvas e coeficientes de correlação.

Sistema	Inclinação ($\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$)	Coefficiente de correlação
Nitrato	$0,0160 \pm 0,0012$	$0,9986 \pm 0,0040$
Nitrato + Nitrito	$0,0170 \pm 0,0012$	$0,9987 \pm 0,0041$
Nitrito + H ₂ O ₂	$0,0155 \pm 0,0009$	$0,9991 \pm 0,0032$

1.2.5. Aplicação do método proposto

O método proposto foi aplicado para a determinação de nitrito e nitrato em dez amostras de água subterrânea. Com a finalidade de verificar a exatidão do método proposto, os resultados foram comparados com aqueles obtidos pelo método da cromatografia de íons. As concentrações de N-nitrato variaram de 0,58 a 15,2 mg mL⁻¹. Em todas as amostras analisadas, as concentrações de N-nitrito foram abaixo do limite de quantificação de ambos os métodos. Teste de adição/recuperação de N-nitrito também foi realizado para validação. As recuperações obtidas para nitrito foram na faixa de 94-116%. Todos estes resultados são apresentados na Tabela 8. Nenhuma diferença significativa foi observada entre as concentrações de N-nitrato obtidas pelo método proposto e aquelas obtidas pelo método da cromatografia de íons. Aplicando-se teste *t*-pareado ao nível de confiança de 95%, o *t* calculado foi de 1,98, enquanto que o *t* crítico foi de 2,26.

O método da regressão linear foi também aplicado para comparar os resultados obtidos pelo método proposto (HR-CS ET MAS) e o método da cromatografia de íons (IC). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os resultados obtidos por ambos os métodos, uma vez que os coeficientes da inclinação, interseção e correlação calculados não diferem significativamente dos valores "ideais" de 1, 0 e 1, respectivamente, como mostrado na equação abaixo:

$$[\text{HR-CS ET MAS}] = 0,9626 \pm 0,0413 [\text{IC}] - 0,0061 \pm 0,2772, r = 0,9986 \pm 0,1852$$

De acordo com a legislação brasileira, os limites máximos estabelecidos para nitrito e nitrato em águas doces são de 1 e 10 mg mL⁻¹, como N-nitrito e N-nitrato, respectivamente [9]. Deste modo, a amostra 5 de água subterrânea apresentou uma concentração de N-nitrato acima do limite máximo estabelecido.

Tabela 8. Resultados da determinação de nitrito e nitrato em água subterrânea por HR-CS ET MAS e por cromatografia de íons.

Amostra	Concentração de N-NO ₃ ⁻ (µg mL ⁻¹)		Concentração de N-NO ₂ ⁻ (µg mL ⁻¹)		
	HR-CS ET MAS	Cromatografia de Íons	Adicionado	Encontrado	Recuperação (%)
1	2,6 ± 0,1	2,4	2,0	2,0	100
2	2,0 ± 0,2	2,3	2,0	1,9	95
3	2,3 ± 0,2	2,6	2,0	2,3	115
4	1,9 ± 0,1	2,0	2,0	2,1	105
5	15,2 ± 0,6	16,0	5,0	4,9	98
6	10,1 ± 0,6	10,0	5,0	5,2	104
7	4,8 ± 0,5	4,9	5,0	5,1	102
8	1,5 ± 0,1	1,7	2,0	2,1	105
9	0,58 ± 0,09	0,48	1,0	0,94	94
10	6,3 ± 0,4	6,8	5,0	5,8	116

1.3. CONCLUSÕES

O método proposto demonstrou ser uma interessante e atraente alternativa para a determinação de nitrito e nitrato em água subterrânea. Embora apresente limite de quantificação maior do que os métodos convencionais baseados em cromatografia e espectrofotometria de absorção molecular no UV/Vis, o método proposto ainda é adequado para a análise de águas de acordo com os limites máximos estipulados por órgãos governamentais. Além disso, o método proposto oferece algumas vantagens em relação aos métodos convencionais, tais como: baixo consumo de amostras e reagentes, seletividade, frequência analítica relativamente alta e o uso de reagentes de baixa toxicidade. Entretanto, a principal vantagem deste método reside na sua simplicidade: nenhuma etapa de separação é necessária antes da análise instrumental. A separação das espécies ocorre no próprio forno de grafite durante a medida, devido à diferença de estabilidade térmica entre as espécies. Além disso, o método proposto tem exatidão adequada para a determinação de nitrito e nitrato em amostras de água subterrânea, uma vez que as concentrações estavam de acordo com aquelas obtidas pelo método da cromatografia de íons.

CAPÍTULO II: GERAÇÃO QUÍMICA DE NO PARA A DETERMINAÇÃO DE NITRITO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR COM FONTE CONTÍNUA DE ALTA RESOLUÇÃO

2.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1.1. Instrumentação

O equipamento utilizado para a medida de absorção molecular de NO foi um espectrômetro com fonte contínua de alta resolução, Modelo ContrAA 700 da Analytik Jena AG (Jena, Alemanha), equipado com uma lâmpada de xenônio de arco curto operando em modo de hot-spot como fonte de radiação contínua. A linha de NO em 215,360 nm foi usada para as medidas de absorção molecular. Todas as medidas foram realizadas por altura de pico e o sinal obtido usando três pixels. Um sistema HS 50 para Hg/hidreto (Analytik Jena AG) foi usado para a geração química de NO (Figura 11). O sistema consiste de um recipiente com fundo cônico de PTFE para reação e um recipiente para distribuição do redutor com volume de 300 mL. A injeção do redutor foi realizada pneumaticamente em modo de batelada. A medida de absorção molecular foi realizada em célula de tubo de quartzo (Analytik Jena AG), com 140 mm de comprimento e diâmetros internos de 16 mm nas extremidades e 8 mm no centro. A célula foi colocada em um suporte disposto sobre o queimador de 50 mm. Argônio (White Martins, Brasil) com 99,998% de pureza foi usado como gás de purga e de transporte com vazões de 12 e 15 L h⁻¹, respectivamente.



Figura 11. Sistema HS 50, acoplado ao HR-CS AAS, usado para a geração química de NO a partir da redução de nitrito.

Para as medidas de espectrofotometria de absorção molecular de nitrito, foi usado um espectrofotômetro de absorção molecular UV/Vis, Modelo SP-22, da Biospectro (Unity Instrumentos, São Paulo, Brasil). A reação de Griess foi empregada para derivatização e todas as medidas foram efetuadas no comprimento de onda máximo em 540 nm do azocomposto formado.

2.1.2. Reagentes, padrões e amostras

Todos os reagentes utilizados para o preparo das soluções foram de grau analítico. Água ultrapura foi obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Ácido clorídrico, ácido ascórbico e iodeto de sódio foram de qualidade Suprapur™ obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Solução estoque de nitrito de 1000 mg mL^{-1} foi preparada pela dissolução de 150,0 mg de nitrito de sódio (Merck) em água ultrapura para um volume final de 100 mL. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente pela adequada diluição da solução estoque com água ultrapura e volume completado para 10 mL com água ultrapura.

As amostras de água (água de poço, água de rio e água potável) foram coletadas na Cidade de Cachoeira, Bahia, Brasil. Antes das análises, as amostras de água de rio e potável foram filtradas em papel de filtro, utilizando aparelhagem para filtração por gravidade.

2.1.3. Procedimento para otimização do método proposto

As seguintes variáveis foram investigadas para a otimização do método: tipo e concentração de agente redutor, concentração de ácido clorídrico, tempo de injeção de redutor e pressão de gás argônio. O estudo foi realizado utilizando metodologia univariada para um volume de solução padrão de 10 mL contendo $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de nitrito.

2.1.4. Procedimento para determinação espectrofotométrica de nitrito usando a reação de Griess

Um volume de 10,0 mL da amostra de água (água de poço, água de rio ou água potável) foi transferido para um frasco volumétrico. Em seguida, um volume 0,5 mL de solução contendo sulfanilamida 1,0% (m/v) e HCl 10% (v/v) foi adicionado. Um tempo de reação de 10 min foi aguardado. Depois, um volume de 0,5 mL de NED 0,1% (m/v) foi adicionado. Após um tempo de reação de 15 min, a medida do azocomposto formado foi efetuada no comprimento de onda de 540 nm.

2.1.5. Procedimento para determinação de nitrito pelo método proposto

Uma alíquota de 8,0 mL da amostra de água (água de poço, água de rio ou água potável) foi transferida para o frasco de reação e 2,0 mL de HCl 2,0 mol L⁻¹ foram adicionados. No sistema HS 50, um volume de 2,0 mL de uma solução de ácido ascórbico 1,5% (m/v) foi pneumáticamente injetado no recipiente de reação durante um tempo de 4 s. O óxido nítrico (NO) gerado a partir da redução de nitrito foi transportado para a célula de quartzo por um fluxo de gás argônio e a medida de absorção molecular de NO foi realizada durante um tempo de 30 s. Um diagrama esquemático desse procedimento é apresentado na Figura 12.

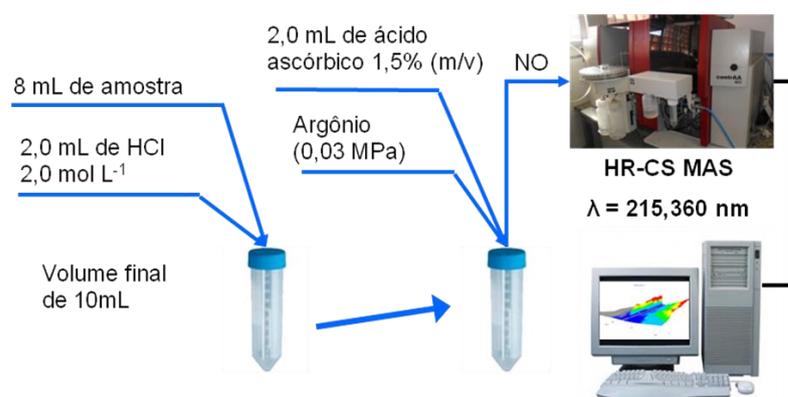
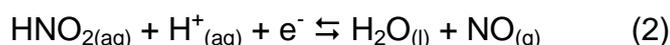


Figura 12. Diagrama esquemático do procedimento proposto para a determinação de nitrito a partir da geração química de NO.

2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1. Estudo das condições para geração química de NO

O processo de geração química de NO é baseado na reação de redução de nitrito em meio ácido, o qual pode ser representado pelas seguintes equações:



Inicialmente, ácido ascórbico e iodeto de sódio foram investigados como agentes redutores na faixa de concentração de 0,5-2,5% (m/v). Este estudo foi realizado para uma concentração de HCl de 0,2 mol L⁻¹, tempo de injeção de redutor de 4 s e pressão de gás argônio de 0,03 MPa. A Figura 13 apresenta o efeito da concentração do agente redutor sobre o sinal de absorção molecular de NO. Como pode ser observado, o sinal analítico foi aproximadamente constante em toda a faixa de concentração estudada para os dois agentes redutores. Ácido ascórbico foi selecionado para evitar a possível formação de precipitado que pode ocorrer com o uso de iodeto, devido à presença de alguns cátions metálicos que podem estar presentes na amostra, o que poderia interferir na medida. Uma concentração de 1,5% (m/v) de ácido ascórbico foi estabelecida para assegurar a robustez do método.

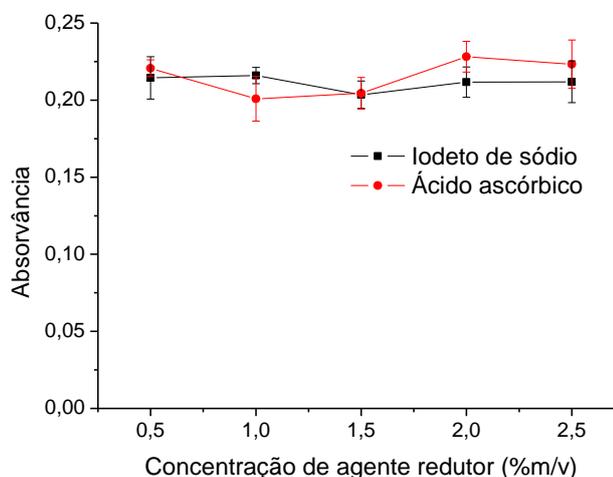


Figura 13. Estudo do tipo e concentração de redutor na geração química de NO.

