UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL

" POTENCIALIDADE DA ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQÜENCIAL NO MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DE INDICADORES DE QUALIDADE DE ÁGUAS NATURAIS E RESIDUAIS"

Cristiane Xavier Galhardo

Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Jorge Cesar Masini

São Paulo

2001

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Galhardo, Cristiane Xavier
G156p Potencialidade da análise por injeção seqüencial no monitoramento em tempo real de indicadores de qualidade de águas naturais e residuais / Cristiane Xavier Galhardo. -- São Paulo, 2001.
145p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Masini, Jorge Cesar

1. Análise por injeção seqüencial : Química 2. Água : Controle de qualidade I. T. II. Masini, Jorge Cesar, orientador

543.08 CDD

"Potencialidade da Injeção Seqüencial no Monitoramento em Tempo Real de Indicadores de Qualidade de Águas Naturais e Residuais"

CRISTIANE XAVIER GALHARDO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Química Analítica.

Aprovado por:

Prof. Dr. JORGE CESAR MASINI
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. MARIA ENCARNACIÓN VÁZQUEZ SUÁREZ IHA
IQ - USP

Profa. Dra. NINA COICHEV
IQ – USP

Prof. Dr. BOAVENTURA FREIRE DOS REIS
CENA – USP

Prof. Dr. IVO MILTON RAIMUNDO JUNIOR
IQ – UNICAMP

SÃO PAULO
04 DE MAIO 2001.

"Pode-se viver no mundo uma vida magnífica,
Quando se sabe trabalhar e amar; trabalhar pelo
que se ama e amar aquilo em que se trabalha."

Tolstoi

Dedico este trabalho aos meus pais, Neyde e Octávio,
a quem agradeço pelo amor e incentivo,
tornando possível a realização de
mais uma etapa em minha vida.

Aos meus irmãos, Lucyene e Luciano,

pelo carinho e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Prof. Dr. Jorge Cesar Masini por ser mais que um orientador, um amigo que sempre me incentivou e com quem divido a alegria deste momento.

Ao Prof. Dr. Jaim Lichitg pela sua amizade convívio e colaboração.

Aos professores da analítica por contribuírem para a minha formação.

Aos meus amigos do laboratório pela amizade e convivência de que sentirei saudades.

À todos os amigos e colegas da analítica pela amizade e convivência.

Aos meus avós Rosa (*in memorian*) e Alcino pelo amor e dedicação.

Ao meu tio Chico e meu primo Maurício pelo apoio e amizade.

À tia Idalina e minha prima Sônia pelo carinho, amizade e incentivo.

Aos funcionários do Instituto de Química.

À todos que de alguma forma colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq e a FAPESP pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO 1

1. Princípios da Análise por Injeção Seqüencial 2

2. Algumas Aplicações da Análise por Injeção Seqüencial 5

3. Nutrientes e o Meio Ambiente 12

4. Qualidade das Águas – Estações de Monitoramento da CETESB 14

II. OBJETIVO 17

III. DETERMINAÇÃO DE FOSFATO E SILICATO 18

1. INTRODUÇÃO 19

2. PARTE EXPERIMENTAL 23

2.1. Reagentes e Soluções 23

2.2. Equipamentos Utilizados 23

2.3. Procedimentos 24

2.3.1. Determinação de fosfato 24

2.3.2. Determinação de silicato na presença de fosfato 25

2.3.2.1. Uso da câmara de mistura 25

2.3.2.2. Uso da bobina auxiliar no lugar da câmara de mistura 27

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 29

3.1. Determinação de Fosfato 29

3.1.1. Influência do antimônio (Sb(III)) no sinal analítico 31

3.1.2. Estudo da composição e concentração da solução de ácido ascórbico – Efeito Schlieren 32

3.1.3. Comparação entre os redutores ácido ascórbico e cloreto de estanho(II) 37

3.1.4. Interferência de silicato na determinação de fosfato 40

3.1.4.1. Utilização de ácidos orgânicos 41

3.2. Determinação de Silicato 47

3.2.1. Interferência de fosfato na determinação de silicato 47

3.2.1.1. Influência da temperatura na determinação de silicato 47

3.2.1.2. Influência da concentração do reagente molibdato de amônio 49

3.3. Determinação Seqüencial de Fosfato e Silicato 54
3.4. Estudo de Interferentes 56
3.5. Análise de Amostras Reais 57
4. CONCLUSÕES 63
5. PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS 64
5.1. Pré-concentração de Fosfato com Resina de Troca-iônica 64
IV. DETERMINAÇÃO DE NITRITO E NITRATO 66
1. INTRODUÇÃO 67
2. PARTE EXPERIMENTAL 70
2.1. Reagentes e Soluções Utilizadas 70
2.2. Procedimento 71
2.2.1. Determinação seqüencial de nitrito e nitrato 71
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 73
3.1. Otimização do Sistema para Determinação de Nitrito e Nitrato 73
3.2. Ensaio de Repetibilidade 80
3.2.1. Repetibilidade das curvas analíticas 80
3.2.2. Comportamento das colunas redutoras 83
3.3. Estudo de Interferentes 86
3.4. Determinação Seqüencial de Nitrito e Nitrato 90
3.4.1. Análise de Amostra Real 90
3.4.2. Estudo com amostras simuladas utilizando-se a filtração tangencial para amostragem 91
4. CONCLUSÕES 97
5. PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS 98
V. DETERMINAÇÃO DE FERRO(II) E FERRO(III) 99
1. INTRODUÇÃO 100
1.1. Determinação de Ferro 101
2. PARTE EXPERIMENTAL 106
2.1. Reagentes e Soluções Utilizadas 106
2.2. Procedimento 107
2.2.1. Determinação seqüencial de ferro(II) e ferro(III) 107

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 109
3.1. Otimização do Sistema para Determinação de Ferro(II) e Ferro(III) 109
3.2. Ensaio de Repetibilidade 115
3.2.1. Repetibilidade das curvas analíticas 115
3.2.2. Comportamento das colunas redutoras 118
3.3. Utilização da técnica de amostragem sanduíche 119
3.4. Estudo da concentração do reagente 1,10-fenantrolina 122
3.5. Estudo de Interferentes 124
3.6. Monitoramento de Fe(II) e Fe(III) Utilizando-se Filtração Tangencial em Amostras Simuladas 126
4. CONCLUSÕES 129
5. PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS 130
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 131
CURRICULUM VITAE 146

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág

Figura 1. Sistema básico de injeção Seqüencial. BC: bobina coletora; BR: bobina de reação. 3

Figura 2. Típicos níveis de oxigênio dissolvido em ambiente oligotrófico (a) e eutrofizado (b) (Nebel e Wright, 1993). 14

Figura 3. Estação de Monitoramento de Qualidade de Águas. 16

Figura 4. Esquema dos processos de mobilização e transporte de fósforo no sistema água-sedimento (Silva, 1996). 20

Figura 5. Diagrama representativo do sistema de Injeção Seqüencial utilizado para a análise de fosfato. Características do sistema: Solução transportadora: água, Reagente 1: ácido ascórbico 2% (m/v) contendo 100 mg L^{-1}de Sb, Reagente 2: molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, bobina coletora (comprimento = 3 m; diâmetro interno = 0,8 mm), reator (comprimento = 76 cm; diâmetro interno = 0,5 mm), vazão = 100 μL s^{-1}, cela de fluxo (v = 80 μL), λ = 660 nm. 24

Figura 6. Configuração do sistema SIA para determinação de silicato com câmara de mistura (v =0,78 mL). Reagente 1: ácido oxálico 10% (m/v), Reagente 2: molibdato de amônio 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, Reagente 3: ácido ascórbico 2% (m/v) com 100 mg L^{-1} de Sb. As demais características são similares a Figura 5. 26

Figura 7. Configuração do sistema SIA para determinação de silicato com bobina auxiliar. Bobina auxiliar (comprimento = 2 m; diâmetro interno = 0,7 mm). As demais características são similares a Figura 6. 27

Figura 8. Estrutura do heteropoliácido 12-molibdato de fórmula geral $[X^{n+}Mo_{12}O_{40}]^{(8-n)-}$ (Cotton e Wilkinson, 1972). 30

Figura 9. Efeito da utilização do Sb(III) no sinal analítico na determinação de fosfato. (A) solução de ácido ascórbico 5% (m/v) contendo 10% de glicerina (v/v) e Sb 100 mg L^{-1}, Y=(-0,015±0,003)+(0,0339±0,0008)X, R=0,999; L.D.=0,27 mg L^{-1}; (B) solução de ácido ascórbico 5% (m/v) contendo 10% de glicerina (v/v), Y=(-0,002±0,001)+(0,007±0,0002)X, R=0,998; L.D.=0,43 mg L^{-1}. 32

Figura 10. Efeito do ácido ascórbico no sinal do branco para a determinação de 34

fosfato usando molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em 0,2 mol L^{-1} de HNO_3 e água desionizada como solução transportadora. (A) 5% (m/v) de ácido ascórbico com 10% (v/v) de glicerina; (B) 5% (m/v) de ácido ascórbico sem glicerina; (C) 2,5% (m/v) de ácido ascórbico com 10% (v/v) de glicerina; (D) 2,5% (m/v) de ácido ascórbico sem glicerina.

Figura 11. Influência da composição da solução de ácido ascórbico no sinal analítico de fosfato. (A) ácido ascórbico 5% (m/v) com 10% (v/v) de glicerina e 100 mg L^{-1} de Sb. (B) ácido ascórbico 2,5% (m/v) com 100 mg L^{-1} de Sb. (C) ácido ascórbico 2,0% (m/v) com 100 mg L^{-1} de Sb. (D) ácido ascórbico 1,0% (m/v) com 100 mg L^{-1} de Sb. 35

Figura 12. Influência da concentração do reagente molibdato de amônio. (A) molibdato de amônio 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}; Y=(0,00±0,03)+(0,051±0,005)X; R=0,989. (B) molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}; Y=(-0,01±0,02)+(0,058±0,003)X; R=0,996. 37

Figura 13. Influência do agente redutor no sinal analítico de fosfato. Condições: molibdato de amônio 2,5 mmol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, ácido ascórbico 2% com 100 mg L^{-1} de Sb. (A) branco, (B) 0,02 mg L^{-1}, (C) 0,05 mg L^{-1}, (D) 0,1 mg L^{-1}, (E) 0,2 mg L^{-1}, (F) 0,4 mg L^{-1}, (G) 0,6 mg L^{-1}. Y= (0,002±0,001)+(0,066±0,003)X; R=0,996. 38

Figura 14. Influência do agente redutor no sinal analítico de fosfato. Condições: molibdato de amônio 2,5 mmol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, $SnCl_2$ 1 x 10^{-3} mol L^{-1} com sulfato de hidrazina 0,8% em HCl 2,5 x 10^{-1} mol L^{-1} . (A) branco, (B) 0,02 mg L^{-1}, (C) 0,05 mg L^{-1}, (D) 0,1 mg L^{-1}, (E) 0,2 mg L^{-1}, (F) 0,4 mg L^{-1}, (G) 0,6 mg L^{-1}.Y=(0,0009±0,0005)+(0,032±0,002)X; R=0,995. 39

Figura 15. Interferência do silicato na determinação de fosfato. Aos padrões utilizados foi adicionado 2 mg L^{-1} de P. Condições: molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1} e ácido ascórbico 5% (m/v) contendo 100 mg L^{-1} de Sb. Y=(0,078±0,003)+(0,0024±0,0001)X, R=0,997. 43

Figura 16. Influência da concentração de ácido tartárico no sinal analítico da solução padrão 2 mg L^{-1} de P. A: 2 mg L^{-1} de P utilizando-se 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} de molibdato de amônio em 0,2 mol L^{-1} de HNO_3. B: 2 mg L^{-1} de P utilizando-se 0,125 mol L^{-1} de molibdato de sódio contendo 0,1 mol L^{-1} de ácido tartárico em 3 mol L^{-1} de HCl. C: 2 44

mg L^{-1} de P utilizando-se 0,125 mol L^{-1} de molibdato de sódio contendo 0,17 mol L^{-1} de ácido tartárico em 3 mol L^{-1} de HCl. O branco equivale a 40% do sinal de A.

Figura 17. Influência do ácido tartárico na eliminação da interferência de silicato na 45
determinação de fosfato. Aos padrões utilizados foi adicionado 2 mg L^{-1} de P. Condições: (A) molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1} e ácido ascórbico 5% (m/v) contendo 100 mg L^{-1} de Sb. (B) molibdato de sódio 0,125 mol L^{-1} contendo 0,1 mol L^{-1} de ácido tartárico em HCl 3,0 mol L^{-1} e ácido ascórbico 5% (m/v) contendo 100 mg L^{-1} de Sb.

Figura 18. Influência dos ácidos orgânicos na eliminação da interferência de silicato 46
na determinação de fosfato. Aos padrões utilizados foi adicionado 2 mg L^{-1} de P e utilizou-se ácido ascórbico 2% (m/v) contendo 100 mg L^{-1} de Sb. Condições: (A) molibdato de amônio 5 x 10^{-3} mol L^{-1} contendo 0,02 mol L^{-1} de ácido oxálico em HNO_3 0,2 mol L^{-1}. (B) molibdato de amônio 5 x 10^{-3} mol L^{-1} contendo 0,01 mol L^{-1} de ácido tartárico em HNO_3 0,2 mol L^{-1}. (C) molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} contendo 0,01 mol L^{-1} de ácido tartárico em HNO_3 0,2 mol L^{-1}.

Figura 19. Influência da temperatura na determinação de silicato. Condições: 48
molibdato de amônio 5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, ácido oxálico 10% (m/v) e ácido ascórbico 2% (m/v) contendo Sb 100 mg L^{-1}. (A) temperatura 40-42°C. (B) temperatura ambiente.

Figura 20. Influência da concentração de molibdato de amônio na determinação de 50
silicato. Condições: (A) molibdato de amônio 1 x 10^{-2} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}. (B) molibdato de amônio 5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}. Demais condições: 10% (m/v) de ácido oxálico, ácido ascórbico 2% (m/v) contendo 100 mg L^{-1} de Sb e temperatura ambiente.

Figura 21. Interferência de fosfato na determinação de silicato. (A) soluções padrão 51
contendo 40 mg L^{-1} de Si; (B) soluções padrão contendo 10 mg L^{-1} de Si.

Figura 22. Interpenetração entre as zonas de amostra e reagente usando azul de 53
bromotimol no lugar do reagente (R) e amostra (S) na bobina auxiliar da Figura 6. Seqüências: 150 μL R, 100 μL S, 150 μL R; (B) 150 μL R, 200 μL S, 150 μL R; (C) 150 μL R, 100 μL S, 100 μL R, 100 μL S, 150 μL R.

Figura 23. Esquema da seqüência sandwich utilizada para destruição do 53

fosfomolibdato.

Figura 24. Curva analítica de silicato. Condições: molibdato de amônio 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, solução de ácido oxálico 10% (m/v), ácido ascórbico 2% (m/v) com 100 mg L^{-1} de Sb. Y=(-0,010±0,001)+(0,00373±0,00005)X; R=0,999. Demais condições similares a Figura 7. 54

Figura 25. Registro do sinal para a determinação seqüencial de fosfato e silicato. 232 unidades arbitrárias corresponde a 0,1 unidades de absorbâcia. 55

Figura 26. Correlação entre os métodos APHA e SIA para determinação de fosfato em amostras de extratos de sedimentos. 61

Figura 27. Curva analítica de fosfato após pré-concentração em resina de troca-iônica. Faixa de trabalho 0,01 a 0,1 mg L^{-1}. Condições: HNO_3 0,2 mol L^{-1} (solução transportadora); molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}; ácido ascórbico 2% (m/v) contendo 100 mg L^{-1} de Sb; volume de amostra injetada na coluna: 1500 μL; volume morto: 130μL; volume de amostra destinado a análise: 200 μL.; Y=(-0,0031±0,0006)+(0,44±0,01)x; L.D. = 0,004 mg L^{-1};R=0,999. 65

Figura 28. Especiação de nitrogênio em águas naturais. 68

Figura 29. Esquema utilizado para a análise de nitrato e nitrito com coluna redutora de Cd-Cu. Características do sistema: bobina coletora (comprimento = 3 m; diâmetro interno = 0,8 mm); bobina de reação (comprimento = 50 cm; diâmetro interno = 0,8 mm); vazão = 100 μL s^{-1}; cela de fluxo de quartzo (V = 80 μL); λ=540 nm. Solução transportadora: solução tampão NH_4^+OH/NH_4Cl pH=8,5 com EDTA; Reagente 1: solução regeneradora HCl 0,1 mol L^{-1}; Reagente 2: reagente de Griess; coluna (comprimento = 3 cm; diâmetro interno = 2,5 mm). 71

Figura 30. Esquema da reação química para formação do azo-composto. 73

Figura 31. Influência do volume de amostra (V_S). Condições: V_R=100 μL; padrão de controle 0,2 mg L^{-1} de NO_2^--N. 74

Figura 32. Sinal analítico para a determinação de nitrito. Parada de fluxo com o tempo de 80 s. Condições:Volume de transportador = 1500 μL; V_R=100 μL; V_S =350 μL. 75

Figura 33. A: Registro do sinal para a determinação seqüencial de NO_2^-/NO_3^-. B: Curva analítica de NO_2^-. Y=(-0,011±0,002)+(1,01±0,03)X, R=0,998, L.D.=0,006 mg 79

L^{-1} N-NO_2^-; C: Curva analítica do N total: Y=(0,072±0,003)+(0,74±0,03)X, R=0,997, L.D.=0,018 mg L^{-1} N-NO_3^-.

Figura 34. Ensaio da repetibilidade da curva analítica de nitrito em 4 dias consecutivos utilizando-se os mesmo padrões. 81

Figura 35. Ensaio da repetibilidade da curva analítica de nitrato em 4 dias consecutivos utilizando-se os mesmo padrões. 81

Figura 36. Comportamento da coluna de Cd-Cu utilizando-se padrão de controle 0,1 mg L^{-1} de N- NO_2^- / N-NO_3^- em solução tampão NH_4OH/NH_4Cl, pH=8,5. 84

Figura 37. Comportamento da coluna de Cd-Cu utilizando-se padrão de controle 0,1 mg L^{-1} de N- NO_2^- / N-NO_3^- em água. 85

Figura 38. Registro do sinal para 0,5 mg L^{-1} de N-NO_3^- contendo 5,0 mg L^{-1} de sulfeto. Curva descendente: Não utilizou-se etapa extra de lavagem da coluna com 0,1 mol L^{-1} de HCl. Curva ascendente: Utilizou-se etapa extra de lavagem da coluna com 0,1 mol L^{-1} de HCl. 89

Figura 39. Filtro tangencial A-SEP Applikon. 92

Figura 40. Esquema utilizado para a determinação de nitrito e nitrato com filtração tangencial no sistema SIA. T = transportador; V = válvula da seringa; SP = seringa de pistão; BC = bobina coletora; VS = válvula seletora; Reduc = coluna redutora; FT = filtro tangencial; P = bomba peristáltica; S = amostra; R1 = reagente colorimétrico; RS = solução regeneradora para a coluna redutora; D = detector espectrofotométrico; AW = descarte auxiliar; W = descarte. 96

Figura 41. (A) Correlação entre os métodos FIA e SIA na análise da suspensão de sedimentos. (B) Diferença entre as concentrações obtidas pelo método SIA e FIA, plotados como função dos resultados obtidos pelo FIA. 95

Figura 42. Diagrama ilustrativo EH-pH para o sistema Fe-H_2O-CO_2-S (O'Nell, 1993). 102

Figura 43. Diagrama ilustrativo EH-pH para o sistema Fe-H_2O (O'Nell, 1993). 103

Figura 44. Esquema utilizado para a análise de ferro(II) e ferro(III) com coluna contendo o redutor de Jones. Características do sistema: bobina coletora (comprimento = 3 m; diâmetro interno = 0,8 mm); bobina de reação (comprimento = 50 cm; diâmetro interno = 0,8 mm); vazão = 100 μL s^{-1}; cela de fluxo de quartzo (V = 107

80 μL); λ=512 nm. Solução transportadora: solução tampão ácido acético/acetato de sódio pH=4,5; Reagente 1: solução regeneradora HCl 0,1 mol L^{-1}; Reagente 2: 1,10-fenantrolina; coluna (comprimento = 3 cm; diâmetro interno = 2,5 mm).

Figura 45. Fórmula estrutural da 1,10-fenantrolina. 109

Figura 46. Influência do volume de amostra na determinação de Fe(II). Condições: V_R=100 μL; padrão de controle 3,0 mg L^{-1} de Fe(II). 110

Figura 47. Influência do volume de reagente na determinação de Fe(II). Condições: V_S= 100 μL; padrão de controle 3,0 mg L^{-1} de Fe(II). 111

Figura 48. Sinal analítico do ferro(II). Parada de fluxo com o tempo de 30 s. Condições: Volume de transportador: 2000 μL; V_R= 100 μL; V_S= 100 μL. 112

Figura 49. A: Curva analítica de Fe(II): Y=(-0,004±0,001)+(0,079±0,002)X, R=0,999, L.D.=0,04 mg L^{-1}; B: Curva analítica de Fe total: Y=(-0,0032±0,0008)+(0,0418±0,0007)X, R=0,999, L.D.=0,06 mg L^{-1}. 114

Figura 50. Ensaio da repetibilidade da curva analítica de ferro total em 3 dias utilizando-se os mesmo padrões. 115

Figura 51. Ensaio da repetibilidade da curva analítica de ferro total em 3 dias utilizando-se os mesmo padrões. 116

Figura 52. Comportamento da coluna contendo o redutor de Jones utilizando-se padrão de controle 3,0 mg L^{-1} de Fe^{2+} e Fe^{3+}. 118

Figura 53. Registro do sinal de Fe(II) e Fe total. (A) 0,05 mg L^{-1} de Fe^{2+} e 0,05 mg L^{-1} de Fe^{3+}; (B) 0,1 mg L^{-1} de Fe^{2+} e 0,1 mg L^{-1} de Fe^{3+}; (C) 0,2 mg L^{-1} de Fe^{2+} e 0,2 mg L^{-1} de Fe^{3+}; (D) 0,5 mg L^{-1} de Fe^{2+} e 0,5 mg L^{-1} de Fe^{3+}; (E) 0,7 mg L^{-1} de Fe^{2+} e 0,7 mg L^{-1} de Fe^{3+}; (F) 1,0 mg L^{-1} de Fe^{2+} e 1,0 mg L^{-1} de Fe^{3+}. 120

Figura 54. Curva analítica para Fe(II). A: curva obtida antes das modificações na seqüência de operações no SIA. Y=(-0,004±0,002)+(0,079±0,002)X, R=0,998, L.D.= 0,17 mg L^{-1}; B: curva obtida após as modificações. Y=(-0,0007±0,0003)+(0,1003±0,0005)X, R=0,999, L.D.=0,02 mg L^{-1}. 121

Figura 55. Curva analítica para Fe total. A: curva obtida antes das modificações na seqüência de operações no SIA. Y=(-0,003±0,001)+(0,0420±0,0009)X, R=0,99918, L.D.= 0,21 mg L^{-1};B: curva obtida após as modificações.Y=(-0,0006±0,0005)+(0,0789±0,0005)X, R=0,999, L.D.=0,034mg L^{-1}. 122

Figura 56. Registro do sinal de Fe(II) (A) e Fe total (B) variando-se a concentração de 1,10-fenantrolina. Condições: Amostragem sandwich (V_S = 150 μL; V_R = 100 μL); percurso analítico = 50 m; Vazão = 100 μL s^{-1}. 123

Figura 57. (A) Correlação entre os métodos SIA e o método off-line para determinação de Fe(II) e Fe total na suspensão de sedimentos. (B) Diferença entre as concentrações obtidas pelo método SIA e método off-line, plotados como função dos resultados obtidos pelo método off-line. 127

ÍNDICE DE TABELAS

Pág

Tabela 1. Sumário das técnicas analíticas e respectivos analitos determinados por SIA. 6

Tabela 2. Concentração de silicato em águas. (Robards e colaboradores, 1994). 21

Tabela 3. Principais tipos de heteropolimolibdatos (Cotton e Wilkinson, 1972). 30

Tabela 4. Influência da composição da solução de ácido ascórbico no sinal analítico do fosfato - parâmetros das curvas analíticas (Figura 11). 36

Tabela 5. Efeito de possíveis interferentes na determinação de fosfato. 56

Tabela 6. Determinação de silicato em água (mg L^{-1} em Si). 58

Tabela 7. Determinação de fosfato em extrato de sedimentos (mg kg^{-1} em P). 59

Tabela 8. Resultados da determinação de fosfato em amostras de extrato de sedimentos expressos em mg kg^{-1} em P. 60

Tabela 9. Resultados da determinação de fosfato e silicato em culturas de algas em água do mar expressos em mg L^{-1} de P e Si. 62

Tabela 10. Máximo de concentração admitida (MAC) para várias espécies em águas usada para consumo humano (Robards e colaboradores, 1994). 67

Tabela 11. Resumo das curvas analíticas. 82

Tabela 12. Rendimento da coluna de cádmio cobreada antes e depois da construção das curvas analíticas. 83

Tabela 13. Resultados obtidos na avaliação do comportamento da coluna de Cd-Cu para os diferentes padrões de controle. 85

Tabela 14. Efeito de possíveis interferentes na determinação de nitrito e nitrato. 86

Tabela 15. Interferência de sulfeto na determinação de nitrogênio total. 88

Tabela 16. Determinação de nitrito e nitrato em água. 90

Tabela 17. Distribuição do ferro no ambiente (Huebers, 1991). 100

Tabela 18. Resumo das curvas analíticas para o ferro. 116

Tabela 19. Rendimento da coluna contendo o redutor de Jones antes e depois da construção das curvas analíticas. 117

Tabela 20. Resultados obtidos na avaliação do comportamento da coluna redutora de 119

Jones.

Tabela 21. Parâmetros característicos das curvas analíticas em função da concentração de 1,10-fenantrolina. 124

Tabela 22. Efeito dos possíveis interferentes na determinação de ferro(II) e ferro(III). 125

ABREVIAÇÕES E SÍMBOLOS

FIA : Análise por Injeção em Fluxo (do inglês, Flow Injection Analysis)

SIA : Análise por Injeção Seqüencial (do inglês, Sequential Injection Analysis)

APHA: American Public Health Association

DQO : Demanda química de oxigênio

DBO : Demanda bioquímica de oxigênio

CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

UGRHI: Unidade de Gerenciamento dos Recursos Hídricos

ETE: Estação de Tratamento de Esgoto

PAR : 4-(2-piridilazo)resorcinol

PVP : Poli(vinilpirrolidina)

V_S : Volume de amostra

V_R : Volume de reagente

min: Minutos

UA: Unidades de absorbância

E_H: Potencial redox

λ: Comprimento de onda

Δ: Diferença

MAC : Máximo de concentração admitida

DDTC : Dimetilditiocarbamato

DPPS : 4,7-difenil-1,10-fenantrolinadissulfonato

DPKBH : di-2-piridil cetona benzoilhidrazona

SPA : Sulfanilamida

NED : N-(1-naftil)dietilenodiamina diclorato

MON: Matéria Orgânica Natural

L.D. : limite de detecção

DPR : desvio padrão relativo

RESUMO

O presente trabalho apresenta o desenvolvimento de metodologias baseadas no sistema de Análise por Injeção Seqüencial (SIA) para a determinação de fosfato e silicato, nitrito e nitrato, assim como a especiação de Fe(II) e Fe(III) em amostras de interesse ambiental, com ênfase para sistemas aquáticos. Para todas as determinações utilizou-se a espectrofotometria de absorção molecular na região do visível como técnica de detecção.

A determinação de fosfato e silicato foi baseada na reação de ambos os ânions com molibdato de amônio em meio ácido e posterior redução do Mo(VI) à Mo(V) com ácido ascórbico. O procedimento SIA foi desenvolvido para contornar a interferência mútua das duas espécies explorando o efeito de complexação do molibdato pelo ácido oxálico.

A determinação de nitrito foi baseada na reação de diazotação com sulfanilamida e diclorato de N-1 naftil etilenodiamina (NED), enquanto a determinação de Fe(II) baseou-se na sua complexação com 1,10 fenantrolina. A determinação de nitrato e Fe(III) foi efetuada pelas mesmas reações após a redução a nitrito e Fe(II) em colunas de cádmio e zinco amalgamado, respectivamente. A estabilidade das curvas analíticas foi avaliada em diferentes dias de trabalho, obtendo-se variações não superiores a 5% durante um período de 4 dias. O sistema de injeção seqüencial foi explorado também no sentido de regenerar as colunas redutoras no intervalo de tempo entre duas amostras.

A estabilidade das curvas analíticas, a viabilidade de regeneração das colunas redutoras e a possibilidade de realizar a amostragem através de filtração tangencial, permitindo a realização de análises com características de tempo real, sugerem que o sistema de injeção seqüencial tem grande potencial para ser implementado em estações automáticas de monitoramento da fração solúvel de indicadores de poluição em águas naturais e residuais.

ABSTRACT

The present work presents the development of analytical methodologies based on Sequential Injection Analysis (SIA) for determination of phosphate and silicate, nitrite and nitrate, as well as speciation Fe(II)/Fe(III) in environmental samples with emphasis for aquatic environments. All determinations were performed using molecular absorption spectrophotometry at the visible range of the spectrum as the detection technique.

The determination of phosphate and silicate was based on the reaction of both anions with ammonium molybdate in acidic medium, followed by reduction of Mo(VI) to Mo(V) with ascorbic acid. The SIA procedure was developed to avoid the mutual interference of both species exploiting the complexation of the molybdate by oxalic acid.

The determination of nitrite was based on the diazotation reaction with sulfanilamide and N-1 naphtyl ethylenediamine dihydrochlorine (NED), while the determination of Fe(II) were based on the complexation with 1,10 phenantroline. The determination of nitrate and Fe(III) were based on the same reactions, performed after their reduction to nitrite and Fe(II) in reducing columns containing cooperized cadmium and amalgamated zinc, respectively. The stability of the analytical curves was evaluated in different working days, in which no variations greater than 5% were observed during a period of 4 consecutive days. The sequential injection analysis was exploited to regenerate the reducing columns in the time interval between two sample.

The stability of the analytical curves, the easy and automatic regeneration of the reducing columns, as well as the possibility to perform sampling through tangential filtration, which permits the analysis to be performed in real time, are characteristics that show the potential application of the sequential injection systems in automatic stations for monitoring the soluble fraction of pollution indicators in natural waste waters.

I. INTRODUÇÃO

1. Princípios da Análise por Injeção Seqüencial

Análise por Injeção em Fluxo (FIA) é atualmente uma técnica bem estabelecida para mecanização e automação de análises químicas, com boa precisão e alta freqüência de amostragem (Ruzicka e Hansen, 1988). A técnica apresenta grande versatilidade, acomodando várias metodologias analíticas. Análises complexas que requerem o uso de vários reagentes, ou que se baseiam no monitoramento da velocidade de reação, ou ainda que envolvem métodos de separação como troca iônica, diálise, extração com solventes, etc., têm sido descritas em sua modalidade de injeção em fluxo (Fang, 1993). O uso de reagentes instáveis, gerados *in-situ*, tem sido proposto por alguns pesquisadores (Boef e Schothorst, 1986; Boef, 1989; Hansen, 1992; Pacey e colaboradores, 1986).

A mudança de um tipo de análise para outro requer a reconfiguração mecânica do sistema. Reações que envolvem vários reagentes requerem o uso de múltiplos canais de fluxo, resultando muitas vezes em sistemas que necessitam de freqüente manutenção e conseqüentemente, freqüentes recalibrações. Tais características são aceitáveis em condições de laboratório, mas tem dificultado a implantação do FIA em monitoramento ambiental *in-situ*, ou no monitoramento/controle de processos industriais (Christian, 1994; Ruzicka e Marshall, 1990).

No sentido de vencer estas dificuldades, Ruzicka e Marshall (1990) propuseram a técnica de Injeção Seqüencial (SIA). Nesta nova técnica o equipamento consiste, basicamente, de uma bomba peristáltica ou de pistão, um único canal de fluxo e uma válvula seletora, conforme esquematizado na Figura 1.

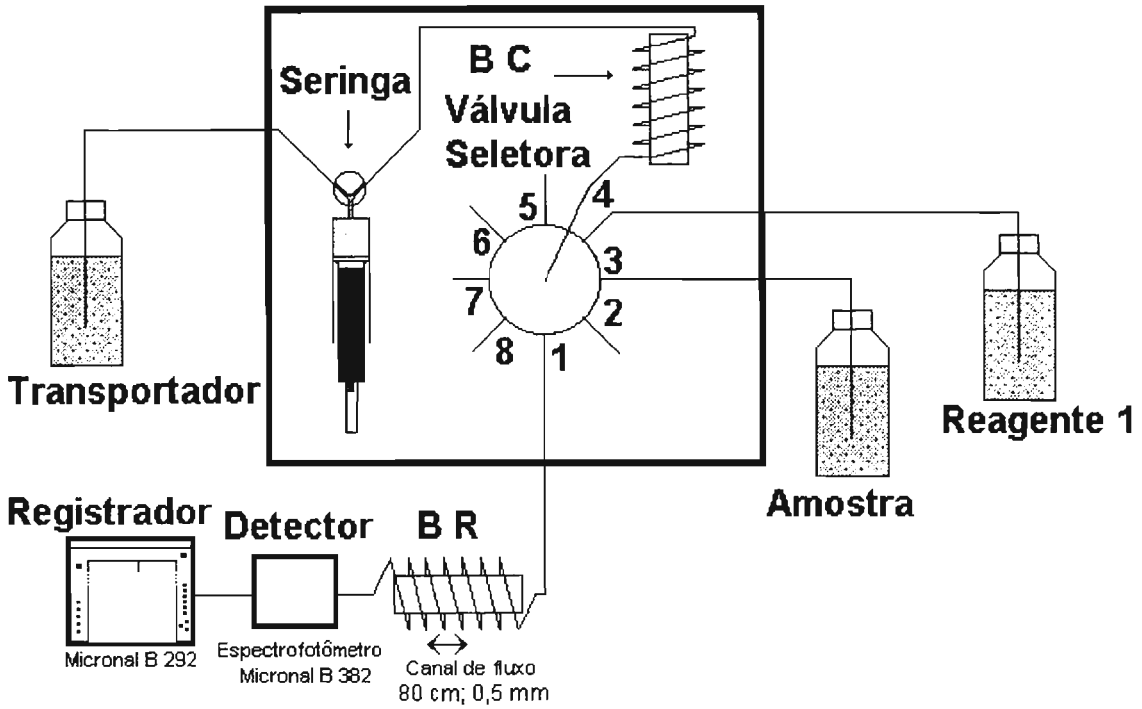


Figura 1. Sistema básico de Injeção Seqüencial. BC: bobina coletora; BR: bobina de reação.

O componente principal do sistema SIA é a válvula seletora que é usada no lugar da válvula de injeção convencional. Esta válvula seletora contém várias portas (usualmente entre 8 e 10), sendo que uma delas (denominada porta comum) tem acesso a cada uma das outras, individualmente, através da rotação da válvula. Esta porta é conectada à bomba peristáltica ou à seringa de uma bomba de pistão através da chamada bobina coletora, que tem a função de armazenar zonas de amostra e reagentes sem permitir que estes atinjam a seringa ou o reservatório da solução transportadora. As outras portas da válvula seletora são conectadas a reagentes, amostra, padrões, detector, reservatório para acúmulo de resíduos, etc. A realização de uma análise baseada no uso de um único reagente pode ser resumida como:

1- Inicialmente o sistema é lavado com solução transportadora. Os canais usados para aspirar reagente (porta 4) e amostra (porta 3) são preenchidos com a respectiva solução e o excesso é expelido através de uma porta auxiliar (porta 6).

2- A válvula seletora gira até a porta 4, conectando-a com a bobina coletora do sistema de bombeamento, que então aspira para o interior desta bobina um volume pré-estabelecido de reagente 1. No caso de bombas peristálticas, o volume é determinado pelo tempo de movimento da bomba, pela velocidade de rotação, assim como pelo diâmetro interno dos tubos usados.

3- A válvula gira então até a porta 3. Salienta-se que quando a válvula está girando, o sistema de bombeamento permanece parado, evitando-se problemas de pressão e formação de bolhas. Aspira-se um volume de amostra para a bobina coletora. Neste ponto tem-se adjacentes as zonas de reagente e amostra, que foram seqüencialmente aspirados para a bobina coletora.

4- Um novo movimento da válvula coloca em contato a bobina coletora e o detector (acoplado à porta 1). Injeta-se então as zonas de amostra e reagente, através de um reator, até o detector. Simultaneamente, inicia-se a aquisição de dados. Neste caminho ocorre a interdispersão de amostra e reagente e, conseqüentemente, a reação de interesse. O sinal transiente obtido é similar àquele obtido em FIA convencional. Se existe interesse em estudar cinética da reação, pode-se parar o fluxo quando a zona interdispersa atinge o detector.

O consumo de reagentes e amostra no sistema SIA é bem reduzido em relação ao FIA. Isto se deve a programação do sistema de propulsão, que aspira quantidades pré-determinadas de amostra, reagentes e solução transportadora somente no momento da análise. No sistema FIA convencional isto não ocorre, uma vez que a utilização da bomba peristática promove o fluxo contínuo das soluções utilizadas. Vale lembrar que no sistema SIA se faz necessário o uso de um computador interfaceado ao sistema de bombeamento e à válvula seletora. Um software apropriado é utilizado para controlar a direção, velocidade e tempo de rotação da bomba, assim como a posição da válvula giratória e aquisição de dados do detector. A alta precisão da bomba de pistão, controlada pelo software, faz do SIA uma ferramenta adequada para medidas na modalidade "stopped-flow", que permite o acompanhamento da velocidade da reação (Ruzicka e Hansen, 1990; Christian, 1994; Gubelli e colaboradores,1991).

Um estudo comparativo sobre o desempenho de bombas peristálticas e de pistão em sistemas SIA foi realizado por Ivaska e Ruzicka (1993). Apesar de ambos os sistemas de propulsão serem adequados à utilização em SIA, a utilização da bomba de pistão mostra vantagens em relação a bomba peristáltica, pois confere maior robustez ao sistema, uma vez que não contém elementos deformáveis como os tubos comumente utilizados nas bombas peristálticas. Por outro lado, bombas peristálticas são de menor custo e maior disponibilidade comercial do que bombas de pistão. Recentemente tem-se demostrado a viabilidade do emprego da gravidade para direcionar fluxos em sistema SIA (Vieira e colaboradores, 2000). Diante das características de maior robustez, o sistema SIA viabiliza trabalhos envolvendo monitoramento ambiental *in-situ* e/ou controle de processos, permitindo sua utilização por períodos de tempo mais longos sem necessidade de recalibrações.

A mistura das zonas de reagentes e amostra no fluido transportador é promovida através da reversão da direção do fluxo. No sistema FIA, assim como métodos cromatográficos, a utilização do fluxo unidirecional é fator primordial para o desenvolvimento da análise. Porém, em cromatografia o fluxo unidirecional tem por finalidade a separação dos componentes presentes no analito, enquanto no sistema FIA o objetivo visado é a conversão química reprodutível do analito em uma segunda espécie possível de ser detectada. Para alcançar-se tal objetivo, o fluxo laminar é fator primordial para a obtenção da reprodutibilidade da dispersão da amostra injetada no transportador, e também pela chegada da zona reacional ao detector. Isto implica na boa reprodutibilidade do sinal e, conseqüentemente, na veracidade do resultado obtido. No sistema de injeção seqüencial, que é necessariamente de linha única, o fluxo é bidirecional, sendo que os movimentos avante e reverso da bomba de pistão promovem em parte a dispersão necessária levando-se à formação do produto da reação e possibilitando a detecção da espécie de interesse (Ruzicka e Marshall, 1990). Assim como no FIA, a partir do momento da injeção da zona de reação em direção ao detector a dispersão é dada pelos seus componentes axial e radial, sendo este último implementado pelas mudanças freqüentes de direção do fluxo na bobina enrolada, geralmente de geometria helicoidal.

2. Algumas Aplicações da Análise por Injeção Seqüencial

A utilização do sistema de Injeção Seqüencial já encontra-se muito difundida na área de determinações analíticas. Nestes dez anos de existência do SIA, já são encontrados na literatura artigos de revisão envolvendo cerca de 100 trabalhos publicados (Barnett e colaboradores, 1999; Pasekova e colaboradores, 1999; Taljaard e van Staden, 1998). A Tabela 1 mostra um sumário de alguns trabalhos envolvendo diversas técnicas analíticas na determinação de uma vasta gama de analitos em vários tipos de matrizes utilizando-se o sistema SIA.

No que diz respeito ao monitoramento ambiental, uma grande variedade de espécies químicas tem sido estudadas. Recentemente Cerdà e colaboradores (1999) evidenciaram as vantagens do sistema SIA, especialmente como ferramenta no monitoramento ambiental. Em água residual, é proposto o monitoramento da demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), amônio, nitrato, nitrito, nitrogênio total, ortofosfato, detergentes, etc. Para cada espécie a ser determinada utiliza-se reagentes específicos que são dispostos nas diversas portas existentes na válvula seletora, utilizando-se uma seqüência de operações pré-

Tabela 1. Sumário das técnicas analíticas e respectivos analitos determinados por SIA.

