

JURACIR SILVA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA A
DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

JURACIR SILVA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA A
DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de fevereiro de 2007

Prof. Efraim Lázaro Reis
(Co-orientador)

Prof^a. Maria do Carmo Hespanhol da Silva
(Co-orientadora)

Prof. Fernando Barboza Egreja Filho

Prof. Benjamin Gonçalves Milagres

Prof. César Reis
(Orientador)

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”
(GALILEU GALILEI)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a vida.

Aos meus pais Antonio Pereira Santos e Mirian da Silva Santos e meus irmãos Juarez, Jucival e Jussiara pelo amor e incentivo durante toda minha vida.

A minha noiva, Carla Souza Cruz, pela compreensão e paciência durante a execução deste trabalho, mesmo distante.

À Universidade Federal de Viçosa, pelas facilidades concedidas para a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

Ao Professor César Reis pela sua orientação e dedicação durante todo este trabalho.

Aos professores Efraim Lázaro Reis, Maria do Carmo Hespanhol da Silva e Benjamin Gonçalves Milagres pelos aconselhamentos.

À Marisa, secretária da Pós-Graduação, que sempre me ajudou nas horas fáceis e difíceis.

Aos professores Valfredo Azevedo Lemos e Regina Terumi Yamaki pela eterna amizade.

Aos amigos de República Fred e Marcelo Eça pelo companheirismo, amizade e incentivo no período em que estive em Viçosa.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Instrumentação e Quimiometria: Viviane, Leandra, Lidiane, Patrícia, Silvéria, José Carlos, Henrique, Ana Paula, Fernanda, Flávia, Anderson, Glasiela, e Cristiano pelos momentos que passamos juntos e ajuda no que foi necessário durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao técnico Ricardo Natalino (xuxu) e aos alunos de Iniciação Científica Luiz Gustavo e Alexsandro Matias pela colaboração durante todo o trabalho.

Aos amigos, Cléber, João, Cristiane, Nayara, Teresa, Leo, Filipe, Guilherme, Raquel, Ulisses, Jorge, Peterson, Carlos, Róbson, Kamila e Kitê que sempre proporcionaram um ambiente agradável enquanto estive em Viçosa.

Sei que muitas outras pessoas contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado. Perdoe-me se seus nomes não aparecem aqui explicitamente, mas pode ter a certeza que serei eternamente grato.

BIOGRAFIA

JURACIR SILVA SANTOS, filho de Antônio Pereira Santos e Mirian da Silva Santos, nasceu em Jequié, Bahia, em 28 de Agosto de 1980.

Em março de 2000 iniciou o Curso de Licenciatura em Química na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, diplomando-se em Janeiro de 2005.

Durante este período, foi bolsista por três anos do programa de Bolsas do CNPq, onde desenvolveu pesquisas na área de Química Analítica. Atuou em projetos, como produção de novos reagentes orgânicos e resinas funcionalizadas utilizados em metodologias de pré-concentração para determinação de quantidades traço de metais.

Participou de congressos regionais e nacionais apresentando trabalhos científicos.

Em fevereiro de 2005 ingressou no programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química Analítica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2007.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO	
1. Introdução	01
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2. Revisão Bibliográfica	04
2.1 Nitrogênio no meio ambiente	04
2.1.1. Fontes de contaminação de nitrito, nitrato e amônio	08
2.1.2. Nitrito, nitrato e amônio em solos	09
2.1.3. Nitrito, nitrato e amônio em plantas	10
2.1.4. Nitrito, nitrato e amônio em águas	11
2.1.5. Nitrito e nitrato em alimentos	13
2.2. Determinação de nitrito e nitrato	14
2.2.1. Determinação de nitrito e nitrato por espectrofotometria ...	15
2.3. Redução de nitrato a nitrito	17
2.3.1. Redução de nitrato a nitrito por sulfato de hidrazina catalisada por Cu(II)	18
2.4. Determinação de amônio	19
2.4.1. Determinação de amônio por titrimetria	20
2.4.2. Determinação de amônio por espectrofotometria aplicando a metodologia de Nessler	21
2.4.3. Determinação de amônio por espectrofotometria	

aplicando o método do indofenol (reação de Berthelot)	22
2.5. Titulação potenciométrica pelo método de Gran	23
2.6. Planejamento fatorial	24
PARTE EXPERIMENTAL	
3. Parte Experimental	26
3.1. Preparo de soluções	26
3.1.1. Solução de cloreto de potássio 0,100 mol L ⁻¹	26
3.1.2. Solução padrão estoque de nitrato 50,00 mg L ⁻¹	26
3.1.3. Solução padrão estoque de nitrito 50,00 mg L ⁻¹	26
3.1.4. Solução de hidróxido de sódio	27
3.1.5. Solução de sulfato de cobre 0,0350 g L ⁻¹	27
3.1.6. Solução de sulfato de hidrazina 0,375 g L ⁻¹	27
3.1.7. Solução de ácido clorídrico 0,120 e 2,40 mol L ⁻¹	27
3.1.8. Soluções de sulfanilamida 5,000 g L ⁻¹	27
3.1.9. Solução de N-(1-naftil)-etilenodiamina 2,250 g L ⁻¹	28
3.1.10. Solução de EDTA 100,0 g L ⁻¹	28
3.1.11. Soluções de ácido sulfúrico 0,500 mol L ⁻¹	28
3.1.12. Solução de cloreto de sódio 0,5000	28
3.1.13. Solução digestora	28
3.1.14. Padronização da solução de NaOH	29
3.1.15. Solução estoque de sulfato de amônio	29
3.1.16. Padronização da solução sulfato de amônio	29
3.2. Montagem do sistema para a determinação de nitrogênio total e amoniacal	30
3.3. Procedimento geral para determinação de nitrogênio total e amoniacal	31
3.4. Procedimento geral otimizado para determinação de nitrato	

	utilizando a reação de Griess modificada	31
3.5.	Procedimento geral para determinação de nitrito pelo método da adição padrão utilizando a reação de Griess modificada	32
3.6.	Otimização da metodologia da determinação de nitrato utilizando a reação de Griess modificada aplicando planejamento fatorial e superfície de resposta	33
3.6.1.	Planejamento fatorial fracionário 2^{9-5} de resolução IV	33
3.6.2.	Planejamento fatorial 2^5 dividido em blocos	34
3.6.3.	Planejamento composto central para três fatores	34
3.7.	Coleta e preparo de amostras de água, solo, aveia e fertilizante para a determinação de nitrogênio total e amoniacal	35
3.7.1.	Abertura das amostras de solo, aveia e fertilizante	36
3.8.	Metodologia de Kjeldahl para determinação de nitrogênio total	37
3.9.	Coleta e preparo de amostras para determinação de nitrato ...	37
3.9.1.	Coleta e preparo de amostra de água da lagoa São Bartolomeu	37
3.9.2.	Coleta e preparo de amostra de água de torneira	37
3.10.	Parâmetros analíticos e validação do método para a determinação do íon amônio	38
3.11.	Parâmetros analíticos envolvidos na determinação de nitrato .	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO		
4.	Resultados e Discussão	40
4.1.	Reações envolvidas na determinação do íon amônio	40
4.2.	Padronização das soluções de sulfato de amônio e hidróxido de sódio utilizando o método de Gran	41
4.3.	Variáveis que afetam a reação de formação de imina na determinação do íon amônio	43
4.3.1.	Influencia do EDTA na determinação do íon amônio	43
4.3.2.	Estudo da quantidade de formaldeído na determinação	

do íon amônio	45
4.4. Parâmetros analíticos e validação do método para a determinação do íon amônio	46
4.4.1. Parâmetros analíticos	46
4.4.2. Validação do método para a determinação do íon amônio	47
4.5. Teste de recuperação de amônio	48
4.6. Comparação entre a metodologia proposta e a metodologia de Kjeldahl	48
4.7. Reações envolvidas na determinação de nitrato utilizando a reação de Griess modificada	50
4.8. Otimização da metodologia de determinação de nitrato utilizando a reação de Griess modificada	51
4.8.1. Planejamento fatorial	52
4.8.2. Planejamento fatorial – triagem dos fatores	53
4.8.3. Planejamento fatorial 2 ⁵ completo em bloco dividido em blocos	55
4.8.4. Planejamento composto central para três fatores e superfície de resposta	62
4.9. Estabilidade do complexo p-(4-etilenodiamino-1-naftilazo) benzenosulfonamida	69
4.10. Parâmetros analíticos para determinação de nitrato (metodologia otimizada)	69
4.11. Determinação de nitrato utilizando a metodologia de Griess em amostra de água	70
4.12. Teste de recuperação	71
CONCLUSÕES	
5. Conclusões	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
6. Referências Bibliográficas	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Ciclo biológico do nitrogênio	05
Figura 02: Processos de nitrificação e desnitrificação dos compostos nitrogenados	07
Figura 03: Sistema empregado para a determinação de amônio	30
Figura 04: Planejamento composto central para três fatores	35
Figura 05: Mudança de coloração da solução durante o processo da digestão	36
Figura 06: Equação do mecanismo de reação de amônia com formaldeído para a formação de imina	41
Figura 07: Funções de Gran obtidas a partir da titulação da solução de sulfato de amônio com solução de hidróxido de sódio 0,09972 mol L ⁻¹	42
Figura 08: Estudo da quantidade de EDTA na determinação de íon amônio. A concentração do íon NH ₄ ⁺ é expressa em função da concentração de sulfato de amônio	44
Figura 09: Influência do EDTA na variação do pH na titulação de sulfato de amônio	44
Figura 10: Influência da quantidade de formaldeído na titulação de sulfato de amônio	45
Figura 11: Cálculo do limite de quantificação pela diminuição da concentração do íon amônio em função do erro relativo	46
Figura 12: Etapas seguidas na determinação de amônio pelo método do formaldeído (A) e de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (B)	49
Figura 13: Reação de Griess modificada	50
Figura 14: Curva analítica baseado na reação de Griess-Llosvay, com redução de nitrato a nitrito com solução de sulfato de hidrazina, modificado a partir de Rider-Mellon e Mullin-Riley	51

Figura 15: Estudo da interação 23	55
Figura 16: Superfície de resposta com a concentração da solução de hidróxido de sódio fixada em $0,132 \text{ mol L}^{-1}$, (Var1 = -1,682)	66
Figura 17: Superfície de resposta com a concentração da solução de hidróxido de sódio fixada em $0,200 \text{ mol L}^{-1}$, (Var1 = -1)	66
Figura 18: Superfície de resposta com a concentração da solução de hidróxido de sódio fixada em $0,300 \text{ mol L}^{-1}$, (Var1 = 0)	67
Figura 19: Superfície de resposta com a concentração da solução de hidróxido de sódio fixada em $0,400 \text{ mol L}^{-1}$, (Var1 = +1)	67
Figura 20: Superfície de resposta com a concentração da solução de hidróxido de sódio fixada em $0,468 \text{ mol L}^{-1}$, (Var1 = +1,682) ...	68
Figura 21: Estudo da estabilidade do complexo p-(4-etilenodiamino-1-naftilazo) benzenosulfonamida	69
Figura 22: Curva analítica para a determinação de nitrato na faixa de $0,020 - 0,20 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Estados de oxidação e principais compostos nitrogenados	07
Tabela 02: Padrão de potabilidade da água em função do valor máximo permitido de nitrogênio que representam risco a saúde humana	13
Tabela 03: Resultado obtido na análise de amostras de solo, aveia e fertilizante pela metodologia proposta e pela metodologia de Kjeldahl	47
Tabela 04: Resultado obtido na determinação de nitrogênio total e amoniacal em amostra de solo e nitrogênio amoniacal em amostra de água de torneira	48
Tabela 05: Condições experimentais, sem otimização, para construção da curva analítica de nitrato	51
Tabela 06: Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial fracionário	52
Tabela 07: Planejamento fatorial 2_{IV}^{9-5} para estudar a influência de nove fatores	53
Tabela 08: Contrastes calculados na fração 2_{IV}^{9-5} , e suas expressões em termos dos efeitos principais e das interações binárias de um fatorial completo 2^4	54
Tabela 09: Fatores e níveis determinados para a realização do planejamento fatorial 2^5 completo em dois blocos de 16 ensaios	55
Tabela 10: Resultados obtidos para o primeiro (A) e segundo bloco (B)	56
Tabela 11: Algoritmo de Yates para o cálculo da soma de quadrado dos efeitos e interações	58

Tabela 12: Análise de variância para verificar a significância dos efeitos e interações	60
Tabela 13: Dados experimentais para a montagem de um planejamento fatorial composto central	62
Tabela 14: Dados experimentais ampliados para a execução de um planejamento fatorial composto central	63
Tabela 15: Fatores e níveis escolhidos para o planejamento	63
Tabela 16: Variáveis codificadas, decodificadas e sinais obtidos durante a realização do planejamento composto central	64
Tabela 17: Parâmetros, erros e teste t para estimar a equação do modelo	64
Tabela 18: Análise de variância para o ajuste do modelo	65
Tabela 19: Determinação de nitrato e nitrito em amostras água	71
Tabela 20: Determinação de nitrato e nitrito em amostras água	71
Tabela 21: Recuperação obtida na determinação de nitrato e nitrito em amostras água	72

RESUMO

SANTOS, Juracir Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Desenvolvimento e otimização de metodologias para a determinação de nitrogênio.** Orientador: César Reis. Co-orientadores: Efraim Lázaro Reis, Valfredo Azevedo Lemos e Maria do Carmo Hespanhol da Silva.

A determinação de nitrogênio inorgânico e orgânico é um objeto de interesse na análise de amostras biológicas, solo, água e alimentos. Essas análises são motivadas pelas perdas de nitrogênio do solo para os lençóis freáticos e para os ecossistemas marinhos, provocando eutrofização e pela elevada toxicidade desses compostos, em homens, animais e vegetais. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e otimizar métodos para a determinação de nitrato e amônio. A metodologia proposta para a determinação de amônio foi baseada na reação do íon amônio com formaldeído e posterior titulação com solução de hidróxido de sódio. A otimização da metodologia foi realizada por análise univariada, sendo estudados os efeitos da quantidade de formaldeído, suficiente para favorecer a cinética da reação e possibilitar a recuperação quantitativa do amônio, e da concentração de EDTA, necessário para evitar interferentes metálicos e tamponar o meio. A metodologia para a determinação de amônio com formaldeído foi validada tendo como referência a metodologia de Kjeldahl e por testes de recuperação resultando em um procedimento simples, rápido e de baixo custo para a determinação de nitrogênio na forma amoniacal, podendo ser aplicado para a análise de rotina. O método foi aplicado com sucesso para a determinação de nitrogênio total em amostra de água, solo, fertilizante e aveia. Para a determinação de nitrato foram feitas as otimizações da reação de Griess modificada e da etapa de redução de nitrato a nitrito pela hidrazina com a finalidade de obter maior rapidez nas análises, menor consumo de reagentes e alcançar maior sensibilidade. A otimização foi realizada por planejamentos fatorial e de superfície de resposta, onde foram considerados os seguintes parâmetros: concentrações de cloreto de potássio, hidróxido de sódio, sulfato de cobre, sulfato de hidrazina, sulfanilamida e Nafitil-etilenodiamina,

temperatura de aquecimento e tempos de agitação e resfriamento. A otimização da determinação de nitrato pela metodologia de Griess modificada possibilitou a diminuição no tempo de análise e na temperatura, reduzindo assim, o custo das análises. Além disso, proporcionou um aumento no sinal analítico de 34,8%. A reação de Griess otimizada foi aplicada com sucesso na determinação de nitrato em águas naturais na faixa de 0,020 a 0,20 mg L⁻¹ com um limite de detecção de 5,80 µg L⁻¹.

ABSTRACT

SANTOS, Juracir Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa. February of 2007.
Development and optimization of methodologies to the nitrogen determination. Adviser: César Reis. Co-Advisers: Efraim Lázaro Reis, Valfredo Azevedo Lemos and Maria do Carmo Hespanhol da Silva.

The determination of inorganic and organic nitrogen is an interesting subject in the analysis of biological samples: soil, water and foods. These analyses are motivated by the losses of nitrogen of the ground to freatic sheets and marine ecosystems, causing eutrofization, and by the elevated toxicity of these composites, in human, animals and vegetables. This paper had as objective to develop and to optimize methods to the determination of nitrate and ammonium. The proposal methodology to the ammonium determination was based on the reaction of the ammonium ion with formaldehyde and posterior tritration with sodium hydroxide solution. The optimization of the methodology was carried through univariate analysis. The effect of the amount of sufficient formaldehyde to help the kinetic of the reaction and to make the quantitative recovery of ammonium possible was studied, and the concentration of EDTA necessary to prevent metallic interferent and to tamponate the essay was studied as well. The methodology for the ammonium determination with formaldehyde was validated having as reference the methodology of Kjeldahl and through tests of recovery, resulting in a simple, fast and with low cost procedure to the nitrogen determination in the ammoniac form, this procedure can be applied in routine analysis. The method was successfully applied to determinate ammoniac nitrogen in sample of water, soil, fertilizer and oats. To the nitrate determination, optimizations of the modified reaction of Griess and the stage of nitrate reduction into nitrite was done by hydrazine with the purpose to get greater rapidity in the analyses, minor consumption of reagents and to reach greater sensibility. The optimization was carried through factorial plan and through response surface, where the following parameters were considered: potassium chloride concentrations, sodium hydroxide, copper sulphate, hydrazine sulphate, sulfanilamide and naphthyl ethylenediamine, temperature of heating and times of

agitation and cooling. The optimization of the nitrate determination through the modified Griess methodology made possible the reduction of the time of analysis and the temperature, reducing, the cost of the analyses. Moreover, it provided an increase in the analytical signal of 34.8%. The optimized Griess reaction was successfully applied in the nitrate determination in natural waters in the band of 0.020 to 0.20 mg L⁻¹ with a limit of detection of 5.80 µg L⁻¹.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um dos elementos essenciais à vida, fazendo parte dos processos vitais de plantas e animais [1, 2]. Embora esse elemento seja abundante, o suprimento das formas disponíveis para as plantas é escasso em muitas partes do mundo. Onde a insuficiência existe, a produção de alimentos é limitada, e as colheitas são muitas vezes insuficientes para suprir a demanda de alimentos [3].

O nitrogênio é o quarto elemento mais abundante na planta, perdendo apenas para o carbono, hidrogênio e oxigênio. O nitrogênio é considerado fundamental no metabolismo das plantas, pois é utilizado na síntese de proteínas e outros compostos orgânicos, tais como aminoácidos, nucleotídeos e coenzimas. Desta forma, está comprovada a relação entre o teor de nitrogênio e o crescimento das plantas. Um dos principais sintomas da deficiência do nitrogênio é o amarelecimento ou clorose das folhas, devido à inibição da síntese de clorofila, o que resulta, principalmente, na diminuição da fotossíntese e conseqüentemente, na síntese de aminoácidos essenciais [4]. Além disso, sua ausência limita o crescimento vegetal e a sua disponibilidade tem sido associada à redução da divisão e expansão celular, da área foliar e da fotossíntese [5].

Desde a antiguidade, os homens aprenderam a compensar a quantidade insuficiente de nitrogênio em muitos solos usando fezes humanas e de animais ou o cultivo de leguminosas. Atualmente, a quantidade de nitrogênio requerida vem sendo suprida pela utilização de fertilizantes químicos [3]. Embora o nitrogênio possa agir como fertilizante, quantidades excessivas dos compostos deste elemento podem causar problemas ambientais [2].

A quantidade de nitrogênio aplicado nas lavouras tem aumentado rapidamente nas últimas décadas ao nível global. Dentre as conseqüências deste aumento, estão a elevação das perdas de nitrato do solo para os lençóis freáticos e para os ecossistemas marinhos e a emissão de gases que contém nitrogênio para a atmosfera [6].

O uso excessivo de fertilizante inorgânico juntamente com a utilização indiscriminada dos recursos naturais têm sido apontado como os principais responsáveis na perturbação global e local do ciclo do nitrogênio [7].

A determinação de nitrogênio inorgânico e orgânico é um objeto de interesse na análise de solo, para verificar sua fertilidade. Além disso, a determinação de nitrogênio pode ser requerida para a análise de água, alimentos e amostras biológicas devido ao aumento na eutrofização de águas naturais e sua elevada toxicidade em homens, animais e vegetais [8]. Desta forma, neste trabalho é proposto o desenvolvimento de um método para a determinação do íon amônio utilizando formaldeído e posterior titulação com NaOH para ser aplicado em amostras de alimentos, solos, fertilizantes e água. É proposto também, otimizar por planejamento fatorial o método de determinação de nitrato utilizando a reação de Griess modificada empregando como técnica de detecção a espectrofotometria. Com a otimização pretende-se obter maior rapidez nas análises, menor consumo de reagentes e maior sensibilidade.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Nitrogênio no Meio Ambiente

O nitrogênio é o elemento não combinado mais abundante acessível ao homem. Ele compreende cerca de 78,1% da atmosfera terrestre. Foi “descoberto” em 1772 por Daniel Rutherford. Acredita-se também que o gás foi isolado independentemente na mesma época por C. W. Scheele e H. Cavendish. O nome “nitrogênio” foi sugerido por Jean-Antoine Chaptal em 1790 quando foi percebido que o elemento era um constituinte do ácido nítrico e do nitrato [9, 10 e 11].

Apesar do nitrogênio (N_2) ser muito abundante na atmosfera, ele é relativamente escasso na crosta terrestre: nesta, seu teor é da ordem de 19 ppm (isto é, 19 g em cada tonelada), teor, igual ao do gálio, 33^o em ordem de abundância, e semelhante ao do nióbio (20 ppm) e do lítio (18 ppm) [11].

O nitrogênio encontra-se no solo essencialmente na forma orgânica (aproximadamente 98%). A outra pequena parte encontra-se nas formas inorgânicas de amônio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-). A principal reserva de nitrogênio do solo é a matéria orgânica, com grande significado para o suprimento do nutriente para as culturas através de processos químicos e biológicos. A mineralização é a transformação biológica do nitrogênio orgânico em nitrogênio inorgânico, executada pelos microrganismos heterotróficos do solo. A imobilização refere-se ao processo inverso, ou seja, é a transformação do nitrogênio inorgânico em orgânico. A quantidade de nitrogênio inorgânico no solo depende, entre outros fatores, da disponibilidade de resíduos orgânicos, da relação C:N do solo, da umidade e do pH do solo. Em contrapartida, o teor total de nitrogênio, no solo, praticamente não varia em curto prazo, ou mesmo no período de alguns anos. Entre os fatores que contribuem para o aumento da produtividade das culturas, a disponibilidade de nitrogênio é um dos fatores mais importantes, pois este elemento é um nutriente absorvido em maiores quantidades pela maioria das culturas e o que exerce efeito mais pronunciado na produção [12, 13].

O nitrogênio é um elemento fundamental para todas as formas de vida. Este composto é empregado como, um constituinte essencial para a formação de

proteínas e aminoácidos, sendo o terceiro elemento mais abundante, contribuindo com cerca de 17% da composição média de uma proteína. As plantas e os microrganismos do solo assimilam as formas inorgânicas de nitrogênio para formar os constituintes orgânicos de suas células e tecidos [9, 12].

Na natureza, o nitrogênio é visto como se estivesse se movendo em um tipo de ciclo fluído da atmosfera para o solo, onde é absorvido por plantas, que posteriormente servem de alimento para animais e seres humanos, e o nitrogênio de todos estes tecidos retornam a atmosfera por degradação microbiana da matéria orgânica e redução de nitrato a nitrogênio gasoso. A representação do ciclo do nitrogênio no ambiente é mostrada na figura 1 [3].

