

✓

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE ANÁLISE  
SIMULTÂNEA POR INJEÇÃO EM FLUXO PARA  
NITRATO E NITRITO E SUA APLICAÇÃO EM  
ESTUDOS LIMNOLÓGICOS**

**RICARDO LUIZ VASCONCELLOS DE QUEIROZ**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos-USP,  
como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre  
em Ciências da Engenharia Ambiental

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Bohdan Matvienko Sikar

DEDALUS - Acervo - EESC



31100036146

São Carlos - 1997



Class.	TESE - EESC
Cuti.	4626
Tombo	T108 97

Área: Engenharia Ambiental

3110003p146

st 0934232

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento  
da Informação do Serviço de Biblioteca - EESC-USP

Q3d

Queiroz, Ricardo Luiz Vasconcellos de  
Desenvolvimento de um sistema de análise  
simultânea por injeção em fluxo para nitrato e  
nitrito e sua aplicação em estudos limnológicos /  
Ricardo Luiz Vasconcellos de Queiroz. -- São  
Carlos, 1997.

Dissertação (Mestrado). -- Escola de Engenharia  
de São Carlos-Universidade de São Paulo, 1997.

Área: Ciências da Engenharia Ambiental  
Orientador: Prof. Dr. Bohdan Matvienko Sikar

1. Análise por injeção em fluxo. 2. Nitrato.
3. Limnologia - estudos. I. Título

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Candidato: Licenciado **RICARDO LUIZ VASCONCELLOS DE QUEIROZ**

Dissertação defendida e aprovada em 13-6-1997  
pela Comissão Julgadora:

*Bohdan Matvienko Sikar*

---

Prof. Titular **BOHDAN MATVIENKO SIKAR (Orientador)**  
(Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo)

*Arnola C. Rietzler*

---

Profª. Doutora **ARNOLA CECILIA RIETZLER**  
(Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)

*Boaventura Freire dos Reis*

---

Prof. Doutor **BOAVENTURA FREIRE DOS REIS**  
(Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo)

*Maria do Carmo Calijuri*

---

Profª. Doutora **MARIA DO CARMO CALIJURI**  
Coordenadora da Área de Ciências da Engenharia Ambiental

*José Carlos A. Cintra*

---

**JOSÉ CARLOS A. CINTRA**  
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Essa dissertação é dedicada a todos  
aqueles que acreditaram que ela existiria.  
Às vezes contra minhas próprias expectativas.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

Ao Professor Bohdan Matvienko pela orientação precisa e pela estimulante e agradável companhia nos momentos de trabalho.

Aos Profs. Drs. Boaventura Freire dos Reis e Arnola Cecília Rietzler, pelas excelentes críticas e sugestões, de pronto incorporadas nesse trabalho.

Ao Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada da EESC - USP, pelo apoio durante a execução desse trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas do CRHEA, pela ajuda e pelos bons momentos de convivência.

Ao Centro de Estudos do Mar - UFPR pelo constante apoio nesses últimos anos de trabalho e pesquisa.

À Dra. Elizabeth Aidar, do IO - USP, pelo apoio e amizade de vários anos.

Ao M.Sc. Leonardo Rios pela extrema gentileza na cessão de dados ainda não publicados.

Ao Biol. Jackson Cesar Bassfeld, responsável pelo laboratório de Ecotoxicologia do CEM, por todas as facilidades arranjadas para a execução de algumas etapas desse projeto.

Ao M.Sc. José Claro da Fonseca Neto, pelo excelentes desenhos, diagramação e arte final dessa dissertação.

Ao jornalista Silvio Luiz Vasconcellos de Queiroz, pela revisão, no mínimo excepcional, desse trabalho.

Aos meus amigos e irmãos de São Carlos por termos, juntos, tornado essa nossa passagem por aqui uma experiência bastante agradável.

À minha grande família em Pontal do Sul, para aonde eu corro, ao menos em pensamento, sempre que posso.

À minha maior ainda família de São Paulo, especialmente à Vanda, Zally, Silvio, Thais, Fernando, Márcio e Maurício, por tudo.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
<i>ABSTRACT</i> .....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Importância dos estudos com o nitrogênio nos ambientes aquáticos.....	1
1.2. Sistemas de análise em fluxo para nitrato e nitrito.....	5
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Preparo de reagentes e padrões.....	21
3.2. Sistema de detecção.....	23
3.3. Configuração do sistema para análise simultânea de nitrato e nitrito.....	27
3.4. Estudo das características do sistema.....	30
3.5. Tratamento do sinal.....	33
3.6. Calibração do sistema.....	33
3.7. Bioensaio.....	34
4. RESULTADOS.....	39
4.1. Sistema de análise.....	39
4.2. Características do sistema.....	41
4.3. Bioensaio.....	48

	Página
5. DISCUSSÃO.....	49
5.1. Cella de fluxo e sistema de detecção.....	49
5.2. Ajuste do sistema.....	51
5.3. Características do sistema.....	55
5.4. Bioensaio.....	57
6. CONCLUSÕES.....	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS.....	66

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Principais vias do nitrogênio em ecossistemas aquáticos.....	3
Figura 2. Paralelo entre procedimentos manuais e automatizados.....	7
Figura 3. Esquema do mais simples modelo de linha analítica em FIA.....	8
Figura 4. Dispersão de uma amostra em sistemas FIA.....	14
Figura 5. Representação esquemática da reação de diazotação / acoplamento.....	21
Figura 6. Diagrama esquemático do colorímetro e circuito.....	24
Figura 7. Cella de detecção.....	26
Figura 8. Diagrama esquemático do sistema utilizado para a análise simultânea de nitrito e nitrato.....	28
Figura 9. Espectro de absorção do composto diazo.....	39
Figura 10. Efeito da variação da vazão da amostra no sinal.....	40
Figura 11. Efeito da variação da vazão do tampão no sinal.....	40
Figura 12. Efeito do comprimento da alça de amostragem no sinal.....	42
Figura 13. Efeito do comprimento da bobina de reação no sinal.....	43
Figura 14. Efeito da variação da concentração de reagente cromogênico no sinal.....	43
Figura 15. Efeito da variação da concentração de solução tampão no sinal.....	44
Figura 16. Sistema de análise simultânea para nitrato e nitrito devidamente otimizado.....	44
Figura 17. Curvas analíticas para nitrito, obtidas com o sistema proposto.....	46
Figura 18. Curvas analíticas para nitrato, obtidas com o sistema proposto.....	47
Figura 19. Sinal obtido com o sistema desenvolvido.....	55

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela I. Coeficientes de variação obtidos para diferentes concentrações de nitrato e nitrito.....	41
Tabela II. Comparação entre as concentrações de nitrato (mg/L) obtidas pelos métodos espectrofotométrico tradicional e o proposto no presente trabalho.....	45

## RESUMO

QUEIROZ, R.L.V. 1997. *Desenvolvimento de um sistema de análise simultânea por injeção em fluxo para nitrato e nitrito e sua aplicação em estudos limnológicos*. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 72 p.

Existe uma ênfase crescente na quantificação dos processos reguladores envolvendo o nitrogênio em muitos ecossistemas aquáticos. Portanto, nesses estudos, um sistema confiável e rápido de análise desse nutriente se faz altamente desejável. Os sistemas FIA (do inglês, Flow Injection Analysis) são versáteis, de baixo custo e facilmente adaptáveis a vários tipos de análise química, entre elas as do nitrato e nitrito. Vários métodos para a análise em fluxo desses íons já foram descritas, sendo que um dos mais simples e utilizados é o colorimétrico, com a redução do nitrato em coluna de cádmio. Com os necessários ajustes, pode-se adaptar um sistema como esse para a análise da água em estudos limnológicos.

O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento e calibração de um sistema como o acima mencionado. No desenvolvimento do sistema, optou-se pela construção de um colorímetro específico para essa análise, dotado de cela de fluxo imune à ação de bolhas. A calibração visou a obtenção de sensibilidade, precisão e exatidão compatíveis com os propósitos do mesmo. Para tanto, os parâmetros operacionais do sistema, como volume de amostra, percurso analítico, concentração de reagentes e qualidade na redução do nitrato foram manipulados. A área do pico foi testada como alternativa para a diminuição do erro devido à flutuação da leitura (ruído). Para ilustrar o funcionamento do sistema, foram analisadas amostras provenientes do reservatório de Salto Grande e também foi realizado um bioensaio visando o monitoramento do consumo de nitrato por organismos do fitoplâncton.

Os resultados obtidos mostraram que o sistema é bastante viável, sendo necessários alguns refinamentos para a melhoria do sinal e aumento da sensibilidade, para ser colocado em rotina. A cela de fluxo comportou-se de maneira bastante satisfatória e o colorímetro, por ser portátil, conferiu flexibilidade ao sistema para ser, posteriormente, utilizado em campo. A área do pico mostrou-se como alternativa possível na quantificação do analito.

As amostras provenientes do reservatório foram analisadas, com sucesso, pelo sistema proposto, quando comparadas com um método já estabelecido. O bioensaio mostrou que o nitrato não foi consumido pelas algas durante o período em que foi efetuado. Tal fato deveu-se, provavelmente, às características do cultivo e às respostas ecofisiológicas dos organismos às condições experimentais.

Palavras-chave: Nitrato; Análise em fluxo; Limnologia

## ABSTRACT

QUEIROZ, R.L.V. 1997. *Development of a flow injection system for simultaneous determination of nitrate and nitrite and its application on limnological studies*. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 72 p.

The growing interest in quantification of regulating processes concerning nitrogen in aquatic systems, makes necessary a rapid and efficient analyser system to be used in these studies. FIA systems are flexible, cheap and easily adapted to most of the chemical analysis routine, including nitrate and nitrite. The colorimetric determination with reduction of nitrate in cadmium columns seems to be one of the simplest and commonly used methods for this purpose. With adequate adjustments, such systems can be adequate to perform water analysis in limnological studies.

The aim of the present work was the development and calibration of such system. A dedicated colorimeter, including a flow cell designed to avoid bubble interference, was constructed to do so. Calibration steps included manipulation of systems parameters such as sample volume, analytical path, reagents concentration and reduction efficiency. The purpose of this calibration was to achieve sensitivity, precision and accuracy needed for the analysis. Peak area was proposed as an alternative analytical measurement, instead of peak height, in order to diminish readout fluctuations. To illustrate the uses of the developed system, samples from a reservoir were analyzed, as well as a bioassay was performed, with the purpose of monitoring nitrate consumption by aquatic organisms.

Results showed that the analytical system is viable, nevertheless some refinements are needed to put it on a routine basis. The flow cell performed very well and the colorimeter, since it is portable, has brought flexibility to the system which can be used in field, after the adjustments. Peak area was considered a possible alternative in measuring analyte concentration.

The reservoir samples were successfully analyzed, when compared to other well established method. The bioassay showed no consumption of nitrate during the experiment. This was due, probably, to cultivation characteristics of the organisms, as well as their ecophysiological responses to the experimental conditions.

Key words: Nitrate; Flow analysis; Limnology

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Importância dos estudos com nitrogênio em ambientes aquáticos**

Têm-se consolidado, ultimamente, tendências que priorizam o enfoque sistêmico e dinâmico em estudos ecológicos. Essa abordagem tem sido enfatizada tanto no que tange a seus aspectos teóricos quanto naquelas situações que visam a uma aplicação mais direcionada e pragmática desses estudos e pode-se mesmo dizer que, atualmente, novos paradigmas são colocados para a Ecologia. Por essa razão, faz-se necessário aprofundar o conhecimento sobre os principais processos reguladores dos ecossistemas, suas características ao longo do espaço e tempo e, se possível, suas quantificações.

A qualidade da água e produtividade de sistemas aquáticos tais como lagos, reservatórios e estuários são controladas, em boa parte, pela quantidade de nutrientes disponível para a atividade das comunidades produtoras (ODUM, 1985). Essa disponibilidade reflete processos de entrada dos nutrientes nesses corpos de água (afluentes, chuva, aporte biológico, por exemplo); processos de troca interna desses nutrientes entre os diversos compartimentos (consumo, regeneração, sedimentação, entre outros) e, também, processos de saída, seja através de exportação, perda para a atmosfera ou imobilização em compartimentos relativamente imperturbáveis, como o sedimento profundo. Estudos visando identificar e quantificar esses processos podem

ser de extrema utilidade na compreensão dos mecanismos reguladores, além do que evidenciam a interação do sistema com os seus entornos e dão indicação do estado metabólico interno do mesmo (KENNEDY & WALKER, 1990; THORNTON, 1990).

Dentre os nutrientes, o nitrogênio tem sido um dos mais pesquisados com relação ao papel regulador em processos ecológicos nos diferentes ambientes aquáticos. Esse elemento, que é o quarto mais abundante no sistema solar (DOWNING & McCAULAY, 1992), além de ser um dos principais constituintes do protoplasma dos seres vivos (WETZEL, 1981), apresenta-se sob muitas formas, nesses ambientes. Ele pode estar fazendo parte de tecidos e outras estruturas orgânicas particuladas; também pode apresentar-se dissolvido como diversos compostos: alguns inorgânicos, como o nitrogênio molecular ( $N_2$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ) e amônio ( $NH_4^+$ ); e outros orgânicos, como aminoácidos, aminas, proteínas e mesmo moléculas mais complexas (WETZEL, *op.cit.*).

O nitrogênio pode ser considerado, por excelência, como um exemplo do papel regulador desempenhado pelos nutrientes em ecossistemas aquáticos. Os processos envolvendo esse elemento manifestam-se em diferentes níveis, desde intracelulares até ecológicos (STEWART *et al.*, 1983). As entradas de nitrogênio em um determinado corpo d'água, por exemplo, refletem o uso e conservação dos sistemas adjacentes, a sazonalidade climática da região e também podem estar associadas à atividade biológica do sistema, através da fixação.

As transformações pelas quais o nitrogênio passa, devido a processos internos de ciclagem, são fruto de uma íntima interrelação entre os diversos compartimentos do sistema e constituem parte de um metabolismo interno altamente regulado. Essas

transformações contemplam diferentes formas de nitrogênio e diferentes níveis de controle. Nessa regulação estão envolvidos desde processos enzimáticos intracelulares, passando pelos mecanismos fisiológicos dos organismos, até aqueles que envolvem as diferentes comunidades (fitoplâncton, zooplâncton, microorganismos, entre outras) e outros compartimentos, como coluna d'água e sedimento (STEWART *et al.*, 1983). Existem evidências, inclusive, de uma forte ligação do ciclo do nitrogênio com os de outros elementos, em certos ambientes (GOLTERMAN, 1995). A figura 1, abaixo, procura dar uma idéia de alguns desses processos, do grau de complexidade dos mesmos e das dificuldades envolvidas nas quantificações.

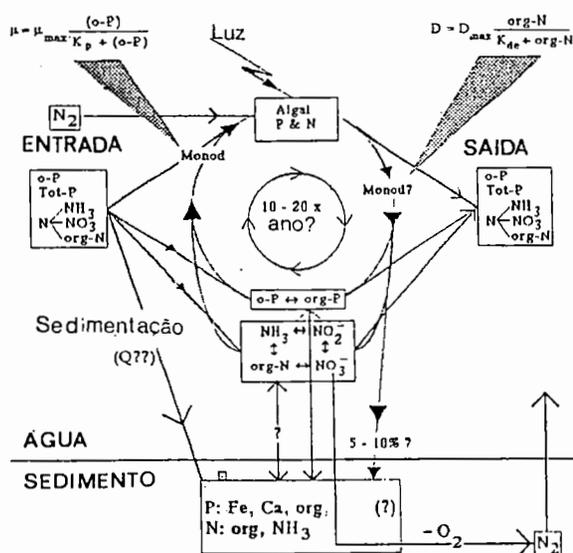


Figura 1: Principais vias do nitrogênio em ecossistemas aquáticos. Figura reproduzida de GOLTERMAN (1995)

A importância da quantificação dos processos envolvendo o nitrogênio em sistemas aquáticos pode ser ilustrada pelo número e variedade de estudos nos quais essa preocupação aparece. Alguns trabalhos relacionam esses processos com as características mais gerais do sistema e entornos (DOWNING & McCAULEY, 1992;

STEVENS *et al.*, 1993; BONETTO *et al.*, 1994; PREGO, 1994; REYNOLDS *et al.*, 1994). Outros tratam de processos mais específicos, como a interação entre coluna d'água e sedimento (MARTINOVA, 1993; MORELL & CORREDOR, 1993; OLSEN & ANDERSEN, 1994). Autores como HILL (1988); BRUSH & NILSSON (1993); HELMER & LABROUE (1993) enfatizaram o papel da regulação sistêmica na disponibilidade do nitrogênio e sua aplicação prática. BALLS *et al.* (1995) esquematizaram um quadro bastante significativo dos processos que ocorrem num estuário na Escócia, após muitos anos consecutivos de medidas.

Muito embora não exista uma profusão tão grande de trabalhos dedicados ao tema acima abordado na literatura concernente a ecossistemas tropicais, nota-se um aumento da ênfase na abordagem sistêmica, com o necessário aprofundamento na explicitação e quantificação de processos regulatórios. Como exemplo, podemos citar os estudos realizados no reservatório do Lobo (Broa), localizado na região central do estado de São Paulo, que tem sido objeto de estudo desde 1971, numa tentativa coordenada de se compreender o mesmo como sistema dinâmico e parte de uma trama ecológica mais ampla (TUNDISI, 1986; CALIJURI & TUNDISI, 1990).

A primeira síntese do conhecimento sobre o reservatório do Broa pode ser atribuída a TUNDISI (1977), que propõe mecanismos para a regulação da produtividade primária do sistema, mecanismos esses que envolvem o nitrogênio. Tais idéias foram ampliadas e desenvolvidas por MORAES (1978), que estudou a variação espacial e sazonal de nutrientes na represa. Os nutrientes no sedimento foram objeto de estudo de TRINDADE (1980); a fixação biológica de nitrogênio na região das macrófitas foi estudada por SANTOS (1981). A limitação potencial da produtividade

devida a diversos nutrientes, inclusive nitrogênio, foi avaliada através de bioensaios com a comunidade produtora desse sistema (HENRY, 1981). Os principais tributários do reservatório também têm sido pesquisados (CHAMIXAES, 1991; OLIVEIRA, 1993). O potencial de desnitrificação de sedimentos das áreas alagadas nesse sistema também foi recentemente investigado (WHITAKER, 1993). Cabe ser ressaltado que, em todos esses estudos, ficou patente o importante papel desempenhado pelo nitrogênio no controle e regulação da produtividade do sistema.