Analito	Técnica Analítica	Matriz	Faixa Linear	Ref.
PO_4^{3-} e SiO_3^{2-}	Espectrofotometria	Ambiental e Meio de Cultura	0,2 – 7,0 e 5,0 – 50 mg L^{-1}	Galhardo e Masini, 200(
PO_4^{3-} e SiO_3^{2-}	Espectrofotometria	Água residual	0-12 e 0-30 mg L^{-1}	Mas-Torres et al., 1997
PO_4^{3-}	Espectrofotometria	Fermentação	0,1-30 mmol L^{-1}	Masini et al., 1995
PO_4^{3-}	Espectrofotometria	Alimentos	20-400 mg L^{-1}	Oliveira et al., 1998
PO_4^{3-}	Espectrofotometria	Água natural e residual	0-18, 0-0,4 e 0-4 mg L^{-1}	Muñoz et al., 1997
PO_4^{3-}	Espectrofotometria	Água natural e residual	0-70 mg L^{-1}	van Staden e Taljaaed, 1998
SO_4^{2-}	Espectrofotometria	Água de garrafa e subterrânea	0-500 mg L^{-1}	Rius et al., 1997
SO_4^{2-}	Espectrofotometria	Água e efluente industrial	10-200 mg L^{-1}	van Staden e Taljaard, 1996
SO_4^{2-}	Espectrofotometria	Água residual	10 – 1000 mg L^{-1}	Lapa et al., 2000
S^{2-}	Espectrofotometria	Sedimentos	0,05-2 mg L^{-1}	Silva et al., 2001
NO_2^-	Espectrofotometria	Água natural	13,4-160 e 0,83-20 ng L^{-1}	Miró et al., 2000
NO_2^-	Espectrofotometria	Carnes curadas	-	van Staden e van der Merwe, 1998b
NO_2^-	Espectrofotometria	Águas e efluentes	0-5,0 mg L^{-1}	van Staden e van der Merwe, 1998a
NO_2^- e NO_3^-	Espectrofotometria	Água residual	0-400 μmol L^{-1}	Oms et al., 1995
NO_2^- e NO_3^-	Espectrofotometria	Água residual	0-220 e 0-240 μmol/L	Cerdà et al., 1996
NO_2^- e NO_3^-	Espectrofotometria	Águas	0,5-40 e 2-100 μmol L^{-1}	Cerdà et al., 1998
NH_4^+	Condutometria	Água residual	0-80 mg L^{-1}	Oms et al., 1996a
NH_4^+	Espectrofotometria	Água residual e extrato de aerosol atmosférico	0-60 mg L^{-1}	Oms et al., 1996b
NH_3	Espectrofotometria	Ar	0,15-4 μg	Luo et al., 1995
NH_3	Espectrofotometria	Água e efluente industrial	0-50 mg L^{-1}	Van Staden e Taljaard, 1997
NH_4^+ e NH_3	Espectrofotometria	Meio de fermentação	0,05-350 mmol L^{-1}	Lukkari et al., 1993
F^-	Potenciometria – íon seletivo	Creme dental	10^{-8}-10^{-6} mol/L	van Staden et al., 2000
Cl^- e F^-	Potenciometria	Água	20-500 e 0,5-200 μg mL^{-1}	Alpízar et al., 1996
Cl^-	Condutimetria	Leite	$0,5.10^{-2}$-$1,5.10^{-2}$ mol L^{-1}	Silva et al., 1999

SCN^-	Espectrofotometria	Águas Residuárias	2,0-150,0 mg L^{-1}	van Staden e Botha, 2000
Ca^{2+}	Espectrofotometria	Água	5-500 mg L^{-1}	Nyman e Ivaska, 1995
Mg^{2+}	Fluorimetria	Águas naturais	1,2 mg L^{-1}	Armas et al., 2000
Mg^{2+} e Ca^{2+}	Espectrofotometria	Água mineral e residual	1-20 e 2-40 mg L^{-1}	Gómez et al., 1995
Mg^{2+} e Ca^{2+}	EAA-chama	Água mineral	0,03-10 e 0,58-200; 0,03-1,5 e 0,80-50,0 mg L^{-1}	Araújo et al., 1998
Mg^{2+} e Ca^{2+}	Espectroscopia Mid-IR	Água dura	0-200 nmol	Pérez-Ponce e Lendl, 2000
Fe^{2+} e NO_2^-	Espectrofotometria	Amostras sintéticas	0,7-11,3 e 1,02-7,15 mg L^{-1}	Estela et al., 1996
Fe^{3+}	Espectrofotometria	Águas naturais	-	Gracia et al., 1997
Fe^{3+}	EAA	Água natural	0,01-1,2 mg L^{-1}	Rubí et al., 1997
Fe^{3+}	Espectrofotometria	Fármacos	0,50-20 mg L^{-1}	Araújo et al., 1997
Fe^{3+}	Espectrofotometria	Fármacos	100-1000 mg L^{-1}	van Staden et al., 1997
Pb^{2+}	EAA-Chama	Água natural	-	Araujo et al., 1999
Cu^{2+}	Espectrofotometria	Alimentos	0,5-5,0 mg L^{-1}	van Staden e Botha, 1999
Cu, Pb, Cd e Zn	Voltametria	Sedimento	0,01-0,2; 0,01-0,4; 0,01-0,4 e 0,05-0,2 mg L^{-1}	Silva e Masini, 2000
Cr^{+6}	Espectrofotometria	Água residual banho galvânico	0,2-2 mg L^{-1}	Oliveira e Masini, 1998
Cr^{3+} e Cr^{6+}	Espectrofotometria		0-100 μg L^{-1}	Luo et al., 1997
Hg^{2+}	EAA-Geração de vapor	Água do mar	-	Ma et al., 1999
Co^{2+} e Ni^{2+}	Espectrofotometria	Água e extrato de solo	0-10 mg L^{-1}	Taljaard e van Staden, 1998
Açúcares redutores	Espectrofotometria	Vinhos	2-25 e 20-140 g L^{-1}	Araújo et al., 2000
Açúcares, álcoois e ácidos orgânicos	Espectroscopia FTIR	Vinhos		Schindler et al., 1998
Glicerol e 2,3-butadieno	Potenciometria	Vinhos	5-15 e 0,33-13,35 g L^{-1}	Luca et al., 1998
Procaína, Benzocaína e Tetracaína	Quimiluminescência	Anestésicos	0,5 -50; 0,5 - 25 e 0,2 – 25 μg L^{-1}	Paseková e Polásek, 2000
Titulação	Espectrofotometria	Vitamina C	30-200 mg L^{-1}	Sultan et al., 1999a

Titulação de ácidos	Espectrofotometria	Efluentes		
S e R-captopril	Amperometria (Biosensor)	Controle de processo	0,4-1,6 e 0,12-0,95 μmol L^{-1}	Stefan et al., 2000
Ciprofloxacin e Norfloxacin	Espectrofotometria	Fármacos	50-500 e 50-400 mg L^{-1}	Suliman e Sultan, 1996
Cloreto de Prometazina	Espectrofotometria	Fármacos	50-400	Sultan e Desai, 1997
Ibuprofen	Espectrofotometria	Fármacos	0-0,12 e 0-0,35g/L	Liu et al., 1998
Vitamina C	Espectrofotometria	Fármacos	20-000	Sultan e Desai 1998
Aspirina, Fenacetina e Cafeína	Espectrofotometria	Fármacos		Liu et al., 1999
Triiodotironina	Quimiluminescência		-	Dreveny et al., 1999
Bromoazepan	Espectrofotometria	Fármacos	$5x10^{-4}$-$1,5x10^{-3}$ mol dm^{-3}	Sultan e Suliman, 1996
Bromoazepan	Espectrofotometria	Fármacos	300-1100 mg L^{-1}	Sultan et al., 1999b
Trimeprazina e Perfenazina	Espectrofotometria	Fármacos	50-400 e 50-500 mg L^{-1}	Sultan et al., 1995
TNT	Espectrofotometria	Extrato de solo	-	Echols et al., 1999
Digoxina (imunoensaio)	Quimiluminescência	-	-	Dreveny et al., 1998
Aminoácidos	Espectrofotometria	Alimento	0-1,0.10^{-2} mol L^{-1}	Van Staden e McCormack, 1998
Warfarin	Fluorimetria	Água	0,1-1 μg mL^{-1}	Tang e Rowell, 1998
Morfina	Quimiluminescência	Água e processo	$2,5x10^{-6}$-$3,0x10^{-5}$ mol L^{-1}	Barnett et al., 1996
Sr^{90} e Y^{90}	Análise por ativação com neutrons	Àgua mineral e Água Térmica	-	Grate et al., 1996
Sr^{90}	Radiometria	Efluente nucle e lixo nuclear vitrificado		Grate et al., 1999
Tc^{99}	Centilação	Resíduo nuclear envelhecido	-	Egorov et al., 1998

estabelecidas gerenciadas pelo programa do computador. No que diz respeito a determinação de nutrientes em água natural e residual, vários trabalhos tem sido publicados principalmente para o estudo das várias formas de espécies de nitrogênio e fosfato (ortofosfato). A importância da determinação e monitoramento destas espécies em rios e reservatórios está relacionada com o crescimento de algas que prejudicam a qualidade da água destinada ao consumo público (Robards e colaboraores,1994). Para a determinação seqüencial de nitrito e nitrato, o reagente de Griess-Ilosvay tem sido amplamente utilizado (van Staden e van der Merwe, 1998a). A especiação de nitrito e nitrato tem sido obtida através da redução de nitrato a nitrito utilizando-se micro-coluna de cádmio cobreado (Cerdà e colaboradores, 1998) ou o reagente sulfato de hidrazina (Oms e colaboradores, 1995). Para a quantificação de amônia, sistema de membrana difusora de gás tem mostrado grande eficiência (Luo e colaboradores, 1995). A determinação de fosfato tem sido realizada empregando-se o reagente molibdato de amônio. A interferência da espécie silicato nesta reação é muito conhecida (Chalmers e Sinclair, 1966). Ambas as espécies formam heteropoliácidos com molibdênio que absorvem no mesmo comprimento de onda. Diante deste fato, a determinação simultânea de fosfato e silicato vem sendo muito estudada nas técnicas de injeção em fluxo. No que diz respeito a SIA, determinação seqüencial de fosfato e silicato foi realizada utilizando-se uma zona contendo molibdato de amônio, amostra, ácido oxálico, amostra e vanadomolibdato (Mas-Torres e colaboradores, 1997). Com isto tem-se a determinação de fosfato com o reagente vanadomolibdato e a posterior determinação de silicato com o reagente molibdato de amônio. A diferença de pH entre os reagentes utilizados permite que a formação do fosfomolibdato seja mais rápida que a formação do silicomolibdato, além da interferência do fosfato na determinação de silicato ser contornada com a utilização do ácido oxálico. Outra forma de eliminar-se a interferência mútua entre as espécies, é através do controle da formação do fosfomolibdato e do silicomolibdato, levando-se em conta a cinética de formação de ambas as espécies em conjunto com a utilização de ácido oxálico como agente complexante (Galhardo e Masini, 2000).

Íons cálcio e magnésio também foram determinados em água residual (Gómez e colaboradores, 1995), utilizando-se o reagente cromogênico 4-(2-piridilazo)rezorcinol (PAR), com o qual são formados os complexos de Mg-PAR e Ca-PAR que são determinados espectrofotometricamente.

A utilização do sistema SIA tem abrangido outros tipos de matrizes como a análise de alimentos. Devido a sua importância no controle de doenças no gado, íons cloreto foram

determinados em amostra de leite, utilizando-se detecção condutométrica (Silva e colaboradores, 1999). Determinação de nitrito em defumados é muito difundida devido ao seu grande potencial carcinogênico e foi realizada utilizando-se o reagente de Griess-Ilosvay em sistema SIA (van Staden e van der Merwe, 1998b).

A determinação de metais em sistema SIA também vem sendo muito estudada. Sua aplicação tem englobado amostras ambientais, água residual, alimentos, ligas metálicas, entre outras. Araújo e colaboradores (1999) propuseram a determinação de chumbo em água natural através da pré-concentração da amostra utilizando-se o polímero poli(vinilpirrolidina) (PVP). Assim como o chumbo, crômio(VI) também possui grande importância ambiental por tratar-se de um metal pesado de grande toxicidade. Sua determinação foi proposta através da detecção do estado transiente da reação entre o Cr(VI) e a brucina, alcalóide que quando oxidado pelo Cr(VI) em meio ácido, contendo ácido oxálico como catalisador, produz o intermediário brucicromo que possui grande absortividade molar na faixa de 510-540 nm (Oliveira e Masini, 1998). Neste trabalho, os autores evidenciam a versatilidade do sistema SIA mostrando o emprego da diluição in-line que permite a diluição da amostra em uma bobina auxiliar utilizando-se três parâmetros: volume da amostra, V_S, volume de transferência, V_T, e volume de análise, V_A. O volume V_T consiste no volume de amostra transferido à bobina de diluição que determinará o fator de diluição, ou seja, a dispersão da amostra na solução transportadora contida na bobina de diluição.

Para a determinação de fósforo total em amostras de alimentos, também tem-se empregado o tratamento de amostra in-line, onde utilizou-se uma bomba de digestão no interior de um forno de micro-ondas. Com a utilização do fluxo reverso tornou-se possível bombear a amostra após seu tratamento para a bobina coletora e dar prosseguimento à análise (Oliveira e colaboradores, 1998). O tratamento de amostra in-line, diluição, pré-concentração, filtração entre outros, viabiliza o monitoramento ambiental e de processos, uma vez que elimina-se a manipulação da amostra minimizando erros provenientes do tratamento destas. A determinação de outros metais também tem sido estudada em sistema SIA.

Cobre(II) tem sido determinado em amostras de água e alimentos utilizando-se o reagente dimetilditiocarbamato (DDTC) (van Staden e Botha, 1999).

Cobalto(II) e níquel(II) também são espécies de grande importância ambiental. O cobalto faz parte do complexo vitamínico B_{12} e é essencial para a fixação de nitrogênio pelos microorganismos. O níquel é um metal componente da enzima urease, essencial para plantas, e alguns de seus compostos causam reações alérgicas e outros ainda são carcinogênicos. A

determinação simultânea de ambos os íons metálicos foi realizada utilizando-se o reagente complexante 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) (Taljaard e van Staden, 1998) onde foram medidas as absorbâncias dos complexos formados.

Ferro(II) tem sido determinado utilizando-se o reagente 1,10-fenantrolina em amostras de águas naturais (Estela e colaboradores, 1996; Vieira e colaboradores, 1998). Estes estudos envolvendo a determinação de Fe(II), mostram estratégias de análise em sistema SIA. Estela e colaboradores,1996 propuseram a utilização da técnica sandwich (Alonso e colaboradores, 1987) e grandes volumes de amostra na determinação de espécies iônicas por SIA. Para tanto aplicou-se a metodologia proposta na determinação de ferro(II) e nitrito utilizando-se os reagentes colorimétricos 1,10-fenantrolina e reagente de Griess-Ilosvay respectivamente. A utilização da técnica sandwich em SIA consiste no emprego de grandes volumes de amostra tendo por finalidade a separação física dos reagentes utilizados para as duas diferentes reações químicas. Neste trabalho, foi utilizado uma zona de 2000 μL de amostra contendo as espécies Fe(II) e nitrito entre 150 μL de 1,10-fenantrolina e 75 μL do reagente de Griess-Ilosvay. Diante do grande volume de amostra utilizado entre pequenos volumes de reagentes, torna-se possível a determinação de Fe(II) e nitrito devido a ocorrência das zonas de dispersão entre reagente e amostra, levando a formação de duas zonas de reação independentes nas duas extremidades da grande zona de amostra (Cerdà e colaboradores, 1998; Mas-Torres e colaboradores, 1997). Vieira e colaboradores (1998) demostraram através da determinação de ferro(II) com o reagente 1,10-fenantrolina, a possibilidade da técnica SIA atingir maior sensibilidade, utilizando-se em conjunto, técnicas de amostragem binária, amostragem sandwich e fluxo monosegmentado.

O sistema de Injeção Seqüencial não só tem despertado o interesse para determinações e estudos de espécies inorgânicas, como também para a determinação de compostos orgânicos tais como fármacos, aminoácidos, entre outros. A determinação da vitamina C em fármacos foi realizada empregando-se a técnica de titulação espectrofotométrica em sistema em fluxo, baseada na reação de oxidação de cério(IV) na presença de ácido sulfúrico (Sultan e colaboradores, 1999a). Bromazepam também tem sido determinado por reação de complexação com ferro(II) em meio de ácido clorídrico (Sultan e colaboradores, 1999b). Determinação de isoprofeno e determinação simultânea de aspirina, fenacetina e cafeína foram propostos com o objetivo de monitorar o perfil de dissolução destes compostos em comprimidos. A utilização da filtração on-line foi empregada como forma de diminuir o consumo de amostra uma vez que a zona de

amostra utilizada para a análise retorna para o recipiente original limpando o filtro utilizado (Liu e colaboradores, 1998 e 1999). Determinação de aminoácidos foi realizada utilizando-se como reagente o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico, cujo produto de reação é monitorado em 350 nm (van Staden e McCormack, 1998).

Pollema e colaboradores (1992) propuseram um novo modo de análise no sistema SIA utilizando-se micro esferas magnetizadas aplicado a imunoensaio (SIIA). O uso destas micro esferas (beads) de dimensões microscópicas tem sido muito difundido como uma forma de pré-concentração, além de propiciar uma superfície sempre renovada entre outras vantagens. Um outro tipo de cela especialmente construído e adaptado para o uso deste tipo de sistema de pré-concentração foi citado na literatura como cela de jato circular (jet ring cell) (Ruzicka e colaboradores, 1993). Nesta cela, uma suspensão contendo as micro-esferas são aspiradas por um canal central em direção perpendicular a uma superfície óptica plana (detector). A solução escapa através da fenda entre a superfície óptica e um anel de borracha, ficando as micro-esferas retidas juntas a superfície de detecção. Com a aplicação do fluxo reverso no sistema de Injeção Seqüencial, as micro-esferas são aspiradas e drenadas para o descarte. Além das micro-esferas funcionarem como unidade de pré-concentração, uma outra vantagem é o fato da constante renovação da camada junto ao detector aliado ao fato das micro-esferas poderem ser recuperadas (lavadas) após seu uso. Vários trabalhos envolvendo temas desde imunoensaios até determinação de analitos de interesse ambiental (Oliveira e colaboradores, 2000) têm sido publicados na literatura fazendo uso deste tipo de sistema.

3. Nutrientes e o Meio Ambiente

Algas e a maioria das plantas aquáticas são fontes primárias de alimento na complexa cadeia alimentar em ambientes de águas naturais. Essas espécies requerem nutrientes para seu crescimento. Por exemplo, diatomáceas e algas verdes precisam de 18 elementos nutricionais, e destes, hidrogênio, carbono, oxigênio, potássio, sódio, magnésio, cálcio e enxofre, estão usualmente em grande quantidade nas águas de superfície. Dos 10 elementos remanescentes, nitrogênio e fósforo são indispensáveis, e nem sempre disponíveis em quantidades suficientes. Portanto, a biodisponibilidade de nutrientes, em particular do fósforo e nitrogênio, determina a velocidade de crescimento de plantas e algas, além de determinar a biomassa que eles podem gerar. Especiação em sistemas aquáticos tem se tornado altamente importante devido as

características de comportamento ambiental de um elemento, como por exemplo, biodisponibilidade, bioacumulação e transporte biogeoquímico, que são muitas vezes criticamente dependentes destas formas físico-químicas (Robards e colaboradores, 1994).

Outro fator que está intrinsecamente ligado a quantidade de nitrogênio e fósforo disponíveis no ambiente é o processo de *eutrofização*. Para um ambiente aquático atingir condições de eutrofização, a concentração de nutrientes deve estar alta o suficiente para promover o crescimento exagerado de algas. A medida que a população de algas e outras plantas aquáticas aumentam, o consumo de oxigênio dissolvido também aumenta, ocorrendo uma diminuição deste ao longo da profundidade do lago ou rio. A extensa camada de fitoplâncton impede a entrada de luz no ambiente dificultando a fotossíntese das plantas bentônicas. O oxigênio produzido durante a fotossíntese das plantas de superfície pode as vezes ser observado na forma de bolhas de ar escapando para a atmosfera em decorrência da super-saturação. Portanto, estas plantas não conseguem fornecer oxigênio para as camadas mais profundas (Nebel e Wright, 1993).

A morte de micro-organismos (fitoplâncton) gera detritos que são depositados no fundo iniciando as atividades das bactérias decompositoras. Estas bactérias consomem oxigênio dissolvido nas camadas profundas, sendo responsáveis pela mortandade de peixes e outros animais aquáticos que aí vivem. Entretanto a ausência de oxigênio não atinge a vida destas bactérias que podem iniciar atividades anaeróbicas. Neste estágio, o fundo do rio ou lago adquire características de um ambiente anóxido (Nebel e Wright, 1993). A Figura 2 exemplifica as principais características que diferenciam um ambiente pobre em nutrientes (oligotrófico) de um ambiente eutrofizado.

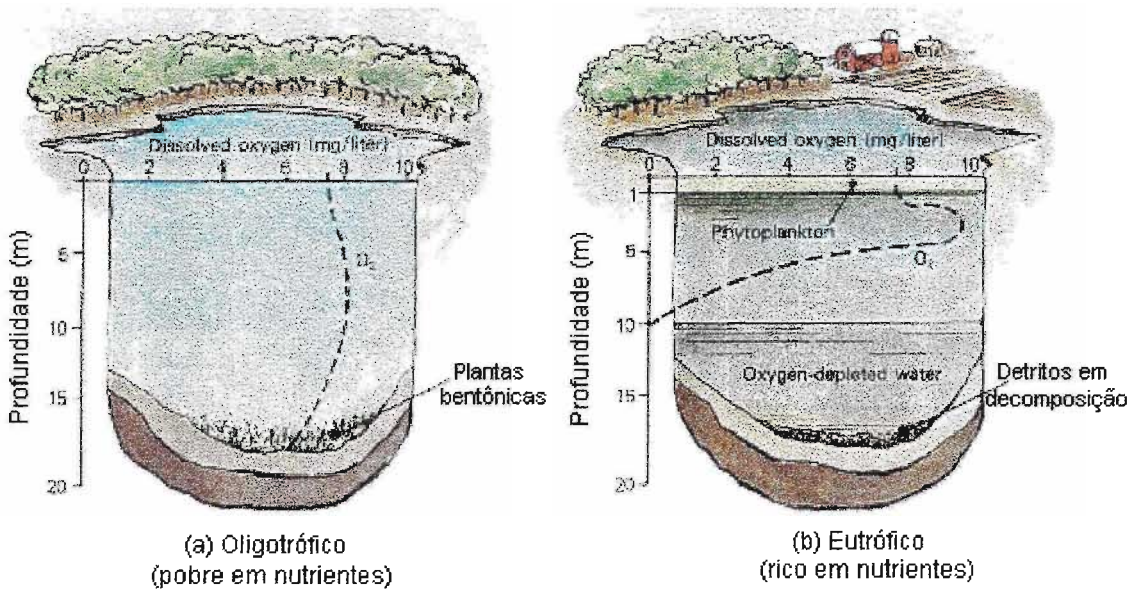


Figura 2. Típicos níveis de oxigênio dissolvido em ambiente oligotrófico (a) e eutrofizado (b) (Nebel e Wright, 1993).

4. Qualidade das Águas – Estações de Monitoramento da CETESB

A crescente expansão demográfica e industrial observada nas últimas décadas trouxe como conseqüência o comprometimento das águas de rios, lagos e reservatórios. A falta de recursos financeiros nos países em desenvolvimento tem agravado esse problema pela impossibilidade da aplicação de medidas corretivas para reverter a situação.

As reservas de água doce disponíveis na natureza são limitadas e algumas vezes sua obtenção torna-se difícil devido ao alto custo das formas menos convencionais, como é o caso da água do mar e das águas subterrâneas. Portanto, a preservação, o controle e a utilização racional das águas doces superficiais deve ser prioridade.

A CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) iniciou em 1974 a operação da Rede de Monitoramento da Qualidade das Águas Interiores (rios e reservatórios). Este monitoramento é realizado em 135 estações de qualidade distribuídas ao longo de 22 Unidades de Gerenciamento dos Recursos Hídricos (UGRHIs), em que foi dividido o Estado de São Paulo através da Lei Estadual N° 7.663 de dezembro de 1991.

Dentre os objetivos da Rede de Monitoramento da CETESB podemos citar: (a) avaliar a evolução da qualidade das águas interiores para cada ponto de amostragem; (b) propiciar o

levantamento das áreas prioritárias para o controle da poluição das águas; (c) subsidiar o diagnóstico da qualidade das águas doces utilizadas para o abastecimento público e outros usos; (d) dar subsídio técnico para a elaboração dos Relatórios de Situação dos Recursos Hídricos, realizados pelos Comitês de Bacias Hidrográficas; (e) identificar trechos de rios onde a qualidade da água possa estar mais degradada, possibilitando ações preventivas e de controle da CETESB, com a construção de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) por parte do município responsável pela poluição ou a adequação de lançamentos industriais.

A boa gestão da água deve ser objetivo de um plano que contemple os múltiplos usos desse recurso, desenvolvendo e aperfeiçoando as técnicas de utilização, tratamento e recuperação de nossos mananciais.

A poluição das águas é gerada por:

(1) efluentes domésticos (poluentes orgânicos biodegradáveis, nutrientes e bactérias);

(2) efluentes industriais (poluentes orgânicos e inorgânicos, dependendo da atividade industrial);

(3) carga difusa urbana e agrícola (poluentes advindos da drenagem destas áreas: fertilizantes, defensivos agrícolas, fezes de animais e material em suspensão).

A Rede de Monitoramento realiza coleta de amostras destinadas às determinações de vários parâmetros físico-químicos e microbiológicos que caracterizam a qualidade das águas. A seguir estão apresentados aqueles de maior representatividade:

- Alumínio
- Bário
- Cádmio
- Chumbo
- Cloreto
- Clorofila-a / Feofitina-a
- Cobre
- Coliformes fecais
- Coloração da água
- Condutividade específica
- Manganês
- Níquel
- Nitrogênio amoniacal
- Nitrogênio (Kjeldahl) total
- Nitrogênio (nitrato)
- Nitrogênio (nitrito)
- Oxigênio dissolvido
- Ortofosfato solúvel
- pH
- Resíduo não filtrável

- Cromo total
- Demanda bioquímica de oxigênio
- Demanda química de oxigênio
- Fenóis
- Ferro total
- Fósforo total
- Resíduo total
- Surfactantes
- Temperatura da água
- Temperatura do ar
- Turbidez
- Zinco

A Figura 3 exemplifica a estação de monitoramento de qualidade de águas da CETESB.

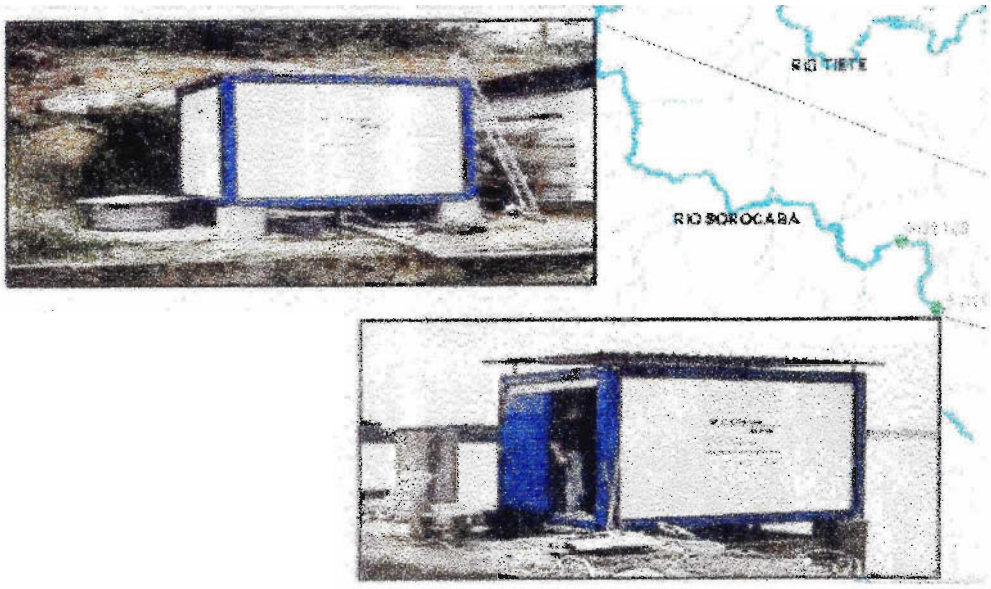


Figura 3. Estação de Monitoramento de Qualidade de Águas.

Nas estações de monitoramento de qualidade de águas, realizam-se somente as determinações de alguns parâmetros físico-químicos como temperatura, oxigênio dissolvido (OD), pH, E_H, condutividade específica, coloração e turbidez que são obtidos através do uso de eletrodos e sensores fornecendo os resultados rapidamente. Indicadores de poluição das águas tais como, fosfato, nitrito e nitrato entre outros, cujas determinações dependem de reações químicas envolvendo o uso de diversos reagentes, não são realizadas nas estações de monitoramento. Porém, sabe-se da importância em efetuar-se tais determinações *in loco* devido a geração de informações que contribuam para um melhor gerenciamento da água (CETESB, 2000).

II. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de métodos analíticos empregados no sistema de Injeção Seqüencial com detecção espectrofotométrica para a determinação da fração reativa de indicadores de poluição em águas naturais. O sistema de Injeção Seqüencial foi explorado de modo a promover a automatização de etapas de pré-tratamento de amostras tais como filtração e conversão do analito na sua forma mais facilmente detectável.

As espécies indicadoras de poluição em ambientes aquáticos estudadas foram: fosfato, silicato, nitrito, nitrato, ferro(II) e ferro(III). A determinação destes íons foi baseada nos métodos oficiais do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater - (APHA) os quais foram adaptados e otimizados para o sistema de Injeção Seqüencial (SIA).

Objetivou-se obter informações que permitam direcionar o desenvolvimento de sistemas SIA, caracterizado por sua robustez e baixo custo, para o monitoramento ambiental *in-situ* de tais indicadores de poluição, evitando-se desta forma possíveis alterações da matriz devido a complexa dinâmica que envolve o meio ambiente. Para tanto foi estudada a utilização de um sistema de filtração tangencial acoplado no sistema SIA para algumas amostras, o que permitiria a determinação em tempo real dos íons previamente estudados.

III. DETERMINAÇÃO DE FOSFATO E SILICATO

1. INTRODUÇÃO

Fósforo ocorre nos ambientes aquáticos em várias concentrações tanto na forma dissolvida como no material particulado, estando presente nas formas orgânica e inorgânica. Sua concentração pode variar abaixo de 0,01 mg L^{-1}, para mais de 1 mg L^{-1} em águas poluídas e ambientes eutrofizados (Robards e colaboradores, 1994).

As fontes de fósforo em ambientes aquáticos podem ser naturais e artificiais. Dentre as fontes naturais estão as rochas das bacias de drenagem como fonte básica, material particulado da atmosfera e decomposição de organismos de origem alóctone. Já as fontes artificiais provém dos esgotos domésticos e industriais (incluindo principalmente a presença de detergentes), águas tratadas, os fertilizantes agrícolas lixiviados e o material particulado de origem industrial contido na atmosfera.

As formas de fósforo mais comumente determinadas em sistemas aquáticos são o fósforo dissolvido, o fósforo total dissolvido e o fósforo particulado. As frações de fósforo orgânico e inorgânico ocorrem tanto nas formas de fósforo dissolvido quanto particulado. Considera-se o fósforo dissolvido como sendo uma medida de ortofosfato (PO_4^{3-}), enquanto que as frações de fósforo total dissolvido contém além de ortofosfato, espécies solúveis tais como fosfatos condensados do qual faz parte PO_4^{3-}, pirofosfato ($P_2O_7^{4-}$), polímeros cíclicos (metafosfatos) e polímeros lineares (polifosfatos). Nesta última fração há também a ocorrência de fosfatos orgânicos e espécies de fósforo associadas a substâncias húmicas.

A importância do sedimento como fonte ou depósito de fósforo da água tem sido discutida com ênfase sobre a qualidade e quantidade de fósforo do sedimento e os processos que afetam sua troca entre a água e o fundo. As condições ambientais predominantes no corpo d'água regulam a retenção ou liberação de fósforo dos sedimentos de fundo. Portanto, faz-se necessária a determinação da relação entre a composição do sedimento e fosfato ligado para se avaliar o potencial dos sedimentos em liberar fósforo para a fase aquosa.

Em sistema aquático, as algas e o sedimento tem particular importância para o ciclo do fósforo.

Para o estudo limnológico, todas as formas de fosfato são importantes, no entanto os ortofosfatos assumem maior relevância, por serem a principal forma de fosfato assimilada pelos

vegetais aquáticos. É geralmente aceito que as formas de maior importância em sedimentos de lago são aqueles que estão ligadas a um complexo amorfo hidróxido-ferro.

Os principais processos responsáveis pela transferência de fósforo entre o sedimento e a coluna d'água estão resumidos na Figura 4.

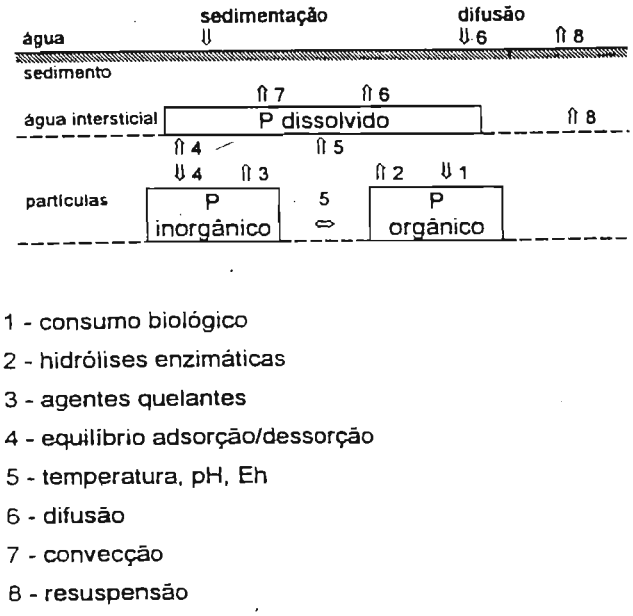


Figura 4. Esquema dos processos de mobilização e transporte de fósforo no sistema água-sedimento (Silva, 1996).

O transporte de fósforo da água para o sedimento é devido a sedimentação de material particulado e a difusão. Este último mecanismo é relevante se a concentração de fósforo na água adjacente é muito maior do que na água intersticial, já que o fluxo é determinado pelo gradiente existente entre essa interface. A liberação do fósforo do sedimento para a coluna d'água é efetuada através da mobilização do fósforo ligado a partículas em uma forma dissolvida, devido a fatores físico-químicos e biológicos, enquanto o transporte do fósforo dissolvido para a água adjacente por processos físicos tais como convecção e difusão.

A troca de fósforo entre sedimento e água foi baseada nas interações com o ciclo do ferro em condições aeróbicas e anaeróbicas. Em potenciais redox maiores que 200 mV, ferro(III) liga-se a fosfatos como hidróxidos insolúveis que precipitam na superfície do sedimento. Em valores

mais baixos, geralmente encontrados abaixo de 1 cm de profundidade de sedimento, ferro(III) é reduzido à ferro(II) e assim, o ferro e fosfato adsorvidos retornam a solução.

O fósforo também pode ser liberado para a coluna d'água sob condições aeróbicas na superfície dos sedimentos. Nestas condições a liberação parece estar associada com a mineralização de fósforo orgânico que produz fosfato solúvel, não ligado ao ferro, especialmente em lagos ricos em cálcio, ou causado por condições microanaeróbicas na superfície do sedimento e, conseqüentemente pode ser explicado pelo mesmo mecanismo como na liberação anaeróbica (Silva, 1996).

Outro importante elemento a ser considerado como nutriente em ambientes aquáticos é o silício. Diatomáceas requerem grandes quantidades de sílica para suas paredes celulares e nas localidades onde as diatomáceas são as espécies de algas predominantes, silício pode ser um elemento limitante para o crescimento de fitoplâncton. Tanto processos geoquímicos como biogeoquímicos afetam a quantidade de silício em águas naturais. Silício ocorre em águas naturais predominantemente como sílica reativa solúvel, SiO_4^{2-}, e com pequena cadeia polimérica, podendo também ser observado como grandes polímeros e frações inorgânicas e orgânicas, ou material suspenso. Sílica dissolvida mostra uma considerável faixa de valores de concentração excedendo 20 mg L^{-1}. A Tabela 2 exemplifica as concentrações de silício em vários ambientes.

Tabela 2. Concentração de silicato em águas (Robards e colaboradores, 1994).

Tipo de água	Concentração (mg L^{-1})
Águas naturais continentais	<0,5-60
Mar, superfície	Traços
profundidade	4
Salmoura	Acima de 1000

Outras formas, tais como argilas e sílica coloidal, contém sítios de sorção para fosfato e amônia influenciando significativamente na sua mobilidade e biodisponibilidade.

A determinação de fosfato tem sido amplamente realizada através da química do azul de molibdênio (Murphy e Riley, 1962). Sendo método oficial recomendado pela APHA (1995), vem sendo aplicado em análises de amostras de água natural, oceanos, extratos de sedimentos, entre

outros. O silicato é um forte interferente nesta reação, bem como um importante nutriente para o meio aquático, despertando assim o interesse na determinação simultânea/seqüencial destas duas espécies. Vários trabalhos vem sendo publicados em FIA (Jacintho e colaboradores, 1989; Más e colaboradores, 1990; Chen e colaboradores, 1991) demostrando o forte interesse dos autores nesta determinação.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes usados neste trabalho foram de grau analítico da Merck, Sigma ou Aldrich. Todas as soluções foram preparadas com água desionizada.

Solução estoque de fósforo (100 mg L^{-1}) e silício (1000 mg L^{-1}) foram preparadas a partir de KH_2PO_4 e $NaSiO_3.9H_2O$, respectivamente. A solução de fósforo foi armazenada em frasco de vidro âmbar e a solução de silício em frasco de polietileno. As soluções padrão utilizadas foram preparadas à partir da diluição das soluções estoque.

Para a determinação de fosfato foram utilizados os seguintes reagentes:

3. molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1};
4. ácido ascórbico 2% (m/v) contendo 100 mg L^{-1} de Sb*.

Para a determinação de fosfato na presença de silicato foram utilizados os reagentes:

4. molibdato de amônio 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1} contendo ácido oxálico 0,25% (m/v) (0,02 mol L^{-1});
5. ácido ascórbico 2% (m/v) contendo 100 mg L^{-1} de Sb*.

Para a determinação de silicato na presença de fosfato utilizou-se os seguintes reagentes:

1. molibdato de amônio 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1};
2. ácido oxálico 10% (m/v);
6. ácido ascórbico 2% (m/v) contendo 100 mg L^{-1} de Sb*.

*Solução estoque 4000 mg L^{-1} de Sb foi preparada a partir do sal tartarato de antimônio(III) e potássio e mantida sob refrigeração para melhor conservação.

2.2. Equipamentos utilizados

Sistema de análise por Injeção Sequencial FIALab-3500 da Alitea USA, constituído por uma bomba de pistão com seringa Cavro de capacidade de 5 mL, uma válvula seletora com 8 portas, tendo a porta comum acesso as demais portas. O pistão e a válvula foram controlados pelo software FIALab-3500, utilizando-se um computador Pentium 100 MHz.

Para detecção foi utilizado espectrofotômetro Micronal B 382 com cela de fluxo Hellma com volume interno de 80 μL, e registrador Micronal B342II. Registros também foram feitos no sistema de aquisição de dados do equipamento.

2.3. Procedimentos

2.3.1.Determinação de fosfato

Para a determinação de fosfato, utilizou-se a configuração do sistema SIA mostrado na Figura 5.

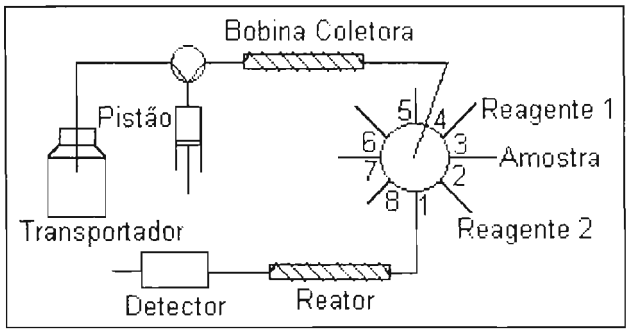


Figura 5. Diagrama representativo do sistema de Injeção Seqüencial utilizado para a análise de fosfato. Características do sistema: Solução transportadora: água, Reagente 1: ácido ascórbico 2% (m/v) contendo 100 mg L^{-1}de Sb, Reagente 2: molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, bobina coletora (comprimento = 3 m; diâmetro interno = 0,8 mm), reator (comprimento = 76 cm; diâmetro interno = 0,5 mm), vazão = 100 μL s^{-1}, cela de fluxo (V = 80 μL), λ = 660 nm.

A seqüência de operações está descrita a seguir:

1- O pistão aspira 1500 μL de água desionizada para dentro da seringa.

2- A válvula seletora é posicionada na porta 2. O movimento reverso do pistão aspira 150 μL de molibdato de amônio para a bobina coletora.

3- A porta 3 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 75 μL de amostra para a bobina coletora.

4- A porta 4 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 150 μL de ácido ascórbico para a bobina coletora.

5- A válvula seletora conecta o reator ao detector através da porta 1 e o movimento avante do pistão propulsiona a mistura reacional ao detector e descarte.

Em seguida é realizada a limpeza do sistema SIA, onde é utilizado a seguinte seqüência de operações:

1- O pistão aspira 800 μL de água desionizada para dentro da seringa.

2- A válvula seletora é posicionada na porta 3. O movimento reverso do pistão aspira 200 μL do próximo padrão a ser utilizado (ou amostra) para a bobina coletora.

3- A válvula seletora é posicionada na porta 6. O movimento avante do pistão dispensa todo o conteúdo da bobina coletora.

Após este procedimento de limpeza, evita-se possíveis efeitos de memória causados pela presença de padrão (ou amostra) anteriormente utilizado.

Para a determinação de fosfato na presença de silicato utilizou-se no lugar do Reagente 2 solução de molibdato de amônio 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} contendo 0,25% de ácido oxálico em HNO_3 0,2 mol L^{-1}.

2.3.2. Determinação de silicato na presença de fosfato

2.3.2.1. Uso da câmara de mistura

A configuração do sistema SIA indicada na Figura 6, foi utilizado para confecção de curvas analíticas na faixa de concentração de 10 a 50 mg L^{-1} de Si, adicionados a estas, 2 mg L^{-1} de P. Os parâmetros abordados foram temperatura, realizando-se experimentos a temperatura ambiente e 40°C, e concentração do reagente molibdato de amônio, utilizando-se soluções 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1} e 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}. O estudo deste último parâmetro foi feito a temperatura ambiente.

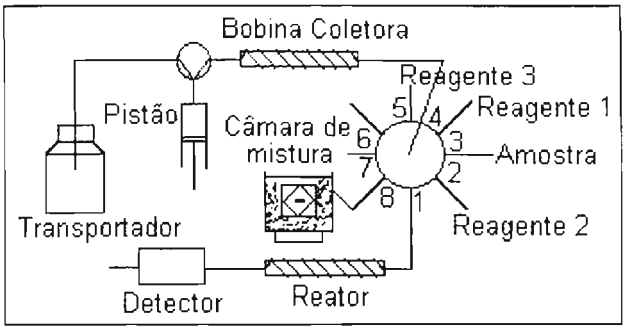


Figura 6. Configuração do sistema SIA para determinação de silicato com câmara de mistura (V =0,78 mL). Reagente 1: ácido oxálico 10% (m/v), Reagente 2: molibdato de amônio 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, Reagente 3: ácido ascórbico 2% (m/v) com 100 mg L^{-1} de Sb. As demais características são similares a Figura 5.

Para a obtenção das curvas analíticas utilizou-se a seqüência descrita a seguir:

1- O pistão aspira 2000 μL de água desionizada para dentro da seringa.

2- A válvula seletora é posicionada na porta 2. O movimento reverso do pistão aspira 150 μL de solução de molibdato de amônio para a bobina coletora.

3- A porta 3 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 280 μL de solução de amostra para a bobina coletora.

4- A porta 8 é selecionada. O movimento avante do pistão propulsiona 380 μL da mistura reacional contida na bobina coletora para a câmara de mistura.

5- A porta 4 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 400 μL de solução de ácido oxálico para a bobina coletora.

6- A porta 8 é selecionada. O movimento avante do pistão propulsiona 350 μL de ácido oxálico para a câmara de mistura.

7- A mistura reacional permanece na câmara de mistura por 30 segundos sob agitação.

8- O movimento reverso do pistão aspira 100 μL da mistura reacional para a bobina coletora.

9- A porta 5 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 150 μL de solução de ácido ascórbico para a bobina coletora.

10- A válvula seletora conecta a bobina coletora ao detector e o movimento avante do pistão propulsiona a mistura reacional através da bobina de reação ao detector e descarte.

11- O pistão aspira 1000 μL de água desionizada para dentro da seringa.

12- A porta 8 é selecionada. O movimento avante do pistão propulsiona a água desionizada para dentro da câmara de mistura, deixando o sistema pronto para um novo ciclo de análise.

2.3.2.2. Uso da bobina auxiliar no lugar da câmara de mistura

A configuração do sistema SIA apresentado na Figura 6 foi alterado conforme a Figura 7, trocando-se a câmara de mistura por uma bobina auxiliar.

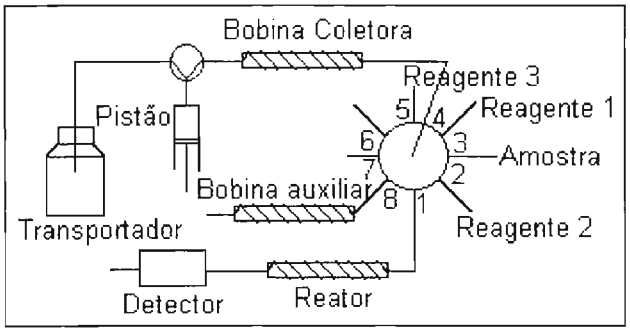


Figura 7. Configuração do sistema SIA para determinação de silicato com bobina auxiliar. Bobina auxiliar (comprimento = 2 m; diâmetro interno = 0,07 mm). As demais características são similares a Figura 6.

Para a obtenção da curva analítica na faixa de 5 a 50 mg L^{-1} de Si, utilizou-se a seqüência de operações descrita a seguir:

1- O pistão aspira 2000 μL de água desionizada para dentro da seringa.

2- A válvula seletora é posicionada na porta 2. O movimento reverso do pistão aspira 150 μL de solução de molibdato de amônio para a bobina coletora.

3- A porta 3 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 100 μL de amostra para a bobina coletora.

4- A porta 2 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 150 μL de solução de molibdato de amônio para a bobina coletora.

5- A porta 8 é selecionada. O movimento avante do pistão propulsiona 400 μL da mistura reacional para a bobina auxiliar.

6- A porta 4 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 200 μL de ácido oxálico para a bobina coletora.

7- A porta 8 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 150 μL da mistura reacional para a bobina coletora.

8- A porta 4 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 150 μL de ácido oxálico para a bobina coletora.

9- A porta 8 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 150 μL da mistura reacional para a bobina coletora.

10- A porta 4 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 150 μL de ácido oxálico para a bobina coletora.

11- A porta 8 é selecionada. O movimento avante do pistão propulsiona 650 μL da mistura reacional para a bobina auxiliar.

12- A porta 5 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 150 μL de ácido ascórbico para a bobina coletora.

13- A porta 8 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 300 μL da mistura reacional para a bobina coletora.