Qualquer alteração nos níveis de nitrogênio biologicamente disponível no solo pode afetar drasticamente a vida dos microrganismos, plantas e animais [14]. Neste sentido, o conhecimento das fontes, naturais ou antrópicas, bem como de suas grandezas, é necessário para um melhor entendimento do ciclo do nitrogênio e avaliação dos impactos causados pelas atividades humanas aos ambientes naturais [15].

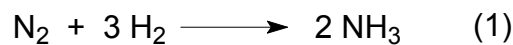


Fonte: http://www.ib.usp.br/ecologia/ciclos_biogeo_05_ciclo_nitrogenio.jpg

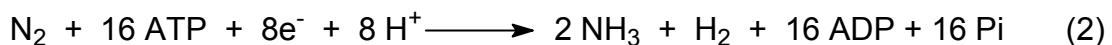
Figura 1: Ciclo biológico do nitrogênio.

A maioria dos organismos vivos é incapaz de absorver o N_2 e convertê-lo a uma forma assimilável. Nesta molécula, os átomos de nitrogênio encontram-se unidos de uma maneira muito estável. Por esse motivo para que o N_2 possa ser convertido a uma forma assimilável é necessário o fornecimento de temperatura e

pressão muito elevadas (fixação industrial) ou a presença de um sistema enzimático apropriado (fixação biológica). A fixação industrial do N₂, chamada de processo de Haber-Bosch, utiliza temperaturas em torno de 400 a 600 °C e pressões em torno de 100 a 200 atm, sendo dispendiosa do ponto de vista energético. O processo de Haber-Bosch é representado na equação 1, onde os valores de pressão e temperatura foram omitidos [16].



A fixação biológica do nitrogênio, processo demonstrado na equação 2, é realizada apenas por alguns procariontes, denominados organismos fixadores de nitrogênio. Do ponto de vista energético, este processo é dispendioso para o organismo que o realiza. Devido à presença de um sistema enzimático, a reação pode ocorrer à temperatura ambiente e pressão atmosférica. Desta forma, a fixação biológica do nitrogênio só ocorre graças a uma enzima, denominada nitrogenase [16].



Grandes quantidades de nitrogênio são consumidas nos diversos processos de fixação do nitrogênio atmosférico, seja ela feita por processos industriais ou realizada por microrganismos, tornando o nitrogênio disponível às plantas, na forma de NH₄⁺ e NO₃⁻.

O único processo de obtenção industrial de N₂ em larga escala é através da liquefação seguida de destilação fracionada do ar liquefeito. Além da aplicação na produção de fertilizantes nitrogenados, o N₂ é empregado em vários processos químicos quando se deseja obter uma atmosfera inerte (sem a presença de outros elementos reativos, como o oxigênio) ou ainda, pode ser utilizado na forma de nitrogênio líquido como agente refrigerante, tanto para o congelamento de produtos alimentícios como para o transporte de alimentos [11].

Existem formas importantes de nitrogênio do ponto de vista ambiental que se diferenciam no grau de oxidação do átomo de nitrogênio. As mais reduzidas são a amônia (NH₃) e seu ácido conjugado, o íon amônio (NH₄⁺). A forma mais

oxidada é o íon nitrato (NO_3^-). A tabela 1 apresenta as formas e respectivos graus de oxidação dos principais compostos nitrogenados [17].

Tabela 1: Estados de oxidação e principais compostos nitrogenados

Estados de Oxidação	-3	0	+1	+2	+3	+4	+5
Soluções Aquosas e Sais	$\text{NH}_3, \text{NH}_4^+$				NO_2^-		NO_3^-
Fase gasosa	NH_3	N_2	N_2O	NO		NO_2	

Um composto de nitrogênio pode se converter em outro composto nitrogenado por dois processos conhecidos como desnitrificação ou nitrificação. No primeiro, nitrogênio é reduzido principalmente para nitrogênio molecular. No segundo, nitrogênio reduzido na forma de amônia ou íon amônio é oxidado quase completamente para íons nitrito e nitrato [17].

A figura 2 apresenta os processos de nitrificação e desnitrificação dos compostos nitrogenados na forma mais reduzida e oxidada, bem como os estados de oxidação de cada espécie formada.

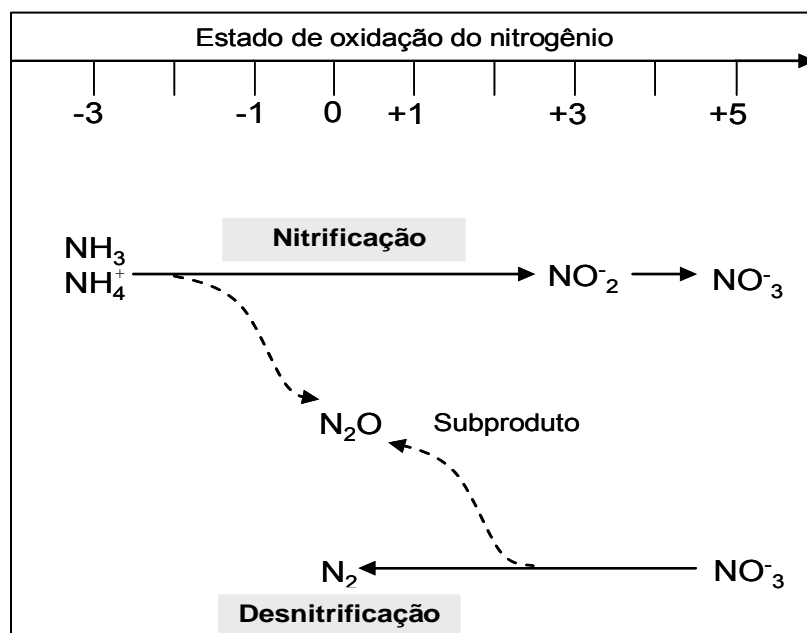


Figura 2: Processos de nitrificação e desnitrificação dos compostos nitrogenados [17].

2.1.1. Fontes de contaminação de nitrito, nitrato e amônio

Nitrito e nitrato têm se misturado à vida doméstica, é efetivamente impossível encontrar no cotidiano das pessoas atividades sem a presença desses íons. Os íons nitrito e nitrato estão presentes no meio ambiente, alimentos e sistemas fisiológicos. A versatilidade química desses agentes tem assegurado sua utilização em um grande número de processos industriais abrangendo desde a fabricação de fogos de artifícios à produção de tintas. Sua ação anti-microbiana, identificada há séculos, ainda é usada para a preservação de enlatados, carnes, frios e alimentos [7, 17]. Levando em consideração o grande número de produtos e atividades a que esses íons são submetidos, é o lançamento ambiental que tem despertado o interesse público e a preocupação de uma proporção significativa da comunidade científica [6].

O depósito de nitrito e nitrato no meio ambiente pode ocorrer através de processos de combustão doméstica e industrial, que geram espécies gasosas de NO_x , as quais, posteriormente, são convertidas em NO_3^- através de conversão fotoquímica na atmosfera. Altas concentrações de nitrato também podem ser originadas de processos de nitrificação ou diretamente de esgoto ou fertilizantes [18]. A grande maioria, no entanto, provém de fontes agrícolas. O uso indiscriminado de fertilizante inorgânico combinado com a utilização indiscriminada dos recursos naturais causa como resultado a perturbação do ciclo local e global do nitrogênio [7].

O íon amônio é liberado no ambiente pela matéria orgânica ou uréia, prática da aquicultura marinha ou é sintetizado por processos industriais envolvendo fixação atmosférica do nitrogênio.

2.1.2. Nitrito, nitrato e amônio em solos

A poluição dos solos constitui-se em um dos mais sérios problemas ecológicos decorrentes da atividade humana na atualidade. A maioria dos fertilizantes usados na agricultura contém grandes concentrações de nitrogênio (N) e fósforo (P). Esses elementos são importantes nutrientes para as plantas, inclusive para as plantas aquáticas, e para algumas espécies de algas. Em condições de abundância de N e P, as plantas crescem excessivamente [19].

O íon amônio é relativamente imóvel no solo e sedimentos. A carga negativa das partículas do solo retém o amônio de carga positiva, os quais podem estar fracamente adsorvidos na superfície (NH_4^+ trocável) ou fixos nos espaços interlamelares dos minerais argilosos (NH_4^+ fixo). A quantidade de amônio fixo depende da disponibilidade do íon NH_4^+ durante a formação dos minerais argilosos e da capacidade de fixação desses minerais [20].

Os íons nitrito e nitrato são negativamente carregados, e por isso não são adsorvidos em solos eletronegativos, eles tendem a ser carregados com águas de escoamento superficial ou lixiviados no perfil do solo. A lixiviação de nitrato é um fenômeno físico favorecido pela baixa energia envolvida na sua adsorção às partículas do solo e também pela sua alta solubilidade em água. Estes íons podem ser carregados pela água de percolação resultando em perdas deste nutriente, contaminação do lençol freático e de cursos d'água [6, 21].

A lixiviação de nitratos no solo pode alcançar grande magnitude, se este ânion estiver presente no solo, em quantidades acima da capacidade de absorção pela cultura e quando a irrigação ou chuva exceder a capacidade de armazenagem de água do solo. Neste caso, o nitrato acompanhar a água de recarga dos aquíferos subterrâneos, trazendo sérios riscos sanitários para a população, que utiliza essas águas [21].

Quando o íon amônio é formado ou adicionado no solo, ele geralmente é convertido por microorganismos a nitrato sempre que fatores favoráveis como temperatura, acidez do solo e aeração, estiverem presentes [3]. Em áreas onde o pH é naturalmente baixo ou não foi devidamente corrigido, a atividade microbiana é baixa, impedindo a conversão do amônio em nitrato. Nessas condições, os fertilizantes nitrogenados aplicados, na forma de uréia ou como sulfato de amônio,

não serão transformados em nitratos, permanecendo no perfil do solo como amônio [22].

De início, pensou-se que resíduos oxidados de aminas, esterco, juntamente com nitrato de amônio não-absorvidos e outros fertilizantes nitrogenados eram os principais responsáveis pela presença de nitrato. No entanto, acredita-se que o cultivo intensivo da terra, mesmo sem aplicação de fertilizantes ou esterco facilita a oxidação do nitrogênio reduzido presente na matéria orgânica decomposta no solo, para nitrato, pelo efeito da aeração e da umidade [17].

Os íons nitrito ocorrem em solos alagados, ambientes anaeróbicos, que não são redutores o suficiente para converter todo nitrogênio em amônio.

2.1.3. Nitrito, nitrato e amônio em plantas

A maioria das espécies vegetais é capaz de absorver e assimilar nitrato e amônio, mas a preferência pela fonte varia de espécie para espécie. Sendo que, o nitrato é a forma mais importante para o crescimento das plantas [23]. Os íons amônio e nitratos gerados pela fixação ou liberados pela decomposição da matéria orgânica do solo tornam-se objetos de intensa competição entre plantas e microorganismo. Para permanecerem competitivos, os vegetais desenvolveram mecanismo para capturar rapidamente esses íons a partir da solução do solo.

Quando as concentrações desses íons são elevadas no solo, o que ocorre após a fertilização com compostos nitrogenados, a absorção do amônio e do nitrato pelas raízes pode exceder a capacidade de uma planta assimilar por via metabólica esses íons, levando ao acúmulo de nitrato. As plantas podem acumular altos níveis de nitrato nos vacúolos para posterior utilização ou podem translocá-lo através dos tecidos sem efeitos prejudiciais, enquanto altos níveis de amônio são tóxicos para as plantas [5].

2.1.4. Nitrito, nitrato e amônio em águas

Amônio, nitrito e nitrato são as principais formas de nitrogênio inorgânico dissolvidos na água do mar e desempenham um papel importante em ecossistemas marítimos [18]. Além das formas de contaminação citadas no item 2.1.1. Alguns tipos de bactérias e algas podem fixar o gás nitrogênio, convertendo-o a nitrogênio orgânico e fazendo-o disponível em outras espécies. Nitrato é a forma mais abundante e pode ser proveniente de rochas expostas ao ar, deposição atmosférica, empreendimentos agrícolas, lixiviados pela água da chuva e despejos de esgoto [18]. Em ambientes aeróbicos, como na superfície de lagos, o nitrogênio existe na forma mais oxidada, nitrato, ao passo que, em ambientes anaeróbicos em sua forma completamente reduzida, íon amônio ou amônia [17]. Um aumento na concentração do íon amônio pode, conseqüentemente, aumentar a concentração de amônia que é tóxica para os peixes, e de nitrato via nitrificação. O íon nitrito, o qual, é tóxico para os peixes, é uma espécie intermediária no ciclo do nitrogênio [18].

O íon nitrato age como principal reservatório de nitrogênio combinado nos oceanos e exerce controle sobre a vida marinha. Altos níveis de nitrato em rios conduzem ao elevado crescimento de algas, as quais, em seguida, diminuem o nível de oxigênio biologicamente disponível, prejudicando o balanço ecológico em rios e lagos [19, 24]. O excesso de íon nitrato nas águas residuais que fluem para o mar tem resultado em uma camada superpovoada de algas, que poluem o mar após sua morte trazendo destruição ao ecossistema local [7, 17].

A contaminação de moluscos comestíveis e a ocorrência de maré vermelha de algas potencialmente tóxicas próximas a locais de atração turística podem em parte contribuir com o grau de miséria econômica das comunidades atingidas [7].

Altas concentrações de nitrato na água potável constituem um risco para a saúde, visto que pode resultar em metemoglobinemia, doença em que ocorre o impedimento do transporte de oxigênio dos alvéolos pulmonares para os tecidos, o que pode acarretar em morte [8, 17, 25].

O desenvolvimento da metemoglobinemia a partir do nitrato nas águas potáveis depende da sua conversão para nitrito, por bactérias, durante a digestão, o que pode ocorrer na saliva e no trato gastrointestinal. As crianças,

principalmente as menores de três meses de idade, são bastante susceptíveis ao desenvolvimento desta doença devido às condições mais alcalinas do seu sistema gastrointestinal, fato também observado em pessoas adultas que apresentam gastroenterites, anemia, porções do estômago cirurgicamente removidas e mulheres grávidas [26].

Vários casos fatais de metemoglobinemia já foram verificados com crianças com menos de seis meses, que beberam água de poço com alto conteúdo de nitrato [26].

O nitrito, quando presente na água potável, tem um efeito mais rápido e pronunciado do que o nitrato. Se o nitrito for ingerido diretamente, pode ocasionar metemoglobinemia independente da faixa etária do indivíduo [27].

Alguns cientistas têm advertido que o excesso do íon nitrato na água potável também pode levar a um aumento na incidência de câncer de estômago em seres humanos, dado que esses íons são convertidos em íons nitrito no estômago. As nitrosaminas e nitrosamidas, compostos conhecidos por sua ação carcinogênica, podem surgir como produtos de reações entre o nitrito ingerido ou formado pela redução bacteriana do nitrato, com as aminas secundárias ou terciárias e amidas presentes nos alimentos. O pH ótimo para a reação de nitrosaminação está entre 2,5 a 3,5, faixa semelhante à encontrada no estômago humano após a ingestão de alimentos. Tanto as nitrosaminas como as nitrosamidas estão relacionadas com o aparecimento de tumores em animais de laboratório [17, 27]. O nitrato também pode ser reduzido na cavidade bucal e, sendo a faixa ótima de pH para a formação de nitrosaminas semelhante àquela encontrada no estômago do homem após a ingestão de alimentos [28].

A forma mais eficaz de prevenir o surgimento da metemoglobinemia e do câncer de estômago é fazer um rígido controle das doses de íons nitrito e nitrato, principalmente na água de beber.

No Brasil, o limite máximo permitido de nitrogênio nas formas de nitrito, nitrato e nitrogênio amoniacal na água destinada ao consumo humano devem estar em conformidade com o padrão de substâncias químicas estabelecidos pela Portaria nº. 518/2004 e resolução CONAMA nº. 357/2005 [29, 30]. O Padrão de potabilidade da água em função do valor máximo permitido de nitrito, nitrato e

nitrogênio amoniacal que representa risco a saúde humana são apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Padrão de potabilidade da água em função do valor máximo permitido de nitrogênio que representam risco a saúde humana [29, 30]

Parâmetro	Valor Máximo Permitido (mg L ⁻¹)	Faixa de pH
Nitrato	10,0	-
Nitrito	1,0	-
Nitrogênio Amoniacal	3,70	pH ≤ 7,5
	2,0	7,5 < pH ≤ 8
	1,0	8 < pH ≤ 8,5
	-	pH > 8,5

Fonte: Portaria nº. 518/2004 e resolução CONAMA nº. 357/2005

2.1.5. Nitrito e nitrato em alimentos

Nos vegetais, o nitrato está naturalmente presente, visto que a planta absorve nitrato como fonte de nitrogênio para o seu crescimento. Em vegetais danificados ou em condições de armazenamento inadequadas, incluindo temperatura elevada e período prolongado, há uma tendência de redução do teor de nitrato, enquanto o teor de nitrito aumenta. A conversão de nitrato a nitrito pode ser decorrente da ação de bactérias redutoras. A refrigeração é capaz de retardar o processo, sem, contudo, preveni-lo [28].

Algumas plantas acumulam nitrato nas raízes e na parte aérea quando a absorção excede as suas necessidades metabólicas, sendo encontrados altos teores nas folhas. Entre os alimentos consumidos pelo homem, os vegetais representam entre 72 e 94% da ingestão diária de nitrato [31].

O teor de nitrito em vegetais crus, diferentemente do teor de nitrato, é baixo, enquanto os vegetais fermentados ou em conserva, podem conter elevados teores de nitrito e nitrato [28].

Em alimentos industrializados, os íons nitrito e nitrato são adicionados aos processos de cura de carnes, bacon e salsicha para preservar o aroma, inibir o crescimento de microorganismos e, principalmente, conferir e fixar a cor rósea

avermelhada, característica dos produtos curados. Nesses alimentos, uma parte dos íons nitrato é reduzida bioquimicamente para íons nitrito, o que impede o crescimento do organismo responsável pelo botulismo [17, 28].

Nitratos e nitritos podem aparecer como contaminantes do leite, embora em concentrações pouco elevadas. Os nitratos passam do solo para o pasto usado na alimentação bovina e, após a absorção pelos animais, são excretados pelo leite. Os teores de nitrato e nitrito, no leite, podem ser influenciados pelo local de origem da amostra e pela estação do ano [32].

Além da formação de compostos N-nitroso, indutores de câncer. A presença de nitrito e nitrato, em altas concentrações, nos alimentos também pode levar a ocorrência de metemoglobinemia.

2.2. Determinação de Nitrito e Nitrato

As técnicas para a determinação de nitrito e nitrato podem ser classificadas como simultânea e seqüencial. Nas técnicas de determinação simultânea o analito é detectado independente um do outro em uma única medida. As metodologias empregadas para fazer a determinação simultânea de nitrito e nitrato são eletroquímica, eletroforese capilar, cromatografia, e espectroscopia de Ramam [7, 33]. Já a análise seqüencial tem como fundamento a detecção inicial do íon nitrito, mais versátil, seguido por uma redução da amostra, por um agente redutor, para assegurar que todo nitrato seja convertido em nitrito e repetir a análise de nitrito. Os cálculos da concentração podem ser obtidos pela diferença.

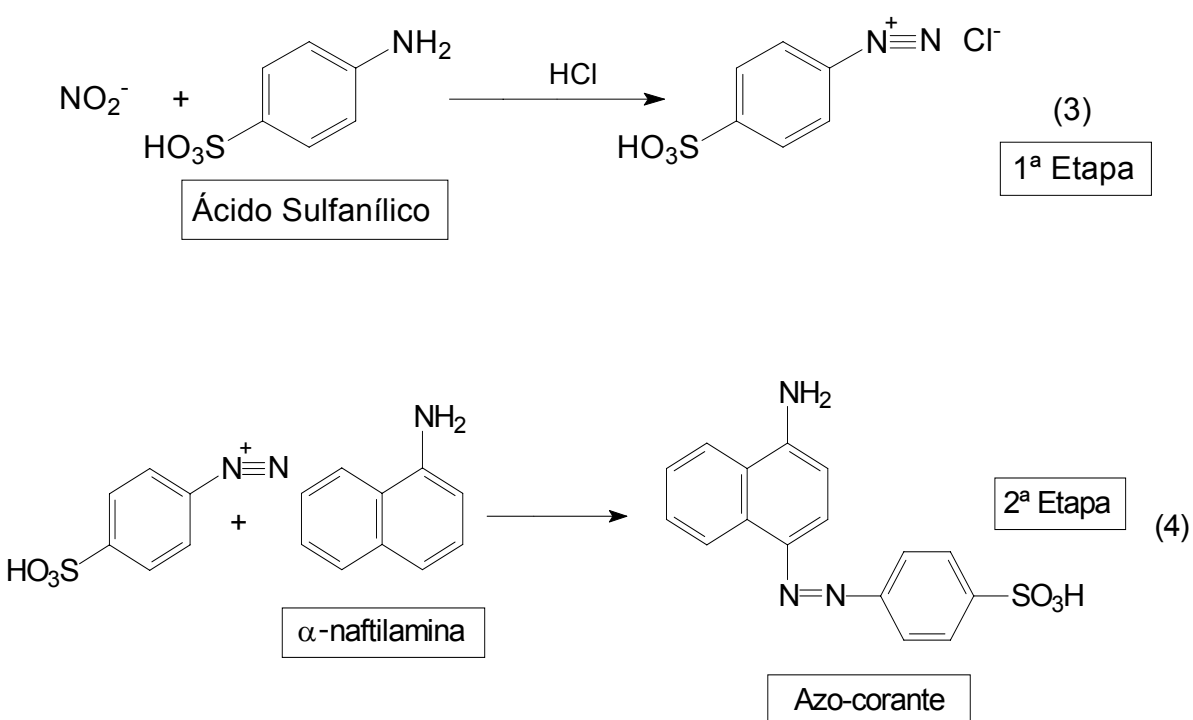
A maioria das estratégias para a determinação de nitrato geralmente conta com a detecção de nitrito [7]. As técnicas que utilizam o nitrito como suporte para a determinação de nitrato são eletroforese capilar [34], quimiluminescência [35], espectrofotometria UV/Vis [36], fluorimetria [37], eletroforese capilar de zona [38] e absorção atômica [39, 40].

A determinação indireta do nitrato apresenta vantagens em relação à direta. Entre elas é possível citar: maior sensibilidade, maior precisão e melhor seletividade, ou seja, é menos sujeita à interferência de outros íons, por exemplo, cloretos [7, 25].

2.2.1. Determinação de nitrito e nitrato por espectrofotometria

O método mais famoso e mais frequentemente usado para a análise de nitrito e nitrato é baseado na reação de Johann Peter Griess (1829 - 1888). A reação de Griess foi realizada pela primeira vez em 1879 e tornou-se a técnica mais comum para a detecção de nitrito. Até 1963 mais de 50 métodos colorimétricos foram desenvolvidos para a determinação de nitrito e nitrato em uma variedade de matrizes, muitos baseados na reação de Griess [7, 24, 41].

Na reação original de Griess, nitrito reage com ácido sulfanílico sob condições ácidas para formar um íon diazônio o qual acopla com a α -naftilamina para formar um corante azo vermelho-violeta, solúvel em água [24, 41]. As reações envolvidas estão representadas pelas equações químicas 2 e 3.