Posteriormente, o efeito da concentração de HCl na geração química de NO foi estudada na faixa de 0,1-0,5 mol L⁻¹. Nenhuma diferença significativa foi observada no sinal analítico de NO na faixa de concentração de HCl estudada (Figura 14). No entanto, um meio ácido é necessário para redução de nitrito a NO, como já foi mostrado nas equações 1 e 2. Assim, uma concentração de HCl de 0,4 mol L⁻¹ foi estabelecida para os próximos estudos para assegurar a robustez do método.

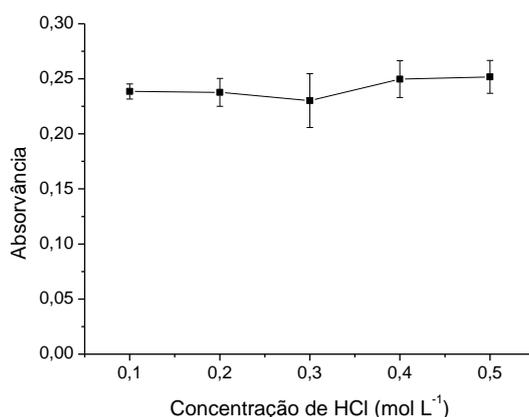


Figura 14. Estudo da concentração de HCl para a geração química de NO.

Após o estudo das variáveis químicas, a pressão de gás argônio e o tempo de injeção de redutor foram investigados. Na Figura 15 é mostrada a influência da pressão do gás argônio no sinal analítico de NO para os valores de pressão entre 0,03-0,15 MPa, uma vez que o sistema permite um máximo de pressão do gás de transporte de 0,20 MPa. O sinal analítico permaneceu constante até a pressão de 0,06 MPa e um aumento quase linear foi observado em pressões mais elevadas. O aumento do sinal analítico foi de cerca de 90% na pressão de 0,15 MPa.

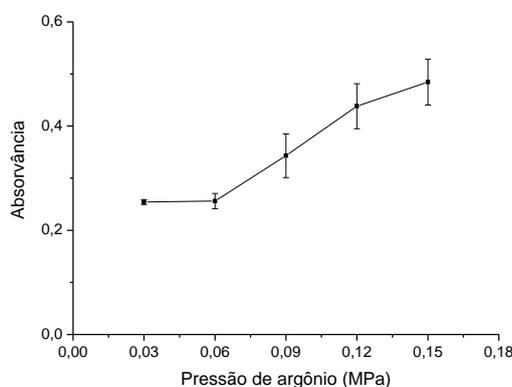


Figura 15. Efeito da pressão do gás de transporte sobre o sinal analítico de NO gerado a partir da redução de nitrito.

O aumento no sinal analítico é provavelmente devido ao aumento da velocidade do transporte de moléculas de NO do frasco de reação para a célula de quartzo, o qual é promovido pelo aumento da pressão do gás argônio. Desta forma, um número maior de moléculas de NO atinge a célula de quartzo em um intervalo de tempo menor. Este fato também pode ser explicado pela mudança no perfil do sinal analítico, como mostrado na Figura 16. O sinal de NO apresenta um comportamento aproximadamente contínuo na pressão de 0,03 MPa e, gradualmente, torna-se transiente com o aumento da pressão do gás de transporte. No entanto, uma pressão de gás muito elevada promove um fluxo mais turbulento, o que pode prejudicar a precisão do método. O aumento da pressão do gás de transporte é acompanhado por um aumento no desvio padrão da medida de NO (Figura 15). Os valores de desvio padrão relativo (RSD) foram de 1,8; 5,7; 12,2; 9,9 e 9,1% ($n = 3$), para as pressões de 0,03, 0,06, 0,09, 0,12 e 0,15 Mpa, respectivamente. Com base nesta informação, a pressão do gás argônio foi mantida em 0,03 MPa.

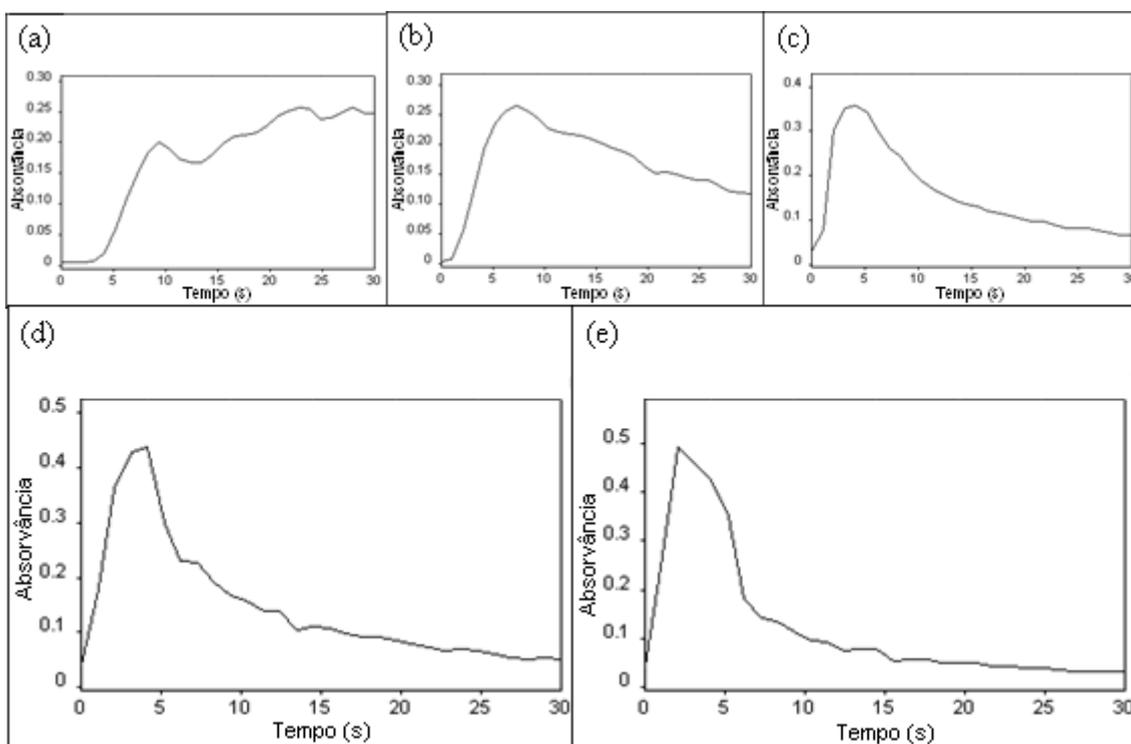


Figura 16. Influência da pressão do gás de transporte sobre o perfil do sinal analítico de NO gerado a partir da redução de nitrito: (a) 0,03, (b) 0,06 (c) 0,09, (d) 0,12 e (e) 0,15 Mpa.

Finalmente, o efeito do tempo de injeção de redutor na geração química de NO foi investigado. Tempos de injeção na faixa de 2-10 s foram avaliados e valores de absorvância mais altos foram obtidos para tempos de injeção acima de 2 s (Figura 17). Um tempo de injeção de redutor de 4 s foi mantido para estudos posteriores, havendo um compromisso entre sensibilidade e consumo de reagente. Este tempo de injeção corresponde a um volume injetado de 2,0 mL de solução de redutor.

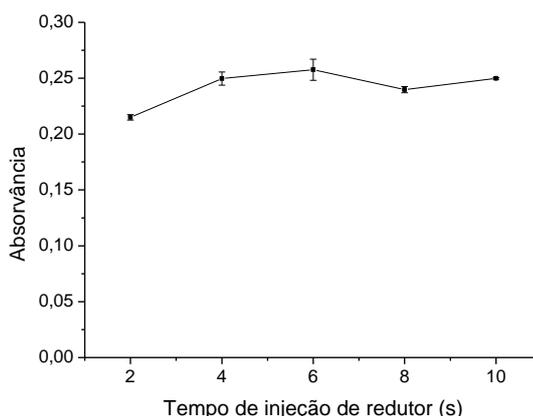


Figura 17. Influência do tempo de injeção de ácido ascórbico sobre a geração química de NO a partir da redução de nitrito.

2.2.2. Estudos complementares

2.2.2.1. Conversão de NO_2^- a HNO_2

Em meio aquoso, nitrito existe sob as formas iônica e molecular, respectivamente: NO_2^- (ion nitrito) e HNO_2 (ácido nitroso). Ambas as espécies coexistem devido ao equilíbrio ácido-base, como já mostrado na equação 1. Desta forma, a conversão de NO_2^- a HNO_2 pode ser investigada a partir da medida do sinal analítico de NO como função do pH do meio. O estudo foi realizado nas condições experimentais estabelecidas, exceto para o ácido clorídrico, o qual foi substituído por soluções tampão na concentração final de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Como pode ser observado na Figura 18, o sinal analítico de NO aumentou com a diminuição do pH do meio e tornou-se constante abaixo do pH 2,0.

O sinal relativo esperado da distribuição das espécies de nitrito em função do pH do meio também é mostrado na Figura 18. A constante de equilíbrio utilizada para o cálculo da distribuição das espécies foi de $5,13 \times 10^{-4}$ [180]. Os valores experimentais obtidos a partir do sinal analítico relativo de NO concordam satisfatoriamente com os valores teoricamente calculados. Além disso, estes resultados estão em concordância com aqueles obtidos no estudo da concentração de HCl, a qual foi investigada no intervalo de 0,1-0,5 mol L⁻¹, o que fornece valores de pH abaixo de 2,0.

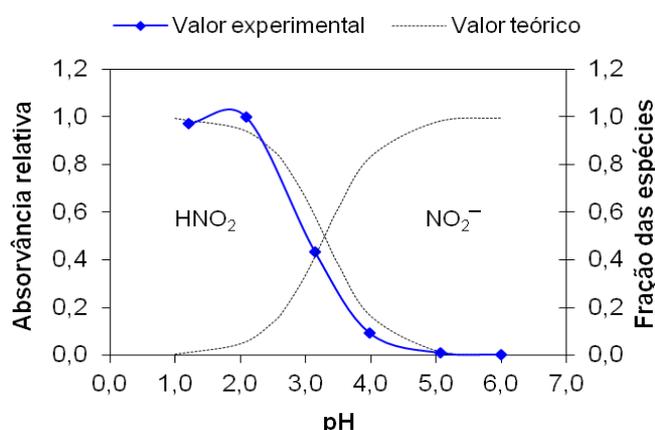


Figura 18. Estudo da distribuição das espécies de nitrito a partir da medida do sinal analítico de NO como função do pH do meio.

2.2.2.2. Estudo de interferentes

Algumas espécies foram investigadas como potenciais interferentes na determinação de nitrito a partir da geração química de NO. Os seguintes ânions foram investigados na forma de sais de sódio ou potássio: nitrato, sulfato, sulfito, fosfato, carbonato, fluoreto, brometo e iodeto. Dentre os cátions metálicos, foram investigados: cálcio, magnésio, potássio, cobre zinco, ferro (II), ferro (III) sob a forma de sais de nitrato ou sulfato. Além destas espécies, ácido húmico também foi investigado neste estudo. Todas as espécies foram avaliadas em uma concentração final de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para uma solução contendo $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrito. O nível de interferência foi considerado significativo para um desvio maior do que 10% no sinal analítico. Todos os resultados são apresentados na Figura 19.

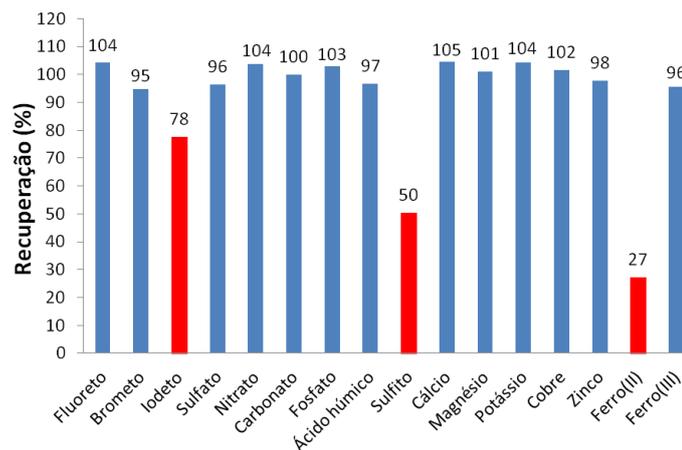


Figura 19. Estudo de potenciais interferentes na geração química de NO a partir da redução de nitrito.