14- A porta 5 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 150 μL de ácido ascórbico para a bobina coletora.

15- A válvula seletora conecta a bobina coletora ao detector através da porta 1 e o movimento avante do pistão propulsiona a mistura reacional através da bobina de reação ao detector e descarte.

16- O pistão aspira 1000 μL de água desionizada para dentro da seringa.

17- A porta 8 é selecionada. O movimento avante do pistão propulsiona a água desionizada para dentro da bobina auxiliar, deixando o sistema pronto para um novo ciclo de análise.

Registros de sinais de fósforo e silício foram obtidos seqüencialmente acoplando-se a seqüência de operações utilizada para a análise de fosfato na presença de silicato, a seqüência de operações utilizada para a análise de silicato. A faixa de concentração abordada foi de 2 a 7 mg L^{-1} para P e 5 a 50 mg L^{-1} para Si.

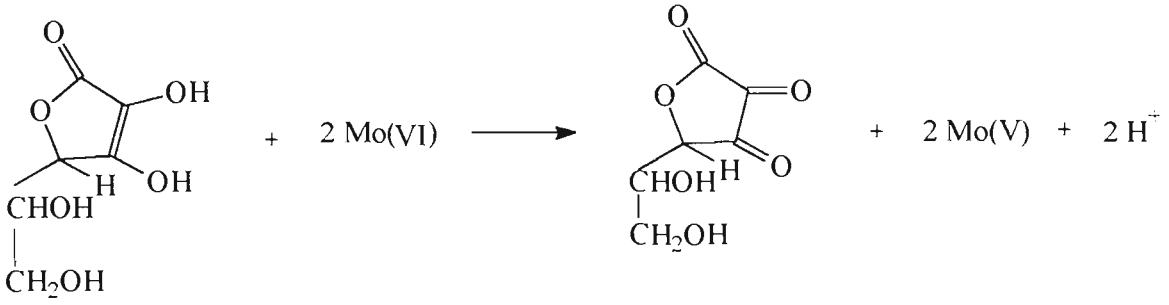
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação de Fosfato

A determinação de fosfato baseou-se na química do azul de molibdênio, estando representado pelas reações químicas descritas a seguir:

$$7H_3PO_4 + 12(NH_4)_6Mo_7O_{24} + 51H^+ \rightarrow 7\,(NH_4)_3PO_4.12MoO_3 + 51\,NH_4^+ + 36\,H_2O \quad (1)$$

complexo amarelo-Mo(VI) + ácido ascórbico → complexo azul-Mo(V) (**2**)



A formação do fosfomolibdato de amônio, que possui coloração amarela, ocorre rapidamente (reação **1**). Em seguida, o Mo(VI) é reduzido pelo ácido ascórbico (reação lenta **2**) ocorrendo a mudança no seu estado de oxidação de +6 para +5, conferindo a solução uma intensa coloração azul (azul de molibdênio), monitorado em λ maior ou igual a 660 nm (APHA, 1995; Ruzicka e Hansen, 1988).

Este complexo é formado quando solução de molibdato contendo oxo- ânions (PO_4^{3-}, SiO_4^{4-}) ou íons metálicos são acidificadas (Cotton e Wilkinson, 1972). Os ácidos germânico, arsênico e silícico tem comportamento análogo ao fosfato, reagindo com o molibdato em soluções ácidas para formar respectivamente o ácido germanomolibdico $H_8Ge(Mo_2O_7)_6$, ácido arsenicomolibdico $H_7As(Mo_2O_7)_6$ e o ácido silicomolibdico $H_8Si(Mo_2O_7)_6$, tambem caracterizados por uma coloração azul quando sofrem processo de redução (Fiegl, 1958).

O complexo formado pelo molibdato e por um oxo ânion em meio ácido é conhecido como heteropoliácido, caracterizado por conter dois elementos diferentes no centro do íon, ou seja, o átomo de Mo e o átomo de P, sendo este último chamado de hetero átomo. Como exemplo, o ânion $[PMo_{12}O_{40}]^{3-}$ possui o PO_4^{3-} no interior de um cesto octaédrico de MoO_6

(Shriver e colaboradores, 1990). As estruturas destes heteropoliácidos tem sido estudadas por difração de raio-X. A Figura 8 ilustra a estrutura do complexo formado podendo ter como hetero átomo P^V, As^V, Ti^V e Zr^{IV} (Cotton e Wilkinson, 1972).

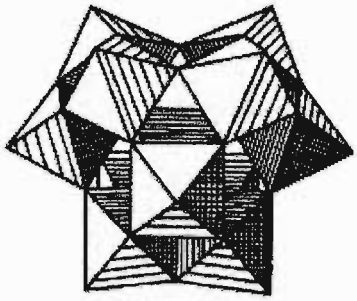


Figura 8. Estrutura do heteropoliácido 12-molibdato de fórmula geral $[X^{n+}Mo_{12}O_{40}]^{(8-n)-}$ (Cotton e Wilkinson, 1972).

Tabela 3 mostra os principais tipos de heteropoliácidos de molibdênio ou heteropolimolibdatos.

Tabela 3. Principais tipos de heteropolimolibdatos (Cotton e Wilkinson, 1972).

Razão dos hetero átomos para átomos de Mo	Principais hetero átomos	Fórmula do ânion
1:12	Série A: P^V, As^V, Si^{IV}, Ge^{IV}, Sn^{IV}, Ti^{IV}, Zr^{IV}	$[X^{n+}Mo_{12}O_{40}]^{(8-n)-}$
	Série B: Ce^{IV}, Th^{IV}, Sn^{IV}, P^V, As^V, Ge^{IV}	$[X^{n+}Mo_{12}O_{42}]^{(12-n)-}$
1:11	P^V, As^V, Ge^{IV}	$[X^{n+}Mo_{11}O_{39}]^{(12-n)-}$ (talvez dímero)
1:10	P^V, As^V, Pt^{IV}	$[X^{n+}Mo_{10}O_x]^{(2x-60-n)-}$ (talvez dímiro)
1:9	Mn^{IV}, Ni^{IV}	$[X^{n+}Mo_9O_{32}]^{(10-n)-}$
1:6	Te^{VI}, I^{VII}, Co^{III}, Al^{III}, Cr^{III}, Fe^{III}, Rh^{III}	$[X^{n+}Mo_6O_{24}]^{(12-n)-}$
2:18	P^V, As^V	$[X_2^{n+}Mo_{18}O_{62}]^{(16-2n)-}$
2:17	P^V, As^V	$[X_2^{n+}Mo_{17}O_x]^{(2x-102-2n)-}$

3.1.1. Influência do antimônio (Sb(III)) no sinal analítico

Estudos foram iniciados para a determinação de fosfato na faixa de trabalho de 1,0 a 10 mg L^{-1} de P utilizando-se os reagentes molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1} e solução de ácido ascórbico 5% (m/v) contendo 10% (v/v) de glicerina (Ruzicka e Hansen, 1988). Inicialmente obteve-se o valor para o limite de detecção 0,43 mg L^{-1} (Figura 9).

Murphy e Riley (1962) reportaram que a presença de Sb(III) (tartarato de antimônio e potássio) promove um rápido desenvolvimento da cor azul característico da redução do ácido fosfomolibdico. Neste trabalho, os autores verificaram a possibilidade do Sb ser um componente do complexo azul de molibdênio. A razão atômica de Sb para P no complexo foi determinada sendo o resultado do experimento, realizado em duplicata, 1:0,97 e 1:0,94.

Conhecendo-se a função do Sb(III) (Murphy e Riley, 1962; Lacy e colaboradores, 1989; APHA, 1995), optou-se pela sua utilização adicionando-se 100 mg L^{-1} de Sb(III) na solução de ácido ascórbico. A Figura 9 ilustra o resultado obtido utilizando-se solução de ácido ascórbico na ausência e presença de Sb(III).

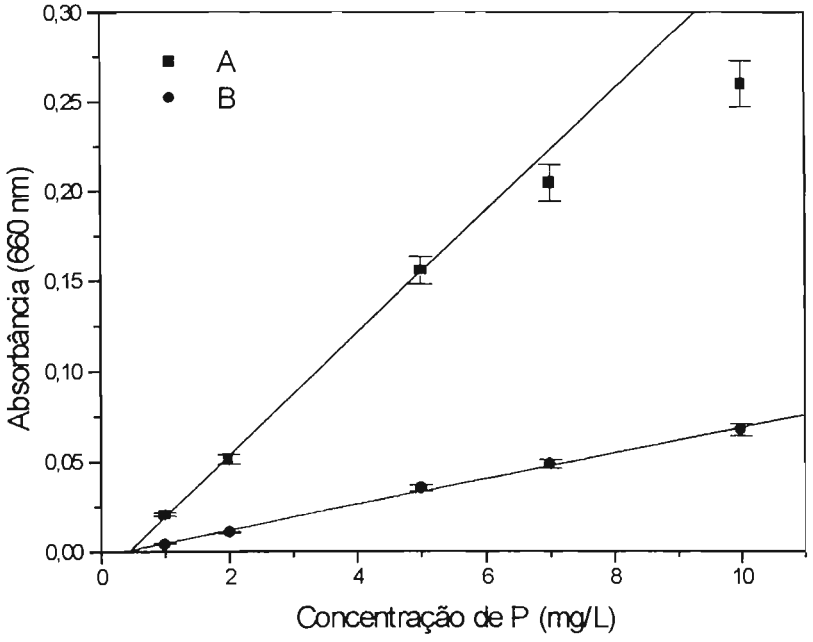


Figura 9. Efeito do emprego do catalisador Sb no sinal analítico na determinação de fosfato. (A) solução de ácido ascórbico 5% (m/v) contendo 10% de glicerina (v/v) e Sb 100 mg L^{-1}, Y=(-0,015±0,003)+(0,0339±0,0008)X, R=0,999, L.D.=0,27 mg L^{-1}; (B) solução de ácido ascórbico 5% (m/v) contendo 10% de glicerina (v/v), Y=(-0,002±0,001)+(0,007±0,0002)X, R=0,998, L.D.=0,43 mg L^{-1}.

De acordo com o resultado mostrado na Figura 9, observa-se uma melhora significativa na sensibilidade do método quando utilizada solução de ácido ascórbico contendo 100 mg L^{-1} de Sb. Devido a maior sensibilidade na faixa de trabalho, a Lei de Beer é estabelecida até a solução 5 mg L^{-1}. Como o objetivo do presente trabalho é a determinação de fosfato em águas naturais e residuais, almeja-se trabalhar numa faixa linear que abranja concentrações de fosfato em torno de 0,025 mg L^{-1} (Resolução CONAMA 20/1986), tornando-se irrelevante o estreitamento da faixa de trabalho.

3.1.2. Estudo da composição e concentração da solução de ácido ascórbico - Efeito Schlieren

A sensibilidade do método mostrou limitações devido ao significativo sinal do branco ocasionado principalmente por dois fatores:

(i) a presença do efeito Schlieren (Rocha e Nóbrega, 1996) na zona de mistura devido a variações no índice de refração ocasionados pela formação de gradientes de concentração entre os reagentes e a zona de amostra;

(ii) redução do Mo (VI) para Mo (V) pelo ácido ascórbico principalmente pela formação do composto azul de molibdênio (van Staden e Taljaard, 1998).

Em sistemas FIA, o efeito Schlieren pode ser contornado pelo uso de confluências, obtendo-se desta forma, uma melhor mistura entre os reagentes e amostra minimizando a formação de gradientes de concentração que possam alcançar o detector. No entanto, em sistema SIA, não é possível introduzir pontos de confluência devido a este ser um sistema de linha única. Haj-Hussein e Christian (1986) e Fogg e colaboradores (1990) sugerem a compatibilidade entre a composição da solução transportadora, amostra e reagentes, ou seja, utilização de força iônica similar nas diferentes soluções a fim de minimizar a formação de gradientes de concentração no percurso analítico além daquele que é obtido pela reação química de interesse.

Baseando-se nesta última proposta, uma alternativa para solucionar este problema foi a modificação da composição do reagente ácido ascórbico. O sinal do branco foi obtido utilizado-se diferentes concentrações de ácido ascórbico contendo ou não glicerina. A Figura 10 mostra o resultado obtido.

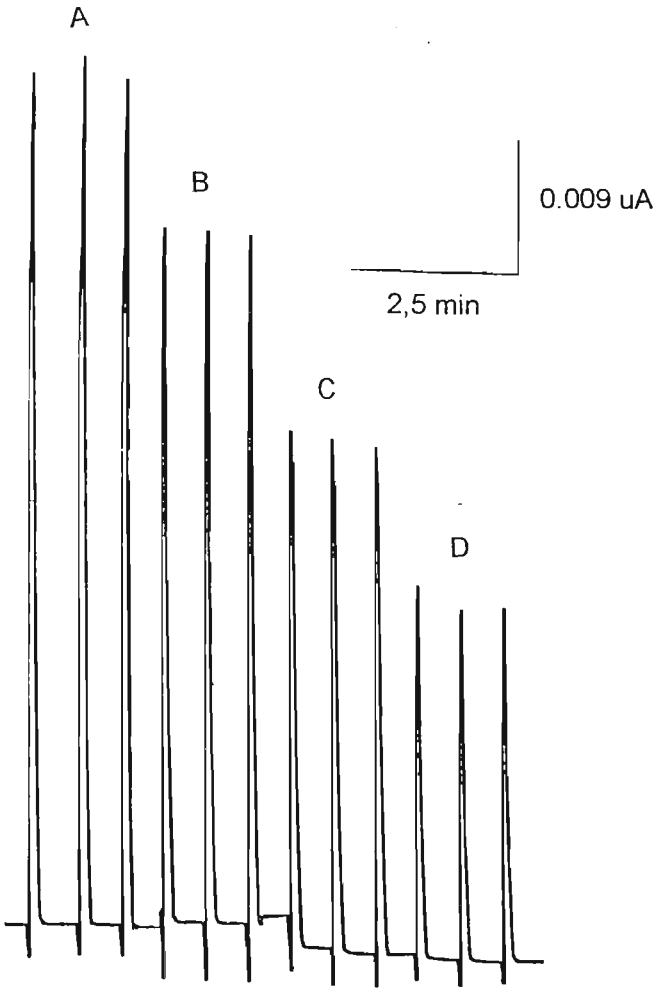


Figura 10. Efeito da concentração de ácido ascórbico no sinal do branco para a determinação de fosfato usando molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em 0,2 mol L^{-1} de HNO_3 e água desionizada como solução transportadora. (A) 5% (m/v) de ácido ascórbico com 10% (v/v) de glicerina; (B) 5% (m/v) de ácido ascórbico sem glicerina; (C) 2,5% (m/v) de ácido ascórbico com 10% (v/v) de glicerina; (D) 2,5% (m/v) de ácido ascórbico sem glicerina.

A adição de glicerina tem sido recomendada para estabilizar a solução de ácido ascórbico. Outra função da glicerina é evitar a precipitação de produtos da reação no percurso analítico (Ruzicka e Hansen, 1988; van Staden e Taljaard, 1998). Por outro lado, a alta viscosidade da glicerina promove o aparecimento de gradientes de índice de refração na zona de reação, com o surgimento do efeito Schlieren. Abolindo-se a utilização da glicerina na solução de ácido ascórbico, não foi observado precipitação ou acúmulo do produto da reação para as concentrações de fosfato e silicato estudadas, sendo a reprodutibilidade considerada ótima durante um dia de trabalho.

Quando comparado o sinal do branco de uma solução 5% (m/v) de ácido ascórbico contendo 10% (v/v) de glicerina à mesma solução na ausência de glicerina, observa-se uma diminuição de 22% no sinal. Uma diminuição de 48% é observada quando a primeira solução mencionada é comparada à solução 2,5% de ácido ascórbico na ausência de glicerina. Curvas analíticas foram obtidas na faixa de concentração de 1 a 10 mg L^{-1} de P variando-se a composição de ácido ascórbico. A Figura 11 mostra o resultado obtido.

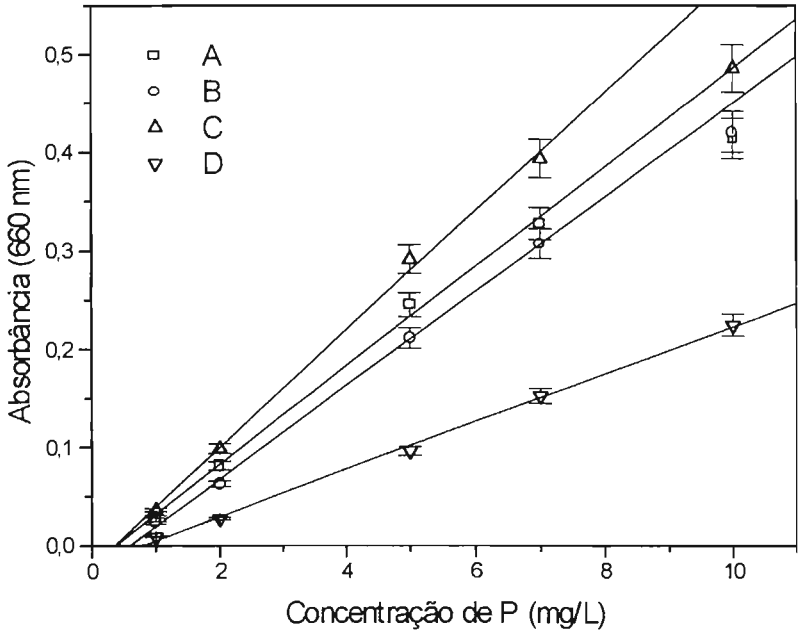


Figura 11. Influência da composição da solução de ácido ascórbico no sinal analítico de fosfato. (A) ácido ascórbico 5% (m/v) com 10% (v/v) de glicerina e 100 mg L^{-1} de Sb. (B) ácido ascórbico 2,5% (m/v) com 100 mg L^{-1} de Sb. (C) ácido ascórbico 2,0% (m/v) com 100 mg L^{-1} de Sb. (D) ácido ascórbico 1,0% (m/v) com 100 mg L^{-1} de Sb.

Tabela 4. Influência da composição da solução de ácido ascórbico no sinal analítico do fosfato - parâmetros das curvas analíticas (Figura 11).

Faixa Linear ($mg\ L^{-1}$)	Coeficiente Linear (UA)	Coeficiente Angular ($L\ mg^{-1}$)	R
(A) 1- 7,0	-0,02±0,01	0,050±0,002	0,998
(B) 1- 7,0	-0,03±0,004	0,050±0,001	0,999
(C) 1- 7,0	-0,02±0,01	0,060±0,002	0,998
(D) 1- 10	-0,02±0,003	0,0243±0,0006	0,999

A composição do reagente na condição otimizada foi de 2% (m/v) de ácido ascórbico contendo 100 mg L^{-1} de antimônio.

Observou-se também significativa diminuição do efeito Schlieren quando usada solução de HNO_3 0,2 mol L^{-1} como solução transportadora.

Avaliou-se também a concentração do reagente molibdato de amônio mantendo-se a concentração de ácido ascórbico em 2% (m/v) contendo 100 mg L^{-1} de Sb. Obteve-se curvas analíticas utilizando-se molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} e 5 x 10^{-3} mol L^{-1}, ambos os casos em meio de HNO_3 0,2 mol L^{-1}. O resultado obtido é verificado na Figura 12.

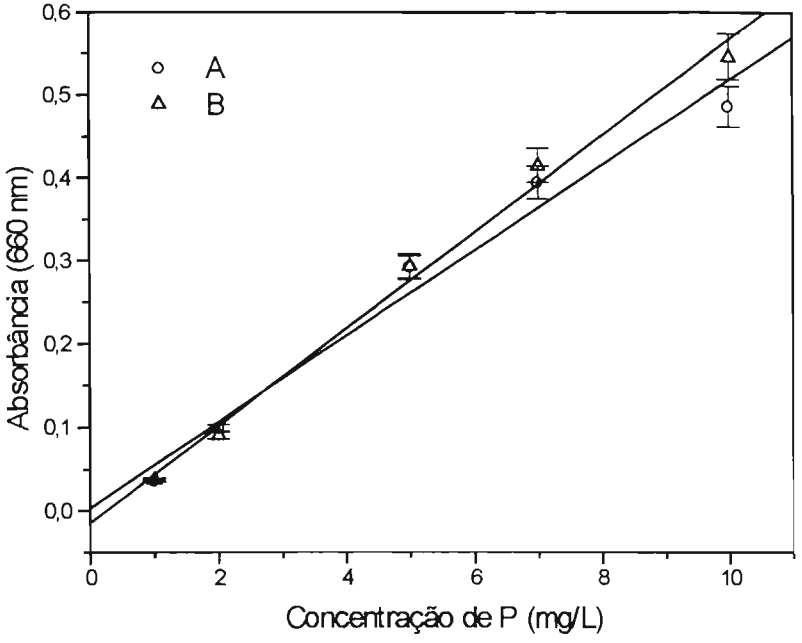


Figura 12. Influência da concentração do reagente molibdato de amônio. (A) molibdato de amônio 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}; Y=(0,00±0,03)+(0,051±0,004)X; R=0,989. (B) molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}; Y=(-0,01±0,02)+(0,058±0,003)X; R=0,996.

Conforme observado na Figura 12, não há ganho significativo de sensibilidade. Com isso, optou-se em manter a concentração de molibdato de amônio inicial (2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}). Solução de molibdato de amônio 5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1} foi utilizada somente quando na presença de ácido oxálico 0,25% (m/v) com a finalidade de eliminar-se a interferência de silicato (item 3.1.4.1).

3.1.3. Comparação entre os redutores ácido ascórbico e cloreto de estanho(II)

Assim como o ácido ascórbico, solução de cloreto de estanho(II) tem sido utilizada como redutor na determinação de fosfato (APHA, 1995 e Reis, 1992). Comparação entre as soluções de ácido ascórbico e $SnCl_2$ foi proposta a fim de avaliar-se o desempenho das duas soluções redutoras na determinação de fosfato.

Realizou-se testes utilizando solução de $SnCl_2$ 1,0 x 10^{-1} mol L^{-1} contendo sulfato de hidrazina 0,8% (m/v) em HCl 2,5 x 10^{-1} mol L^{-1}. Os resultados obtidos com ácido ascórbico e cloreto de estanho(II) estão apresentados nas Figuras 13 e 14 respectivamente.

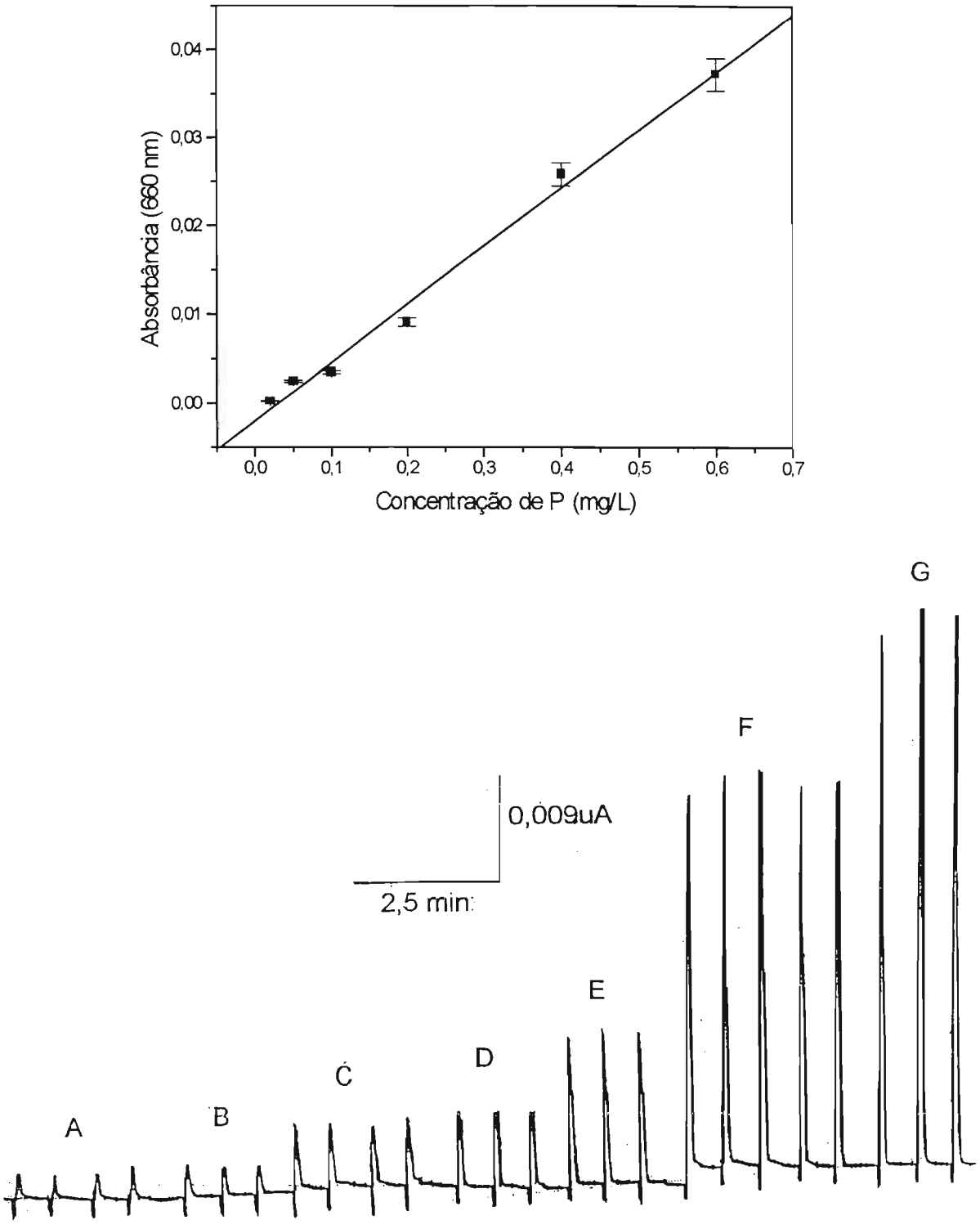
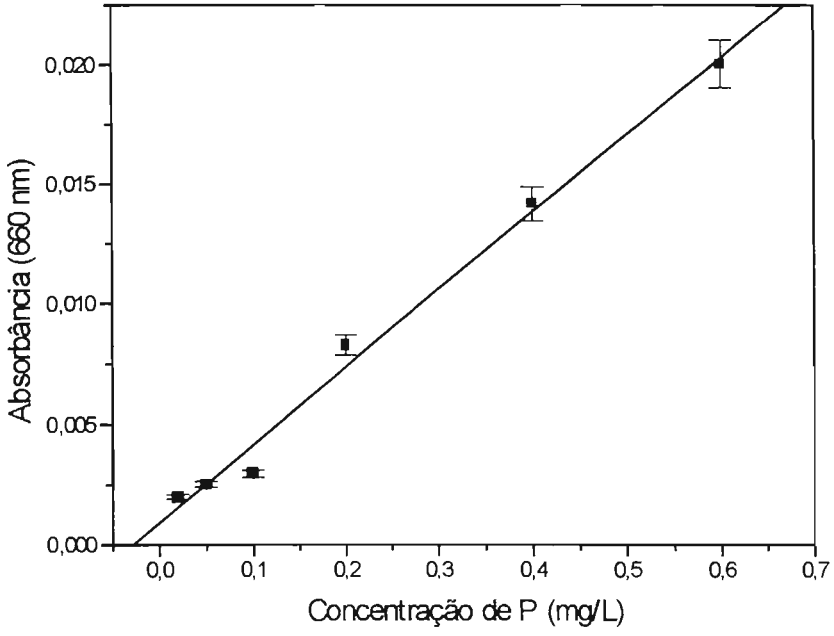


Figura 13. Influência do agente redutor no sinal analítico de fosfato. Condições: molibdato de amônio 2,5 mmol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, ácido ascórbico 2% com 100 mg L^{-1} de Sb. (A) branco, (B) 0,02 mg L^{-1}, (C) 0,05 mg L^{-1}, (D) 0,1 mg L^{-1}, (E) 0,2 mg L^{-1}, (F) 0,4 mg L^{-1}, (G) 0,6 mg L^{-1}. Y= (0,002±0,001)+(0,066±0,003)X; R=0,996.



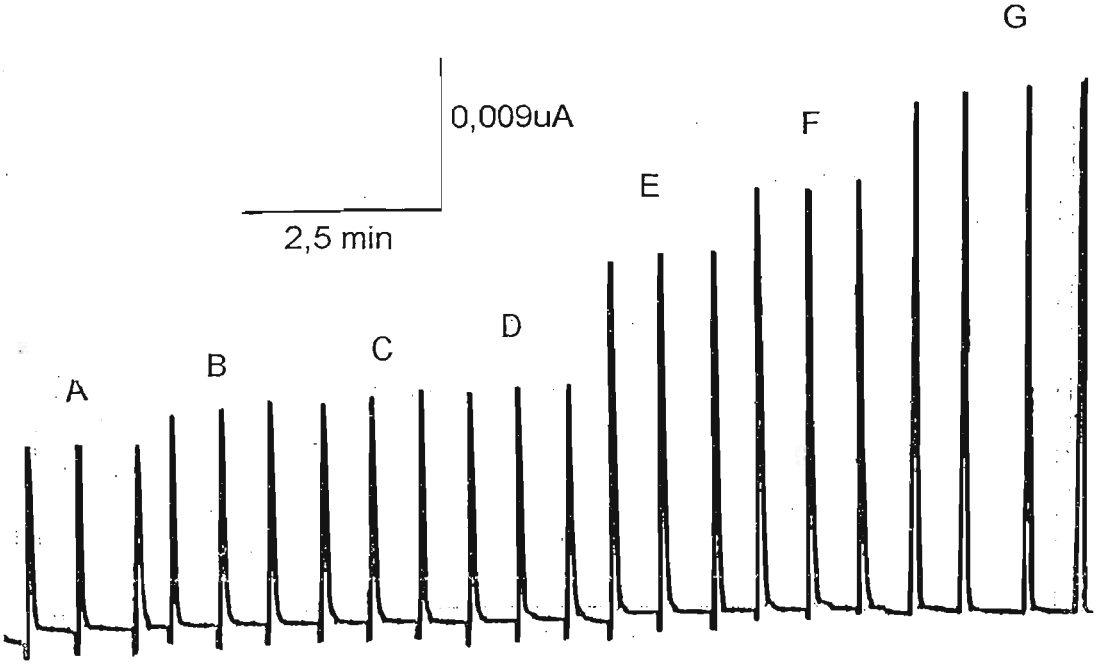


Figura 14. Influência do agente redutor no sinal analítico de fosfato. Condições: molibdato de amônio 2,5 mmol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, $SnCl_2$ 1 x 10^{-3} mol L^{-1} com sulfato de hidrazina 0,8% em HCl 2,5 x 10^{-1} mol L^{-1} . (A) branco, (B) 0,02 mg L^{-1}, (C) 0,05 mg L^{-1}, (D) 0,1 mg L^{-1}, (E) 0,2 mg L^{-1}, (F) 0,4 mg L^{-1}, (G) 0,6 mg L^{-1}.Y= (0,0009±0,0005)+(0,032±0,002)X; R=0,995.

A utilização da solução de ácido ascórbico mostrou vantagens sobre o redutor cloreto de estanho(II), podendo ser observado na Figura 13 maior sensibilidade na faixa de concentração estudada e também diminuição do efeito Schlieren. O preparo da solução de cloreto de estanho foi extremamente trabalhosa, uma vez que Sn(II) é facilmente oxidado a Sn(IV), sendo que este último, é solúvel sob condições drásticas (HCl concentrado a quente). Reis e colaboradores (1992) sugeriram solução de $SnCl_2$ 0,01% (m/v) contendo sulfato de hidrazina 0,35% (m/v) em H_2SO_4 1,5 x 10^{-1} mol L^{-1}. Porém, não foi possível o preparo desta solução no meio ácido sugerido utilizando-se o reagente $SnCl_2$ disponível no laboratório. Optou-se portanto em manter-se o redutor inicial que também é menos tóxico.

3.1.4. Interferência de silicato na determinação de fosfato

A metodologia comumente utilizada para a determinação de fosfato e silicato envolve a reação destes íons com molibdato em meio ácido produzindo as espécies de coloração amarela molibdofosfato e molibdosilicato (APHA, 1995). Quando baixas concentrações de fosfato e silicato são monitoradas, a formação do azul de molibdênio é requerida, onde o Mo(VI) é reduzido à Mo(V) ocorrendo a intensificação da cor do produto de reação, aumentando desta forma a sensibilidade do método. A seletividade tem sido alcançada explorando-se as diferenças entre a cinética de formação dos heteropoliácidos (Ingle e Crouch, 1971;Kircher e Crouch, 1983a).

Levine e colaboradores (1955) propuseram a determinação de fosfato através da reação do azul de molibdênio em águas contendo arsênio, silício e germânio, elementos que ao reagirem com molibdênio também formam heteropoliácidos produzindo o composto azul detectável no mesmo comprimento de onda. O trabalho envolve a utilização de agentes redutores tais como cloreto estanhoso e ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico e há pré-concentração de fósforo através da coprecipitação com hidróxido de alumínio.

Em 1962 Murphy e Riley propuseram a utilização de antimônio(III) (como tartarato de antimônio e potássio) a fim de acelerar o desenvolvimento da cor azul oriunda da redução do heteropoliácido pelo ácido ascórbico.

No tocante aos procedimentos analíticos, verifica-se ao longo dos anos uma crescente automação dos métodos em função de suprir necessidades como o grande número de amostras existentes principalmente nas áreas clínicas e ambientais, além da necessidade da geração de

resultados rápidos devido a possíveis problemas de deterioração de amostras. Skeggs, (1957) dando o primeiro passo na execução de processos analíticos, reportou o transporte da alíquota de amostra num fluxo transportador do ponto de introdução até a unidade de detecção. Esta abordagem tem sido denominada como Análise em Fluxo Contínuo (segmentado) (Zagatto e colaboradores, 1999).

Com o advento da Análise por Injeção em Fluxo, muitos foram os trabalhos publicados para a determinação de fosfato (Ruzicka e Stewart, 1975) bem como para a determinação seqüencial de fosfato e silicato (Jacintho e colaboradores, 1989; Ohashi e colaboradores, 1979; Más e colaboradores, 1990). Neste modo de análise, a amostra é introduzida no fluido transportador através de uma seringa ou de uma válvula de injeção sendo transportada ao detector (Ruzicka e Hansen, 1975; Stewart e colaboradores, 1976).

Mais recentemente, em 1990, a Análise por Injeção Seqüencial (Ruzicka e Marshall, 1990) mostrou suas vantagens em relação a Análise por Injeção em Fluxo no tocante a monitoramento ambiental e de processos e também a possibilidade de realiza-lo *in-loco*, devido a simplicidade do sistema e minimização de correntes reconfigurações mecânicas do mesmo. Masini e colaboradores (1995) propuseram a determinação de fosfato em bioprocessos, possibilitando o seu monitoramento on-line. A determinação seqüencial de fosfato e silicato em águas naturais e residuais, bem como cultura de algas em água do mar, também tem sido proposto no sistema SIA, visando principalmente o monitoramento *in-loco* destas espécies (Mas-Torres e colaboradores, 1997; Thomas e colaboradores, 1997; Galhardo e Masini, 2000).

3.1.4.1. Utilização de ácidos orgânicos

Ácidos orgânicos (tais como tartárico e oxálico) podem ser usados para viabilizar a determinação de fosfato na presença de silicato e vice-versa, dependendo se o ácido orgânico é adicionado antes ou depois da formação do heteropoliácido. Se o ácido orgânico e o reagente molibdato de amônio (ou de sódio) são adicionados à solução contendo fosfato e silicato, somente o fosfomolibdato é formado. Porém, se houver a formação prévia dos dois heteropoliácidos e posteriormente a adição do ácido orgânico, somente o silicomolibdato é mantido em solução (Chalmers e Sinclair, 1966).

Feigl (1949) relatou a importância analítica de certos heteropoliácidos nos quais anidridos de ácidos inorgânicos são combinados com ácidos orgânicos. São eles o ácido silicomolibdico,

$H_2[C_6H_4(O)(COO).MoO_3]$ e dois ácidos oxalomolibdicos, $H_2[C_2O_4.MoO_3]$ e $H_2[C_2O_4.2MoO_3]$. A molécula de MoO_3 provavelmente coordena-se com o oxigênio do grupo carbonila. Feigl (1949) evidencia a ação mascarante de certos compostos, mencionando o fato do ácido oxálico ser padrão primário para o permanganato de potássio e que a presença de ácido molibdico pode agir como mascarante contra o permanganato de potássio devido a formação dos ácidos oxalomolibdicos, $H_2[C_2O_4.MoO_3]$ e $H_2[C_2O_4.2MoO_3]$.

$$H_2[MoO_3.C_2O_4] \text{ ou } MoO_3.H_2C_2O_4 \rightarrow MoO_3 + H_2C_2O_4$$

Contudo, o fosfomolibdato não se formará até que todo ácido oxálico tenha se combinado com o ácido molibdico. Um excesso de molibdato deve estar presente para a formação do fosfomolibdato (Feigl, 1949).

Inicialmente verificou-se a interferência de silicato na determinação de fosfato construindo-se uma curva analítica utilizando-se soluções padrão de silício contaminadas com 2,0 mg L^{-1} de P. A Figura 15 mostra o resultado obtido.

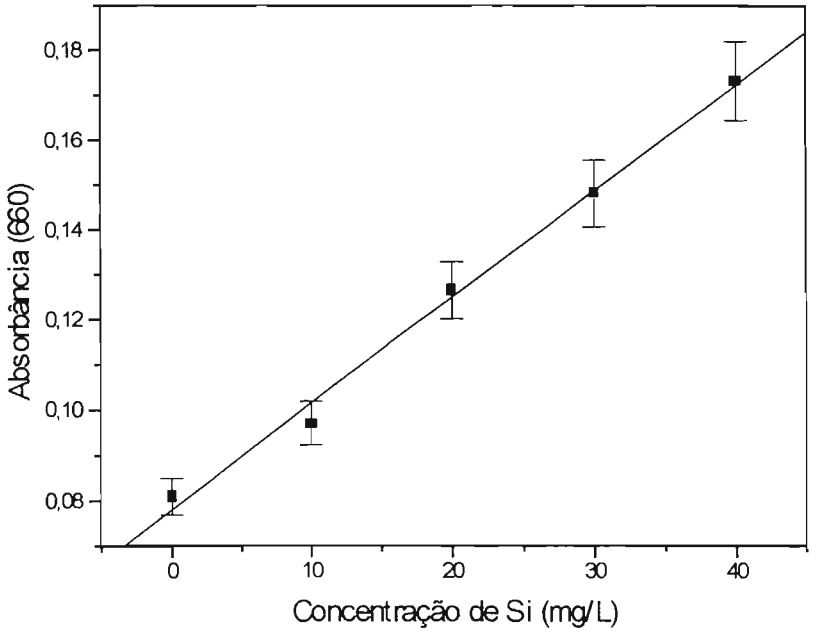


Figura 15. Interferência do silicato na determinação de fosfato. Aos padrões utilizados foram adicionados 2 mg L^{-1} de $P\text{-}PO_4^{3-}$. Condições: molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1} e ácido ascórbico 5% (m/v) contendo 100 mg L^{-1} de Sb. Y=(0,078±0,003)+(0,0024±0,0001)X, R=0,997.

Como pode-se verificar na Figura 15, a medida que a concentração de silício aumenta, ocorre um aumento proporcional na absorbância. Chalmers e Sinclair (1966) utilizaram solução 0,125 mol L^{-1} de molibdato de sódio contendo ácido tartárico 0,17 mol L^{-1} em HCl 3,0 mol L^{-1} para contornar a interferência de silicato na determinação de fosfato.

Um teste preliminar foi realizado com a solução mencionada acima utilizando-se padrão 2,0 mg L^{-1} de $P\text{-}PO_4^{3-}$. O sinal registrado apresentou um decréscimo de 94,24% em relação ao sinal obtido com a mesma solução padrão quando utilizado o reagente empregado inicialmente, molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}. Diminuiu-se então a concentração de ácido tartárico para 0,1 mol L^{-1} observando-se uma variação de 33,17% no sinal analítico. A Figura 16 mostra o resultado obtido.

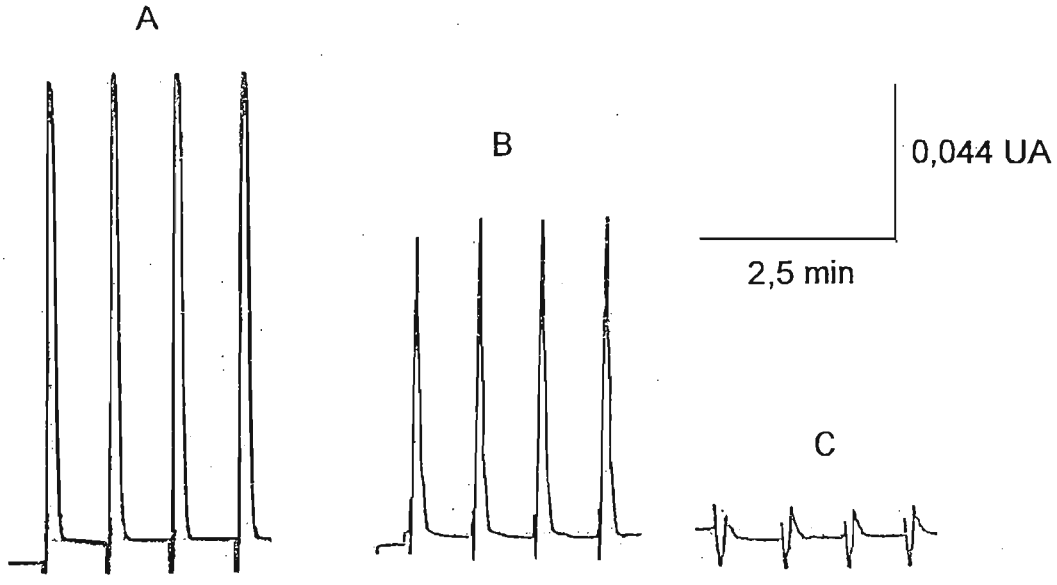


Figura 16. Influência da concentração de ácido tartárico no sinal analítico da solução padrão 2 mg L^{-1} de P-PO_4^{3-}. A: 2 mg L^{-1} de P utilizando-se 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} de molibdato de amônio em 0,2 mol L^{-1} de HNO_3. B: 2 mg L^{-1} de P utilizando-se 0,125 mol L^{-1} de molibdato de sódio contendo 0,1 mol L^{-1} de ácido tartárico em 3 mol L^{-1} de HCl. C: 2 mg L^{-1} de P utilizando-se 0,125 mol L^{-1} de molibdato de sódio contendo 0,17 mol L^{-1} de ácido tartárico em 3 mol L^{-1} de HCl. O branco equivale a 40% do sinal de A.

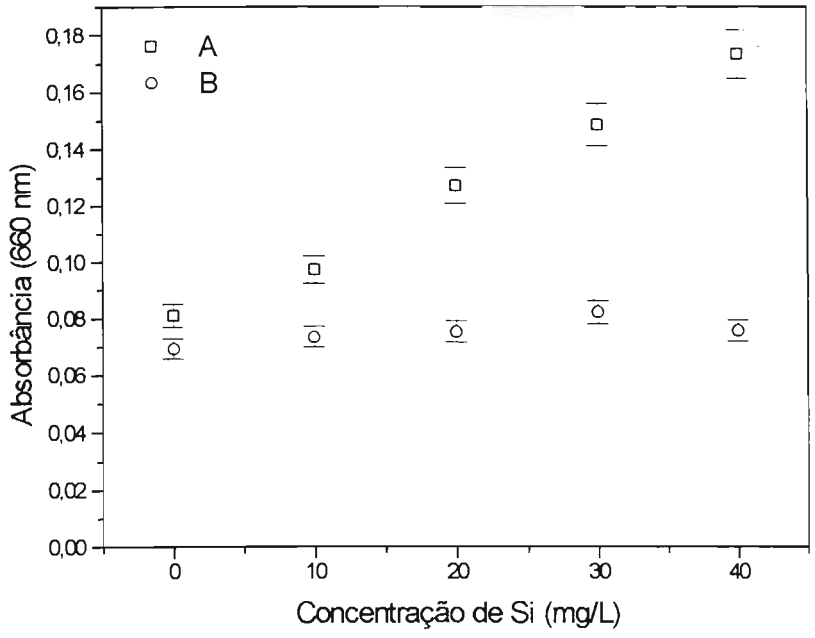


Figura 17. Influência do ácido tartárico na eliminação da interferência de silicato na determinação de fosfato. Aos padrões utilizados foi adicionado 2 mg L^{-1} de P. Condições: (A) molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1} e ácido ascórbico 5% (m/v) contendo 100 mg L^{-1} de Sb. (B) molibdato de sódio 0,125 mol L^{-1} contendo 0,1 mol L^{-1} de ácido tartárico em HCl 3,0 mol L^{-1} e ácido ascórbico 5% (m/v) contendo 100 mg L^{-1} de Sb.