Uma das condições necessárias, quando se pretende intensificar estudos envolvendo a dinâmica dos nutrientes, é dispor de um sistema eficiente de determinação dos mesmos. Um sistema rápido e confiável, que permita velocidade analítica compatível com a demanda do estudo, que não cause acúmulo de amostras à espera de processamento, fato que pode alterar resultados, e que apresente sensibilidade, precisão e exatidão mínimas exigidas pelo trabalho a ser desenvolvido. Como será visto mais detalhadamente a seguir, sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA, das iniciais em inglês) preenchem com bastante sucesso os requisitos acima citados, com as vantagens adicionais da grande flexibilidade exibida pelos mesmos e dos baixos custos de implementação e operação.

## **1.2. Sistemas de análise em fluxo para nitrato e nitrito**

A idéia de automação de procedimentos em química analítica não é nova, surgiu e acompanhou os avanços da área na década de cinquenta. A idéia de automação, então em voga, tinha como paradigma o aumento da velocidade pela mecanização dos processos manuais realizados pelos analistas. Segundo esse conceito, então, cada amostra é individualmente tomada, devidamente isolada e

processada (concentrada, diluída, etc.), recebe o(s) reagente(s) necessários, é deixada um tempo reagindo e, então, tem o seu produto analisado, constituindo-se num processo completamente discretizado de análise (Fig.2, a e b).

Não obstante o grau de eficiência atingido por esses analisadores, vários são os problemas por eles enfrentados, entre os quais merecem destaque a grande quantidade de partes móveis: correias, recipientes para amostra, cubetas e rotores, entre outras, fato que pode provocar maior desgaste, causando frequentes problemas de reprodutibilidade; dificuldade da adaptação aos principais sistemas de detecção usados em química analítica, devido à concepção do “design” de automação e operação onerosa. Outra grande desvantagem desse tipo de sistema é o seu alto custo inerente, devido tanto à complexidade de seus componentes, quanto à implantação de soluções dispendiosas para resolver alguns de seus problemas (RUZICKA & HANSEN, 1988).

Os sistemas em fluxo permitem que uma infinidade de operações, como diluição, concentração e mistura, sejam realizadas de maneira mais flexível do que nos sistemas *batch*, acima descritos. Além disso, operações mais complexas, como separações, podem ser bem executadas em fluxo. A grande maioria dos detectores utilizados nos ensaios clássicos é facilmente adaptável a esse tipo de sistema, que possui poucas partes móveis, pois o que se move é o fluido, não o aparelho (RUZICKA & HANSEN, *op.cit.*).

As primeiras análises a se utilizarem de técnicas em fluxo derivam das idéias de SKEGGS (1957), que introduziu a análise em fluxo segmentado por bolhas de ar. O sucesso desse tipo de analisador pode ser medido pela popularidade dos chamados *Autoanalysers*, bastante utilizados desde então, até atualmente. Os principais

problemas enfrentados por esse tipo de analisador são a falta de flexibilidade para executar várias determinações simultâneas e a ainda grande complexidade do sistema envolvido. Além disso, a presença de bolhas de ar causa uma série de dificuldades adicionais, tais como perturbações no fluxo, sem contar com o fato de que as mesmas precisam ser retiradas antes que atinjam o sistema de detecção. Todos esses fatos, conjuntamente, ainda agem elevando os custos de tais sistemas. Num exame mais acurado, esses problemas derivam da concepção de análise em fluxo que permeia o sistema acima descrito que, no fundo, ainda reproduz a idéia de análise individual de cada amostra, separada das outras por bolhas de ar, no intuito de se minimizar a interpenetração entre as mesmas; e permitir tempo suficiente para que ocorra uma reação homogênea e completa, antes da detecção (fig.2, c) (RUZICKA & HANSEN, 1988).

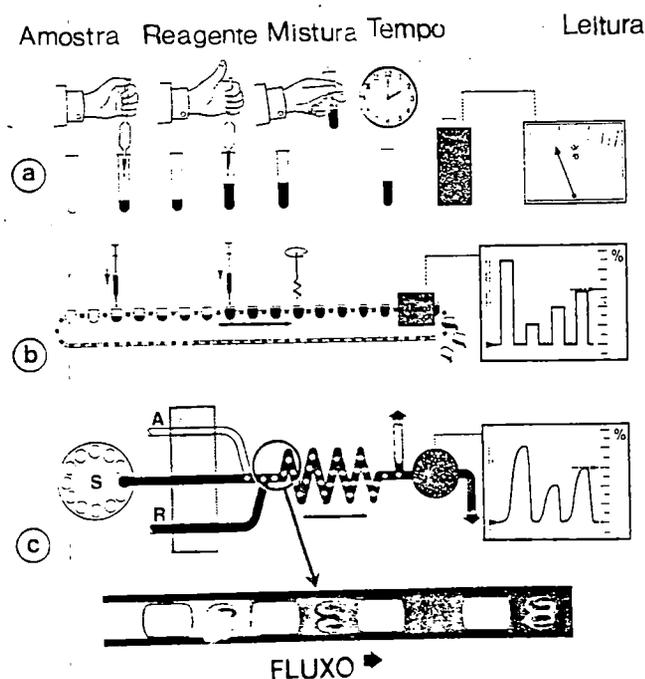


Figura 2: Paralelo entre procedimentos manuais e automatizados em um ensaio colorimétrico típico: (a) operação manual; (b) um tipo de analisador discreto; (c) analisador em fluxo com segmentação por ar. Notar que em todas as análises, as medidas são realizadas na condição de equilíbrio da reação (à direita da figura). Reproduzido de RUZICKA & HANSEN (1988).

A primeira vez que se utilizou de fluxo contínuo não segmentado como base para um sistema de análise foi em 1975, feito realizado por RUZICKA & HANSEN, num trabalho que, agora, tornou-se clássico. Neste, foram apresentadas as principais características desse sistema e foi lançada a base para o desenvolvimento dessa técnica. A mesma se caracteriza pela injeção reprodutível de um certo volume de amostra num fluxo carreador. Nesse fluxo a amostra sofre dispersão constante, controlada e reprodutível; é devidamente processada e atinge o detector fornecendo um sinal, cujas características refletem os processos acima descritos. Portanto, ao assegurarmos a reprodutibilidade do volume injetado e dos processos que ocorrem entre a injeção e a detecção, não há, absolutamente, a necessidade de que a reação se complete, ou atinja um estado de equilíbrio. Há, apenas, a preocupação com a obtenção de um sinal identificável (fig.3).

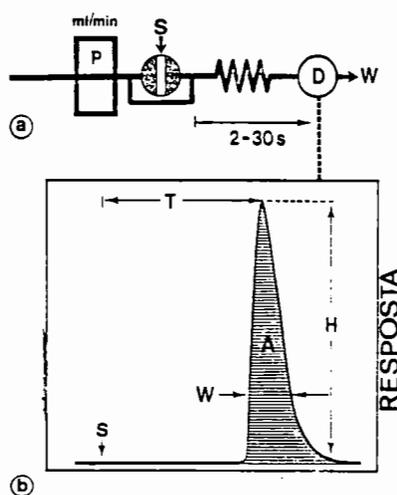


Figura 3: (a) Esquema do mais simples modelo de linha analítica em FIA, utilizando-se do reagente como carreador; **P** é a bomba peristáltica; **S** é a válvula de injeção; **D**, o detector e **W** o lixo. (b) o sinal obtido com a configuração proposta: **S** representa o momento da injeção; **T**, o tempo decorrido até a altura máxima do pico; **H**, a altura; **A**, a área e **W**, a largura desse pico. Reproduzido de RUZICKA & HANSEN (1988).

O sistema FIA típico faz uso de bombas peristálticas para a propulsão dos fluidos; o percurso dos mesmos é, normalmente, feito com tubulação plástica de diâmetro interno pequeno (por exemplo, 0,8mm); a injeção da amostra se dá por algum dispositivo que permita o controle e reprodutibilidade do volume injetado e muitas vezes necessitam-se conexões e confluências para promover o encontro da amostra com o reagente. A reação ocorre no percurso, do ponto de mistura até o detector, sendo que se costuma construir bobinas de reação com a própria tubulação, o que garante uma mistura eficiente entre o reagente e a amostra. Finalmente algum tipo de detector, dotado de cela de fluxo, acoplado a um registrador, completam o sistema. No trabalho original, os autores analisaram amostras de fosfato e amônio, injetando-as em fluxos de reagentes específicos, e utilizaram-se de dois tipos de detectores. Obtiveram uma velocidade analítica de até 270 amostras por hora e precisão da ordem de 1 - 2%.

O sistema originalmente proposto tem sofrido muitas modificações e melhorias, algumas das quais importantes para o seu desenvolvimento. Uma primeira a ser citada refere-se ao aparecimento de vários dispositivos dedicados a melhorar a reprodutibilidade e eficiência do processo de injeção, inicialmente realizado manualmente com seringa (RUZICKA & HANSEN, 1975). Nesse sentido, vários tipos de injetores foram propostos, visando à diminuição das flutuações causadas pelo processo de injeção e também a uma maior versatilidade do processo. Como destaques, temos o injetor proporcional, as válvulas rotatórias e, mais recentemente, as válvulas solenóides de três vias (REIS & BERGAMIN Fº, 1993).

A injeção da amostra num fluxo carreador de reagente constitui-se numa maneira bastante simples de promover o encontro dessas duas espécies e é uma

técnica que possui características interessantes de serem exploradas (RUZICKA & HANSEN, 1988). Porém, em determinados casos, pode limitar a análise de algumas amostras nas quais se necessita de grande volume injetado, como nas amostras muito diluídas. Nesses casos, o reagente não consegue penetrar na zona central da amostra, causando distorções no pico. Em outros casos, a diferença entre os índices de refração entre amostra e reagente não permite a execução de determinados tipos de determinação, como a espectrofotométrica. Essa dificuldade foi contornada por BERGAMIN F<sup>o</sup> *et al.* (1978a), com a introdução da amostra num fluxo carreador inerte, que recebia o reagente por confluência, que se distribuía por toda a amostra. Uma extensão desse conceito (BERGAMIN F<sup>o</sup> *et al.*, 1978c) permitiu uma alta economia de reagentes, na medida em que ambos, reagente e amostra, eram injetados em fluxos carreadores inertes, formando zonas que confluíam de maneira sincrônica, permitindo a sua interação.

Um terceiro exemplo da exploração da versatilidade dos sistemas FIA teve suas características básicas apresentadas por STEWART & RUZICKA (1976), ainda nos primórdios da história dos sistemas FIA. Os autores, nesse artigo, relatam a determinação simultânea de duas espécies químicas diferentes com a utilização de um único espectrofotômetro. Uma velocidade analítica de 200 determinações por hora, de nitrogênio e fósforo em extratos de digeridos vegetais, foi conseguida com a utilização de uma configuração de dois canais.

Os exemplos acima citados, apesar de serem reconhecidamente importantes e terem contribuído significativamente para o desenvolvimento posterior dos métodos de análise em fluxo, são apenas aqueles mais relacionados com o tema em questão. Representam apenas uma pequena fração da versatilidade exibida por esses métodos,

que atualmente têm vários campos de aplicação (RUZICKA & HANSEN, 1988). Alguns deles: espectrofotometria, espectrometria de absorção e emissão atômica (inclusive plasma), fluorimetria e quemoluminescência, espectrometria de massa, métodos eletroquímicos em geral, métodos enzimáticos e titulações (RUZICKA & HANSEN, *op.cit.*). Muito do esforço atual tem sido dedicado à automação cada vez maior dos sistemas, inclusive com a utilização de microcomputadores e programas dedicados a isso.

Os primeiros trabalhos que descreveram a determinação de nitrato, uma das mais importantes e abundantes formas de nitrogênio em ambientes aquáticos, aparecem quase que simultaneamente (ANDERSON, 1979, *apud* RUZICKA & HANSEN, 1988; GINÉ *et al.*, 1980). Em ambos, a determinação foi colorimétrica, com a redução do nitrato a nitrito em coluna de cádmio, sendo que o primeiro autor utilizou uma coluna amalgamada com zinco. GINÉ *et al.* (*op.cit.*) utilizaram-se do amálgama de cobre no seu sistema, que foi desenvolvido em dois canais analíticos. No primeiro canal, a amostra passava pela coluna, o nitrato reduzido somava-se ao nitrito porventura já presente na mesma. O nitrito originalmente presente nas amostras era determinado simultaneamente em uma linha paralela, sem a coluna redutora. O nitrito foi determinado através da reação de diazotação e acoplamento, sendo que realizando essa determinação em amostras de água e extratos de solo, obtiveram velocidade analítica de 90 amostras por hora, precisão de 1,5% para a faixa de 1,0 a 5,0 ppm de nitrato e 0,5% para a faixa de 0,1 a 0,5 ppm de nitrito.

A partir desses trabalhos pioneiros, vários outros têm se dedicado à determinação de nitrato e nitrito. Vários métodos foram utilizados, bem como várias configurações foram propostas, sempre no sentido de se obter sensibilidade e

velocidade analítica compatíveis com a análise desejada. Muitos desses trabalhos tiveram o intuito de melhorar sistemas anteriormente propostos, ou explorar características que permitissem acesso a novas técnicas e novos propósitos, visto que o desenvolvimento dos sistemas FIA tem se dado com abordagem notadamente empírica.

Dessa forma, MADSEN (1981) relata a determinação colorimétrica de nitrato em água de chuva, com redução do mesmo a nitrito com hidrazina. Obteve precisão de cerca de 3% em amostras contendo de 0,5 a 4,0 ppm de nitrato e foram analisadas 40 amostras por hora. VAN STADEN (1982) utilizou-se de redução em coluna de cádmio antes da introdução da amostra no fluxo principal, conseguindo analisar 72 amostras de nitrato por hora em condições de sensibilidade e precisão semelhantes a GINÉ *et al.* (1980). JOHNSON & PETTY (1983) adaptaram o método colorimétrico com redução por coluna de cádmio para a determinação de nitrato na água do mar, com limite de detecção de 0,1  $\mu\text{M}$ , precisão de 1% e uma velocidade analítica de mais de 75 amostras por hora.

GINÉ *et al.* (1983), demonstraram a aplicação de um método automatizado para adição padrão em FIA na determinação de nitrato em extratos de planta, com velocidade analítica de 100 amostras/hora. FAIZULLAH & TOWNSHEND (1986) determinaram esse íon em misturas iônicas com utilização de uma resina de troca iônica contendo tiocianato, que era trocado com o nitrato quando da passagem da amostra. O tiocianato era determinado colorimetricamente e o sistema obteve limite de detecção de 0,2  $\mu\text{M}$  de nitrato e velocidade analítica de 60 amostras/hora. Um monitor para a determinação colorimétrica *in situ* de nitrato em águas de rios

apresentou limite de detecção de 0,024 ppm de nitrato, com precisão de 1,4% e foi usado para propósitos de monitoramento contínuo (CLINCH *et al.*, 1987).

Já foi desenvolvida a metodologia para a determinação fluorimétrica de nitrato em águas naturais, um método bastante sensível, com limite de detecção de 0,01  $\mu\text{M}$  de nitrato, precisão de 0,8% e que permite a análise de 30 amostras por hora (MOTOMIZU *et al.*, 1987). Outra técnica já descrita para a determinação em fluxo é a biamperometria (HULANICKI *et al.*, 1987; TROJANOWICZ *et al.*, 1992), cuja sensibilidade pode atingir 0,006 ppm de nitrato, sendo que em ambos os casos foi utilizada coluna redutora de cádmio. A detecção potenciométrica de nitrato em fluxo, com o uso de membrana seletiva também é uma técnica que tem sido explorada (ZUTHER *et al.*, 1995), fornecendo resultados similares aos citados anteriormente em termos de precisão e sensibilidade.

Alguns trabalhos procuraram discutir aspectos específicos das metodologias em fluxo já estabelecidas. A redução do nitrato a nitrito tem recebido alguma atenção, pois representa um passo importante nesses métodos. Dessa forma, BERMUDEZ *et al.* (1988) discutem alternativas para a perda de eficiência da coluna, propondo soluções para o problema. Mais recentemente, foi desenvolvido um sistema de determinação espectrofotométrica de nitrato em água doce e salgada, com redução por meio de lâmpada de UV (redução foto-induzida) (TAKEDA & FUJIWARA, 1993), com velocidade de 10 amostras por hora, limite de detecção em 0,05  $\mu\text{M}$  de nitrato. Tal sistema tem sido aperfeiçoado (MOTOMIZU & SANADA, 1995). A melhoria dos sinais produzidos na análise espectrofotométrica desses íons também tem sido objeto da preocupação de alguns autores (DANIEL *et al.*, 1995).

O sinal típico que se obtém em análises realizadas em sistemas FIA é um pico, cujas características gerais podem ser vistas na figura 4. Esse pico corresponde ao perfil de dispersão obtido no sistema e é característico do mesmo (RUZICKA & HANSEN, 1988; GINÉ *et al.*, 1992). A quantificação do analito se dá com a medida de alguma das dimensões do pico: altura, largura ou área (conferir fig.3) e subsequente comparação com uma curva analítica (padrão) apropriada. (RUZICKA & HANSEN, *op.cit.*).

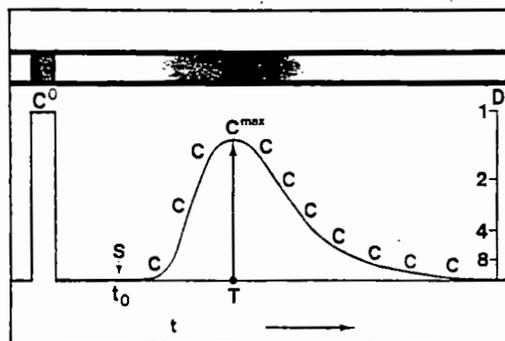


Figura 4: Dispersão de uma amostra de concentração original  $C^0$  (mostrada ao alto) e o efeito no sinal obtido a partir do momento de injeção  $t_0$ . O perfil de dispersão pode ser visto, com várias concentrações intermediárias ( $C$ ), até uma concentração máxima  $C^{\max}$ , atingida após um tempo  $T$ . Notar que  $C^{\max}$  é menor que  $C^0$ . Os valores relativos de dispersão ( $D$ ) são dispostos no eixo à direita da figura. Reproduzido de RUZICKA & HANSEN (1988).

As medidas de área de pico não são frequentemente utilizadas em FIA, sendo que a dimensão mais utilizada na quantificação é a altura do mesmo. Tal fato deve-se, em parte, a razões históricas, dado que nos primórdios dessa técnica foram amplamente utilizados registradores potenciométricos, que forneciam a altura do pico como dimensão mais facilmente determinada, no caso, por simples medição. Outra das razões para que a área do picc seja pouco utilizada é por conter informação “redundante” sobre a concentração do analito, “escondendo” informação sobre o perfil do mesmo. Como boa parte do desenvolvimento dos sistemas FIA se deu com a exploração da informação contida no perfil do pico, pouca atenção tem sido dada ao

potencial de exploração da área do mesmo (RUZICKA & HANSEN, 1988). A área do pico parece ser somente utilizada em algumas análises por absorção atômica em fluxo, em situações nas quais a curva analítica foi melhor ajustada por esse parâmetro de medida (SPERLING *et al.*, 1992; GARCÍA *et al.*, 1995). A área do pico, quando medida por integração, na verdade contém informação sobre uma série de medidas discretas tomadas em intervalos bastante próximos e somados para formar a área e corresponde, portanto, a uma medida múltipla de várias alturas.