Além dos reagentes originalmente usados na reação de Griess, ácido sulfanílico e α -naftilamina, outros compostos derivados desses reagentes podem ser usados para a reação de diazotação e acoplamento, a saber, sulfanilamida e N-(1-naftil)etilenodiamina (NED ou NEDA). O uso do NED como um reagente para o acoplamento da sulfanilamida na reação de Griess foi sugerido pela primeira

vez por Bratton e Marshall em 1939. NED apresenta várias vantagens sobre componentes de acoplamento, tais como N,N-dimetil-1-naftilamina em termos de reprodutibilidade, maior rapidez de acoplamento, aumento na sensibilidade e aumento da solubilidade ácida do azo corante [41].

A reação de Griess modificada usando sulfanilamida e NED é atualmente a reação mais usada para determinação quantitativa de nitrito e nitrato. Este método foi estabelecido como padrão europeu para a determinação de nitrito em água [41, 42].

Numerosos ajustes têm sido feitos para o procedimento básico relativo a condições de reagentes e metodologias de detecção final. Ácido sulfanílico, nitroanilina e p-nitroacetofenona têm sido usados com finalidade de diazotar e fenol, naftol, 1-naftol-4-sulfonato, 1-aminonaftaleno e 1,3-diaminobenzeno têm sido investigados como agentes de acoplamento [7].

A metodologia de Griess tem sido encontrada em numerosas aplicações tanto para determinação de nitrito como para nitrato. Essas análises iniciam-se com a diazotação de uma amina aromática pelo nitrito em meio ácido com subsequente reação de acoplamento fornecendo um corante altamente colorido no qual a concentração de nitrito pode ser calculada. A absorção máxima para o produto colorido é geralmente encontrada no intervalo de 500 a 600 nm. (dependendo do reagente selecionado) [7, 24, 43].

O limite de detecção para o método de Griess tende ao intervalo de 0,02 a 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, de acordo com o reagente especificado, apresentando uma linearidade na faixa de 1 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [7, 18, 44].

A técnica é um método simples e efetivo para detecção de nitrito em uma variedade de matrizes, mas pode ter a sua eficácia reduzida em matrizes complexas tais como alimentos. Anti-oxidantes podem destruir o ácido nitroso antes dele reagir com a amina aromática e conduzir a redução na recuperação de nitrito [7].

A reação de Griess pode ser usada diretamente para a determinação de nitrito ou indiretamente para a determinação de nitrato. A análise de nitrato pela metodologia baseada na reação de Griess requer redução de nitrato a nitrito antes da diazotação. Como um resultado do passo de redução, a metodologia de Griess fornece a soma de nitrito e nitrato ambos em batelada ou em sistemas

automatizados, a metodologia de Griess não separa nitrito de nitrato, e a quantidade de nitrito deve ser calculada pela diferença [41].

2.3. Redução de Nitrato a Nitrito

A maioria das estratégias de detecção para nitrato atualmente é realizada pela detecção de nitrito. Portanto, o íon nitrato, menos reativo, deve ser quimicamente reduzido ao íon nitrito, mais reativo, antes de iniciar a seqüência de determinação [6].

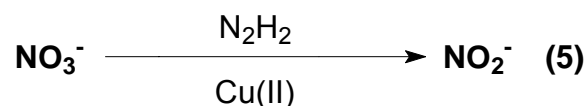
Alguns metais têm sido usados em vários procedimentos analíticos por muitos anos para reduzir nitrato em solução básica para nitrito. A maioria dos procedimentos descreve a adição do metal a uma solução altamente básica com uma pequena concentração de nitrato. Alguns metais que têm sido propostos para o uso analítico são: Cádmiio, amalgamas de Cd, Al, liga de Devarda (50% Cu, 45% Al, 5% Zn), zinco, zinco em $Mn(OH)_4$ e liga de Arndt (60% Mg, 40% Cu) [44, 45].

Os redutores químicos mais freqüentemente usados são: cádmio em várias formas, tais como pó, esponja, fio e colunas ativadas, e cloreto de vanádio (VCl_3 ou VCl_3/VCl_4). O processo de redução empregando cádmio pode ser realizado em condições ácidas (ácido clorídrico ou acético) e condições alcalinas (tampão de cloreto de amônio, em pH 8,0). Podendo ser realizado em batelada ou automatizado. A redução com vanádio é realizada sob condições ácidas (HCl) [41].

Colunas de cádmio recobertas com cobre são os agentes redutores mais eficientes para reduzir nitrato a nitrito apresentando uma conversão de aproximadamente 100%. No entanto, a principal desvantagem é que a coluna de redução precisa ser regenerada após a passagem de algumas amostras e desta regeneração resultam resíduos tóxicos que precisam ser descartados, bem como o próprio amalgama depois de um período de uso [46].

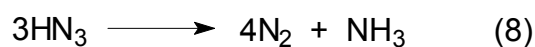
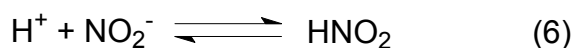
2.3.1. Redução de nitrato a nitrito por sulfato de hidrazina catalisada por Cu(II)

A tendência atual é disponibilizar procedimentos acessíveis e que gerem menos resíduos tóxicos para descarte [46]. Neste sentido, hidrazina tem sido usada em diversos procedimentos analíticos para reduzir nitrato a nitrito (equação 5) [45]. A hidrazina em meio básico fornece uma boa produção de nitrito (aproximadamente 85%). Contudo, quando este reagente é aplicado na determinação de nitrato em água destilada, verifica-se que a redução de nitrato a nitrito varia de uma análise para outra. Este comportamento irregular pode ser eliminado utilizando íon cobre(II) [47].



A oxidação da hidrazina é catalisada por traços de cobre(II) para formar N_2 e a alcalinidade média é também conveniente para completar a oxidação [24]. O efeito catalítico do cobre na redução foi investigado e verificou-se que na ausência de cobre nitrito não é produzido [47].

O agente redutor hidrazina-cobre é geralmente preparado pela mistura da solução de sulfato de hidrazina com o sulfato de cobre (catalisador) e a redução do nitrato é feita em pH 9,6. A redução deve ser realizada em meio alcalino médio desde que, em pH abaixo de 7,0, nitrito é rapidamente destruído pela hidrazina conforme mostrado nas equações químicas abaixo [24]:



2.4 Determinação de Amônio

O íon NH_4^+ tem sido determinado por diferentes métodos, sendo que os mais utilizados são os métodos espectrofotométricos: método do indofenol (reação de Berthelot), procedimento de difusão de gás/indicador ácido-base e do reagente de Nessler [48]. O método colorimétrico de Berthelot, geralmente apresenta valores altos e variáveis de branco, e na faixa de concentração micromolar, a precisão é raramente melhor que cerca de 10%. Outros métodos também utilizados são: a titrimetria e eletrodo íon seletivo. Para análise de solos o método titrimétrico é geralmente o mais empregado [48].

A determinação das espécies trocáveis de nitrogênio (N-NO_3^- , N-NO_2^- e N-NH_4^+ trocável) em solos, rochas e sedimentos consiste geralmente de duas etapas: (a) extração das espécies em fase aquosa e (b) análise do extrato. O deslocamento das espécies da amostra é geralmente obtido através da suspensão da amostra em uma solução eletrolítica. Um método de extração satisfatório precisa extrair quantitativamente a espécie a ser analisada, sendo que o procedimento ideal depende de variáveis, tais como: composição e concentração da solução salina, número de extrações necessárias e o tempo de extração. O método mais vantajoso consiste na extração de todas as espécies trocáveis com um único extrator [49].

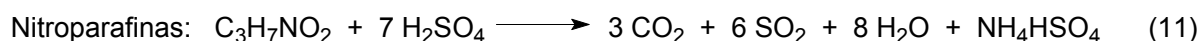
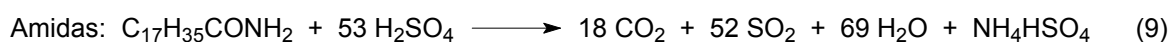
Na literatura, são apresentados diferentes extratores para as espécies N-NO_3^- , N-NO_2^- e N-NH_4^+ trocável presente nos solos, rochas e sedimentos. Entretanto, o íon mais favorável para a troca com NH_4^+ é o K^+ e, conseqüentemente, a solução extratora de KCl tem sido muito utilizada para a extração de todas as espécies de N-(nitrato, nitrito e amônio trocável) [49].

Os métodos mais utilizados para a determinação de N-NH_4^+ fixo em folhelhos, rochas, solos e argilas baseiam-se na extração com HF e posterior determinação do íon amônio [20].

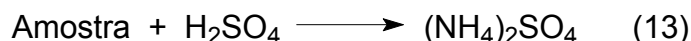
2.4.1. Determinação de amônio por titrimetria

O método Kjeldahl tem sido utilizado desde 1883 para a determinação de nitrogênio total (N_{total}) em diferentes materiais. É baseado na conversão do nitrogênio a íon amônio (NH_4^+) por digestão da amostra a 400 °C com ácido sulfúrico concentrado, contendo catalisadores que aceleram a oxidação da matéria orgânica.

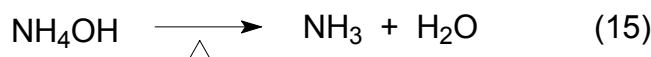
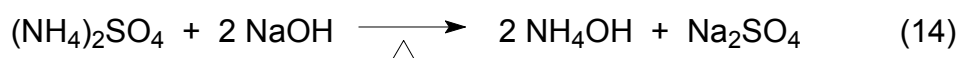
Algumas reações químicas que ocorreram durante o processo de digestão dos compostos nitrogenados são resumidas pelas equações 9, 10, 11 e 12 [50]:



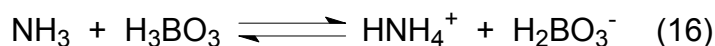
De uma forma geral, o processo de digestão de uma amostra pode ser representado pela equação 13.



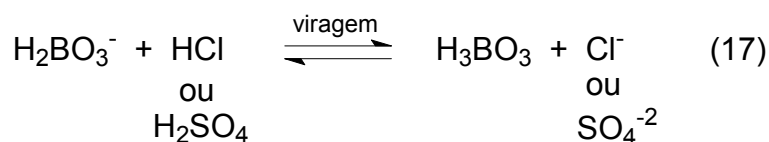
Após a digestão o íon NH_4^+ é submetido a um aquecimento direto ou por arraste a vapor, em meio básico, ocorrendo a liberação de NH_3 , que é recolhida em uma solução padrão de ácido. O íon NH_4^+ é então, quantificado por titulação com solução de ácido padrão. As reações envolvidas no processo de adição da base para a conversão do íon amônio em amônia e aquecimento estão apresentados nas equações 14 e 15.



O método titrimétrico é comumente utilizado para análise de solos, e consiste na coleta do destilado em uma solução de ácido bórico contendo um indicador apropriado:



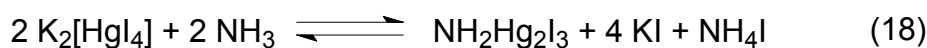
A titulação é realizada com ácido sulfúrico ou clorídrico diluídos, equação 17. O indicador misto de verde de bromocresol e vermelho de metila em ácido bórico possibilita a observação da mudança de cor na titulação, que ocorre em intervalo menor do que uma unidade de pH (de 4,8 a 5,6) [20, 51, 52, 53].



2.4.2. Determinação de amônio por espectrofotometria aplicando a metodologia de Nessler (reação de Nessler)

A metodologia foi proposta por Julius Nessler, em 1856, sendo o primeiro método colorimétrico para a determinação de amônia. O princípio da técnica consiste em utilizar uma solução alcalina de iodeto de mercúrio(II) em iodeto de potássio como reagente para a determinação colorimétrica de amônia. Quando se adiciona o reagente de Nessler a uma solução contendo o íon amônio, a amônia livre formada reage com o reagente e forma um composto castanho alaranjado que fica em suspensão coloidal e floccula depois de um longo período. A medida da cor deve ser feita antes da flocculação [52, 54].

A reação com o reagente de Nessler [solução alcalina de tetraiodomercurato(II) de potássio] pode ser representada pela equação 18:

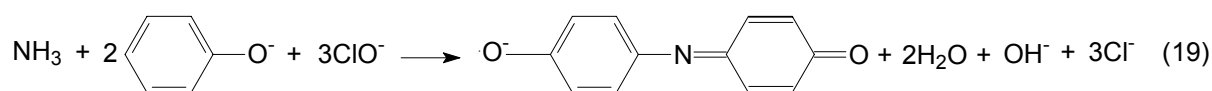


Na verdade, a metodologia desenvolvida por Nessler não é um método colorimétrico autêntico devido à característica coloidal das espécies coloridas formadas pelo reagente de Nessler, $K_2[HgI_4]$ [54].

O método de Nessler é rápido e de operação simples, mas esta técnica apresenta várias desvantagens. O método tem pouca reprodutibilidade e não é sensível para baixas concentrações de amônio. O reagente de Nessler reage somente com amônia (não interage com aminas orgânicas e outros compostos nitrogenados como aminoácidos), não é estável e não deve ser estocado por longo tempo. Nesta metodologia o tempo de reação, a quantidade de reagente, a temperatura da reação durante o desenvolvimento da cor, a presença de alguns cátions e ânions e o pH da reação são fatores críticos para o desenvolvimento da cor [51]. Para eliminar interferentes químicos, a etapa de destilação é necessária [54]. A quantidade de amônio que pode ser determinada pela reação de Nessler varia de 20 a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ e as medidas podem ser feitas em 425 nm [52].

2.4.3. Determinação de amônio por espectrofotometria aplicando o método do indofenol (reação de Berthelot)

O método do indofenol para a determinação de NH_4^+ baseia-se na formação do composto azul intenso de indofenol, resultante da reação do íon amônio com compostos fenólicos na presença de um agente oxidante. Os reagentes oxidantes mais utilizados são: hipoclorito e dicloro isocianato de sódio (DCIC). E os compostos fenólicos utilizados são: fenol, o-fenilfenol e o salicilato. Diferentes catalisadores, principalmente o nitroprussiato de sódio e o ferrocianeto de potássio podem ser utilizados. Apesar do mecanismo da reação não ser conhecido em detalhes, a mesma pode ser representada pela equação química (19) mostrada, quando são utilizados fenol e hipoclorito [49].



O mecanismo da reação de formação do indofenol é dependente da luz, temperatura, catalisador e pH. Bons resultados são obtidos quando se utiliza luz ultravioleta durante o desenvolvimento da cor, na presença do catalisador ferrocianeto de potássio. Contudo, alguns pesquisadores descrevem que o desenvolvimento da reação no escuro elimina as interferências induzidas pela luz, utilizando nitroprussiato como catalisador. Alguns autores preferiram a utilização de ferrocianeto de potássio a nitroprussiato de sódio, devido à maior estabilidade da cor, tanto na luz quanto no escuro. O aumento da temperatura modifica a velocidade de formação do indofenol, mas não influencia no comprimento de onda de absorção máxima.

Para análise de solos e plantas, geralmente, o método do indofenol utiliza nitroprussiato-salicilato e como oxidante, DCIC, alcançando uma faixa de detecção de 5-100 mg L⁻¹ de N-NH₄⁺. Na literatura não foi encontrada aplicação do método do indofenol, utilizando nitroprussiato-fenol e o agente oxidante hipoclorito, para análise de solos.

2.5. Titulação Potenciométrica pelo Método de Gran

Existem vários métodos para determinar o ponto de equivalência de uma titulação potenciométrica, podendo ser agrupados em métodos gráficos, métodos algébricos, dentre outros. No entanto, o método da linearização Gran apresenta-se como um método mais exato do que os métodos utilizados para as curvas de titulação normal, e ainda apresenta a vantagem de não ser necessário a calibração do eletrodo como nos métodos usuais, que utilizam tampões, devido a não determinação do valor absoluto da [H⁺] e sim um valor proporcional, relativo ao potencial da solução.

O método de Gran está entre os melhores métodos de linearização conhecidos devido a eficiente localização do volume de equivalência nos métodos titrimétricos de análises. Este método é menos afetado por fenômenos cinéticos, que ocorrem no eletrodo e na solução, do que os métodos baseados na localização do ponto de inflexão, apresentando assim um menor desvio padrão e uma maior quantidade de informação [55].

A titulação potenciométrica pelo método de Gran implica em uma linearização da curva de titulação [55]. A linearização transforma os dados experimentais da titulação potenciométrica em uma função linear, com o objetivo de obter a informação certa por meios computacionais [56].

Nos dias atuais, o método de Gran também é usado em estudos de hidrólise, dissociação e reações de formação de complexo. Além do mais, já existem “softwares” comerciais que aplicam o método de Gran em instrumentos para determinar o volume de equivalência da titulação [55].

Maiores informações sobre o método de Gran, como dedução de fórmulas e algumas generalidades, podem ser encontradas na revisão escrita por Michaowski et al, 2005 [55].

2.6. Planejamento Fatorial

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística importante e simples. A observação dos efeitos de variáveis e interações entre elas, é de extrema importância para entender os processos que estão sendo investigados em um determinado sistema. Quando é empregada uma otimização univariada, não é possível detectar interações entre as variáveis estudadas. Neste tipo de procedimento, alguns resultados e interpretações incompletas podem ocorrer, devido ao fato de que os efeitos de interação entre as variáveis não são explorados. Além do problema relatado anteriormente, o número de experimentos executados é geralmente maior se comparado com àqueles obtidos em um planejamento fatorial [57].

Parte Experimental

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Preparo de Soluções

Todos os reagentes utilizados na realização deste trabalho foram de grau analítico, não tendo sido submetidos a qualquer tratamento adicional. As soluções foram preparadas com água deionizada. Toda a vidraria foi devidamente limpa com detergente, água, água destilada e água deionizada.

3.1.1. Solução de cloreto de potássio 1,00 mol L⁻¹

Pesaram-se 74,56 g de KCl (Vetec), dissolveram-se em água deionizada. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 1,00 L e o volume foi completado com água deionizada.

3.1.2. Solução padrão estoque de nitrato 50,00 mg L⁻¹

Pesou-se 0,1805 g de KNO₃ (Reagen), previamente seco em dessecador com H₂SO₄ por 4 horas, dissolveram-se em solução de KCl 1,00 mol L⁻¹. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 500,00 mL e o volume foi completado com solução de KCl 1,00 mol L⁻¹. A solução foi mantida em geladeira.

A partir da solução estoque de nitrato 50,00 mg L⁻¹ foram preparados soluções padrões com 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00 e 5,00 mg L⁻¹ de NO₃⁻ em KCl 1,00 mol L⁻¹.

3.1.3. Solução padrão estoque de nitrito 50,00 mg L⁻¹

Pesou-se 0,0750 g de NaNO₂ (0,0500 g do íon nitrito), dissolveram-se em KCl 1,00 mol L⁻¹. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 1,00 L e o volume foi completado com KCl 1,00 mol L⁻¹. O sal foi previamente seco em dessecador com H₂SO₄ durante 4 h.

As soluções de nitrito usadas foram preparadas antes da realização do experimento (não mais que 6 h) e o uso de um reagente PA, marca Merck, foi empregado [58].

A partir da solução estoque de nitrito $50,00 \text{ mg L}^{-1}$ foram preparadas soluções padrões com 0; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00 e $2,00 \text{ mg L}^{-1}$ de N-NO_2^- em solução de $\text{KCl } 1,00 \text{ mol L}^{-1}$.

3.1.4. Solução de hidróxido de sódio

Todas as soluções de NaOH foram preparadas por diluição com água deionizada, a partir de uma solução de $\text{NaOH } 8 \text{ mol L}^{-1}$ (marca Dinâmica).

3.1.5. Solução de sulfato de cobre $0,0350 \text{ g L}^{-1}$

Pesou-se $0,0350 \text{ g}$ de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), dissolveram-se em água deionizada. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de $1,00 \text{ L}$ e o volume foi completado com água deionizada.

3.1.6. Solução de sulfato de hidrazina $0,375 \text{ g L}^{-1}$

Pesou-se $0,3750 \text{ g}$ de sulfato de hidrazina (Vetec), dissolveram-se em água deionizada. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de $1,00 \text{ L}$ e o volume foi completado com água deionizada.

3.1.7. Solução de ácido clorídrico $0,120$ e $2,40 \text{ mol L}^{-1}$

Mediram-se $10,0$ e $200,0 \text{ mL}$ de HCl concentrado (Merck), para análise, adicionaram-se cuidadosamente em água deionizada. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de $1,00 \text{ L}$ e o volume foi completado com água deionizada.

3.1.8. Soluções de sulfanilamida $5,000 \text{ g L}^{-1}$

Pesou-se $0,5000 \text{ g}$ de sulfanilamida (Vetec), dissolveram-se em $50,0 \text{ mL}$ de $\text{HCl } 2,40 \text{ mol L}^{-1}$. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de

100,00 mL e o volume foi completado com solução de HCl 2,40 mol L⁻¹. A solução foi mantida em geladeira e substituída semanalmente.

3.1.9. Solução de N-(1-naftil)-etilenodiamina 2,250 g L⁻¹

Pesou-se 0,2250 g de N-(1-naftil)-etilenodiamina (Vetec), dissolveram-se em 50,0 mL de HCl 0,120 mol L⁻¹. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 100,00 mL e o volume foi completado com solução de HCl 0,120 mol L⁻¹. A solução foi mantida em geladeira e substituída semanalmente.

3.1.10. Solução de EDTA 100,0 g L⁻¹

Pesaram-se 100,0 g de EDTA (Quimex), previamente seco em estufa a 70-80 °C por 2 h, dissolveram-se em água deionizada. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 1,00 L e o volume foi completado com água deionizada.

3.1.11. Soluções de ácido sulfúrico 0,5000 mol L⁻¹

Mediram-se 27,80 mL de H₂SO₄ concentrado (Merck), para análise, e adicionaram-se cuidadosamente em água deionizada. Após resfriamento, a solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 1,00 L e o volume foi completado com água deionizada.

3.1.12. Solução de cloreto de sódio 0,5000 mol L⁻¹

Pesaram-se 1,4625 g de NaCl (Proquímica), dissolveram-se em água deionizada. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 50,00 mL e o volume foi completado com água deionizada.

3.1.13. Solução digestora

Pesaram-se 6,668 g de K₂SO₄ (Vetec) e 3,336 g de CuSO₄. Os sais foram triturados com o auxílio de um gral e pistilo. Em seguida, a mistura foi transferida

para um béquer de 500 mL e adicionaram-se 100,0 mL de água deionizada e 100,0 mL de H₂SO₄ concentrado [20].

3.1.14. Padronização da solução de NaOH

Após o preparo da solução de NaOH, a mesma foi titulada com solução de biftalato de potássio (vetec) (massa igual a 0,2471 g previamente seca em estufa por 2 h a 105 °C), dissolvido em 25 mL de solução de NaCl 0,500 mol L⁻¹. Com o auxílio de uma bureta adicionou-se a solução de NaOH de 0,50 em 0,50 mL e registrou-se o potencial medido por um medidor de pH.

Com auxílio do programa gráfico (Origin 5.0), obteve-se a linearização de Gran para a curva de titulação do biftalato com NaOH [52, 59, 60].

3.1.15. Solução estoque de sulfato de amônio

Pesaram-se 6,6067 g de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄ (Proanalysis), previamente seco em estufa por 2 h a 105 °C, dissolveram-se em água deionizada. A solução resultante foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 500,00 mL e o volume foi completado com água deionizada.