De acordo com a Figura 17 podemos verificar a eficiência do ácido tartárico na eliminação da interferência de silicato na determinação de fosfato.

Dando prosseguimento aos estudos de interferência, testou-se soluções de molibdato de amônio contendo ácido tartárico e ácido oxálico.

Uma solução padrão 2 mg L^{-1} de P foi utilizada como padrão de controle na realização de testes preliminares. Inicialmente utilizou-se como reagente uma solução de molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}. Não foi verificado sinal analítico quando utilizada solução de ácido oxálico 0,02 mol L^{-1} ou solução de ácido tartárico 0,1 mol L^{-1} à esta solução. Decidiu-se por aumentar a concentração de molibdato de amônio uma vez que a relação de Mo para P na formação do fosfomolibdato é de 12 para 1. Preparou-se duas soluções distintas de molibdato de amônio 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, onde adicionou-se ácido oxálico 0,02 mol L^{-1} na primeira solução e ácido tartárico 0,1 mol L^{-1} na segunda solução. O sinal

analítico foi observado para a solução de 2 mg L^{-1} de P somente quando a solução de molibdato de amônio contendo ácido oxálico foi utilizada.

Diminuiu-se então a concentração de ácido tartárico para 0,01 mol L^{-1} em ambas as soluções de molibdato de amônio (2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} e 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1}) visando a obtenção do sinal analítico para a solução de 2 mg L^{-1} de P. Construiu-se curvas analíticas utilizando-se as soluções de molibdato de amônio contendo o ácido orgânico em meio de ácido nítrico. Foram utilizadas soluções padrão de silicato na faixa de 10 a 40 mg L^{-1} (Si) contendo 2 mg L^{-1} de P a fim de observar-se a minimização da interferência de silicato. A Figura 18 mostra os resultados obtidos.

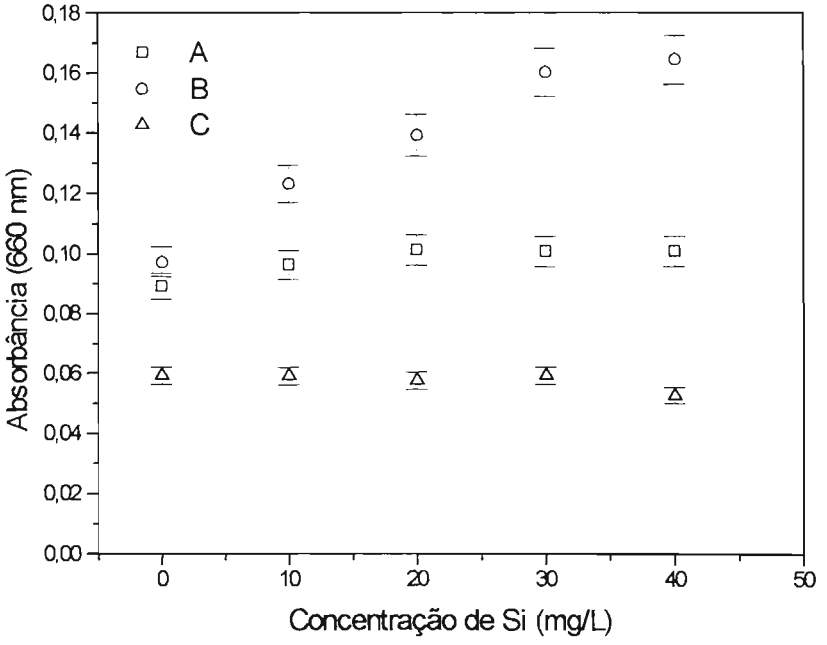


Figura 18. Influência dos ácidos orgânicos na eliminação da interferência de silicato na determinação de fosfato. Aos padrões utilizados foram adicionado 2 mg L^{-1} de P-PO_4^{3-} e utilizou-se ácido ascórbico 2% (m/v) contendo 100 mg L^{-1} de Sb. Condições: (A) molibdato de amônio 5 x 10^{-3} mol L^{-1} contendo 0,02 mol L^{-1} de ácido oxálico em HNO_3 0,2 mol L^{-1}. (B) molibdato de amônio 5 x 10^{-3} mol L^{-1} contendo 0,01 mol L^{-1} de ácido tartárico em HNO_3 0,2 mol L^{-1}. (C) molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} contendo 0,01 mol L^{-1} de ácido tartárico em HNO_3 0,2 mol L^{-1}.

Pode-se observar que a interferência de silicato foi contornada quando utilizada solução de molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} contendo ácido tartárico 0,01 mol L^{-1} em HNO_3 0,2

mol L^{-1} e também quando utilizada solução de molibdato de amônio 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} contendo ácido oxálico 0,02 mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}. Porém, comparando-se o sinal obtido para as curvas analíticas quando utilizadas as soluções de molibdato de amônio contendo os ácidos orgânicos, com o sinal obtido para o padrão 2 mg L^{-1} de P quando utilizado o reagente molibdato de amônio na ausência de ácido orgânico, verifica-se perda no sinal analítico. Para o reagente molibdato de amônio 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} contendo ácido oxálico 0,02 mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, a perda no sinal em relação a utilização do mesmo reagente na ausência do ácido orgânico, foi de 11,30%. Já, no caso do reagente molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} contendo ácido tartárico 0,01 mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, a perda no sinal foi de 53,94%. Diante deste resultado, optou-se pela utilização do reagente molibdato de amônio 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} contendo ácido oxálico 0,02 mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1} para contornar a interferência de silicato na determinação de fosfato.

3.2. Determinação de Silicato

3.2.1. Interferência de fosfato na determinação de silicato

Para realizar-se a determinação de silicato na presença de fosfato, solução de ácido oxálico foi aspirada para a bobina coletora após a formação dos complexos de molibdênio. A concentração estabelecida de ácido oxálico foi de 10% (m/v), baseado em Borggaard e Jorgensen (1985).

Para a determinação de silicato na presença de fosfato se faz necessário uma mistura eficaz da amostra com o reagente molibdato de amônio para que haja formação completa dos ácidos fosfomolíbdico e silicomolíbdico. Para tanto, numa etapa inicial, foi utilizada uma câmara de mistura com volume interno de 0,78 mL acoplada a uma das portas da válvula seletora.

3.2.1.1. Influência da temperatura na determinação de silicato

A formação do silicomolibdato é mais lenta que a formação do fosfomolibdato (Chalmers e Sinclair 1966). A velocidade da reação para formação do silicomolibdato é favorecida quando esta ocorre com aquecimento (Kuroda e colaboradores 1985; Borggaard e Jorgensen 1985; Floch e colaboradores, 1998). Yokoyama e colaboradores (1982) reportaram sobre a determinação de

ácido silícico utilizando um sistema FIA no qual as bobinas de reação foram imersas em banho de silicone a 50°C ou 80°C. No estudo realizado a 50°C, verificou-se aceleração na velocidade de formação do silicomolibdato bem como a eliminação da interferência de fosfato quando utilizado ácido oxálico. Trabalhando-se na temperatura de 80°C, observou-se que mais de 90% do ácido silicomolibdico formado foi reduzido ao complexo azul. Porém, nota-se uma queda no sinal do complexo azul quando este é gerado na temperatura de 80°C na presença de ácido oxálico. Isto ocorre devido a decomposição do ácido silicomolibdico pelo ácido oxálico em temperaturas altas como 80°C.

Nesta primeira etapa do estudo da interferência de fosfato na determinação de silicato, utilizando-se a câmara de mistura no sistema SIA, a influência da temperatura foi verificada na formação do silicomolibdato. Para tanto, construiu-se curvas analíticas na faixa de concentração de 10 a 50 mg L^{-1} de Si contendo 2 mg L^{-1} de P, a temperatura ambiente e posteriormente a 40°C, fazendo uso de banho-maria. Os resultados obtidos podem ser verificados na Figura 19.

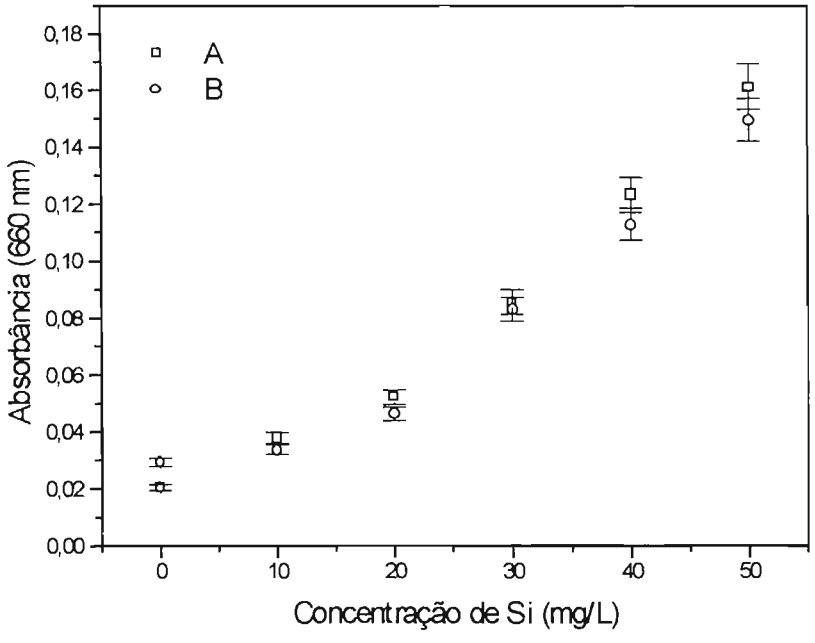


Figura 19. Influência da temperatura na determinação de silicato. Condições: molibdato de amônio 5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, ácido oxálico 10% (m/v) e ácido ascórbico 2% (m/v) contendo Sb 100 mg L^{-1}. (A) temperatura 40-42°C. (B) temperatura ambiente.

A formação do complexo azul proveniente da redução do silicomolibdato quando procedida a 40°C, não apresentou aumento significativo na sensibilidade. Porém, no experimento realizado a 40°C, observa-se um aumento significativo no sinal relativo ao padrão de 10 mg L^{-1} de Si quando comparado ao sinal relativo ao padrão 2 mg L^{-1} de P. Podemos concluir um maior rendimento na formação do silicomolibdato quando utilizado aquecimento, visto que, para o experimento realizado a temperatura ambiente, não houve variação significativa entre os dois primeiros padrões injetados, mostrando desta forma, a formação preferencial do fosfomolibdato.

No entanto, optou-se em realizar a determinação de silicato em temperatura ambiente. Isto porque, como mencionado anteriormente, o ganho na sensibilidade não foi significativo além da preferência em utilizar-se uma configuração simplificada do sistema SIA.

3.2.1.2. Influência da concentração do reagente molibdato de amônio

Partiu-se então para o estudo da concentração do reagente molibdato de amônio que foi aumentado para 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1}. Para a determinação de silicato na presença de fosfato, é necessária a utilização de uma concentração maior do reagente molibdato de amônio pelos seguintes motivos:

(i) Tanto na formação do fosfomolibdato como do silicomolibdato a relação estequiométrica do Mo para Si ou P é de 12:1. Ou seja, um certo volume de solução 50 mg L^{-1} de Si, cuja concentração expressa em mol L^{-1} seria 1,78 x 10^{-3}, requereria o mesmo volume dessa solução 2,13 x 10^{-2} mol L^{-1} de molibdênio para manter a relação estequiométrica.

(ii) acelerar a reação de formação do silicolibdato que é reconhecidamente mais lenta que a reação de formação do fosfomolibdato (Chalmers e Sinclair, 1966).

Utilizando-se padrões na faixa de concentração de 10 a 50 mg L^{-1} de Si contendo 2 mg L^{-1} de P, foram obtidas curvas analíticas em temperatura ambiente. Os resultados estão apresentados na Figura 20.

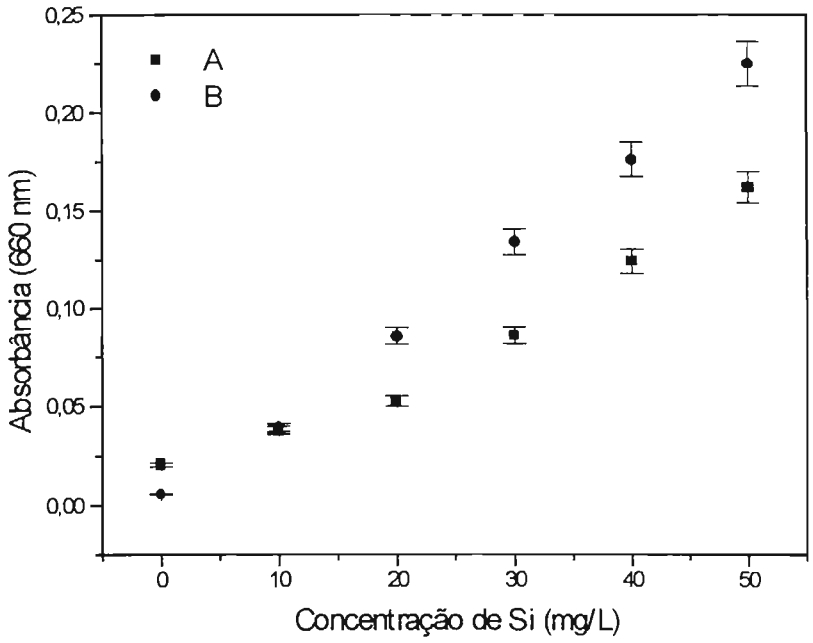


Figura 20. Influência da concentração de molibdato de amônio na determinação de silicato. Condições: (A) molibdato de amônio 5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}. (B) molibdato de amônio 1 x 10^{-2} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}. Demais condições: 10% (m/v) de ácido oxálico, ácido ascórbico 2% (m/v) contendo 100 mg L^{-1} de Sb e temperatura ambiente.

Um considerável aumento na sensibilidade foi verificado quando utilizada solução de molibdato de amônio 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}. Vale lembrar que no experimento anterior foi utilizado solução de molibdato de amônio 5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}. Como mencionado no item anterior, não foi observado sinal na determinação de silicato quando injetado o padrão de 10 mg L^{-1} de Si a temperatura ambiente. Porém, a falta do reagente molibdato de amônio também compromete a formação do silicomolibdato.

Concentração de molibdato de amônio superior a 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1} não foi verificada devido a dificuldade na dissolução do sal.

A condição adotada para contornar-se a interferência de fosfato foi: solução de ácido oxálico 10% (m/v), molibdato de amônio 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, ácido ascórbico 2% (m/v) com 100 mg L^{-1} de Sb e temperatura ambiente. Construiu-se então duas curvas de interferência de fosfato. A primeira utilizando-se padrões de 1 a 10 mg L^{-1} de P contendo 10 mg L^{-1} de Si e a segunda curva utilizando-se padrões de 10 a 40 mg L^{-1} de P contendo 40 mg L^{-1} de Si. A Figura 21 mostra o resultado obtido.

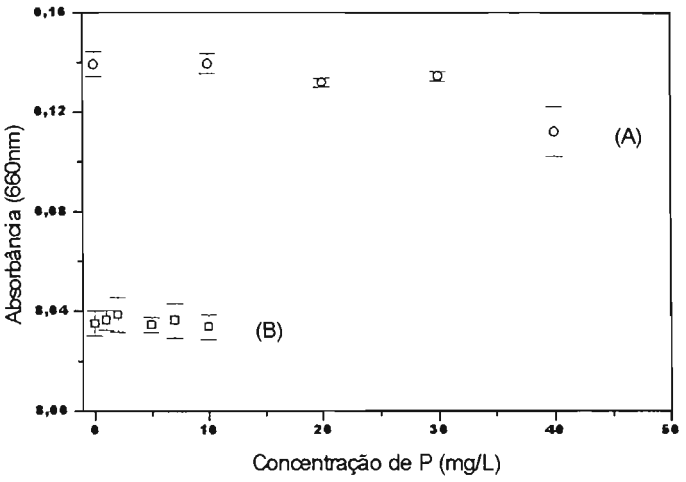


Figura 21. Interferência de fosfato na determinação de silicato. (A) soluções padrão contendo 40 mg L^{-1} de Si; (B) soluções padrão contendo 10 mg L^{-1} de Si.

Após a obtenção destes parâmetros preliminares para a determinação de silicato na presença de fosfato, partiu-se para uma nova configuração no sistema SIA, substituindo a câmara de mistura por uma bobina de mistura. Esta nova tentativa teve por finalidade diminuir a dispersão ocasionada pela câmara de mistura, revertendo em ganho na sensibilidade.

Más e colaboradores (1990) reportaram sobre a determinação simultânea de fosfato e silicato em FIA. Para tanto foi utilizada a diferença entre a cinética de formação dos dois heteropoliácidos. O ácido fosfomolibdico forma-se mais rapidamente do que o ácido silicomolibdico o que permitiu a medida de ambas as espécies em tempos diferentes utilizando-se rodamina B como agente redutor.

Mais recentemente, Mas-Torres e colaboradores (1997) propuseram análise simultânea de fosfato e silicato por Injeção Seqüencial utilizando a técnica sanduíche (Alonso-Chamarro e colaboradores, 1992) que consiste no uso de grandes volumes de amostra. A diferença entre a cinética de formação dos dois heteropoliácidos também foi utilizada levando-se em conta a acidez do meio que promove um aumento na velocidade de formação do fosfomolibdato quando este é formado em pH menor do que 0,4 (Kircher e Crouch, 1983b). Para tanto, os autores utilizaram dois grandes segmentos com 800 e 1200 μL de amostra que são intercalados por 150 μL de molibdato de amônio e 75 μL de vanadomolibdato, este preparado em HCl 0,65 mol L^{-1}, garantindo desta forma a rápida formação do fosfomolibdato.

Primeiro é obtido o sinal analítico do fosfato. O ácido oxálico destrói o fosfomolibdato formado e pode-se então registrar o sinal do silicato sem interferência do fosfato.

O procedimento proposto no presente trabalho utiliza duas seqüências distintas de operações para a determinação de fosfato e silicato. Na determinação de silicato fez-se uso de duas seqüências sanduíche, porém com o intuito de obter uma mistura eficiente das zonas de reagente e amostra. O primeiro sanduíche ocorre entre uma zona de amostra (100 μL) e duas do reagente molibdato de amônio 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1} (150 μL), visando a completa formação do silicomolibdato e fosfomolibdato, uma vez que este é mais lentamente formado quando comparado ao fosfomolibdato.

A Figura 22 mostra o resultado do estudo da sobreposição das zonas de reagente e amostra em função do volume e seqüência de aspiração de ambos. Para isso foi utilizado o corante azul de bromotimol no lugar do reagente ou da amostra e como solução transportadora utilizou-se tampão borato 0,01 mol L^{-1}. Na Figura 22 A intercalando-se 100 μL da amostra entre duas zonas de 150 μL de reagente, verifica-se a completa sobreposição da zona de amostra pelas zonas de reagente. Nestas condições, quando constroi-se a curva analítica para silicato, observa-se a faixa de resposta linear iniciando-se com a solução de Si 10 mg L^{-1}. O aumento da sensibilidade pode ser obtido aumentando o volume da amostra para 200μL. Porém, a partir da Figura 22 B observa-se que a mistura não é efetiva devido a insuficiência de reagente. Um bom resultado foi alcançado, combinando-se sensibilidade e a eliminação da interferência de fosfato, segmentando os 200 μL de amostra com 100μL de molibdato de amônio obtendo-se desta forma, uma efetiva sobreposição da zona de amostra com as zonas de reagente (Figura 22 C).

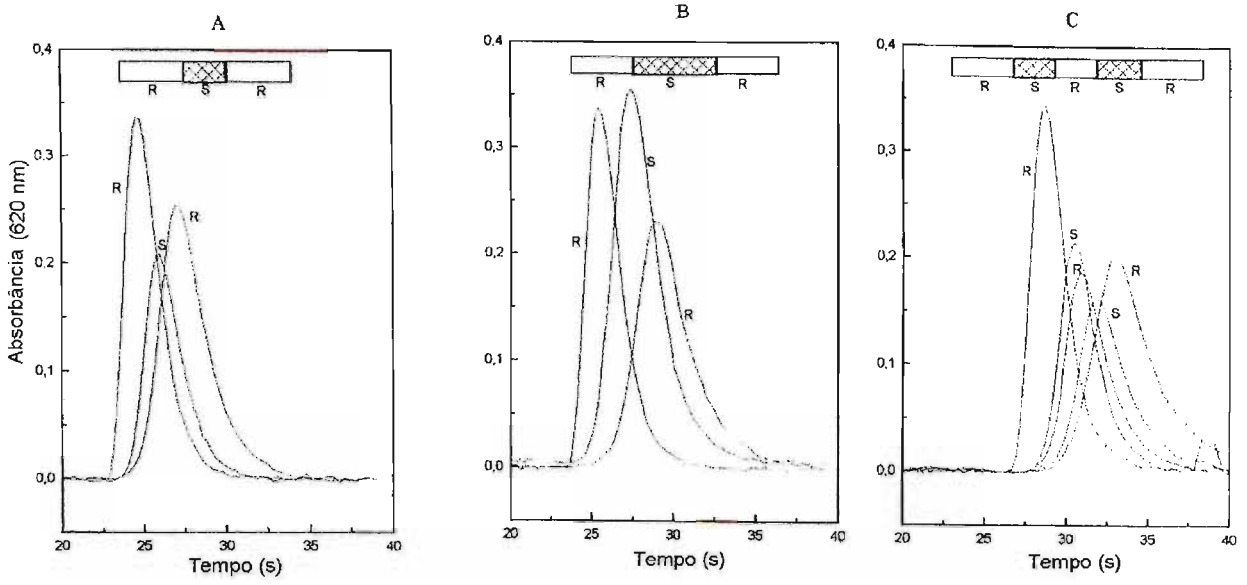


Figura 22. Interpenetração entre as zonas de amostra e reagente usando azul de bromotimol no lugar do reagente (R) e amostra (S) na bobina auxiliar da Figura 7. Seqüências: 150 μL R, 100 μL S, 150 μL R; (B) 150 μL R, 200 μL S, 150 μL R; (C) 150 μL R, 100 μL S, 100 μL R, 100 μL S, 150 μL R.

A segunda seqüência sandwich utilizada, refere-se a mistura reacional previamente preparada e o ácido oxálico, usado para destruir o fosfomolibdato. Nesta segunda seqüência sanduíche fez-se necessário duas seqüências (volume) com a mistura reacional, acompanhadas por ácido oxálico (volume) (Figura 23). Este duplo sanduíche é propulsionado para a bobina auxiliar. Nesta seqüência de etapas promove-se a interpenetração entre a zona contendo os heteropoliácidos e a zona de ácido oxálico, ocorrendo a destruição do ácido fosfomolibdico e possibilitando a determinação de silicato na presença de fosfato.

Figura 23. Esquema da seqüência sanduíche utilizada para destruição do fosfomolibdato.

Construiu-se uma curva analítica no intervalo de 5 a 50 mg L^{-1} de Si. O resultado está apresentado na Figura 24.

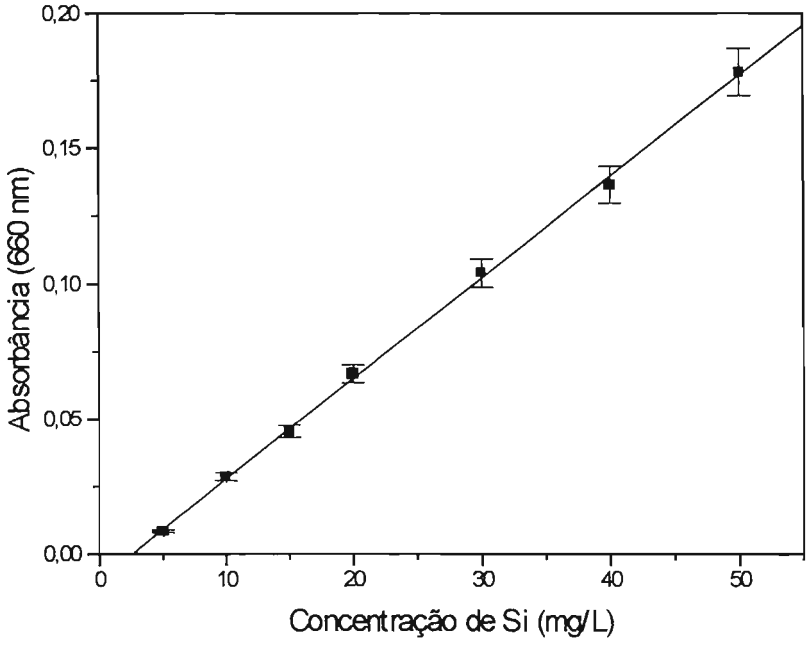


Figura 24. Curva analítica de silicato. Condições: molibdato de amônio 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, solução de ácido oxálico 10% (m/v), ácido ascórbico 2% (m/v) com 100 mg L^{-1} de Sb. y=(-0,010±0,001)+(0,00373±0,00005)x; R=0,999. Demais condições similares à Figura 7.

3.3. Determinação Seqüencial de Fosfato e Silicato

Para a construção da curva analítica de 1 a 10 mg L^{-1} de P e de 5 a 50 mg L^{-1} de Si, foram fixados os seguintes parâmetros: solução transportadora água, molibdato de amônio 5 x 10^{-3} mol L^{-1} com 0,25% (m/v) de ácido oxálico em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, molibdato de amônio 1 x 10^{-2} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, ácido oxálico 10% (m/v), ácido ascórbico 2% (m/v) com 100 mg L^{-1} de Sb, bobina coletora com 1000 μL de volume interno, bobina auxiliar e bobina de reação, vazão igual a 100 μL s^{-1} e λ = 660 nm (ver Figura 7). A Figura 25 ilustra o resultado obtido na determinação seqüencial de fosfato e silicato.

O limite de detecção foi calculado considerando três vezes o desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica somado ao sinal do branco (Miller e Miller, 1988). Para o fosfato obteve-se 0,1 mg L^{-1} e para o silicato 1 mg L^{-1}. O método tem uma freqüência de amostragem para o fosfato de 75 amostras h^{-1} e para o silicato de 40 amostras h^{-1}.

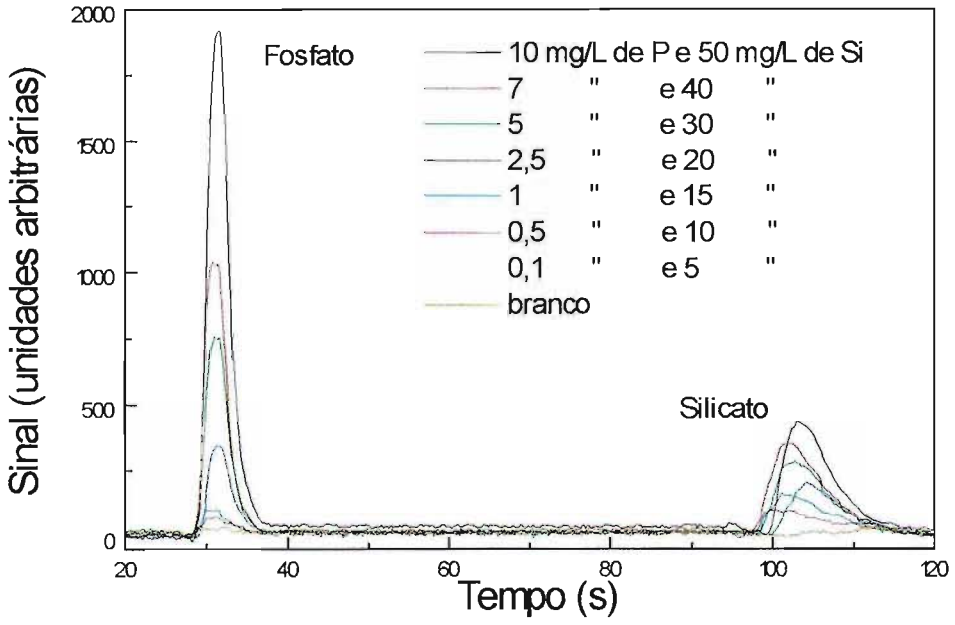


Figura 25. Registro do sinal para a determinação seqüencial de fosfato e silicato. 232 unidades arbitrárias corresponde a 0,1 unidades de absorbância.

3.4. Estudo de Interferentes

Dando prosseguimento ao estudo da determinação seqüencial de fosfato e silicato, partiu-se para o estudo de outros possíveis interferentes que podem estar presentes nas amostras de interesse, tais como, água e sedimentos. A Tabela 5 mostra possíveis íons interferentes extraíveis de extratos de sedimentos, bem como espécies solúveis na água verificados na determinação de fosfato.

Tabela 5. Efeito de possíveis interferentes na determinação de fosfato.

Espécie	Concentração (mg L^{-1})	Adicionado como	E%
Al^{3-}	50	$Al(NO_3)_3.9\ H_2O$	+1,68
Ca^{2-}	10	$CaCl_2$	-2,51
Cu^{2-}	1	$Cu(NO_3)_2.3\ H_2O$	+0,11
Fe^{3-}	10	$Fe(NO_3)_3.9\ H_2O$	+0,34
Mn^{2-}	10	$MnCl_2$	-5,59
Pb^{2-}	1	$Pb(NO_3)_2$	+0,68
Zn^{2-}	50	$Zn(NO_3)_2.6\ H_2O$	-2,79

Utilizou-se padrão 2 mg L^{-1} de P no estudo dos interferentes Al^{3+}, Ca^{2+}, Mn^{2-} e Zn^{2-}; e padrão 5 mg L^{-1} de P no estudo do restante dos interferentes, isto é, Cu^{2+}, Fe^{3+} e Pb^{2+}. Todos os padrões foram preparados em meio de HCl 0,1 mol L^{-1}, utilizando-se esta mesma solução como transportador.

Não foram realizados estudos de interferência de possíveis íons metálico na determinação de silicato, devido a necessidade da utilização de padrões em meio ácido, ocasionando desta forma a precipitação do ácido silícico.

O estudo de possíveis interferentes na determinação de fosfato, basicamente tem-se detido a íons metálicos quando a matriz de interesse trata-se de solos ou sedimentos (McLeod e Clarke, 1978). Pode-se verificar interferência na determinação de fosfato quando encontram-se presentes na amostra arsenato (0,1 mg L^{-1} As), Cr(VI) (1 mg L^{-1}) e NO_2^- (10 mg L^{-1}) (APHA, 1995).

McLeod e Clarke (1978) propuseram a determinação de fósforo em solos na presença de Fe(III) e Fe(II) utilizando solução de cloreto de hidroxilamônio na redução de Fe(III), anterior a formação do complexo azul de molibdênio. Fe(II) pode interferir quando a razão Fe/P torna-se maior que 500. Más e colaboradores (1990) verificaram a interferência de ácidos orgânicos na determinação de fosfato e silicato em água natural. Ácido oxálico não apresentou interferência na determinação de fosfato na razão de 200:1. Tartarato não interfere na razão de 10:1. Para a determinação de silicato, interferência de tartarato não foi verificada.

No estudo de interferentes realizado neste trabalho, Mn(II) apresentou erro superior a 5% quando presente na razão de 5:1. Tratando-se de um metal presente em grande quantidade em solos e sedimentos, seria interessante dar-se prosseguimento ao estudo desta interferência.

3.5. Análise de Amostras Reais

Inicialmente os métodos desenvolvidos para a determinação de fosfato e silicato por SIA foram utilizados na análise de águas e extratos de sedimentos dos reservatórios de Pirapora localizado na região metropolitana de São Paulo, reservatório de Barra Bonita, interior do estado (270 km da capital) e reservatório Billings, localizado na grande São Paulo, município de São Bernardo do Campo.

Para a análise de águas, todas as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose 0,45 μm e então analisadas pelo método convencional da APHA (1995) e posteriormente pelo método proposto. Não foi possível realizar a determinação de fosfato nas amostras de água devido sua concentração apresentar-se abaixo do limite de determinação do método proposto.

Para a determinação de silicato, os parâmetros adotados foram: solução transportadora água, molibdato de amônio 1 x 10^{-2} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}, ácido oxálico 10% (m/v), ácido ascórbico 2% (m/v) com 100 mg L^{-1} de Sb. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Determinação de silicato em água (mg L^{-1} em Si).

Amostras	APHA	SIA	E%
Billings-1	nd*	2,2	------
Billings-2	nd*	2,0	------
Pirapora-1	4,9	4,6	-6,1
Pirapora-2	4,4	5,0	+14
Barra Bonita-1	5,2	4,7	-9,6
Barra Bonita-2	5,2	5,0	-3,8

* nd: não detectado

De acordo com a Tabela 6, podemos observar que os resultados das amostras Billings-1 e Billings-2 estão fora da faixa linear abordada na construção da curva analítica. Entretanto, os valores são maiores que o limite de detecção (1 mg L^{-1} de Si). Portanto silicato foi determinado somente nas amostras provenientes de Pirapora e Barra Bonita nas concentrações de 4,8±0,2 e 4,9±0,1 mg L^{-1} respectivamente.

A análise de sedimentos foi iniciada com a extração de fósforo de acordo com o método proposto por Legg e Black (1955). Os extratos de sedimento para a determinação de fósforo total foram obtidos a partir do aquecimento das amostras em mufla a 240°C por 1 hora, seguido pelo tratamento com HCl concentrado a quente. A concentração de fosfato inorgânico foi obtida pelo tratamento direto das amostras com HCl concentrado a quente, enquanto a fração de fosfato orgânico foi obtida pela diferença entre o fosfato total e o fosfato inorgânico. Nestes extratos de sedimento foi determinado apenas o fósforo, devido ao silicato ser um dos constituintes naturais do sedimento, na forma de areia e argilas, sendo irrelevante sua determinação. Os parâmetros adotados para a determinação de fosfato: solução transportadora: água, molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1} e ácido ascórbico 2% (m/v) contendo 100 mg L^{-1} de Sb. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Determinação de fosfato em extrato de sedimentos (mg kg^{-1} em P).

Amostras	APHA (P inorg)	SIA (P inorg)	E%	APHA (P t)	SIA (P t)	E%
Pirapora-1	3494	3392	-2,9	3760	3276	-13
Pirapora-2	1973	1807	-8,4	2110	1981	-6,1
Pirapora-3	2568	2278	-11	2836	2230	-21
Pirapora-4	898	982	+9,4	1098	1039	+5,4
Pirapora-5	4084	4038	-1,1	4466	4021	-10
Pirapora-6	2607	2318	-11	2943	2498	-15
Billings-1	3854	3757	-2,5	4014	4069	+1,4
Billings-2	2997	2755	-8,1	3069	2975	-3,1

* P inorg = fosfato inorgânico; P t = fosfato total.

De acordo com a Tabela 7 verifica-se que os resultados obtidos pelo método SIA são sistematicamente menores que os obtidos pelo método da APHA.

Após realizadas as determinações preliminares de fosfato e silicato nas amostras acima mencionadas, outras determinações de fosfato e silicato foram feitas em amostras reais. Trabalhou-se com dois grupos de amostras: extratos de sedimento e cultura de algas em água do mar. Para os dois grupos de amostras, determinou-se as concentrações das espécies de interesse pelo método SIA e pelo método da APHA a fim de obter a correlação entre eles.

Extratos de sedimentos provenientes de 5 diferentes pontos do rio Tietê foram analisados pelos dois métodos, apresentados anteriormente. As amostras foram secas em estufa a 60°C por 24 horas. Em seguida foram desagregadas em almofariz de porcelana. Pesou-se (1,000 ± 0,001) g de amostra em tubos para centrífuga e adicionou-se 40 ml de solução de HCl 0,1 mol L^{-1}. Manteve-se sob agitação por duas horas a 200 rpm. As amostras foram centrifugadas e filtradas em membrana 0,45 μm e posteriormente diluídas para 100 mL com HCl 0,1 mol L^{-1}. A Tabela 8 mostra os resultados obtidos.

Tabela 8. Resultados da concentração de fosfato em amostras de extrato de sedimentos expressos em mg kg^{-1} em P.

Amostras	SIA	APHA	E%
Barra Bonita-1	51	44	+13,7
Barra Bonita-2	49	44	+10,2
Tecelagem-1	1429	1436	-0,4
Tecelagem-2	1039	1353	-3,3
Pirapora-1	356	353	+0,8
Pirapora-2	342	333	+2,6
Rasgão-1	980	1031	-5,2
Rasgão-2	963	1037	-7,7
Billings-1	907	929	-2,4
Billings-2	887	899	-1,5

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 7 e 8, é verificado maior acúmulo de fosfato nos sedimentos amostrados na represa Billings do que em Pirapora, região muito atingida por descargas de esgotos provenientes da região metropolitana de São Paulo.

A Figura 26 mostra a correlação entre os métodos APHA e SIA, referente aos resultados apresentados na Tabela 8.

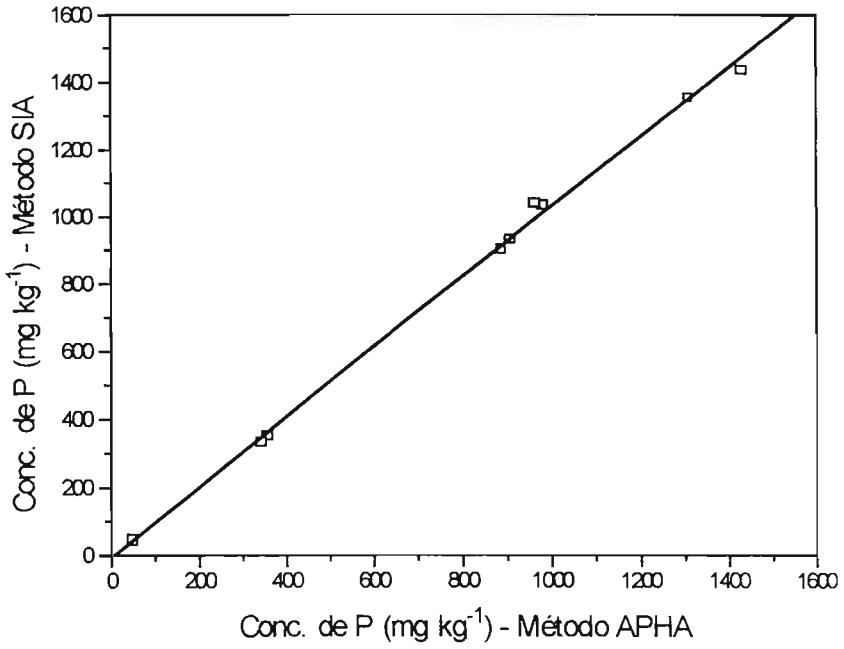


Figura 26. Correlação entre os métodos APHA e SIA para determinação de fosfato em amostras de extratos de sedimentos.

O gráfico apresentado na Figura 26 mostra a correlação entre os métodos APHA e SIA empregados na determinação de fosfato. Os valores obtidos da regressão linear indicam o valor de -7±14 para o coeficiente linear e 1,04±0,02 para o coeficiente angular. Observa-se que o valor do coeficiente linear inclui 0 e o valor do coeficiente angular inclui 1 (Miller e Miller 1988), indicando que os resultados apresentados pelos dois métodos não diferem significativamente, mostrando desta forma que o sistema SIA foi eficiente para a determinação de fosfato em extratos de sedimentos.

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos da determinação de fosfato e silicato em meio de cultura da alga *T. gracilis* em água do mar.

Tabela 9. Resultados da determinação de fosfato e silicato em culturas de algas em água do mar expressos em mg L^{-1} de P e Si.

Amostras	Fosfato			Silicato		
	SIA	APHA	E%	SIA	APHA	E%
1	0,99	0,92	+7,6	13,07	12,23	+6,87
2	0,86	0,84	+2,4	13,18	12,23	+7,77
3	0,85	1,03	-17,5	13,12	12,00	+9,33
4	0,24	0,22	+9,09	5,07	7,17	-29,3
5	0,89	0,73	+21,9	8,02	7,91	+1,39
6	0,91	0,84	+8,3	8,48	8,18	+3,67
7	0,79	0,89	-11,2	8,02	7,91	+1,39
8	0,31	0,26	+19,2	5,93	5,75	+3,13
9	0,84	0,76	+10,5	8,24	7,99	+3,13
10	0,85	0,82	+3,66	7,94	8,06	-1,49
11	0,63	0,59	+6,78	8,32	7,99	+4,13
12	0,20	0,22	-9,09	3,99	4,96	-19,6

Para a determinação de fosfato e silicato em meio de cultura de algas em água do mar, utilizou-se como solução transportadora e meio de preparo dos padrões para a construção da curva analítica, solução de NaCl 0,5 mol L^{-1} a fim de manter proximidade com a matriz em estudo.

A comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos aplicados foi feita através do teste t pareado (Miller e Miller, 1988) resultando o valor de t para o fosfato de 0,76 e o valor de t igual a 0,11 para o silicato. Estes valores, frente ao valor tabelado para 11 graus de liberdade e 95% de confiança (t = 2,18), sugerem que não há evidências de diferenças sistemáticas entre os dois métodos.

A técnica SIA pode ser uma ferramenta utilizável para estudo de velocidade de assimilação de fosfato e silicato por organismos aquáticos dentro de condições controladas, gerando dados com características de tempo real. Isto pode ser de grande utilidade para estudos de processos de eutrofização, bem como para o tratamento de águas residuais por algas que removem o excesso de nutrientes.

4. CONCLUSÕES

O sistema de análise por Injeção Seqüencial mostrou-se adequado às determinações de fosfato e silicato nas amostras estudadas, apresentando características que o tornam viável para o monitoramento destas espécies no próprio local de amostragem com características de tempo real. O sistema SIA possui uma configuração simples que facilita seu transporte e sua acomodação no lugar de trabalho, podendo ser este um transporte fluvial. Neste caso, vale a pena mencionar que o equipamento pode ser conectado à um computador lap-top e à espectrofotômetros portáteis, já disponíveis no mercado. O funcionamento do sistema de análise é possível através de uma bateria de 12 V. Outras características importantes são a versatilidade, robustez, além do sistema não necessitar de reconfiguração mecânica.

Outro tópico a ser mencionado, é o volume de efluente gerado, uma vez que atualmente, a necessidade de tratamento de resíduos é de grande importância. Numa simples comparação entre os métodos mais utilizados para a determinação de fosfato, o método da APHA (APHA, 1995) gera 4,8 x 10^{-3} mol L^{-1} de molibdato de amônio para cada 100 mL de reagente combinado preparado, suficientes para analisar 12 amostras. O sistema FIA para determinação de fosfato (Ruzicka e Hansen, 1988) possui uma freqüência de amostragem de 120 amostras h^{-1}. Este sistema despende 1,5 x 10^{-6} mols de molibdato de amônio por análise. Para o método proposto nesta tese, tem-se a geração de 3,75 x 10^{-7} mols de molibdato de amônio por amostra analisada. Podemos concluir que dentre as vantagens do sistema SIA, destacam-se a economia de reagentes e consequentemente a redução na geração de efluente.

Porém, o sistema SIA também apresenta desvantagens. Por tratar-se de um equipamento constituído por unidade única, dependendo inclusive de um software apropriado, sua utilização torna-se limitada, ao contrário do FIA, no qual uma bomba peristáltica e uma válvula de injeção são o suficiente para constituir um sistema de análise. Devido a necessidade do sistema SIA executar o programa pré-estabelecido obedecendo a seqüência de operações, isto torna sua freqüência de amostragem (75 amostras h^{-1} para fosfato) baixa quando comparado ao FIA (120 amostras h^{-1} para fosfato). A sensibilidade alcançada com o sistema SIA é 7 vezes menor que no método da APHA, o que tornou o método proposto inviável para a análise de fosfato em amostras de águas naturais dentro dos padrões ditados pela resolução CONAMA 20/1986 (0,025 mg L^{-1}).

5. PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS

5.1. Pré-concentração de Fosfato com Resina de Troca-iônica

O método SIA proposto para fosfato é aplicável a extratos de sedimento, águas residuais e cultura de algas, porém, ainda não atinge a sensibilidade para determinação nos níveis de concentração recomendados pela resolução CONAMA 20/1986 (0,025 mg L^{-1}). Neste sentido, visando o desenvolvimento da metodologia para monitoramento *in loco*, aperfeiçoamentos ainda são necessários.