Existem inúmeras fontes de interferência que podem causar flutuações na forma do pico; entre as mais importantes encontram-se o fluxo e a relação entre volume de amostra e comprimento da bobina de reação. Essa flutuação não é homogênea ao longo do perfil do pico e pode causar distorções na quantificação da espécie química sob análise (GINÉ, *et al.*, 1992). Na verdade, alguma atenção tem sido dada à melhoria da qualidade do sinal obtido, com relação à sua flutuação, também denominada ruído. Assim, SZOSTEK & TROJANOWICZ (1992) propuseram um sistema de filtração digital para o sinal de FIA e o aplicaram em situações práticas (TROJANOWICZ & SZOSTEK, 1992). SPERLING *et al.* (1992) propuseram tratamento de sinal para melhorias na análise de íons por espectrometria de absorção atômica de chama.

A flutuação distribui-se aleatoriamente pelo perfil do sinal e fica difícil avaliar a sua importância como componente do sinal quando se utiliza uma medida discreta, como a altura do mesmo. Porém, ao considerarmos a medida da área do pico como uma série de medidas discretas da altura, o efeito desse ruído, estando aleatoriamente distribuído, tenderia a se anular ao longo dessas medidas múltiplas, ou seja, pela área. Dessa forma, a área de pico poderia ser utilizada como parâmetro para a

quantificação, inclusive com a seleção de trechos da mesma onde a flutuação seja mais homogênea (GINÉ *et al.*, 1992), o que evitaria um aumento desnecessário no erro e poderia proporcionar aumento da velocidade analítica. Atualmente, existem programas que executam integração de picos nas análises em fluxo, que podem ser aproveitados e adaptados para vários propósitos (KUCHLER & MELLO, 1996).

A idéia central que permeou o presente trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de determinação de nitrato/nitrito que permitisse sua aplicação em algum estudo envolvendo esses íons em ecossistemas aquáticos. A condição básica para a realização do estudo foi determinada pela necessidade de se realçar alguma característica dos sistemas FIA (velocidade analítica, versatilidade, por exemplo) que justificasse a sua utilização, em vez de métodos de análise tradicionalmente empregados nesses estudos.

Dessa forma, além de se utilizar o sistema desenvolvido na análise de amostras provenientes de um reservatório, foi feita uma tentativa de se realizar um bioensaio visando o monitoramento do desaparecimento de nitrato previamente adicionado a uma cultura contendo organismos aquáticos. Tais estudos permitem avaliar a velocidade com que esses organismos consomem esse nutriente, fato que pode ser determinante na competição por esse recurso, sua utilização e disponibilidade (TURPIN, 1988). A velocidade de consumo de nitrato em culturas monoespecíficas de organismos do fitoplâncton tem sido monitorada tanto quando esses organismos são colocados em vários estados nutricionais, quanto quando se pretende avaliar, comparativamente, respostas a mudanças no comportamento nutricional em função de mudanças em outras condições fisiológicas (RAIMBAULT *et al.*, 1990; MARTINEZ, 1991; SCIANDRA, 1991).

As vantagens do uso de sistemas em fluxo para a análise de nitrato, nesses casos, são flagrantes, pois esses sistemas permitem baixo consumo de amostra, permitem uma velocidade analítica compatível com a demanda do estudo e aquisição de informação quase que imediata. Além disso, evitam o manuseio excessivo dos frascos de cultura, prevenindo a contaminação das mesmas. RAIMBAULT *et al.* (1990) e SCIANDRA, (1991) utilizaram-se do Technicon® AutoAnalyzer em seus estudos.

## 2. OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivo principal o desenvolvimento de um sistema de análise em fluxo para nitrito e nitrato, visando a sua adequação para a realização de estudos envolvendo esses íons em ecossistemas aquáticos. Para o cumprimento desse objetivo mais geral, alguns objetivos específicos destacaram-se como parte desse esforço:

2.1. Construção e adequação de um detector colorimétrico específico, com detecção não prejudicada pela passagem de bolhas.

2.2. Montagem de um sistema para análise em fluxo simultânea de nitrito e nitrato, com sensibilidade (limite de detecção), precisão e exatidão compatíveis para a determinação desses íons nas condições desejadas. Esse objetivo incluiu a otimização de parâmetros como fluxos, comprimento de reatores, concentração de reagentes e volume de amostras.

2.3. Com o sistema acima descrito, propôs-se a utilização da área do pico como parâmetro de medida do sinal, com o intuito de se diminuir o efeito do ruído e conseqüente melhoria da reprodutibilidade desse sinal.

2.4. Com o sistema ajustado, foram analisadas amostras provenientes do reservatório de Salto Grande (Americana, São Paulo), conhecido por apresentar altas concentrações de nitrato. Também realizou-se uma tentativa de bioensaio visando a acompanhar o consumo de nitrato por culturas monoespecíficas de organismos fitoplanctônicos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

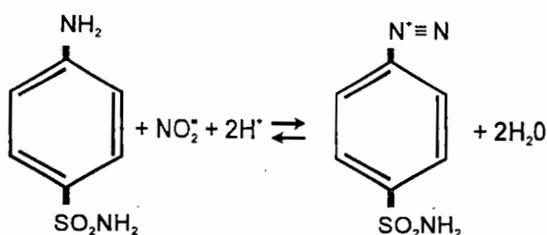
Ao selecionarmos um método analítico devemos ter como parâmetro, em primeiro lugar, a faixa de concentração das amostras a serem analisadas. Dentre as opções que se apresentarem compatíveis com essa faixa, aquelas possíveis de serem realizadas, ou aquelas que apresentem vantagens, sejam, por exemplo, de eficiência ou de economia, devem ser as escolhidas.

Os íons nitrato e nitrito tem sido determinados nos mais diversos ambientes aquáticos, com bastante sucesso, pelo método colorimétrico, sendo esse o mais tradicional e recomendado para esse tipo de análise (STRICKLAND & PARSONS, 1972; GRASSHOFF *et al.*, 1983; APHA, 1985). Baseia-se na reação denominada de diazotação e acoplamento, na qual o nitrito reage com uma amina aromática, formando um composto diazo na primeira etapa da reação, conhecida como diazotação. O composto diazo formado nessa etapa reage, então, com uma outra amina aromática, numa segunda etapa denominada acoplamento, formando um composto fortemente colorido que absorve caracteristicamente a 540 nm, podendo ser detectado colorimetricamente (fig. 5).

A redução do nitrato a nitrito, nessas determinações, tem sido tradicionalmente realizada com a utilização de um amálgama de cádmio e cobre, procedimento que assegura uma alta eficiência na redução. O cádmio amalgamado,

ainda mais, pode ser acondicionado em pequenas colunas, o que facilita a sua adaptação a sistemas de análise em fluxo. Portanto, no desenvolvimento do sistema proposto, optou-se pela reação de diazotação e acoplamento e pela redução do nitrato em coluna de cádmio amalgamado, como métodos a serem empregados na determinação espectrofotométrica simultânea de nitrato e nitrito.

### Reação de diazotação



### Reação de acoplamento

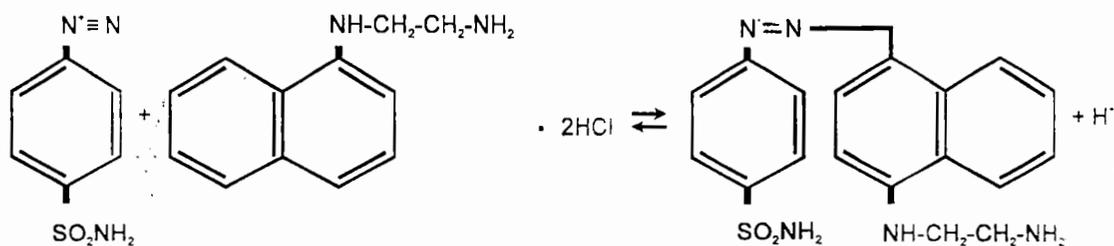


Figura 5. Representação esquemática da reação de diazotação / acoplamento

### 3.1. Preparo de reagentes e padrões

No preparo das soluções, foram utilizados sempre reagentes P.A. e água destilada e deionizada.

**3.1.1.** A solução tampão era preparada, semanalmente, pesando-se 100g de cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), 20g de tetraborato de sódio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) e 1g de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , que eram dissolvidos completamente em, aproximadamente, 700 mL de água. O volume era completado para 1L de solução com água (GINÉ, 1979). A solução tampão era mantida em geladeira, quando não utilizada.

**3.1.2.** Uma solução tampão diluída era preparada tomando-se 60 mL da solução tampão e completando-se o volume para 1000 mL com água destilada, obtendo-se uma solução tampão diluída de concentração semelhante àquela recomendada por APHA (1985).

**3.1.3.** O reagente cromogênico era preparado dissolvendo-se 5g de Sulfanilamida ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ) em 300 mL de uma solução obtida pela diluição de 100 mL de HCl P.A. (37%) para 1000 mL da mesma, com água destilada. Após isso, adicionava-se 0,5g de bicloridrato de N-1 naftil etilenodiamina ( $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$ ) à essa solução e agitava-se até a dissolução completa dos sais. O volume da solução era, então, completado para 500 mL. Essa solução era mantida em geladeira, quando não utilizada, pelo período máximo de uma semana, após o que era descartada. O mesmo ocorria caso a solução apresentasse coloração anormal.

**3.1.4.** A coluna redutora era preparada, a cada semana, da seguinte maneira (APHA, 1985): aproximadamente 25g de grânulos de cádmio (0,5 - 0,7 mm de diâmetro, grânulos irregulares) eram lavados com HCl 6N e enxaguados com água destilada. O cádmio era, então, imerso em uma solução de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) a 2%, até o empalidecimento da mesma que era renovada, até que um precipitado marrom se acumulasse sobre os grânulos. O excesso de cobre precipitado era lavado com água destilada e procedia-se, então, ao preenchimento da

coluna, que era realizado com a coluna já contendo água destilada e conectada ao sistema de análise. Uma vez preenchida, a coluna era lavada com solução tampão diluída e ativada com a passagem de 20mL de uma solução padrão concentrada (por exemplo, 5mg/L) de nitrato e novamente lavada com solução tampão diluída.

**3.1.5.** A solução estoque de nitrito era preparada pesando-se 1,064 g de nitrito de potássio ( $\text{KNO}_2$ ), previamente seco em estufa a  $105^\circ\text{C}$  por 1h, e diluindo-se com água destilada para 250 mL de solução. Tal solução possuía 0,7mg/mL de  $\text{NO}_2^-$ -N.

**3.1.6.** A solução estoque de nitrato era preparada pesando-se 0,3564g de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ), previamente seco em estufa a  $105^\circ\text{C}$  por 1h, e diluindo-se com água destilada para 500 mL de solução. Tal solução possuía 0,1mg/mL de  $\text{NO}_3^-$ -N.

## **3.2. Sistema de detecção**

As condições no Laboratório de Limnologia do CRHEA (EESC-USP), local onde o trabalho foi desenvolvido, fizeram com que fosse necessária a construção de um colorímetro específico para a análise em vista. O colorímetro em questão compõe-se de uma fonte de luz, um filtro que seleciona a faixa de comprimento de onda desejado, um detector fotoelétrico, capaz de converter o sinal luminoso em pulso elétrico e um amplificador desse sinal. Completa esse conjunto, nos casos dos sistemas FIA, uma cela adaptada à medição em fluxo da amostra. A figura 6 mostra o diagrama esquemático do sistema de detecção, bem como a representação esquemática dos circuitos do colorímetro.

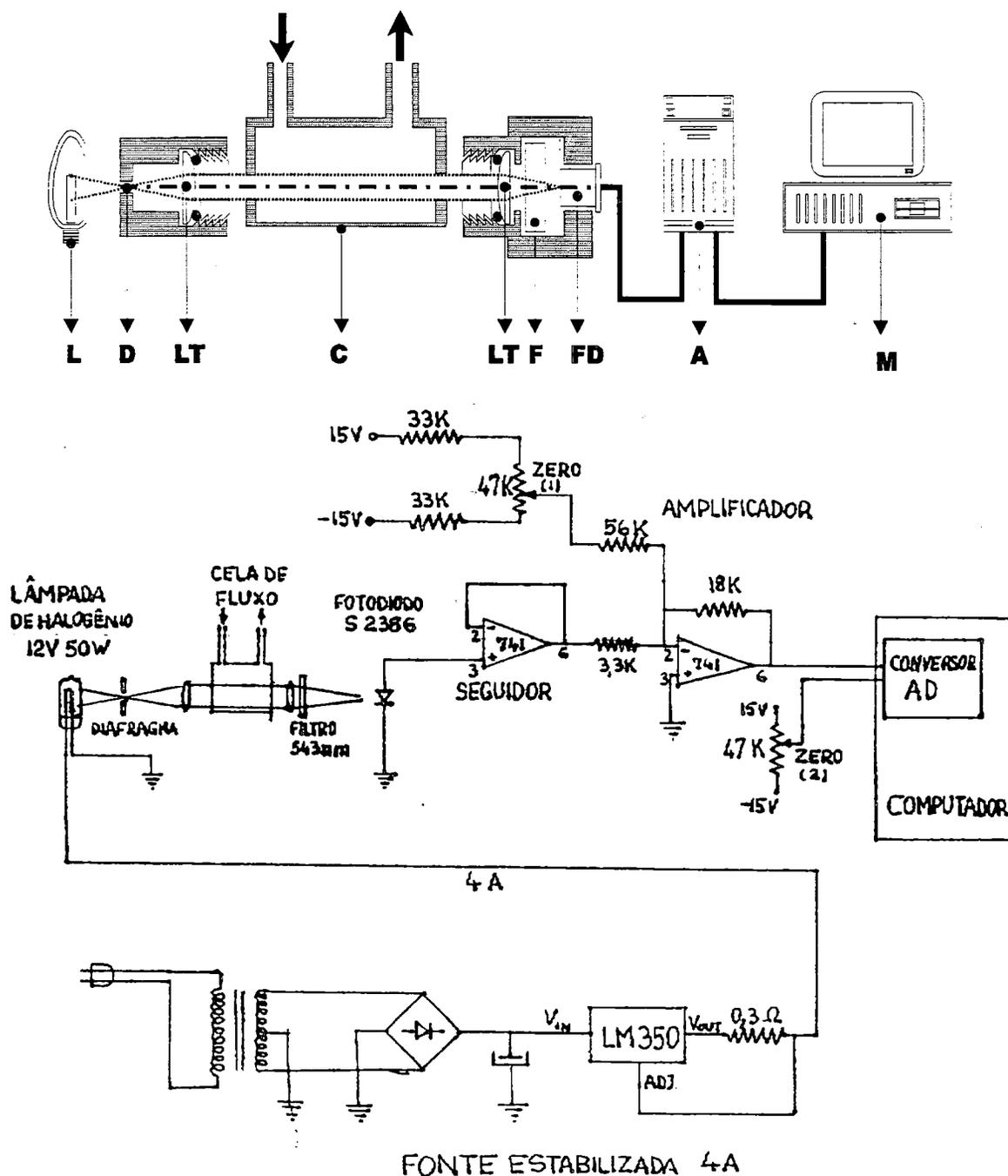


Figura 6. Acima: diagrama esquemático do colorímetro desenvolvido no presente trabalho. L é a lâmpada de halogênio; D, o diafragma (0,5 mm de diâmetro); LT, são lentes de 6mm de distância focal; F, o filtro; C, a cela de detecção; FD, o fotodiodo; A, o amplificador e M, o microcomputador. Abaixo: Representação esquemática do colorímetro, mostrando fonte estabilizada de corrente, alimentando lâmpada de halogênio, cuja luz atravessa a cela de fluxo e incide no fotodiodo. Este gera uma diferença de potencial e a envia a um seguidor constituído por um amplificador operacional na forma de um CI 741. O sinal é enviado a um amplificador, também constituído por CI 741 e segue para uma interface conversora AD situada em um computador. O colorímetro ainda contém uma fonte de alimentação estabilizada dupla (15V, -15V, 200 mA) de tipo corriqueiro, implícita, mas não representada na figura.

Além da montagem propriamente dita do detector e dos necessários ajustes de ordem mecânica, uma das etapas mais importantes na obtenção do colorímetro é a seleção de um filtro adequado. Essa seleção foi feita obtendo-se o espectro de absorção do composto diazo característico da reação e com a escolha de um filtro que se superpusesse ao espectro obtido. Para tanto, preparou-se uma solução-padrão de concentração de 100  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{NO}_3^- \text{-N}$ , à qual adicionaram-se os reagentes necessários para o desenvolvimento da reação, como em APHA (1985). Após a obtenção do composto colorido, procedeu-se a varredura do espectro de absorção em um espectrofotômetro Micronal, modelo B280. A varredura foi feita de 400 a 700 nm

As celas de detecção normalmente em uso nos sistemas de determinação espectrofométrica ou colorimétrica em fluxo apresentam algumas dificuldades de utilização devido ao fato de serem muito vulneráveis à ação das bolhas. Muitas vezes, a análise tem sua continuidade prejudicada pela tarefa de desalojar uma bolha que, de alguma forma, ocupou em parte a cela de fluxo. Tal dificuldade deriva do fato de que o *design* dessas celas permite o alojamento das bolhas no seu interior, não importando quanto esforço tenha sido despendido no sentido de se resolver esse problema.

Para tentar se contornar esse problema, foi construída uma cela de detecção, cujo desenho permitia que as bolhas eventualmente presentes ficassem alojadas numa “calha” superior, ao passo que um feixe paralelo de luz atravessava o corpo principal da cela (fig.7). Dessa forma, a detecção não ficaria, teoricamente, prejudicada pela presença de bolhas. A eficiência de tal arranjo pôde ser testada ao longo de todo o trabalho.

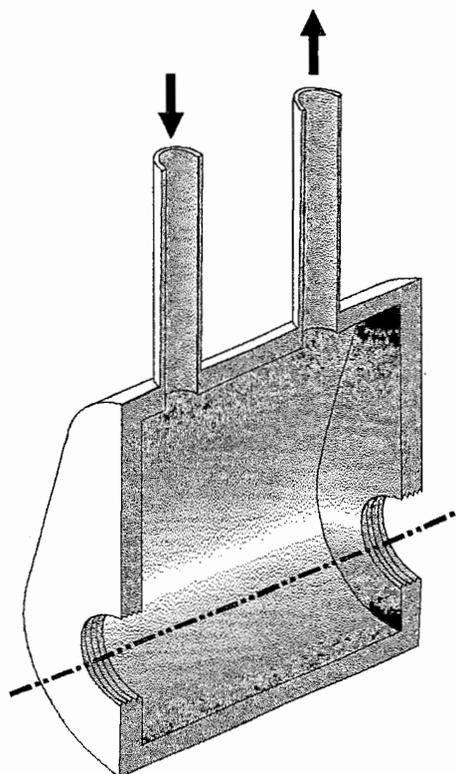


Figura 7. Cela de detecção em corte longitudinal, mostrando o eixo por onde passa o feixe luminoso. O espaço acima é previsto para bolhas.