Foi observada interferência somente para iodeto, ferro (II) e sulfito. Obviamente, estas espécies promovem a redução de nitrito a NO antes da medida instrumental, causando o decréscimo do sinal analítico. Além disso, foi observada interferência espectral para sulfito, que é notadamente visível no espectro obtido com a presença desta espécie (Figura 20). A interferência deve-se a liberação do gás SO₂ formado a partir do sulfito. Todas estas interferências estão representadas pelas equações mostradas abaixo:

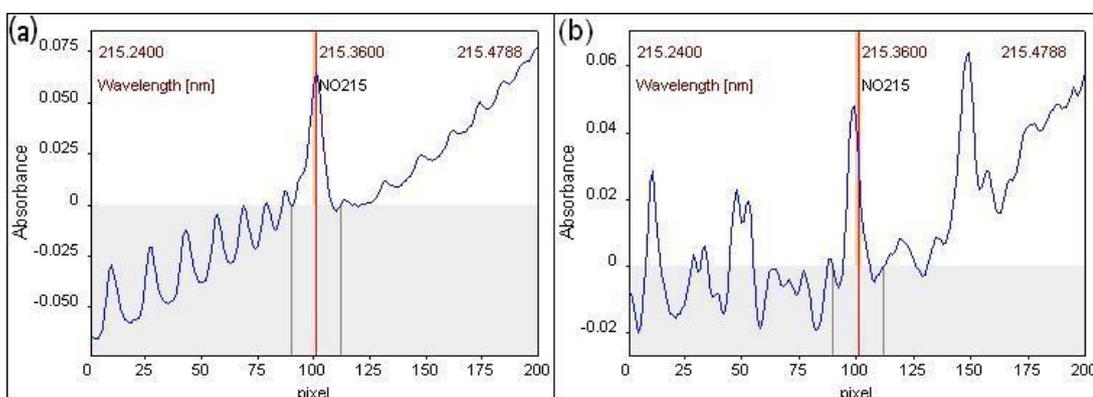
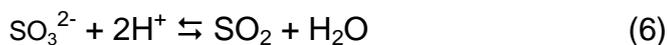
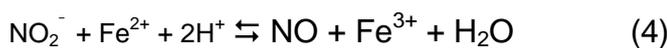
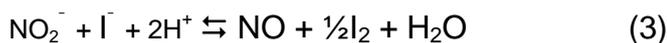


Figura 20. Espectros de absorção molecular obtidos durante o estudo de interferentes: (a) espectro obtido ao redor da linha de NO em 215,360 nm e (b) interferência espectral de SO₂ na linha de NO em 215,360 nm.

A salinidade foi também investigada como potencial interferente na determinação de nitrito. Para tal, concentrações de NaCl na faixa de 1-5% (m/v) foram avaliadas para uma solução contendo $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrito e o nível de interferência também foi considerado significativo para desvios de mais do que 10% no sinal analítico. A Figura 21 mostra o efeito da salinidade sobre o sinal analítico de NO. Sob essas condições, nenhuma interferência foi observada para nitrito em toda a faixa de concentração de NaCl avaliada. Este resultado demonstra que o presente método pode ser também aplicado para a análise de amostras salinas e salobras.

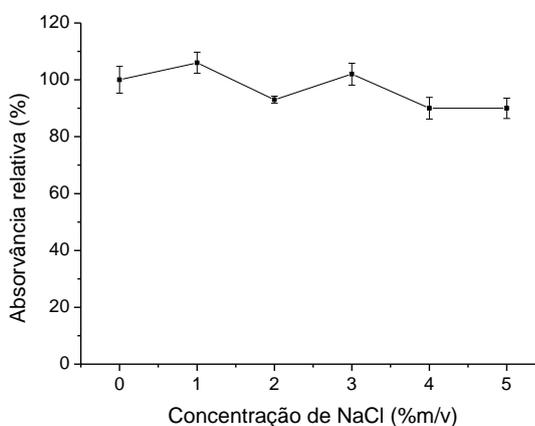


Figura 21. Efeito da salinidade sobre o sinal analítico de NO.

2.2.3. Características analíticas do método

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram de $0,045$ e $0,150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrito, respectivamente. Estes parâmetros foram calculados como três e dez vezes o desvio padrão do branco, respectivamente, divididos pela inclinação da curva analítica. A curva de calibração (Figura 22) foi linear em uma faixa de concentração de nitrito de $0,5$ até $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($r = 0,9989$). Precisão, estimada como desvio padrão relativo (RSD), foi de 3,5 e 4,4% para soluções com concentrações de nitrito de $0,5$ e $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Uma comparação do método proposto com outros métodos reportados na literatura é apresentada na Tabela 9. Todos estes métodos são baseados na medida de absorção molecular de espécies gasosas nitrogenadas visando a determinação de nitrito. No entanto, diferentes técnicas espectrométricas foram usadas para a detecção. O método proposto apresenta limite de detecção de $0,045 \mu\text{g mL}^{-1}$ e

tempo por replicata menor que 1 min. Estes parâmetros foram os mais baixos quando comparados com os métodos reportados na literatura (Tabela 9) [35-37], exceto para o método que emprega detecção por quimiluminescência que apresenta um limite de detecção menor. Embora também apresente um limite de detecção maior que o método espectrofotométrico convencional baseado na reação de Griess, o método proposto ainda oferece algumas vantagens, tais como: uso de reagentes menos tóxicos, maior simplicidade e menor tempo de análise.

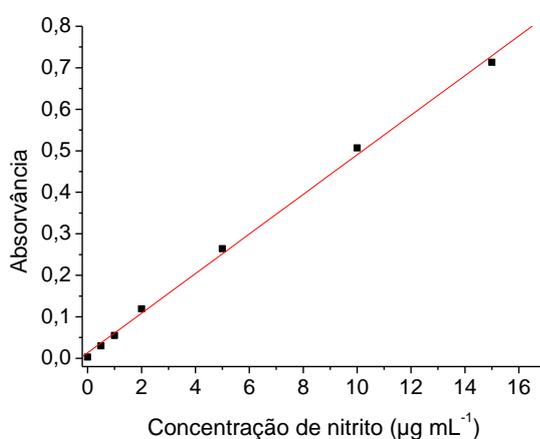


Figura 22. Curva de calibração obtida para nitrito usando o método proposto.

Tabela 9. Comparação do método proposto com outros métodos reportados na literatura.

Técnica de detecção	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Linearidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Tempo por replicata (min)	FIA	Amostra	Referência
Espectrofotometria UV	7,5	Até 1000	2	Sim	Água	35
Quimiluminescência	0,00035	0,003-0,7	1	Sim	Água	36
AAS	0,23	Até 65	Menos que 2	Não	Não especificado	37
HR-CS AAS	0,045	0,15-15	Menos que 1	Não	Água	Este trabalho

2.2.4. Aplicação do método proposto

O método proposto foi aplicado para a análise de diferentes amostras de água (água de poço, água de rio e água potável) coletadas na Cidade de Cachoeira, Estado da Bahia, Brasil. No sentido de avaliar a exatidão do método, as amostras foram também analisadas por espectrofotometria baseada na reação de Griess. Os resultados obtidos pelo método proposto foram concordantes com aqueles obtidos pelo método espectrofotométrico. Testes de adição/recuperação de analito foram também realizados para validação. As recuperações obtidas foram na faixa de 93-106%. Todos os resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Determinação de nitrito em amostras de água coletadas na cidade de Cachoeira, Bahia, pelo método proposto e por espectrofotometria usando a reação de Griess ($n = 3$, nível de confiança de 95%).

Amostra	Método proposto (HR-CS MAS)			Espectrofotometria
	Adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Encontrado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Água de poço 1	0,0	0,190±0,015	-	0,203±0,009
	0,300	0,478	96	-
Água de poço 2	0,0	0,292±0,031	-	0,300±0,004
	0,300	0,596	101	-
Água de rio 1	0,0	<LQ	-	<LQ
	0,200	0,193	96	-
Água de rio 2	0,0	<LQ	-	<LQ
	0,200	0,185	93	-
Água potável 1	0,0	<LQ	-	<LQ
	0,200	0,201	100	-
Água potável 2	0,0	<LQ	-	<LQ
	0,200	0,211	106	-

LQ = 0,150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para o método proposto empregando HR-CS MAS. LQ = 0,032 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para o método espectrofotométrico empregando a reação de Griess.

2.3. CONCLUSÕES

O método proposto demonstrou ser uma alternativa simples, rápida e viável para a determinação de nitrito em diferentes amostras de água. O método requer o uso de reagentes de menor toxicidade, apresenta maior simplicidade e menor tempo de análise em relação ao método espectrofotométrico baseado na reação de Griess. Além disso, o método apresentou parâmetros analíticos adequados para a análise de água, como precisão, exatidão e limite de quantificação. Todas as amostras apresentaram concentrações de nitrito abaixo dos níveis máximos estabelecidos por agências governamentais nacionais (Ministério da Saúde, Conselho Nacional do Meio Ambiente e Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e internacionais (Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana, União Europeia e Organização Mundial da Saúde).

CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO BASEADO NA GERAÇÃO QUÍMICA DE NO PARA A DETERMINAÇÃO DE NITRITO E AMÔNIO POR HR-CR MAS

3.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1.1. Instrumentação

O equipamento utilizado para a medida de absorção molecular de NO e os acessórios usados para a geração química de NO foram os mesmos descritos no capítulo anterior. No entanto, uma linha de NO em 214,803 nm foi usada para as medidas de absorção molecular, ao invés da linha 215,360 nm. Todas as medidas foram realizadas por altura de pico e o sinal foi obtido usando três pixels.

3.1.2. Reagentes e padrões

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Ácido clorídrico, ácido ascórbico, hidróxido de sódio e brometo de potássio foram de qualidade Suprapur™ obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Solução de hipoclorito de sódio 4-6% (m/m) foi obtida da Vetec. Esta solução foi periodicamente padronizada por um método iodométrico adaptado [181].

Soluções estoques de nitrito e amônio contendo 1000 mg mL⁻¹ de nitrogênio foram preparadas pela dissolução de 492,9 e 382,65 mg de nitrito de sódio (Merck) e cloreto de amônio (Merck), respectivamente, em água ultrapura para um volume final de 100 mL. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente pela diluição das soluções estoques com água ultrapura para um volume final de 10 mL.

3.1.3 Otimização das condições experimentais

Um planejamento fatorial de dois níveis foi aplicado para a avaliação dos fatores químicos envolvidos na reação de oxidação do amônio a nitrito. Estes fatores foram: concentração de NaClO, concentração de KBr e concentração de NaOH. O

tempo de reação de oxidação foi investigado usando metodologia univariada. Quanto ao processo de geração química de NO, um segundo planejamento fatorial foi aplicado e os seguintes parâmetros foram avaliados: concentração de ácido ascórbico, concentração de HCl e tempo de injeção de solução redutora. Em ambos os casos, um volume de 10 mL de solução contendo 5,0 mg mL⁻¹ de N-amônio foi usado durante todos os experimentos. Medida em triplicata do ponto central foi efetuada para avaliação do erro experimental. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória e o sinal de absorvância de NO foi usado como resposta analítica. Os resultados obtidos para cada planejamento foram processados no programa STATISTICA 6.0.

3.1.4. Procedimento para determinação de nitrito e amônio por HR-CS MAS

Uma alíquota de 5,0 mL de solução padrão foi transferida para um frasco de reação e os seguintes reagentes foram adicionados: 0,4 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹, 0,3 mL de NaClO 0,05 mol L⁻¹ e 0,3 mL de KBr 2% (m/v). A solução foi completada com água ultrapura para um volume final de 10,0 mL. Após um tempo de reação de 20 min, o frasco de reação foi conectado ao sistema HS 50 e um volume de 3,0 mL de uma solução redutora contendo ácido ascórbico 1,5% (m/v) e HCl 1,0 mol L⁻¹ foi pneumaticamente injetado, durante um tempo de 6 s. O óxido nítrico (NO) gerado a partir da redução de nitrito foi transportado para a célula de quartzo por um fluxo de gás argônio e a medida de absorção molecular de NO foi obtido por um tempo de 30 s. Para determinação de nitrito somente, foi realizado o mesmo procedimento, mas sem a adição dos reagentes usados para a oxidação de amônio a nitrito. Na figura 23 é apresentado o diagrama esquemático do procedimento descrito acima.