A determinação de fosfato em baixas concentrações em amostras de águas naturais tem sido realizada utilizando-se técnicas de pré-concentração (Freeman e colaboradores, 1992; Reis e colaboradores, 1990). A resina com especificação AG1-X8 da Bio-Rad na forma cloreto, tem mostrado bons resultados na pré-concentração da espécie PO_4^{3-}.

Estudos preliminares para pré-concentração de fosfato em micro-coluna de troca-iônica no sistema SIA foram efetuados.

Numa primeira etapa, confeccionou-se uma micro-coluna com dimensões de 2,8 cm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno contendo a resina AG1-X8, a qual foi preenchida com o auxílio de água desionizada na sua forma original (forma cloreto). Diversos testes foram realizados acoplando-se a micro-coluna de pré-concentração no sistema SIA até estabelecer-se a primeira seqüência de operações com resposta à pré-concentração de uma solução padrão de 1 mg L^{-1} de P.

Estudou-se parâmetros como o volume de amostra injetado e o volume morto presente na micro-coluna de pré-concentração. Tendo em mãos as primeiras condições para a pré-concentração de fosfato, partiu-se para a construção da curva analítica na faixa de 0,01 a 0,1 mg L^{-1} de P. Os resultados obtidos são mostrados nas Figura 27.

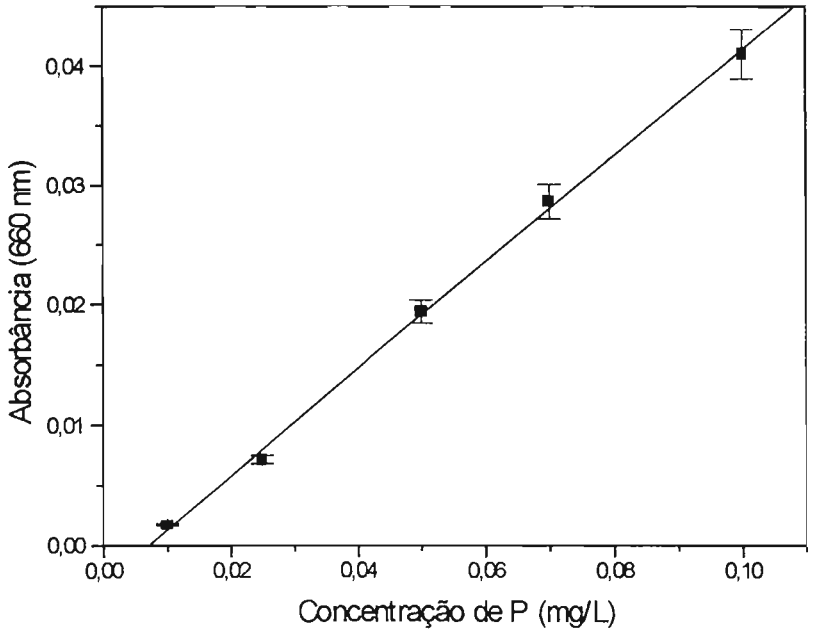


Figura 27. Curva analítica de fosfato após pré-concentração em resina de troca-iônica. Faixa de trabalho 0,01 a 0,1 mg L^{-1}. Condições: HNO_3 0,2 mol L^{-1} (solução transportadora); molibdato de amônio 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} em HNO_3 0,2 mol L^{-1}; ácido ascórbico 2% (m/v) contendo 100 mg L^{-1} de Sb; volume de amostra injetada na coluna: 1500 μL; volume morto: 130μL; volume de amostra destinado a análise: 200 μL.; Y=(-0,0031±0,0006)+(0,44±0,01)x; L.D. = 0,004 mg L^{-1};R=0,999.

Nas condições experimentais descritas na Figura 27 obteve-se o valor do limite de detecção igual a 0,004 mg L^{-1} o que viria a permitir sua aplicação no estudo de águas naturais atendendo a resolução CONAMA. Entretanto, vários estudos devem ser realizados antes de estabelecer-se o método, incluindo a investigação do processo de retenção de fosfato na coluna, bem como as condições para lavagem e pré-condicionamento da mesma entre uma amostra e outra no sistema SIA.

De acordo com os resultados preliminares, já verificamos o bom desempenho do modo de pré-concentração no sistema SIA, podendo ser aplicável a amostras de água natural dentro do limite de concentração exigido pela resolução CONAMA 20/1986.

IV. DETERMINAÇÃO DE NITRITO E NITRATO

1. INTRODUÇÃO

Níveis de nitrogênio em sistemas aquáticos, assim como o fósforo, estão intimamente ligados com o excessivo crescimento de algas. A faixa de concentração de nitrogênio total em águas pode variar desde abaixo de 0,1 mg L^{-1} para quantidades maiores que 10 mg L^{-1}, em ambientes que apresentam poluição.

As formas de nitrogênio de maior interesse em ambientes aquáticos são nitrato, nitrito, amônia e nitrogênio orgânico. Essas formas são todas interconvertidas umas nas outras e também como nitrogênio molecular. Dentre as formas no qual se encontra o nitrogênio, nitrato é usualmente encontrado em águas.

Elevados níveis de nitrato justificam o interesse clínico devido a possibilidade de ocorrer ligações deste com a metahemoglobina (síndrome do bebê azul), e câncer do tipo gástrico estomacal. A Organização Mundial da Saúde tem estipulado níveis de nitrato e amônia em águas para consumo público. Estas concentrações são apresentadas na Tabela 10 (Robards e colaboradores, 1994).

Tabela 10. Máximo de concentração admitida (MAC) para várias espécies em águas usada para consumo humano (Robards e colaboradores, 1994).

Espécie	MAC (mg L^{-1})
Nitrato	11,3
Amônia total	0,38
Nitrito	0,03
Nitrogênio Kjeldahl	1
Fosfato	1,091

O nitrogênio orgânico, ocorre de maneira natural como uréia, proteínas, peptídeos e ácidos nucléicos, assim como numerosas substâncias orgânicas sintéticas.

A Figura 28 ilustra as diferentes frações de nitrogênio em águas naturais.

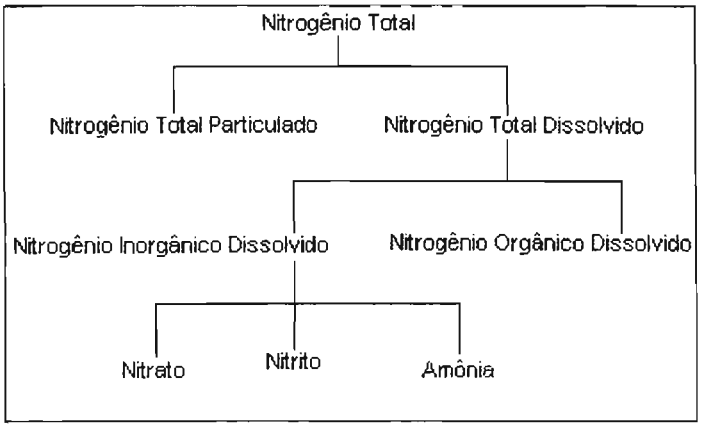


Figura 28. Especiação de nitrogênio em águas naturais.

O nitrogênio pode vir de processos normais como hidrólise da uréia e de fontes antropogênicas como uso do nitrito como inibidor de corrosão em processos industriais. Amônia é um produto do decaimento microbiológico de proteínas de plantas e animais e é aplicado diretamente ao solo como fertilizante. A presença de amônia em águas de superfície usualmente reflete na poluição de origem doméstica, contudo, sua presença em águas resulta também de processos microbiológicos. O nitrato ocorre como um estágio intermediário na decomposição microbiológica de compostos contendo nitrogênio. Bactérias convertem a amônia para nitrito sob condição anaeróbica. A forma mais oxidada do nitrogênio, comumente encontrada em águas, é o nitrato.

Sob condições aeróbicas, bactérias convertem nitrito em nitrato. Grandes quantidades de nitrato são também formadas pela conversão direta do nitrogênio atmosférico pela luz. Evidências mostram que o uso de fertilizantes é o maior contribuinte para o aumento de níveis de nitrato em rios. Muitas das partículas no solo são carregadas pela chuva e pelo solo lixiviado. O ciclo do nitrogênio no solo é extremamente complexo e a quantidade de nitrato depende de uma série de fatores, incluindo condições físicas e químicas do solo, chuva, etc.

Métodos espectroscópicos indiretos para determinação de nitrato são comumente baseados na redução a nitrito. Esses métodos utilizam redutores homogêneos como hidrazina ou titânio(III) ou redutores heterogêneos como zinco, zinco amalgamado, cádmio ou borohidreto de sódio. O nitrito produzido pela redução pode ser determinado diretamente ou sofrer uma reação de diazotação (Reação de Griess) que permite medidas a 545 nm. O procedimento de redução com cádmio é amplamente usado em sistemas automatizados com uma coluna de cádmio

cobreada (Cd-Cu) ou mais recentemente com a utilização de uma bobina de reação de cádmio cobreada (Robards e colaboradores, 1994). Sawicki e colaboradores (1963) compararam 52 métodos espectroscópicos para determinação de nitrito onde uma vasta gama de reagentes são mencionados. Devido a característica eletroativa do nitrito, este pode ser determinado por amperometria (Mori, 1998; Rocha, 2001). Porém para a determinação de nitrato a utilização de agentes redutores continuam sendo empregados, na sua maioria colunas redutoras de Cd-Cu.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e Soluções Utilizadas

A solução estoque de nitrito (100 mg L^{-1} $N\text{-}NO_2^-$) foi preparada a partir do sal nitrito de sódio e armazenada em frasco âmbar, sob refrigeração, na presença de duas gotas de clorofórmio para melhor preservação. Solução estoque de nitrato (100 mg L^{-1} $N\text{-}NO_3^-$) foi preparada utilizando-se o sal nitrato de potássio previamente seco em estufa a 110°C por 5 horas. Armazenou-se a solução em frasco de polietileno.

Para a determinação de nitrito e nitrato foram utilizados os seguintes reagentes e soluções:

1. solução transportadora: solução tampão hidróxido de amônio/cloreto de amônio (pH≈8,5), preparada a partir de 13 g do sal cloreto de amônio e 1,7 g de EDTA em balão volumétrico de 1 litro. O pH foi ajustado com hidróxido de amônio, acertando-se o menisco com água destilada.

2. reagente de Griess: preparado a partir de 5 g de sulfanilamida (SPA) em 0,3 L de HCl 1,2 mol L^{-1}. Em seguida adicionou-se 0,5 g de dicloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina (NED) ajustando-se o volume para 0,5 L.

Micro-coluna para redução foi confeccionada com a dimensão 3 cm de comprimento e 2,5 mm de diâmetro interno. Utilizou-se no preenchimento da coluna cádmio em grânulos (20-50 mesh). O cádmio metálico foi tratado previamente com HCl 2,0 mol L^{-1} e em seguida lavado com água desionizada. Na próxima etapa, adicionou-se solução de HNO_3 0,3 mol L^{-1}. Este tratamento com HNO_3 é bem rápido, seguido de lavagem abundante com água desionizada. Novamente trata-se o cádmio com HCl para remover resíduos de NO_3^-, lavando-se em seguida com água desionizada. Posteriormente, adicionou-se a esta solução 1% de $CuSO_4$ (m/v) agitando-se suavemente por três minutos. Lavou-se o cádmio cobreado com água desionizada até eliminar por completo o cobre coloidal remanescente. Em seguida os grânulos do metal tratado foram imersos em solução tampão NH_4OH/NH_4Cl, pH=8,5 em presença de EDTA.

A coluna foi preenchida tapando-se uma das extremidades com flocos de lã de vidro, e com o auxílio de um conta gotas, preencheu-se o interior da mesma com a solução tampão NH_4OH/NH_4Cl, pH=8,5. Posteriormente, utilizou-se uma espátula a fim de se transferir o metal para dentro da coluna, tomando-se o cuidado para que esta permanecesse sempre preenchida com

a solução tampão. Após o preenchimento da coluna, colocou-se flocos de lã de vidro na outra extremidade para impedir a saída do metal. Às extremidades da coluna, foram conectados tubos de teflon (≈ 4cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno) para obter-se uma melhor adaptação destas à porta a ser utilizada na válvula seletora.

2.2. Procedimento

2.2.1.Determinação seqüencial de nitrito e nitrato

Para a determinação seqüencial de nitrito e nitrato foi utilizada a configuração do sistema SIA mostrado na Figura 29.

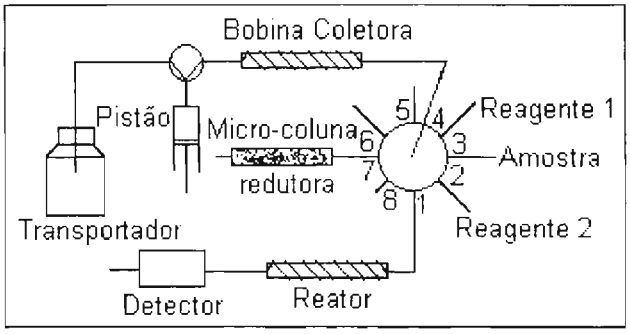


Figura 29. Esquema utilizado para a análise de nitrito e nitrato com coluna redutora de Cd-Cu. Características do sistema: bobina coletora (comprimento = 3 m; diâmetro interno = 0,8 mm); bobina de reação (comprimento = 50 cm; diâmetro interno = 0,8 mm); vazão = 100 μL s^{-1}; cela de fluxo de quartzo (V = 80 μL); λ=540 nm. Solução transportadora: solução tampão NH_4OH/NH_4Cl pH=8,5 com EDTA; Reagente 1: solução regeneradora HCl 0,1 mol L^{-1}; Reagente 2: reagente de Griess; coluna (comprimento = 4 cm; diâmetro interno = 2,5 mm).

Para tanto utilizou-se a seqüência de operações descrita abaixo:

1- O pistão aspira 1500 μL de solução transportadora para dentro da seringa.

2- A válvula seletora é posicionada na porta 2. O movimento reverso do pistão aspira 100 μL de reagente para a bobina coletora.

3- A porta 3 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 350 μL de amostra para a bobina coletora.

4- A válvula seletora conecta a bobina coletora ao reator, e um movimento avante do pistão propulsiona a mistura reacional ao detector e descarte.

5- O pistão aspira 2600 μL de solução transportadora para dentro da seringa.

6- A porta 3 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 500 μL de amostra para a bobina coletora.

7- A porta 7 é selecionada. O movimento avante do pistão propulsiona 550 μL de amostra para dentro da coluna com vazão de 50 μL s^{-1}.

8- O pistão aspira 100 μL de volume morto da porta 7 para a bobina coletora com vazão de 50 μL s^{-1}.

9- A porta 6 é selecionada. O movimento avante do pistão propulsiona 130 μL da bobina coletora para o descarte.

10- A porta 2 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 100 μL de reagente para a bobina coletora.

11- A porta 7 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 350 μL de amostra já reduzida para a bobina coletora com vazão de 50 μL s^{-1}.

12- A válvula seletora conecta a bobina coletora ao reator e um movimento avante do pistão propulsiona 1600 μL do carregador e a mistura reacional ao detector e descarte.

13- A porta 7 é selecionada. O pistão propulsiona 1000 μL de solução tampão para a coluna com vazão de 50 μL s^{-1}, lavando-a para a próxima análise.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.Otimização do Sistema para Determinação de Nitrito e Nitrato.

A determinação de nitrito, baseou-se na reação de diazotação deste com a sulfanilamida (SPA) seguido de acoplamento com o reagente N-(1-naftil)etilenodiamina (NED) cujo produto possui forte coloração róseo detectado em 540 nm. A Figura 30 mostra o esquema da reação para formação do azo-composto.

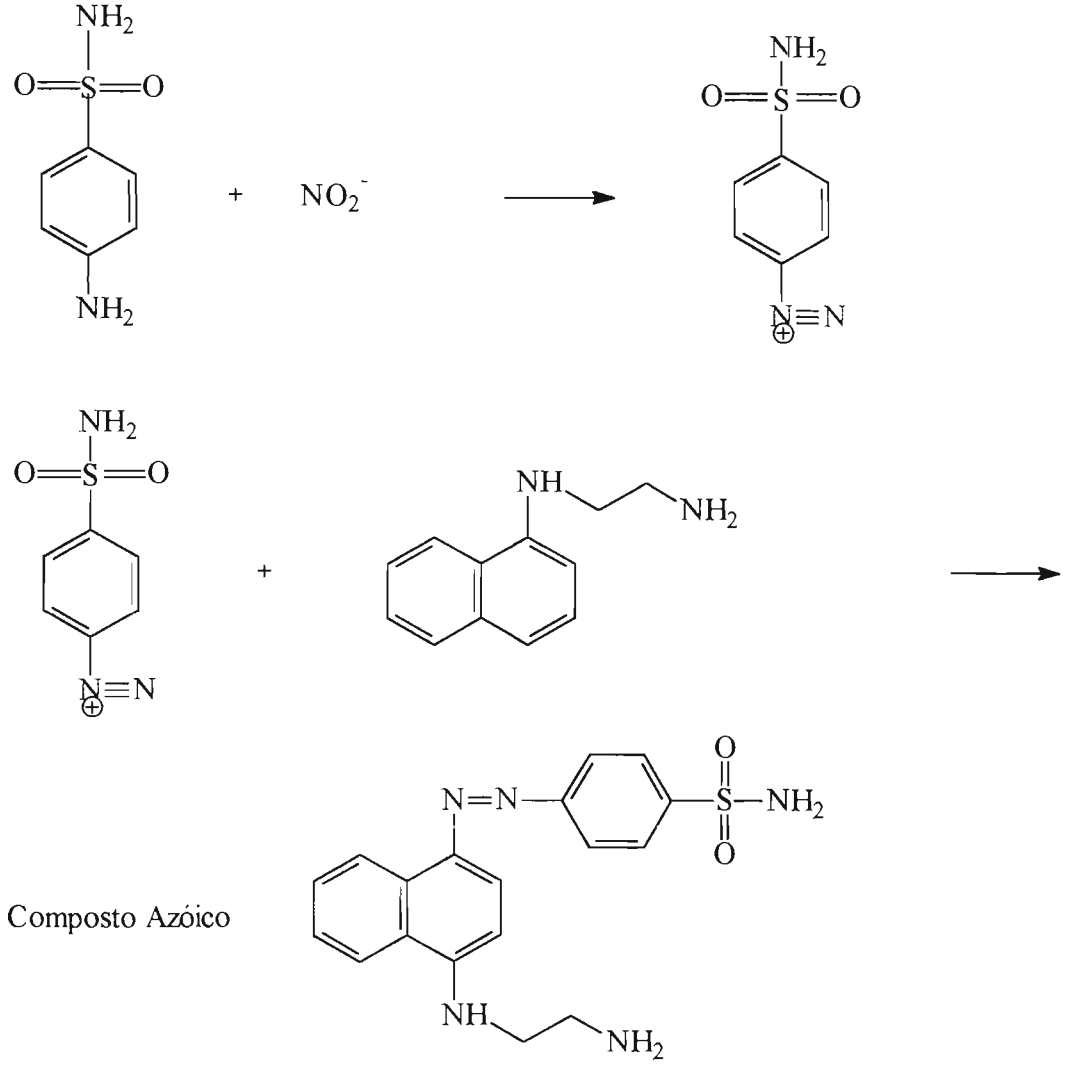


Figura 30. Esquema da reação química para formação do azo-composto.

Para obter-se as melhores condições na determinação seqüencial de nitrito e nitrato, foram verificados parâmetros como volume de amostra, volume de reagente e volume morto. No que diz respeito à configuração do sistema SIA, deu-se maior atenção ao percurso analítico (bobina de reação).

Para a otimização da determinação de nitrito utilizou-se padrão 0,2 mg L^{-1} de NO_2^--N em solução tampão NH_4OH/NH_4Cl, pH=8,5 devido à necessidade em manter-se o sistema em pH alcalino, visando posterior utilização da micro-coluna de Cd-Cu, que necessita permanecer em pH=8,5 a fim de conservar-se seu bom desempenho.

Partiu-se inicialmente de 100 µL de reagente colorimétrico (SPA+NED), 300 µL de padrão e percurso analítico de 76 cm. Mantendo-se fixo o volume de amostra, variou-se o volume de reagente na faixa de 50 a 400 µL. Acima de 200 µL de reagente não foi observado melhora significativa do sinal. Em seguida variou-se o volume do padrão na faixa de 100 a 400 µL, mantendo-se constante o volume de reagente em 100 µL. A melhor condição observada para a determinação de nitrito ocorreu em 100 µL de reagente e 350 µL de padrão. A Figura 31 ilustra a otimização do volume de amostra.

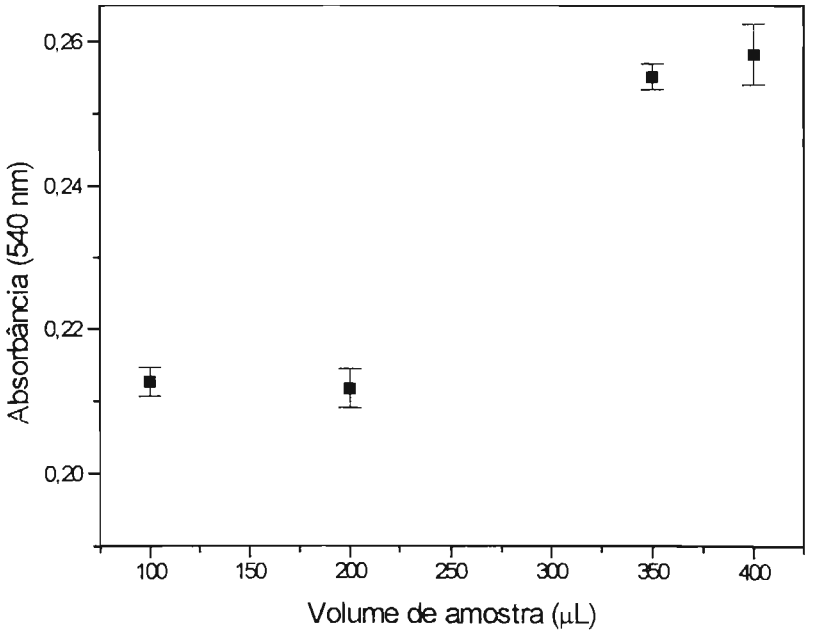


Figura 31. Influência do volume de amostra (V_S). Condições: V_R =100 µL; padrão de controle 0,2 mg L^{-1} de N-NO_2^-.

Mantendo-se fixa esta condição, variou-se o percurso analítico utilizando-se bobinas de reação de 100 cm e 50 cm de comprimento. O melhor resultado foi obtido com percurso analítico de 50 cm.

No sentido de verificar a extensão com que a reação procede no sistema efetuou-se uma etapa de "stopped-flow" que consiste em parar o fluxo no momento em que a zona reacional passa pelo detector. Através desta parada de fluxo, pode-se observar a continuidade da reação indicada pelo aumento do sinal até a sua chegada ao equilíbrio. Vale mencionar os volumes das soluções utilizadas na etapa de "stopped-flow": 1500 μL de solução transportadora, 350 μL de amostra e 100 μL de reagente. A Figura 32 mostra a etapa de "stopped-flow" para a reação de determinação de nitrito.

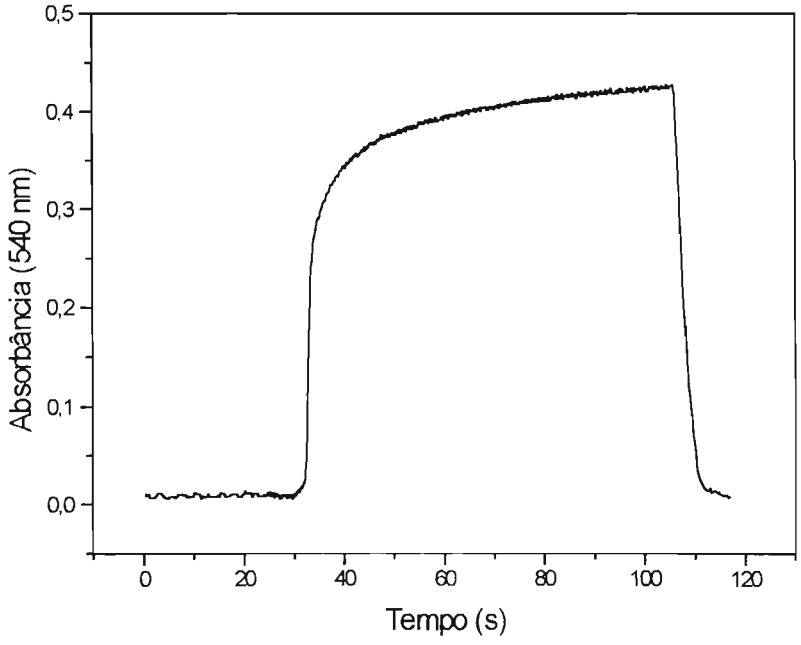


Figura 32. Sinal analítico para a determinação de nitrito. Parada de fluxo com o tempo de 80 s. Condições: Volume de transportador = 1500 μL; V_R = 100 μL; V_S = 350 μL.

A parada de fluxo ocorreu após 30 segundos ao qual iniciou-se a detecção. A zona reacional permaneceu no interior da cela de fluxo por 80 segundos, reiniciando-se a injeção da solução transportadora remanescente na seringa através da bobina de reação, detector e descarte. De acordo com o gráfico apresentado na Figura 32, o sinal analítico do nitrito está aumentando no tempo, não sendo observado o patamar de equilíbrio. Este resultado evidencia que o sistema para determinação de nitrito pode ainda ser otimizado a fim de obter-se maior sensibilidade. Entretanto, o ganho de sinal após 60 segundos de parada de fluxo não excedeu 30% em relação àquele observado em fluxo contínuo. Como o ganho de sinal foi pequeno, enquanto a queda na freqüência analítica foi significativa, optou-se por dar continuidade aos estudos sem aumentar o tempo de residência da zona de amostra no sistema.

Para a análise simultânea de nitrito e nitrato, a utilização de colunas contendo o metal cádmio cobreado tem sido muito explorada (Guiné e colaboradores, 1980). O cádmio reduz o nitrato presente na amostra a nitrito, e desta forma, pode-se então usar a reação de diazotação que permite medidas a 540 nm. O cádmio utilizado deve ser granulado (20-50 mesh), o que implica em uma maior superfície de contato que resultará em um rendimento aceitável. O cobre age como catalisador da reação de redução (Margeson e colaboradores, 1980). Bermudez e colaboradores (1988) reportaram que a eficiência na redução da coluna de cádmio cobreada decresce depois de 40 a 50 minutos. van Staden e colaboradores (1986) sugerem que o uso de uma coluna de cobre incorporada ao sistema de análise em fluxo antes da coluna cobreada, não somente melhora o rendimento ao longo da sua utilização, como estende o tempo de vida útil da mesma. A reação para redução do NO_3^- a NO_2^- é mostrado a seguir (Margeson e colaboradores, 1980):

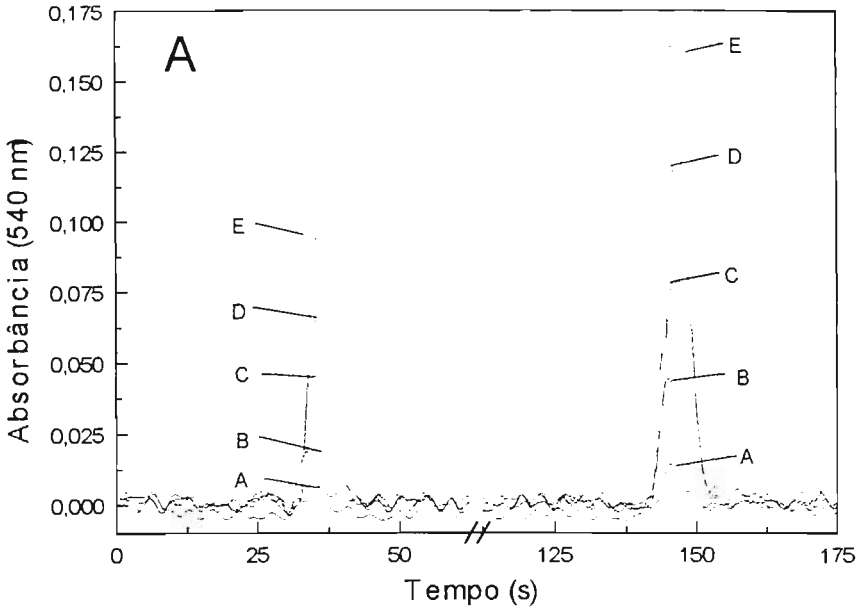
$$NO_3^- + H_2O + EDTA^{4-} + Cd^0 \rightarrow NO_2^- + 2OH^- + Cd(EDTA)^{2-}$$

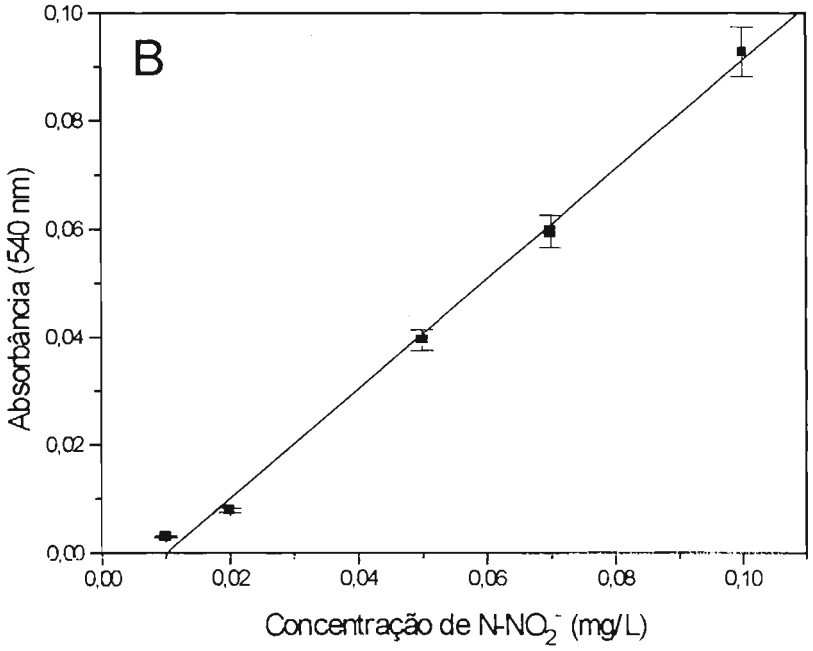
A coluna deve ser mantida em pH alcalino durante a redução para estabilizar a formação do NO_2^-, e o EDTA é adicionado para quelar os íons Cd^{2+}. Quando na ausência de EDTA, $Cd(OH)_2$ poderá precipitar na coluna e impedir o fluxo de soluções.

Após a otimização da reação para a determinação de nitrito, partiu-se para a otimização da reação de redução de nitrato a nitrito utilizando-se coluna redutora de Cd-Cu. Foi utilizado padrão de 0,2 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_2^-$ /$N\text{-}NO_3^-$ em solução tampão NH_4OH/NH_4Cl, pH=8,5 contendo EDTA. Inicialmente partiu-se de 500 μL do padrão, sendo este volume injetado na coluna. Em

seguida, 350 μL do produto da redução foram aspirados à bobina coletora para posterior análise. Almejando-se ganho de sinal, descartou-se o volume morto existente entre a coluna redutora e a válvula seletora. Estes três parâmetros foram variados a fim de obter-se maior sinal na análise. O volume de amostra injetada na coluna, manteve-se na faixa de 500 a 800 μL. A utilização de um grande volume de amostra (padrão) injetado no interior da coluna para a determinação de nitrogênio total (nitrito mais nitrato), deve-se ao processo de dispersão que a amostra sofre no interior da coluna. O volume do padrão a ser aspirado do interior da coluna após sua redução foi mantido em 350 μL, mantendo-se desta forma os mesmos volumes utilizados inicialmente para a determinação de nitrito. O volume morto variou de 100 a 180 μL. O melhor sinal foi obtido eliminando-se 100 μL de volume morto.

Obteve-se a seqüência de operações descrita no ítem 2.2.1 após a otimização do sistema para determinação seqüencial de nitrito e nitrato. A Figura 33 ilustra o registro do sinal obtido nesta determinação.





(Ver legenda na página 82)

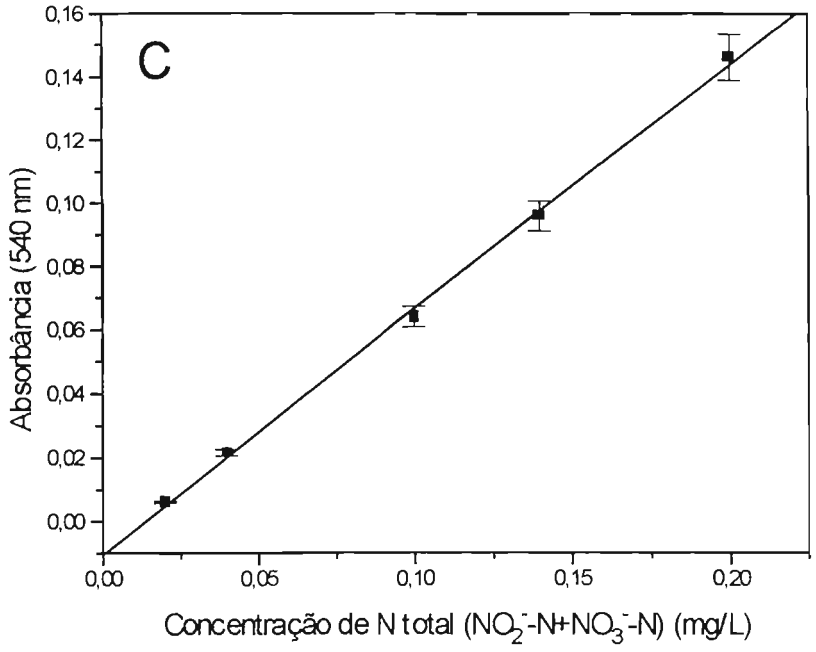


Figura 33. A: Registro do sinal para a determinação seqüencial de nitrito e nitrato. B: Curva analítica de N-NO_2^-. Y=(-0,010±0,002)+(1,01±0,03)X, R=0,998, L.D.=0,006 mg L^{-1} N-NO_2^-; C: Curva analítica do N total: Y=(0,072±0,003)+(0,74±0,03)X, R=0,997, L.D.=0,018 mg L^{-1} N-NO_3^-.

Oms e colaboradores (1995) propuseram a determinação seqüencial de nitrato e nitrito utilizando sulfato de hidrazina na presença de $CuSO_4$ como redutor. Este procedimento requer banho termostatizado a 40°C, permitindo, assim, que o nitrato contido na amostra, seja reduzido a nitrito. Após concluída esta etapa a mistura reacional e o reagente cromogênico (SPA+NED) são aspirados para a bobina coletora e posteriormente, enviados para o detector (λ = 540 nm). O limite de detecção obtido foi de 0,07 mg L^{-1} para o nitrito e 0,2 mg L^{-1} para o nitrato. Porém, a configuração do sistema SIA apresentado, torna-se um tanto complexa com a utilização do banho termostatizado, o que não seria adequado ao monitoramento *in loco*. Mais recentemente, Cerdà e colaboradores (1998), propuseram o emprego da técnica sanduíche (Alonso-Chamarro e colaboradores, 1992) na determinação seqüencial de nitrito e nitrato utilizando-se coluna redutora de cádmio cobreado. Neste trabalho, uma zona de 50 µL de reagente cromogênico é aspirada para uma bobina de reação. Um grande volume de amostra (1800 µL) é aspirado para a bobina coletora passando parte dela através da coluna redutora onde o nitrato é convertido em nitrito. Em seguida, com reversão do fluxo, 1840 µL de amostra são injetados na bobina de reação e

finalmente completa-se a zona reacional com 80 μL de reagente cromogênico. Nota-se uma zona de "sanduíche" entre a amostra parcialmente reduzida e as duas zonas de reagente cromogênico. Os limites de detecção foram 0,0014 mg L^{-1} para o $N\text{-}NO_2^-$ e 0,0063 mgL^{-1} para o $N\text{-}NO_3^-$.

3.2. Ensaio de Repetibilidade

3.2.1. Repetibilidade das curvas analíticas

A repetibilidade das curvas analíticas para a determinação de nitrito e nitrato foi observada através da reprodução das curvas analíticas. Esta reprodução foi realizada em dias consecutivos na mesma faixa de concentração. A faixa de concentração estudada foi de 0,01 a 0,1 mg L^{-1} $N\text{-}NO_2^-$ /$N\text{-}NO_3^-$. As Figuras 34 e 35 mostram os resultados obtidos.

Podemos notar a boa repetibilidade das curvas analíticas para a determinação de nitrito (Figura 34) e nitrogênio total (Figura 35). Observa-se a curva do quarto dia deslocada das demais, apresentando uma menor inclinação. Pode-se atribuir este fato ao deterioramento das soluções padrão, uma vez que soluções contendo nitrito são instáveis.

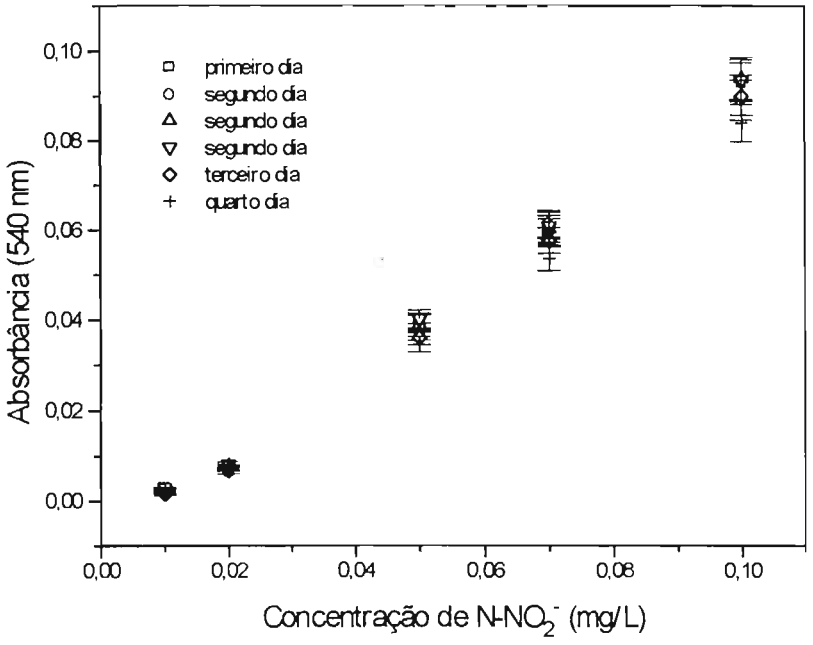


Figura 34. Ensaio da repetibilidade da curva analítica de nitrito em 4 dias consecutivos utilizando-se os mesmos padrões.

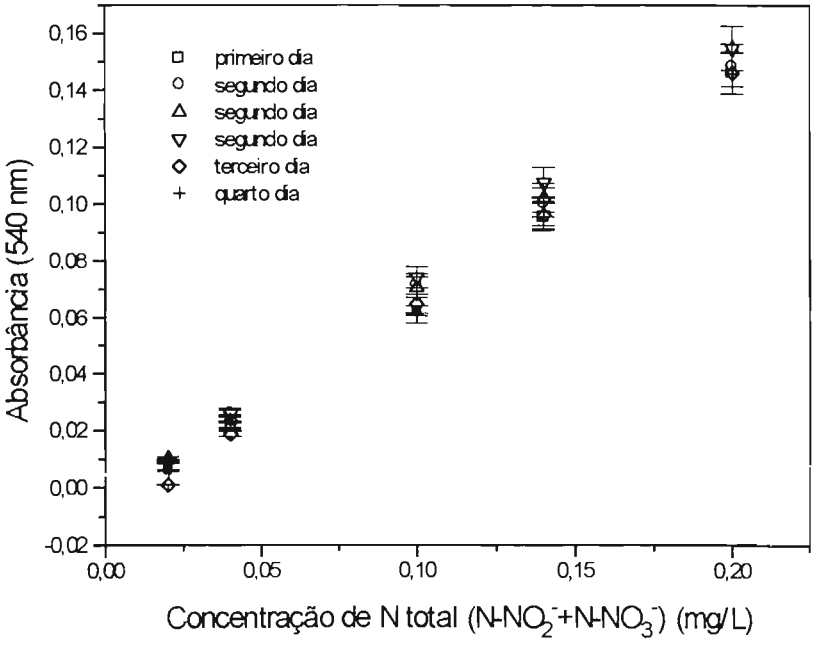


Figura 35. Ensaio da repetibilidade da curva analítica de N total em 4 dias consecutivos utilizando-se os mesmos padrões.

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos das curvas analíticas.

Tabela 11. Resumo das curvas analíticas.

Curvas	Coeficiente Linear (UA)		Coeficiente Angular ($L\ mg^{-1}$)		R	
	NO_2^-	N t*	NO_2^-	N t*	NO_2^-	N t*
(1) primeiro dia	-0,010±0,002	-0,011±0,002	1,01 ±0,03	0,77±0,02	0,998	0,999
(2) segundo dia	-0,011±0,002	-0,005±0,001	1,00±0,04	0,77±0,01	0,998	0,999
(3) segundo dia	-0,011±0,002	-0,007±0,002	1,03±0,03	0,80±0,02	0,998	0,999
(4) segundo dia	-0,010±0,002	-0,0066±0,0005	1,02±0,03	0,809±0,004	0,999	0,999
(5) terceiro dia	-0,011±0,002	-0,014±0,001	0,99±0,04	0,799±0,008	0,998	0,999
(6) quarto dia	-0,010±0,002	-0,011±0,003	0,92±0,03	0,77±0,02	0,999	0,998

*N t = NO_2^- + NO_3^-

Calculando-se a média dos parâmetros das curvas, o valor encontrado para o coeficiente linear médio do NO_2^- foi -0,010±0,002 UA e para o N t (NO_2^- + NO_3^-) foi -0,009±0,002 UA. O coeficiente angular médio para o NO_2^- apresentou valor de 1,00±0,03 L mg^{-1} e para o N t (NO_2^- + NO_3^-) valor de 0,79±0,01 L mg^{-1} . Os desvios padrão relativos das inclinações foram 4,0 e 1,8% para NO_2^- e N t (NO_2^- + NO_3^-), respectivamente, indicando a repetibilidade do método em diferentes dias de trabalho.

O desempenho da coluna de Cd-Cu foi acompanhado a cada execução das curvas analíticas, sendo avaliado o seu rendimento antes e depois da construção da curva analítica. A Tabela 12 mostra os resultados obtidos.

Tabela 12. Rendimento da coluna de cádmio cobreada antes e depois da construção das curvas analíticas.

Curva Analítica	Rendimento (%)		
	Antes	Após	Diferença
(1) primeiro dia	78,6	84,41	+5,81
(2) segundo dia	84,41	80,05	-4,36
(3) segundo dia	80,05	83,19	+3,14
(4) segundo dia	83,19	86,64	+3,45
(5) terceiro dia	79,58	82,04	+2,46
(6) quarto dia	81,79	81,49	-0,3

Utiliza-se na coluna a reversão do fluxo constantemente, que evita a compactação do metal como ocorre no caso do fluxo unidirecional, melhorando desta forma a repetibilidade das curvas analíticas (Bermudez e colaboradores, 1988).

Tal comportamento é de extrema importância na otimização deste sistema para o monitoramento de nitrato e nitrito em águas naturais devido a sua praticidade que é qualidade fundamental no trabalho *in loco*.

3.2.2. Comportamento da coluna redutora

A fim de verificar o comportamento da coluna redutora de Cd-Cu no período de um dia de trabalho, executou-se o programa para determinação simultânea de nitrato e nitrito utilizando-se como padrão de controle solução 0,1 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_2^-/N\text{-}NO_3^-$ a qual foi avolumada usando-se 75% do volume total do balão volumétrico com solução tampão de NH_4OH/NH_4Cl, pH=8,5 (APHA, 1995).

Primeiramente, registrou-se o sinal do branco, composto por 25% (v/v) de água desionizada e 75% (v/v) de solução tampão NH_4OH/NH_4Cl, pH=8,5. Em seguida o rendimento da coluna foi verificado utilizando-se um padrão contendo 0,1 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_2^-$ e outro contendo 0,1 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_3^-$, ambos na mesma composição do branco. Injetou-se o padrão de

controle 80 vezes. Ao final repetiu-se a injeção do branco e posteriormente os dois padrões para cálculo do rendimento da coluna. A Figura 36 mostra o resultado obtido.