A cela foi construída começando com tubo cilíndrico de aço inoxidável, com  $\frac{1}{4}$  de polegada de diâmetro e parede de 0,3 mm de espessura. Desse tubo, cortou-se um pedaço de 10 mm que foi, em seguida, submetido a uma deformação de maneira que a seção transversal ficasse semelhante a uma pera, como sugere a figura. A medida da largura externa na parte mais bojuda e inferior do tubo era de 5 mm, convergindo para 3 mm na parte mais fina e superior.

As extremidades abertas foram fechadas com chapas planas, também de aço inoxidável, que foram soldadas ao tubo com solda de prata. Por fim, para a passagem do feixe de luz, foram abertas janelas com 3 mm de diâmetro, que foram vedadas com lâminas de microscópio (1,4 mm de espessura), coladas com cola de silicone. A

entrada e saída do fluxo foram feitas soldando-se, também com solda de prata, tubos de aço inoxidável com 1,6 mm de diâmetro externo e 1,0 mm de diâmetro interno.

### **3.3. Configuração do sistema para análise simultânea de nitrito e nitrato**

O sistema testado foi construído de forma que permitisse a determinação simultânea de nitrito e nitrato, em dois canais paralelos (figura 8). Constituíam-se de uma bomba peristáltica Micronal, modelo B332, com seis canais, provida de tubulação propelente de Tygon<sup>®</sup> de diâmetros variados, tubulação de polietileno com diâmetro interno de 0,8mm para a construção de bobinas, alças de amostragem e conexões. Dois injetores proporcionais, uma coluna de redução e o detector colorimétrico completavam o conjunto. O sinal gerado era enviado a um microcomputador TK 3000, dotado de interface, e recebia o devido tratamento.

Optou-se pela redução da amostra anteriormente à injeção da mesma, por motivos operacionais, sendo que tal procedimento já havia sido testado anteriormente, com sucesso (VAN STADEN, 1982).

Dessa forma, a amostra era bombeada para dentro do sistema; recebia, por confluência, o fluxo de solução tampão e seguia dois caminhos, de acordo com a análise desejada. Em uma posição dos injetores a amostra seguia diretamente para uma alça de amostragem, preenchendo-a. Ao serem deslocados para a segunda posição, os injetores permitiam a injeção dessa primeira amostra num fluxo carreador de água destilada, que a levava ao detector. Também nessa posição, o fluxo de amostra mais tampão era desviado para uma segunda alça amostral, com a diferença de que, antes dessa, era colocada a coluna de redução.

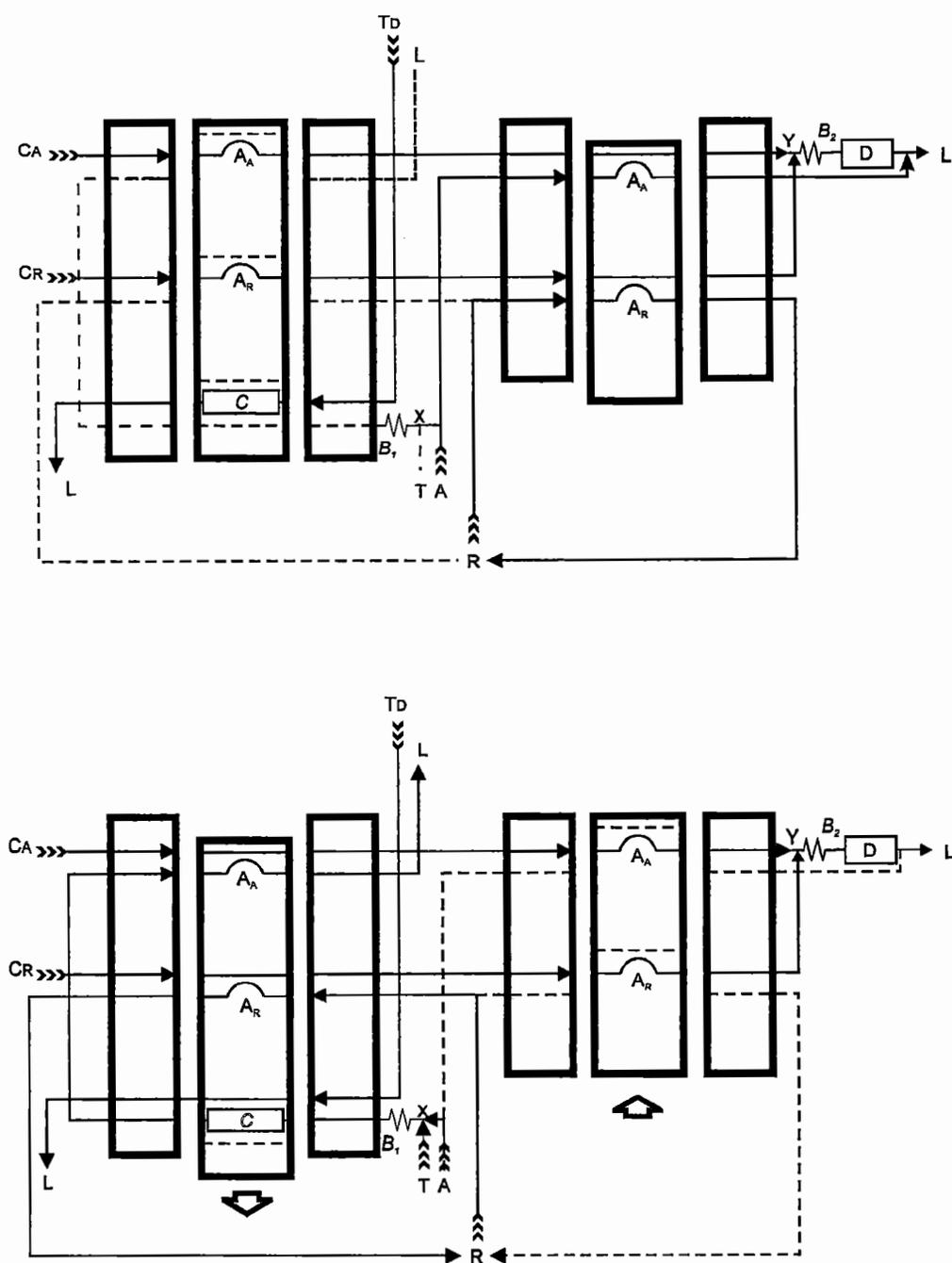


Figura 8: Diagrama esquemático do sistema utilizado para a análise simultânea de nitrito e nitrato. Acima, posição de análise de nitrato e amostragem de nitrito; abaixo, posição de análise de nitrito e amostragem de nitrato. **A**, representa a entrada de amostra; **A<sub>A</sub>** e **A<sub>R</sub>**, as alças de amostra e reagente, respectivamente; **B<sub>1</sub>** e **B<sub>2</sub>**, as bobinas de mistura e reação, respectivamente; **C**, a coluna de redução; **C<sub>A</sub>** e **C<sub>R</sub>**, os carregadores de amostra e reagente, respectivamente; **D**, o detector; **L**, o lixo; **R**, a entrada de reagentes **T**, o fluxo de tampão e **T<sub>D</sub>**, o fluxo de tampão diluído. **X** e **Y**, são os pontos de confluência da amostra com tampão e com o reagente cromogênico, respectivamente. As linhas em pontilhado representam partes do sistemas inoperantes naquela posição.

Dessa forma, a segunda alça amostral era preenchida de amostra previamente reduzida. Ao serem deslocados para a posição original, os injetores introduziam a amostra reduzida no fluxo carreador e o ciclo de amostragem reiniciava. Quando nessa posição, a coluna redutora recebia um fluxo contínuo de solução tampão diluído, que a lavava e recondia.

Uma vez injetada no fluxo carreador, a amostra, reduzida ou não, recebia, também por confluência, uma zona de reagente. Essa zona de reagente era formada pela dispersão de um certo volume do mesmo num fluxo carreador específico (água destilada), no qual o reagente também era injetado, simultaneamente à injeção da amostra. No percurso foi colocada uma bobina de retardo, de modo a fazer com que a confluência das duas zonas se desse de maneira sincrônica. A introdução do reagente no sistema se dava da mesma maneira que a amostra, ou seja, simultaneamente ao carregamento das alças amostrais, o reagente também era bombeado para alças específicas. Nas duas posições dos injetores, as duas alças de reagente preenchiam-se, sendo um bombar contínuo. Ao contrário das amostras, cujo excesso era descartado, o reagente era recuperado, com um mínimo de diluição.

Uma vez em contacto, as zonas de reagente e amostra percorriam uma distância predeterminada, ao longo da qual a reação se desenvolvia. Esse trajeto, normalmente helicoidal, denomina-se bobina de reação e, ao final do mesmo, a zona formada pela dispersão do produto da reação no fluxo carreador atinge o detector.

Cabe, aqui, uma pequena observação sobre o injetor proporcional. Esse componente, desenvolvido por BERGAMIN F<sup>o</sup> *et al.*, (1978b), além de se constituir num injetor hidrodinâmico, permite a definição do volume de amostra simplesmente variando o comprimento da alça de amostragem. A colocação de um segundo injetor

proporcional se fez necessária, pois o injetor proporcional disponível não permitia a colocação de duas alças de amostragem numa mesma secção de comutação.

Como procedimento geral, o trabalho começava com o sistema na posição de receber a amostra de nitrito. A bomba peristáltica era ligada, os fluxos carreadores eram estabelecidos, a coluna redutora recebia fluxo contínuo de tampão diluído, as alças da amostra eram preenchidas com água destilada e as de reagente com o próprio. Uma vez preenchida a primeira alça amostral, o sistema era deslocado para a segunda posição. Com a coluna em linha, a segunda alça amostral era preenchida e o sistema retornava à posição original e estava pronto para a análise. Esperava-se um sinal estável da linha de base no monitor do microcomputador e procedia-se à injeção das amostras. O ciclo percorrido por cada amostra era idêntico ao descrito acima e fornecia, ao final do mesmo, dois sinais: um para nitrito, somente, e outro para nitrato (reduzido) + nitrito (originalmente presente na amostra).

### **3.4. Estudo das características do sistema**

Alguns parâmetros do sistema precisam ser ajustados, com o intuito de se obter as características desejáveis ao mesmo. O ajuste de todos esses parâmetros foi feito com a utilização de padrões de 5,0 mg/L, tanto de  $\text{NO}_2^-$ -N, como de  $\text{NO}_3^-$ -N, valor próximo do limite superior do intervalo de concentrações a ser, supostamente, encontrado no estudo.

**3.4.1. Eficiência de redução.** Em primeiro lugar, no caso específico dessa determinação, a eficiência de redução da coluna tem um papel fundamental e precisa ser otimizada (GINÉ, 1979). A porcentagem de redução é função, nos sistemas em fluxo, do tempo de contato entre a amostra e o cádmio da coluna. Para controlarmos

esse parâmetro, então, temos duas opções: a variação do tamanho da coluna e da vazão do fluxo de amostra e tampão. No presente caso, o tamanho da coluna era constante (40 mm de comprimento e 5mm de diâmetro interno), restando somente o fluxo, como opção a ser testada. A vazão de amostra foi, então, variada, com a colocação de tubulação propelente com diferentes diâmetros na bomba peristáltica. Foram testadas vazões de 0,93 ; 1,9 ; 3,0 ; 4,25 ; 5,3 e 6,5 mL/min de amostra.

Como a vazão através da coluna era , nesse sistema, função também do fluxo de tampão, testou-se a influência desse parâmetro na eficiência de redução. Da mesma maneira que no caso da amostra, a vazão do tampão foi variada. Foram testadas vazões de 0,39 ; 0,93 ; 1,9 e 3,5 mL/min.

A eficiência de redução foi obtida pela comparação das respostas de soluções de mesma concentração de nitrato e nitrito, quando injetadas através da alça de injeção das amostras de nitrato.

**3.4.2. Volume de amostra.** A dispersão controlada é uma das características básicas em sistemas FIA e é responsável pelo padrão de resposta observado nesses sistemas (RUZICKA & HANSEN, 1988). O controle da dispersão pode se dar de diversas maneiras e é importante, principalmente no caso de amostras muito diluídas. Um primeiro parâmetro a ser ajustado é o volume de amostra, pois quanto maior o volume injetado, menor o grau de dispersão alcançado. No presente caso, o comprimento das alças de amostragem é que vai definir o volume injetado, na medida em que essas alças são feitas de tubulação de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno. As alças amostrais para ambas as análises, de nitrito e nitrato, tiveram testados os seguintes comprimentos: 5 ; 10 ; 20 ; 30 e 50 cm.

**3.4.3. Bobina de reação.** Um outro parâmetro que influencia diretamente a dispersão é o trajeto desde a confluência até o detector, sendo que a dispersão aumenta com o aumento desse trajeto. A extensão do trajeto, no caso da presente determinação, não pode ser diminuída a ponto de comprometer o desenvolvimento da reação, pois o caminho ao longo do qual ocorre dispersão é, fundamentalmente, composto pela bobina de reação. Portanto, o tamanho da bobina de reação deve ser cuidadosamente escolhido para atingir um equilíbrio entre o processo de formação do composto colorido e processos dispersivos causados pelo trajeto. No presente trabalho foram construídas bobinas de reação com a mesma tubulação de polietileno, de diâmetro interno de 0,8 mm, sendo que foram testadas bobinas de reação de 50 ; 75 ; 100 ; 150 e 200 cm de comprimento.

**3.4.4. Concentração dos reagentes.** A concentração dos reagentes também parece ser um fator que afeta o produto final da reação, sendo que na literatura encontra-se diversos valores para essas concentrações (PAI *et al.*, 1990). Portanto, foram testadas quais as concentrações mais eficientes tanto para o reagente cromogênico, quanto para o tampão.

Tomando-se como base as concentrações definidas no item 3.1., desse capítulo, foram feitas diluições de 1:2 ; 1:5 e 1:10 nos reagentes cromogênico e tampão, cujos efeitos foram testados na resposta do sistema.

**3.4.5. Confluência.** A sincronia no encontro da zona de amostra e de reagente foi conseguida pela colocação de uma bobina de retardo, cujo comprimento foi definido observando-se o comportamento de bolhas de ar, quando injetadas no lugar das amostras.

### 3.5. Tratamento do sinal

Com o sistema em funcionamento, o sinal analógico produzido no colorímetro era enviado a um microcomputador TK 3000, onde convertido a digital, era armazenado e tratado para se converter em medida. Essa medida se deu, como já foi dito, pelo cálculo da área do pico. O cálculo da área era feito por um *software*, originalmente utilizado para cálculo das áreas de cromatogramas.

A integração feita pelo *software* assemelha-se ao método poligonal de Simpsons, no qual o gráfico é dividido em faixas verticais estreitas de mesma largura, de maneira que a curva é seguida por uma seqüência de pequenos patamares. Assim, as pequenas faixas, sendo retângulos, permitem fácil cálculo de sua área. A integral, então, é aproximada pela soma das áreas das faixas.

A largura de cada faixa foi determinada a partir da freqüência de leitura. O sinal analógico proveniente do colorímetro era convertido por um conversor analógico / digital (AD) cerca de dez vezes por segundo. Assim, um pico típico, com dez segundos de duração, estava subdividido em 100 faixas. Para se obter o número de unidades de área se fixou a largura da faixa como tendo uma unidade de comprimento. Para a determinação da altura se usava a leitura do conversor AD. Por essa razão, a unidade de área utilizada foi denominada como sendo arbitrária.

### 3.6. Calibração do sistema

O sistema ajustado teve, então, as suas características analíticas determinadas. Nessas determinações, os padrões eram feitos diariamente, obtidos das soluções estoque e diluídos com água destilada, com a vidraria volumétrica adequada.

**3.6.1. Precisão.** Por meio dos desvios-padrão (DP), calculados para diferentes pontos da faixa operacional do sistema, foi obtida a precisão (coeficiente de variação) para cada um desses pontos. Para tanto era realizada uma série de injeções consecutivas, contendo uma solução padrão de concentração definida. Foram injetados padrões nas concentrações: 0,5 ; 3,0 e 5,0 mg/L.

**3.6.2. Sensibilidade.** A sensibilidade do sistema foi obtida tomando-se o desvio padrão associado ao branco e dividindo-se pelo coeficiente angular da curva analítica.

**3.6.3. Exatidão.** A exatidão foi avaliada mediante comparação dos resultados obtidos pelo método sob investigação com outro, aceito e utilizado universalmente. O método escolhido para comparação foi o método espectrofotométrico tradicional (APHA, 1985), que vem sendo empregado rotineiramente no Laboratório de Limnologia do CRHEA. Essa comparação foi realizada com amostras provenientes do reservatório de Salto Grande e foram analisadas simultaneamente por um espectrofotômetro de varredura Shimadzu, modelo UV2101PC, e pelo sistema sob investigação.

**3.6.4. Curvas analíticas.** Foram feitas inúmeras curvas analíticas para o intervalo de 0,5 a 5,0 mg/L de  $\text{NO}_3^-$ -N e  $\text{NO}_2^-$ -N. As curvas eram obtidas com a utilização de padrões de 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 3,0 e 5,0 mg/L de  $\text{NO}_3^-$ -N e  $\text{NO}_2^-$ -N.

### 3.7. Bioensaio

Como exemplo de utilização de um sistema FIA para a análise simultânea de nitrato e nitrito, tentou-se realizar um bioensaio no qual deveria ser monitorado o consumo de nitrato por culturas de uma espécie representativa do fitoplâncton de

água doce (a microalga cloroficea *Selenastrum capricornutum*), submetidas a diferentes condições de suprimento desse nutriente. Para tanto, um clone dessa espécie foi escolhido, inoculado em meio de cultivo específico, deixado a crescer até a obtenção de uma cultura densa. Após serem submetidas a diferentes tratamentos nutricionais com nitrogênio, as culturas teriam as suas concentrações de nitrato dissolvido monitoradas pelo sistema FIA já devidamente otimizado para a análise.

**3.7.1. Meio de cultura.** O meio de cultivo utilizado foi o W/C, recomendado para esse tipo de organismo (OLIVEIRA, 1988). Esse meio contém concentração de nitrogênio equivalente a 14 mg/L, na forma de nitrato. Sua composição completa pode ser encontrada em OLIVEIRA (*op.cit.*).