3.1.16. Padronização da solução sulfato de amônio

A partir da solução estoque de sulfato de amônio tirou-se uma alíquota de 50,00 mL. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100,00 mL. Completou-se o volume com água deionizada.

Tomou-se uma alíquota de 25,00 mL do balão de 100,00 mL e titulou-se com solução de NaOH 0,9972 mol L⁻¹. Adicionou-se a solução de NaOH de 0,25 em 0,25 mL, com o auxílio de uma bureta, e registrou-se o potencial medido em cada adição. Repetiu-se este procedimento por duas vezes.

Com auxílio de um programa gráfico (Origin 5.0), obteve-se a linearização de Gran para a curva de titulação do sulfato de amônio com NaOH [52, 59, 60].

3.2. Montagem do Sistema para a Determinação de Nitrogênio Total e Amoniacal

Foi montado um sistema de titulação para a determinação de íon amônio (figura 3). Em um suporte universal foi fixado um balão volumétrico de 100 mL contendo solução de NaOH. A posição do balão possibilita o preenchimento da bureta por gravidade, sem esta estratégia é difícil encher a bureta com solução, pois a mesma é muito fina ocasionando a formação de bolhas. A amostra, o EDTA e o formaldeído foram colocados em um béquer de 250 mL. Um agitador magnético marca TecnoL, modelo TE 0853 foi usado para homogeneização do meio reacional e um medidor de pH marca TecnoPar, modelo mPA -210 foi utilizado para fazer a medida do pH no momento da titulação.

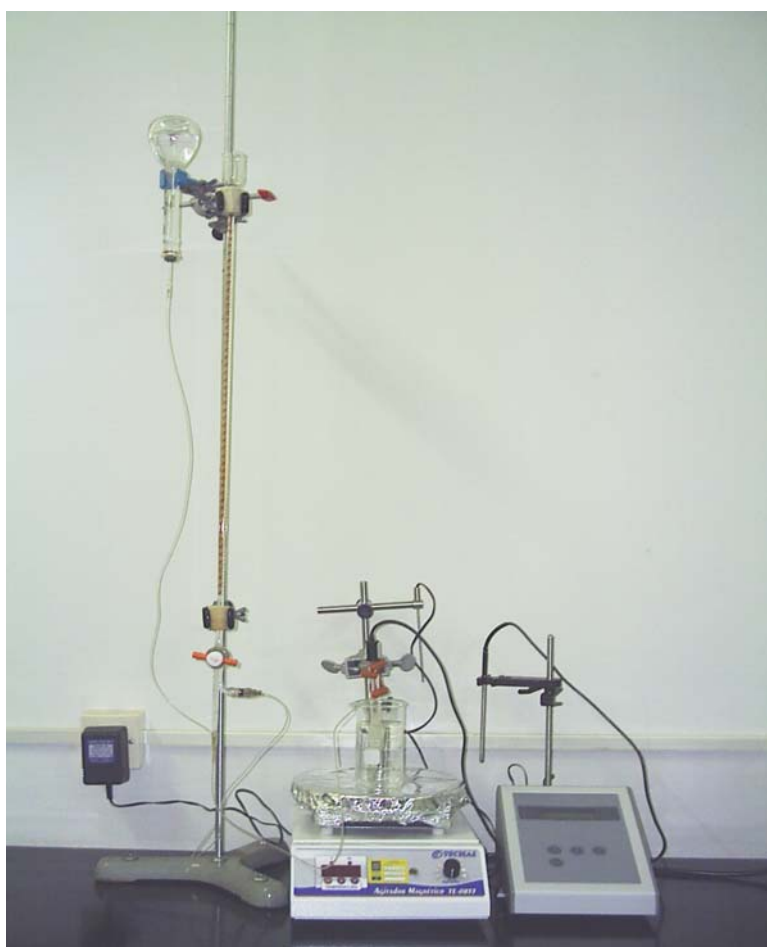


Figura 3. Sistema empregado para a determinação de amônio.

3.3. Procedimento Geral para Determinação de Nitrogênio Total e Amoniacal

O sistema da figura 3 foi empregado para fazer a determinação de nitrogênio total. Desta forma, 5,00 mL da amostra, previamente filtrada, juntamente com 15,0 mL da solução de EDTA 100 g L⁻¹ foram colocados em um béquer de 250 mL e o pH foi ajustado entre 7,40 e 7,60 com solução de H₂SO₄ ou NaOH, utilizando um medidor de pH. Em seguida, 10,0 mL de formaldeído (Vetec) foram adicionados ao béquer (amostra + EDTA) causando um decréscimo no pH do meio. A mistura foi titulada com solução de NaOH determinando-se o volume do titulante quando o pH atingiu o valor ajustado anteriormente. O volume de NaOH gasto na titulação foi utilizado para o cálculo da concentração como nitrogênio total.

3.4. Procedimento Geral Otimizado para Determinação de Nitrato Utilizando a Reação de Griess Modificada

Para a construção da curva analítica foram tomadas alíquotas de 2,00 mL das soluções padrões (0,20 a 5,00 mg L⁻¹ de N-NO₃⁻) e da solução de KCl (ponto zero da curva). Estas foram transferidas para tubos de ensaio com capacidade volumétrica 15 a 20 mL. Em seguida, adicionou-se 1,00 mL da solução de NaOH 0,300 mol L⁻¹; 0,50 mL da solução de sulfato de cobre 0,00659 g L⁻¹; 1,00 mL da solução de sulfato de hidrazina 0,375 g L⁻¹; e 3,50 mL da solução de KCl 0,750 mol L⁻¹. (Os reagentes foram adicionados, necessariamente nesta ordem).

Após a adição dos reagentes os tubos foram vedados com um filme plástico, para evitar perdas de água e levados para aquecimento, na temperatura de 70 °C, em um banho-maria com circulação, marca Marconi, modelo MA179 por 15 minutos. Em seguida, deixou-se esfriar por 20 minutos. Depois, adicionou-se 1,00 mL da solução de sulfanilamida 5,000 g L⁻¹, agitou-se a solução em um agitador de tubo de ensaio marca B.Braun Biotech international, modelo Certomat MV por 20 segundos e aguardou-se por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,00 mL da solução de N-(1-naftil)-etilenodiamina 2,250 g L⁻¹ e após 20 minutos mediu-

se a absorvância em um espectrofotômetro UV/Visível, marca HITACHI, modelo U-2000 ajustado para o comprimento de onda de 532 nm. O valor real da concentração de nitrato foi ajustado de acordo com a diluição de 10 mL durante a adição dos reagentes, obtendo-se valores de 0,040; 0,080; 0,12; 0,16; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80, e 1,00 mg L⁻¹.

Para as amostras, tomaram-se alíquotas de até 2,00 mL e seguiu-se todos os procedimentos descritos para a curva padrão.

3.5. Procedimento Geral para Determinação de Nitrito pelo Método da Adição Padrão Utilizando a Reação de Griess Modificada

Para estabelecer a curva de adição padrão, em cada tubo de ensaio de capacidade volumétrica de 15 a 20 mL foram adicionados 2,00 mL da amostra, 2,00 mL da soluções padrão (0,020 a 2,00 mg L⁻¹) ou 2,00 mL de solução de KCl 0,750 mol L⁻¹, para o branco. Em seguida, Adicionaram-se 4,00 mL da solução de KCl 0,750 mol L⁻¹ e 1,00 mL da solução de sulfanilamida 5,000 g L⁻¹. Agitou-se a solução por 20 segundos em um agitador de tubo de ensaio e deixou-se em repouso por 5 minutos para que ocorresse a reação de diazotacão. Passado este tempo, adicionou-se 1,00 mL da solução de bicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina 2,250 g L⁻¹, agitou-se e deixou-se em repouso por 20 minutos. Logo após, mediu-se absorvância em espectrofotômetro UV/Visível, marca HITACHI, modelo U-2000 ajustado para o comprimento de onda de 532 nm [adaptado de 61].

3.6. Otimização da Metodologia da Determinação de Nitrato Utilizando a Reação de Griess Modificada Aplicando Planejamento Fatorial e Superfície de Resposta

A determinação de nitrato empregando a reação de Griess modificada é altamente dependente de variáveis como concentração de reagentes, temperatura, tempo de agitação e resfriamento. O efeito destas variáveis foi estudado a fim de estabelecer as condições ótimas de trabalho.

O procedimento seguinte foi executado em todos os experimentos realizados para a otimização da resposta espectrofotométrica na determinação de nitrato empregando a reação de Griess modificada. Nestes, os volumes das soluções adicionadas foram mantidos constantes e a concentração dos reagentes foi variada seguindo os passos descritos: 2,00 mL da solução padrão de nitrato $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ foi transferida para tubos de ensaio com capacidade volumétrica 15 a 20 mL. Em seguida, adicionou-se 1,00 mL da solução de NaOH; 0,50 mL da solução de sulfato de cobre; 1,00 mL da solução de sulfato de hidrazina; e 3,50 mL da solução de KCl. (Os reagentes foram adicionados, necessariamente nesta ordem).

Após a adição dos reagentes os tubos foram levados para aquecimento em um banho-maria com circulação, marca Marconi, modelo MA179, por 15 minutos e em seguida, deixou-se esfriar. Depois, adicionou-se 1,00 mL da solução de sulfanilamida, agitou-se a solução em um agitador de tubo de ensaio e aguardou-se por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,00 mL da solução de N-(1-naftil)-etilenodiamina e após 20 minutos mediu-se a absorvância em espectrofotômetro.

Cada ensaio, no planejamento fatorial, foi realizado de maneira aleatória. O “software” Statistica 5.0 foi utilizado para calcular os valores dos efeitos, interação e as superfícies de resposta.

3.6.1. Planejamento fatorial fracionário 2^{9-5} de resolução IV

Um planejamento fatorial fracionário 2^{9-5} de resolução IV foi usado para estudar a influência de nove fatores envolvidos nas reações de redução de nitrato

a nitrito e de formação do complexo p-(4-etilenodiamino-1-naftilazo) benzenosulfanamida. O sinal analítico foi proporcional à quantidade do complexo formado na reação.

3.6.2. Planejamento fatorial 2^5 dividido em blocos

Um planejamento fatorial em bloco 2^5 completo foi usado para estudar o efeito das concentrações de hidróxido de sódio, sulfato de cobre, sulfato de hidrazina e Naftil-etilenodiamina, e tempo de agitação. O experimento foi realizado em dois blocos de 16 ensaios, Sendo que os ensaios do primeiro bloco foram realizados em um dia, sendo assim chamados de **A**, e os 16 ensaios do segundo bloco no outro dia, **B**. Os experimentos foram feitos de forma aleatória dentro de cada bloco.

3.6.3. Planejamento composto central para três fatores

Um planejamento em estrela do tipo composto central para três fatores foi usado com a finalidade de expandir a faixa de estudo para alcançar o ponto ótimo.

Para realizar a otimização das concentrações de hidróxido de sódio, sulfato de cobre e sulfato de hidrazina, na determinação de nitrato pela reação de Griess modificada, foi empregado um planejamento fatorial com 19 experimentos. Este fatorial possui dois níveis, relativos à menor (-1) e maior (+1) concentração e três variáveis (Concentrações de hidróxido de sódio, sulfato de cobre e sulfato de hidrazina).

Para a construção do planejamento composto central foi montado um planejamento fatorial completo 2^3 , com os níveis codificados em -1 e +1. Além disso, foram realizados cinco experimentos no ponto central (com a concentração dos reagentes codificados em zero) para o cálculo do erro, e 6 experimentos axiais (ou em estrela). A configuração dos experimentos pode ser visualizada na figura 4, onde o cubo com círculos sólidos nas arestas representa o fatorial 2^3 , o

círculo sólido cinza no centro representa o ponto central, e os círculos sólidos fora das arestas do cubo representam o fatorial em composto central. Os dados obtidos no planejamento composto central foram lançados no programa Statistica 5.0 para se obter a superfície de resposta.

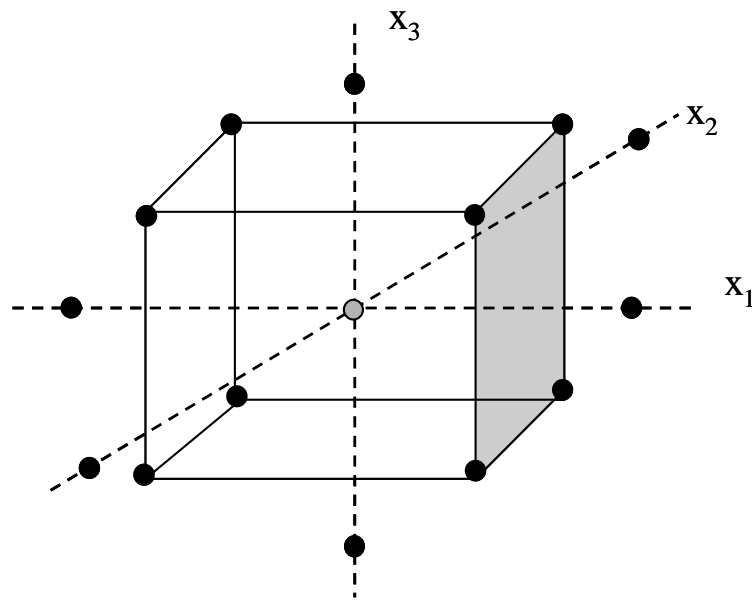


Figura 4: Planejamento composto central para três fatores. Os pontos das arestas do cubo são a parte cúbica – os ensaios de um fatorial 2^3 . As bolas fora do cubo representam a parte em estrela.

3.7. Coleta e Preparo de Amostras de Água, Solo, Aveia e Fertilizante para a Determinação de Nitrogênio Total e Amoniacal

A amostra de solo foi coletada no campus universitário da Universidade Federal de Viçosa, situada no município de Viçosa-MG. A mostra de solo foi seca em estufa a 105 °C por 4 h. Em seguida, a amostra foi pulverizada em um moinho de bolas marca Viatest, modelo BM e peneirada em um agitador de peneiras marca Bertel, modelo 2208 com uma peneira marca Granutest, de 100 mesh, pesada e submetida ao processo de digestão, item 3.7.1.

O fertilizante e a aveia foram adquiridos no comércio de Viçosa-MG e não passaram por nenhum tratamento prévio, ou seja, foram diretamente submetidos

ao processo de digestão. Após esfriar as amostras foram filtradas e os volumes completados para 50,00 mL com água deionizada.

A amostra de água foi coletada na lagoa São Bartolomeu situada no campus universitário da Universidade Federal de Viçosa, filtrada e armazenada em geladeira até o momento da análise.

3.7.1. Abertura das amostras de solo, aveia e fertilizante

Na etapa de abertura das amostras para a determinação de nitrogênio total o bloco digestor marca LMIM, modelo OE-202 foi previamente aquecido a 150 °C. Cerca de 0,5000 g da amostra de solo e 0,3000 g de aveia e de fertilizantes foram transferido para tubos digestores e adicionados 15,0 mL da solução ácida digestora, contendo K_2SO_4 para aumentar a temperatura de ebulição do H_2SO_4 e do catalisador, $CuSO_4$, para acelerar a oxidação da matéria orgânica. A solução do tubo foi agitada para que ocorresse um melhor contato da amostra com a solução e, então colocado no poço, sendo a temperatura mantida a 150 °C por 1 h. Em seguida, o sistema foi mantido a 400 °C por 2 h.

No processo de digestão o carbono contido na matéria orgânica foi oxidado e o dióxido de carbono (CO_2) se despreendeu da solução. Durante o processo da digestão a solução passou de uma coloração escura (preto) para um verde claro conforme está apresentado na figura 5 [20, 53].



Figura 5: Mudança de coloração da solução durante o processo da digestão.

3.8. Metodologia de Kjeldahl para Determinação de Nitrogênio Total

A determinação de nitrogênio total em amostras de aveia, solo e fertilizante empregando o método de Kjeldhal foi realizada nos laboratórios do departamento de solos da Universidade Federal de Viçosa seguindo o seguinte protocolo:

Uma alíquota de 10,00 mL da amostra, previamente submetida ao tratamento dos itens 3.7 e 3.7.1, foi quantitativamente transferida para um tubo de ensaio de 15 mL. Em seguida a amostra foi levada para o sistema de destilação e destilada na presença de 25 mL de NaOH 10 mol L⁻¹. O titulado foi coletado em um erlenmeyer e 15,0 mL do indicador (mistura de ácido bórico 2%, solução alcoólica de verde de bromocresol 0,1% m/v e solução alcoólica de vermelho de metila 0,04% m/v) foram adicionados. Após esta etapa, a mistura foi titulada com solução de HCl 0,1104 mol L⁻¹.

3.9. Coleta e Preparo de Amostras de Água para Determinação de Nitrato

3.9.1. Coleta e preparo de amostra de água da lagoa São Bartolomeu

A amostra de água foi coletada na lagoa São Bartolomeu situada no campus universitário da Universidade Federal de Viçosa, filtrada e armazenada em geladeira até o momento da análise.

3.9.2. Coleta e preparo de amostra de água de torneira

A amostra de foi coletada diretamente da torneira, filtrada e imediatamente submetida à análise.

3.10. Parâmetros Analíticos e Validação do Método para a Determinação do Íon Amônio

Para garantir a confiabilidade do método analítico proposto para quantificar nitrogênio total foram avaliados os seguintes parâmetros: precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão. A exatidão foi avaliada pela realização de teste de recuperação de nitrogênio amoniacal em água e por comparação dos resultados obtidos pelo método proposto com o método de Kjeldahl através da quantificação de nitrogênio total em amostras de solo, aveia e fertilizante.

3.11. Parâmetros Analíticos Envolvidos na Determinação de Nitrato

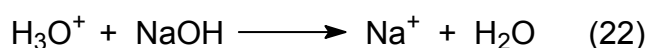
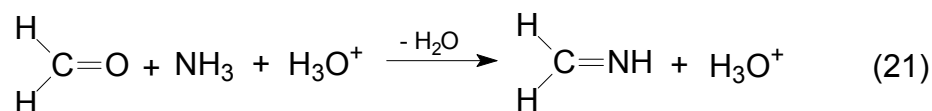
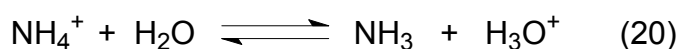
Para garantir a confiabilidade do método analítico otimizado para quantificar nitrato utilizando a reação de Griess modificada foram avaliados os seguintes parâmetros: faixa linear, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão. A exatidão foi avaliada pela realização de teste de recuperação através da quantificação de nitrato em amostras de e água.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Reações Envolvidas na Determinação do Íon Amônio

O íon amônio em solução aquosa encontra-se em equilíbrio com a amônia, equação 20. Na presença do formaldeído ocorre a formação de uma molécula de imina consumindo uma molécula de amônia, o que faz com que o equilíbrio se desloque consumindo quantitativamente o amônio e liberando uma quantidade estequiométrica do íon H_3O^+ , que participa na reação como catalisador acelerando a formação da imina, equação 21. No final da reação, o H_3O^+ usado é totalmente recuperado, conforme é apresentado no mecanismo da figura 6, justificando assim a diminuição do pH após a adição do formaldeído. A partir da quantidade de solução padronizada de hidróxido de sódio consumida na titulação de H_3O^+ é possível calcular a concentração do íon amônio na amostra, equação 22.



A fórmula abaixo (23) foi empregada para calcular a concentração do íon amônio das titulações. O valor numérico da equação 23 engloba os volumes da amostra e das soluções utilizadas, em litro. Na constante, também está embutido o valor da concentração da solução de hidróxido de sódio, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Neste sentido o ajuste da concentração de hidróxido de sódio pelo fator de correção faz-se necessário. A utilização da fórmula evita a necessidade de efetuar cálculos trabalhosos e diminuindo, desta forma, o tempo de análise.

$$C_{\text{amônio}} (\text{g L}^{-1}) = 0,28 \times f.c. (\text{NaOH}) \times V_{(\text{gasto NaOH em mL})} \quad (23)$$

Em que, $C_{\text{amônio}}$ é a concentração do íon amônio, em g L^{-1} , $f.c$ o fator de correção da concentração de hidróxido de sódio e V o volume de hidróxido de sódio, em mL, gasto na titulação.

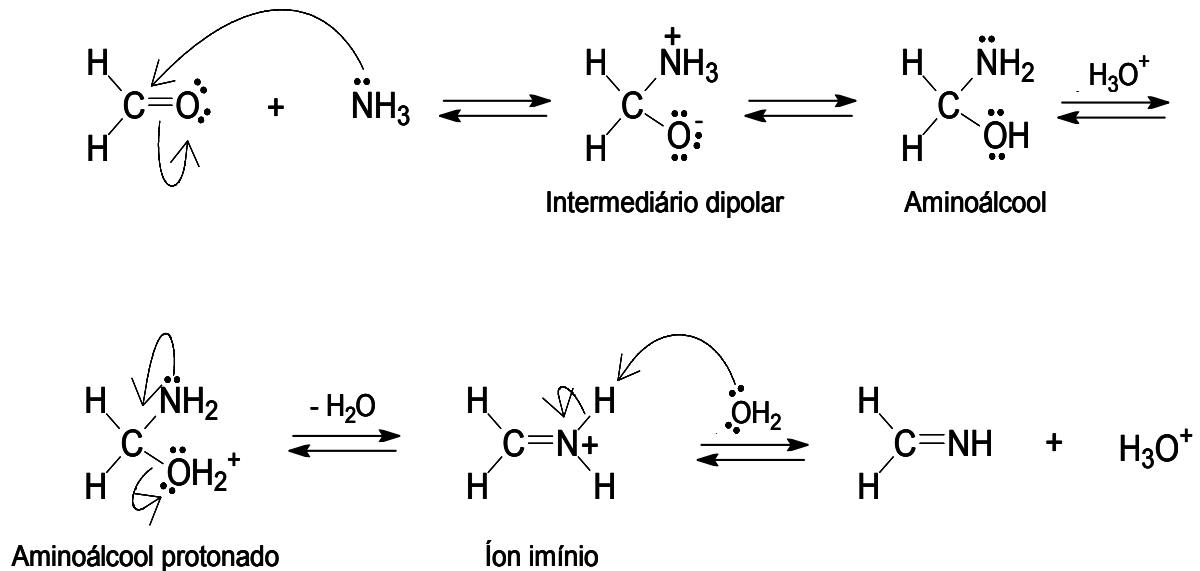


Figura 6: Equação do mecanismo de reação da amônia com formaldeído para a formação de imina [62].

4.2. Padronização das Soluções de Sulfato de Amônio e Hidróxido de Sódio Utilizando o Método de Gran

A titulação convencional do íon amônio não foi realizada devido à inclinação da curva de titulação para este íon ser mais suave em relação à titulação ácido forte x base forte, causada pelo efeito de tamponamento (ácido fraco/sal de ácido fraco), de tal modo que as variações de pH tendiam a ser sempre amenizadas. Outro ponto a ser observado foi que para esse tipo de titulação a faixa onde ocorria a viragem do indicador foi relativamente larga, resultando em grandes erros [63]. O método da segunda derivada foi aplicado, mas não apresentou um resultado satisfatório para a determinação do ponto de equivalência, devido a grande quantidade de ruído no gráfico.

Com o auxílio do programa gráfico Origin 5.0 obteve-se o gráfico da linearização da curva de titulação do íon amônio pelo método de Gran, apresentado na figura 7.