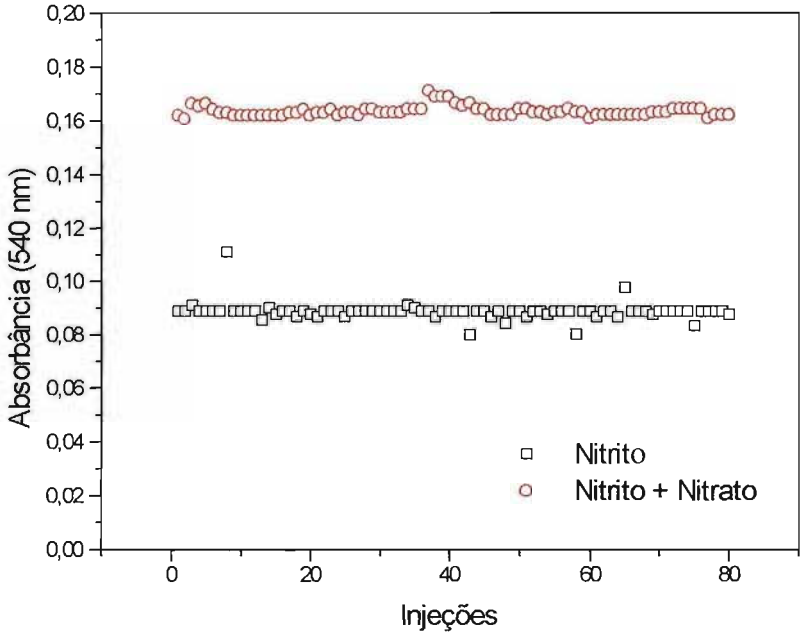


Figura 36. Comportamento da coluna de Cd-Cu utilizando-se padrão de controle 0,1 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_2^-/N\text{-}NO_3^-$ em solução tampão NH_4OH/NH_4Cl, pH=8,5.

Observa-se na Figura 36, a boa reprodutibilidade do sinal nas diferentes injeções. Após 80 injeções do padrão de controle, o rendimento da coluna apresentou uma pequena variação de 1,68%, o que comprova sua estabilidade.

A fim de aumentar a praticidade do método, partiu-se para o emprego de padrões de nitrato e nitrito utilizando-se água desionizada no preparo das soluções padrão ao invés de solução tampão de NH_4OH/NH_4Cl, pH=8,5 contendo EDTA.

Repetiu-se o experimento anterior, utilizando-se padrão de controle de $N\text{-}NO_2^-/N\text{-}NO_3^-$ 0,1 mg L^{-1} em água desionizada. O resultado pode ser verificado na Figura 37. O rendimento da coluna foi registrado antes e após as sucessivas injeções do padrão de controle. Foram feitas 78 injeções. O rendimento da coluna apresentou uma variação de –1,46% ao término do experimento. A Tabela 13 mostra a comparação entre os dois experimentos ilustrados nas duas Figuras anteriores a fim de avaliar o comportamento da coluna redutora de Cd-Cu.

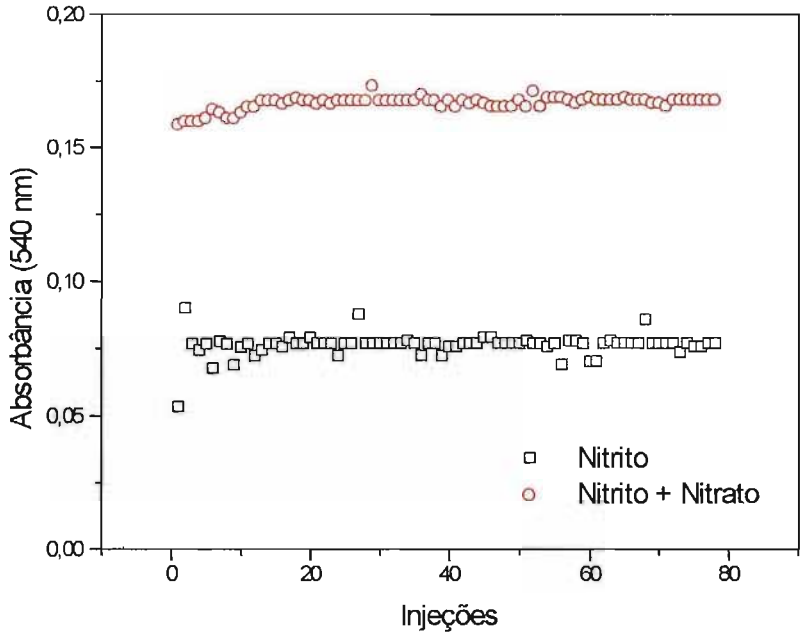


Figura 37. Comportamento da coluna de Cd-Cu utilizando-se padrão de controle 0,1 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_2^-/N\text{-}NO_3^-$ em água.

Tabela 13. Resultados obtidos na avaliação do comportamento da coluna de Cd-Cu para os diferentes padrões de controle.

Padrão	N° de injeções	Δ rendimento	$M^{\#}$(UA)		DPR(%)	
			NO_2^-	N t*	NO_2^-	N t*
Em tampão	80	+1,68%	0,089	0,164	0,34	0,19
Em água	78	-1,46%	0,076	0,167	0,41	0,25

*N t = nitrito + nitrato; $M^{\#}$ = média aritmética do sinal obtido

De acordo com os resultados obtidos para os dois padrões de controle podemos concluir que a utilização de padrões de nitrito e nitrato preparados em água desionizada não altera o desempenho da coluna redutora de Cd-Cu, além de oferecer maior praticidade para o monitoramento das espécies de interesse *in loco*.

3.3. Estudo de Interferentes

Foram realizados estudos de interferentes na determinação seqüencial dos íons nitrito e nitrato. Para tanto utilizou-se padrão de controle 0,1 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_2^-$ e $N\text{-}NO_3^-$. A Tabela 14 mostra os resultados obtidos.

Tabela 14. Efeito de possíveis interferentes na determinação de nitrito e nitrato.

Espécie estudada	Concentração (mg L^{-1})	Adicionado como	E%(NO_2^-)	E%(N t*)
Na^+	1000	NaCl	-2,8	+0,13
Cl^-	1000	NaCl	-2,8	+0,13
PO_4^{3-}	25	KH_2PO_4	-3,5	-0,92
K^+	25	KH_2PO_4	-3,5	-0,92
Mg^{2+}	500	$MgSO_4$	-4,2	-4,2
SO_4^{2-}	500	$MgSO_4$	-4,2	-4,2
Cu^{2+}	50	$CuSO_4$	-9,4	-0,52
Ni^{2+}	10	$NiSO_4$	-1,6	+7,2
MON#	5	Ácido húmico	+4,5	+4,4
MON	10	Ácido húmico	+4.5	+4,4
Fe^{3+}	0,2	$FeNH_4(SO_4)_2.12H_2O$	-8,5	-15,3
Fe^{3+}	3	$FeNH_4(SO_4)_2.12H_2O$	-4,9	-83,5
Fe^{2+}	0,2	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$	-22,3	-17,5
Fe^{2+}	3	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$	-38,0	-86,1
Mn^{2+}	25	$MnCl_2$	+4,6	+5,7

*N t = nitrito + nitrato; #MON = Matéria Orgânica Natural

O íon cobre pode causar erro negativo para nitrito devido sua ação catalítica na decomposição do sal de diazônio. Na determinação de nitrogênio total, ferro, cobre e outros metais podem reduzir a eficiência da coluna. (APHA, 1995).

Pode-se observar que os íons Na^+, Cl^-, PO_4^{3-}, K^+, Mg^{2+}, SO_4^{2-} e Mn^{2+} que podem ser considerados como constituintes em águas naturais não apresentaram efeitos que causassem variação de altura de pico maior que ±5% no sinal de nitrito e nitrogênio total.

A Tabela 14 mostra a ausência de interferência quando o íon fosfato está presente em grande quantidade (25 mg L^{-1}). Entretanto, Cerdà e colaboradores, (1998) depararam-se com uma acentuada interferência causada pelo íon fosfato, ainda que em baixa concentração (1 mg L^{-1}), resultando numa diminuição do sinal. A magnitude da interferência mostrou-se proporcional ao tempo de contato entre o íon PO_4^{3-} e a coluna, atingindo perda de 50% do sinal após 10 injeções sucessivas da amostra. Skicko e Tawfik (1988) reportaram que além do fator tempo de contato da amostra com a coluna, o número de amostras consecutivas e a concentração dos íons fosfato a que a coluna é exposta, influenciam na perda da sua eficiência. Estes autores propuseram a precipitação prévia de fosfato com cloreto de cálcio, evitando desta forma que o ânion entre em contato com a coluna redutora. No presente trabalho, não observou-se efeito significativo da interferência de fosfato.

A influência da matéria orgânica natural (MON) foi estudada adicionando-se ao padrão de controle sal sódico de ácido húmico em concentrações próximas ao encontrado em águas naturais, na faixa de 2 a 5 mg L^{-1} de carbono (5 a 10 mg L^{-1} de matéria húmica). Observou-se um decréscimo no sinal de nitrito e nitrato de 4%, porém, após 10 injeções não foi observada mudança no comportamento da coluna redutora.

A interferência dos íons metálicos Fe^{2+} e Fe^{3+} está relacionada às reações redox entre as espécies na amostra ou na zona de reação.

Outro possível interferente em águas residuais ou ambientes anóxidos é o sulfeto podendo causar interferência na determinação destas espécies, uma vez que este ânion na presença de íons nitrato em meio ácido sofre oxidação, promovendo a redução dos íons nitrato. Os íons sulfeto também podem afetar o rendimento da micro-coluna de cádmio cobreada, ocorrendo a precipitação de CdS o que leva à diminuição da taxa de conversão de nitrato a nitrito. Testou-se a interferência de sulfeto em soluções padrão contendo 0,5 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_2^-/N\text{-}NO_3^-$ separadamente, contendo diferentes concentrações de sulfeto. A Tabela 15 mostra os resultados obtidos para o teste de interferência de sulfeto na determinação de nitrogênio total.

Tabela 15. Interferência de sulfeto na determinação de nitrogênio total.

$[S^{2-}]$ (mg L^{-1})	Sinal de N t* (UA)	DPR%	Diferença de sinal
0,00	0,460	0	———
0,01	0,465	2,3	+0,9%
0,025	0,452	0	-2,0%
0,05	0,449	0,4	-3,0%
0,1	0,470	0	+1,9%
0,25	0,460	0	0
0,5	0,465	0,6	+0,9%
5,0	0,412	1,0	-10,6%

Quando adicionado sulfeto na faixa de concentração de 0,01 a 0,5 mg L^{-1}, não é observada interferência na determinação dos íons de interesse. Utilizando-se solução de 0,5 mg L^{-1} de N-NO_3^- contendo 0,5 mg L^{-1} de S^{2-} verificou-se estabilidade na micro-coluna redutora de cádmio cobreada.

Contudo, para soluções de nitrato contendo concentrações iguais ou acima de 5,0 mg L^{-1} de sulfeto, verifica-se um acentuado decréscimo do sinal referente ao nitrogênio total. Devido a este problema, adicionou-se uma etapa extra para lavagem da micro-coluna com solução de HCl 0,1 mol L^{-1} anterior à lavagem da mesma com solução tampão NH_4OH /NH_4Cl. Porém, iniciando-se sucessivas lavagens da micro-coluna no final de cada determinação de nitrito e nitrato, retoma-se a estabilidade de seu comportamento, verificando-se uma perda de 10% no sinal, o que pode eventualmente ser explicado pela redução do nitrato pelo H_2S no meio no qual ocorre a reação de diazotação. A Figura 38 mostra o resultado obtido.

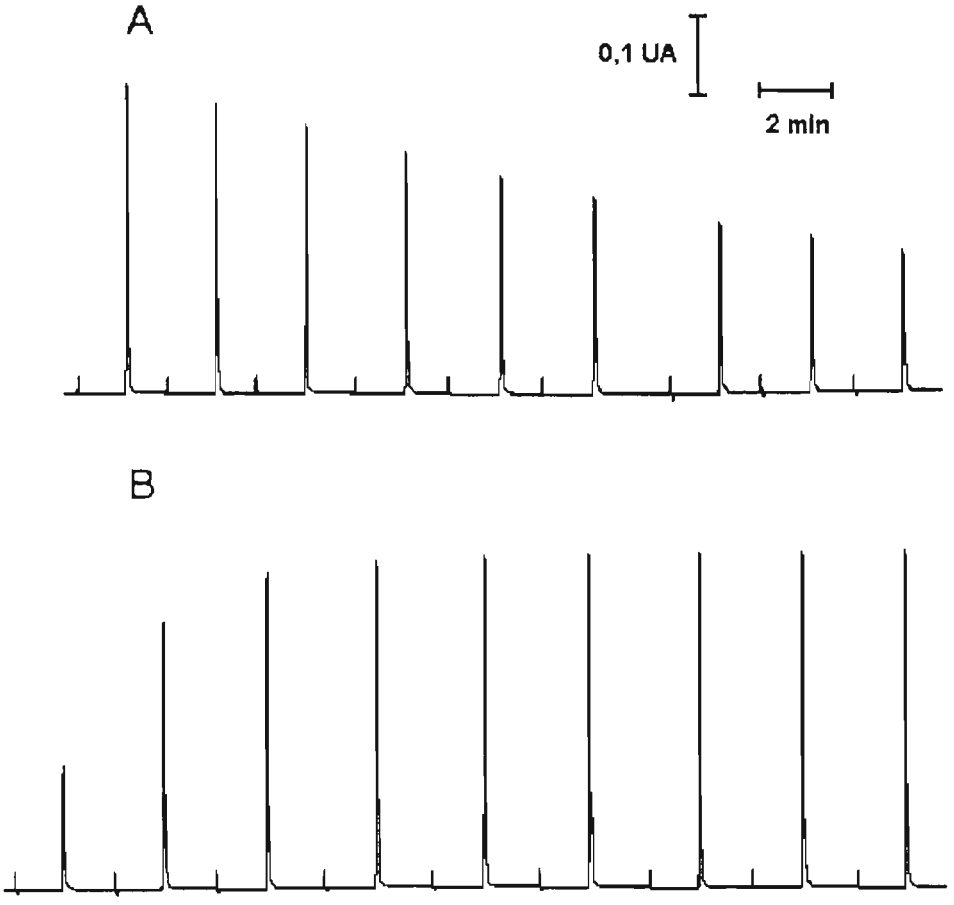


Figura 38. Registro do sinal para 0,5 mg L^{-1} de $N\text{-}NO_3^-$ contendo 5,0 mg L^{-1} de sulfeto. Curva descendente: Não foi utilizada etapa extra de lavagem da coluna com solução 0,1 mol L^{-1} de HCl. Curva ascendente: Utilizou-se etapa extra de lavagem da coluna com solução 0,1 mol L^{-1} de HCl.

3.4. Determinação Seqüencial de Nitrito e Nitrato.

3.4.1. Análise de amostras

Inicialmente foram analisadas amostras de água provenientes de diferentes pontos de amostragem do lago do Parque Ecológico do Tietê. Estas amostras pertencem à fração da lâmina d'água que está em contato com o sedimento de fundo. São comumente chamadas de águas de fundo.

Escolheu-se esta fração da lâmina d'água em virtude de ser uma região extremamente dinâmica, ocorrendo grande número de equilíbrios químicos entre a água e o sedimento. Após a coleta das amostras, estas foram filtradas em membrana 0,2 μm e refrigeradas a 4°C até o momento da análise (7 dias após a coleta). As análises das amostras foram realizadas em triplicata. A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos da determinação seqüencial de nitrito e nitrato.

Tabela 16. Determinação de nitrito e nitrato em água.

Amostra	$N\text{-}NO_2^-$ (mg L^{-1})	DPR%	$N\text{-}NO_3^-$ (mg L^{-1})	DPR%
1	0,018	3,4	0,027	0
2	0,017	0	0,026	1,3
3	0,017	0	0,072	1,9
4	0,020	12,5	0,031	2,4
5	0,017	0	0,031	0
6	0,017	0	0,04	2,1
7	0,015	0	0,039	3,1
8	0,016	0	0,047	6,0
9	0,014	0	0,034	5,2
10	0,016	2,8	0,028	3,9
11	0,017	0	0,046	2,7
12	0,013	0	0,075	0
13	0,016	10,6	0,038	1,1

Ao observarmos o desvio padrão relativo das amostras na Tabela 16, verificamos a boa reprodutibilidade das triplicatas que apresentam valores, em sua grande maioria, inferiores a 5%. Entretanto, devido a quantidade limitada das amostras obtidas, não se pode verificar a exatidão por comparação dos resultados com aqueles obtidos por metodologia independente.

3.4.2. Estudo com amostras simuladas utilizando-se a filtração tangencial para amostragem.

O experimento descrito abaixo foi preparado com o intuito de simular um ambiente aquático natural constituído por sedimento e água. Wallmann e colaboradores (1992) propuseram o estudo da determinação de traços de metais em sedimento anóxido por extração seqüencial. Neste trabalho os autores separaram uma massa de 7,2 g equivalente ao peso seco de sedimento do ambiente estudado, e adicionaram 400 mL de água desionizada. Foi adicionado à esta suspensão $CaCl_2$ 2 mmol L^{-1}, NaCl 5 mmol L^{-1} e Na_2SO_4 1,5 mmol L^{-1}. O reservatório foi mantido em condições anaeróbicas onde posteriormente fez-se a determinação de traços de metais.

O procedimento descrito acima foi reproduzido, utilizando-se no preparo da suspensão, sedimento proveniente da represa Guarapiranga. Manteve-se o recipiente contendo a suspensão sob agitação por menos que 5 minutos numa rotação de 200 rpm.

Em ambiente aquático, espécies químicas tais como nitrito e nitrato, podem sofrer alterações de concentração devido a complexa dinâmica na qual estão inseridos. Sendo assim, a análise em tempo real torna-se de grande utilidade no monitoramento destas espécies no próprio local de amostragem. Para tanto, utilizou-se um sistema de filtração tangencial A-SEP Applikon (Figura 39).

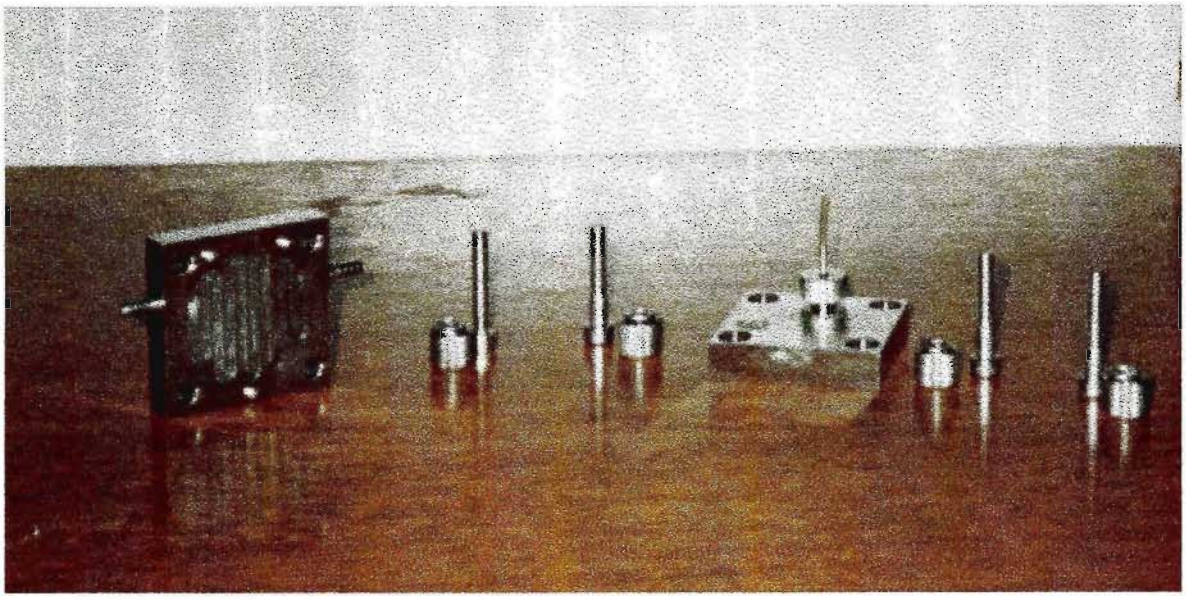


Figura 39. Filtro tangencial A-SEP Applikon.

A filtração tangencial consiste no acoplamento de um sistema de filtração à porta de amostragem do SIA. Uma bomba peristáltica bombeia a amostra através do filtro, porém esta só passa através da membrana de filtração (acetato de celulose 0,45 μm) no momento da análise. Este sistema permite a utilização da amostra sem prévio tratamento, ou seja, pode-se determinar as espécies de interesse em águas naturais sem a manipulação da amostra. Utilizando-se o filtro tangencial em conjunto com o SIA, podemos minimizar eficientemente fontes de erro provenientes do tratamento de amostras como é o caso da filtração convencional além dos períodos de estocagem a que as amostras são submetidas entre o instante da amostragem e a análise propriamente dita. A Figura 40 ilustra o filtro tangencial acoplado ao sistema SIA.

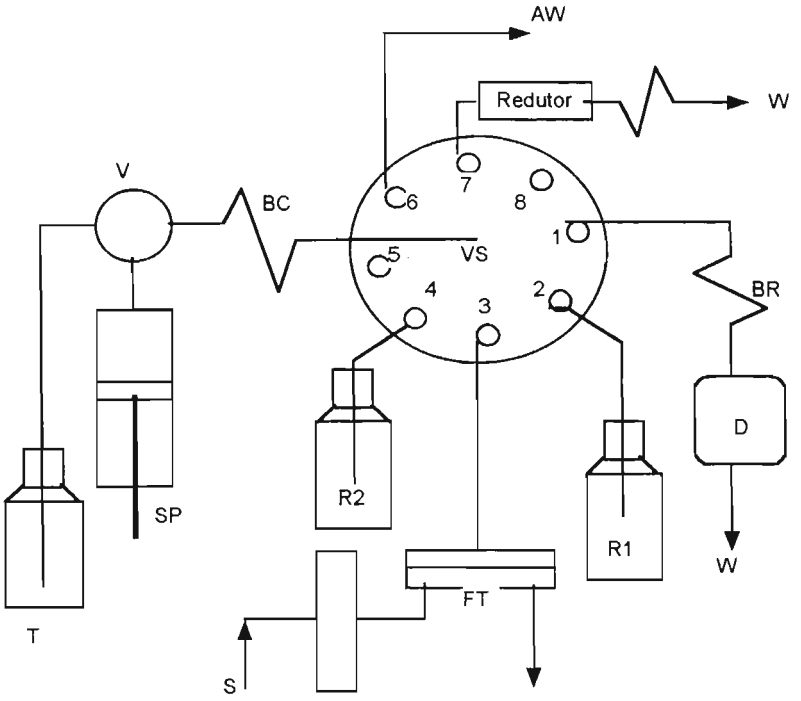


Figura 40. Esquema utilizado para a determinação de nitrito e nitrato com filtração tangencial no sistema SIA. T = transportador; V = válvula da seringa; SP = seringa de pistão; BC = bobina coletora; VS = válvula seletora; Redutor = coluna redutora; FT = filtro tangencial; P = bomba peristáltica; S = amostra; R1 = reagente colorimétrico; RS = solução regeneradora para a coluna redutora; D = detector espectrofotométrico; AW descarte auxiliar; W = descarte.

O filtro tangencial possui outras vantagens como a total ausência de bolhas. A presença de bolhas prejudica a aquisição de dados. Utilizando-se o filtro tangencial a amostra só é filtrada no momento da análise sendo aspirada pela porta de acesso (porta 3) passando através da membrana que permanece no interior do filtro. Outra vantagem a ser mencionada, é o fato de não ocorrer obstrução no sistema de filtração. A amostra permanece em constante circulação pelo filtro.

Iniciou-se então determinações sucessivas de nitrito e nitrato na suspensão utilizando-se o sistema SIA na configuração apresentada na Figura 40. A cada triplicata adicionaram-se concentrações aleatórias de nitrito e nitrato na suspensão (*spike*). Ao final de cada triplicata, desconectou-se o filtro tangencial da porta 3 e com o auxílio de uma seringa hipodérmica, retirou-se um volume de 10 mL da amostra a ser submetida a análise por um método independente. Como método de comparação, utilizou-se o método FIA proposto por Giné e colaboradores (1980). Outro detalhe a ser mencionado, é a lavagem da porta de amostragem

(porta 3) com a suspensão, após a adição seguinte dos padrões de nitrito e nitrato, a fim de evitar-se o contato entre zonas de amostras diferentes, refletindo no sinal posteriormente detectado. A Figura 41 mostra os resultados obtidos para a comparação entre as diferentes metodologias.

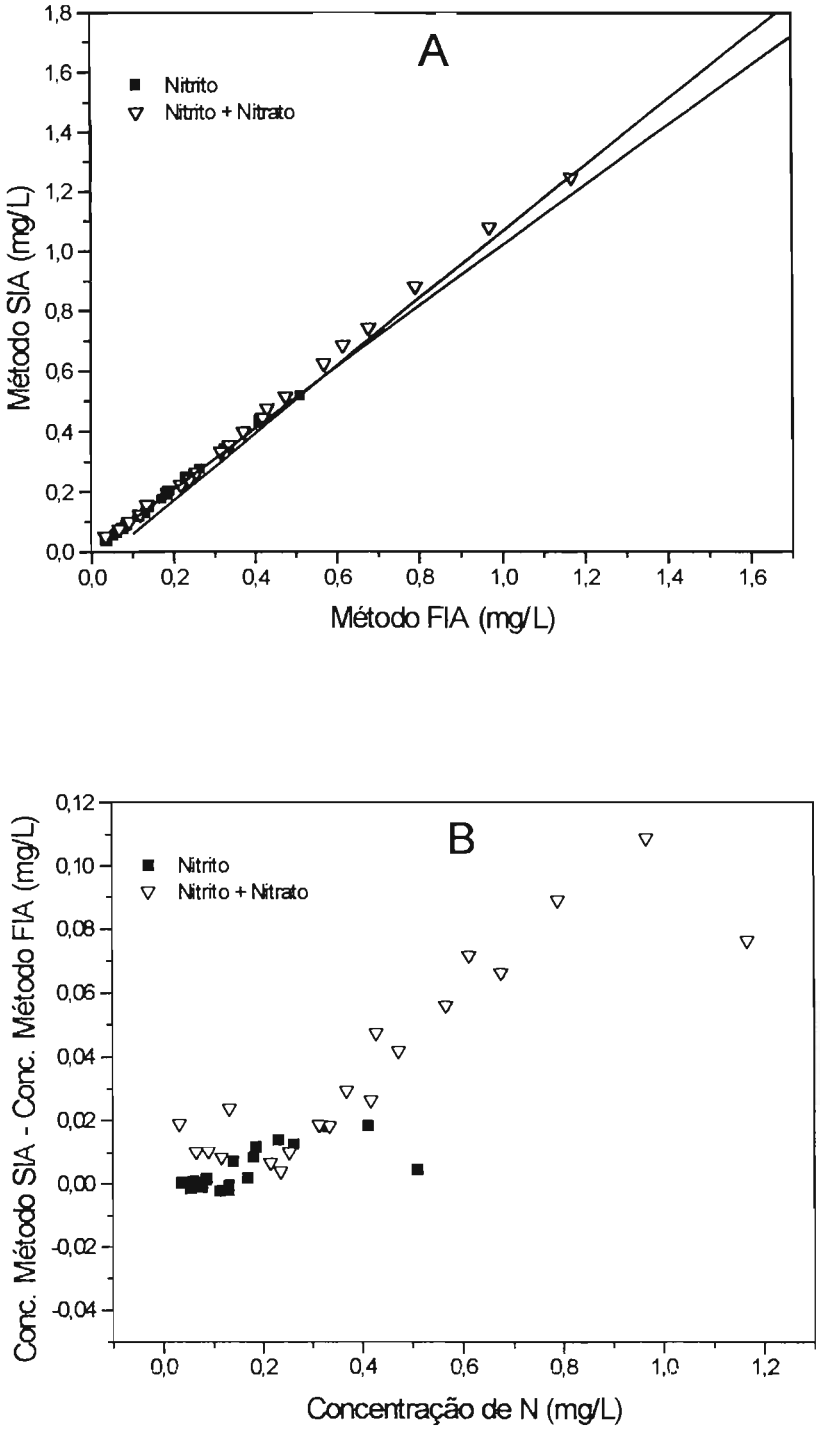


Figura 41. (A) Correlação entre os métodos FIA e SIA na análise da suspensão de sedimentos. (B) Diferença entre as concentrações obtidas pelo método SIA e FIA, plotados como função dos resultados obtidos pelo FIA.

Observa-se no gráfico (A) da Figura 41 uma boa concordância entre os métodos. Os coeficientes de correlação apresentaram valores maiores do que 0,99 e o coeficiente angular valor de 1,04±0,01 e 1,09±0,01 para o nitrito e nitrato respectivamente, indicando que o resultado obtido pelo método SIA foi sistematicamente maior do que pelo método FIA (gráfico(B) da Figura 41). Deve-se salientar que a determinação pelo método FIA foi realizada pelo menos 24 horas após a determinação pelo método SIA. Podemos concluir que pode ter ocorrido decomposição do nitrito durante o período anterior, mostrando desta forma a importância do monitoramento ambiental com características de tempo real.

Além das vantagens anteriormente mencionadas no procedimento proposto, verificou-se a importância do monitoramento em tempo real através da análise das amostras simuladas, onde foi efetuada a filtração tangencial.

4. CONCLUSÕES

O método proposto para a determinação de nitrito e nitrato no sistema SIA, mostrou-se adequado para as amostras estudadas. Os limites de detecção foram de 6,0 μg L^{-1}N e 8,0 μg L^{-1}N para o nitrito e nitrato, respectivamente. A freqüência de amostragem foi de 20 amostras h^{-1}. Estes valores incluem os valores de máxima concentração para os padrões de qualidade ambiental e também para os padrões de potabilidade, (nitrito: 0,1 a 1,0 mg L^{-1} N; nitrato: 10 a 50 mg L^{-1} N) podendo ser utilizado na determinação destas classes de amostras.

O sistema SIA também mostrou-se adaptável à unidade de filtração tangencial, tornando-se muito importante no monitoramento ambiental em tempo real. Erros provenientes da coleta de amostras, estocagem, alterações de temperatura e da própria filtração convencional podem ser evitados.

O consumo de reagentes e a geração de resíduos é menor no sistema SIA do que utilizando-se o sistema FIA (Giné e colaboradores, 1980) ou a metodologia da APHA (APHA, 1995) para a determinação de nitrito. O método da APHA e o método proposto utilizam a mesma concentração do reagente de Griess, porém, 1 litro do reagente colorimétrico é utilizado na análise de 500 amostras enquanto com apenas 50 mL de reagente pode-se realizar a determinação de nitrito pelo método SIA no mesmo número de amostras. O método FIA utiliza uma maior concentração de sulfanilamida (8×10^{-5} mols por amostra analisada), entretanto, gera 3 vezes menos resíduo que o método oficial.

O sistema SIA por utilizar micro-coluna de redução, despende uma quantidade de cádmio muito menor que no método da APHA, onde a coluna redutora é composta por 25 g do metal.

5. PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS

Uma próxima etapa do trabalho deve ser o monitoramento de nitrito e nitrato em tempo real no próprio local de amostragem. Com isto, pretende-se avaliar o desempenho do método proposto bem como o comportamento da micro-coluna em uma situação real. O período de uso da membrana de acetato de celulose no filtro tangencial também é um parâmetro importante e deve ser estudado. A quantidade de material em suspensão pode levar a obstrução da membrana impedindo a filtragem da amostra, havendo a necessidade de troca da membrana.

Realizando-se estes estudos, poderemos então indicar ou empregar a metodologia proposta à estações de monitoramento como aquelas utilizadas pela CETESB (Estação de Monitoramento de Qualidade de Águas) obtendo resultados mais rápidos e que retratem com veracidade o ambiente aquático estudado.

V. DETERMINAÇÃO DE FERRO(II) E FERRO(III)

1. INTRODUÇÃO

O ferro é um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre e está presente em ampla variedade de minerais de rochas e solos como ferro(II) e ferro(III). Também é encontrado em lagos e rios na forma de sedimentos heterogêneos. Este tipo de sedimento no entanto, possui diferenças em relação as camadas de hidróxido de ferro existentes nos antigos oceanos devido a grande presença de ferro nas águas e sua oxidação, a qual colaborou para a precipitação do metal. Em uma certa profundidade crítica, partículas de ferro apresentam-se como pequenos sólidos amorfos, esferas porosas de menos de 0,5 μm de diâmetro constituído aproximadamente de 50% de Fe^{2+} e 50% de Fe^{3+} e em alguns casos $Ca_3(PO_4)_2$ pode estar presente. O complexo lábil FeS está em equilíbrio com Fe^{2+} e S^{2-}, possivelmente Fe_2S_2. A literatura cita espécies de fosfato de ferro coloidal, formado nas interfaces óxido-anóxido em lagos. Óxidos de ferro e manganês são carregados para o fundo de rios e lagos sendo adsorvidos por nutrientes e poluentes nas águas, sedimentos e solos (Pehkonen, 1995). A Tabela 17 mostra a distribuição de ferro no meio ambiente (Huebers, 1991).

Tabela 17. Distribuição do ferro no ambiente (Huebers, 1991).

Fonte	Índice de ferro	Comentários
Minério de ferro	20-69%	
Solos	0,7-4,2%	
Água de fundo	< 0,5-100 mg/L	Maiores valores ambiente anóxido
Água potável	Máx. 0,3 mg/L	U.S.Public Health Service
Rios	0,67 mg/L	
Oceanos	0,01-0,14	Bruland (1983)
Atmosfera	0,9-1,2 μg/m^3	Óxido de ferro particulado

Os íons ferro(II) e ferro(III) participam de várias atividades biológicas e processos metabólicos catalíticos. Faz parte da atividade fotossintética sendo um nutriente limitante para o crescimento do fitoplâncton em algumas regiões do oceano aberto. Ambos, ferro(II) e ferro(III), possuem um importante papel na biosfera servindo como centro ativado para uma ampla faixa de

proteínas tais como oxidases, redutases e dehidrases. Processos microbiais que resultam na redução de ferro(III), tal como a redução dissimilativa de ferro(III) pela eubactéria marina *Alteromonas putrefaciens*, são também importantes caminhos para o destino do ferro(III). Sideróforos e alguns ácidos húmicos e fúlvicos podem ser importantes ligantes para o ferro(III) na superfície e no fundo de rios e lagos. A concentração observada de ferro total dissolvido em sistemas de águas naturais variam de 1,12 mg L^{-1} em águas superficiais do oceano até 22,4 mg L^{-1} em área urbana poluída (Pehkonen, 1995).

Medidas de ferro(II) em águas oceânicas e água doce tem mostrado que este íon está presente em níveis significativos ainda que em ambientes óxidos além de sua presença em ambientes anóxidos. Outras formas de ferro(II) e ferro(III) podem estar presentes em sistemas de águas naturais, tais como ferro(III) coloidal e ferro(III) ligado a compostos orgânicos. O ciclo redox entre ferro(II) e ferro(III) tem um efeito significativo em muitos processos em sistemas de águas naturais incluindo o ciclo redox do enxofre (Pehkonen, 1995). A Figura 42 apresenta o diagrama de E_H-pH para o sistema Fe- H_2O-CO_2-S presente em solos e sedimentos enquanto a Figura 43 ilustra o sistema Fe-H_2O atuante em sistemas aquáticos (O'Nell, 1993).

1.1. Determinação de Ferro

A determinação do estado de oxidação do ferro é variável no que diz respeito às amostras de águas naturais, como água do mar, lagos, rios e atmosfera, sendo obtido geralmente pela complexação com agentes quelantes específicos seguido por medidas espectrofotométricas, ou por voltametria com ou sem etapa de preconcentração utilizando um agente quelante. Espectrofotômetros portáteis de campo tem permitido medidas imediatamente após a coleta de amostras (Pehkonen, 1995). Rossi e colaboradores (2000) propuseram um colorímetro utilizável para determinações quantitativas. O sensor é um LDR (light detector resistor) localizado dentro de uma cela escura (negra) de PTFE e acoplado a um multímetro de baixo custo.

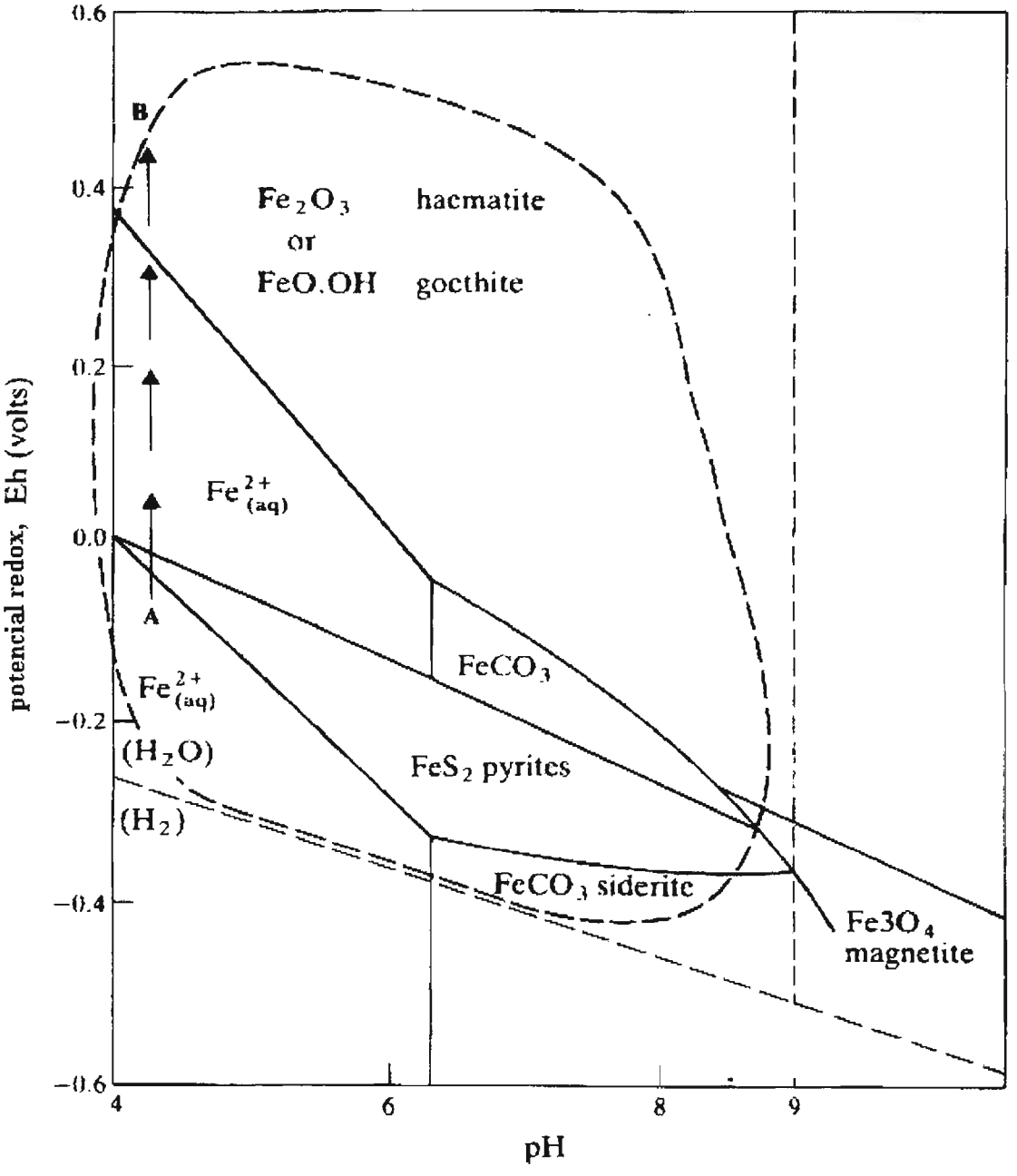


Figura 42. Diagrama ilustrativo E_H-pH para o sistema Fe-H_2O-CO_2-S (O'Nell, 1993).

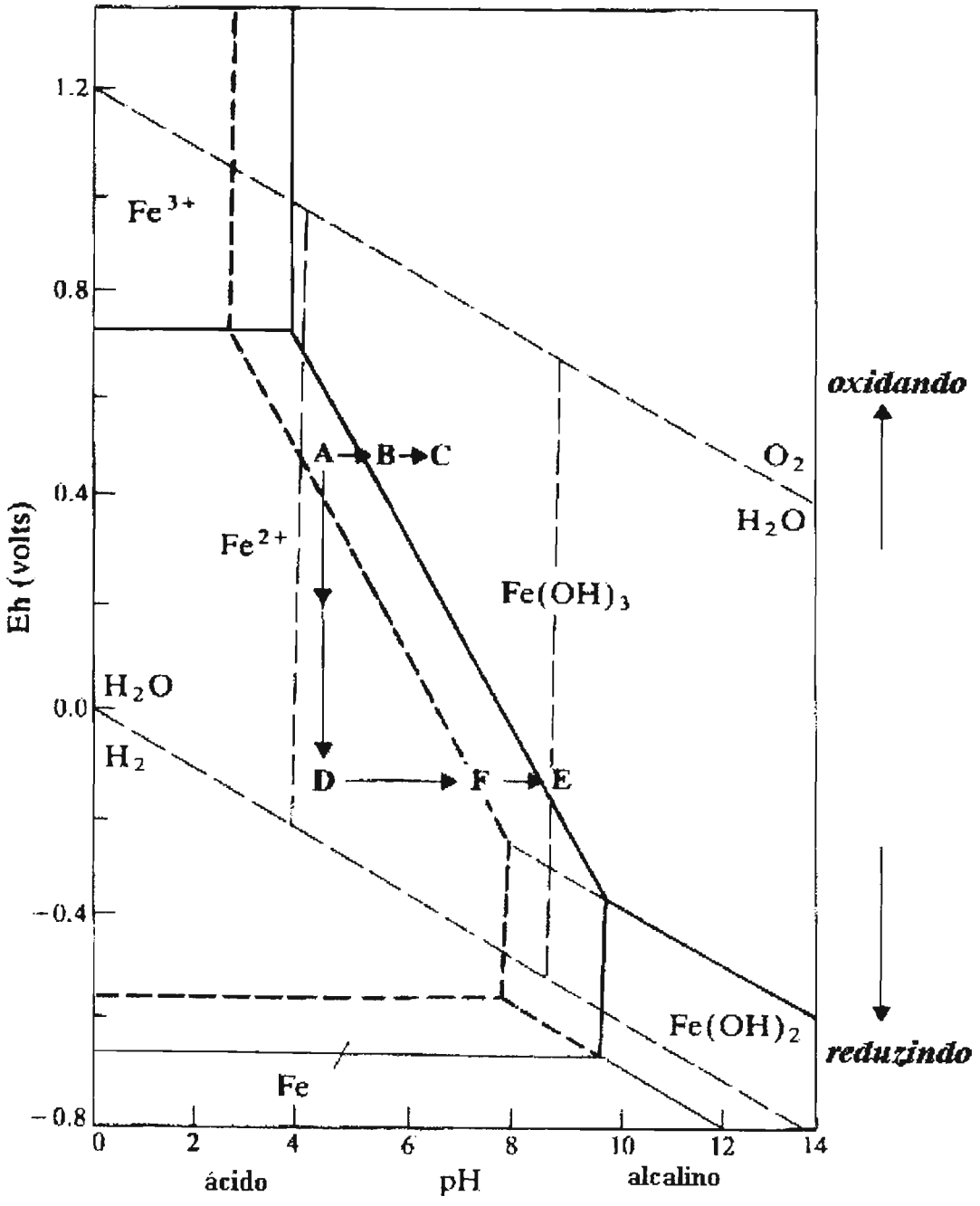


Figura 43. Diagrama ilustrativo E_H-pH para o sistema Fe-H_2O (O'Nell, 1993).

O reagente 1,10-fenantrolina tem sido amplamente empregado na determinação de ferro(II). A formação do complexo vermelho-alaranjado (1,10-fenantrolina)$_3$–Fe^{2+}, permite sua determinação em solução aquosa no comprimento de onda λ=510 nm. Os principais interferentes nesta determinação são agentes oxidantes tais como, nitrito e agentes complexantes fortes como o fosfato e cianeto. Crômio e zinco em elevadas concentrações (400 vezes o Fe^{2+}) causam interferência. Cobalto e cobre em excesso de 5 mg L^{-1} e níquel em excesso de 2 mg L^{-1} podem também interferir. O limite de detecção para este método é de aproximadamente 0,02 mol L^{-1} (0,36 μmol L^{-1}) de ferro(II). A 1,10-fenantrolina também pode reagir com Fe(III) produzindo um complexo de cor amarela que absorve em 396 nm (Areias, 1998). Fadrus e Malý (1975) propuseram a determinação de Fe(II) na presença de Fe(III) com 1,10-fenantrolina utilizando-se agentes complexantes tais como ácido nitrilotriacético, tornando-se possível a supressão da interferência de Fe(III).