Os reagentes utilizados no preparo do meio eram P.A. e a água era destilada e deionizada. Durante todas as etapas do bioensaio foram observados os cuidados de assepsia necessários a esse tipo de trabalho (STEIN, 1973). Após o preparo do meio, o mesmo foi colocado em quatro erlenmeyers de 2L de capacidade cada, sendo que o volume de meio colocado em cada frasco foi de 1L. Os frascos contendo meio foram fechados com rolhas de algodão e gaze e esterilizados por autoclavagem a 120°C e 1 atm por 20 minutos.

**3.7.2. Organismo-teste.** O organismo escolhido foi a microalga cloroficea *Selenastrum capricornutum*, bastante utilizado em bioensaios (IBAMA, 1988). Foi obtido um clone dessa alga (clone 05D), junto ao CEPPA (CEM/UFPR) em Pontal do Paraná - PR. Esse clone foi obtido por reisolamento de outro procedente da CETESB/SP. Tal clone era mantido em geladeira em meio L.C. Oligo (AFNOR, 1980), solidificado com agar.

Com o intuito de se obter um inóculo denso e saudável, previamente ao experimento, foi feito um inóculo diretamente do tubo de ensaio no qual o clone era mantido para um erlenmeyer contendo pouco mais de 200mL de meio W/C devidamente esterilizado. Após a obtenção de uma cultura densa, em fase exponencial, o conteúdo do mesmo foi usado como inóculo para os quatro frascos de 2L citados no item anterior (3.7.1.). Para tanto, o frasco foi agitado para homogeneização e 50 mL de seu conteúdo foram adicionados a cada erlenmeyer maior.

**3.7.3. Condições de cultivo pré-bioensaio.** Após a inoculação, os quatro frascos foram colocados em local com iluminação artificial fluorescente (tipo luz do dia), temperatura pouco variável, em torno de 24°C, e aeração proveniente de aerador de aquário modelo Tropical II. Com a finalidade de se colocar as culturas sob os tratamentos nutricionais desejados, após cinco dias nessas condições, os frascos deixaram de ser aerados por 24 horas, até que os organismos estivessem decantados no fundo. O sobrenadante foi retirado e meio de cultura recém preparado foi colocado em cada um dos frascos. Dois dos frascos, no entanto, receberam meio de cultura sem nenhuma fonte de nitrogênio, sendo que os outros dois receberam meio de cultura normal, com a quantidade de nitrato prescrita. Após isso, os frascos foram recolocados nas condições originais e deixados por mais dois dias.

**3.7.4. Bioensaio.** No dia inicial do bioensaio, o sistema FIA para análise de nitrato e nitrito foi ativado, seguindo rotina já descrita e realizou-se uma primeira bateria de análise visando a construção de uma curva analítica. As culturas do organismo teste tiveram mais uma vez o meio renovado, como descrito anteriormente, sendo que todas elas, dessa vez, receberam meio fresco sem nitrogênio. Tal procedimento visava eliminar nitrato residual presente nas culturas.

Os frascos com as culturas de *Selenastrum capricornutum* foram colocados no local destinado ao ensaio e realizou-se a primeira medida de  $\text{NO}_3^-$ -N com o auxílio do sistema FIA, sendo que os frascos foram amostrados numa sequência que durou até o final do experimento. Para realizar a amostragem, filtravam-se 10 mL de cada frasco com filtrador manual dotado de manômetro e filtro de fibra de vidro. Nessa primeira amostragem, os filtros foram preservados para posterior análise do teor de clorofila-a das culturas.

Essa primeira medida do nitrato dissolvido mostrou que todas as culturas ainda apresentavam altos valores desse nutriente, não obstante os procedimentos adotados. Portanto, não foi adicionado o pulso de nitrato previsto para o bioensaio, porém o mesmo prosseguiu com o monitoramento da concentração do nitrato ainda presente nas culturas. Foram realizadas seqüências de amostragens, sempre em triplicata, acompanhando-se a evolução da concentração de  $\text{NO}_3^-$ -N nos frascos nos intervalos de 2 ; 4 ; 8 ; 12 e 20 horas após a medida inicial. Cabe lembrar que cada amostra se compunha de uma medida de nitrato mais nitrito e outra de nitrito, somente. No cálculo do nitrato em cada amostra levou-se em conta o nitrito eventualmente já presente na amostra, sendo feito o desconto após os cálculos das respectivas concentrações. O intuito de tal seqüência de medidas foi muito mais mostrar o uso do sistema FIA desenvolvido do que acompanhar o consumo de nitrato propriamente.

Como as concentrações de nitrato dissolvido não apresentassem redução significativa, procedeu-se a uma diluição das culturas em meio novo, no intuito de se repetir o experimento após alguns dias. Foram adicionados, então, a cada cultura, 700 mL de meio novo, substituindo 700mL de cultura que haviam sido previamente

retirados. No caso das culturas previamente tratadas com meio contendo nitrogênio, esse novo meio continha 1/10 da concentração de N-NO<sub>3</sub> prescrita pelo meio W/C. No caso dos frascos tratados sem nitrogênio, o novo meio adicionado também não continha tal elemento. A diluição das culturas foi feita com a intenção de se obter, após algum tempo, culturas em fase exponencial novamente.

Os frascos voltaram às condições de incubação descritas por mais 11 dias, após o que o experimento foi repetido, nas mesmas condições do anterior, excetuando-se o fato de que dessa vez, o meio não foi renovado ao início do experimento. Após a medida inicial, constatou-se que ainda havia teores consideráveis de nitrato dissolvido em todos os frascos. Optou-se, então, pela interrupção do ensaio, pois verificou-se que dificilmente o nitrato presente seria consumido no prazo previsto para a conclusão do trabalho. Foram filtradas novas amostras, dessa vez em filtrador acoplado a bomba de vácuo. Os filtrados foram novamente analisados quanto às concentrações de nitrato; foram recolhidas amostras para análise de fosfato dissolvido e fósforo total dissolvido; os filtros foram preservados para análise de clorofila-a (NUSH, 1980) e foram recolhidas amostras para observação e contagem de células no microscópio (STEIN, 1973).

Fósforo total dissolvido e fosfato dissolvido foram analisados segundo métodos recomendados em APHA (1985). As amostras contendo material vivo foram observadas com o auxílio de microscópio binocular e contadas com a utilização de hemocitômetro tipo Neubauer.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Sistema de análise

**4.1.1. Espectro de absorção:** O espectro de absorção do composto diazo pode ser visto na figura 9.

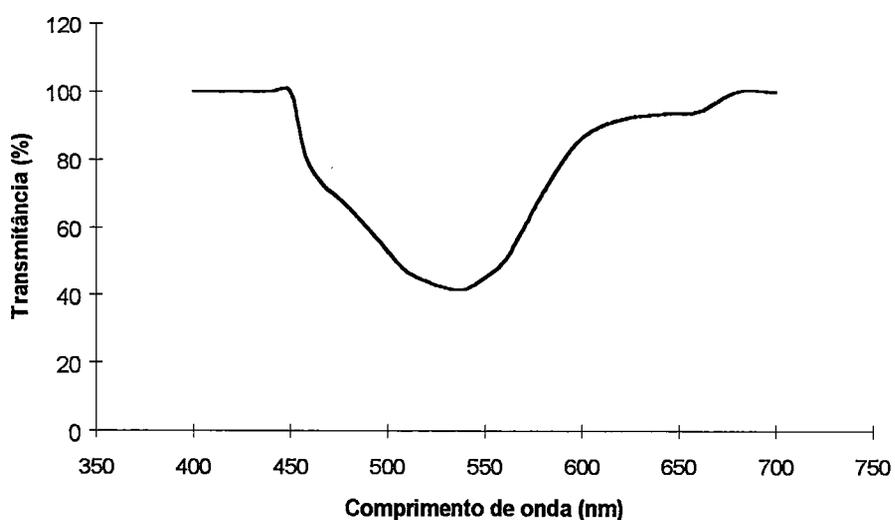


Figura 9. Espectro de absorção do composto diazo

**4.1.2. Vazão da amostra.** A influência da vazão da amostra no sinal pode ser vista na figura 10.

**4.1.3 Vazão do carregador.** O efeito da vazão do carregador no sinal pode ser observado na figura 11.

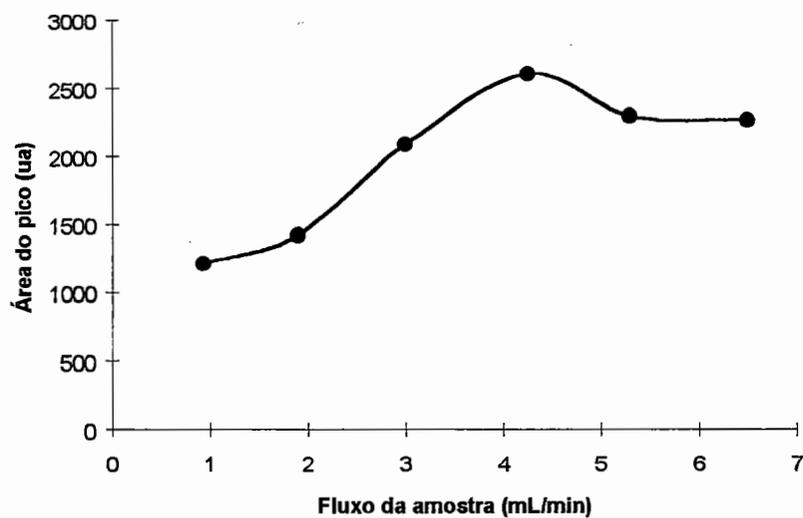


Figura 10. Influência da variação da vazão da amostra no sinal (área do pico)

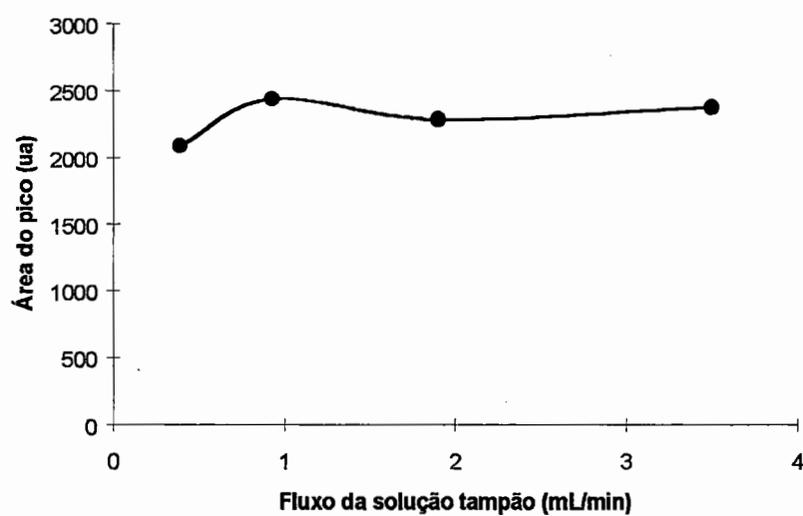


Figura 11. Efeito da variação da vazão do tampão no sinal obtido

**4.1.4. Eficiência de redução.** A eficiência de redução variou entre 15 % e 43%, sendo que a média geral obtida foi de 25%. Notou-se uma queda da eficiência de redução entre duas análises consecutivas utilizando-se a mesma coluna. Numa

primeira bateria, a média de eficiência de redução foi de 32%, sendo que a mesma caiu para 20% numa segunda bateria realizada dois dias depois. Não houve correlação entre concentração de nitrato da amostra e eficiência de redução.

**4.1.5. Volume de amostra.** O efeito do volume de amostra injetado, ou seja, do comprimento da alça amostral no sinal, está ilustrado na figura 12.

**4.1.6. Bobina de reação.** O comprimento da bobina influenciou a área do pico da maneira ilustrada na figura 13.

**4.1.7. Concentração de reagentes.** A influência da concentração dos reagentes cromogênico e tampão no sinal obtido podem ser vistos, respectivamente, nas figuras 14 e 15.

A figura 16 mostra o sistema otimizado, em função dos resultados obtidos acima. Essa configuração foi utilizada na obtenção das características do mesmo e na posterior utilização no bioensaio.

## 4.2. Características do sistema

**Precisão.** A tabela I mostra os resultados obtidos no cálculo dos coeficientes de variação para as diferentes faixas de concentração de  $\text{NO}_2$  e  $\text{NO}_3$ .

Tabela I. Coeficientes de variação obtidos para diferentes concentrações de nitrato e nitrito

Concentração (mg/L)	CV - $\text{NO}_2$ (%)	CV- $\text{NO}_3$ (%)
0,5	20	67
3,0	12	16
5,0	3.7	14

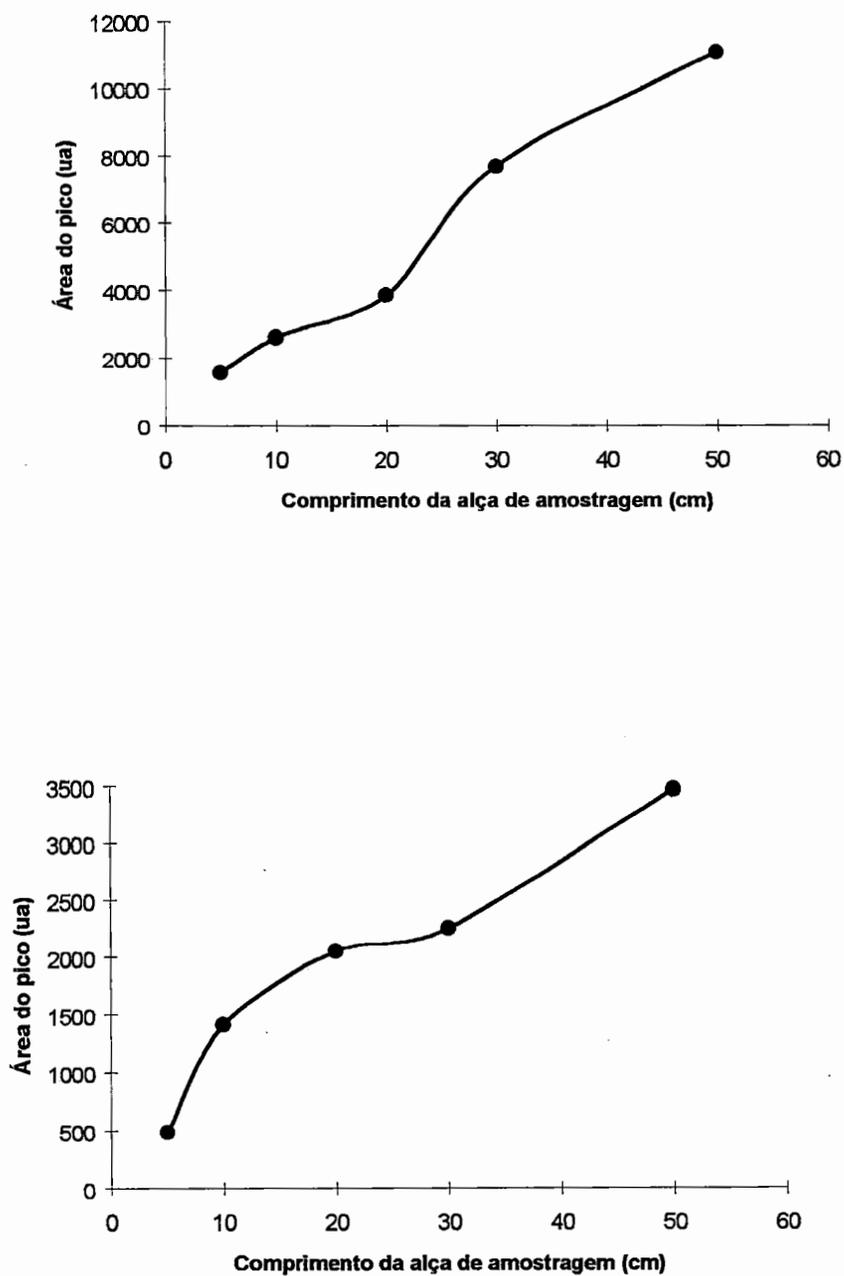


Figura 12. Efeito do comprimento da alça de amostragem no sinal obtido. O gráfico superior mostra o resultado para nitrito e o inferior para nitrate.