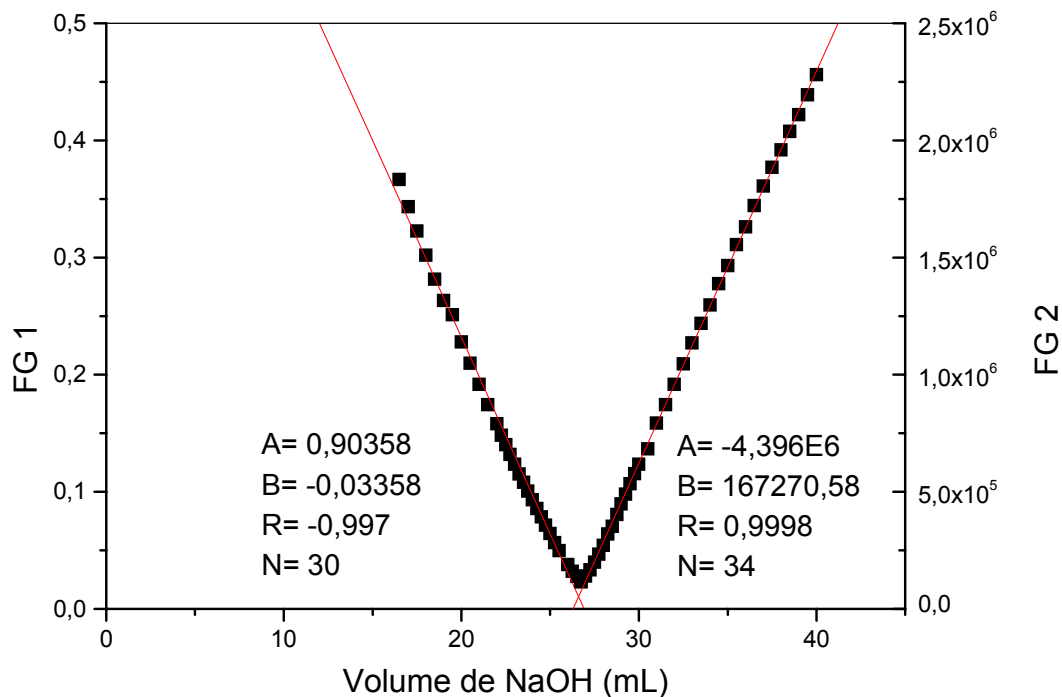


Figura 7: Funções de Gran obtidas a partir da titulação da solução de sulfato de amônio com solução de hidróxido de sódio $0,09972 \text{ mol L}^{-1}$.

A função de Gran 1 (FG1) e a função de Gran 2 (FG2) foram obtidas pelas equações:

$$FG\ 1 = (V_0 + V) * 10^{E/59,16} \quad (24)$$

$$FG\ 2 = (V_0 + V) * 10^{-E/59,16} \quad (25)$$

Em que: V_0 é o volume inicial da solução, V o volume do titulante e E é o potencial medido em mV a cada adição do titulante.

Com a interseção destas duas retas determinou-se o volume de NaOH gasto no ponto de equivalência, onde:

$$(FG1) \rightarrow y = 0,90358 - 0,03358 * V_{NaOH}$$

$$(FG2) \rightarrow y = 4,396 \times 10^6 - 1,6727 \times 10^5 * V_{NaOH}$$

igualando-se as duas equações encontrou-se um valor de $V_{NaOH} = 26,28$, que equivale ao volume de equivalência da titulação.

$$C_{amônio} = C_{NaOH} * V_{NaOH} / V_{amônio}$$

$$C_{\text{amônio}} = 0,09972 \text{ mol L}^{-1} * 26,28 \text{ mL} / 25,00 \times 10^{-3} \text{ L} = 0,1048 \text{ mol L}^{-1}$$

Considerando-se a diluição realizada durante o procedimento, a concentração do íon amônio na solução foi de $0,2096 \text{ mol L}^{-1}$ e a concentração da solução de sulfato de amônio foi $0,1048 \text{ mol L}^{-1}$.

Multiplicando-se a concentração em mol L^{-1} pela massa molecular encontrou-se uma concentração de $13,85 \text{ g L}^{-1}$ e $3,773 \text{ g L}^{-1}$ para o sulfato de amônio e íon amônio na solução, respectivamente.

A padronização da solução de hidróxido de sódio foi realizada da mesma maneira que a solução de sulfato de amônio obtendo-se uma concentração de $0,09972 \text{ mol L}^{-1}$ e um fator de correção de $0,9972$.

4.3. Variáveis que Afetam a Reação de Formação de Imina na Determinação do Íon Amônio

4.3.1. Influencia do EDTA na determinação do íon amônio

O efeito da influência de EDTA foi estudado na faixa de valores de 0 a 15,0 mL da solução de EDTA $100,0 \text{ g L}^{-1}$. Os resultados da figura 8 mostram que a presença de EDTA no meio reacional não interfere na quantificação do íon amônio. Desta forma, um volume de 15,0 mL de EDTA $100,0 \text{ g L}^{-1}$ foi utilizado para evitar possíveis interferentes metálicos que podem precipitar durante a titulação, arrastando o íon amônio por co-precipitação. Além da eliminação de interferentes pela formação de complexos solúveis o EDTA tem a função de tamponar o meio, absorvendo o H_3O^+ formado no momento da produção da imina. Posteriormente, o H_3O^+ é gradativamente liberado facilitando, assim, a titulação de retorno ao pH inicial. A ausência do EDTA na determinação do íon amônio, por este método, torna o ajuste do pH difícil de ser realizado, visto que, pequena variação no volume de NaOH pode acarretar em grande variação no intervalo de pH. Este efeito pode ser visualizado na figura 9.

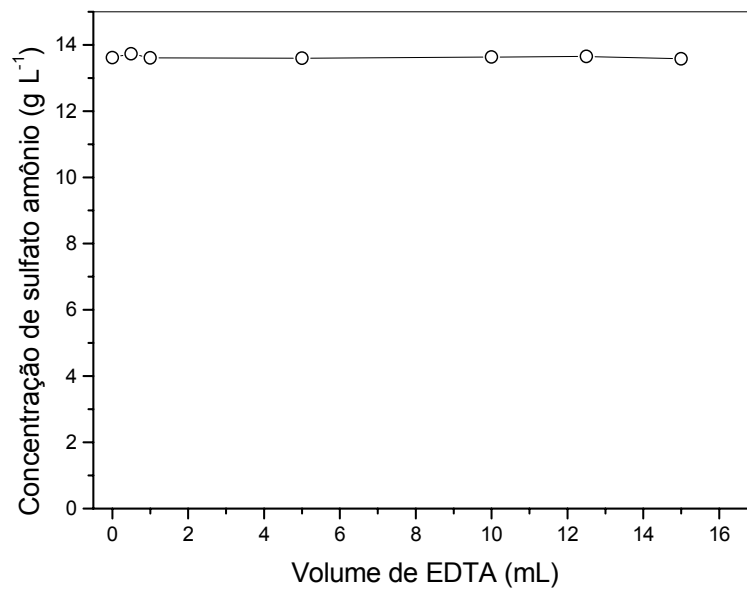


Figura 8: Estudo da quantidade de EDTA na determinação de íon amônio. A concentração do íon NH_4^+ é expressa em função da concentração de sulfato de amônio.

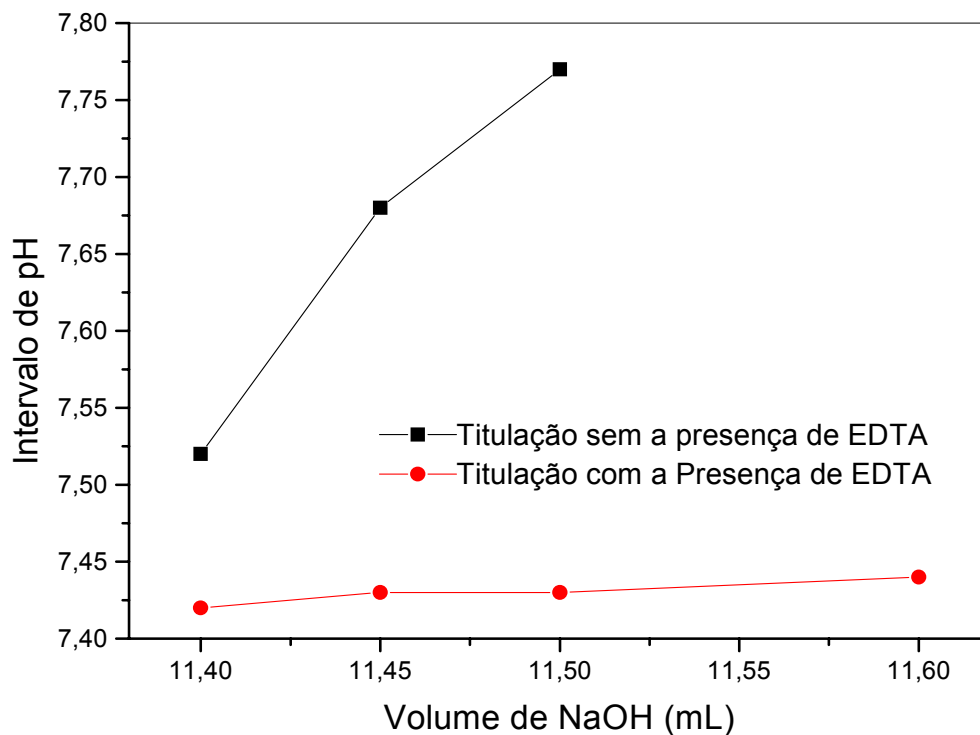


Figura 9: Influência do EDTA na variação do pH na titulação de sulfato de amônio.

4.3.2. Estudo da quantidade de formaldeído na determinação do íon amônio

O efeito da quantidade de formaldeído foi avaliado realizando-se um estudo na faixa de 5,0 a 15,0 mL para verificar qual o volume de formaldeído necessário para alcançar recuperação quantitativa do íon amônio. A concentração do íon amônio foi fixada em $3,773 \text{ g L}^{-1}$ e os resultados foram expressos em função da concentração de sulfato de amônio. Quando foram utilizadas quantidades de formaldeído inferiores a 10,0 mL observou-se que a reação não era quantitativa, ou seja, a quantidade de formaldeído foi insuficiente para reagir com todo o íon amônio presente na solução e que a reação não era instantânea, demorava mais tempo para ocorrer. Este efeito pode ser explicado pelo menor número de moléculas de formaldeído na solução. Conforme o gráfico apresentado na figura 10, um volume de 10,0 mL de formaldeído foi suficiente para a recuperação quantitativa do íon amônio na amostra quando a concentração deste íon não excedia a $3,773 \text{ g L}^{-1}$.

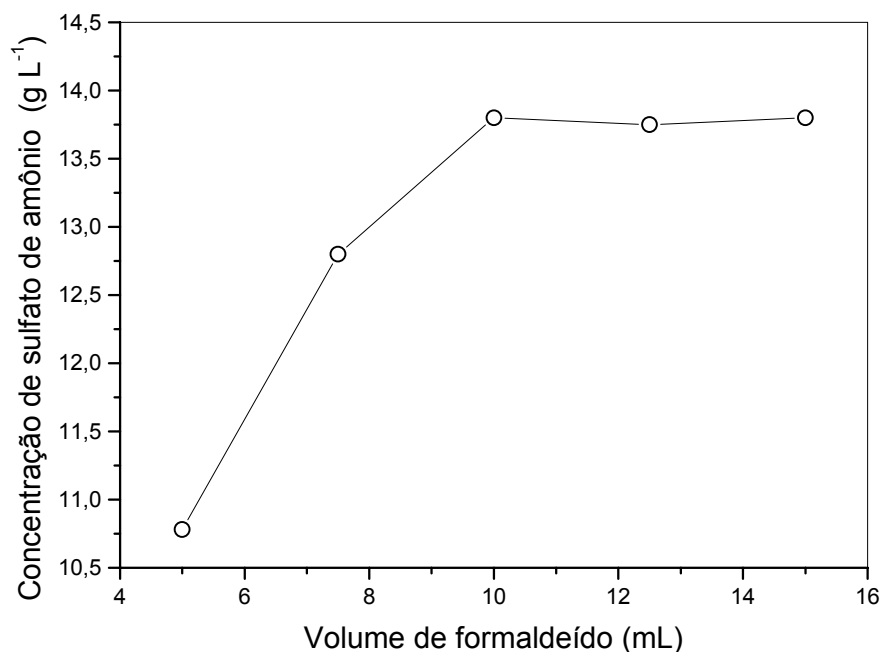


Figura 10: Influência da quantidade de formaldeído na titulação de sulfato de amônio.

4.4. Parâmetros Analíticos e Validação do Método para a Determinação do Íon Amônio

4.4.1. Parâmetros analíticos

Utilizando-se os valores otimizados das variáveis químicas, obtidas nos experimentos anteriores, foram calculados alguns parâmetros relativos ao sistema de determinação de NH_4^+ descrito na figura 3.

O limite de detecção, calculado como $3 \times s_b$, sendo s_b o desvio-padrão para dez medidas do branco foi $1,83 \text{ mg L}^{-1}$. O limite de quantificação, calculado como $10 \times s_b$, sendo s_b o desvio-padrão para dez medidas do branco foi $6,11 \text{ mg L}^{-1}$.

O limite de quantificação também foi calculado pela diminuição gradativa da concentração de amônio. Os resultados são apresentados na figura 11 e mostram que o erro relativo embutido nas análises cresce exponencialmente com a diminuição da concentração de amônio na solução. Nestas condições, a concentração mínima que o método consegue quantificar com erros relativos inferiores a 10% é de $0,3740 \text{ g L}^{-1}$. Concentrações menores que este valor apresentam erros relativos elevados impossibilitando que o método seja aplicado para análises quantitativas. Para concentrações superiores a $0,3740 \text{ g L}^{-1}$ o erro relativo das análises diminui consideravelmente. A precisão do método, avaliada como o desvio-padrão relativo correspondente ao valor da concentração, calculado como $(s/X) \times 100$, sendo s o desvio-padrão para dez medidas e X o valor médio dessas medidas, alcançou um valor de 6,0 a 0,5 %, para valores de concentração de amônio na faixa de 0,400 a $3,773 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente.

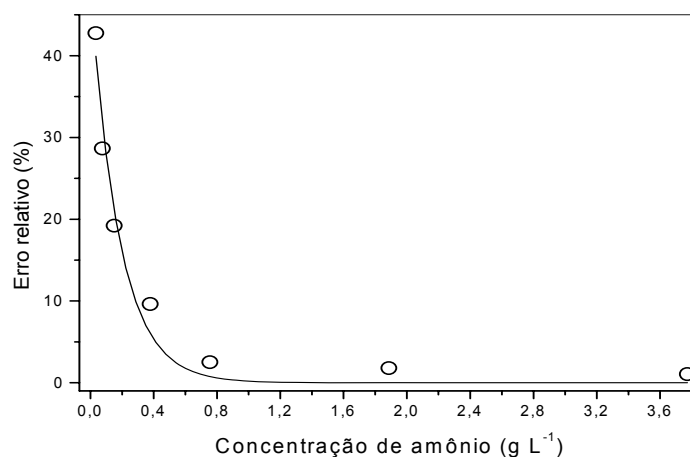


Figura 11: Cálculo do limite de quantificação pela diminuição da concentração do íon amônio em função do erro relativo.

4.4.2. Validação do método para a determinação do íon amônio

Para avaliar a exatidão do procedimento desenvolvido, as amostra de solo, aveia e fertilizante foram submetidas ao tratamento do item 3.7.1, em seguida, as amostras foram divididas em duas frações. Uma fração foi enviada ao laboratório de solo da Universidade Federal de Viçosa para que o nitrogênio total fosse quantificado pela metodologia de Kjeldahl e a outra fração foi analisada empregando a metodologia proposta para a determinação de amônio. Os resultados encontram-se na tabela 3. De acordo com a tabela, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os resultados da metodologia proposta e da metodologia de Kjeldahl.

Tabela 3: Resultado obtido na análise de amostras de solo, aveia e fertilizante pela metodologia proposta e pela metodologia de Kjeldahl

Amostra	Metodologia proposta	Metodologia de Kjeldahl
	N_T (mg g ⁻¹)	N_T (mg g ⁻¹)
Solo	3,350 ± 0,07	3,050 ± 0,06
Aveia	31,91 ± 0,07	31,94 ± 0,07
Fertilizante	77,04 ± 0,17	77,06 ± 0,11

Os desvios padrão foram obtidos após análise em triplicata.
 N_T = nitrogênio total

Pelo processo de tratamento ao qual as amostras foram submetidas só foi possível quantificar o nitrogênio orgânico e amoniacal, pois a solução digestora empregada não apresenta resultados satisfatórios para os compostos que apresentam ligações N-N e N-O. As espécies de nitrogênio contendo ligações N-O só podem ser quantificadas se for utilizada a liga de Devarda para redução de nitrato e nitrito ao íon amônio, o que não foi feito [20]. No entanto, a literatura chamada o nitrogênio determinado por esse tratamento de digestão de nitrogênio total, desta forma, mesmo que não seja apropriado, o termo nitrogênio total será empregado neste trabalho [20, 51, 52, 53].

4.5. Teste de Recuperação de Amônio

Além das determinações de nitrogênio total nas amostras de solo, aveia e fertilizante, realizadas no item 4.4.2, a metodologia desenvolvida foi aplicada, novamente, para a determinação de nitrogênio total e amoniacal em amostra de solo e nitrogênio amoniacal em amostra de água de torneira. Os resultados são descritos na tabela 4. Os valores das recuperações que se encontram na tabela foram calculados da seguinte forma: $R (\%) = \{(C_m - C_{\text{amônio}})/m\} \times 100$, onde C_m é o valor da concentração de íon amônio em uma amostra na qual foi feita adição do analito (concentração encontrada na solução), $C_{\text{amônio}}$ é o valor da concentração de íon amônio em uma amostra sem adição, e m é a quantidade de do íon amônio adicionada.

Tabela 4: Resultado obtido na determinação de nitrogênio total e amoniacal em amostra de solo e nitrogênio amoniacal em amostra de água de torneira

Amostra	Nitrogênio Total (n=3)		Recuperação (%)
	Adicionado (g L ⁻¹)	Encontrado (g L ⁻¹)	
Água de torneira	0,0	< nd	-
	2,934	2,900 ± 0,02	98,8
	1,467	1,445 ± 0,01	98,5
Solo	0,0	0,0623 ± 0,01	-
	1,174	1,294 ± 0,02	105,0
	2,934	2,928 ± 0,01	97,7

4.6. Comparação entre a Metodologia Proposta e a Metodologia de Kjeldahl

A metodologia proposta para a determinação de amônio apresentou algumas vantagens em relação à metodologia de Kjeldahl, sendo que uma das principais foi a eliminação da etapa de destilação do amônio formado e desta forma, não foi necessário a presença de equipamentos especializados ou a montagem de sistemas complicados de destilação. O sistema para a determinação do íon amônio pelo método do formaldeído utiliza-se de uma

bureta, um béquer e um medidor de pH e os reagentes utilizados são o EDTA, formaldeído e solução de hidróxido de sódio, tornando o sistema extremamente simples. Além desta vantagem, a metodologia não necessita da utilização de indicadores, ou seja, a detecção do ponto final da titulação não é visual, eliminando assim, possíveis erros do operador.

A análise de nitrogênio pelo método proposto, assim como no método de Kjeldahl, apresenta baixo custo, rapidez e pode ser aplicada para análises de rotina. A figura 12 apresenta as principais diferenças nos protocolos da metodologia proposta e da metodologia de kjeldahl.

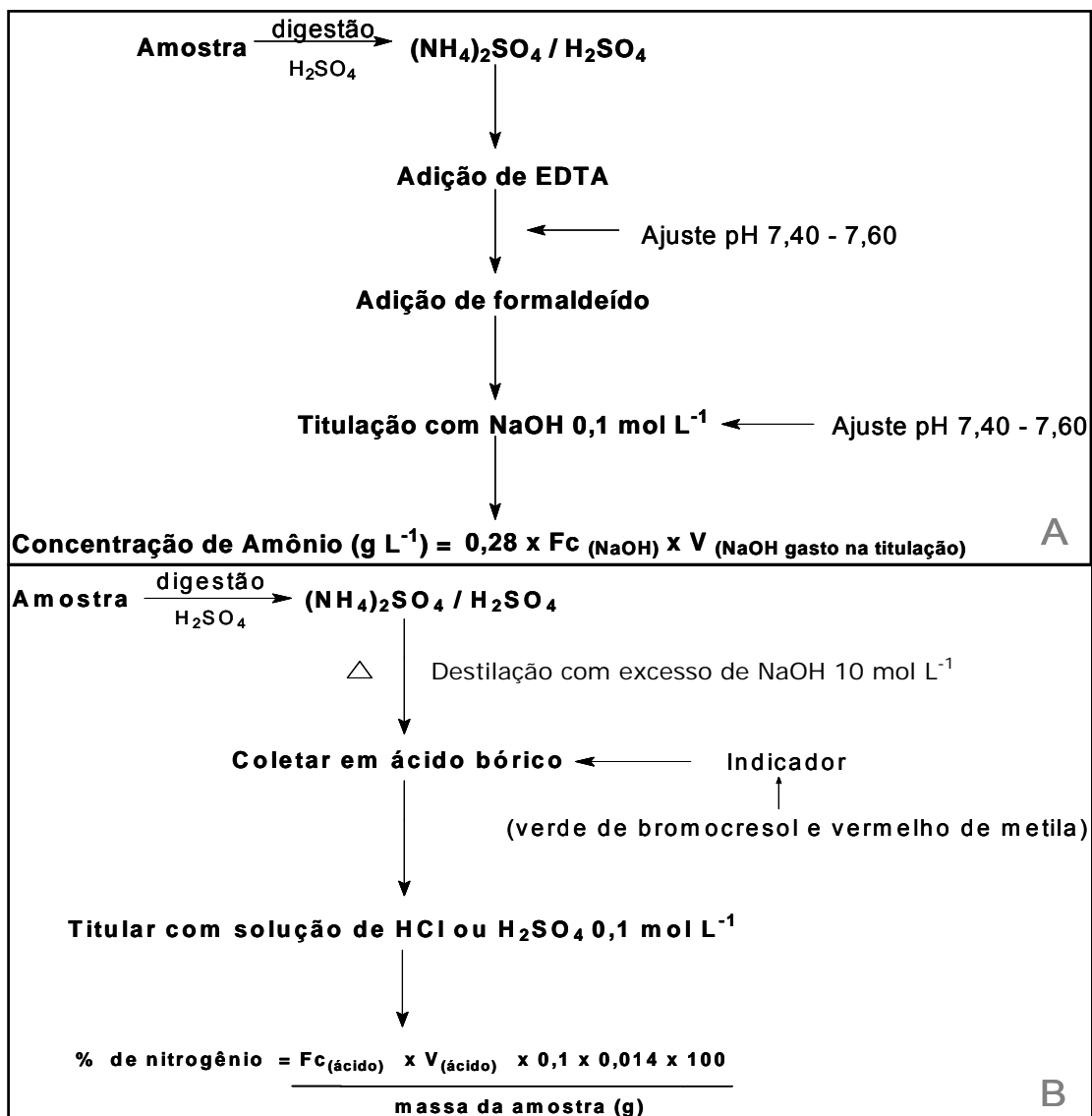


Figura 12: Etapas seguidas na determinação de amônio pelo método do formaldeído (A) e de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (B).