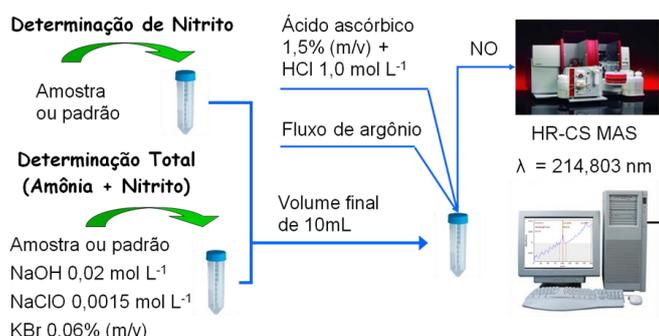


Figura 23. Diagrama esquemático do procedimento proposto para determinação de nitrito e amônio a partir da geração química de NO.

3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1. Estudo das condições para oxidação de amônio a nitrito

Para o processo de oxidação do íon amônio a nitrito, hipoclorito de sódio foi usado como agente oxidante em meio básico e íons brometo como catalisador da reação. Desta forma, um planejamento fatorial 2^3 foi aplicado para a avaliação da significância dos seguintes fatores químicos: concentração de hipoclorito de sódio ([ClO]), concentração de brometo de potássio ([KBr]) e concentração de hidróxido de sódio ([NaOH]). A Tabela 11 apresenta a matriz do planejamento fatorial com os resultados obtidos para cada experimento. Os níveis máximo, mínimo e o ponto central de cada fator são apresentados em valores reais e codificados.

Tabela 11. Matriz do planejamento fatorial 2^3 aplicado para a avaliação dos fatores químicos envolvidos na reação de oxidação de amônio a nitrito. Valores codificados entre parênteses.

Exp.	[ClO] (mol L ⁻¹)	[KBr] (%m/v)	[NaOH] (mol L ⁻¹)	Absorvância
1	0,0025 (+1)	0,10 (+1)	0,03 (+1)	0,50332
2	0,0025 (+1)	0,10 (+1)	0,01 (-1)	0,26766
3	0,0025 (+1)	0,02 (-1)	0,03 (+1)	0,44923
4	0,0025 (+1)	0,02 (-1)	0,01 (-1)	0,29562
5	0,0005 (-1)	0,10 (+1)	0,03 (+1)	0,17886
6	0,0005 (-1)	0,10 (+1)	0,01 (-1)	0,32516
7	0,0005 (-1)	0,02 (-1)	0,03 (+1)	0,03382
8	0,0005 (-1)	0,02 (-1)	0,01 (-1)	0,12937
9	0,0015 (0)	0,06 (0)	0,02 (0)	0,50588
10	0,0015 (0)	0,06 (0)	0,02 (0)	0,53198
11	0,0015 (0)	0,06 (0)	0,02 (0)	0,55127

De acordo com o gráfico de Pareto apresentado na Figura 24, os fatores [ClO] e [KBr] foram estatisticamente significativos para a reação de oxidação, bem como as interações [ClO]x[NaOH] e [ClO]x[KBr], considerando o domínio experimental estudado. Embora o fator [NaOH] não seja significativo, a partir do gráfico de Pareto para o intervalo estudado, esse fator apresenta uma influência bastante significativa quando são analisados os pares de experimentos 1-2 e 3-4, com efeito positivo, e 5-

6 e 7-8, com efeito negativo. O efeito contrário pode ser explicado pela forte interação que este fator possui com o fator [ClO]. O fator [NaOH] possui efeito positivo para o nível máximo de [ClO] e efeito negativo para o nível mínimo. Ainda de acordo com o gráfico de Pareto, a curvatura foi significativa considerando o domínio experimental avaliado. Isto significa que os resultados do planejamento não se ajustam ao modelo linear aplicado, havendo a necessidade da aplicação de um modelo de segunda ordem para ajustar os dados experimentais, através de metodologia de superfície de resposta. No entanto, uma curvatura significativa indica também que as condições ótimas da reação estão próximas do ponto central do planejamento. Analisando os resultados do planejamento, observa-se que valores mais altos de absorvância são obtidos com os experimentos do ponto central. Sendo assim, as condições do ponto central foram selecionadas para estudos posteriores.

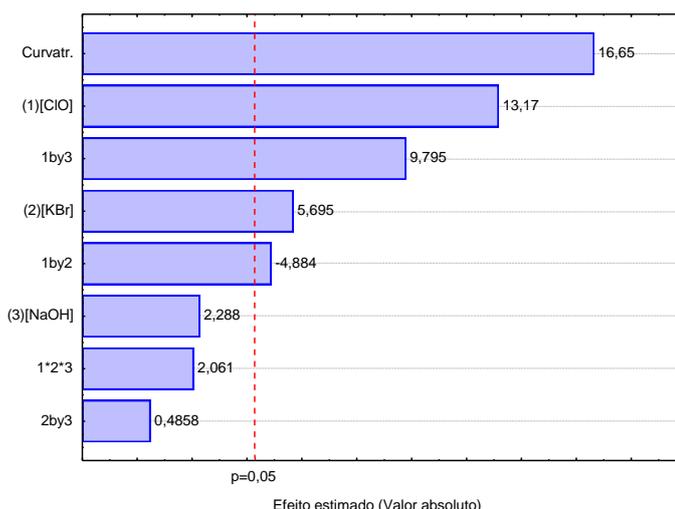


Figura 24. Gráfico de Pareto obtido para o planejamento fatorial aplicado para a reação de oxidação do íon amônio a nitrito.

O tempo de reação para a oxidação de amônio a nitrito foi avaliado na faixa de 0-30 min, mantendo-se os fatores químicos em seus valores centrais. Observa-se que o sinal analítico de NO aumenta linearmente entre o intervalo de tempo de 0 a 15 min, permanecendo-se constante entre o intervalo de tempo de 15 a 30min (Figura 25). Um tempo de reação de pelo menos 20 min foi estabelecido para a oxidação de amônio a nitrito.

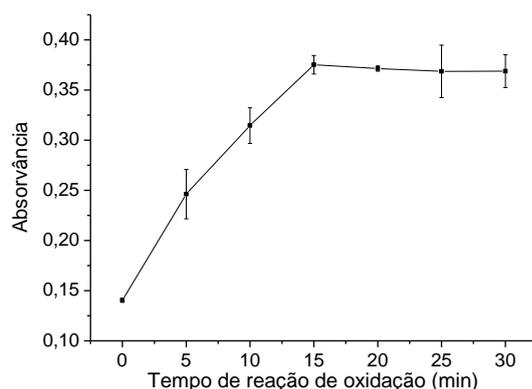


Figura 25. Estudo do tempo de reação de oxidação do íon amônio a nitrito.

3.2.2. Estudo das condições para geração química de NO

Um segundo planejamento fatorial 2^3 foi aplicado para avaliar a influência que algumas variáveis podem ter sobre o processo de geração química de NO. Os seguintes fatores foram investigados: concentração de ácido ascórbico ([AA]), concentração de ácido clorídrico ([HCl]) e tempo de injeção de solução redutora (TR). A matriz do planejamento fatorial com os resultados de absorvância é mostrada na Tabela 12.

Tabela 12. Matriz do planejamento fatorial 2^3 aplicado para avaliação dos fatores envolvidos na geração química de NO. Valores codificados entre parênteses.

Exp.	[HCl] (mol L ⁻¹)	[AA] (%m/v)	TR (s)	Absorvância
1	1,5 (+1)	2,0 (+1)	8 (+1)	0,50817
2	1,5 (+1)	2,0 (+1)	4 (-1)	0,40708
3	1,5 (+1)	1,0 (-1)	8 (+1)	0,55335
4	1,5 (+1)	1,0 (-1)	4 (-1)	0,37160
5	0,5 (-1)	2,0 (+1)	8 (+1)	0,52099
6	0,5 (-1)	2,0 (+1)	4 (-1)	0,34928
7	0,5 (-1)	1,0 (-1)	8 (+1)	0,57734
8	0,5 (-1)	1,0 (-1)	4 (-1)	0,32580
9	1,0 (0)	1,5 (0)	6 (0)	0,43595
10	1,0 (0)	1,5 (0)	6 (0)	0,40432
11	1,0 (0)	1,5 (0)	6 (0)	0,44910

O gráfico de Pareto obtido com este planejamento demonstra que somente a variável TR influencia significativamente o processo de geração química de NO, dentro do domínio experimental estudado (Figura 26). Desta forma, todas as outras variáveis foram mantidas em seu nível central, enquanto que TR foi estudada de forma univariada.

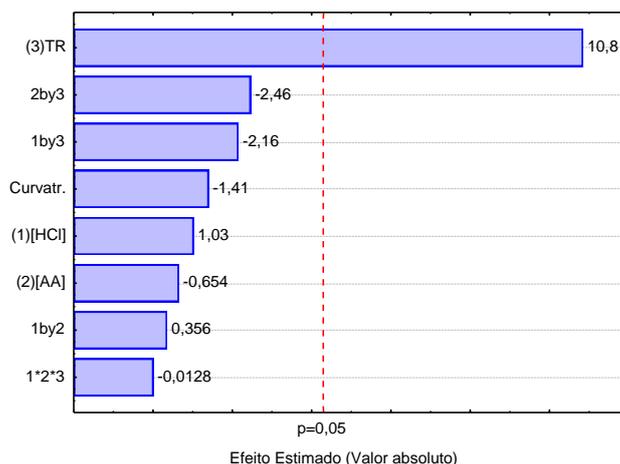


Figura 26. Gráfico de Pareto obtido para o planejamento fatorial aplicado no estudo da geração química de NO.

A Figura 27 mostra o efeito do tempo de injeção de solução redutora sobre a geração química de NO para tempos de injeção entre 4 e 12 s. Pode ser observado que o sinal de absorvância aumenta substancialmente com o aumento do tempo de injeção. No entanto, para tempos de injeção entre 8 e 12 s, houve também um aumento significativo no desvio padrão das medidas. Sendo assim, um tempo de injeção de 6 s foi estabelecido, como um compromisso entre a sensibilidade do método, a precisão e o consumo de reagentes. O tempo de injeção selecionado corresponde a um volume injetado de solução redutora de 3 mL.

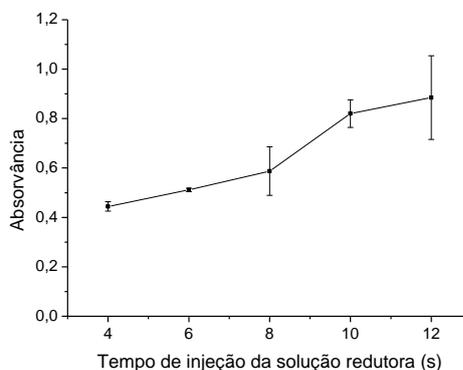


Figura 27. Estudo do tempo de injeção da solução redutora para geração química de NO.

2.2.2. Estudos complementares

2.2.2.1. Conversão de amônio a nitrito

A taxa de conversão do íon amônio que é oxidado a nitrito foi calculada mediante a comparação de inclinações de duas curvas analíticas: uma curva obtida para amônia após o processo de oxidação e outra curva obtida para nitrito. Ambas as curvas foram obtidas com padrões aquosos contendo a mesma concentração de nitrogênio para ambas as espécies. A taxa de conversão foi calculada como sendo a razão entre a inclinação da curva de N-amônio e a inclinação da curva de N-nitrito vezes 100. A Tabela 13 apresenta as curvas obtidas para N-amônio e N-nitrito e seus respectivos coeficientes de correlação. Sob estas condições, a taxa de conversão obtida para a oxidação de amônio a nitrito foi de 51%.

Tabela 13. Curvas de calibração obtidas para nitrito e amônio pelo método proposto.

Espécie	Equação da curva	Coefficiente de correlação (<i>r</i>)
N-nitrito	$Abs = 0,1779C_{N-nitrito} + 0,0096$	0,9998
N-amônio	$Abs = 0,0913C_{N-amônio} + 0,0054$	0,9996

2.2.2.2. Estudo da oxidação de nitrito a nitrato

A avaliação da oxidação de nitrito a nitrato foi realizada comparando-se as inclinações de curvas analíticas obtidas para nitrito na ausência e na presença dos reagentes usados para a oxidação do íon amônio. As inclinações das curvas obtidas para N-nitrito sob as duas condições experimentais são apresentadas na Tabela 14, como intervalo de confiança. Nenhuma diferença significativa foi observada entre as inclinações das curvas analíticas, indicando que nitrito não é oxidado a nitrato sob as condições estabelecidas para a oxidação do íon amônio.

Tabela 14. Inclinações das curvas analíticas para nitrito na ausência e na presença dos reagentes usados para a oxidação do íon amônio.