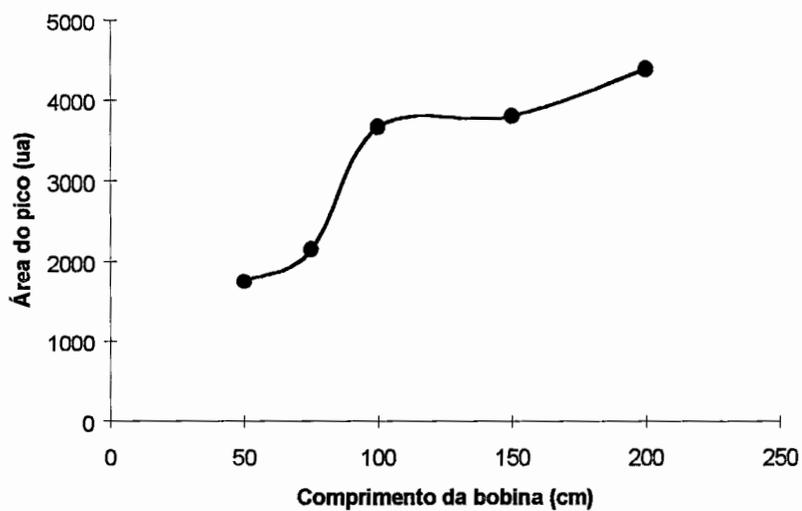


Figura 13. Efeito do comprimento da bobina de reação no sinal obtido para nitrato

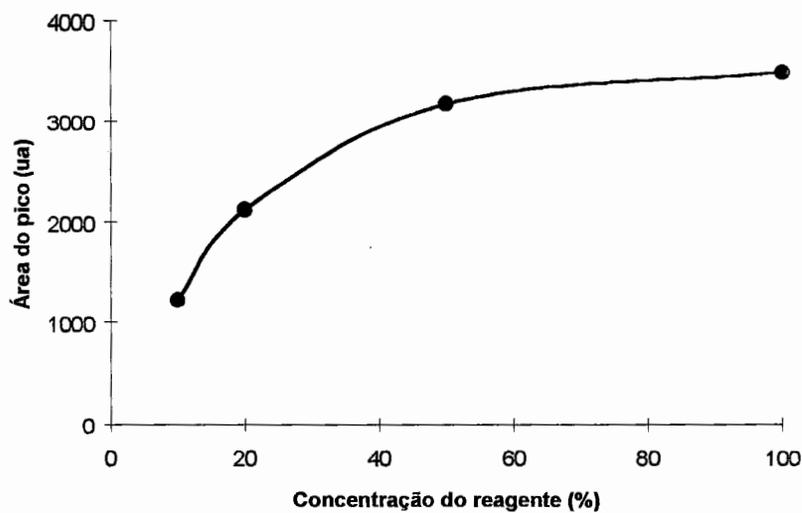


Figura 14. Efeito da variação da concentração de reagente cromogênico no sinal obtido para nitrato

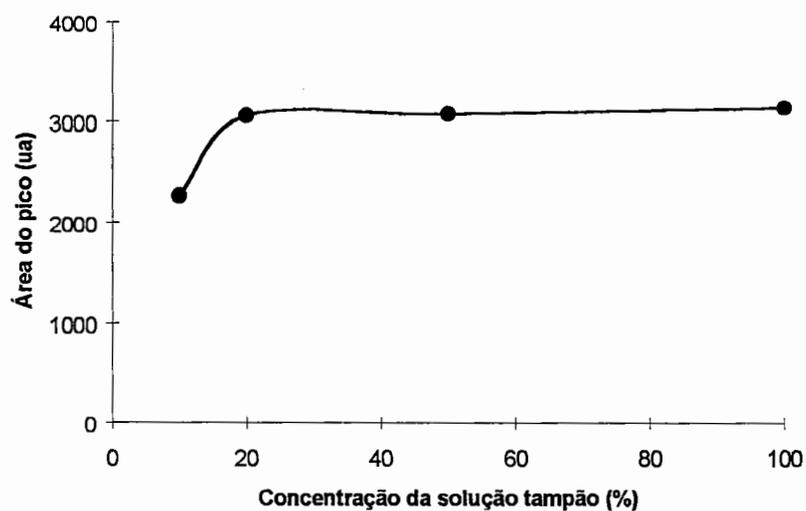


Figura 15. Efeito da variação da concentração de solução tampão no sinal obtido

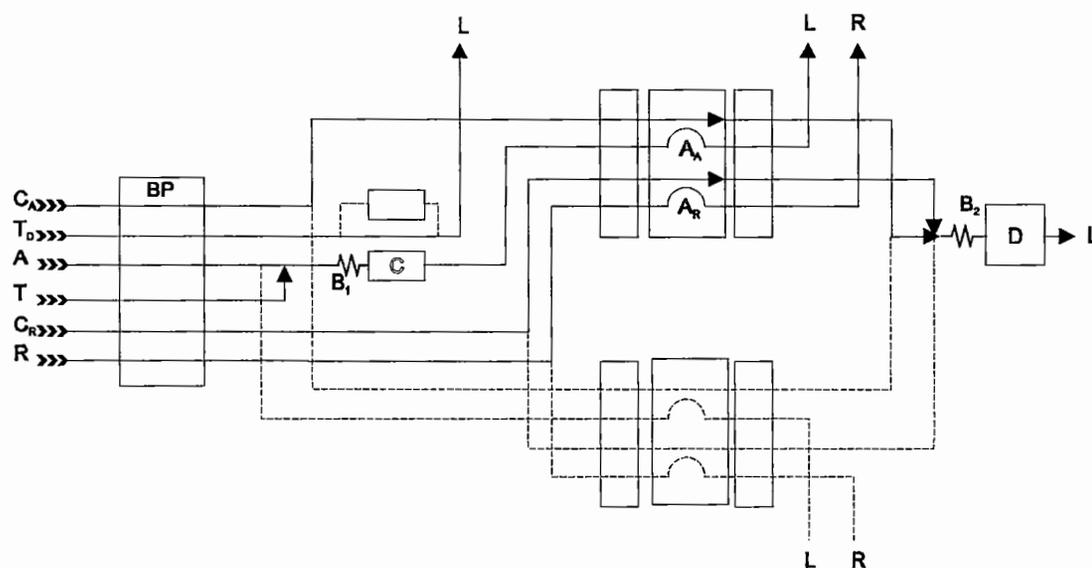


Figura 16. Sistema de análise simultânea para nitrato e nitrito otimizado, mostrando o sistema para análise de nitrato em linha cheia e o sistema para análise de nitrito em linha pontilhada. **BP** representa a bomba peristáltica e os demais símbolos são como citados na figura 8. Os fluxos (mL/min) foram otimizados em:  $C_A$ , 5,0;  $C_R$ , 2,5; **A**, 4,2; **R**, 3,0; **T**, 2,0 e  $T_D$ , 3,0. As alças de amostragem e reagente foram fixadas em 50 cm, resultando em volume de 250  $\mu$ L. **B<sub>1</sub>** e **B<sub>2</sub>** foram fixadas em 20 e 150 cm, respectivamente.

**4.2.2. Sensibilidade.** O limite de detecção para nitrito foi calculado como sendo 0,085 mg/L e o limite de detecção para nitrato situou-se em 0,49 mg/L.

**4.2.3. Exatidão.** As comparações dos resultados obtidos pelos diferentes métodos, quando da análise de nitrato das mesmas amostras, podem ser vistas na tabela II.

**4.2.4. Curvas de calibração.** As curvas analíticas nunca apresentaram coeficientes de correlação ( $R^2$ ) inferiores a 0,98. Alguns exemplos dessas curvas podem ser vistos nas figuras 17 e 18.

Tabela II. Comparação entre as concentrações de nitrato (mg/L) obtidas pelos métodos espectrofotométrico tradicional e pelo proposto no presente trabalho. As amostras são de reservatório de Salto Grande (Americana, São Paulo).

Amostra	Método Tradicional	Método proposto
1	2,07	2,39
2	1,72	1,40
3	1,28	1,05
4	0,85	0,80
5	1,30	1,01
6	1,24	1,52
7	1,28	1,18
8	1,28	1,22
9	1,42	1,51
10	1,23	0,91

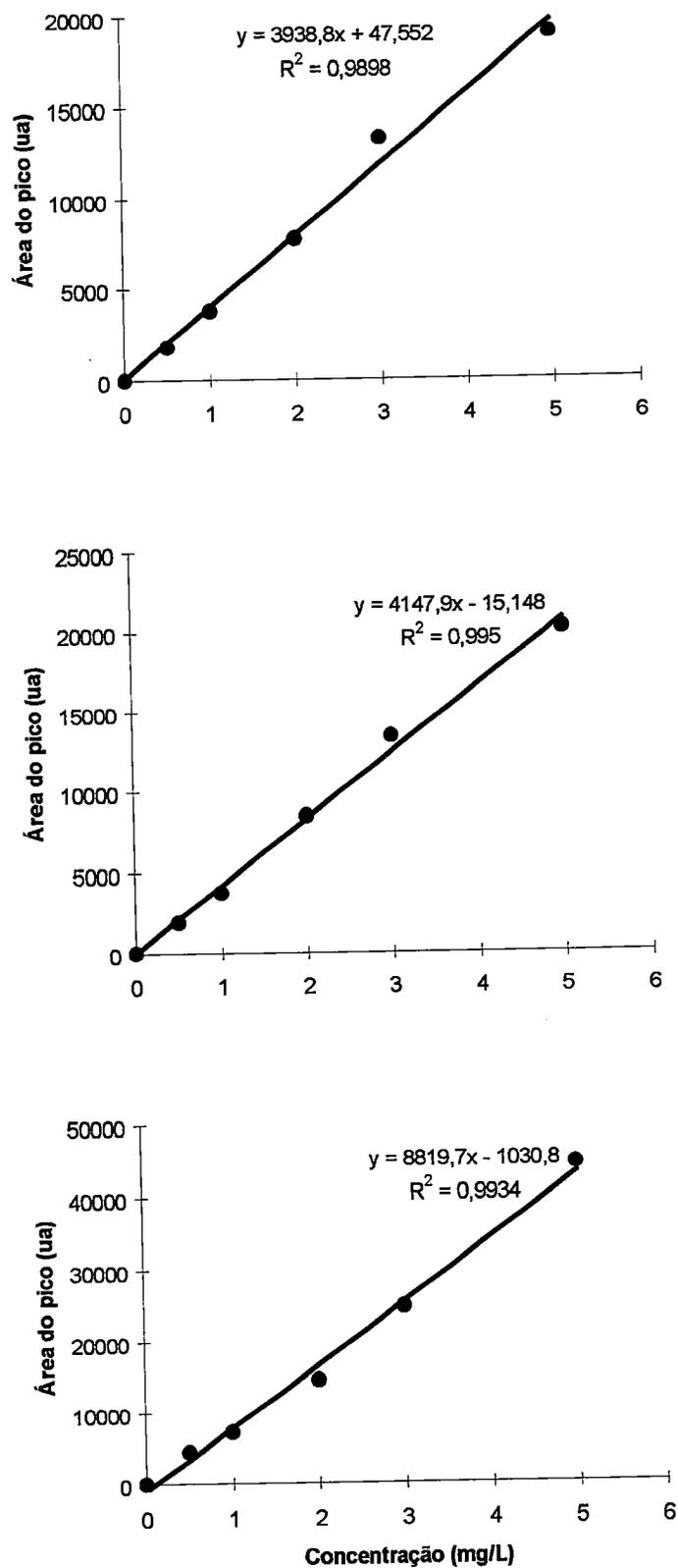


Figura 17. Curvas analíticas para nitrito, obtidas com o sistema proposto.

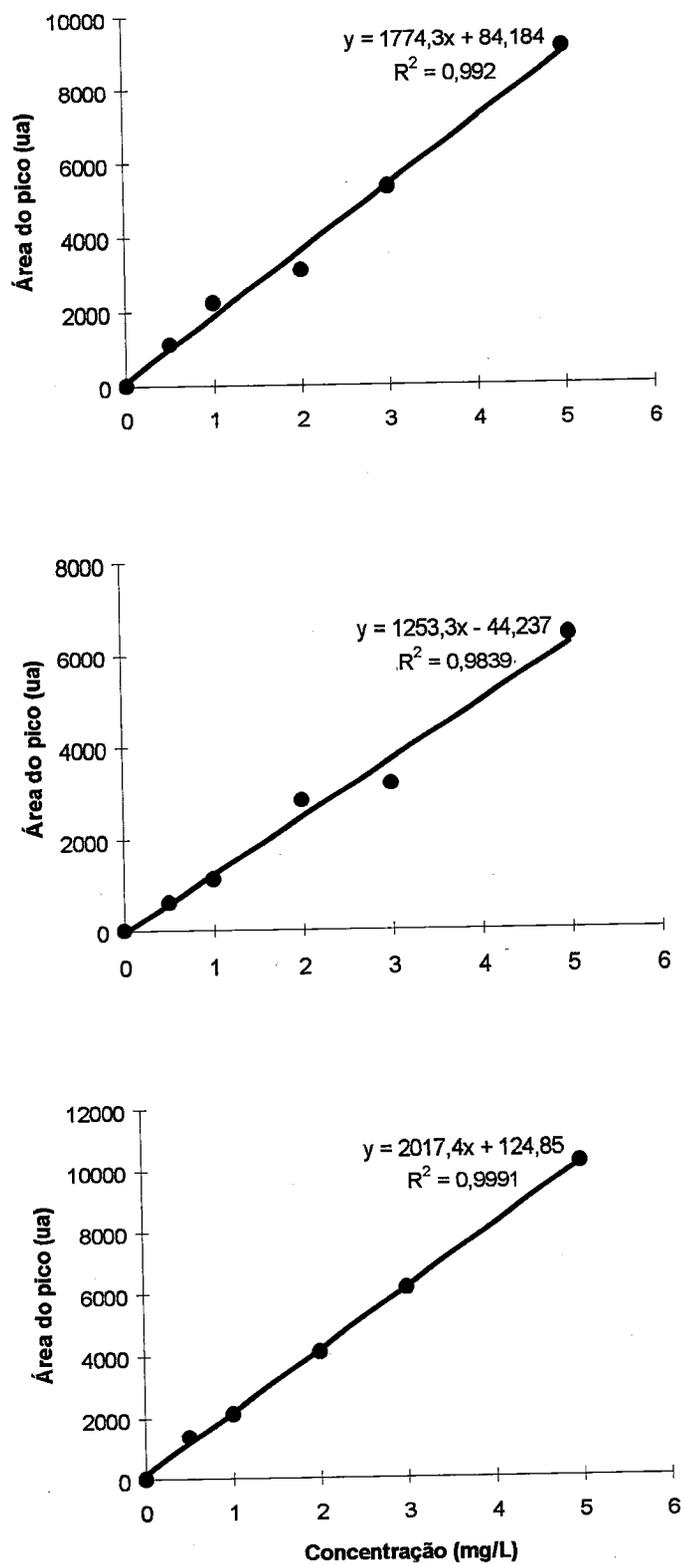


Figura 18. Curvas analíticas para nitrato, obtidas com o sistema proposto.

### 4.3. Bioensaio

Na primeira tentativa de ensaio, as concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  dissolvido, em todos os frascos sem exceção, estavam acima de 10 mg/L e assim permaneceram enquanto o ensaio durou. Os valores de clorofila-a situaram-se acima de 1,5 mg/L e os feopigmentos contribuíram com cerca de 20% desses valores.

Na segunda tentativa, muito embora não tenha sido feita uma curva de calibração, o sinal obtido para  $\text{N-NO}_3^-$  dissolvido nas culturas foi muito semelhante ao produzido por um padrão contendo 5,0 mg/L desse nutriente. Os picos produzidos pelo nitrito demonstraram a presença desse elemento em concentrações detectáveis. As concentrações de clorofila-a situaram-se em torno de 1,0 mg/L, sendo que a contribuição dos feopigmentos, nesse caso, foi de 33%.

Ainda referente ao segundo ensaio, os valores de fosfato dissolvido ficaram em torno de 14  $\mu\text{g/L}$  (observar unidade), ao passo que os valores de fósforo total dissolvido (fosfato + fósforo orgânico) situaram-se em torno de 150  $\mu\text{g/L}$ .

A observação no microscópio não revelou, aparentemente, nenhuma contaminação e a densidade celular do organismo teste atingiu valores em torno de  $10^7$  cels/mL.

## **5. DISCUSSÃO**

No laboratório de limnologia do CRHEA há um constante aumento do volume de trabalho, fato que exerce pressão para a introdução de métodos automáticos, visando o aumento de produtividade, atualmente dependente de métodos manuais. O método FIA é um dos possíveis candidatos a ser adotado para vários tipos de determinação, inclusive de nitrato e nitrito. O presente trabalho é, de certa forma, uma primeira tentativa exploratória neste sentido. Não chegou a estabelecer o método em regime de rotina, principalmente porque foi desenvolvido sem aquisições adicionais e as modificações que se fizeram necessárias durante a viabilização do método dependeram fortemente de improvisações. No entanto, vários aspectos foram revelados pelo trabalho.

### **5.1. Cella de fluxo e sistema de detecção**

As principais dificuldades encontradas originaram-se da necessidade de se construir um colorímetro com cela de fluxo. Como o laboratório de limnologia não possuía aparelho óptico adequado disponível para o desenvolvimento do método proposto, grande parte do esforço e do tempo dedicados ao projeto foram gastos no desenvolvimento do equipamento. Tal fato gerou, por um lado, limitações quanto à sensibilidade e faixa de concentração para as quais o método mostrou-se viável e

eficiente, porém alguns esforços podem ser empreendidos na melhoria dessas limitações. Por outro lado, o equipamento tornou-se portátil e foi construído com um mínimo de recursos, características desejáveis em sistemas de análise rotineiros.

Em primeiro lugar, foi preciso incorporar um estabilizador de corrente da lâmpada de halogênio, recurso que eliminou as flutuações do sinal devidas à variabilidade da intensidade do feixe luminoso. Foram testados três tipos de detectores: fotorresistor, fotomultiplicadora e fotodiodo, sendo que este último foi o escolhido, pois foi o que mostrou sinal mais estável.

No desenvolvimento do colorímetro, considerável esforço foi dedicado à escolha do filtro. Neste contexto, foram testados vários corantes prontamente disponíveis, envolvendo o levantamento dos respectivos espectros de transmissão e a confecção de filtros de gelatina. Tais levantamentos produziram filtros combinados cujos espectros se adequavam, perfeitamente, à análise desejada. Tais filtros, porém, não puderam ser usados, pois imperfeições na confecção dos mesmos causavam grande espalhamento do feixe luminoso, prejudicando a sensibilidade do sistema. Descartando-se a idéia de produzir o próprio filtro, optou-se pela aquisição de uma unidade comercial, com a faixa adequada de comprimento de onda.

Também foram testados dois tipos de celas de fluxo, com comprimentos de caminho óptico variando entre 1 e 10 cm. O tipo escolhido foi o que permite a passagem de eventuais bolhas em um espaço previsto para elas, fora do caminho do feixe óptico. Acredita-se que este tipo de cela possa ser um tipo novo, apresentado pela primeira vez neste trabalho, para uso em FIA. Cabe ser ressaltado que a cela de fluxo comportou-se de maneira bastante satisfatória, pois bolhas muito pequenas ficavam alojadas na calha superior da cela, não causando perturbações no feixe de luz.

Quando as bolhas atingiam tamanho suficiente para afetar o caminho da luz, as mesmas eram facilmente eliminadas com leve inclinação do aparelho. Tal fato foi altamente positivo na operação de rotina do equipamento, eliminando consideráveis gastos de esforço e tempo na retirada de bolhas. O caminho óptico adotado foi o de 1cm, que se mostrou o mais adequado para a faixa de concentração a ser esperada nas análises previstas (acima de 1 mg/L).

## 5.2. Ajuste do sistema

A redução de nitrato a nitrito através de coluna de cádmio tem sido largamente utilizada em sistemas FIA, com comprovada eficiência (GINÉ, 1980 e 1983; VAN STADEN, 1982; JOHNSON & PETTY, 1983, entre outros). Os autores acima citados relatam eficiências de redução raramente inferiores a 80%, muito embora no presente trabalho a eficiência máxima não tenha ultrapassado 43%. Tal fato deveu-se, muito provavelmente, à qualidade do cádmio utilizado, o tipo e o tamanho da granulação do produto disponível. Quanto maior a superfície de contato entre o grânulo e a amostra, maior a eficiência na redução. A eficiência na redução, neste tipo de sistema, também é função do comprimento da coluna e da vazão do carregador que passa pela coluna. No sistema desenvolvido, como já foi dito, o comprimento da coluna era fixo, restando-se apenas a vazão do carregador como parâmetro a ser estudado.

A figura 10 mostra que a resposta do sistema aumentava com o aumento da vazão até um certo valor, a partir do qual essa resposta diminuía. Vazões muito altas acabam por não permitir contato adequado do nitrato da amostra com o cádmio, prejudicando a redução. Portanto seria de se esperar um aumento de resposta com o

diminuir da vazão e o que se observou foi o contrário. Tal fato pode ser explicado levando-se em conta que a solução utilizada na calibração do sistema era de concentração relativamente alta (5 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ ) e que devido ao período de contato com a coluna de cádmio, poderia estar sendo reduzida para outra espécie química, como amônia, ou, até mesmo, nitrogênio gasoso.