4.7. Reações Envolvidas na Determinação de Nitrato Utilizando a Reação de Griess Modificada

O princípio do método, abordado neste trabalho, consiste na reação da sulfanilamida com o íon nitrito formando o sal diazônio. Posteriormente, o N-(1-naftil)-etilenodiamina reage com o sal diazônio para formar o p-(1-naftil)-etilenodiamino-1-naftilazo) benzenosulfonamida (cor púrpura), no qual, a intensidade da coloração formada é proporcional à quantidade de nitrito [61]. A equação da reação está apresentada na figura 13. A reação de diazotação, como já foi mencionada anteriormente, é específica para nitrito. Desta forma, neste trabalho optou-ser fazer a redução do nitrato a nitrito empregando a hidrazina. Apesar da conversão do nitrato a nitrito empregando a hidrazina apresentar um rendimento de aproximadamente 85% ela não gera resíduos tóxicos como os agentes redutores à base de Cd e ligas metálicas que possuem rendimento de aproximadamente 100%.

Mecanicamente, a reação de diazotação representa uma substituição eletrofílica aromática, com o íon diazônio (produzido da sulfanilamida) sendo o agente eletrofílico e a segunda amina aromática (NED) sendo a base nucleofílica. O ataque eletrofílico do íon diazônio ocorre na posição-para com o respectivo grupo amino da base aromática (reagente de acoplamento). Reações de diazotação também são aplicadas a aminas alifáticas [43].

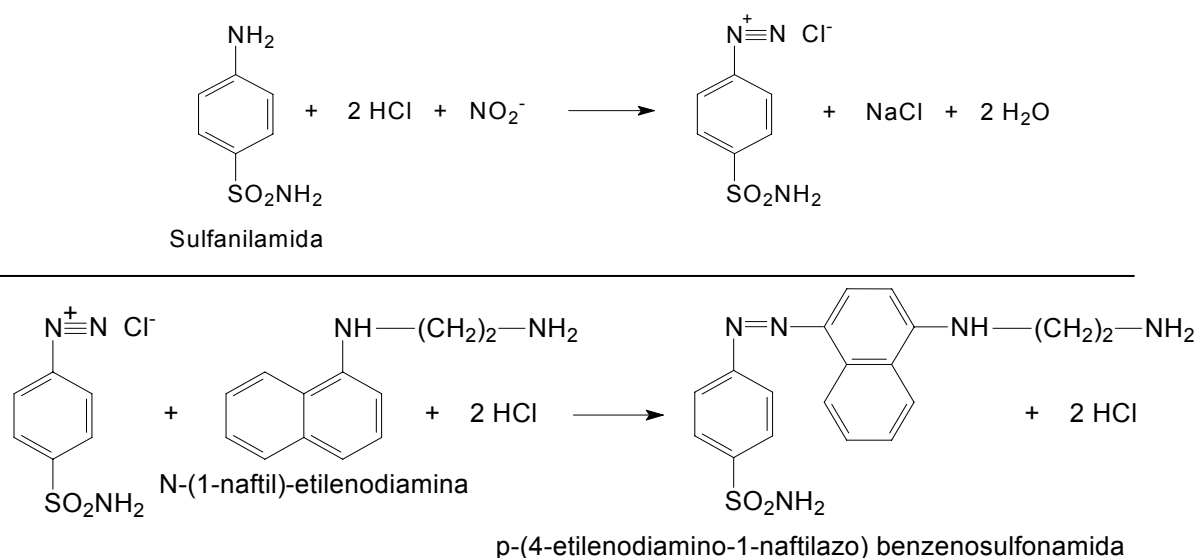


Figura15: Reação de Griess modificada. Nitrito reage com o grupo amino da sulfanilamida para formar o cátion diazônio, o qual acopla com N-(1-naftil)etilenodiamana na posição-para para formar o p-(4-etilenodiamono-1-naftilazo) benzenosulfonamida [24, 41, 61].

4.8. Otimização da Metodologia de Determinação de Nitrato Utilizando a Reação de Griess Modificada

Para obter maiores informações sobre o sinal analítico fornecido pelo método baseado na reação de Griess-Ilosvay, modificada a partir de Rider e Mellon [64] e Mullin e Riley [47]. O experimento do item 3.6 foi realizado seguindo as condições da tabela 5. A partir dos resultados apresentados na figura 14 verificou-se que a concentração de 0,20 mg L⁻¹ foi a mais indicada para os estudos posteriores, pois apresentava uma absorvância de 0,643 favorecendo assim, uma melhor visualização dos dados do planejamento fatorial.

Tabela 5: Condições experimentais, sem otimização, para construção da curva analítica de nitrato

Condições experimentais	
NaOH	0,300 mol L ⁻¹
Sulfato de cobre	0,0350 g L ⁻¹
Sulfato de hidrazina	0,375 g L ⁻¹
KCl	0,750 mol L ⁻¹
Temperatura	80°C
Tempo (resfriamento)	30 minutos
Sulfanilamida	5,000 g L ⁻¹
Agitação	10 segundos
Naftil-etilenodiamina	3, 000 g L ⁻¹

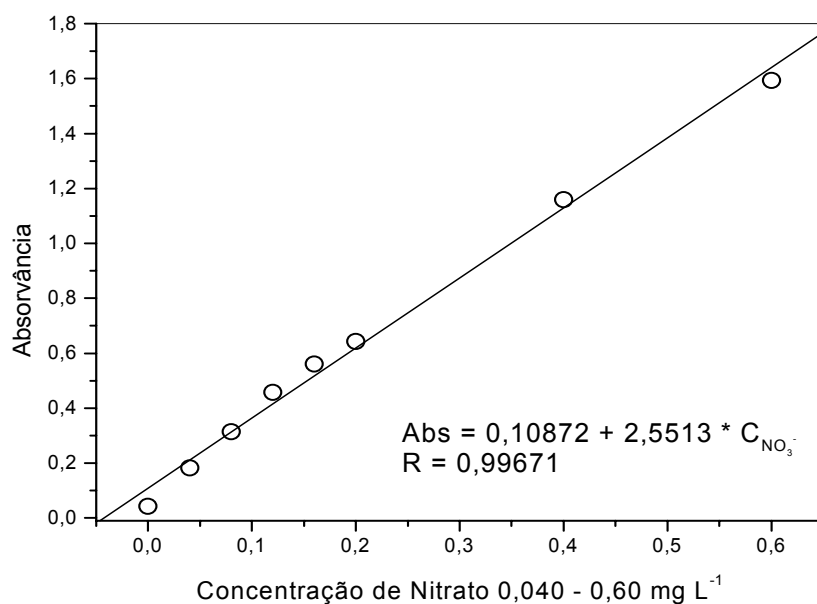


Figura 14: Curva analítica baseada na reação de Griess-Ilosvay, com redução de nitrato a nitrito com solução de sulfato de hidrazina, metodologia modificada a partir de Rider e Mellon [64] e Mullin e Riley [47]. As medidas foram realizadas em 532 nm.

4.8.1. Planejamento fatorial

4.8.2. Planejamento fatorial – triagem dos fatores

Na elaboração do planejamento de qualquer experimento, a primeira coisa que se deve fazer é decidir quais são os fatores e as respostas de maior relevância [65]. A partir do conhecimento prévio das reações envolvidas na determinação de nitrato utilizando a reação modificada de Griess, empregando como agente redutor a hidrazina, partiu-se do pressuposto que todas as variáveis apresentadas na tabela 6 eram importantes. No entanto, a realização de um planejamento fatorial completo de dois níveis, 2^9 , exigiria a realização de 512 ensaios, inviabilizando a execução do mesmo. Desta forma decidiu-se realizar um planejamento fracionário, 2_{IV}^{9-5} . A tabela 6 mostra os fatores escolhidos e seus respectivos níveis. A tabela 7 apresenta a matriz do planejamento e as respostas obtidas durante a realização do experimento.

Tabela 6: Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial fracionário

variáveis	Fatores	Níveis		Unidades
		+	-	
1	KCl	1,00	0,500	mol L ⁻¹
2	NaOH	0,300	0,150	mol L ⁻¹
3	CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,0350	0,0175	g L ⁻¹
4	Hidrazina	0,300	0,150	g L ⁻¹
5	Temperatura	80	60	°C
6	Tempo (resfriamento)	30	15	minutos
7	Sulfanilamida	5,000	2,500	g L ⁻¹
8	Agitação	20	10	segundos
9	Naftil-etilenodiamina	3,000	1,500	g L ⁻¹

Tabela 7: Planejamento fatorial 2_{IV}^{9-5} para estudar a influência de nove fatores envolvidos na reação de formação do p-(4-etilenodiamino-1-naftilazo)benzenosulfamida, sendo a intensidade da coloração formada proporcional a quantidade de íons nitrato

Ensaio	1	2	3	4	5 = 123	6 = 234	7 = 134	8 = 124	9 = 1234	Absorvância
1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0,132
2	+	-	-	-	+	-	+	+	-	0,177
3	-	+	-	-	+	+	-	+	-	0,234
4	+	+	-	-	-	+	+	-	+	0,232
5	-	-	+	-	+	+	+	-	-	0,135
6	+	-	+	-	-	+	-	+	+	0,125
7	-	+	+	-	-	-	+	+	+	0,183
8	+	+	+	-	+	-	-	-	-	0,153
9	-	-	-	+	-	+	+	+	-	0,569
10	+	-	-	+	+	+	-	-	+	0,530
11	-	+	-	+	+	-	+	-	+	0,579
12	+	+	-	+	-	-	-	+	-	0,726
13	-	-	+	+	+	-	-	+	+	0,586
14	+	-	+	+	-	-	+	-	-	0,626
15	-	+	+	+	-	+	-	-	-	0,561
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,571

Os dados referentes a absorvância da tabela 7 foram processados pelo “software” Statistica 5.0, onde se realizaram os cálculos para obter a estimativa dos efeitos e das interações dos fatores da tabela 6. Os resultados são mostrados na tabela 8.

Segundo a observação dos dados da tabela 8 foi possível verificar que os efeitos principais estavam confundidos com efeitos de terceira, quarta e quinta ordem. Supondo que os efeitos de interação de três ou mais ordens foram desprezíveis. Cada contraste passou a representar simplesmente um efeito principal, ficando evidente que as concentrações de hidróxido de sódio, sulfato de cobre, sulfato de hidrazina e Naftil-etilenodiamina e o tempo de agitação foram os fatores mais importantes, dos nove, neste planejamento.

Quando a concentração do Naftil-etilenodiamina foi aumentada de 1,500 para 3,000 g L⁻¹, ocorreu uma diminuição no sinal analítico. Sendo assim,

resolveu-se diminuir as concentrações dos níveis (+) e (-) do Naftil-etilenodiamina (tabela 9).

As variáveis que não apresentaram importância relativa no planejamento não interferiram no sinal analítico, assim, seus valores foram fixados como as médias dos somatórios dos níveis (+) e (-). Exceto para a sulfanilamida que deve estar sempre em excesso, por isso, foi fixado o nível de maior concentração (+). As variáveis e seus respectivos valores fixos estão apresentados na tabela 9.

Tabela 8: Contrastes calculados na fração 2_{IV}^{9-5} , e suas expressões em termos dos efeitos principais e das interações binárias de um fatorial completo 2^4

Relação entre as colunas	Contrastes dos efeitos	Estimativas
1 = 235 = 248 = 347 = 2349 = 12346	$\ell_1 = 1 + 235 + 248 + 347 + 2349 + 12346$	$\ell_1 = 0,0201$
2 = 135 = 148 = 346 = 1349 = 12347	$\ell_2 = 2 + 135 + 148 + 346 + 1349 + 12347$	$\ell_2 = 0,0449^*$
3 = 125 = 147 = 246 = 1249 = 12348	$\ell_3 = 3 + 125 + 147 + 246 + 1249 + 12348$	$\ell_3 = -0,0299^*$
4 = 128 = 137 = 236 = 1239 = 12345	$\ell_4 = 4 + 128 + 137 + 236 + 1239 + 12345$	$\ell_4 = 0,4221^*$
5 = 123	$\ell_5 = 123$	$\ell_5 = -0,0236$
6 = 234	$\ell_6 = 234$	$\ell_6 = -0,0256$
7 = 134	$\ell_7 = 134$	$\ell_7 = 0,0031$
8 = 124	$\ell_8 = 124$	$\ell_8 = 0,0279^*$
9 = 1234	$\ell_9 = 1234$	$\ell_9 = -0,0304^*$
12 = 35 = 48 = 349 = 1346 = 2347	$\ell_{12} = 12 + 35 + 48 + 349 + 1346 + 2347$	$\ell_{12} = 0,0111$
13 = 25 = 47 = 249 = 1246 = 3248	$\ell_{13} = 13 + 25 + 47 + 249 + 1246 + 3248$	$\ell_{13} = -0,0176$
14 = 28 = 37 = 239 = 2345 = 1236	$\ell_{14} = 14 + 28 + 37 + 239 + 2345 + 1236$	$\ell_{14} = 0,0194$
23 = 15 = 46 = 149 = 1247 = 1348	$\ell_{23} = 23 + 15 + 46 + 149 + 1247 + 1348$	$\ell_{23} = -0,0459^*$
24 = 18 = 36 = 139 = 1345 = 1237	$\ell_{24} = 24 + 18 + 36 + 139 + 1345 + 1237$	$\ell_{24} = -0,0134$
34 = 17 = 26 = 129 = 1245 = 1238	$\ell_{34} = 34 + 17 + 26 + 129 + 1245 + 1238$	$\ell_{34} = 0,0149$
$l_1 = 1235, l_2 = 2346, l_3 = 1347, l_4 = 1248$ e $l_5 = 12349$	$\ell_l = \text{média} + \frac{1}{2} (56789)^*$	$\ell_l = 0,3824$

* Efeitos e interação de maior importância relativa

Analisando os efeitos de interação de dois fatores foi observado que apenas a interação **23** obteve importância relativa no planejamento. Através de cálculos realizados com base na figura 15 foi possível afirmar que quando a concentração de sulfato de cobre foi mudada do nível (-) para o nível (+) o sinal analítico diminuiu desfavorecendo a reação de redução de nitrato a nitrito. Isto pode ter ocorrido pela formação de Cu_2O [47].

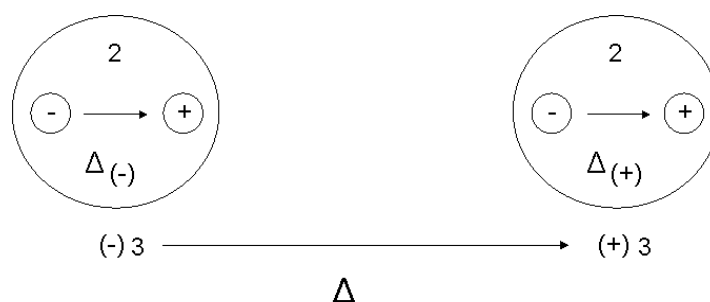


Figura 15: Estudo da interação 23. O cálculo foi feito como a variação dos níveis do fator 2 dentro do nível (+) do fator 3 menos a variação dos níveis do fator 2 dentro do nível (-) do fator 3. O resultado foi dividido por 2.

Com a finalidade de melhorar o sinal analítico a concentração de hidróxido de sódio foi mantida e a de cobre foi reduzida gerando novos níveis. Os valores dos níveis de hidróxido de sódio e sulfato de cobre são apresentados na tabela 9.

4.8.3. Planejamento fatorial 2^5 completo dividido em blocos

A partir dos dados obtidos no item 4.8.2, mostrados na tabela 9, montou-se um planejamento fatorial 2^5 completo dividido em dois blocos (Tabela 10).

Tabela 9: Fatores e níveis determinados para a realização do planejamento fatorial completo 2^5 dividido em dois blocos de 16 ensaios

Variáveis	Fatores	Níveis			Unidades
		+	Fixos	-	
	KCl	-	0,750	-	mol L ⁻¹
1	NaOH	0,300	-	0,150	mol L ⁻¹
2	CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,0300	-	0,00100	g L ⁻¹
3	Hidrazina	0,300	-	0,150	g L ⁻¹
	Temperatura	-	70	-	°C
	Tempo (resfriamento)	-	20	-	minutos
	Sulfanilamida	-	5,000	-	g L ⁻¹
4	Agitação	20	-	10	segundos
5	Naftil-etilenodiamina	2,250	-	0,7500	g L ⁻¹

O experimento foi dividido em blocos porque o número de experimentos era muito grande, 32 ensaios, e demandava tempo, sendo difícil a realização em apenas uma etapa. Desta forma, 16 ensaios foram realizados em um dia e 16 no outro dia. Os resultados estão apresentados na tabela 10. A numeração da coluna de ensaios da tabela 10 não representa a ordem de execução de cada experimento, pois os mesmos foram realizados de forma aleatória dentro de cada bloco, mas a ordem crescente de ensaio obtida na construção do planejamento (tabela 10).

Tabela 10: Resultados obtidos para o primeiro (A) e segundo bloco (B)

Ensaio	1	2	3	4	5	Bloco (12345)	Representação do bloco	Absorvância
1	-	-	-	-	-	-	A	0,214
4	+	+	-	-	-	-	A	0,179
6	+	-	+	-	-	-	A	0,668
7	-	+	+	-	-	-	A	0,474
10	+	-	-	+	-	-	A	0,271
11	-	+	-	+	-	-	A	0,153
13	-	-	+	+	-	-	A	0,566
16	+	+	+	+	-	-	A	0,569
18	+	-	-	-	+	-	A	0,281
19	-	+	-	-	+	-	A	0,139
21	-	-	+	-	+	-	A	0,553
24	+	+	+	-	+	-	A	0,526
25	-	-	-	+	+	-	A	0,236
28	+	+	-	+	+	-	A	0,174
30	+	-	+	+	+	-	A	0,778
31	-	+	+	+	+	-	A	0,512
2	+	-	-	-	-	+	B	0,310
3	-	+	-	-	-	+	B	0,181
5	-	-	+	-	-	+	B	0,399
8	+	+	+	-	-	+	B	0,698
9	-	-	-	+	-	+	B	0,225
12	+	+	-	+	-	+	B	0,137
14	+	-	+	+	-	+	B	0,699
15	-	+	+	+	-	+	B	0,534
17	-	-	-	-	+	+	B	0,275
20	+	+	-	-	+	+	B	0,202

Tabela 10: (Continuação): Resultados obtidos para o primeiro (A) e segundo bloco (B)

Ensaio	1	2	3	4	5	Bloco (12345)	Representação do bloco	Absorvância
22	+	-	+	-	+	+	B	0,523
23	-	+	+	-	+	+	B	0,471
26	+	-	-	+	+	+	B	0,246
27	-	+	-	+	+	+	B	0,103
29	-	-	+	+	+	+	B	0,714
32	+	+	+	+	+	+	B	0,684

A partir das respostas obtidas no planejamento fatorial 2^5 completo dividido em blocos foi possível, com o auxílio dos programas Origin 5.0 e Microsoft Excel XP, desenvolver o algoritmo de Yates para se obter a soma de quadrado para os efeitos, interações e para o bloco.

A partir da soma de quadrado obtida no algoritmo de Yates foi possível fazer a análise de variância. Assumindo que as interações de quarta ordem não foram significativas no planejamento fatorial 2^5 dividido blocos, as mesmas foram utilizadas para estimar o erro e, assim, estimou-se a significância do efeito de bloco e dos demais efeitos.

A tabela 11 apresenta a soma de quadrado dos efeitos principais, de bloco e das interações envolvidas no planejamento. A tabela 12 apresenta a análise de variância ao nível de 5% de significância.

Tabela 11: Algoritmo de Yates para o cálculo da soma de quadrado dos efeitos e interações

Combinação de tratamentos	Respostas	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	Estimativa do efeito	Representação do efeito	Soma de Quadrado
(1)	0,214	0,524	0,884	3,123	6,277	12,694	-	-	-
a	0,31	0,360	2,239	3,154	6,417	1,196	0,07475	A	4,470E-02
b	0,181	1,067	0,786	2,970	0,785	-1,222	-0,07637	B	4,667E-02
ab	0,179	1,172	2,368	3,447	0,411	0,008	5,00E-04	AB	2,000E-06
c	0,399	0,496	0,897	0,587	-0,427	6,042	0,37762	C	1,141E+00
ac	0,668	0,290	2,073	0,198	-0,795	0,648	0,0405	AC	1,312E-02
bc	0,474	1,265	0,759	0,094	-0,303	0,358	0,02237	BC	4,010E-03
abc	0,698	1,103	2,688	0,317	0,311	0,092	0,00575	ABC	2,645E-04
d	0,225	0,556	0,094	-0,059	2,937	0,508	0,03175	D	8,060E-03
ad	0,271	0,341	0,493	-0,368	3,105	-0,166	-0,01038	AD	8,611E-04
bd	0,153	1,076	0,030	-0,294	0,537	-0,516	-0,03225	BD	8,320E-03
abd	0,137	0,997	0,168	-0,501	0,111	0,010	6,25E-04	ABD	3,125E-06
cd	0,566	0,482	0,069	-0,143	0,313	0,980	0,06125	CD	3,001E-02
acd	0,699	0,277	0,025	-0,160	0,045	-0,062	-0,00388	ACD	1,201E-04
bcd	0,534	1,492	0,081	0,142	0,017	-0,452	-0,02825	BCD	6,380E-03
abcd	0,569	1,196	0,236	0,169	0,075	-0,070	-0,00438	ABCD	1,531E-04
e	0,275	0,096	-0,164	1,355	0,031	0,140	0,00875	E	6,125E-04
ae	0,281	-0,002	0,105	1,582	0,477	-0,374	-0,02338	AE	4,370E-03
be	0,139	0,269	-0,206	1,176	-0,389	-0,368	-0,023	BE	4,230E-03
abe	0,202	0,224	-0,162	1,929	0,223	0,614	0,03837	ABE	1,178E-02
ce	0,553	0,046	-0,215	0,399	-0,309	0,168	0,0105	CE	8,820E-04
ace	0,523	-0,016	-0,079	0,138	-0,207	-0,426	-0,02662	ACE	5,670E-03

Tabela 11 (Continuação): Algoritmo de Yates para o cálculo da soma de quadrado dos efeitos e interações

Combinação de tratamentos	Respostas	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	Estimativa do efeito	Representação do efeito	Soma de Quadrado
bce	0,471	0,133	-0,205	-0,044	-0,017	-0,268	-0,01675	BCE	2,240E-03
abce	0,526	0,035	-0,296	0,155	0,027	0,058	0,00363	ABCE	1,051E-04
de	0,236	0,006	-0,098	0,269	0,227	0,446	0,02788	DE	6,220E-03
ade	0,246	0,063	-0,045	0,044	0,753	0,612	0,03825	ADE	1,170E-02
bde	0,103	-0,030	-0,062	0,136	-0,261	0,102	0,00637	BDE	3,251E-04
abde	0,174	0,055	-0,098	-0,091	0,199	0,044	0,00275	ABDE	6,050E-05
cde	0,714	0,010	0,057	0,053	-0,225	0,526	0,03288	CDE	8,650E-03
acde	0,778	0,071	0,085	-0,036	-0,227	0,460	0,02875	ACDE	6,610E-03
bcde	0,512	0,064	0,061	0,028	-0,089	-0,002	-1,25E-04	BCDE	1,250E-07
abcde	0,684	0,172	0,108	0,047	0,019	0,108	0,00675	ABCDE (Blocos)	3,645E-04 *

* Soma de quadrado de bloco

Tabela 12: Análise de variância para verificar a significância dos efeitos e interações

Fonte de Variação	Soma de Quadrado	Grau de Liberdade	Quadrado da Média	Teste F
ABCDE (Blocos)	3,645E-04	1	3,645E-04	0,2630
A	4,470E-02	1	4,470E-02	32,256 *
B	4,667E-02	1	4,667E-02	33,677 *
C	1,141E+00	1	1,141E+00	823,21 *
D	8,060E-03	1	8,060E-03	5,8161
E	6,125E-04	1	6,125E-04	0,4420
AB	2,000E-06	1	2,000E-06	0,0014
AC	1,312E-02	1	1,312E-02	9,4675 *
AD	8,611E-04	1	8,611E-04	0,6214
AE	4,370E-03	1	4,370E-03	3,1534
BC	4,010E-03	1	4,010E-03	2,8936
BD	8,320E-03	1	8,320E-03	6,0038
BE	4,230E-03	1	4,230E-03	3,0524
CD	3,001E-02	1	3,001E-02	21,6554 *
CE	8,820E-04	1	8,820E-04	0,6365
DE	6,220E-03	1	6,220E-03	4,4884
ABC	2,645E-04	1	2,645E-04	0,1909
ABD	3,125E-06	1	3,125E-06	0,0023
ABE	1,178E-02	1	1,178E-02	8,5005 *
ACD	1,201E-04	1	1,201E-04	0,0867
ACE	5,670E-03	1	5,670E-03	4,0915
ADE	1,170E-02	1	1,170E-02	8,4428 *

Tabela 12 (Continuação): Análise de variância para verificar a significância dos efeitos e interações

Fonte de Variação	Soma de Quadrado	Grau de Liberdade	Quadrado da Média	Teste F
BCD	6,380E-03	1	6,380E-03	4,6038
BCE	2,240E-03	1	2,240E-03	1,6164
BDE	3,251E-04	1	3,251E-04	0,2346
CDE	8,650E-03	1	8,650E-03	6,2419
Erro (ABCD + ABCE + ABDE + ACDE + BCDE)	6,929E-03	5	1,386E-03	
Total	1,367	31		

$F_{5\%}(1, 5)$ = Significativo quando $F_{\text{calculado}} \geq 6,61$

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

O cálculo do teste F demonstrou que o efeito de bloco não foi estatisticamente significativo ao nível de 5% de probabilidade para este experimento.