Outras formas de determinação do ferro(II) e determinação simultânea de ferro(II) e ferro(III) também podem ser citadas, tais como a utilização de reator fotoquímico em sistema FIA para a fotorredução do complexo ferro(III)-1,10-fenantrolina (Liu e colaboradores, 1992). O emprego de colunas redutoras também tem sido verificado. Micro-coluna contendo o reagente de Jones tem sido utilizada em sistema FIA para promover a redução de Fe(III) a Fe(II), tornando-se possível a especiação entre Fe(II) e Fe(III) através da utilização do reagente 1,10-fenantrolina (Faizullah e Townshend, 1985). Burguera e Burguera (1984) também propuseram a determinação de ferro(II) e ferro total utilizando-se detecção espectrofotométrica com o reagente 1,10-fenantrolina e em seguida obteve-se a determinação de ferro total através da espectrometria de absorção atômica. Outros reagentes redutores tais como a hidroxilamina, cloreto estanhoso e ácido ascórbico têm sido empregados visando assim a especiação entre Fe(II) e Fe(III). No caso de utilizar-se reagente oxidante, o mais comumente empregado é o peróxido de hidrogênio (Areias, 1998). A utilização do composto derivado da 1,10-fenantrolina, o reagente 4,7-difenil-1,10-fenantrolinadissulfonato (DPPS) também é encontrado na literatura com o propósito de ganho na sensibilidade. Para tanto utilizou-se coluna com resina trocadora de íons a fim de obter-se uma pré-concentração do analito para determinação de ferro(II) em água purificada. Além destes trabalhos podemos citar o emprego do reagente 2,2'-bipiridila e 2,2',2"-tripiridina, sendo que este último forma um complexo bis com o ferro(II) e possui máximo de absorção em 555 nm. O reagente ferrozina também é empregado na determinação de Fe(II), formando o complexo

$[((C_{18}N_4H_{13})_3S_3)Fe]^{2+}$ de cor vermelho-púrpura o qual apresenta máximo de absorção em 562 nm (Areias, 1998). Para determinação de Fe(III), reagentes tais como tiocianato, ácido salicílico, 8-hidroxiquinolina, ácido 5-sulfoantranílico, sal R nitroso, tiron e cupferron tem sido utilizados (Terra, 1997). O ácido tioglicólico bem como o ácido sulfosalicílico complexam com ambas as espécies Fe(II) e Fe(III) (Areias, 1998). O agente complexante di-2-piridil cetonabenzoilhidrazona (DPKBH) também tem sido estudado como agente quelante na determinação de ferro(II) e ferro(III) (Prada, 2000; Areias, 1998; Pehkonen, 1995).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes Soluções e Utilizados

Soluções estoque de Fe(II) (100 mg L^{-1}) e Fe(III) (100 mg L^{-1}) foram preparadas em HCl 0,1 mol L^{-1} e armazenadas em frascos de vidro. Os sais utilizados para o preparo das soluções foram o sal $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$ e $NH_4Fe(SO_4)_2.12H_2O$, respectivamente.

Para a determinação de ferro(II) e ferro(III) foram utilizados os seguintes reagentes e soluções:

1. solução transportadora: solução tampão de ácido acético/acetato de sódio 0,1 mol L^{-1}, em pH=4,7.

2. reagente: solução de 1,10-fenantrolina 0,5% (m/v) em HCl 0,05 mol L^{-1}.

Confeccionou-se micro-coluna com dimensão 3 cm de comprimento e 2,5 mm de diâmetro interno. Foi utilizado zinco em grânulos (20-50 mesh). O tratamento do zinco metálico, foi realizado com solução HCl 0,2 mol L^{-1} para remoção de óxidos. Em seguida, lavou-se o metal abundantemente com água desionizada. Para finalizar o tratamento, adicionou-se solução saturada de nitrato de mercúrio(II), promovendo a geração do amalgama de zinco. Um último enxague foi feito com água desionizada antes de sua utilização. A coluna foi empacotada tapando-se uma de suas extremidades com flocos de lã de vidro, e com o auxílio de um conta gotas, preencheu-se o interior da coluna com água desionizada. Posteriormente, utilizou-se uma espátula a fim de se transferir o metal para dentro da coluna, tomando-se o cuidado para que esta permanecesse sempre preenchida com água. Após o empacotamento da coluna, colocou-se flocos de lã de vidro na outra extremidade para impedir a saída do metal. Às extremidades da coluna, foram conectados tubos de teflon (≈ 4cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno) para obter-se uma melhor adaptação destas à porta a ser utilizada na válvula seletora.

2.2. Procedimento

2.2.1. Determinação seqüencial de ferro(II) e ferro(III)

Para a determinação seqüencial de ferro(II) e ferro(III) foi utilizada a configuração do sistema SIA mostrado na Figura 44.

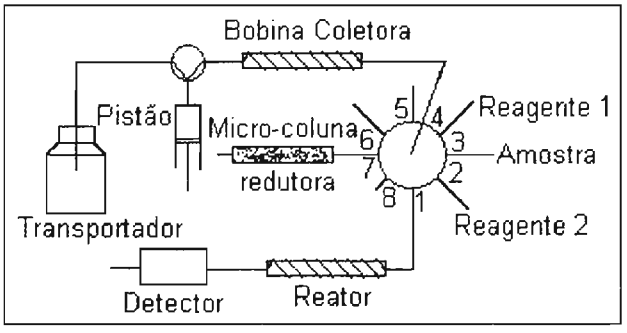


Figura 44. Esquema utilizado para a determinação de ferro(II) e ferro(III) com coluna redutora contendo o redutor de Jones. Características do sistema: bobina coletora (comprimento = 3 m; diâmetro interno = 0,8 mm); bobina de reação (comprimento = 50 cm; diâmetro interno = 0,8 mm); vazão = 100 μL s^{-1}; cela de fluxo de quartzo (V = 80 μL); λ=512 nm. Solução transportadora: solução tampão ácido acético/acetato de sódio pH=4,5; Reagente 1: solução regeneradora HCl 0,1 mol L^{-1}; Reagente 2: 1,10-fenantrolina; coluna (comprimento = 4 cm; diâmetro interno = 2,5 mm).

A seqüência de operações utilizadas no SIA está descrita a seguir:

1. O pistão aspira 2000 μL de solução transportadora (solução tampão ácido acético/acetato de sódio) para dentro da seringa.

2. A porta 2 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 100 μL de reagente para a bobina coletora.

3. A válvula seletora é posicionada na porta 3. O movimento reverso do pistão aspira 150 μL de amostra para a bobina coletora.

4. A porta 2 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 100 μL de reagente para a bobina coletora.

5. A válvula seletora conecta a bobina coletora ao reator e um movimento avante do pistão propulsiona a mistura reacional ao detector e descarte.

6. A porta 1 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 2200 μL de solução transportadora para dentro da seringa.

7. A válvula seletora é posicionada na porta 1. O movimento reverso do pistão aspira 25 μL de HCl para a bobina coletora.

8. A válvula seletora é posicionada na porta 3. O movimento reverso do pistão aspira 190 μL de amostra para a bobina coletora.

9. A válvula seletora é posicionada na porta 1. O movimento reverso do pistão aspira 30 μL de HCl para a bobina coletora.

10. A válvula seletora é posicionada na porta 3. O movimento reverso do pistão aspira 190 μL de amostra para a bobina coletora.

11. A porta 7 é selecionada. O movimento avante do pistão propulsiona 460 μL da bobina coletora para dentro da micro-coluna com vazão de 50 μL s^{-1}.

12. A porta 7 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 80 μL de solução contida dentro da micro-coluna para a bobina coletora com vazão de 50 μL s^{-1}.

13. A porta 6 é selecionada. O movimento avante do pistão descarta 80 μL da bobina coletora para o descarte.

14. A porta 2 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 100 μL do reagente para a bobina coletora.

15. A válvula seletora é posicionada na porta 7. O movimento reverso do pistão aspira 150 μL de amostra já reduzida para a bobina coletora com vazão de 50 μL s^{-1}.

16. A porta 2 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 100 μL de reagente para a bobina coletora.

A válvula seletora conecta a bobina coletora ao reator e um movimento avante do pistão propulsiona a mistura reacional ao detector e descarte.

A porta 4 é selecionada. O movimento reverso do pistão aspira 500 μL de HCl 0,1 mol L^{-1} para a bobina coletora.

A porta 7 é selecionada. O movimento avante do pistão propulsiona a solução de HCl 0,1 mol L^{-1} para dentro da coluna com vazão de 50 μL s^{-1} a fim de lavá-la para a próxima determinação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Otimização do Sistema para a Determinação de Ferro(II) e Ferro(III)

A determinação de ferro(II) foi baseada na reação de complexação do Fe^{2+} com o reagente 1,10-fenantrolina. A Figura 45 mostra a fórmula estrutural da 1,10-fenantrolina.

$$Fe^{2+} + 3(C_{12}H_8N_2) \rightarrow Fe(C_{12}H_8N_2)_3^{2+}$$

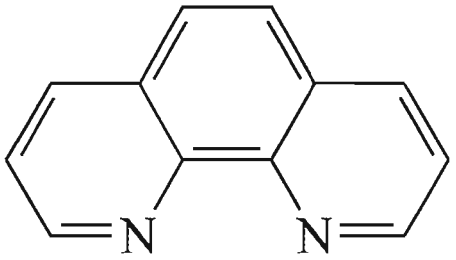


Figura 45. Fórmula estrutural da 1,10-fenantrolina.

A formação do complexo $Fe(C_{12}H_8N_2)_3^{2+}$ ocorre através dos dois átomos de nitrogênio presentes na molécula com um átomo de ferro. O complexo formado apresenta estrutura octaédrica.

Iniciou-se a otimização da reação no sistema SIA para a determinação de ferro(II) utilizando-se 100 μL de reagente colorimétrico (1,10-fenantrolina) e 200 μL de padrão 3,0 mg L^{-1} de Fe^{2+} em HCl 0,1 mol L^{-1}. O percurso analítico inicial foi de 76 cm de comprimento. Mantendo-se fixo o volume de reagente em 100 μL, variou-se o volume do padrão de 50 a 200 μL. A Figura 46 ilustra a otimização do volume de amostra para a determinação de ferro(II).

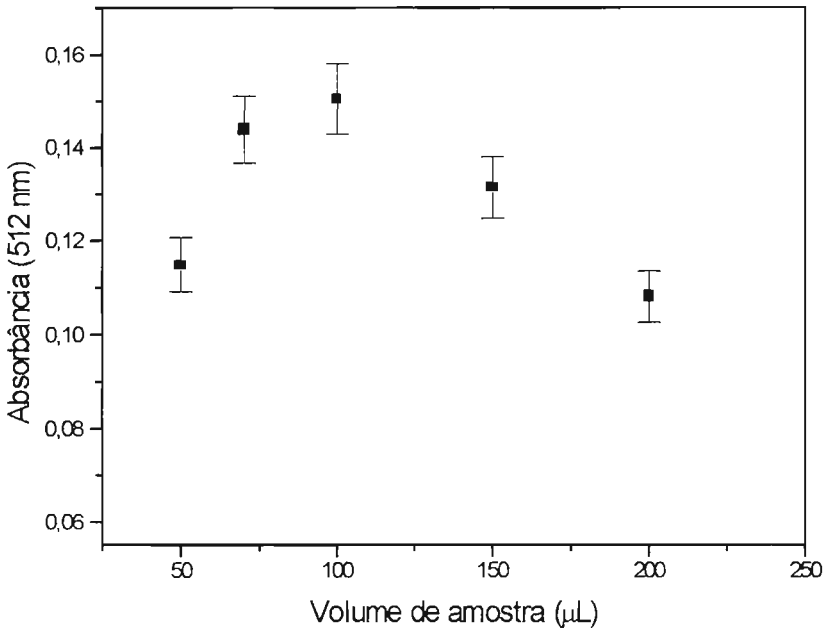


Figura 46. Influência do volume de amostra na determinação de Fe(II). Condições: V_R=100 µL; padrão de controle 3,0 mg L^{-1} de Fe(II).

Maior sensibilidade foi obtida utilizando-se 100 µL de amostra. A seguir, fixou-se o volume do padrão em 100 µL e variou-se o volume do reagente na faixa de 10 a 200 µL. A Figura 47 mostra o resultado obtido na otimização do volume de reagente. Para a concentração de Fe(II) estudada o volume de reagente não causou modificações significativas no sinal analítico.

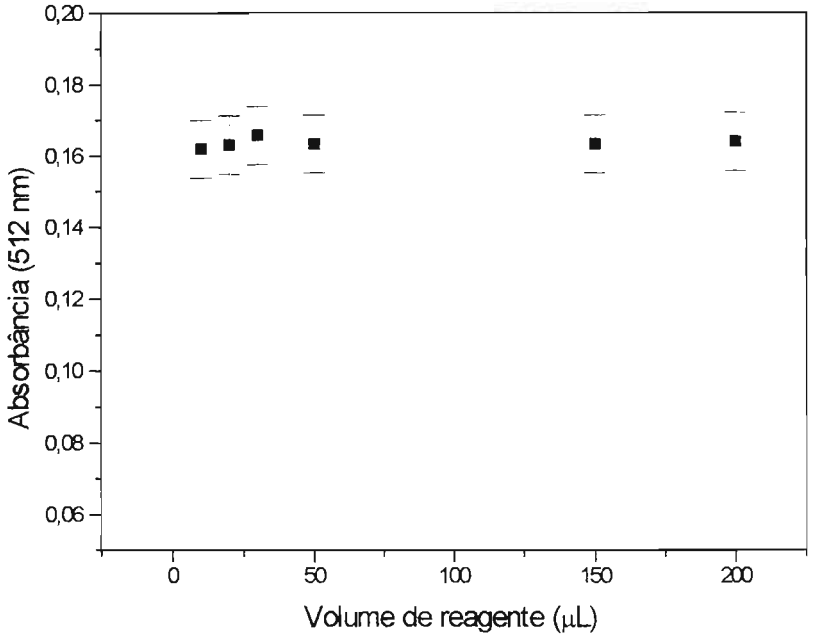


Figura 47. Influência do volume de reagente na determinação de Fe(II). Condições: V_S= 100 μL; padrão de controle 3,0 mg L^{-1} de Fe(II).

Uma etapa de "stopped-flow" também foi realizada no estudo da otimização do sinal analítico de Fe(II). Para a aquisição do sinal de ferro(II), aspirou-se 2000 μL de solução transportadora, 100 μL de amostra e 100 μL de reagente. Em seguida o pistão injetou a solução transportadora e a mistura reacional para o detector sendo efetuada parada de fluxo por 30 segundos. A Figura 48 mostra o resultado obtido.

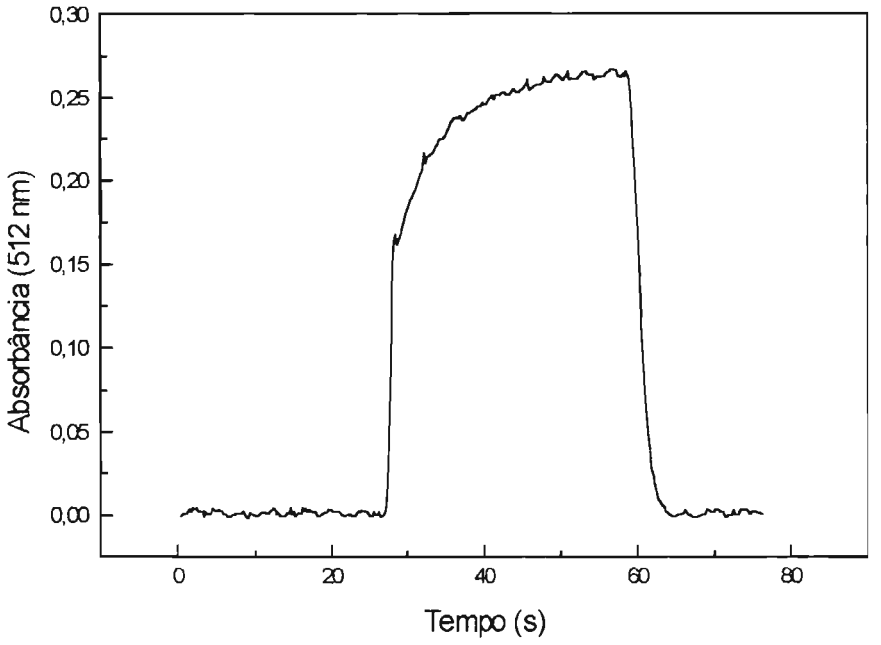


Figura 48. Sinal analítico do ferro(II). Parada de fluxo com o tempo de 30 s. Condições: Volume de transportador = 2000 μL; V_R = 100 μL; V_S = 100 μL.

A zona reacional permaneceu no interior da cela de fluxo por 80 segundos, reiniciando-se a injeção da solução transportadora remanescente na seringa através da bobina de reação, detector e descarte. De acordo com o gráfico apresentado na Figura 48, observa-se o aumento do sinal analítico de Fe(II) com o tempo, não observando-se a formação do patamar de equilíbrio. Este resultado evidencia que o sistema para determinação de Fe(II) pode ainda ser otimizado, e conseqüentemente, obter-se maior sensibilidade. Apesar do ganho de sinal ter sido de 55% após 30 segundos de parada de fluxo, deu-se preferência a seqüência de operações iniciais ao invés de aumentar o tempo de residência da zona de amostra no sistema. A partir do estudo do parâmetro percurso analítico, utilizando-se bobinas de 50, 100, 150 e 250 cm de comprimento, verificou-se melhor resultado com bobina de reação de 50 cm. Isto indica que o provável ganho de sensibilidade com o aumento do tempo de residência, acaba sendo compensado pela maior dispersão da zona de amostra que decorre de percursos analíticos maiores.

A otimização da reação para determinação de ferro total utilizando-se redutor de Jones, foi baseada nos parâmetros: volume de amostra injetada para dentro da coluna redutora, volume de amostra utilizado após a redução e volume morto. Para tanto utilizou-se o padrão de 3,0 mg L^{-1} de Fe^{2+}/ Fe^{3+}. O volume de amostra injetada para dentro da coluna variou de 200 a 250 μL. O

volume de padrão reduzido na coluna, utilizado para a determinação de ferro total variou de 100 a 180 μL e o volume morto foi estudado na faixa de 60 a 90 μL. Obteve-se melhor sinal na condição de 220 μL de padrão injetado na coluna, 80 μL de volume morto descartado e 110 μL de padrão reduzido utilizado para a análise.

Posteriormente tentou-se minimizar o efeito Schlieren preparando os padrões em HCl 0,05 mol L^{-1}. Observou-se significativa diminuição no sinal do branco, adotando-se HCl 0,05 mol L^{-1} no preparo dos padrões de ferro. A Figura 49 ilustra o registro do sinal obtido para a especiação de ferro(II) e ferro(III).

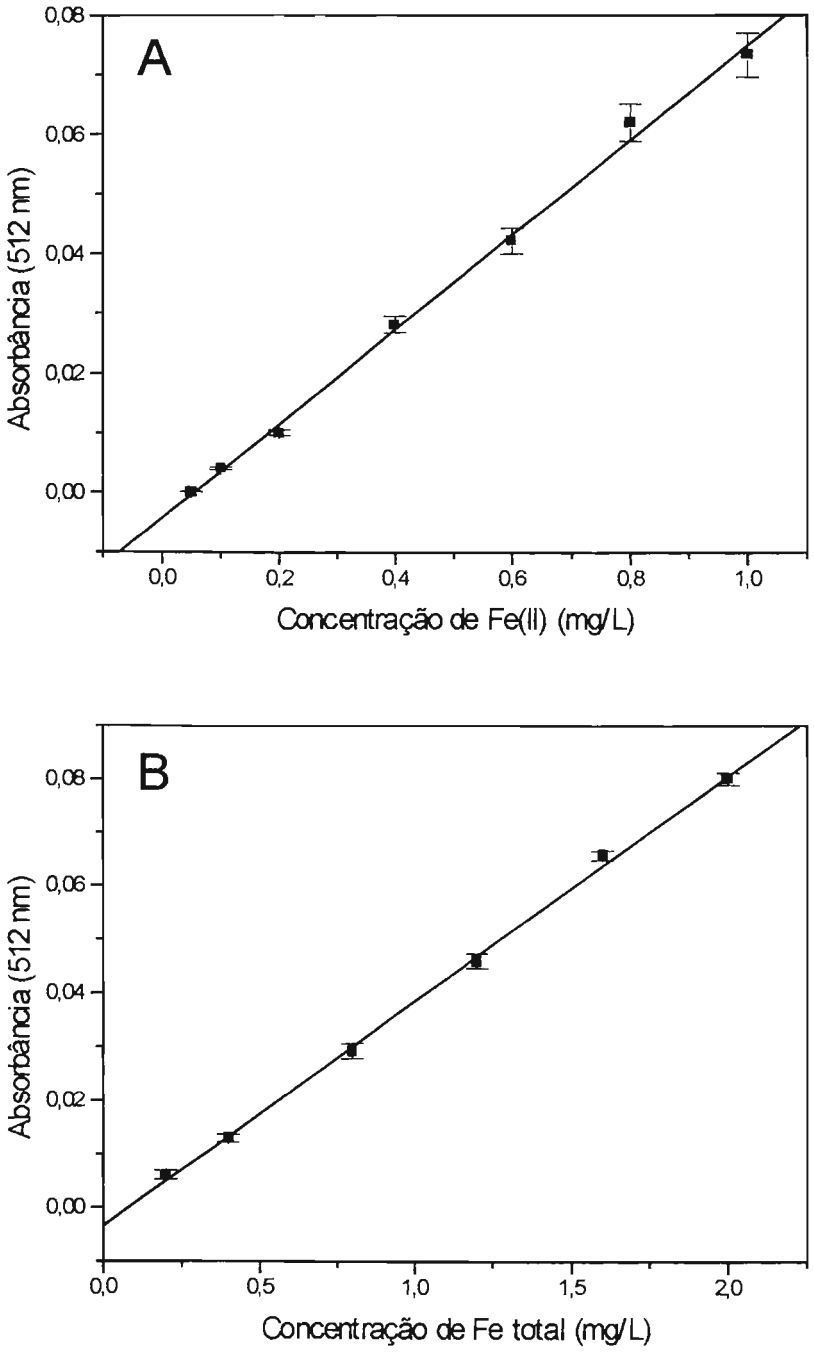


Figura 49. A: Curva analítica de Fe(II): Y=(-0,004±0,001)+(0,079±0,002)X, R=0,999, L.D.=0,04 mg L^{-1}; B: Curva analítica de Fe total: Y=(-0,0032±0,0008)+(0,0418±0,0007)X, R=0,999, L.D.=0,06 mg L^{-1}.

3.2. Ensaio de Repetibilidade

3.2.1. Repetibilidade das curvas analíticas

O estudo da repetibilidade da curva analítica na determinação de ferro(II) e ferro(III) foi realizado trabalhando-se na faixa de concentração de 0,05 a 1,0 mg L^{-1} de Fe(II) e Fe(III). Todos os padrões foram preparados em meio de HCl 0,05 mol L^{-1}. Utilizou-se como transportador solução tampão de ácido acético/acetato de sódio, pH=4,5 e como branco, HCl 0,05 mol L^{-1}. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 50 e 51.

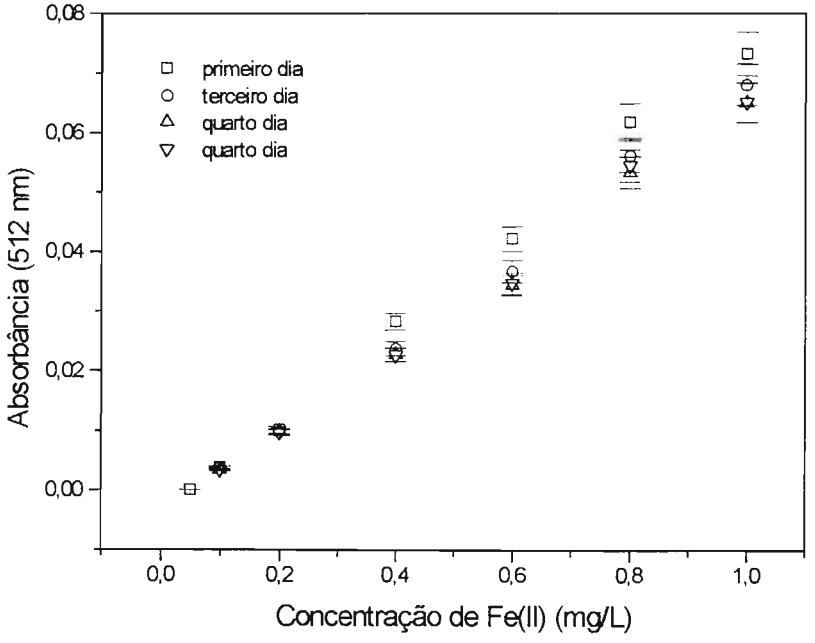


Figura 50. Ensaio da repetibilidade da curva analítica de ferro(II) em 3 dias utilizando-se os mesmo padrões.

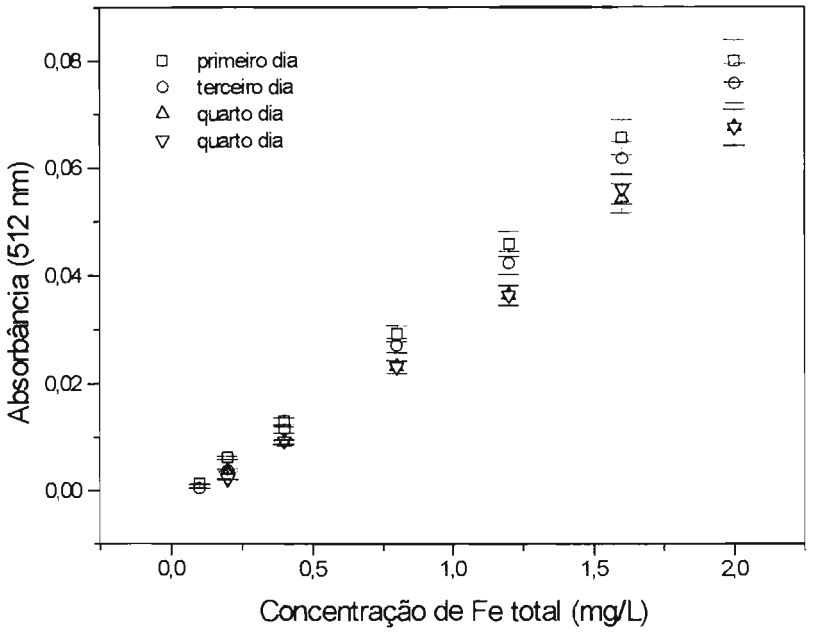


Figura 51. Ensaio da repetibilidade da curva analítica de ferro total em 3 dias utilizando-se os mesmo padrões.

Podemos observar a boa repetibilidade nas curvas analíticas registradas no mesmo dia. Porém verifica-se variação na inclinação das curvas obtidas em dias distintos. Portanto, para a determinação de ferro(II) e ferro(III) se faz necessário a construção diária de curvas analíticas. A Tabela 18 mostra os valores obtidos das regressões lineares nas curvas de ferro(II) e ferro total.

Tabela 18. Resumo das curvas analíticas para o ferro.

Curvas	Coeficiente Linear (UA)		Coeficiente Angular ($L\ mg^{-1}$)		R	
	Fe(II)	Fe t*	Fe(II)	Fe t*	Fe(II)	Fe t*
(1)primeiro dia	-0,004±0,001	-0,0033±0,0008	0,079±0,002	0,0419±0,0007	0,999	0,999
(5) terceiro dia	-0,005±0,002	-0,0044±0,0008	0,073±0,002	0,0403±0,0007	0,998	0,999
(6) quarto dia	-0,004±0,002	-0,005±0,001	0,069±0,002	0,0363±0,0009	0,997	0,999
(6) quarto dia	-0,005±0,002	-0,006±0,001	0,070±0,003	0,037±0,001	0,997	0,998

*Fe t = ferro total

Calculando-se a média dos parâmetros das curvas da Tabela 18, tem-se o valor de –0,005±0,002 para o coeficiente linear médio do Fe^{2+} e –0,0047±0,0009 para o coeficiente linear médio de Fe total. Os valores dos coeficientes angulares médios são 0,073±0,002 mg L^{-1} para o Fe^{2+} e 0,0389±0,0008 mg L^{-1} para o Fe total.

Como mencionado para o nitrito e nitrato, determinou-se o rendimento da coluna contendo o redutor de Jones entre cada curva analítica obtida. A Tabela 19 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 19. Rendimento da coluna contendo o redutor de Jones antes e depois da construção das curvas analíticas.

Curva Analítica	Rendimento (%)		
	Antes	Após	Diferença
1 (primeiro dia)	88,39	86,88	-1,51
2 (terceiro dia)	86,88	86,96	+0,08
3 (quarto dia)	86,96	86,87	-0,09
4 (quarto dia)	86,87	89,29	+2,42

Ao observarmos a Tabela 19, verifica-se aleatoriedade nos valores entre as diferenças no que diz respeito ao rendimento da coluna redutora antes e após a construção de cada curva analítica. Ao término da obtenção da quarta curva analítica, verifica-se pouca variação nos valores de rendimento da coluna, indicando estabilidade e durabilidade da mesma. Este comportamento é muito importante, como no caso da coluna de Cd-Cu, devido a robustez da mesma no monitoramento dos íons de interesse *in loco*.

3.2.2. Comportamento da coluna redutora

A fim de verificar-se o comportamento das coluna redutoras em um período de um dia de trabalho, executou-se o programa para determinação simultânea de ferro(II) e ferro(III) utilizando-se o padrão de controle 3,0 mg L^{-1} de Fe^{2+} e Fe^{3+}.

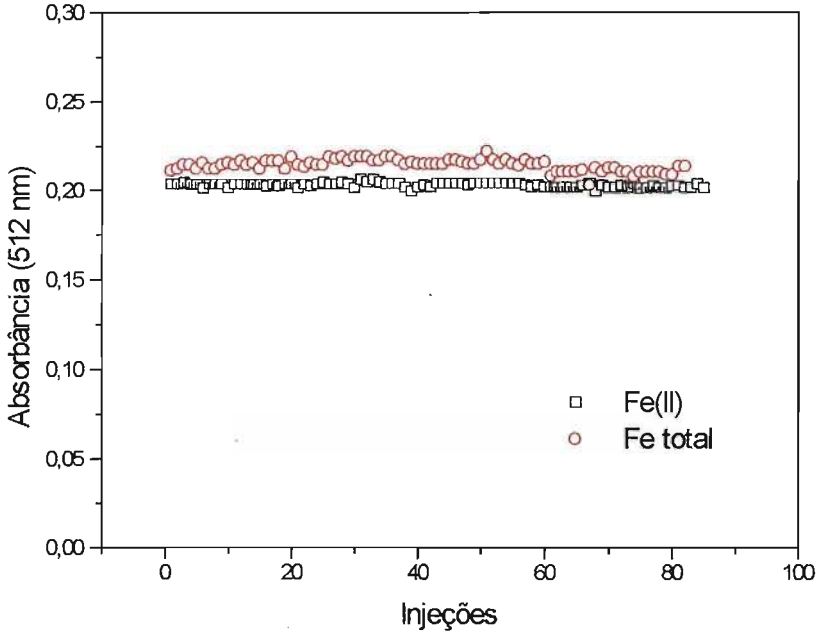


Figura 52. Comportamento da coluna contendo o redutor de Jones utilizando-se padrão de controle 3,0 mg L^{-1} de Fe^{2+}e Fe^{3+}.

A Figura 52 mostra a boa repetibilidade das sucessivas injeções do padrão de controle. Ao fim de 85 injeções comprova-se o bom desempenho da coluna redutora de Jones verificando-se uma variação de +0,76% no seu rendimento.

A Tabela 20 resume os resultados obtidos quanto ao comportamento da coluna ao fim de 85 injeções do padrão de controle.

Tabela 20. Resultados obtidos na avaliação do comportamento da coluna redutora de Jones.

Padrão	N° de injeções	Δ rendimento	M#(UA)		DPR%	
			Fe(II)	Fe t*	Fe(II)	Fe t*
3 mg L^{-1}	85	+0,76%	0,212	0,224	1,55	2,9

*Fe t = ferro(II) + ferro(III) M# = média aritmética do sinal obtido

Observa-se na Tabela 20, o pequeno valor do desvio padrão, mostrando o bom desempenho da micro-coluna contendo o redutor de Jones. Esta característica potencializa o sistema para a determinação destes íons metálicos *in loco*.

3.3. Utilização da Técnica de Amostragem Sanduíche

Alonso-Chamarro e colaboradores (1992) reportaram sobre a utilização da amostragem sanduíche em Análise por Injeção em Fluxo (FIA). Neste trabalho, os autores inseriram um "plug" de amostra entre dois "plugs" de reagentes com diferentes concentrações a fim de se determinar crômio(VI) em duas faixas de trabalho diferentes. A utilização da técnica sanduíche com grandes volumes de amostra também tem sido empregada para a determinação de dois analitos diferentes simultaneamente (Estela e colaboradores, 1996; Cerdà e colaboradores, 1998). Vieira e colaboradores (1998) demostraram ganho de sensibilidade na técnica SIA, utilizando-se estratégias de amostragem como a amostragem binária (Kronka e colaboradores, 1996) e amostragem sanduíche. A zona de amostra é intercalada por duas zonas de reagentes, promovendo a formação de duas interfaces entre amostra e reagente, resultando numa mistura mais efetiva.

A fim de aumentar a sensibilidade do método para a determinação de ferro(II) e ferro(III), visando o monitoramento das espécies de interesse em águas naturais, alterou-se a seqüência aspirada entre as zonas de amostra e reagente.

A amostragem sanduíche foi utilizada, aspirando-se a seqüência reagente, amostra, reagente a fim de promover uma melhor eficiência na formação da zona de reação, contribuindo para que ocorra efetiva sobreposição das zonas de amostra e reagente, assim como manter o reagente em excesso em relação à quantidade estequiométrica. Para tanto, utilizou-se o primeiro padrão habitual da curva analítica (0,05 mg L^{-1} de Fe(II)) como padrão de controle com o intuito

de verificar qualquer ganho de sinal diferenciando desta forma, o padrão do branco (0,05 mol L^{-1} HCl). A influência do volume de amostra foi estudada na faixa de 25 a 300 μL, mantendo-se constante o volume de reagente em 100 μL ou seja, duas zonas de reagente intercaladas pela zona de amostra. O melhor resultado foi obtido utilizando-se 150 μL de amostra. As Figuras 54 e 55 mostram as curvas analíticas obtidas para ferro(II) e ferro total, onde verifica-se uma significativa diminuição no limite de detecção.

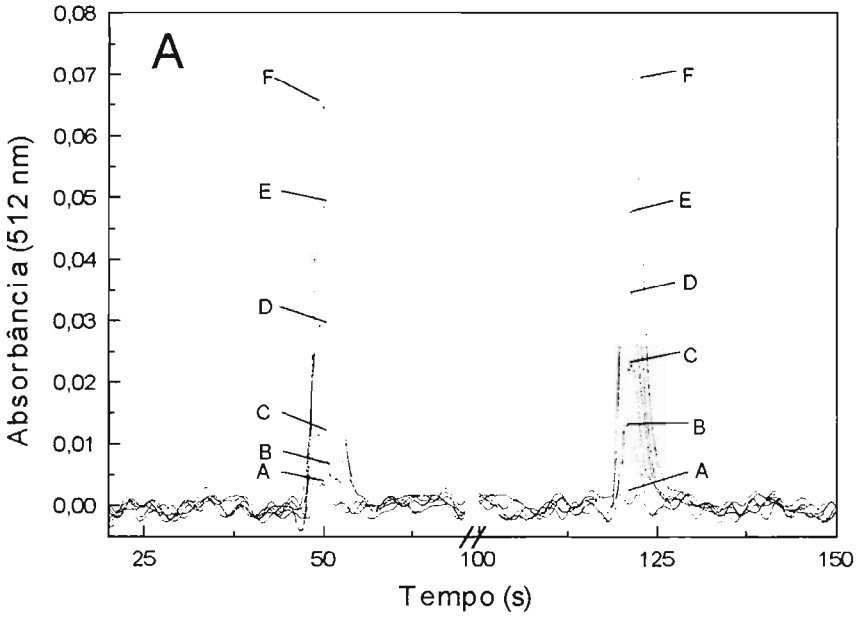


Figura 53. Registro do sinal de Fe(II) e Fe total . (A) 0,05 mg L^{-1} de Fe^{2-} e 0,05 mg L^{-1} de Fe^{3-}; (B) 0,1 mg L^{-1} de Fe^{2+} e 0,1 mg L^{-1} de Fe^{3+}; (C) 0,2 mg L^{-1} de Fe^{2+} e 0,2 mg L^{-1} de Fe^{3-}; (D) 0,5 mg L^{-1} de Fe^{2+} e 0,5 mg L^{-1} de Fe^{3+}; (E) 0,7 mg L^{-1} de Fe^{2+} e 0,7 mg L^{-1} de Fe^{3+}; (F) 1,0 mg L^{-1} de Fe^{2+} e 1,0 mg L^{-1} de Fe^{3+}.

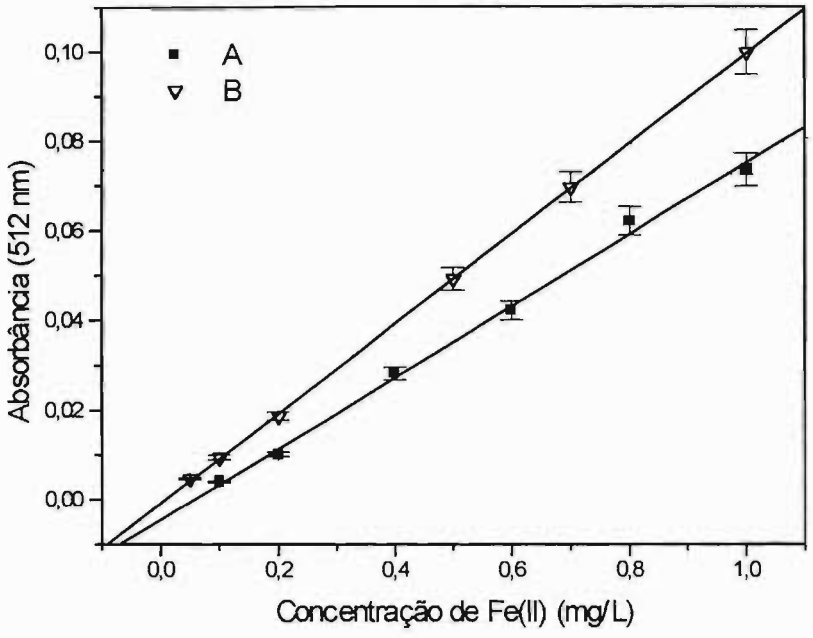


Figura 54. Curva analítica para Fe(II). A: curva obtida antes das modificações na seqüência de operações no SIA. Y=(-0,004±0,002)+(0,079±0,002)X, R=0,998, L.D.= 0,17 mg L^{-1}; B: curva obtida após as modificações. Y=(-0,0007±0,0003)+(0,1003±0,0005)X, R=0,999, L.D.=0,02 mg L^{-1}.

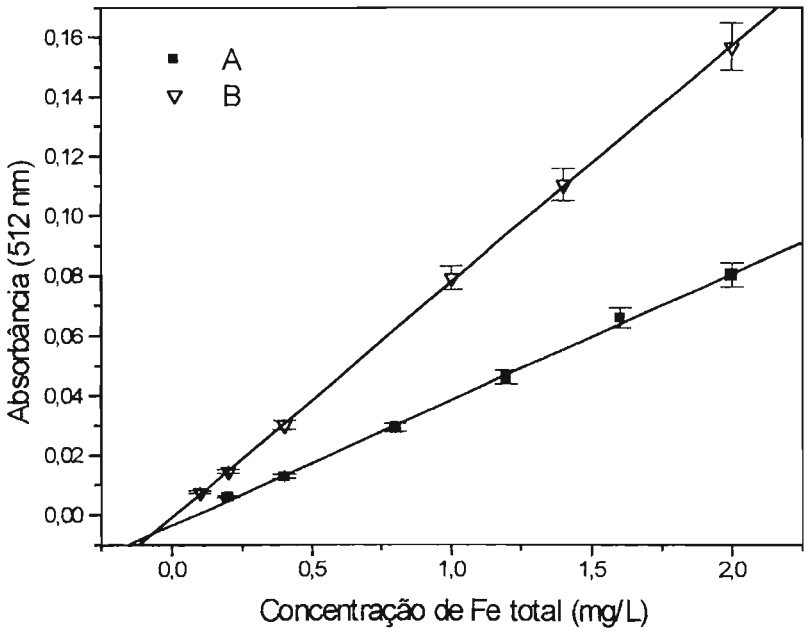
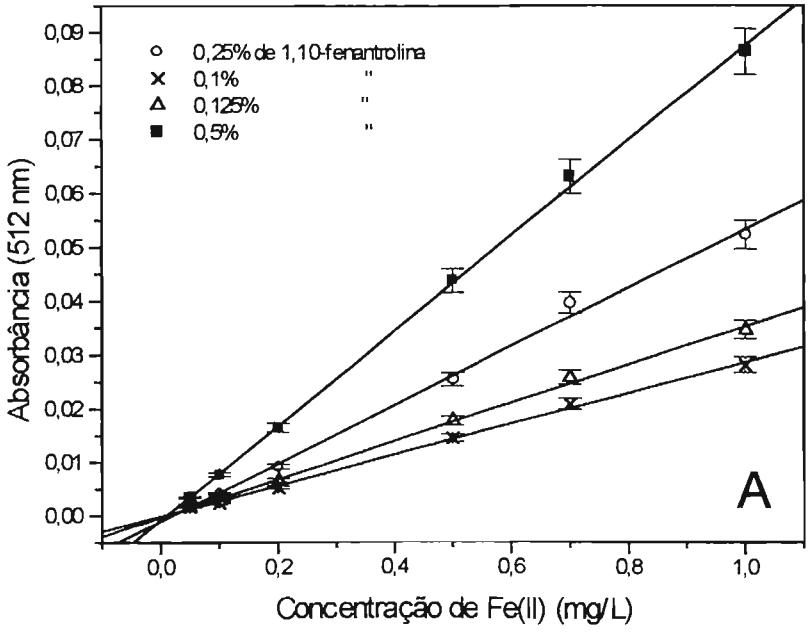


Figura 55. Curva analítica para Fe total. A: curva obtida antes das modificações na seqüência de operações no SIA. Y=(-0,003±0,001)+(0,0420±0,0009)X, R=0,999, L.D.= 0,21 mg L^{-1};B: curva obtida após as modificações.Y=(-0,0006±0,0005)+(0,0789±0,0005)X, R=0,999, L.D.=0,034mg L^{-1}.

3.4. Estudo da Concentração do Reagente 1,10-fenantrolina

A fim de aumentar ainda mais a sensibilidade do método para a determinação de Fe(II) e Fe(III), testou-se diferentes concentrações da solução de 1,10-fenantrolina em HCl 0,05 mol L^{-1} em comparação com a solução usualmente utilizada (0,25% (m/v)). As concentrações escolhidas foram 0,1%, 0,125% e 0,5% (m/v). A Figura 56 ilustra o resultado obtido.



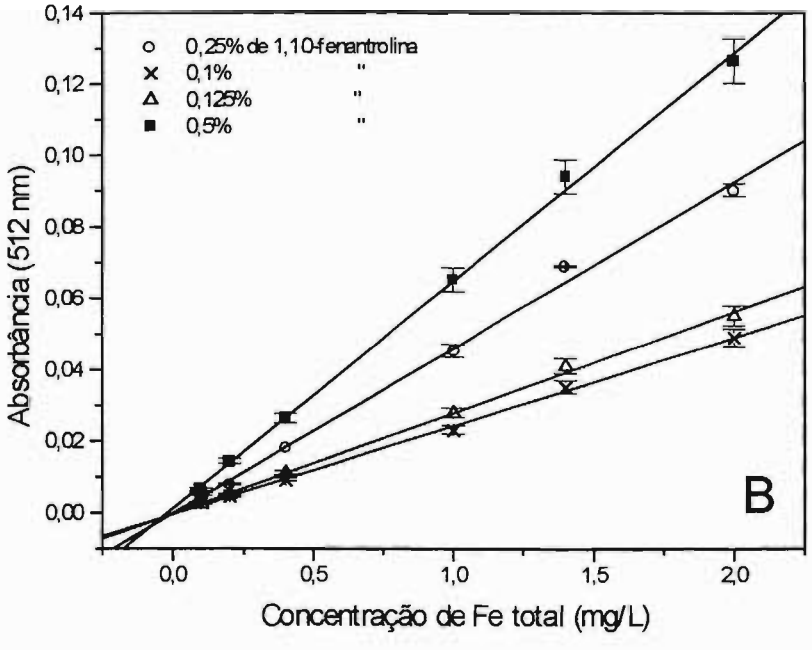


Figura 56. Registro do sinal de Fe(II) (A) e Fe total (B) variando-se a concentração de 1,10-fenantrolina. Condições: Amostragem sanduíche (V_S = 150 μL; V_R = 100 μL); percurso analítico = 50 m; Vazão = 100 μL s^{-1}.