Uma outra explicação poderia ser a progressiva diluição a que a amostra estaria sendo submetida ao se variar o seu fluxo carregador, sem se variar a vazão da solução tampão. Porém, ao observarmos a figura 11, podemos perceber que a variação da vazão de solução tampão para um valor fixo de vazão de carregador da amostra teve pouca influência no sinal.

Porém, de uma maneira geral, o sistema reduziu satisfatoriamente o nitrato a nitrito. A colocação da coluna de redução previamente à injeção da amostra propiciou independência da etapa de redução do resto da análise, o que torna essa etapa mais fácil de ser manipulada, sem perda da velocidade analítica. A colocação de um fluxo de solução tampão, lavando e recondicionando a coluna na posição de injeção da amostra, mostrou-se bastante eficiente.

O tamanho da bobina de reação é um importante aspecto a ser estudado, pois controla a formação do composto colorido e a sua dispersão no fluxo carreador. Observando-se a figura 13 pode-se ver que bobinas com comprimentos inferiores a 70 cm aparentemente não permitiram um bom desenvolvimento da reação. Com o aumento do tamanho da mesma, provavelmente ocorre uma mistura mais efetiva da amostra com o reagente, promovendo a reação. Após estabilizar num patamar, a reação parece começar a incrementar, fato que pode ser devido ao aumento do tempo de reação. De fato PAI *et al.* (1990), discutem que a reação de diazotação ocorre

quase que instantaneamente, ao passo que a etapa de acoplamento ocorre mais lentamente. Dessa forma, o primeiro patamar na figura 13 significaria eficiência na etapa de diazotação e a subida posterior da curva mostraria o começo da evolução da segunda etapa da reação. Em bobinas muito grandes, como 200 cm, o sinal, embora fosse maior na área, apresentava distorções, provavelmente devidas aos processos dispersivos. Entre as bobinas de 100 e 150 cm, que apresentaram sinais bastante semelhantes, optou-se pela escolha dessa última, também tendo como critério a qualidade do sinal, em detrimento da velocidade analítica. O comprimento das alças de amostragem e, portanto, o volume de amostra injetado teve influência marcada no tamanho do sinal, como pode ser visto na figura 12. Aumentos no volume injetado produziram aumentos quase lineares nas respostas. O tamanho da alça de amostragem foi fixado como sendo, no máximo, 1/3 do tamanho da bobina de reação, o que fez com que o volume ficasse em, aproximadamente, 250 $\mu$ L.

A concentração do reagente cromogênico mostrou que pode ser diluído em até 50% da concentração original, sem muito prejuízo na amplitude do sinal. Isso significa que a recuperação do reagente durante o processo de análise pôde ser feita sem maiores problemas, durante todo o tempo pelo qual o reagente permanecia estável, sem ser preciso o seu acondicionamento.

A solução tampão também pôde ser bastante diluída (até 75% da concentração original) sem afetar o sinal. Esse fato pode significar alguma economia de reagentes, na medida em que uma solução tampão mais diluída pode ser preparada, sem receio de comprometer a boa redução do nitrato.

A bomba peristáltica apresentou problemas de uniformidade no fluxo, defeito característico desse tipo de equipamento. Parte da flutuação do sinal, principalmente

da linha de base, pode ser atribuída a esse efeito. Ao final do bioensaio, a bomba peristáltica apresentava problemas sérios, que chegaram a interferir na qualidade do sinal a ponto de se precisar interromper o experimento.

A colocação de dois injetores proporcionais foi absolutamente necessária para a análise simultânea de nitrito e nitrato, visto que um só, apenas, não possuía duas alças em uma única seção de comutação. Descartou-se a possibilidade da colocação de outras alças de amostragem, pois não se tinha certeza da estabilidade estrutural da peça para tanto. Portanto, os dois injetores trabalhavam em regimes opostos de funcionamento: enquanto um injetava amostra para nitrito, o outro carregava, reduzindo, a amostra de nitrato e vice-versa. Tal arranjo foi perfeitamente satisfatório e não causou maiores dificuldades de ser operado, uma vez em funcionamento.

Os sinais produzidos por fotodiodos são, em muitos casos, logarítmicos. Acredita-se, a se julgar pelos bons resultados obtidos nas curvas analíticas, que esse é o caso do presente trabalho. Os sinais enviados relacionavam-se com transmissão, ao invés da absorbância, o que poderia causar comportamento não linear à curva analítica. Porém a resposta logarítmica do sensor, provavelmente, corrigiu internamente a distorção.

Quanto ao uso da área do pico, em vez da altura, constatou-se que é um procedimento viável. A área utilizada era a área total do pico, porém, devido ao ruído presente na linha de base, havia certa indefinição nos pontos exatos de início e fim, resultando num aumento da variabilidade. Essa dificuldade foi analisada e foi concebida uma possível solução, mediante a melhor definição da largura do pico, com modificações no programa de computador, como mostra a figura 19.

Tendo em vista a conseqüente necessidade de mudanças substanciais no já citado programa de computador, tal solução não pôde ser adotada pela escassez de tempo. Espera-se que a mesma, uma vez implementada, vá reduzir a variabilidade dos sinais, pois as abscissas dos dois pontos de semi-altura são muito melhor definidas que as do início e fim do pico, quando se considera presença de ruído.

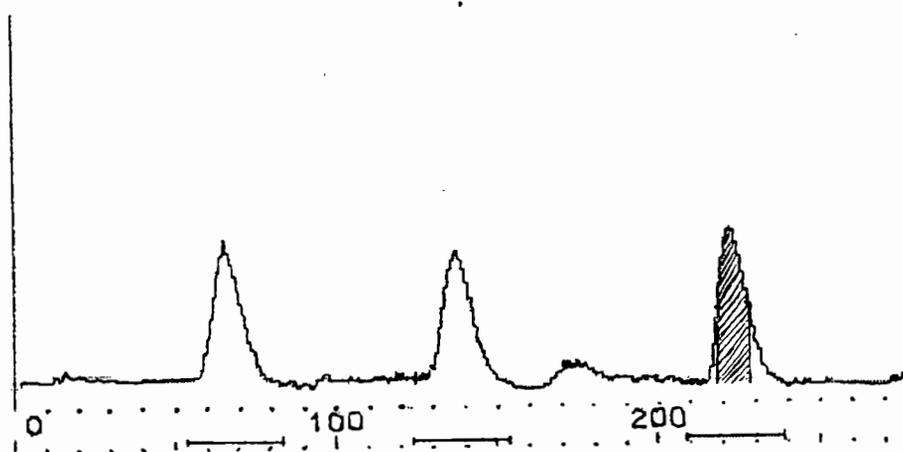


Figura 19: Sinais obtidos com o sistema desenvolvido mostrando parte de uma curva de calibração para nitrato, com solução padrão de 5 mg/L. No pico mais à direita, a área computada situa-se entre duas semi-alturas do pico.

### 5.3 Características do sistema

A precisão pareceu relacionar-se diretamente com o tamanho do sinal. Muito embora a precisão obtida para a faixa de 0,5 mg/L de nitrato deixasse muito a desejar, existe a perspectiva de, melhorando-se a qualidade do sinal, melhorar-se a precisão. Observando-se a precisão obtida para a faixa de 5,0 mg/L de nitrito (3,7%), verifica-se que ela não ficou muito distante daquelas obtidas por alguns sistemas FIA desenvolvidos para esse tipo de análise (MADSEN, 1981; CLINCH *et al.*, 1987).

A sensibilidade obtida foi satisfatória para o estudo que foi realizado, muito embora possa ser aumentada na medida em que se processe uma melhora do sinal. A exatidão do método foi bastante boa, a julgar pelos problemas enfrentados, pois,

com pouca exceções, o método aqui proposto forneceu um resultado semelhante ao adotado como referência. Certos desvios devem-se ao fato de que as amostras do reservatório de Salto Grande analisadas tinham teores de nitrato situados mais próximos dos limites inferiores do que dos superiores da faixa operacional do sistema (0,5 mg/L - 5,0 mg/L).

A velocidade analítica foi mais dependente das limitações do programa de computador que qualquer outra coisa. Como o programa imprimia e calculava somente nove picos, no máximo, a cada corrida, a velocidade de análise ficou prejudicada. Internamente, verificou-se que a principal limitação na velocidade analítica provinha do tempo pelo qual a coluna deveria ser lavada, entre uma amostra e outra.

O presente trabalho fez uso de algum equipamento para FIA já existente no CRHEA e o completou com a adição de um colorímetro e da conexão a um computador. Se esse procedimento provocou, por um lado, improvisações que deixaram margem para melhoras, por outro lado gerou grande economia de material e viabilizou um sistema FIA, desenvolvendo-o a um ponto a partir do qual um esforço menor, mais concentrado no refinamento do mesmo, poderá estabelecer a operação em regime de rotina.

Ficou claro que o método é viável ao repetir a análise de  $\text{NO}_3^-$  em amostras provenientes de um reservatório próximo, que vem sendo objeto de estudo de um grupo interdisciplinar, num extenso projeto. A economia de tempo ficou patente, mesmo com o sistema FIA improvisado.

Outra revelação veio em consequência do uso de um colorímetro específico para a análise, ao invés de um espectrofotômetro: o primeiro é mais compacto,

portanto pode ser portátil. Se o computador de bancada for substituído por um do tipo *lap top* e se fizer uso de bateria automotiva de 12V, o conjunto se torna operável no campo. Dessa forma, os dados gerados em uma campanha poderiam ser obtidos já no campo, eliminando o transporte das amostras.

Os principais esforços para o refinamento do sistema dizem respeito ao melhoramento do sinal. Isso pode ser conseguido com modificações no programa de computador, aquisição de bombas peristálticas de qualidade melhor e, no caso da análise de nitrato, uma coluna redutora com eficiência maior. Para se aumentar a eficiência dessa coluna, pode-se fazer variar o tamanho da mesma, parâmetro não testado nesse estudo, e realizar um estudo mais aprofundado sobre a redução nesse sistema, com a utilização de várias fontes e tipos de grânulos de cádmio.

#### **5.4 Bioensaio**

A intenção inicial, ao se propor o bioensaio como exemplo da utilização do sistema FIA desenvolvido, era mostrar a utilidade desse equipamento numa das medidas mais realizadas em estudos ecofisiológicos envolvendo nutrientes e fitoplâncton, que é a velocidade de consumo de nitrato por culturas de microalgas.

Muitos autores têm feito tais medidas, com os mais diferentes propósitos. Por exemplo, RAIMBAULT *et al.* (1990) estudaram o consumo de baixas concentrações de nitrato adicionado a um meio de cultura contendo diatomáceas crescendo em meio sem nitrogênio. MARTINEZ (1991) trabalhou com clones de ditomáceas crescendo em vários graus de deficiência de nitrogênio e a resposta desses organismos a pulsos de nitrato na presença de luz e no escuro. SCIANDRA (1991) monitorou esse

consumo quando o nitrato era adicionado em frequências diferentes (continuamente, ou em pulsos de 1 ; 2 e até 3 dias de intervalo) a uma cultura de dinoflagelados.

Nesses estudos, assim como em muitos outros, a resposta dos organismos aos pulsos do nutriente ocorreram em algumas horas, sendo que o pulso de nutriente adicionado raramente excedia a faixa de 100  $\mu\text{g}$  de  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$ . A grande maioria desses estudos fez uso de sistemas de cultivo contínuo, cujo funcionamento se adapta melhor a esse tipo de estudo, pois permite manipulações com a densidade dos organismos e a composição do meio de maneira mais fácil e precisa.

No presente trabalho, a alga cloroficea *Selenastrum capricornutum* foi colocada em sistema de cultivo tipo *batch*, o que dificultou a colocação dos organismos num regime ideal de cultivo preparatório. Para facilitar a colocação dos organismos nas condições de cultivo prévias ao bioensaio, os frascos foram deixados sem agitar por um período de tempo, a fim de permitir a sedimentação dos organismos e facilitar a troca de meio, evitando a diluição da cultura.

Devido à sensibilidade conseguida, a quantidade de nitrato adicionado no pulso deveria ser tal que pudesse ser detectada pelo aparelho e, logo, relativamente alta (o valor sugerido foi de 3mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$ ) . Portanto, as culturas deveriam ser densas o suficiente para consumir esse nitrato adicionado num intervalo de 24 a 48 horas, daí os cuidados na prevenção da diluição das mesmas. Isso, por outro lado, criou culturas extremamente densas, cujo comportamento é bastante diferente daquele de culturas ralas.

Uma tentativa de filtração das amostras em fluxo mostrou-se inoperante, provavelmente devido à sobrecarga hidrodinâmica no canal de amostragem, que já continha a coluna. A bomba peristáltica, já não muito eficiente, não teve potência

suficiente para manter o sistema operante. A opção, então, foi realizar a filtração previamente à injeção da amostra no sistema

Os resultados obtidos pelo estudo mostraram, claramente, que durante o tempo em que durou, não houve consumo de nitrato por parte das culturas ou o mesmo não foi detectável pelo método proposto. No entanto, as culturas cresceram como esperado, aparentemente saudáveis, como pode ser atestado pelos índices de densidade de organismos e valores de clorofila-a obtidos. Muito embora não se esperasse tal resposta e, portanto, não se estivesse preparado para o monitoramento de vários parâmetros, importantes na interpretação do resultado obtido, algumas observações podem ser feitas, no sentido de elucidar o acontecido. Tais observações incluem o sistema de análise, condições de cultura e mecanismos fisiológicos dos organismos.

Uma das razões pelas quais os teores de nitrato mantiveram-se altos poderia ser a ação de interferentes provenientes ou de restos de algas que eventualmente não foram retidos pelo processo de filtração, ou de outros componentes do meio. As amostras foram filtradas por dois processos, utilizados em rotina sem maiores problemas, e ambos os tratamentos forneceram resultados semelhantes. O meio de cultura não possui composição tão mais enriquecida do que, por exemplo, as águas do reservatório de Salto Grande, que foram testadas com sucesso. Ao contrário, o reservatório recebe influência significativa de efluentes com os mais diferentes compostos, alguns em concentrações relativamente altas.

O tratamento prévio ao qual as culturas foram submetidas pode, talvez, ser a principal explicação para o resultado obtido. Nas duas vezes em que houve substituição do meio, no primeiro ensaio, apenas parte desse era retirada, o que

causou a permanência de nitrogênio residual, mesmo nas situações nas quais o meio adicionado não continha nitrato. Um agravante dessa situação é o fato de que as culturas foram deixadas sem aeração e, portanto, sem agitação, durante algum tempo antes.

Como a situação nutricional das células era boa, o nitrato residual não foi consumido significativamente até o momento do ensaio. De fato, as culturas necessitam de um certo tempo até que o nitrato remanescente no meio seja depletado antes do início do experimento (MARTINEZ, 1991; SCIANDRA, 1991). Levando esse fato em conta, tentou-se repetir o ensaio com a cultura renovada em meio sem nitrato, ou com 10% da concentração original, porém tal tentativa não foi bem sucedida. Muito embora o tempo decorrido entre os dois ensaios fosse, teoricamente, suficiente para que ocorresse o consumo do nitrato remanescente, o fato é que no presente caso a concentração de nitrato do meio e a densidade celular das culturas eram altas, diferentes das encontradas em trabalhos prévios. Talvez fosse necessário aguardar mais tempo até a depleção de nitrato do meio, o que não foi possível, além do que ocorreram problemas com a bomba peristáltica do aparelho, como já foi exposto.

Quando levamos a cabo experimentos envolvendo culturas, freqüentemente as condições axênicas não são preservadas, principalmente quando o cultivo se processa em condições adequadas, porém improvisadas, como foi o presente caso. Nesse sentido, ao realizar o experimento, estamos lidando com uma comunidade, ao invés de uma população. Essa comunidade, por mais que seja dominada por uma única espécie (no caso, a alga), exhibe uma rica comunidade microbiana, cuja importância nos sistemas aquáticos já é estabelecida.

Em situações como essa, o papel regulatório do nitrogênio ganha contornos complexos. As microalgas podem regular o *uptake* das formas nitrogenadas dependendo das concentrações externas das diferentes formas desse nutriente e da situação nutricional das células (BEEVERS, 1981; GOLDMAN & GLIBERT, 1983; STEWART *et al.*, 1983; WHEELER, 1983; TURPIN, 1988). O aparecimento de uma comunidade microbiana pode alterar bastante a maneira como o nitrogênio cicla nos frascos experimentais. Tais comunidades produzem e ciclaram rapidamente a amônia, que poderia estar competindo com o nitrato como fonte de nitrogênio, além de serem responsáveis por outros processos de transformação do nitrogênio, como a nitrificação (SCHLEGEL, 1981; WETZEL, 1981; STEWART *et al.*, *op.cit.*). Algumas evidências de atividade microbiana poderiam ser os valores relativamente altos de formas orgânicas de fósforo, presentes no meio após o término do bioensaio, e os valores significativamente altos de nitrito, detectados também nesse meio.

Como já foi dito, vários parâmetros importantes para a elucidação do resultado obtido deixaram de ser monitorados, pois a intenção inicial do bioensaio era tão somente exemplificar o uso de um sistema FIA em estudos limnológicos. Portanto um estudo mais aprofundado, no qual se monitore mais freqüentemente o consumo de nitrato, preferivelmente desde o momento do inóculo inicial, seria desejável. Um acompanhamento mais próximo da evolução de outros nutrientes, como a amônia (e outras formas de nitrogênio) e fósforo também torna-se importante. Por último, a verificação da condição de pureza da cultura e o emprego de técnicas mais sofisticadas que a simples observação em microscópio podem auxiliar bastante no rastreamento de uma comunidade microbiana.

Os resultados obtidos não permitem maiores conclusões acerca dos processos ocorridos, porém sugerem respostas complexas e que demandam um controle maior das variáveis envolvidas no experimento. Enfim, uma abordagem mais completa e inteiramente dedicada a explicar tal comportamento é condição fundamental para explicar os resultados obtidos.

## 6. CONCLUSÕES

**Com relação ao sistema FIA dedicado à análise simultânea de nitrato e nitrito, podemos concluir:**

O sistema foi bem sucedido, cumprido a função para a qual foi construído, sendo uma ferramenta importante em estudos limnológicos.

O colorímetro, com fotodiodo como detector e com a colocação de filtros foi uma opção viável ao espectrofotômetro, apresentando baixo custo de construção e portabilidade.

A cela de detecção foi um sucesso, eliminando quase totalmente o transtorno causado pelas bolhas durante as análises. Acredita-se que tal tipo de cela esteja sendo descrito pela primeira vez em sistemas FIA.

A área do pico provou ser uma alternativa viável à tradicional altura, como medida correlacionada com a concentração de analito. Um programa adequado para o computador pode fazer uso desse fato e melhorar essa medida.