Condição	Inclinação da curva	Coefficiente de correlação (<i>r</i>)
Sem reagentes	$0,1822 \pm 0,0082$	$0,9995 \pm 0,0054$
Com reagentes	$0,1886 \pm 0,0048$	$0,9998 \pm 0,0032$

2.2.2.3. Efeito da salinidade

A salinidade foi também investigada como potencial interferente na determinação de nitrito e amônio. Concentrações de NaCl na faixa de 1-5% (m/v) foram avaliadas para uma solução de nitrito ou amônio contendo $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrogênio e o nível de interferência foi considerado significativo para desvios acima de 10% no sinal analítico. Nenhuma interferência foi observada em toda a faixa de concentração de NaCl avaliada para N-nitrito, como mostrado na Figura 28. No entanto, a salinidade demonstra ter um significativo efeito de interferência sobre o processo de oxidação do íon amônio. Como pode ser observado na Figura 29, uma concentração de NaCl de 1% (m/v) já é suficiente para causar uma diminuição maior do que 10% no sinal analítico de NO. Isto significa que a determinação de amônio em matrizes salinas poderá ser realizada com a técnica de adição de analito para compensar o efeito de matriz.

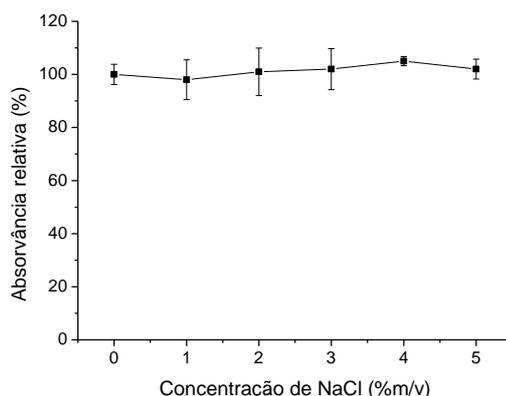


Figura 28. Efeito da salinidade sobre o sinal analítico de NO para nitrito.

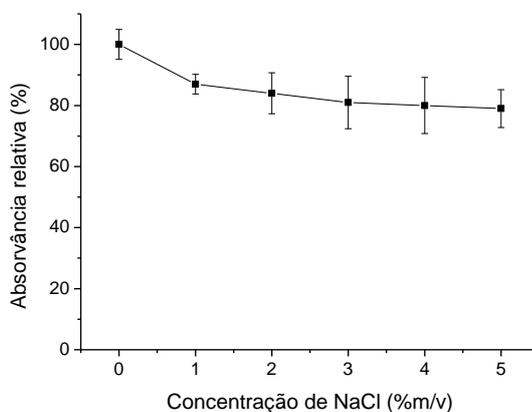


Figura 29. Efeito da salinidade sobre o sinal analítico de NO para amônio.

2.2.3. Características analíticas do método

Neste trabalho, a linha de NO em 214,803 nm foi usada para a medida de absorção molecular por demonstrar maior sensibilidade que a linha 215,360 nm, como mostrado na Figura 30. Com o intuito de comprovar a maior sensibilidade da linha 214,803 nm, inclinações de curvas analíticas, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram obtidos usando-se ambas as linhas.

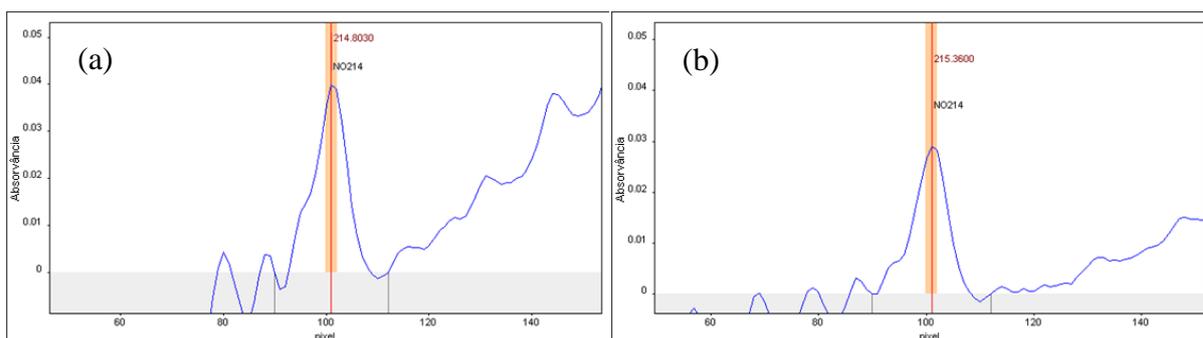


Figura 30. Espectros de absorção molecular de NO obtidos para uma solução contendo $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de N-nitrito: (a) linha 214,803 nm e (b) linha 215,360 nm.

Na Tabela 15 são apresentados o LD e o LQ do método para as duas linhas avaliadas. Estes parâmetros foram calculados como três e dez vezes o desvio padrão do branco, respectivamente, divididos pela inclinação da curva analítica. Limites de detecção e quantificação mais baixos foram obtidos quando a linha de NO em 214,803 nm foi usada, o que comprova sua maior sensibilidade para medidas de absorção molecular de NO, gerado a partir da redução química do nitrito, em comparação com a linha em 215,360 nm. Além disso, as inclinações das curvas analíticas foram significativamente maiores para a linha 214,803 nm (Tabela 15).

Tabela 15. Inclinações das curvas, limites de detecção e quantificação para o método proposto usando as linhas de NO em 214,803 e 215,360 nm para a medida de absorção molecular.

Espécie	Linha (nm)	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Inclinação ($\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$)
N-nitrito	214,803	0,009	0,030	$0,1779 \pm 0,0047$
	215,360	0,013	0,045	$0,1350 \pm 0,0084$
N-amônio	214,803	0,018	0,060	$0,0913 \pm 0,0036$
	215,360	0,028	0,094	$0,0542 \pm 0,0033$

A curva de calibração foi linear de LD até a concentração de $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ para N-nitrito, enquanto que para N-amônio a curva de calibração foi linear de LD até a concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. A precisão, estimada como desvio padrão relativo (RSD), foi de 8,0 e 5,8% (ambos $n=10$) para soluções contendo 0,1 e $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de N-nitrito, respectivamente. Para amônio, a precisão foi de 10,7 e 7,4% (ambos $n=10$) para soluções contendo 0,2 e $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de N-amônio, respectivamente.

2.3. CONCLUSÕES

O método proposto apresenta-se como uma alternativa relativamente simples e rápida para a determinação de nitrito e amônio. Metodologia multivariada foi particularmente útil na avaliação da significância dos parâmetros envolvidos na oxidação de amônio a nitrito e na geração química de NO, bem como para o estabelecimento das condições experimentais adequadas para ambos os processos. O método apresenta limites de quantificação adequados para a determinação de nitrito e amônio, de acordo com os limites máximos estipulados por órgãos governamentais, tais como: Conselho Nacional do Meio Ambiente, Ministério da Saúde Brasileiro e União Europeia. No entanto, a aplicabilidade do método ainda será avaliada para a análise de amostras reais, como água de lagoa, água de rio e água de chuva.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Três métodos analíticos foram desenvolvidos para determinação de nitrito, nitrato e amônio baseados na absorção molecular de NO e detecção empregando um espectrômetro com fonte contínua de alta resolução. De um modo geral, ambos os métodos são relativamente simples, envolvem a manipulação de reagentes de baixa toxicidade e apresentam frequência analítica relativamente alta. Além disso, apresentam também parâmetros analíticos adequados para determinação destas espécies nitrogenadas, tais como limite de quantificação, precisão e exatidão.

REFERÊNCIAS

-
- [1] MOORCROFT, M. J.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. **Talanta**, v. 54, p. 785–803, 2001.
- [2] LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa**, 5ª Ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1999.
- [3] MACHADO, G. C. Determinação seqüencial de nitrito e nitrato por voltametria de pulso diferencial empregando um ultramicroeletrodo de ouro, **Dissertação de mestrado**, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, 2010.
- [4] CAMARGO, J. A.; ALONSO, A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. **Environ. Internat.** v. 32, p. 831–849, 2006.
- [5] CHETTY, A. A.; PRASAD, S. Flow injection analysis of nitrate-N determination in root vegetables: Study of the effects of cooking. **Food Chem.** v. 116, p. 561–566, 2009.
- [6] WOLFF A.; WASSERMAN, A. E. Nitrates, nitrites, and nitrosamines. **Science**, v. 177, n. 4043, p. 15-19, 1972.
- [7] CHAN, T. Y. K. Vegetable-borne nitrate and nitrite and the risk of methaemoglobinaemia. **Toxicol. Lett.** v. 200, p. 107–108, 2011.
- [8] GASPAR, A.; JUHASZ, P.; BAGYI, K. Application of capillary zone electrophoresis to the analysis and to a stability study of nitrite and nitrate in saliva. **J. Chromatogr. A**, v. 1065, p. 327–331, 2005.
- [9] KORNELISSE, R. F.; HOCKMAN, K.; VISSER, J. J.; HOP, W. C. J.; HUIJMANS, J. G. M.; STRAATEN, P. J. C. V. D.; HEIJDEN, A. J. V. D.; SUKHAI, R. N.; NEIJENS, H. J.; GROOT, R. The role of nitric oxide in bacterial meningitis in children. **The J. Infect. Dis.** v. 174, p. 120-126, 1996.

-
- [10] KUIPER, M. A.; VISSER, JELLE J.; BERGMANS, P. L. M.; SCHELTENS, P.; WOLTERS, E. C. Decreased cerebrospinal fluid nitrate levels in Parkinson's disease, Alzheimer's disease and multiple system atrophy patients, **J. Neurolog. Sci.** v. 121, p. 46-49, 1994.
- [11] FERNÍCOLA, N. G. G.; AZEVEDO, F. A. Metemoglobinemia e nitrato nas águas. **Rev. Saúde Públ.** v. 15, 242-8, 1981.
- [12] SMITH, R. P. The blue baby syndromes. **Am. Sci.** v. 97, p. 94-96, 2009.
- [13] BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 2914, de 12 de dezembro de 2011.
- [14] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução RDC Nº 274, de 2 de setembro de 2005.
- [15] BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005.
- [16] Environmental Protection Agency (EPA). Disponível em: <<http://www.epa.gov/safewater/>> **Acesso em: 19 jun. 2012.**
- [17] Conselho da União Europeia. Diretiva 98/83/CE, de 3 de novembro de 1998.
- [18] Organização Mundial da Saúde (OMS). Guidelines for Drinking Water Quality, 3rd ed., Geneva, 2008.
- [19] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Portaria Nº 1.004, de 11 de novembro de 1998.
- [20] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. Instrução Normativa Nº 51, de 29 de dezembro de 2006.
- [21] Food and Drug Administration (FDA). Código de Regulamentações Federal, Título 21, Capítulo I, Parte 172, revisado a partir de 1 abril de 2011.

[22] Conselho da União europeia. Diretiva 95/2/CE, de 5 de julho de 2006.

[23] NIKONOROV, V. V.; BELYANSKAYA, T. A. Comparative study of various methods of the heterogeneous reduction of nitrate ions. **J. Anal. Chem.** v. 55, n. 2, p. 116-120, 2000.

[24] OZDESTAN, O.; UREN, A. Development of a cost-effective method for nitrate and nitrite determination in leafy plants and nitrate and nitrite contents of some green leafy vegetables grown in the Aegean Region of Turkey, **J. Agric. Food Chem.** v. 58, p. 5235–5240, 2010.

[25] ELLIS, P. S.; SHABANI, A. M. H.; GENTLE, B. S.; MCKELVIE, I. D. Field measurement of nitrate in marine and estuarine waters with a flow analysis system utilizing on-line zinc reduction. **Talanta**, v. 84, p. 98–103, 2011.

[26] MADSEN, B. C. Utilization of flow injection with hydrazine reduction and photometric detection for the determination of nitrate in rain-water. **Anal. Chim. Acta**, v. 124, p. 437-441, 1981.

[27] HILTON, J.; RIGG, E. Determination of nitrate in lake water by the adaptation of the hydrazine-copper reduction method for use on a discrete analyser: performance statistics and an instrument-induced difference from segmented flow conditions. **Analyst**, v. 108, p. 1026-1028, 1983.

[28] SILVA, L. A.; KORN, M.; ANDRADE, J. B. Influence of ultrasonic waves in the reduction of nitrate to nitrite by hydrazine–Cu(II). **Ultrason. Sonochem.** v. 14, p. 275–280, 2007.

[29] TAKEDA, K.; FUJIWARA, K. Determination of nitrate in natural waters with the photo-induced conversion of nitrate to nitrite. **Anal. Chim. Acta**, v. 276, p. 25-32, 1993.