Mais uma vez foi comprovada a significância das concentrações do hidróxido de sódio, sulfato de cobre e sulfato de hidrazina e a interação entre o hidróxido de sódio e sulfato de cobre.

Tanto o efeito da agitação como o da concentração de Naftil-etilenodamina não foi estatisticamente significativo pelo teste F ao nível de 5 % de significância por isso estes efeitos foram fixados. Para o Naftil-etilenodamina escolheu-se o nível + (2,250 g L⁻¹), pois o reagente deve permanecer em excesso, visto que quando a concentração deste reagente for menor que a de nitrito, a formação do complexo será limitada, resultando em erro nas análises. Para a agitação também foi escolhido o nível + (20 segundos), pois mesmo o efeito não sendo significativo, o sinal apresentado para o efeito foi positivo.

4.8.4. Planejamento composto central para três fatores e superfície de resposta

O Planejamento composto central foi montado conforme o item 3.6.3, utilizando os fatores fixados nos planejamentos anteriores (tabela 13).

Tabela 13: Dados experimentais para a montagem de um planejamento fatorial composto central, com seus respectivos fatores e níveis

Variáveis	Fatores	Níveis			Unidades
		+	Fixos	-	
	KCl	-	0,750	-	mol L ⁻¹
1	NaOH	0,300	-	0,150	mol L ⁻¹
2	CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,0300	-	0,00100	g L ⁻¹
3	Hidrazina	0,300	-	0,150	g L ⁻¹
	Temperatura	-	70	-	°C
	Tempo (resfriamento)	-	20	-	minutos
	Sulfanilamida	-	5,000	-	g L ⁻¹
	Agitação	-	20	-	segundos
	Naftil-etilenodiamina	-	2,250	-	g L ⁻¹

Com a finalidade de expandir a faixa de estudo da superfície de resposta os níveis das variáveis foram alterados. Os valores estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14: Dados experimentais ampliados para a execução de um planejamento fatorial composto central

Variáveis	Fatores	Unidades	+	-
x_1	NaOH	mol L ⁻¹	0,400	0,200
x_2	CuSO ₄ . 5 H ₂ O	g L ⁻¹	0,0200	0,00100
x_3	Hidrazina	g L ⁻¹	0,400	0,200

* Onde + e - são os níveis das variáveis

Aplicando a equação 26 foi possível codificar as variáveis da tabela 15 e os resultados são mostrados na tabela 16.

$$X = \frac{Z - \bar{Z}}{\frac{\Delta Z}{2}} \quad (26)$$

onde: x representa a variável codificada, Z as concentrações originais (mol L⁻¹ ou g L⁻¹) e ΔZ a variação entre as concentrações dos níveis +1 e -1.

Tabela 15: Fatores e níveis escolhidos para o planejamento

Variáveis	Fatores	Unidades	1,683	+ 1	0	- 1	- 1,683
x_1	NaOH	mol L ⁻¹	0,4682	0,400	0,300	0,200	0,132
x_2	CuSO ₄ . 5 H ₂ O	g L ⁻¹	0,02341	0,0200	0,0150	0,0100	0,00659
x_3	Hidrazina	g L ⁻¹	0,4682	0,400	0,300	0,200	0,132

* Onde: +1,683; +1; 0; -1 e -1,683 são os níveis das variáveis

Lançando a matriz do planejamento e as respostas, em absorvância, da tabela 16 no “software” Statistica 5.0 foram obtidos os coeficientes e os erros (tabela 17). Através destes dados e do teste de F ao nível de 5 % de significância, mostrados na tabela 18 obteve-se o modelo mostrado na equação 27. Os erros padrão calculados pelo “software” foi uma estimativa conjunta da variância, obtida de todos os ensaios repetidos no ponto central do planejamento. A análise de variância (tabela 18) mostra que a falta de ajuste foi significativa para o

planejamento, acredita-se que este valor foi superestimado devido ao erro puro obtido na análise de variância ser muito pequeno. Desta forma, não houve a necessidade de melhorar o modelo.

Tabela 16: Variáveis codificadas, decodificadas e sinais obtidos durante a realização do planejamento composto central

Ensaio	x_1	x_2	x_3	NaOH	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	Hidrazina	Absorvância
1	-1	-1	-1	0,200	0,0100	0,200	0,132
2	+1	-1	-1	0,400	0,0100	0,200	0,177
3	-1	+1	-1	0,200	0,0200	0,200	0,234
4	+1	+1	-1	0,400	0,0200	0,200	0,232
5	-1	-1	+1	0,200	0,0100	0,400	0,135
6	+1	-1	+1	0,400	0,0100	0,400	0,125
7	-1	+1	+1	0,200	0,0200	0,400	0,183
8	+1	+1	+1	0,400	0,0200	0,400	0,153
9	-1,682	0	0	0,133	0,0150	0,300	0,569
10	+1,682	0	0	0,468	0,0150	0,300	0,53
11	0	-1,682	0	0,300	0,00659	0,300	0,579
12	0	+1,682	0	0,300	0,0234	0,300	0,726
13	0	0	-1,682	0,300	0,0150	0,132	0,586
14	0	0	+1,682	0,300	0,0150	0,468	0,626
15	0	0	0	0,300	0,0150	0,300	0,526
16	0	0	0	0,300	0,0150	0,300	0,571
17	0	0	0	0,300	0,0150	0,300	0,530
18	0	0	0	0,300	0,0150	0,300	0,545
19	0	0	0	0,300	0,0150	0,300	0,556

Tabela 17: Parâmetros, coeficientes e erros para estimar a equação do modelo

Variáveis	Regressão		Erro Padrão
	Parâmetros	Coeficientes	
Media	b_0	0,702	0,0064
x_2	b_2	-0,0309	0,0043
x_3	b_3	0,1300	0,0043
x_1^2	b_{11}	-0,0225	0,0044
x_3^2	b_{33}	-0,1268	0,0044
x_{12}	b_{12}	-0,0230	0,0057
x_{13}	b_{13}	-0,0365	0,0057
x_{23}	b_{23}	-0,0285	0,0057

Tabela 18: Análise de variância para o ajuste do modelo

	SQ	GL	SM	F
x_2	0,013042	1	0,013042	50,88
x_3	0,230952	1	0,230952	900,9
x_1^2	0,006720	1	0,006720	26,22
x_3^2	0,212809	1	0,212809	830,2
x_{12}	0,004232	1	0,004232	16,51
x_{13}	0,010658	1	0,010658	41,58
x_{23}	0,006498	1	0,006498	25,35
Falta de ajuste	0,059554	7	0,008508	33,19
Erro puro	0,000769	3	0,000256	
Total	0,538519	17		

Todos efeitos foram significativos pelo teste F ao nível de 5% de significância

$$Y = 0,702 - 0,0309x_2 + 0,130x_3 - 0,0225x_1^2 - 0,127x_3^2 - 0,0230x_1x_2 - 0,0365x_1x_3 - 0,0285x_2x_3 \quad (27)$$

$\pm 0,0064 \quad \pm 0,0043 \quad \pm 0,0043 \quad \pm 0,0044 \quad \pm 0,0044 \quad \pm 0,0057 \quad \pm 0,0057 \quad \pm 0,0057$

A equação do modelo para o planejamento composto central apresentou um grande número de coeficientes significativos, entre eles, a presença de três coeficientes de segunda ordem. A superfície de resposta do modelo não foi obtida diretamente devido à presença de três fatores independentes e do fator dependente, desta maneira, fixou-se um dos fatores independentes (concentração de NaOH) em cinco valores, correspondendo a cada nível do planejamento e obtiveram-se cinco superfícies de resposta, uma para cada valor fixado, do fator NaOH. As cinco superfícies de respostas para cada valor da concentração da solução de hidróxido de sódio fixada estão apresentadas nas figuras 16, 17, 18, 19 e 20.

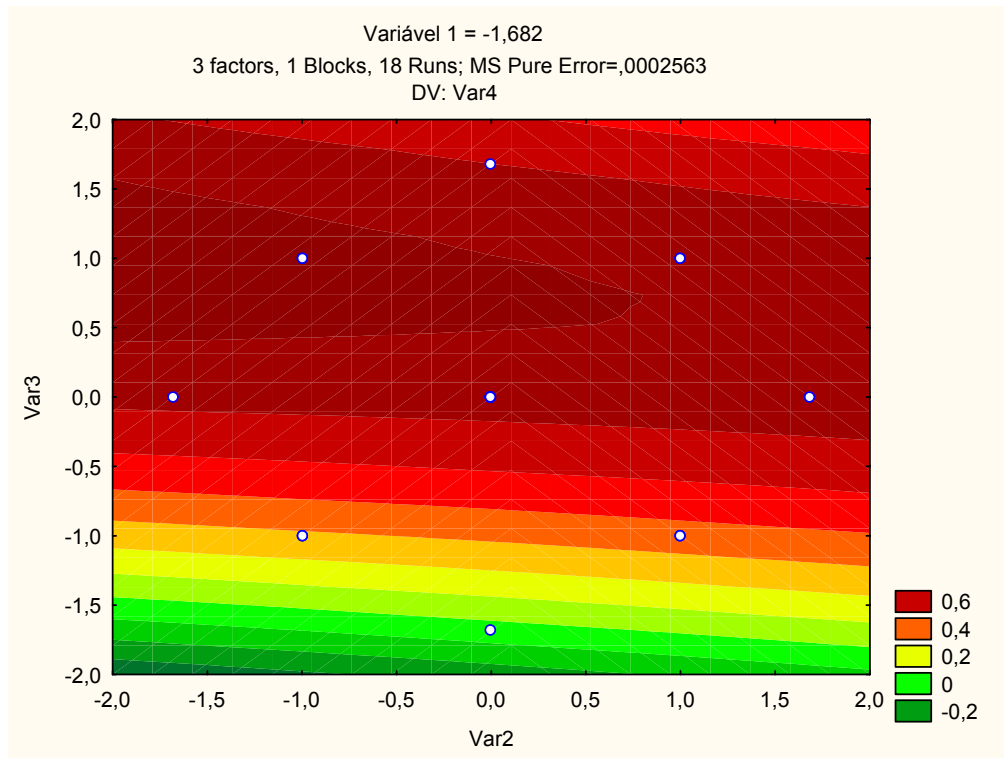


Figura 16: Superfície de resposta com a concentração da solução de hidróxido de sódio fixada em $0,132 \text{ mol L}^{-1}$, (Var1 = -1,682).

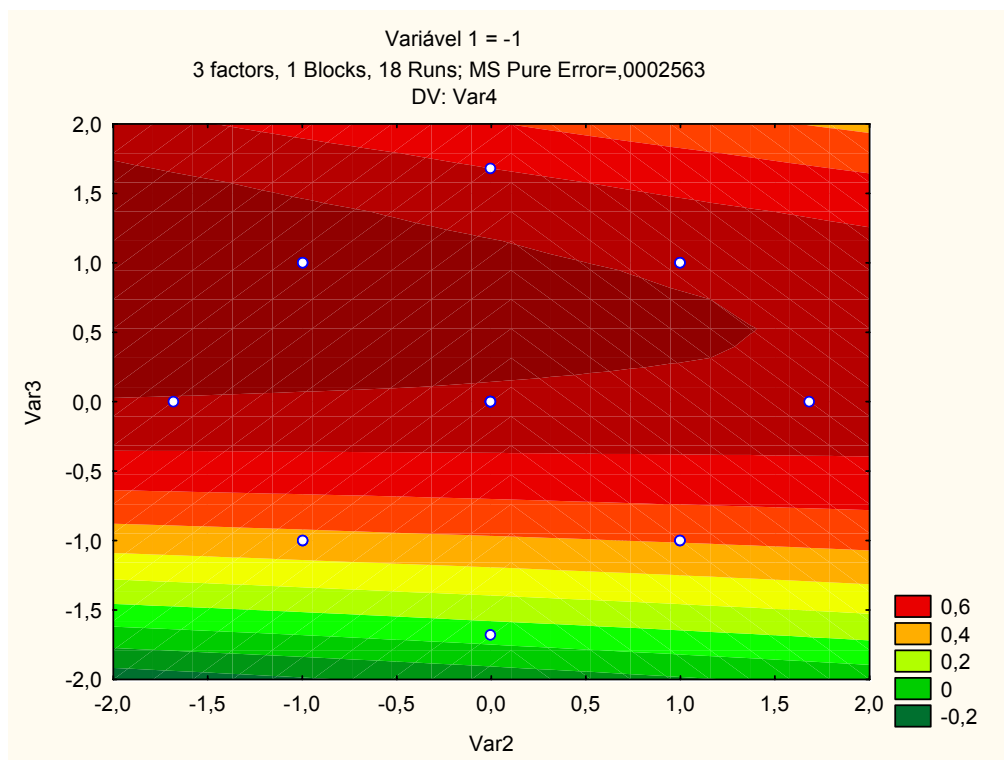


Figura 17: Superfície de resposta com a concentração da solução de hidróxido de sódio fixada em $0,200 \text{ mol L}^{-1}$, (Var1 = -1).

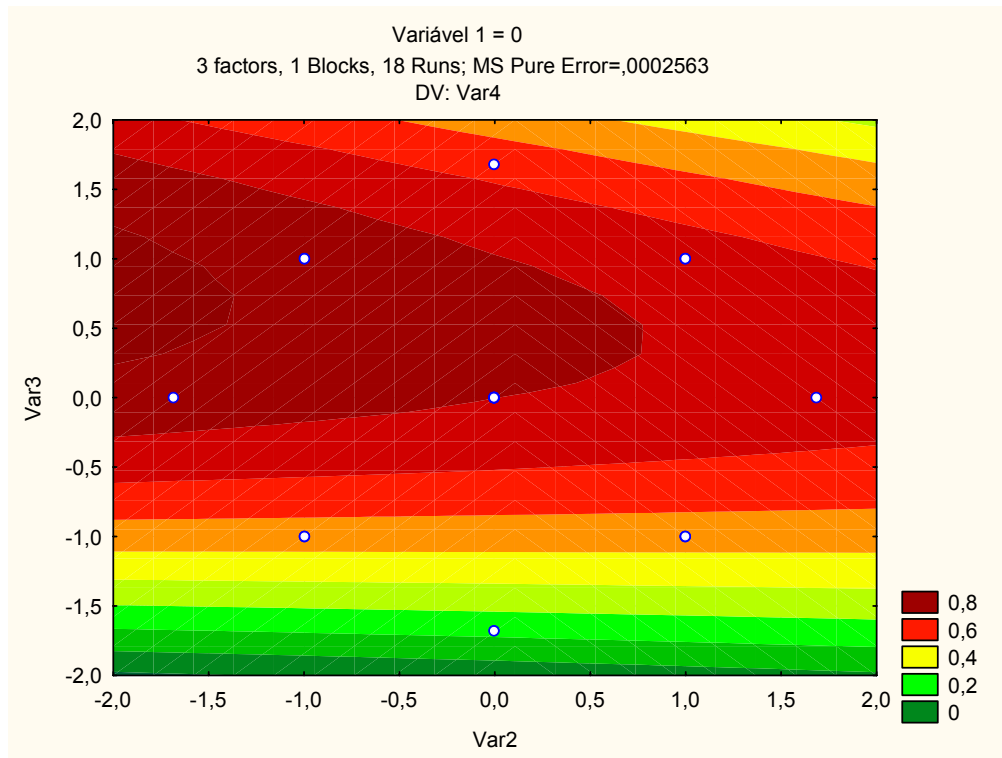


Figura 18: Superfície de resposta com a concentração da solução de hidróxido de sódio fixada em $0,300 \text{ mol L}^{-1}$, ($\text{Var1} = 0$).

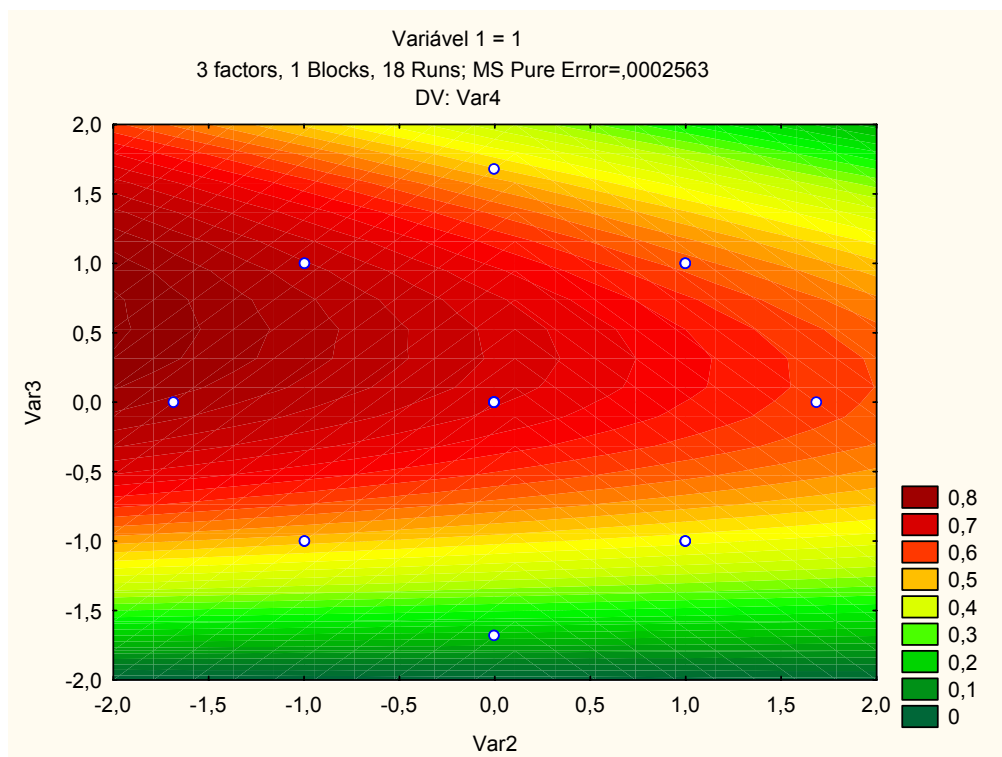


Figura 19: Superfície de resposta com a concentração da solução de hidróxido de sódio fixada em $0,400 \text{ mol L}^{-1}$, ($\text{Var1} = +1$).

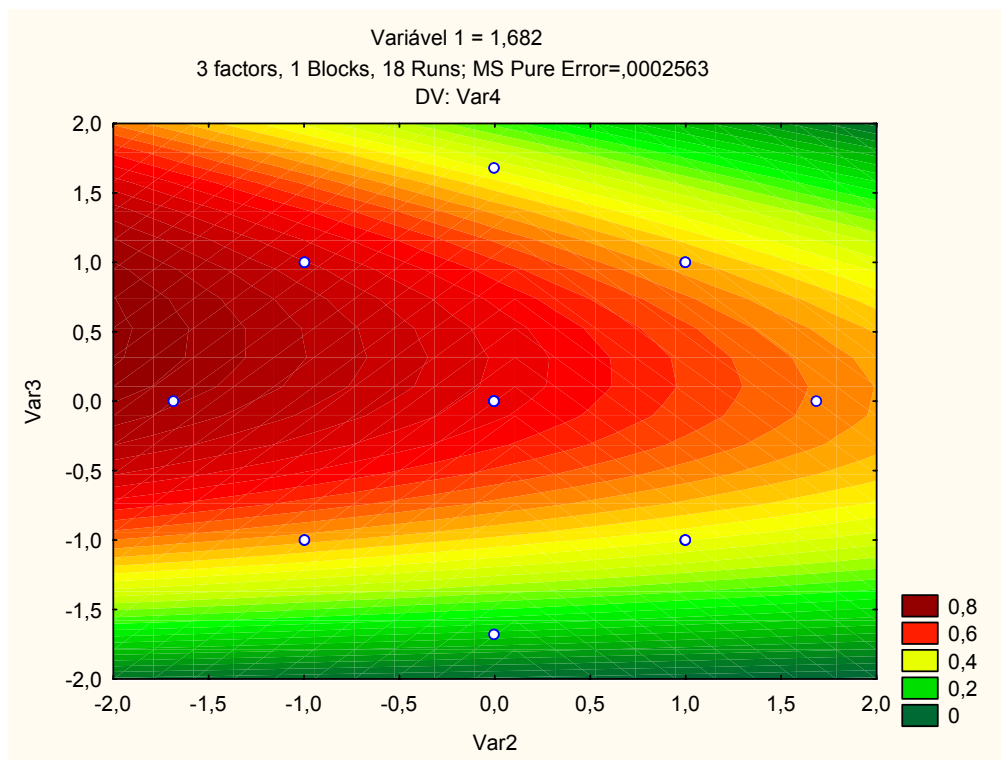


Figura 20: Superfície de resposta com a concentração da solução de hidróxido de sódio fixada em $0,468 \text{ mol L}^{-1}$, ($\text{Var1} = +1,682$).

Nas figuras 16 – 20: *Var2* representa a concentração codificada de sulfato de cobre, *Var3* representa a concentração codificada de sulfato de hidrazina. Os valores decodificados para as três variáveis das superfícies de resposta podem ser encontrados na tabela 16.