As amostras do reservatório de Salto Grande foram analisadas com relativo sucesso, o que mostrou a viabilidade do sistema proposto

O sistema caracterizou-se mais pelo caráter prototípico e de improvisação do que pela operação em rotina, sendo esse um próximo passo a ser dado. Como sugestões de melhorias ficam : a melhora da porcentagem de redução do nitrato a nitrito; a melhora do sinal, com a aquisição de bombas peristálticas de qualidade superior, por exemplo, e, por último, uma adaptação mais eficiente do programa integrador de picos ao sistema FIA em questão.

A perspectiva mais promissora de aplicação do sistema desenvolvido parece ser a exploração da sua portabilidade e posterior uso no campo.

**Com relação ao bioensaio, podemos concluir que:**

O estudo, embora improvisado e realizado em condições diferentes daquelas nas quais ele foi realizado anteriormente, mostrou ser viável.

O estudo mostrou que as culturas não consumiram o nitrato adicionado, mesmo após muitos dias de experimento.

As explicações para o fato de que a cultura aparentemente não consumiu o nitrato, apesar de ter apresentado bom crescimento, parecem originar-se da técnica

usada no tratamento pré-bioensaio, que não considerou o estado nutricional das culturas.

Sujere-se que seja feito um novo bioensaio, totalmente voltado para o monitoramento do consumo do nitrato por culturas submetidas a tais tratamentos nutricionais. Em tal ensaio, não apenas o nitrato e o nitrito, mas também outras formas de nitrogênio devem ser monitoradas desde o início do preparo do experimento. O mesmo pode ser feito com outros nutrientes. O mesmo tipo de cuidado deve ser tomado na verificação da existência, ou não, de organismos contaminando as culturas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFNOR, 1980. *Norme Experimentale T 90-304. Essais des Eaux. Determination de L'inhibition de Scenedesmus subspicatus par une Substance.* Association française de Normalization.
- APHA, 1985. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 16<sup>th</sup> ed. American Public Health Association. Washington, DC.
- BALLS, P.W.; MACDONALD, A.; PUGH, K. & EDWARDS, A. C. 1995. Long Term Nutrient Enrichment of an Estuarine Sistem, Ythan, Scotland (1958-1993). *Environmental Polution*, 90(3): 311-321.
- BEEVERS, L. 1981. Nitrogen Metabolism in Plants. In: *Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur*. Bothe, H. & Trebst, A. (Eds.). Springer Verlag. Berlin. p.15-29.
- BERGAMIN F<sup>o</sup>, H; REIS, B.F. & ZAGATTO, E.A.G. 1978a. A New Device for Improving Sensitivity and Stabilization in Flow Injection Analysis. *Anal. Chim. Acta.*, 97: 145-157
- \_; MEDEIROS, J.X.; REIS, B.F. & ZAGATTO, E.A.G. 1978b. Solvent Extraction in Continuous Flow Injection Analysis. *Anal. Chim. Acta.*, 101: 9-16
- \_; ZAGATTO, E.A.G.; KRUG, F.J. & REIS, B.F. 1978c. Merging Zones in Flow Injection Analysis. Part 1. Double Proportional Injector and Reagent Consumption. *Anal. Chim. Acta.*, 101: 17-23
- BERMUDEZ, B.; RÍOS, A.; LUQUE DE CASTRO, M.D. & VALCÁRCEL, M. 1988. Configuration With Internally Coupled Valves to Overcome Shortcomings in The Simultaneous Determination of Nitrite and Nitrate by Flow Injection Analysis. *Talanta*, 35(10): 810-812.
- BONETTO, C.; DE CABO, L.; GABELLONE, N.; VINOCUR, A.; DONADELLI, J. & UNREIN, F. 1994. Nutrient Dynamics in the Deltaic Floodplain of the Lower Parana River. *Arch. Hydrobiol.*, 131(3): 277-295.

- BRUSCH, W. & NILSSON, B. 1993. Nitrate Transformation and Water Movement in a Wetland Area. *Hydrobiologia*, 251: 103-111.
- CALIJURI, M. C. & TUNDISI, J.G. 1990. Limnologia Comparada das Represas do Lobo (Broa) e Barra Bonita - Estado de São Paulo. Mecanismos de Funcionamento e Bases para o Gerenciamento. *Rev. Bras. Biol.*, 50(4): 893-913.
- CHAMIXAES, C.B.C.B. 1991. *Variação Temporal e Espacial da Biomassa, Composição de Espécies e Produtividade das Algas Perifíticas Relacionadas com as Condições Ambientais de Pequenos Rios da Bacia Hidrográfica do Ribeirão do Lobo (Itirapina-São Paulo)*. Tese de Doutoramendo. SHS/EESC/USP. São Carlos. 334p.
- CLINCH, J.R., & WORSFOLD, P.J. 1987. An Automated Spectrophotometric Field Monitor for Water Quality Parameters. Determination of Nitrate. *Anal. Chim. Acta.*, 200: 523-531.
- DANIEL, A.; BIROT, D.; LEHAITRE, M. & PONCIN, J. 1995. Characterization and Reduction of Interferences in Flow Injection Analysis for the *in situ* Determination of Nitrate and Nitrite in Sea Water. *Anal. Chim. Acta.*, 308: 413-424.
- DOWNING, J.A. & McCAULEY, E. 1992. The Nitrogen: Phosphorus Relationship in Lakes. *Limnol. Oceanogr.*, 37(5): 936-945.
- FAIZULLAH, A.T. & TOWNSHEND, A. 1986. Applications of Ion-Exchange Minicolumns in a Flow Injection System for the Spectrophotometric Determination of Anions. *Anal. Chim. Acta.*, 179: 233-244.
- GARCÍA, I.L.; VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; CÓRDOBA, M.H. 1995. Use of Submicroliter- Volume Sample for Extending the Dynamic Range of Flow-Injection Flame Absorption Spectrometry. *Anal. Chim. Acta.*, 308: 85-95.
- GINÉ, M.F. 1979. *Determinação Espectrofotométrica Simultânea de Nitrato e Nitrito em Águas e Solo por Injeção em Fluxo Contínuo*. Dissertação de Mestrado. CENA/ESALQ/USP. Piracicaba. 70p.
- \_; BERGAMIN F°, H.; ZAGATTO, E.A.G. & REIS, B.F. 1980. Simultaneous Determination of Nitrate and Nitrite by Flow Injection Analysis. *Anal. Chim. Acta.*, 114:191-197
- \_; REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G., KRUG, F.J. & JACINTHO, A.O. 1983. A Simple Procedure for Standard Additions in Flow Injection Analysis. Spectrophotometric Determination of Nitrate in Plant Extracts. *Anal. Chim. Acta.*, 155: 131-138.
- \_; TUON, R.L.; KRUG, F.J. & ARRUDA, M.A.Z. 1992. Experimental Fluctuations of Flow- Injection Signals. *Anal. Chim. Acta.*, 261: 533-538.

- GOLDMAN, J.C. & GLIBERT, P.M. 1983. Kinetics of Inorganic Nitrogen Uptake by Phytoplankton. **In:** *Nitrogen in the Marine Environment*. Carpenter, E.J. & Capone, D.G. (Eds.). Academic Press. New York. p. 233-274.
- GOLTERMAN, H.L. 1995. The Labirinth of Nutrients Cycles and Buffers in Wetlands: Results Based on Research in the Camargue (Southern French). *Hydrobiologia*, 315: 39-58.
- GRASSHOFF, K.; EHRHARDT, M. & KREMLING, K. 1983. *Methods of Seawater Analysis*, 2<sup>nd</sup> ed. Verlag Chemie. Wienhein. 419 p.
- HELMER, C. & LABROUE, L. 1993. Denitrification in Gravel Pit Lakes. *Hydrobiologia*, 252: 35-44.
- HENRY, R. 1981. *Efeitos da Eutroficação Artificial por Nutrientes Inorgânicos na Comunidade Fitoplanctônica da Represa do Lobo, Brotas-Itirapina, SP e no Lago D. Helvécio, Parque Florestal do Rio Doce, MG*. Tese de Dourorado. UFSCAR. São Carlos. 172 p.
- HILL, A.R. 1988. Factors Influencing Nitrate Depletion in a Rural Stream. *Hydrobiologia*, 160: 111-122.
- HULANICKI, A.; MATUSZEWSKI, W. & TROJANOWICZ, M. 1987. Flow-Injection Determination of Nitrite and Nitrate With Biamperometric Detection at Two Platinum Wire Electrodes. *Anal. Chim. Acta.*, 194: 119-127.
- IBAMA, 1988. *Manual de Testes para Avaliação de Ecotoxicidade de Agentes Químicos: Avaliação de Ecotoxicidade para Algas*. IBAMA. Brasília.
- JOHNSON, K.S. & PETTY, R.L. 1983. Determination of Nitrate and Nitrite in Seawater by Flow Injection Analysis. *Limnol. Ocenogr.*, 28(6): 1260-1266.
- KENNEDY, R.H. & WALKER, W.W. 1990. Reservoir Nutrient Dynamics. **In:** *Reservoir Limnology: Ecological Perspectives*. Thornton, K.W. et. al. (eds.). Wiley-Interscience. New York. 109-131.
- KUCHLER, I.L. & MELLO, A.R. 1996. Programa Integrador de Picos Para Análise Multielementar por Espectrometria de Emissão Atômica em Plasma (ICP) com Técnicas de Injeção Discreta. *Química Nova*, 19(1): 82-85.
- MADSEN, B.C. 1981. Utilization of Flow Injection With Hydrazine Reduction and Photometric Detection for the Determination of Nitrate in Rain-Water. *Anal. Chim. Acta.*, 124: 437-441.
- MARTINEZ, R. 1991. Transient Nutrient Uptake and Assimilation in *Skeletonema costatum* Cultures Subject to Nitrate Starvation Under Low Irradiance. *Journal of Plankton Research*, 13(3): 499-512.

- MARTINOVA, M.V. 1993. Nitrogen and Phosphor Compounds in Bottom Sediments: Mechanisms of Accumulation, Transformation and Release. *Hydrobiologia*, 252: 1-22.
- MORAES, E.M. 1978. *Ciclo sazonal, Distribuição Vertical e Horizontal e Inter-Relações Ecológicas de Nutrientes na Represa do Lobo, Brotas-Itirapina, SP*. Dissertação de Mestrado. IB/USP. São Paulo. 153p.
- MORREL, J.M. & CORREDOR, J.E. 1993. Sediment Nitrogen Trapping in a Mangrove Lagoon. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.*, 37: 203-212.
- MOTOMIZU, S.; MIKASA, H. & TÔEI, K. 1987. Fluorimetric Determination of Nitrate in Natural Waters With 3-Amino-1,5- Naphtalenedisulphonic Acid in a Flow-Injection System. *Anal. Chim. Acta.*, 193: 343-347.
- \_\_\_\_ & SANADA, M. 1995. Photo-Induced reduction of Nitrate to Nitrite and its application to the Sensitive Determination of Nitrate in Natural Waters. *Anal. Chim. Acta.*, 308: 406-412.
- NUSH, E.A. 1980. Comparison of Different Methods for Chlorophyll and Phaeopigments. Determination. *Arch.Hydrobiol.Beih.Ergebn.Limnol.*, 14:14-36
- ODUM, E.P. 1895. *Ecologia*. Interamericana. Rio de Janeiro. 434p.
- OLIVEIRA, H.T. 1988. *Utilização de Vinhaça como Meio de Cultura para Chlorella vulgaris (CCAP-211/11b)*. Dissertação de Mestrado. UFSCAR. São Carlos. 145p.
- OLIVEIRA, M.D. 1993. *Produção Primária e Estrutura da Comunidade Fitoplânctônica no Reservatório do Lobo (SP): Uma Comparação Entre Fatores Ecológicos na Represa e seus Principais Tributários*. Dissertação de Mestrado. SHS/EESC/USP. São Carlos. 178p.
- OLSEN, K.R. & ANDERSEN, F.O. 1994. Nutrient Cycling in Shallow, Oligotrophic Lake Kvie, Denmark. *Hydrobiologia*, 275/276: 255-265.
- PAI, S.; YANG, C. & RILEY, J.P. 1990. Formation Kinetics of the Pink Azo Dye in the Determination of Nitrite in Natural Waters. *Anal. Chim. Acta.*, 232: 345-349.
- PREGO, R. 1994. Nitrogen Interchanges Generated by Biogeochemical Processes in a Galician Ria. *Mar. Chem.*, 45: 167-176.
- RAIMBAULT, P.; GENTILLHOMME, V. & SLAWIK, G. 1990. Short-Term Responses of 24 Hour N-Starved Cultures of *Phaeodactylum tricornutum* to Pulsed Additions of Nitrate at Nanomolar Levels. *Mar.Ecol.Prog.Ser.*, 63: 47-52.
- REIS, B.F. & BERGAMIN Fº, H. 1993. Evolução dos Injetores Empregados em Sistemas de Análise Química por Injeção em Fluxo. *Química Nova*, 16(6): 570-573.

- REYNOLDS, B.; ORMEROD, S.J. & GEE, A.S. 1994. Spatial Patterns in Stream Nitrate Concentrations in Upland Wales in Relation to Catchment Forest Cover and Forest Age. *Environmental Pollution*, 84: 27-33..
- RUZICKA, J. & HANSEN, E.H. 1975. Flow Injection Analysis. Part I. A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis. *Anal. Chim. Acta.*, 78:145-157.
- \_\_\_\_\_. 1988. *Flow Injection Analysis*, 2<sup>nd</sup> ed. Chemical Analysis, 62. John Willey & Sons. 498p.
- SANTOS, J.E. 1981. *Fixação de Nitrogênio em Rizosfera de Macrófitas Aquáticas*. Tese de Doutorado. UFSCAR. São Carlos. 188p.
- SCHLEGEL, H.G. 1981. Microorganisms Involved in the Nitrogen and Sulphur Cycles. In: *Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur*. Bothe, H. & Trebst, A. (Eds.). Springer Verlag. Berlin. p.15-29.
- SCIANDRA, A. 1991. Coupling and Uncoupling Between Nitrate Uptake and Growth Rate in *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) under Different Frequencies of Pulsed Nitrate Supply. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 72: 261-269
- SKEGGS, L.T. 1957. Automatic Method for Colorimetric Analysis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 38: 311-322.
- SPERLING, M.; KOSCIELNIAK, P. & WELZ, B. 1992. Improvement of Detection Limits for Flow-Injection Flame Atomic Absorption Spectrometry by Dedicated Signal Processing. *Anal. Chim. Acta*, 261: 115-123.
- STEIN, J. (Ed.) 1973. *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press. U.K. 447p.
- STEVENS, P.A.; WILLIAMS, T.G.; NORRIS, D.A. & ROWLAND, A.P. 1993. Dissolved Inorganic Nitrogen Budget for a forested Catchment at Beddgelert, North Wales. *Environmental Pollution*, 80: 1-8.
- STEWART, J.W.B. & RUZICKA, J. 1976. Flow Injection Analysis. Part V. Simultaneous Determination of Nitrogen and Phosphorus in Acid Digests of Plant Material With a Single Spectrophotometer. *Anal. Chim. Acta.*, 82: 137-144.
- STEWART, W.D.P.; PRESTON, T.; RAI, A.N. & ROWELL, P. 1983 Nitrogen Cycling. In: *Nitrogen as an Ecological Factor*. Lee, J.A.; McNeill, S. & Rorison, I.H. (Eds.). Blackwell Scientific Publications. Oxford. p. 1-27.
- STRICKLAND, J.D.H. & PARSONS, T.R. 1972. a Practical Handbook of Seawater Analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.*, 2nd ed., 122: 1-72.

- SZOSTEK, B. & TROJANOWICZ, M. 1992. Real -Time Digital Filters for Signal Processing in Flow-Injection Analysis. Part 1. General Considerations and Simulation Study. *Anal. Chim. Acta.*, 261: 509-519.
- TAKEDA, K. & FUJIWARA, K. 1993. Determination of Nitrate in Natural Waters With the Photo-Induced Conversion of Nitrate to Nitrite. *Anal. Chim. Acta.*, 276: 25-32.
- THORNTON, K.W. 1990. Perspectives on Reservoir Limnology In: *Reservoir Limnology: Ecological Perspectives*. Thornton, K.W. et. al. (eds.). Wiley-Interscience. New York. 1-13.
- TRINDADE, M. 1980. *Nutrientes em Sedimentos da Represa do Lobo (Brotas-Itirapina, SP)*. Dissertação de Mestrado. UFSCAR. 220 p.
- TROJANOWICZ, M. MATUSZEWSKI, W. & SZOTEK, B. 1992. Simultaneous Determination of Nitrite and Nitrate in Water Using Flow Injection Biamperometry. *Anal. Chim. Acta.*, 261: 391-398.
- \_\_\_\_ & SZOTEK, B. 1992.. Real -Time Digital Filters for Signal Processing in Flow-Injection Analysis. Part 2. Practical Applications. *Anal. Chim. Acta.*, 261: 521-531.
- TUNDISI, J.G. 1977 *Produção Primária, "Standing-Stock", Fracionamento do Fitoplâncton e Fatores Ecológicos em Ecossistema Lacustre Artificial (Represa do Broa, S.Carlos)*. Tese de Livre Docência. FFCL/USP. Ribeirão Preto. 409p.
- \_\_\_\_ 1986. The Lobo (Broa) Ecosystem. *Ciencia Interamericana*, 25(1-4): 18-31.
- \_\_\_\_; TUNDISI, T.M.; ROCHA, O.; GENTIL, J.G. & NAKAMOTO, N. 1977. Primary Production, Standing Stock of Phitoplankton and Ecological Factors in a Shallow Tropical Reservoir (Represa do Broa, São Carlos, Brasil). *Sem. Medio Ambiente y Represas*. Montevideo. 139-172.
- VAN STADEN, J.F. 1982. Automated Simultaneous Determination of Nitrate and Nitrite by Pre-Valve Reduction of Nitrate in a Flow-Injection System. *Anal. Chim. Acta.*, 138: 403-408.
- TURPIN, D.H. 1988. Physiological Mechanisms in Phytoplankton Resource Competition. In: *Growth and Reproductive Strategies of Freshwater Phytoplankton*. Sandgren, C.D. (Ed.). Cambridge University Press. p. 316-368.
- WETZEL, R.G. 1981. *Limnologia*. Ômega. Barcelona. 169-194.
- WHEELER, P.A . 1983. Phytoplankton Nitrogen Metabolism. In: *Nitrogen in the Marine Environment*. Carpenter, E.J. & Capone, D.G. (Eds.). Academic Press. New York. p. 233-274.

WHITAKER, V.A. 1993. *A Área Alagada da Represa do Lobo (Itirapina, SP)-Os Processos Ecológicos Associados ao Potencial de Desnitrificação dos Sedimentos*. Tese de Doutorado. SHS/EESC/USP. São Carlos. 137p.

ZUTHER, F.; ROSS, B. & CAMMANN, K. 1995. Differential Flow-Injection Potentiometry With Double Sensitivity using One Ion-Selective Membrane. *Anal. Chim. Acta.*, 313: 83-87.