[30] MOTOMIZU, S.; SANADA, M. Photo-induced reduction of nitrate to nitrite and its application to the sensitive determination of nitrate in natural waters. **Anal. Chim. Acta**, v. 308, p. 406-412, 1995.

[31] CALATAYUD, J. M.; MATEO, J. V. G.; DAVID, V. Multi-insertion of small controlled volumes of solutions in a flow assembly for determination of nitrate (photoreduction) and nitrite with proflavin sulfate. **Analyst**, v. 123, p. 429–434, 1998.

[32] TORROA, I. G.; MATEO, J. V. G.; CALATAYUD, J. M. Flow-injection biamperometric determination of nitrate (by photoreduction) and nitrite with the NO_2^-/I^- reaction. **Anal. Chim. Acta**, v. 366, p. 241-249, 1998.

[33] CRESSER, M. S.; ISAACSON, P. J. The analytical potential of gas-phase for the determination of molecular absorption spectrometry anions in solution. **Talanta**, v. 23, p. 885-888, 1976.

[34] HAGHIGHI, B.; TAVASSOLI, A. Flow-injection analysis of nitrate by reduction to nitrite and gas-phase molecular absorption spectrometry. **Fresenius J. Anal. Chem.** v. 371, p. 1113–1118, 2001.

[35] HAGHIGHI, B.; TAVASSOLI, A. Flow injection analysis of nitrite by gas phase molecular absorption UV spectrophotometry. **Talanta**, v. 56, p.137–144, 2002.

[36] AOKI, T.; WAKABAYASHI, M. Simultaneous flow injection determination of nitrate and nitrite in water by gas-phase chemiluminescence. **Anal. Chim. Acta**, v. 308, p. 308-312, 1995.

[37] SYTY, A.; SIMMONS, R. A. The determination of nitrite by ultraviolet absorption spectrometry in the gas phase, **Anal. Chim. Acta**, v. 120, p. 163-170, 1980.

[38] AHMED, M. J.; STALIKAS, C. D.; TZOUWARA-KARAYANNI, S. M.; KARAYANNIS, M. I. Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate by flow-injection analysis. **Talanta**, v. 43, p. 1009-1018, 1996.

[39] ENSA, A. A.; KAZEMZADEH, A. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow injection with spectrophotometric detection. **Anal. Chim. Acta**, v. 382, p. 15-21, 1999.

[40] GREENWAY, G. M.; HASWELL, S. J.; PETSUL, P. H. Characterization of a micro-total analytical system for the determination of nitrite with spectrophotometric detection. **Anal. Chim. Acta**, v. 387, p. 1-10, 1999.

[41] BURAKHAM, R.; OSHIMA, M.; GRUDPAN, K.; MOTOMIZU, S. Simple flow-injection system for the simultaneous determination of nitrite and nitrate in water samples. **Talanta**, v. 64, p. 1259–1265, 2004.

[42] PASQUALI, C. E. L.; HERNANDO, P. F.; ALEGRIA, J. S. D. Spectrophotometric simultaneous determination of nitrite, nitrate and ammonium in soils by flow injection analysis. **Anal. Chim. Acta**, v. 600, p. 177–182, 2007.

[43] PASQUALI, C. E. L.; GALLEGÓ-PICÓ, A.; HERNANDO, P. F.; VELASCO, M.; ALEGRIA, J. S. D. Two rapid and sensitive automated methods for the determination of nitrite and nitrate in soil samples. **Microchem. J.** v. 94, p. 79–82, 2010.

[44] AYALA, A.; LEAL, L. O.; FERRER, L.; CERDA, V. Multiparametric automated system for sulfate, nitrite and nitrate monitoring in drinking water and wastewater based on sequential injection analysis. **Microchem. J.** v. 100, p. 55–60, 2012.

[45] MIKUSKA, P.; VECERA, Z. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in water by chemiluminescent flow-injection analysis. **Anal. Chim. Acta**, v. 495, p. 225–232, 2003.

[46] ATTIQ-UR-REHMAN; YAQOOB, M.; WASEEM A.; NABI, A. Determination of nitrite and nitrate in freshwaters using flow injection luminol chemiluminescence detection. **Acta Chim. Slov.** v. 58, p. 569-575, 2011.

[47] SILVA, M.; GALLEGO, M.; VALCARCEL, M. Sequential atomic absorption spectrometric determination of nitrate and nitrite in meats by liquid-liquid extraction in a flow-injection system. **Anal. Chim. Acta**, v. 179, p. 341-349, 1986.

[48] NOROOZIFAR, M.; KHORASANI-MOTLAGH, M.; TAHERI, A.; HOMAYOONFARD, M. Application of manganese (IV) dioxide microcolumn for determination and speciation of nitrite and nitrate using a flow injection analysis-flame atomic absorption spectrometry system. **Talanta**, v. 71, p. 359–364, 2007.

[49] FOX, J. B. J. Kinetics and mechanisms of the Griess reaction. **Anal. Chem.** v. 51, n. 9, p. 1493-1502, 1979.

[50] DAVIS, J.; MCKEEGAN, K. J.; CARDOSI, M. F.; VAUGHAN, D. H. Evaluation of phenolic assays for the detection of nitrite. **Talanta**, v. 50, p. 103–112, 1999.

[51] GUERRERO, R. S.; BENITO, C. G.; CALATAYUD, J. M. Flow-injection analysis-spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in water samples by reaction with proflavin. **Talanta**, v. 43, p. 239-246, 1996.

[52] AYDIN, A.; ERCAN, O.; TASCIOGLU, S. A novel method for the spectrophotometric determination of nitrite in water. **Talanta**, v. 66, p. 1181–1186, 2005.

[53] ANDRADE, R.; VIANA, C. O.; GUADAGNIN, S. G.; REYES, F. G. R.; RATH, S. A flow-injection spectrophotometric method for nitrate and nitrite determination through nitric oxide generation, **Food Chem.** v. 80, p. 597–602, 2003.

[54] MONSER, L.; SADOK, S.; GREENWAY, G. M.; SHAH, I.; UGLOW, R. F. A simple simultaneous flow injection method based on phosphomolybdenum chemistry for nitrate and nitrite determinations in water and fish samples. **Talanta**, v. 57, p. 511–518, 2002.

[55] PETTAS, I. A.; LAFIS, S. I.; KARAYANNIS, M. I. Reaction rate method for determination of nitrite by applying a stopped-flow technique. **Anal. Chim. Acta**, v. 376, p. 331-337, 1998.

[56] GHASEMI, J.; JABBARI, A.; AMINI, A.; OSKOEI, A. G.; ABDOLAHI, B, Kinetic spectrophotometric determination of nitrite based on its catalytic effect on the oxidation of methyl red by bromate. **Anal. Lett.** v. 37, p. 2205-2214, 2004.

[57] BARZEGAR, M.; MOUSAVI, M. F.; NEMATI, A. Kinetic spectrophotometric determination of trace amounts of nitrite by its reaction with molybdosilicic acid blue. **Microchem. J.** v. 65, p. 159-163, 2000.

[58] CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant-tissue by nitration of salicylic-acid. **Commun. Soil Sci. Plan.** v. 6, p. 71-80, 1975.

[59] NAGARAJA, P.; KUMAR, M. S. H. Spectrophotometric determination of nitrate in polluted water using a new coupling reagent. **Anal. Sci.** v. 18, p. 355-357 2002.

[60] HORITA, K.; WANG, G. F.; SATAKE, M. Column preconcentration analysis–spectrophotometric determination of nitrate and nitrite by a diazotization–coupling reaction. **Analyst**, v. 122, p. 1569–1574, 1997.

[61] MIRÓ, M.; CLADERA, A.; ESTELA, J. M.; CERDA, V. Sequential injection spectrophotometric analysis of nitrite in natural waters using an on-line solid-phase extraction and preconcentration method. **Analyst**, v. 125, p. 943–948, 2000.

[62] ABBAS, M. N.; MOSTAFA, G. A. Determination of traces of nitrite and nitrate in water by solid phase spectrophotometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 410, p. 185–192, 2000.

[63] FILIK, H.; GIRAY, D.; CEYLAN, B.; APAK, R. A novel fiber optic spectrophotometric determination of nitrite using Safranin O and cloud point extraction. **Talanta**, v. 85, p. 1818–1824, 2011.

[64] AOKI, T.; FUKUDA, S.; HOSOI, Y.; MUKAI, H. Rapid flow injection analysis method for successive determination of ammonia, nitrite, and nitrate in water by gas-phase chemiluminescence. **Anal. Chim. Acta**, v. 349, p. 11-16, 1997.

[65] NAGABABU, E.; RIFKIND, J. M. Measurement of plasma nitrite by chemiluminescence without interference of S-, N-nitroso and nitrated species, **Free Rad. Biol. Med.** v. 42, p. 1146–1154, 2007.

[66] COX, R. D. Determination of nitrate and nitrite at the parts per billion level by chemiluminescence. **Anal. Chem.** v. 52, p. 332-335, 1980.

[67] YOSHIZUMI, K.; AOKI, K. Determination of nitrate by a flow system with a chemiluminescent NO_x analyzer. **Anal. Chem.** v. 57, p. 737-740, 1985.

[68] BRAMAN, R. S.; HENDRIX, S. A. Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. **Anal. Chem.** v. 61, p. 2715-2718, 1989.

[69] YANG, F.; TRONCY, E.; FRANCOEUR, M.; VINET, B.; VINAY, P.; CZAIIKA, G.; BLAISE, G. Effects of reducing reagents and temperature on conversion of nitrite and nitrate to nitric oxide and detection of NO by chemiluminescence. **Clin. Chem.** v. 43, n. 4, p. 657–662, 1997.

[70] LI, J.-S.; WANG, H.; ZHANG, X.; ZHANG, H.-S. Spectrofluorimetric determination of total amount of nitrite and nitrate in biological sample with a new fluorescent probe 1,3,5,7-tetramethyl-8-(3',4'-diaminophenyl)-difluoroboradiazas-indacence. **Talanta**, v. 61, p. 797-802, 2003.

-
- [71] WANG, H.; YANG, W.; LIANG, S.-C.; ZHANG, Z.-M.; ZHANG, H.-S. Spectrofluorimetric determination of nitrite with 5,6-diamino-1,3-naphthalene disulfonic acid. **Anal. Chim. Acta**, v. 419, p. 169–173, 2000.
- [72] HELALEH, M. I. H.; KORENAGA, T. Fluorometric determination of nitrite with acetaminophen. **Microchem. J.** v. 64, p. 241-246, 2000.
- [73] BISWAS, S.; CHOWDHURY, B.; RAY, B. C. A novel spectrofluorimetric method for the ultra trace analysis of nitrite and nitrate in aqueous medium and its application to air, water, soil and forensic samples. **Talanta**, v. 64, p. 308–312, 2004.
- [74] JIE, N.; YANG, D.; JIANG, Q.; ZHANG, Q.; WEI, L. A Fluorescence quenching method for the determination of nitrite with indole. **Microchem. J.** v. 62, p. 371–376 1999.
- [75] MASSERINI JR., R. T.; FANNING, K. A. A sensor package for the simultaneous determination of nanomolar concentrations of nitrite, nitrate, and ammonia in seawater by fluorescence detection. **Mar. Chem.** v. 68, p. 323–333, 2000.
- [76] LIU, Q.-H.; YAN, X.-L.; GUO, J.-C.; WANG, D.-H.; LI, L.; YAN, F.-Y.; CHEN, L.-G. Spectrofluorimetric determination of trace nitrite with a novel fluorescent probe, **Spectrochim. Acta Part A**, v. 73, p. 789–793, 2009.
- [77] HUANG, Z.; KORENAGA, T.; HELALEH, M. I. H. Kinetic spectrofluorimetric determination of nitrite in water samples and nitrogen dioxide in the atmosphere sampled by the liquid droplet method. **Mikrochim. Acta**, v. 134, p. 179-183, 2000.
- [78] KIRKBRIGHT, G. F.; JOHNSON, H. N. Application of indirect methods in analysis by atomic-absorption spectrometry. **Talanta**, v. 20, p. 433-451, 1973.
- [79] PROJAHN, H.-D.; STEEG, U.; SANDERS, J.; VANCLAY, E. Application of the reference-element technique for fast sequential flame atomic-absorption spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 378, p. 1083–1087, 2004.

[80] AMORIM, F. A. C.; LOBO, I. P.; SANTOS, V. L. C. S.; FERREIRA, S. L. C. Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multielementares. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1784-1790, 2008.