A partir da análise das superfícies de resposta foi verificado que a superfície da figura 19 foi a que apresentou as melhores condições para o aumento do sinal analítico, ou seja, melhor ponto ótimo para as variáveis. Nestas condições, as concentrações ótimas para as soluções de hidróxido de sódio, sulfato de cobre e sulfato de hidrazina foram $0,300 \text{ mol L}^{-1}$, $0,00659$ e $0,375 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente.

4.9. Estabilidade do Complexo p-(4-etilenodiamono-1-naftilazo) benzenosulfonamida

Aplicou-se o procedimento do item 3.4 utilizando solução padrão de nitrato $0,20 \text{ mg L}^{-1}$. Após a adição da solução de Naftil-etilenodiamina aguardou-se 20 minutos e mediu-se a absorvância do complexo formado em 532 nm a cada 5 minutos, conforme os dados da figura 21, e verificou-se que o complexo formado apresentou estabilidade por mais de 75 minutos.

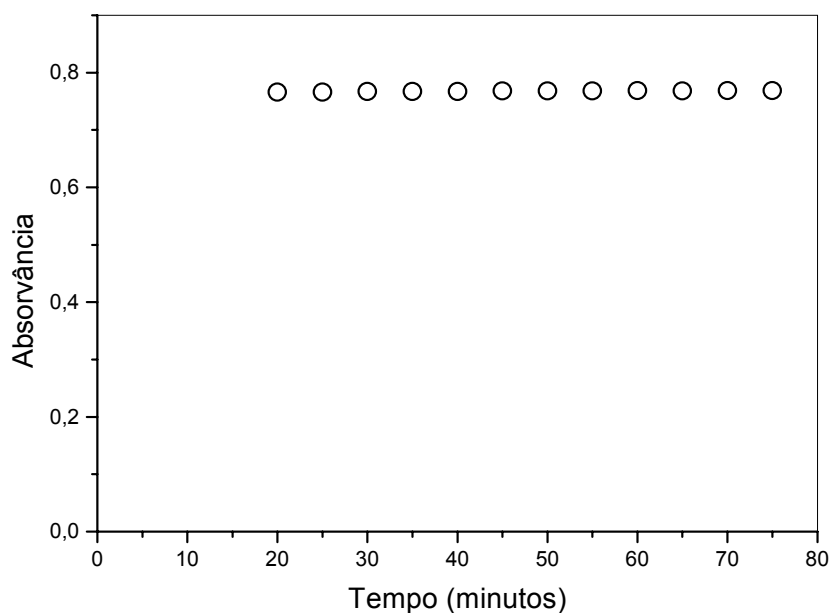


Figura 21: Estudo da estabilidade do complexo p-(4-etilenodiamino-1-naftilazo) benzenosulfonamida. As medidas foram realizadas em 532 nm.

4.10. Parâmetros Analíticos para Determinação de Nitrato (Metodologia Otimizada)

Utilizando-se o procedimento otimizado, item 3.4, foram calculados alguns parâmetros analíticos relativos à determinação de nitrato pela reação de Griess modificada. A metodologia otimizada viabiliza a determinação de nitrato na faixa de $0,020$ a $0,20 \text{ mg L}^{-1}$. A equação da curva analítica (figura 22) no intervalo considerado foi dada como $Abs = 0,12443 + 3,79494 \times C_{\text{nitrato}}$, onde Abs é o sinal analítico, medido como absorvância, e C_{nitrato} é a concentração de nitrato na

solução. O coeficiente de correlação da curva analítica apresentou um valor de 0,998.

O limite de detecção, calculado como $3s_b/b$, sendo s_b o desvio-padrão para dez medidas do branco e b o coeficiente angular da seção linear da curva analítica, foi $5,80 \mu\text{g L}^{-1}$ e o limite de quantificação, calculado como $10s_b/b$, foi $19,20 \mu\text{g L}^{-1}$. A precisão das medidas, avaliada como o desvio-padrão relativo correspondente a cada valor de concentração, calculado como $(s/X) \times 100$, sendo s o desvio-padrão para sete medidas e X o valor médio dessas medidas, alcançou valores que variaram entre 6,1 a 1,5 %, para valores de concentração de nitrato na faixa de $0,020$ a $0,20 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

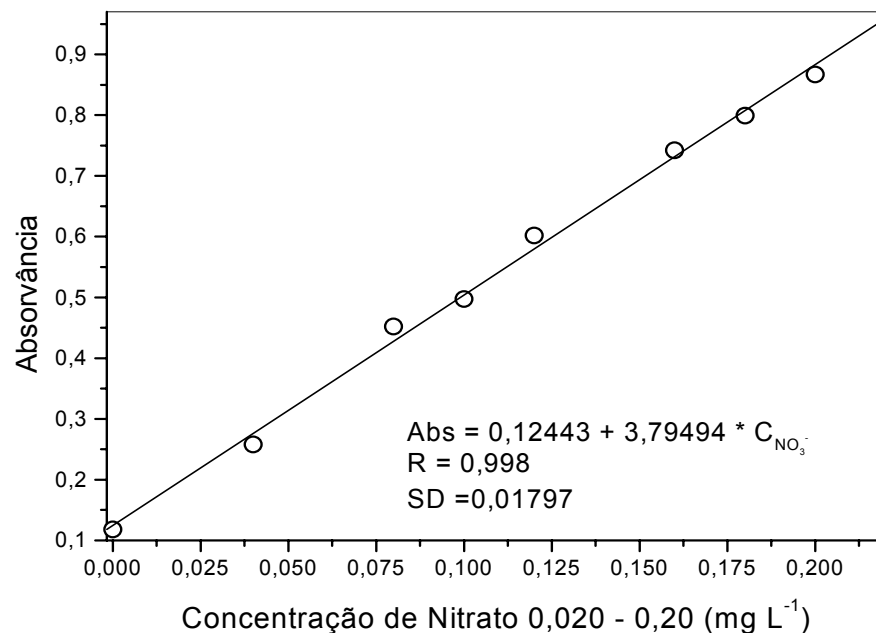


Figura 22: Curva analítica para a determinação de nitrato na faixa de $0,020$ – $0,20 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato. As medidas foram realizadas em 532 nm .

4.11. Determinação de Nitrato Utilizando a Metodologia de Griess em Amostra de Água.

A reação de diazotação é específica para nitrito, ou seja, a análise de nitrato pela metodologia baseada na reação de Griess requer redução de nitrato a nitrito antes da reação de diazotação. Sendo assim, esta metodologia não separa nitrito de nitrato. Como resultado, a metodologia de Griess fornece a soma de

nitrito e nitrato e a quantidade de nitrito deve ser calculada pela diferença. Para a determinação de nitrato foi aplicado o procedimento descrito no item 3.4 e as concentrações de nitrito e nitrato estão apresentados na tabela 19. A quantificação de nitrito nas amostras de água estava abaixo do limite de detecção do método. Para que o nitrito pudesse ser quantificado foi empregado o método da adição padrão, item 3.5. Os resultados da determinação de nitrito + nitrato, nitrito e nitrato são apresentados na tabela 20.

Tabela 19: Determinação de nitrato + nitrito em amostras água

Amostra (n = 3)	Concentração de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ (mg L^{-1})
Água Torneira	nd
Água Torneira + Hidrazina	$0,0194 \pm 7 \times 10^{-3}$
Água Lagoa	nd
Água Lagoa + Hidrazina	$0,0417 \pm 0,01$

n = número de medidas
nd = não detectado

Tabela 20: Determinação de nitrato e nitrito em amostras água

Amostra	$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ (mg L^{-1}) n = 2	NO_2^- (mg L^{-1}) n = 2	NO_3^- (mg L^{-1})
Água Lagoa	$0,0417 \pm 0,01$	$0,0100 \pm 0,001$	$0,0317 \pm 0,01$
Água de Torneira	$0,0194 \pm 7 \times 10^{-3}$	$0,00364 \pm 0,0005$	$0,0158 \pm 7,02 \times 10^{-3}$

n = número de medidas

4.12. Teste de Recuperação

Os valores das recuperações que se encontram na tabela 21 foram calculados da seguinte forma: $R (\%) = \{(C_m - C_{\text{nitrato}})/m\} \times 100$, onde C_m é o valor da concentração de nitrato em uma amostra na qual foi feita adição de analito (concentração encontrada na solução), C_{nitrato} é o valor da concentração de nitrato em uma amostra sem adição, e m é a quantidade de do nitrato adicionado.

Tabela 21: Recuperação obtida na determinação de nitrato em amostras água

Amostra	Adicionado mg L⁻¹	Encontrado mg L⁻¹ n = 3	Recuperação %
Água de Lagoa (n=3)	-	0,0855 ± 0,01 *	-
	0,040	0,1252 ± 0,01	99,3
	0,100	0,1696 ± 0,005	84,1

n = número de medidas

* Concentração de nitrito + nitrato

Conclusões

5. CONCLUSÕES

A metodologia proposta para a determinação de amônio, baseada na reação de formação de imina pela adição de formaldeído foi aplicada com sucesso para a determinação de nitrogênio na forma amoniacal em água, aveia, solo e fertilizante. A metodologia apresenta algumas vantagens em relação à metodologia de Kjeldahl e entre elas destacam-se a eliminação da etapa de destilação do amônio formado, utilização de equipamento especializado ou sistemas de destilação e o uso de indicadores.

O sistema para a determinação do íon amônio pelo método do formaldeído foi montado com uma bureta, um béquer e um medidor de pH e os reagentes utilizados foram EDTA, formaldeído e solução de hidróxido de sódio resultando em um procedimento simples, rápido e de baixo custo para a determinação de nitrogênio na forma amoniacal podendo ser aplicado em análise de rotina.

A determinação de nitrato empregando a metodologia de Griess modificada, com redução de nitrato a nitrito pela hidrazina, utilizando como técnica de detecção a espectrofotometria foi otimizada pela aplicação de planejamento fatorial e superfície de resposta.

A utilização de planejamento fatorial e superfície de resposta para a otimização das condições das variáveis na metodologia Griess possibilitou a diminuição no tempo de análise, tornando o método mais rápido, diminuição na temperatura, durante a etapa de redução de nitrato a nitrito, reduzindo custo, devido ao menor consumo de energia durante o aquecimento. Além disso, proporcionou um aumento no sinal analítico de 34,8%.

A reação de Griess otimizada foi aplicada na determinação de nitrato em águas na faixa de 0,020 a 0,20 mg L⁻¹ com um limite de detecção 5,80 µg L⁻¹.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] NOINDORF, L. **Identificação e caracterização do operon orf1glnkamtb e do gene *amth* de *Herbaspirillum seropedicae***. 2006. 151f. Tese (Doutorado em Ciências Bioquímicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2006.
- [2] JÚNIOR, G. B. A.; LEITE, V. D.; ARAÚJO, H. W. C.; SILVA, J. B. P. da; SANTOS, V. D. dos; SOUZA, J. T. dos; SILVA, W. R. dos. Estudo de espécie de fósforo e nitrogênio em lagoas de estabilização. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27., 2000, Fortaleza. **Anais**. v. III.
- [3] NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Accumulation of nitrate**. Woshington, D. C, 1972.
- [4] DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G. de; CÂMARA, T. R. Variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro com diferentes fontes de nitrogênio. **Scientia Agricola**, v. 56, nº. 04,. p.1289 – 1292, 1999. Suplemento.
- [5] CARVALHO, P. G. de. **Efeitos do nitrogênio no crescimento e no metabolismo de frutanos em *Vernonia Herbacea* (VEEL) RUSBY**. 2005. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2005.
- [6] RAMBO, L.; SILVA, P. R. F. DA; ARGENTA, G.; BAYER, C. Testes de nitrato no solo como indicadores complementares. **Rer. Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1279-1287, 2004.
- [7] MOORCROFT, M. J.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G. Detection e determination of nitrate and nitrite: a review. **Talanta**, v. 54, p. 785-803, 2001.
- [8] 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 determination in water and fish sample. **Talanta**, v. 57, p. 511-518, 2002

[9] LEE, J. D.; **Química Inorgânica não tão Concisa**. 5. ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001, p. 236-248.

[10] GREENWOOD, N. N; Earnshaw, A.; Chemistry of the Elements Londres: Pergamon Press, p. 466-470, 1984.

[11] PEIXOTO, E. M. A. Elemento químico – Nitrogênio. **Química Nova na Escola**. n. 6, p. 34, 1997.

[12] ALFAIA, S. S. Caracterização e distribuição das formas do nitrogênio orgânico em três solos da Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 36, nº. 2, p. 135 – 140, 2006.

[13] MAIA, C. E.; CANTARUTTI, R. B. Acumulação de nitrogênio e carbono no solo pela adubação orgânica e mineral contínua na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.8, n.1, p.39-44, 2004.

[14] 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. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 282-290, 2006.

[15] GUIMARÃES, G. P.; MELLO, W. Z. de. Estimativa do fluxo de amônia na interface ar-mar na baía de Guanabara. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 54-60, 2006.

[16] Morgante, P. G. **Fixação biológica e assimilação de nitrogênio**. Retirado do site <http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGrad/MetNitro.htm#topico7>, no dia 23/01/2007.

[17] BAIRD, COLIN. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002, p. 223-224, 459-463.

[18] TOVAR, A.; MORENO, C.; MANUEL-VEZ, M. P.; VARGA, M. G. A simple automated method for the speciation of dissolved inorganic nitrogen in seawater. **Analytica Chimica Acta**, v. 469, p. 235-242, 2002.

[19] ARAÚJO, A. R. de; CARVALHO, J. L. N.; GUILHERME, L. R. G.; CURI, N.; MARQUES, J. J. Movimentação de nitrato e amônio em colunas de solo. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 28, n. 3, p. 537-541, maio/jun. 2004.

[20] SILVA, L. I. D da; CARNEIRO, M. C.; EMÍDIO, V. S.; JUNIOR, S. S. H.; MONTEIRO M. I. C. Determinação das formas de nitrogênio e nitrogênio total em rochas-reservatório de petróleo por destilação com arraste de vapor e método do indofenol. **Rev. Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 46-51, 2006.

[21] MATOS, A. T. de; LEMOS, A. F.; BARROS, F M. Mobilidade de nitrato em solos de rampas de tratamento de água residuárias por escoamento superficial. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, MG, v. 12, n. 1, 57-65, Jan/Mar., 2004.

[22] LEMOS, G. B. de; FILHO, N. D. OLIVEIRA, L. E. M. de; PURCINO A. A. C. Nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato de amônio. **Rev. Bras. Fisiologia Vegetal**, v. 11, n 2, p. 113-118, 1999.

[23] CAMPOS, A. X. de. **Fertilização com Sulfato de Amônio na cultura do milho em um solo do cerrado de Brasília sob pastagem de *Brachiaria decumbens***. 2004. 119f. Tese (Doutorado em Agronomia, área de concentração: solos e nutrição de plantas)-Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2004.

[24] SILVA, L. A.; KORN, M.; ANDRADE J. B. de. Influence of ultrasonic waves in the reduction of nitrate to nitrite by hydrazine–Cu(II). **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 14, n. 2, p. 275-280, 2007.

[25] MANTOVANI, J. R.; FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. DE. Nitrato em alface e mobilidade do íon em solo adubado com composto de lixo urbano. **Pesq. agropec. bras**, Brasília, v. 40, n. 7, p. 681-688, jul. 2005.

[26] FERNÍCOLA, N. G. G. de; AZEVEDO, F. A. de. Metemoglobinemia e nitrato nas águas. **Rev. Saúde pública**, S. Paulo, v. 15, p. 242-248, 1981.

[27] ALABURDA, J.; NISHIHARA, L.; Presença de compostos de nitrogênio em águas de poços. **Rev. Saúde Pública**, v. 32, n. 2, p. 160-165, 1998.

[28] ANDRADE, R. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de nitrato, nitrito e N-nitrosaminas em produtos cárneos**. 2004. 201f. Tese (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.

[29] BRASIL, BRASÍLIA. Portaria nº. 518, de 24 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle de potabilidade, e dá outras providências. **D.O.U.** - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 26 de março de 2004.

[30] BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente-(CONAMA). Resolução nº. 357, 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Acessado do site: <http://www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf> no dia 13/12/2005.

[31] BENINNI, E.R.Y.; TAKAHASHI, H.W.; NEVES, C.S.V.J.; FONSECA, I.C.B. Teor de nitrato em alface cultivada em sistemas hidropônico e convencional. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 183-186, 2002.

[32] SANTOS, J. S. dos; BECK, L.; WALTER, M.; SOBCZAK, M.; OLIVO, C. J.; COSTABEBER, L.; EMANUELLI, T. Nitrato e nitrito em leite produzido em sistemas

convencional e orgânico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 304-309, abr.- jun. 2005.

[33] LI, JIN-SHU.; WANG, H.; ZHANG, X.; ZHANG, HUA-SHAN. 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)-difluoroborodiazas-indacence. **Talanta**, v. 61, p. 797-802, 2003.

[34] ALONSO, M. C. B.; PREGO, R. Determination of silicate, simultaneously with other nutrients (nitrite, nitrate and phosphate), in river waters by capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 416, n. 1, p. 21-27, 2000.

[35] 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 **Analytica Chimica Acta**, v. 349, n. 1-3, p. 11-16, 1997.

[36] DANIEL, A.; BIROT, D.; LEHAITRE, M.; PONCIN, J. Characterization and reduction of interferences in flow-injection analysis for the in situ determination of nitrate and nitrite in sea water. **Analytica Chimica Acta**, v. 308, n. 1-3, p. 413-424, 1995.

[37] LEE, S. H.; FIELD, L. R. Postcolumn fluorescence detection of nitrite, nitrate, thiosulfate, and iodide anions in high-performance liquid chromatography. **Analytical chemistry**, v. 56, p. 2647, 1984.

[38] ASOPURU, A. O.; HERBERT, H. H.; WILLIAM, F. S.; STEVEN, G. M. Reverse Polarity Capillary Zone Electrophoretic Analysis of Nitrate and Nitrite in Natural Water Samples. **Analytical chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2725 -2731, 1999.

[39] NOROOZIFAR, M.; KHORASANI-MOTLAGH, M.; TAHERI, A.; MARJAN, H. 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, n. 1, p. 359-364, 2007.

[40] NOROOZIFAR, M.; KHORASANI-MOTLAGH, M.; TAHERI, A.; MARJAN, H. Indirect Determination of Nitrite by Flame Atomic Absorption Spectrometry Using a Lead(IV) Dioxide Oxidant Microcolumn. **Bull. Korean Chem. Soc.** v. 27, n. 6, p. 875-880, 2006.

[41] TSIKAS, DIMITRIOS. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research, **Journal of Chromatography B**, 2006, doi:10.1016/j.jchromb.2006.07.054.

[42] CLESCERLL, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. **Standard Methods for Examination of Water & Wastewater**. Washiton: EPA/APHA, 2003.

[43] RIDER, B. F.; MELLON, M. G. Colorimetric determination of nitrites. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, nº 2, p. 96 – 98, 1946.

[44] SUVARDHAN, K.; KUMAR, K. S.; BABU, S. H.; JAYARAJ, B.; CHIRANJEEVI, P. Simultaneous flow-through determination of nitrites, nitrates and their mixtures in environmental and biological samples using spectrophotometry. **Talanta**, v. 66, p. 505-512, 2005.

[45] FANNING, J. C. The chemical reduction of nitrate in aqueous solution. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 199, p. 159–179, 2000.

[46] BASTOS, A. L.; BAISCH, A. L. M.; SOARES, L. A. S.; BURKERT, J. F. M.; FURLONG, E. B. Determinação de nitrato e nitrito em chás de peles de pescados empregados para tratamento de asma brônquica na região sul do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 29, nº. 5, p. 895 – 900, 2006.

[47] MULLIN, J. B; RILEY, J. P. The spectrophotometric determination of nitrate in natural waters, with particular reference to sea-water. **Analytica Chimica Acta**, v. 12, p. 464 – 480, 1955.

[48] PONTES, F. V. M.; MONTEIROS, M. I. C.; SILVA, L. I. D. da; CARNEIRO, M. C. Método do indofenol para determinação de nitrogênio em amostras de solo. Disponível em: www.cetem.gov.br/.../14Artigo%20JIC%202004%20Fernanda%20Veronesi%20e%20Maria%20Ines%20.pdf > acessado em 10/01/ 2006.

[49] JÚNIOR, S. S. H.; M. M. I. C.; SILVA, L. I. D. DA; CARNEIRO, M. C. Determinação das espécies inorgânicas trocáveis de nitrogênio em amostras de rocha petrolífera. Disponível em: http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_XII_jic_2004/32Artigo%20JIC%202004%20Sergio%20e%20Maria%20Ines.pdf > Acessado em: 10 jan. 2006.

[50] NEAS, E.; ZAKARIA-MEEHAN, z. Kjeldahl nitrogen determination using a microwave system. In: Kingston H. Jassie L. eds. Introduction to microwave sample preparation: theory and practice. **Am. Chem. Soc**, p. 167-185, 1988.

[51] COELHO, N. M. M. **Avaliação do método de difusão-condutividade na determinação de amônio e nitrato em solos – Desenvolvimento de um detector condutimétrico de volume variável aplicado a trabalho de rotina.** 1991. 114f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1991.

[52] JEFFERY, G. H.; BASSET, M.; MENDHAM, J.; DENEY, R. C. **Vogel – Análise Química Quantitativa.** 5º Ed., Rio de Janeiro, LTC, 1992, p. 548 – 549 e 690.

[53] GALVANI, F.; GAERTNER, E. Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. **Circular Técnica da Embrapa**, Corumbá, MS, 2006.

[54] ATAMAN, O. Y.; MARK, H. B. Jr. Determination of ammonia in aqueous solutions by Infrared Spectrometry following preconcentration on Zeolite. **Analytical chemistry**, v. 49, n. 9, p. 1331, 1977.

[55] MICHAOWSKI, T.; TOPOREK, M.; RYMANOWSKI, M. Overview on the Gran and other linearisation methods applied in titrimetric analyses. **Talanta**, v. 65, p. 1241-1253, 2005.

[56] <http://www.furg.br/furg/revistas/vet/vet01087.htm>

[57] PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS. **Química Nova**, v.25, n^o. 2, p. 246-253, 2002.

[58] RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, É. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114-1120, 2006.

[59] PEHRSSON, L.; INGMAN, F.; JOHANSSON, A. Acid-base titrations by stepwise additions of equal volumes of titrant with special reference to automatic titrations-I: Theory, discussion of the gran functions, the hofstee method and two proposed methods for calculating equivalence volumes. **Talanta**, v. 23, n. 11-12, p. 769-780, 1976.

[60] Ewing, G. W. **Métodos instrumentais de análise química**. Editora Edgard Blucher. S. Paulo, 1972, p. 514.

[61] PIRES, C. K. **Avaliação da contaminação de nitrito, nitrato e metais no ribeirão Timotinho e em efluentes de indústria siderúrgica em Minas Gerais**.

1999. 92f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.

[62] SOLOMONS, T. **Química Orgânica. v. 2**, 7ª edição, LTC, RIO DE JANEIRO, 1996.

[63] <http://www.ufpa.br/quimicanalitica/tituacfrabafor.htm>.

[64] RIDER, B. F.; MELLON, G. Colorimetric determination of nitrites. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 96 – 99, 1946.

[65] NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2º ed., editora da UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2003, p. 349 - 369.