A Tabela 21 mostra os dados das curvas analíticas da Figura 53.

Tabela 21. Parâmetros característicos das curvas analíticas em função da concentração de 1,10-fenantrolina.

Curvas#	Coeficiente Linear (UA)		Coeficiente Angular (L mg^{-1})		R	
	Fe(II)	Fe t*	Fe(II)	Fe t*	Fe(II)	Fe t*
0,25%	-0,001±0,001	-0,0001±0,002	0,054±0,002	0,046±0,001	0,998	0,998
0,1%	-0,0001±0,0004	-0,0003±0,0006	0,0286±0,0007	0,0248±0,0005	0,999	0,999
0,125%	-0,0002±0,0004	-0,0002±0,0007	0,0355±0,0008	0,0283±0,0006	0,999	0,999
0,5%	-0,0008±0,0008	0,001±0,001	0,088±0,001	0,064±0,001	0,999	0,999

diferentes concentrações de 1,10-fenantrolina; *Fe t = ferro total

Como pode-se observar, o reagente 1,10-fenantrolina na concentração de 0,5% (m/v), proporcionou melhor sensibilidade ao sistema estudado, o que é verificado por um pronunciado aumento no valor do coeficiente angular da curva analítica.

3.5. Estudo de Interferentes

O estudo dos possíveis interferentes na determinação de ferro(II) e ferro(III) foi realizado utilizando-se padrão de controle de 3 mg L^{-1} de Fe(II) e Fe(III) em 0,05 mol L^{-1} de HCl. Todos os padrões contendo os possíveis íons interferentes foram preparados em meio de 0,05 mol L^{-1} de HCl. A Tabela 22 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 22. Efeito dos possíveis interferentes na determinação de ferro(II) e ferro(III).

Espécie estudada	Concentração ($mg\ L^{-1}$)	Adicionado como	E%(Fe(II))	E%(Fe t#)
Al^{3+}	50	$Al(NO_3)_3.\ 9H_2O$	+0,33	+7,2
Cu^{2+}	10	$Cu(NO_3)_2.3H_2O$	+0,87	+3,3
Zn^{2+}	10	$Zn(NO_3)_2.6H_2O$	+1,1	+5,8
Ca^{2+}	25	$CaCl_2$	+0,11	+3,3
K^+	20	KNO_3	+0,11	+3,9
PO_4^-	20	KH_2PO_4	-0,22	+2,8
NO_3^-	20	KNO_3	+0,11	+3,9
NO_2^- *	0,07	$NaNO_2$	+0,15	+3,9
NO_2^- *	0,4	$NaNO_2$	-7,6	-5,6
NO_2^- *	0,8	$NaNO_2$	-21,8	-23,5
MON**	2	Ácido húmico	+0,92	-1,3
MON**	10	Ácido húmico	-1,2	+2,3
S^{2-} **	0,05	$Na_2S.9H_2O$	+3,8	+5,9
S^{2-} **	0,5	$Na_2S.9H_2O$	+3,8	+5,1

Fe t = ferro(II) + ferro(III); * Solução de 0,7 $mg\ L^{-1}$ de Fe^{2+} e Fe^{3+} ; ** Solução 0,5 $mg\ L^{-1}$ de Fe^{2+} e Fe^{3+} contendo 5 $mg\ L^{-1}$ de MON (matéria orgânica natural).

Substâncias fortemente oxidantes, cianeto, nitrito e fosfato podem interferir na determinação de ferro(II). Crômio e zinco na razão de 10:1 de ferro pode interferir. Cobalto e cobre interferem em concentrações maiores que 5 $mg\ L^{-1}$ e níquel em concentração maior que 2 $mg\ L^{-1}$ (APHA, 1995).

Como mostra a Tabela 22, não foi observada interferência para a concentração de cobre estudada. Al^{3+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}, K^+, PO_4^{3-} e NO_3^- também não apresentaram interferência.

Sulfeto, nas concentrações estudadas, não apresentou interferência significativa, porém, sua presença na amostra, proveniente de ambiente anóxido, pode acarretar reação de precipitação do mercúrio presente no redutor de Jones, como HgS diminuindo a estabilidade da micro-coluna redutora e consequentemente redução no seu rendimento.

3.6. Monitoramento de Fe(II) e Fe(III) Utilizando-se Filtração Tangencial em Amostras Simuladas.

Amostras artificiais foram preparadas a partir de sedimentos naturais coletados do reservatório Guarapiranga localizado na cidade de São Paulo, como descrito anteriormente no ítem 3.4.2 no Capítulo IV. Em algumas amostras foi adicionada quantidade conhecida de ácido húmico comercial resultando numa concentração de carbono orgânico dissolvido entre 1 e 5 mg L^{-1}. Nestas condições, observou-se que o sinal de ferro total foi sistematicamente menor do que o obtido pelo método da APHA.

Após verificar-se problemas na aquisição do sinal de ferro total devido a presença da matéria orgânica, optou-se pela alteração na seqüência de operações no SIA. Quando fragmenta-se a zona de amostra com pequenos plugs de HCl anteriormente à injeção da amostra na micro-coluna redutora, não é verificado erro negativo para ferro total. Isto pode ser explicado pela formação de complexos entre a matéria orgânica e o Fe(III) e também entre outros constituintes da suspensão, dificultando a etapa de redução. Com a inclusão de pequenos plugs de HCl 0,1 mol L^{-1} (25 μL HCl; 190 μL de amostra; 30 μL HCl; 190 μL de amostra), a diminuição do pH da amostra é favorecida, contribuindo desta forma para uma redução mais eficiente dos íons Fe(III). Como o SIA é um sistema de linha única, não sendo possível haver confluência da amostra com uma solução ácida, a segmentação da amostra por zonas de HCl foi uma boa opção, já que uma prévia acidificação da amostra resultaria na precipitação da matéria orgânica, além de causar alterações na amostra.

A membrana utilizada no interior do filtro tangencial na determinação de ferro, é responsável pela seleção de partículas coloidais que podem adsorver o ferro. Portanto, o diâmetro dos poros da membrana utilizada reflete diretamente na concentração de ferro encontrado nas amostras de modo que os resultados devem ser encarados de maneira operacional, ou seja, válidos para membrana de filtração com 0,45 μm de diâmetro de poro.

As amostras analisadas por SIA foram também analisadas por uma metodologia independente a fim de obtermos uma comparação entre elas. Utilizando-se a mesma reação química com a 1,10-fenantrolina, determinou-se ferro(II) (APHA, 1995) e a determinação de ferro total foi realizada com prévia redução do Fe(III) a Fe(II) utilizando-se ácido ascórbico. O resultado pode ser observado na Figura 57.

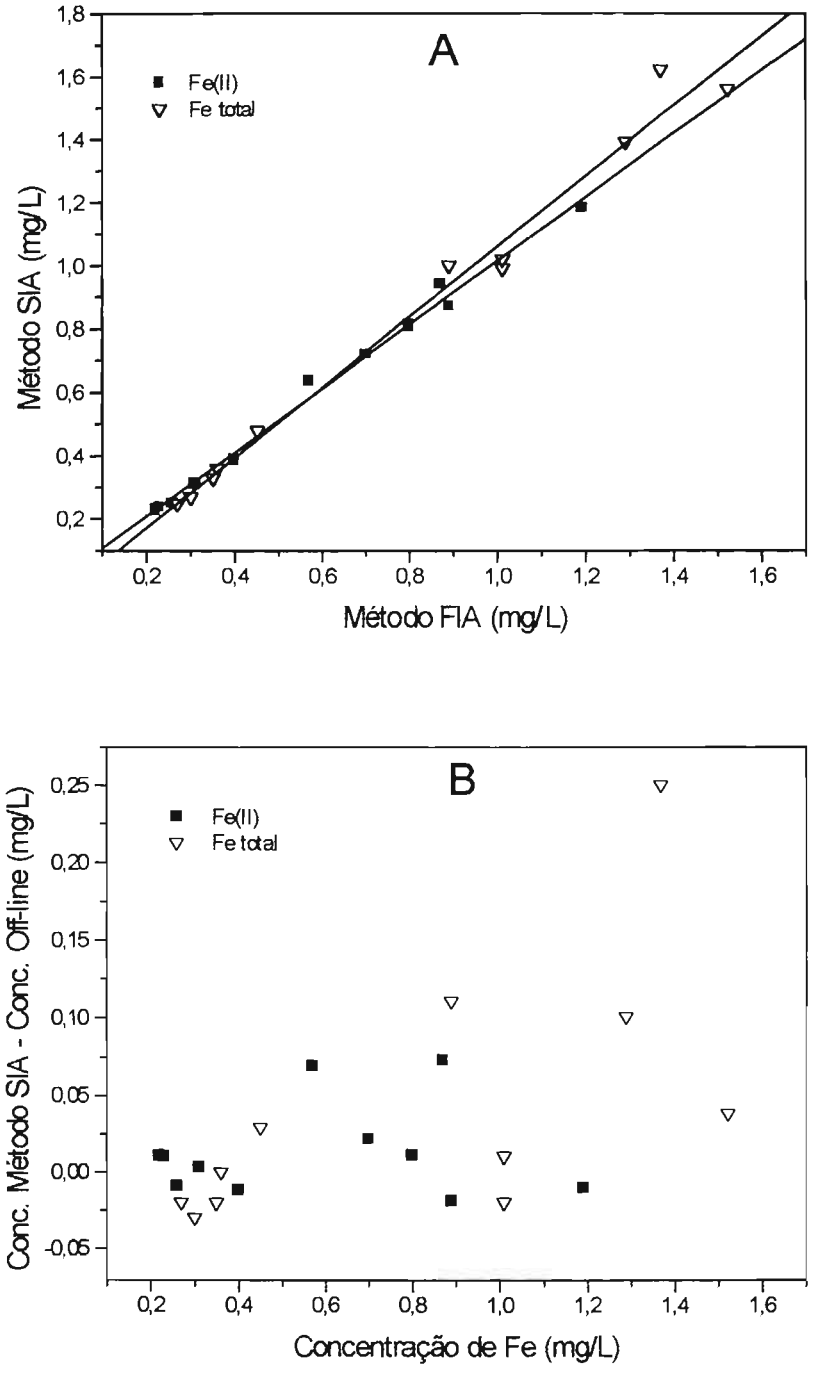


Figura 57. (A) Correlação entre os métodos SIA e o método off-line para a determinação de Fe(II) e Fe total na suspensão de sedimentos. (B) Diferença entre as concentrações obtidas pelo método SIA e método off-line, plotados como função dos resultados obtidos pelo método off-line.

De acordo com os gráficos apresentados na Figura 57, não se observa evidências de erro sistemático entre os resultados obtidos pelos dois métodos aplicados para determinação de ferro(II) e ferro(III), além do gráfico de correlação (A) apresentar coeficiente de correlação ser maior que 0,99, (0,998 para o Fe(II) e 0,992 para o Fe total) o coeficiente angular próximo de 1 (1,00±0,03 para Fe(II) e 1,11±0,04 para Fe total) e o linear próximo de zero (0,01±0,02 para o Fe(II) e –0,05±0,04 para o Fe total), indicando boa concordância entre as metodologias.

4. CONCLUSÕES

O método proposto mostrou-se adequado às amostras estudadas além de ser aplicável a padrões de qualidade ambiental (0,3-5 mg L^{-1} de ferro solúvel) e padrões de potabilidade (0,1-1,0 mg L^{-1} de ferro total). O limite de determinação alcançado foi de 0,02 mg L^{-1} para o ferro(II) e 0,034 mg L^{-1} para o ferro total. A freqüência de amostragem obtida foi de 20 amostras h^{-1}.

O consumo e geração de resíduos no sistema SIA é muito menor que no método da APHA, onde 20 mL de 1,10-fenantrolina são usados na análise de uma amostra gerando o resíduo de 1 x 10^{-4} mols de reagente. No SIA a mesma quantidade de efluente é gerado na análise de 20 amostras. O método FIA (Faizullah e Townshend, 1985) também produz a mesma quantidade de resíduo que o SIA, porém, sua freqüência analítica é muito maior (60 amostras h^{-1}).

O filtro tangencial apresentou bom desempenho como para a determinação de nitrito e nitrato. Entretanto, não observou-se erro sistemático positivo nas amostras simuladas estudadas, como ocorreu anteriormente nas determinações de nitrito.

5. PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS

A metodologia desenvolvida nesta tese poderá ser aplicada em conjunto com o método para determinação de sulfeto (Silva e colaboradores, 2001), em estudos de oxidação de sedimentos anóxidos através de bombeamento de ar. Alguns dos processos envolvidos são oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+}, Mn^{2+} a Mn^{4+} e de S^{2-} a SO_4^{2-} com conseqüente liberação de H^+. Estes estudos podem fornecer informações sobre as cinéticas de oxidação, bem como a caracterização das espécies que permanecem em solução uma vez que os íons Fe^{3+} e Mn^{4+} tendem a sofrer hidrólise. Estas informações podem ser de grande utilidade no gerenciamento de processos de recuperação de ambientes aquáticos degradados e anóxidos.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, J., Bartrilí, J., del Valle, M., Escalada, M., Barber, R., Sandwich Techniques in Flow Injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **199** (1987) 191.

Alonso-chamarro, J., Bartrolí, J., Barber, R., Sandwich Techniques in Flow-injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **261** (1992) 219.

Alpízar, J., Crespí, A., Cladera, A., Forteza, R. and Cerdà, V., Simultaneous Determination of Chloride and Fluoride Ions in Waters by Sequential Injection Analysis, *Eletroanalysis*, **8** (11) (1996) 1051.

Araujo, A.N., Costa, R.C.C., Lima, J.L.F.C., Application of Sequential Injection Analysis to the Assay of Lead Retention Characteristics by Poly(vinylpyrrolidone): Trace Analysis of Lead in Waters, *Anal. Sciences*, **15** (10) (1999) 991.

Araújo, A.N., Costa, R.C.C., Lima, J.L.F.C., Reis, B.F., Sequential Injection System in Flame Atomic Absorption Spectrometry for the Determination of Calcium and Magnesium in Mineral Waters, *Anal. Chim. Acta*, **358** (1998) 111.

Araujo, A.N., Gracia, J., Lima, J.L.F.C., Poch, M., Lúcia, M., Saraiva, M.F.S., Colorimetric Determination of Iron in Infant Fortified Formulas by Sequential Injection Analysis, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **357** (1997) 1153.

Araújo, A.N., Lima, J.L.F.C., Rangel, A.O.S.S., Segundo, M.A., Sequential Injection System for the Spectrophotometric Determination of Reducing Sugars in Wine, *Talanta*, **52** (2000) 59.

Areias, M.C.C., Estudos sobre a Formação de Complexos de Fe(II) e Fe(III) com Di-2-Piridil Cetona Saliciloilhidrazona (DPKSH) e sua Aplicação no Desenvolvimento de Métodos Analíticos, Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP, 1998.

Armas, G., Cladera, A., Becerra, E., Estela, J.M., Cerdà, V., Fluorimetric Sequential Injection Determination of Magnesium Using 8-hydroxiquinoline-5-sulfonic acid in a Micellar Medium, *Talanta*, **52** (2000) 77.

Barnett, N.W., Lenehan, C.E., Lewis, S.W., Sequential Injection Analysis: an Alternative Approach to Process Analytical Chemistry, *Trends in Anal. Chem.*, **18** (5) (1999) 346.

Barnett, N.W., Lewis, S.W., Tucker, D.J., Determination of Morphine in Process Streams by Sequential Injection Analysis with Chemiluminescence Detection, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **355** (1996) 591.

Bermudez, B., Rios, A., Luque de Castro, M. D., Valcarcel, M., Configuration with Internally Coupled Valves to Overcome Shortcomings in the Simultaneous Determination of Nitrite and Nitrate by Flow-injection Analysis, *Talanta*, **35** (10) (1988) 810.

Boef, G. den., Unstable Reagents in Flow Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **216** (1989) 289.

Boef, G. den., and Schothorst, R. C., A. Unstable Reagents in Quantitative Analysis ? Why not apply FIA ! *Anal. Chim. Acta*, **180** (1986) 1.

Borggaard, O.K., Jorgensen, S.S., Determination of Silicon in Soil Extracts by Flow Injection Analysis, *Analyst*, **110** (1985) 177.

Burguera, J.L., Burguera, M., Flow Injection Spectrophotometry Followed by Atomic Absorption Spectrometry for the Determination of Iron(II) and Total Iron, *Anal. Chim. Acta*, **161** (1984) 375.

Cerdà, A., Oms, M.T., Forteza, R., Cerdà, V., Sequential Injection Sandwich Technique for the Simultaneous Determination of Nitrate and Nitrite, *Anal. Chim. Acta*, **371** (1998) 63.

Cerdà, A., Oms, M.T., Forteza, R., Cerdà, V., Speciation of Nitrogen in Wastewater by Flow Injection, *Analyst*, **121** (1996) 13.

Cerdà, V., Estela, J.M., Forteza, R., Cladera, A., Becerra, E., Flow Techniques in Water Analysis, *Talanta*, **50** (1999) 695.

CETESB, Informações Ambientais. Qualidade dos rios e reservatórios. Rede de monitoramento. Disponível em http://www.cetesb.sp.gov.br. Acesso 21 ago 2000.

Chalk, S. J., Tyson, J. F., Comparison of the Maximum Sensitivity of Different Flow Injection Manifold Configurations: Alternating Variable Search Optimization of the Iron(II)/1,10-phenanthroline System, *Anal. Chem.*, **66** (1994) 660.

Chalmers, R.A., Sinclair, A.G., Analytical Applications of β-heteropoly Acids. Part II. The influence of Complexing Agents on Seletive Formation, *Anal. Chim. Acta*, **34** (1966) 412.

Chen, D., Castro, M.D., Valcárcel, M., Determination of Anions by Flow Injection. A Review, *Analyst*, **116** (1991) 1095.

Christian, G.D., Sequential Injection Analysis for Electrochemical Measurements and Process Analysis, *Analyst*, **119** (1994) 2309.

Cotton, F.A., Wilkinson, G., "Advanced Inorganic Chemistry", Interscience Publishers, London, 1972, p. 953.

Dreveny, D., Michalowsky, J., Seidl, E.Gübitz, G., Development of Solid-phase Chemiluminescence Immunoassays for Digoxin Comparing Flow Injection and Sequential Injection Techniques, *Analyst*, **123** (1998) 2271.

Dreveny, D., Klammer, C., Michalowsky, J., Gübitz, G., Flow Injection and Sequential Injection Immunoassay for Triiodothyronine using Acridinium Ester Chemiluminescence Detection, *Anal. Chim. Acta*, **398** (1999) 183.

Echols, R.T., Christensen, M.M., Krisko, R.M., Aldstadt, J.H., Selective Determination of TNT in Soil Extracts by Sequential Injection Spectrophotometry, *Anal. Chem.*, **71** (1999) 2739.

Egorov, O., O'Hara, J., Ruzicka, J., Grate, J.W., Sequential Injection Separation System with Stopped-flow Radiometric Detection for Automated Analysis of ^{99}Tc in Nuclear Waste, *Anal. Chem.*, **70** (1998) 977.

Estela, J.M., Cladera, A., Munõz, A., Cerdà, V., Simultaneous Determination of Ionic Species by Sequential Injection Analysis Using a Sandwich Technique with Large Sample Volumes, *Intern. J. Environ Anal. Chem.*, **64** (1996) 205.

Fadrus, H., Malý, J., Suppression of Iron(III) Interfernce in the Determination of Iron(II) in Water by the 1,10-phenanthroline Method, *Analyst*, **100** (1975) 549.

Faizullah, A.T., Townshend, A., Application of a Reducing Column for Metal Speciation by Flow Injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **167** (1985) 225.

Fang, Z., "Flow Injection Separation and Preconcentration", VCH Publishers, Weinhein, 1993.

Feigl, F., "Chemistry of Specifc, Selective and Sensitive Reactions", Academic Press, New York, 1949, p.75, 117.

Feigl, F., "Spot Tests in Inorganic Analysis", Elsevier Publishing Company, 1958, p. 333.

Floch, J., Blain, S., Birot, D., Treguer, P., In Situ Determination of Silicic acid in Water Based on FIA and Colorimetric Dual-wavelength Measurements, *Anal. Chim. Acta*, **377** (1998) 157.

Fogg, A.G., Cipko, E., Farabella, L., Tyson, J.F., Shapes of Flow Injection Signals. Effect of Refractive Index on Spectrophotometric Signals Obtained for On-line Formation of Bromine from Bromate, Bromide and Hydrogen Ion in a Single-channel manifold Using Large-volume Time-based Injection, *Analyst*, **115** (1990) 593.

Freeman, P.R., Mckelvie, I.D., Hart, B., Cardwell, T.J., Flow-injection Technique for the Determination of Low Levels of Phosphorus in Natural Waters, *Anal. Chim. Acta*, **234** (1990) 409.

Galhardo, C.X., Masini, J.C., Spectrophotometric Determination of Phosphate and Silicate by Sequential Injection Using Molybdenum Blue Chemistry, *Anal. Chim. Acta*, **417** (2000) 191.

Giné, M.F., Bergamin, F°, H., Zagatto, E. A. G., e Reis, B. F., Simultaneous Determination of Nitrate and Nitrite by Flow Injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **144** (1980) 191.

Gómez, E., Tomás, C., Cladera, A., Estela, J.M., Cerdà, V., Multicomponent Techniques in Sequential Injection, *Analyst,* **120** (1995) 1181.

Gracia, J., Saraiva, M.L.M.F.S., Araújo, A.N., Lima, J.L.F.C., Valle, M., Poch, M., Evaluation of Natural Computation Techniques in the Modelling and Optimization of a Sequential Injection Flow System for Colorimetric Iron(III) Determination, *Anal. Chim. Acta*, **348** (1997) 143.

Grate, J.W., Fadeff, S.K., Egorov, O., Separation-optimized Sequential Injection Method for Rapid Automated Analytical Separation of ^{90}Sr in Nuclear Waste, *Analyst*, **124** (1999) 203.

Grate, J.W., Strebin, R., Janata, J., Egorov, O., Ruzicka, J., Automated Analysis of Radionuclides in Nuclear Waste: Rapid Determination of ^{90}Sr by Sequential Injection Analysis, *Anal. Chem.*, **68** (1996) 333.

Gubelli, T., Christian, G.D., Ruzicka, J., Fundamentals of Sinusoidal Flow Sequential Injection Spectrophotometry, *Anal. Chem.*, **63** (1991) 2407.

Haj-Hussein, A.T., Christian, G.D., Simultaneous Spectrophotometric Determination of Copper, Nickel and Palladium by Flow Injection Analysis, *Analyst,* **111** (1986) 65.

Hansen, E.H., Exploiting Kinetic-based Flow-injection Methods for Quantitative Chemical Assays, *Anal. Chim. Acta*, **261** (1992) 125.

Huebers, H.A., Iron In: Merian, E., Metals and their Compounds in the Environmental, VCH Publishers, Cambridge, 1991, p.950.

Ingle, J.D., Crouch, S.R., Simultaneous Determination of Silicate and Phosphate by an Automated Differential Kinetic Procedure, *Anal. Chem.*, **43** (1) (1971) 7.

Ivaska, A., Ruzicka, J., From Flow Injection to Sequential Injection: Comparison of Methodologies and Selection of Liquid Drives, *Analyst,* **118** (7) (1993) 885.

Jacintho, A.O., Kronka, E.A.M., Zagatto, E.A.G., Arruda, M.A.Z., Ferreira, J.R., Sequential Determination of Silicate and Phosphate in Waters by Flow-Injection Spectrophotometry, *J. Flow Injection Anal.*, **6** (1) (1989) 19.

Kircher, C.C., Crouch, S.R., Kinetics of the Formation and Decomposition of 12-molybdophosphate, *Anal. Chem.*, **55** (1983a) 242.

Kircher, C.C., Crouch, S.R., Simultaneous Reaction-Rate Determination of Phosphate and Silicate, *Anal. Chem.*, **55** (1983b) 248.

Kronka, E.Ap.M., Reis, B.F., Vieira, J.A., Blanco, T., Gervasio, A.P.G., Multicomutação e Amostragem Binária em Análise Química em Fluxo. Determinação Espectrofotométrica de Ortofosfato em Águas Naturais, *Química Nova*, **20** (4) 1997.

Kuroda, R., Ida, I., Kimura, H., Spectrophotometric Determination of Silicon in Silicates by Flow-injection Analysis, *Talanta*, **32** (5) (1985) 353.

Lacy, N., Christian, G.D., Ruzicka, J., Flow Injection Method for Antimony(III) Based on Its Enhancement of the Molybdenum Blue Reaction, *Anal. Chim. Acta*, **224** (1989) 373.

Lapa, R.A., Lima, J.L.F.C., Pinto, I.V.O.S., Sequential Injection Analysis Determination of Sulphate in Wastewaters by Ultraviolet-Spectrophotometry, *J. Braz. Chem. Soc.*, **11** (2) (2000) 170.

Legg, J.O., Black, C.A., Determination of Organic Phosphorus in Soils: II Ignition Method, *Soil Science Society Proceedings*, **19** (1955) 139.

Levine, H., Rowe, J.J., Grimaldi, F.S., Molybdenum Blue Reaction and Determination of Phosphorus in Waters Containing Arsenic, Silicon, and Germanium, *Anal. Chem.*, **27** (2) (1955) 258.

Liu, R., Liu, D., Sun, A., Studies on the Application of Photochemical Reaction in a Flow Injection System. Part 2. * Simultaneous Determination of Iron(II) and Iron(III) Based on the Photoreduction of the Iron(III)-phenanthroline Complex, *Analyst*, **117** (1992) 1767.

Liu, S., Dasgupta, P.K., Liquid Droplet. A Renewable Gas Sampling Interface, *Anal. Chem.*, **67** (1995) 2042.

Liu, X., Liu, J., Fang, Z., Sequential-injection System for Drug-dissolution Studies of Ibuprofen Tablets and Sustained-release Formulations, *Anal. Chim Acta,* **358** (1998) 103.

Liu, X., Liu, S., Wu, J., Fang, Z., Simultaneous Monitoring of Aspirin, Phenacetin and Caffeine in Compound Aspirin Tablets Using a Sequential Injection Drug-dissolution Testing System with Partial Least Squares Calibration, *Anal. Chim Acta*, **392** (1999) 273.

Luca, G.C., Reis, B.F., Zagatto, E.A.G., Montenegro, M.C.B.S.M., Araújo, A.N., Lima, J.L.F.C., Development of a Potentiometric Procedure for Determination of Glycerol and 2,3-butanediol in Wine by Sequential Injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **366** (1998) 193.

Lukkari, I., Ruzicka, J., Christian, G.D., Determination of Total Ammonium-nitrogen and free Ammonia in a Fermentation Medium by Sequential Injection Analysis, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **346** (1993) 813.

Luo, Y., Al-Othman, R., Christian, G.D., Ruzicka, J., Flow/sequential Injection Determination of Gaseous Ammonia with a Glass Diffusion Denuder, *Talanta*, **42** (1995) 1545.

Luo, Y., Nakano, S., Holman, D.A., Ruzicka, J., Christian, G.D., Sequential Injection Wetting Film Extraction Applied to the Spectrophotometric Determination of Chromium(VI) and Chromium(III) in Water, *Talanta*, **44** (1997) 1563.

Ma, H.B., Fang, Z.L., Wu, J.F., Liu, S.S., A low Consumption Air-segmented Sequential Injection Vapor Generation System for the Determination of Mercury by Atomic Absorption Spectrometry, *Talanta*, **49** (1999) 125.

Margeson, J. H., Suggs, J. C., Midgett, M. R., Reduction of Nitrate to Nitrite with Cadmium, *Anal. Chem.*, **52** (1980) 1955.

Más, F., Estela, M., Cerdà, V., Simultaneous Spectrophotometric Determination of Silicate and Phosphate by Flow Injection Analysis, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **43** (1990) 71.

Masini, J.C., Baxter, P.J., Detwiler, K.R., Christian, G.D., On-line Spectrophotometric Determination of Phosphate in Bioprocesses by Sequential Injection, *Analyst*, **120** (1995) 1583.

Mas-Torres, F., Munõz, A., Estela, M., Cerdà, V., Simultaneous Determination of Phosphate and Silicate in Waste Water by Sequential Injection Analysis, *Analyst*, **122** (1997) 1033.

McLeod, S., Clarke, A.R.P., Determination of Phosphorus in the Presence of Iron(III) and Iron(II), *Analyst*, **103** (1978) 238.

Miller, J.C., Miller, J.N., "Statistics for Analytical Chemistry", Ellis Horwood, Chichester, 1988, p. 55.

Miró, M., Cladera, A., Estela, J.M., Cerdà, V., Sequential Injection Spectrophotometric Analysis of Nitrite in Natural Waters Using an On-line Solid-phase Extraction and Preconcentration Method, *Analyst*, **125** (2000) 943.

Mori, V., "Estudos Fundamentais sobre a Utilização de Micro-eletrodos em Sistemas Conectivos e Desenvolvimento de Método Analítico para a Determinação de Nitrato e Nitrito", Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, USP, 1998.

Muñoz, A., Mas Torres, F., Estela, J.M., Cerdà, V., Evaluation of Spectrophotometric Methods for Determination of Orthophosphates by Sequential Injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **350** (1997) 21.

Murphy, J., Riley, J.P., A Modified Single Solution Method for the Determination of Phosphate in Natural Waters, *Anal. Chim. Acta*, **27** (1962) 31.

Nebel, B.J., Wright, R.T., "Environmental Science", Prentice Hall, Englewood Cliffis, 1993, p. 268-289.

Nyman, J., Ivaska, A., Spectrophotometric Determination of Calcium in Paper Machine White Water by Sequential Injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **308** (1995) 286.

O'Nell, P., "Environmental Chemistry", second edition, Chapman & Hall, London, 1993.

Ohashi, K., Kawaguchi, H., Yamamoto, K., Simultaneous Kinetic Determination of Phosphate and Silicate Based on Heteropoly Blue Formation, *Anal. Chim. Acta*, **111** (1979) 301.

Oliveira, C.C., Zagatto, E.A.G., Araújo, A.N., Lima, J.L.C., Sample Preparation in Sequential Injection Analysis. Spectrophotometric Determination of Total Phosphorus in Food Samples, *Anal. Chim. Acta*, **371** (1998) 57.

Oliveira, C.C., Zagatto, E.A.G., Ruzicka, J., Christian, G.D., A Bead Injection System for Copper Determination, *Anal. Letters*, **33** (5) (2000) 929.

Oliveira, P.C.C., Masini, J.C., Sequential Injection Determination of Chromium(VI) by Transient Oxidation of Brucine with Spectrophotometric Detection and In-line Dilution, *Analyst*, **123** (1998) 2085.

Oms, M. T.; Cerdà, A. and Cerdà, V.; Preconcentration by Flow Reversal in Conductometric Sequential Injection Analysis of Ammonium, *Eletroanalysis*, , **8** (4) (1996a) 387.

Oms, M.T., Cerdà, A., Cerdà, V., Sequential Injection Analysis of Nitrites and Nitrates, *Anal. Chim. Acta*, **315** (1995) 321.

Oms, M.T., Cerdà, A., Cladera, A., Cerdà, V., Forteza, R., Gas Diffusion Techniques Coupled Sequential Injection Analysis for Selective Determination of Ammonium, *Anal. Chim. Acta*, **318** (1996b) 251.

Pacey, G.E., Hollowell, D.A., Miller, K.G., Straka, M.R., Gordon, G., Selective Enhancement by Flow Injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **179** (1986) 259.

Paseková, H. and Polásek, M, Solich, P.; Sequential Injection Analysis, *Chemicke Listy*, **93** (6) (1999) 354.

Paseková, H. and Polásek, M.; Determination of Procaine, Benzocaine and Tetracaine by Sequential Injection Analysis with Permanganate-induced Chemiluminescence Detection, *Talanta*, **52** (2000) 67.

Pehkonen, S., Determination of the Oxidation States of Iron in Natural Waters, *Analyst*, **120** (1995) 2655.

Pérez-Ponce, A., Lendl, B., Mid-IR Spectroscopy for the Quantification of Metal Ions in Aqueous Solution in the Nanogram Range, *Applied Spectroscopy*, **54** (5) (2000) 676.

Pollema, C.H., Ruzicka, J., Christian, G.D., Sequential Injection Immunoassay Utilizing Immunomagnetic Beads, *Anal. Chem.*, **64** (1992) 1356.

Prada, S.M., Flow System for Sequential Determination of Cu(II) and Speciation of Fe(II)/Fe(III) Employing Multicommutation and Binary Sampling, 8th International Conference on Flow Analysis, Warsaw, Poland, 2000, 217 p.

Reis, B.F., Martelli, P.B., Krug, F.J., Tumang, C,A., Flow Injection Preconcentration and Spectrophotometric Determination of Ortophosphate in Natural Waters, *J. Braz. Chem. Soc.*, **3** (1-2) (1992) 38.

Reis, B.F., Morales-Bubio, A., de la Guardia, M., Environmentally Friendly Analytical Chemistry through Automation: Comparative Study of Strategies for Carbaryl Determination with p-aminophenol, *Anal. Chim. Acta*, **392** (1999) 265.

Rius, A., Callao, M.P., Rius, F.X., Multivariate Statistical Process Control Applied to Sulfate Determination by Sequential Injection Analysis, *Analyst*, **122** (1997) 737.

Robards, K., McKelvie, I.D., Benson, R., Worsfold, P.J., Blundell, N.J., and Casey H., Determination of Carbon, Phosphorus, Nitrogen and Silicon Species in Waters, *Anal. Chim. Acta*, **287** (1994) 147.

Rocha, F.R.P., Nóbrega J.A., Efeito Schlieren em Sistemas de Análise por Injeção em Fluxo, *Química Nova*, **19** (6) (1996) 636.

Rocha, J.R.C., Kosminsky, L., Paixão, T.R.L.C., Bertotti, M., Anodic Oxidation of Nitrite at Molybdenum Oxide Layer, *Electroanalysis*, **13** (2) (2001) 155.

Rossi, A.V., He, X., Tubino, M., A Simple, Portable and Low Cost Device for a Colorimetric Spot-Test Quantitative Analysis, *Anal. Lett*, **33** (9) (2000) 1885.

Rubí, E., Jiménez, M.S., Bauzá de Mirabó, F., Forteza, R., Cerdà, V., Preconcentration and Atomic Absorption Determination of Iron by Sequential Injection Analysis, *Talanta*, **44** (1997) 553.

Ruzicka, J., Hansen, E.H., "Flow Injection Analysis", 2nd Edition, Wiley, New York, 1988.

Ruzicka, J., Hansen, E.H., Flow Injection Analysis. Part 1. A New Concept of Fast Continuos Flow Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **78** (1975) 145.

Ruzicka, J., Marshall, G.D., Sequential Injection: a New Concept for Chemical Sensors, Process Analysis and Laboratory Assays, *Anal. Chim. Acta*, **237** (1990) 329.

Ruzicka, J., Pollema, C.H., Scudder, K., Jet Ring Cell: A Tool for Flow Injection Spectroscopy and Microscopy on a Renewable Solid Support, *Anal. Chem.*, **65** (1993) 3566.

Ruzicka, J., Stewart, J.W.B., Flow Injection Analysis. Part II. Ultrafast Determination of Phosphorous in Plant Material by Continuous Flow Spectrophotometry, *Anal. Chim. Acta*, **79** (1975) 79.

Sawicki, E., Stanley, T.W., Pfaff, J., D'Amico, A., Comparison of Fifty-two Spectrophotometric Methods for Determination of Nitrite, *Talanta*, **10** (1963) 641.

Schindler, R., Vonach, R., Lendl, B., Kellner, R., A Rapid Automated Method for Wine Analysis based upon Sequential Injection (SI)-FTIR Spectroscopy, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **362** (1998) 130.

Shriver, D.F., Atkins, P.W., Langford, C.H., "Inorganic Chemistry", Oxford, 1990, p. 164.

Silva, C.L., Masini, J.C., Determination of Cu, Pb, Cd and Zn in River Sediment Extracts by Sequential Injection Anodic Stripping Voltammetry with Thin Mercury Film Eletrode, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **367** (2000) 284.

Silva, F.V., Souza, G.B., Ferraz, L.F.M., Nogueira, A.R.A., Determination of Chloride in Milk Using Sequential Injection Automated Conductimetry, *Food Chemistry* **67** (1999) 317.

Silva, I.S., "Distribuição Vertical e Fracionamento Químico de Fósforo em Sedimentos do Rio Tiête (Região de Pirapora do Bom Jesus, SP)", Dissertação de Mestrado, Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 1996.

Silva, M.S.P., Silva, I.S., Abate, G., Masini, J.C., Spectrophotometric Determination of Acid Volatile Sulfide in River Sediments by Sequential Injection Analysis Exploiting the Methylene Blue Reaction, *Talanta*, **53** (2001) 843.

Skeggs, L.T., *Am. J. Clin. Pathol.*, An Automatic Method for Colorimetric Analysis, **28** (1957) 311.

Skicko, J.I., Tawfik, A., On-line Method for Overcoming Phosphate Interference in the Automated Cadmium Reduction Method for the Determination of Nitrate, *Analyst*, **113** (1988) 297.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19 Ed., Washington, American Public Health Association, 1995, p. 3-67, 4-75, 4-106.

Stefan, R.I., van Staden, J.K.F., Aboul-Enein, H.Y., Amperometric Biosensors / Sequential Injection System for Simultaneous Determination of S- and R-captopril, *Biosensors & Bioelectronics*, **15** (2000) 1.

Stewart, J.W.B., Ruzicka, J., Bergamin, F°, H., Zagatto, E.A.G., Flow Injection Analysis. Part III. Comparison of Continuous Flow Spectrophotometry and Potentiometry for the Rapid Determination of the Total Nitrogen Content in Plant Digests, *Anal. Chim. Acta*, **81** (1976) 371.

Suliman, F. E. O. and Sultan, S. M., Sequential Injection Technique Employed for Stoichiometric Studies, Optimization and Quantitative Determination of Some Fluoroquinolone Antibiotics Complexed with Iron(II) in Sulfuric Acid Media, *Talanta*, **43** (1996) 559.

Sultan, S. M., Suliman, F. E. O. and Saad, B. B., Use of Sequential Injection Technique to Determine the Concentrations and Stoichiometries of Trimeprazine and Perphenazine Complexed with Palladium(II) in Hydrochloric Acid, *Analyst*, **120** (1995) 561.

Sultan, S. M., Suliman, F. E. O., Use of a Sequential Injection Technique for Mechanistic Studies and Kinetic Determination of Bromazepam Complexed with Iron(II) in Hydrochloric Acid, *Analyst*, **121** (1996) 617.

Sultan, S.M., Desai, N.I., Mechanistic Study and Kinetic Determination of Vitamin C Employing the Sequential Injection Technique, *Talanta*, **45** (1998) 1061.

Sultan, S.M., Desai, N.I., Sequential Injection Analysis Technique for the Concentration, Stoichiometry and Formation Constant Studies of Promethazine Hydrochloride Complexed with Palladium(II) in Hydrochloric Acid, *Analyst*, **122** (1997) 911.

Sultan, S.M., Hassan, Y.A.M., Ibrahim, E.E., Sequential Injection Technique for Automated Titration: Spectrophotometric Assay of Vitamin C in Pharmaceutical Products Using Cerium(IV) in Sulfuric Acid, *Analyst*, **124** (1999a) 917.

Sultan, S.M., Hassan, Y.A.M., Ibrahim, E.E., Sequential Injection Spectrophotometric Assay of Bromazepam Complexed with Iron(II) in Hydrochloric Acid with Chemometric Optimization, *Talanta*, **50** (1999b) 841.

Taljaard, R. E., van Staden, J. F., Simultaneous Determination of Cobalt(II) and Ni(II) in Water and Soil Samples with Sequential Injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **366** (1998) 177.

Taljaard, R.E., van Staden, J.F., Application of Sequential Injection Analysis as Process Analyzers, *Lab. Robotics Automat* **10** (6) (1998) 325.

Tang, L.X., Rowell, F.J., Rapid Determination of Warfarin by Sequential Injection Analysis with Cyclodextrin-enhanced Fluorescence Detection, *Anal. Lett.*, **31** (5) (1998) 891.

Terra, L.H.S.A., "Desenvolvimento de Métodos Espectrofotométricos para Determinação de Níquel(II) na Ausência e Presença de Ferro(II/III)". Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP (1997).

Thomas, O., Théraulaz, F., Cerdà, V., Constant, D., Quevauviller, P., Wastewater Quality Monitoring, *Trends in Anal. Chem.*, **16** (7) (1997) 419.

van Staden, J. F.; Plessis, H. and Taljaard, R. E., Determination of Iron(III) in Pharmaceutical

Samples Using Dialysis in a Sequential Injection Analysis System, *Anal. Chim. Acta*, **357** (1997) 141.

van Staden, J.F., Botha, A., Spectrophotometric Determination of Thiocyanate by Sequential Injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **403** (2000) 279.

van Staden, J.F., Botha, A., Spectrophotometric Determination of Cu(II) with Sequential Injection Analysis, Talanta, **49** (1999) 1099.

van Staden, J.F., Joubert, A.E., van Vliet, H.R., Flow-injection Determination of Nitrate in Natural Waters with Copper- and Copperised Cadmium Tubes in Reaction Manifold System, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **325** (1986) 150.

van Staden, J.F., McCormack, Sequential-injection Spectrophotometric Determination of Amino Acids Using 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic Acid, *Anal. Chim. Acta*, **369** (1998) 163.

van Staden, J.F., Stefan, R.I., Birghila, S., Evaluation of Different SIA Sample-buffer Configurations Using a Fluoride-selective Membrane Electrode as Detector, *Talanta*, **52** (2000) 3.

van Staden, J.F., Taljaard, R.E., Determination of Ammonia in Water and Industrial Effluent Streams with the Indophenol Blue Method Using Sequential Injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **344** (1997) 281.

van Staden, J.F., Taljaard, R.E., Determination of Sulphate in Natural Waters and Industrial Effluents by Sequential Injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **331** (1996) 271.

van Staden, J.F., Taljaard, R.E., On-line Monitoring of Phosphate in Natural Water and Effluent Streams Using Sequential Injection Analysis, *Mikrochim. Acta*, **128** (1998) 223.

van Staden, J.F., van der Merwe, T.A., On-line Monitoring of Nitrite in Fertilizer Process Streams, Natural and Waste Effluents with Sequential Injection Analysis, *Mikrochimica Acta*, **129** (1-2) (1998a) 33.

van Staden, J.F., van der Merwe, T.A., Spectrophotometric Determination of Nitrite in Cured Meat with Sequential Injection Analysis, *South African Journal of Chemistry-Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Chemie,* **51** (2) (1998b) 109.

Vieira, J.A., Raimundo Jr., I.M., Reis, B.F., Turbidimetric Determination of Sulphate Employing Gravity Flow-based Systems, 8th International Conference on Flow Analysis, Warsaw, Poland, 2000, 187 p.

Vieira, J.A., Raimundo Jr., I.M., Reis, B.F., Zagatto, E.A.G., Lima, J.L.F.C., Sampling Strategies in Sequential Injection Analysis: Exploiting the Monosegmented-flow Approach, *Anal. Chim. Acta*, **366** (1998) 257.

Wallmann, K., Kersten, M., Gruber, J., and Förstner, U., *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **51** (1992) 187.

Yokoyama, T., Hirai, Y., Yoza, N., Tarutani, T., Ohashi, S., Spectrophotometric Determination of Silicic Acid by Flow Injection Analysis, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **55** (1982) 3477.

Zagatto, E.A., Oliveira, C.C., Collins, C.H., Classificação e Definição dos Métodos de Análise em Fluxo (Recomendações – IUPAC 1994), *Química Nova*, **22** (1) (1999) 143.