[81] DITTRICH, K.; VORBERG, B.; FUNK, J.; BEYER, V. Determination of some nonmetals by using diatomic molecular absorbance in a hot graphite furnace, **Spectrochim. Acta**, v. 39B, p. 349-363, 1984.

[82] WELZ, B.; LEPRI, F. G.; ARAUJO, R. G. O.; FERREIRA, S. L. C.; HUANG, M. D.; OKRUSS, M.; BECKER-ROSS, H. Determination of phosphorus, sulfur and the halogens using high-temperature molecular absorption spectrometry in flames and furnaces-A review. **Anal. Chim. Acta**, v. 647, p. 137–148, 2009.

[83] YEBRA, M. C. Continuous automatic determinations of organic compounds by flow injection-atomic absorption spectrometry. **Trends Anal. Chem.** v. 19, n. 10, p. 629-641, 2000.

[84] HEITMANN, U.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HUANG, M. D.; OKRUSS, M. Determination of non-metals via molecular absorption using high-resolution continuum source absorption spectrometry and graphite furnace atomization. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 21, p. 1314–1320, 2006.

[85] SILVA, M.; GALLEGU, M.; VALCARCEL, M. Sequential atomic absorption spectrometric Determination of nitrate and nitrite in meats by liquid-liquid extraction in a flow-injection system. **Anal. Chim. Acta**, v. 179, p. 341-349, 1986.

[86] HOUSER, M. E.; FAUTH, M. I. Indirect determination of nitrate, nitrite, and nitro groups by atomic absorption spectrophotometry. **Microchem. J.** v. 15, p. 399-408, 1970.

[87] NOROOZIFAR, M.; KHORASANI-MOTLAGH, M.; TAHERI, A.; HOMAYOONFARD, M. Indirect determination of nitrite by flame atomic absorption

spectrometry using a lead (IV) dioxide oxidant microcolumn. **B. Korean Chem. Soc.** v. 27, n. 6, p. 875-880, 2006.

[88] NOROOZIFAR, M.; KHORASANI-MOTLAGH, M.; TAHERI, A.; HOMAYOONFARD, M. Application of manganese (IV) dioxide microcolumn for determination and speciation of nitrite and nitrate using a flow injection analysis–flame atomic absorption spectrometry system. **Talanta**, v. 71, p. 359–364, 2007.

[89] ALONSO, E. V.; CORDERO, M. T. S.; TORRES, M. P. C.; TORRES, A. G.; PAVÓN, J. M. C. Indirect determination of nitrate by electrothermal atomic absorption spectrometry using an on-line cadmium microcolumn, **Analyst**, v. 123, p. 1561–1564, 1998.

[90] HUANG, M.-D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M.; WELZ, B.; FERREIRA, H. S. High-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of nitrogen monoxide and its application for the determination of nitrate. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 25, p. 163–168, 2010.

[91] AL-ZAMIL, I. Z.; TOWNSHEND, A. Molecular emission cavity analysis. Part 23. Determination of nitrite and nitrate after conversion to nitrogen monoxide. **Anal. Chim. Acta**, v. 142, p. 151-157, 1982.

[92] CELIK, A.; HENDEN, E. Determination of ammonium-, nitrite- and nitrate-nitrogen by molecular emission cavity analysis using a cavity containing an entire flame. **Analyst**, v. 114, p. 563-566, 1989.

[93] WENNMALM, A.; PETERSSON, A. S. Analysis of nitrite as a marker for endothelium-derived relaxing factor in biological-fluids using electron-paramagnetic resonance spectrometry. **J. Cardiovasc. Pharm.** v. 173, p. s34-s40, 1991.

[94] IVANOV, V. M.; FIGUROVSKAYA, V. N.; BARBALAT, Y. A.; ERSHOVA, N. I. Chromaticity characteristics of $\text{NH}_2\text{Hg}_2\text{I}_3$ and I_2 : molecular iodine as a test form alternative to Nessler's reagent. **J. Anal. Chem.** v. 60, n. 7, p. 629–632, 2005.

[95] THOMPSON, J. F.; MORRISON, G. R. Determination of organic nitrogen: control of variables in the use of Nessler's reagent. **Anal. Chem.** v. 23, n. 8, p. 1153-1157, 1951.

[96] LIEBHAFSKY, H. A.; BRONK, L. B. Action of Nessler's reagent on amines. **Anal. Chem.** v. 20, n. 6, p. 588-589, 1948.

[97] MOORE, R. F.; HARRIS, D. L. Influence of solvent vapors on the occurrence of turbidity during color development with the Nessler reagent, **Anal. Chem.** v. 36, n. 1, p. 249-250, 1964.

[98] BOLLETER, W. T.; BUSHMAN, C. J.; TIDWELL, P. W. Spectrophotometric determination of as indophenol. **Anal. Chem.**, v. 33, n. 4, p. 592-594, 1961.

[99] WEICHSELBAUM, T. E.; HAGERTY, J. C.; MARK, H. B. A reaction rate method for ammonia and blood urea nitrogen utilizing a pentacyanonitrosylferrate catalyzed Berthelot reaction. **Anal. Chem.** v. 41, n. 6, p. 848-850, 1969.

[100] PATTON, C. J.; CROUCH, S. R. Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. **Anal. Chem.** v. 49, n. 3, p. 464-469, 1977.

[101] ROCHA, J. C.; GRANER, C. A. F.; MAGNAIN, R. Determinação espectrofotométrica de amônio em extratos de carne com salicilato e hipoclorito, sem prévia neutralização dos digeridos sulfúricos. **Quím. Nova**, v. 12, p. 309-312, 1989.

[102] NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B.; BATISTA, L. A. R. Determinação espectrofotométrica de nitrogênio em digeridos de plantas em sistemas de análise de injeção em fluxo. **Quím. Nova**, v. 19, p. 33-36, 1996.

[103] NEWELL, B. S. The determination of ammonia in sea water. **J. Mar. Bio. Ass.** v. 47, p. 271-280, 1967.

[104] NGO, T. T.; PHAN, A. P. H.; YAM, C. F.; LENHOFF, H. M. Interference in determination of ammonia with the hypochlorite-alkaline phenol method of Berthelot. **Anal. Chem.** v. 54, n. 1, p. 46-49, 1982.

[105] KROM, M. D. Spectrophotometric determination of ammonia: a study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. **Analyst**, v. 105, p. 305-316, 1980.

[106] SANTOS, M. M.; DOS REIS, B. F.; BERGAMIN, H.; BACCAN, N. Flow-injection determination of low-levels of ammonium-ions in natural-waters employing preconcentration with a cation-exchange resin. **Anal. Chim. Acta**, v. 261, p. 339-343, 1992.

[107] HATA, N.; KASAHARA, I.; TAGUCHI, S. Micro-phase sorbent extraction for trace analysis *via in situ* sorbent formation: application to the preconcentration and the spectrophotometric determination of trace ammonia. **Anal. Sci.** v. 18, p. 697-699, 2002.

[108] OKUMURA, M.; HONDA, S.; FUJINAGA, K.; SEIKE, Y. A simple and rapid *in situ* preconcentration method for trace ammonia nitrogen in environmental water samples using solid-phase extraction followed by spectrophotometric determination. **Anal. Sci.** v. 21, p. 1137-1140, 2005.

[109] FUKUI, K.; OHNO, S.; HIGUCHI, K.; TESHINIA, N.; SAKAI, T. Spectrophotometric flow injection analysis for the determination of trace amount of ammonium ion in seawater coupled with on-line gas diffusion/ion exchange concentration technique. **Bunseki Kagaku** v. 56, p. 757-763, 2007.

[110] ESKANDARI, H.; SHARIATI, M. R. Dodecylbenzene sulfonate-coated magnetite nanoparticles as a new adsorbent for solid phase extraction-spectrophotometric determination of ultra trace amounts of ammonium in water samples. **Anal. Chim. Acta**, v. 704, p. 146-153, 2011.

[111] CHEN, G.; ZHANG, M.; ZHANG, Z.; HUANG, Y. M.; YUAN, D. X. On-line solid phase extraction and spectrophotometric detection with flow technique for the determination of nanomolar level ammonium in seawater samples. **Anal. Lett.** v. 44, p. 310-326, 2011.

[112] AFKHAMI, A.; NOROOZ-ASL, R. Micelle-mediated extraction and spectrophotometric determination of ammonia in water samples utilizing indophenol dye formation, **J. Braz. Chem. Soc.** v. 19, n. 8, p. 1546-1552, 2008.

[113] KAWAMOTO, H.; ISHIDA, W.; TSUNODA, K.; AKAIWA, H. Spectrophotometric determination of ammonium ion after solvent-extraction with cryptand(2.2.2)-dithizone system. **Bunseki Kagaku**, v. 41, p. 281-283, 1992.

[114] PARHAM, H.; MOBARAKZADEH, M. Solvent extraction-spectrophotometric determination of trace amounts of total ammonia-ammonium ion content in sewage, soil and shrimp by dicyclohexyl-18-crown-6 and orange II. **J. Anal. Chem.** v. 58, n. 6, p. 514–518, 2003.

[115] CERDA, A.; OMS, M. T.; FORTEZA, R.; CERDA, V. Evaluation of flow-injection methods for ammonium determination in waste-water samples. **Anal. Chim. Acta**, v. 311, p. 165-173, 1995.

[116] HIGUCHI, K.; INOUE, A.; TSUBOI, T.; MOTOMIZU, S. Development of a new gas-permeation system and its application to the spectrophotometric determination of ammonium ion by FIA. **BUNSEKI KAGAKU**, v. 48, p. 253-259, 1999.

[117] OLIVEIRA, S. M.; LOPES, T. I. M. S.; TOTH, I. V.; RANGEL, A. O. S. S. A multi-commuted flow injection system with a multi-channel propulsion unit placed before detection: Spectrophotometric determination of ammonium. **Anal. Chim Acta**, v. 600, p. 29-34, 2007.

[118] ALMEIDA, M. I. G. S.; ESTELA, J. M.; SEGUNDO, M. A.; CERDA, V. A membraneless gas-diffusion unit-multisyringe flow injection spectrophotometric

method for ammonium determination in untreated environmental samples. **Talanta**, v. 84, p. 1244-1252, 2011.

[119] MATSUNAGA, K.; NISHIMURA, M. A rapid and sensitive method for determination of submicrogram amounts of ammonia in fresh and sea waters. **Anal. Chim Acta**, v. 73, p. 204-208, 1974.

[120] LIU, R.; WANG, H.; SUN, A.; LIU, D. Reversed flow trace amount injection spectrophotometric determination of ammonia in natural water by oxidation of ammonia to nitrite. **Talanta**, v. 45, p. 405-410, 1997.

[121] TOVAR, A.; MORENO, C.; MÁNUEL-VEZ, M. P.; VARGAS, M. G. A simple automated method for the speciation of dissolved inorganic nitrogen in seawater. **Anal. Chim Acta**, v. 469, p. 235–242, 2002.

[122] PASQUALI, C. E. L.; HERNANDO, P. F.; ALEGRÍA, J. S. D. Spectrophotometric simultaneous determination of nitrite, nitrate and ammonium in soils by flow injection analysis. **Anal. Chim Acta**, v. 600, p. 177–182, 2007.

[123] HAGHIGHI, B.; KURD, S. F. Sequential flow injection analysis of ammonium and nitrate using gas phase molecular absorption spectrometry. **Talanta**, v. 64, p. 688–694, 2004.

[124] KOROLEFF, F. Direct spectrophotometric determination of ammonia in precipitation. **Tellus XVIII**, v. 2, p. 562-565, 1966.

[125] ICARDO, M. C.; TORRO, I. G.; ZAMORA, L. L.; CALATAYUD, J. M. Flow spectrophotometric determination of ammonium ion. **Anal. Chim Acta**, v. 398, 1999.

[126] KRONKA, E. A. M.; REIS, B. F.; KORN, M.; BERGAMIN, H. Multicommutation in flow analysis .5. Binary sampling for sequential spectrophotometric determination of ammonium and phosphate in plant digests. **Anal. Chim Acta**, v. 334, p. 287-293, 1996.

-
- [127] YAQOOB, M.; NABI, A.; WAHAB, A.; KASI, I. Spectrophotometric determination of ammonium ion in soil and water by flow injection analysis. **J. Chem. Soc. Pakistan**, v. 19, p. 313-316, 1997.
- [128] BUCUR, B.; ICARDO, M. C.; CALATAYUD, J. M. Spectrophotometric determination of ammonium by an rFIA assembly. **Rev. Roum. Chim.** v. 51, p. 101-108, 2006.
- [129] 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. **Microchem. J.** v. 98, p. 97-102, 2011.
- [130] MOLINS-LEGUA, C.; MESEGUER-LLORET, S.; MOLINER-MARTINEZ, Y.; CAMPÍNS-FALCÓ, P. A guide for selecting the most appropriate method for ammonium determination in water analysis. **Trac-Trends Anal. Chem.** v. 25, p. 282-290, 2006.
- [131] QIN, W.; ZHANG, Z.; LI, B.; PENG, Y. Chemiluminescence flow system for the determination of ammonium ion. **Talanta**, v. 48, p. 225–229, 1999.
- [132] LI, J.; DASGUPTA, P. K. Chemiluminescence detection with a liquid core waveguide: Determination of ammonium with electrogenerated hypochlorite based on the luminol-hypochlorite reaction. **Anal. Chim. Acta**, v. 398, p. 33-39, 1999.
- [133] MARQUES, K. L.; PIRES, C. K.; SANTOS, J. L. M.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C. A multi-pumping flow system for chemiluminescent determination of ammonium in natural waters. **Int. J. Environ. An. Ch.** v. 87, p. 77-85, 2007.
- [134] AL-GAILANI, B. R. M.; GREENWAY, G. M.; MCCREEDY, T. Miniaturized flow-injection-analysis (μ FIA) system with on-line chemiluminescence detection based on the luminol-hypochlorite reaction for the determination of ammonium in river water. **Int. J. Environ. An. Ch.** v. 87, p. 425-436, 2007.

-
- [135] HU, X.; TAKENAKA, N.; TAKASUNA, S.; KITANO, M.; BANDOW, H.; MAEDA, Y. Determination of ammonium ion in rainwater and fogwater by flow injection analysis with chemiluminescence detection. **Anal. chem.** v. 65, p. 3489-3492, 1993.
- [136] HU, X. C.; TAKENAKA, N.; KITANO, M.; BANDOW, H.; MAEDA, Y. Mechanism of chemiluminescence reaction between hypobromite and ammonia or urea. **B. Chem. I Soc. Jpn.** v. 69, p. 1179-1185, 1996.
- [137] FRANCIS, P. S.; BARNETT, N. W.; LEWIS, S. W.; LIM, K. F. Chemiluminescence from the oxidation of urea and ammonia with hypobromite and *N*-bromosuccinimide. **Talanta**, v. 64, p. 283–289, 2004.
- [138] FRANCIS, P. S.; ADCOCK, J. L.; BARNETT, N. W. Near-ultraviolet chemiluminescence from the reaction of ammonia with hypobromite in aqueous solution. **Spectrochim. Acta Part A**, v. 65, 708–710, 2006.
- [139] TAKEUCHI, K.; FUSHIMI, C.; NAKAMURA, K.; IBUSUKI, T. Determination of ammonia ammonium ion in water by continuous-flow chemiluminescence after derivatization to an isoindole. **Bunseki Kagaku**, v. 42, p. 625-629, 1993.
- [140] NIE, F.; WANG, N.; ZHENG, J.; ZHANG, J. An ultrasensitive post chemiluminescence reaction of ammonium in NBS–dichlorofluorescein system and its application. **Talanta**, v. 84, p. 1063–1067, 2011.
- [141] AOKI, T.; UEMURA, S. MUNEMORI, M. Continuous flow fluorometric determination of ammonia in water, **Anal. Chem.** v. 55, p. 1620-1622, 1983.
- [142] ROTH, M. Fluorescence reaction for amino acids, **Anal. Chem.** v. 43, n. 7, p. 880-882, 1971.
- [143] DANIELSON, N. D.; CONROY, C. M. Fluorometric determination of hydrazine and ammonia separately or in mixtures. **Talanta**, v. 29, p. 401–404. 1982.

[144] LI, J.; DASGUPTA, P. K.; GENFA, Z. Transversely illuminated liquid core waveguide based fluorescence detection: Fluorometric flow injection determination of aqueous ammonium/ammonia. **Talanta**, v. 50, p. 617–623, 1999.

[145] WATSON, R. J.; BUTLER, E. C. V.; CLEMENTSON, L. A.; BERRY, K. M. Flow-injection analysis with fluorescence detection for the determination of trace levels of ammonium in seawater. **J. Environ. Monitor.** v. 7, p. 37-42, 2005.

[146] HORSTKOTTE, B.; DUARTE, C. M.; CERDÀ, V. A miniature and field-applicable multipumping flow analyzer for ammonium monitoring in seawater with fluorescence detection. **Talanta**, v. 85, p. 380–385, 2011.

[147] FELIX, E. P.; CARDOSO, A. A. A method for determination of ammonia in air using oxalic acid-impregnated cellulose filters and fluorimetric detection. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 23, n. 1, p. 142-147, 2012.

[148] DAI, F.; BURKERT, V. P.; SINGH, H. N.; HINZE, W. L. Update and evaluation of the effectiveness of different thiols and micellar media in Roth's fluorimetric method for the determination of primary amino compounds. **Microchem. J.** v. 57, p. 166-198, 1997.

[149] LLORET, S. M.; ANDRÉS, J. V.; LEGUA, C. M.; FALCÓ, P. C. Determination of ammonia and primary amine compounds and Kjeldahl nitrogen in water samples with a modified Roth's fluorimetric method. **Talanta**, v. 65, p. 869–875, 2005.

[150] MANA, H.; SPOHN, U. Rapid and selective determination of ammonium by fluorimetric flow injection analysis. **Fresenius J. Anal. Chem.** v. 366, p. 825–829, 2000.

[151] HALPERN, J. B.; KOKER, E. B.; JACKSON, W. M. Fluorescence spectrometry with photodissociative excitation of ammonia and hydrazine. **Anal. Chem.** v. 55, 2000-2005, 1983.

[152] SASAKI, S.; ANDO, Y.; DEJIMA, M.; ARIKAWA, Y.; KARUBE, I. A fluorescence-based sensor for ammonium and nitrate. **Anal. Lett.** v. 31, p. 555-567, 1998.

[153] WAICH, K.; MAYR, T.; KLIMANT I. Fluorescence sensors for trace monitoring of dissolved ammonia. **Talanta**, v. 77, p. 66–72, 2008.

[154] JONES, R. D. An improved fluorescence method for the determination of nanomolar concentrations of ammonium in natural-waters. **Limnol. Oceanogr.** v. 36, p. 814-819, 1991.

[155] ALMENDRAL-PARRA, M.-J.; ALONSO-MATEOS, A.; FUENTES-PRIETO, M. S. A gas diffusion technique coupled with flow injection systems. Optimization of the process in its application to the fluorimetric determination of ammonium in water samples. **J. Fluoresc.** v. 20, p. 55-65, 2010.

[156] BELCHER, R.; BOGDANSKI, S. L.; CALOKERINOS, A. C.; TOWNSHENDY A. Determination of ammonium- and nitrate-nitrogen by molecular emission cavity. **Analysis**, v. 106, p. 625-635, 1981.

[157] BOND, A. M.; WILLIS, J. B. Enhancement of zirconium atomic absorption by nitrogen-containing compounds and its use in the determination of ammonia. **Anal. Chem.** v. 40, n. 14, p. 2087-2090, 1968.

[158] CRESSER, M. S. Determination of nitrogen in solution by gas-phase molecular absorption spectrometry, **Anal. Chim. Acta**, v. 85, p. 253-259, 1976.

[159] MUROSKI, C. C.; SYTY, A. Determination of the ammonium ion by evolution of ammonia and ultraviolet absorption spectrometry in the gas phase. **Anal. Chem.** v. 52, 143-145, 1980.

[160] MOLINER-MARTÍNEZ, Y.; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ R.; CAMPÍNS-FALCÓ, P. Improved detection limit for ammonium/ammonia achieved by Berthelot's reaction by

use of solid-phase extraction coupled to diffuse reflectance spectroscopy. **Anal. Chim. Acta**, v. 534, p. 327-334, 2005.

[161] ALDER, J. F.; GUNN, A. M.; KIRKBRIGHT, G. F. The determination of traces of ammonium-nitrogen in aqueous solution by optical emission spectrometry with a high-frequency inductively coupled argon plasma source. **Anal. Chim. Acta**, v. 92, p. 43-48, 1977.

[162] JABER, A. M. Y.; MEHANNA, N. A.; Sultan, S. M. Determination of ammonium and organic bound nitrogen by inductively coupled plasma emission spectroscopy. **Talanta**, v. 78, p. 1298–1302, 2009.

[163] HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. Determination of phosphorus by molecular absorption of phosphorus monoxide using a high-resolution continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 21, p. 338–345, 2006.

[164] HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. Direct determination of total sulfur in wine using a continuum-source atomic-absorption spectrometer and an air-acetylene flame. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 382, p. 1877–1881, 2005.

[165] HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. Determination of sulfur by molecular absorption of carbon monosulfide using a high-resolution continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame. **Spectrochim. Acta Part B**, v. 61, p. 181–188, 2006.

[166] HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M.; PATZ, C.-D. Determination of sulfur forms in wine including free and total sulfur dioxide based on molecular absorption of carbon monosulfide in the air-acetylene flame. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 390, p. 361–367, 2008.

[167] VIRGILIO, A.; RAPOSO, JR., J. L.; CARDOSO, A. A.; NÓBREGA, J. A.; NETO, J. A. G. Determination of total sulfur in agricultural samples by high-resolution continuum source flame molecular absorption spectrometry. **J. Agric. Food Chem.** v. 59, p. 2197–2201, 2011.

[168] KOWALEWSKA, Z. Feasibility of high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in flame and furnace for sulphur determination in petroleum products. **Spectrochim. Acta Part B**, v. 66, p. 546–556, 2011.

[169] BAYSAL, A.; AKMAN, S. A practical method for the determination of sulphur in coal samples by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 85, p. 2662–2665, 2011.

[170] HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. Determination of halogens via molecules in the air–acetylene flame using high-resolution continuum source absorption spectrometry: Part I. Fluorine. **Spectrochim. Acta Part B**, v. 61, p. 572–578, 2006.

[171] OZBEK, N.; AKMAN, S. Method development for the determination of fluorine in toothpaste via molecular absorption of aluminum mono fluoride using a high-resolution continuum source nitrous oxide/acetylene flame atomic absorption spectrophotometer. **Talanta**, v. 94, p. 246–250, 2012.

[172] HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. Determination of halogens via molecules in the air–acetylene flame using high-resolution continuum source absorption spectrometry, Part II: Chlorine. **Spectrochim. Acta Part B**, v. 61, p. 959–964, 2006.

[173] RESANO, M.; BRICEÑO, J.; BELARRA, M. A. Direct determination of phosphorus in biological samples using a solid sampling-high resolution-continuum source electrothermal spectrometer: comparison of atomic and molecular absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 24, p. 1343–1354, 2009.

[174] FERREIRA, H. S.; LEPRI, F. G.; WELZ, B.; CARASEKA, E.; HUANG, M.-D. Determination of sulfur in biological samples using high-resolution molecular absorption spectrometry in a graphite furnace with direct solid sampling. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 25, p. 1039–1045, 2010.

[175] GLEISNER, H.; WELZ, B.; EINAX, J. W. Optimization of fluorine determination via the molecular absorption of gallium mono-fluoride in a graphite furnace using a high-resolution continuum source spectrometer. **Spectrochim. Acta Part B**, v. 65, p. 864–869, 2010.

[176] GLEISNER, H.; EINAX, J. W.; MORÉSC, S.; WELZ, B.; CARASEK, E. A fast and accurate method for the determination of total and soluble fluorine in toothpaste using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and its comparison with established techniques. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 54, p. 1040–1046, 2011.

[177] HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. High-resolution continuum source electrothermal absorption spectrometry of AlBr and CaBr for the determination of bromine. **Spectrochim. Acta Part B**, v. 63, p. 566–570, 2008.

[178] LIMBURG, T.; EINAX, J. W. Determination of bromine using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace. **Microchem. J.** v. 107, p. 31–36, 2013.

[179] HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; OKRUSS, M.; WELZ, B.; MORÉS, S. Determination of iodine via the spectrum of barium mono-iodide using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace. **Spectrochim. Acta Part B**, v. 64, p. 697–701, 2009.

[180] LURIE, J. Handbook of Analytical Chemistry, Mir Publishers, Moscow, 1975.

[181] BRASIL. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT. NBR 9425:2005, de 29 de abril de 2005.