

MÉTODO DO INDOFENOL PARA DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO EM AMOSTRAS DE SOLO

Fernanda Veronesi Marinho Pontes

Bolsista de Inic. Científica, Química Tecnóloga, UFRJ

Maria Inês Couto Monteiro

Orientadora, Química Analítica, D. Sc.

Lílian Irene Dias da Silva

Co-orientadora, Físico-Química, M. Sc.

Manuel Castro Carneiro

Co-orientador, Química Analítica, D. Sc.

RESUMO

Foi utilizado o método Kjeldahl/indofenol para determinação de N_{total} em três materiais de referência certificados de solo, NCS DC 73319, 73321 e 73326. O método do indofenol para a determinação de NH_4^+ se baseia na formação de um composto azul intenso, resultante da reação do íon amônio com um composto fenólico na presença de um oxidante e um catalisador. O método geralmente apresenta valores altos e variáveis de branco. Portanto, foi proposta a utilização de um banho termostatzado, contendo água Milli-Q, para estabilizar a temperatura do condensador e fornecer água isenta de contaminação para a caldeira do

destilador. A melhoria experimental diminuiu os valores de branco em cerca de 73%, reduzindo consequentemente o limite de detecção (65%). O conhecimento da estabilidade do indofenol torna o método flexível, particularmente quando um grande número de amostras deve ser analisado. A solução de nitroprussiato-fenol apresentou estabilidade de até pelo menos 29 dias, reduzindo o tempo de trabalho e o consumo dos reagentes. Os resultados mostraram boa precisão ($RSD \leq 8\%$) e não apresentaram diferença significativa dos valores certificados de N_{total} , quando aplicado o teste t-pareado, para um nível de confiança de 95%.

1. INTRODUÇÃO

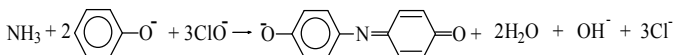
A determinação de nitrogênio total (N_{total}) em solos e outros materiais heterogêneos complexos contendo várias formas de nitrogênio apresenta muitas dificuldades, sendo maiores com solos, devido ao desconhecimento

das formas de nitrogênio presentes na amostra. A concentração de N_{total} em solos varia de $< 0,02\%$ em sub-solos a $> 2,5\%$ em turfas (BREMNER 1965).

O método Kjeldahl tem sido utilizado desde 1883 para a determinação de N_{total} em diferentes materiais (YASUHARA e NOKIHARA 2001). É baseado na conversão do N a íon amônio (NH_4^+) por digestão da amostra com ácido sulfúrico concentrado, contendo catalisadores que aceleram a oxidação da matéria orgânica. O NH_4^+ é então convertido, em meio básico, a NH_3 , que é recolhida em meio ácido, e transformada em NH_4^+ (BREMNER 1965).

O íon NH_4^+ tem sido determinado por diferentes métodos, sendo que os mais utilizados são os métodos espectrofotométricos: método do indofenol (reação de Berthelot), procedimento de difusão de gás/indicador ácido-base e do reagente de Nessler. O método colorimétrico de Berthelot, geralmente apresenta valores altos e variáveis de branco, e na faixa de concentração micromolar, a precisão é raramente melhor que cerca de 10% (PATTON e CROUCH 1977). Outros métodos também utilizados são a titrimetria e eletrodo íon seletivo (VAN STADEN e TALJAARD 1997). Para análise de solos é geralmente utilizado o método titrimétrico (BREMNER 1965, EMBRAPA 1999).

O método do indofenol para a determinação de NH_4^+ se baseia na formação do composto azul intenso de indofenol, resultante da reação do íon amônio com compostos fenólicos na presença de um agente oxidante. Os reagentes oxidantes utilizados foram: hipoclorito (SCHEINER 1976, VERDOUW et al. 1977, VAN STADEN e TALJAARD 1997, KEMPERS e KOK 1989) e dicloro isocianato de sódio (DCIC) (Mc LEOD 1992). Os compostos fenólicos utilizados foram: fenol (SCHEINER 1976, VAN STADEN e TALJAARD 1997), o-fenilfenol (KANDA 1995) e o salicilato (VERDOUW et al. 1977, KEMPERS e KOK 1989, Mc LEOD 1992). Foram utilizados diferentes catalisadores, principalmente o nitroprussiato de sódio (SCHEINER 1976, VERDOUW et al. 1977, KEMPERS e KOK 1989, KANDA 1995, STANDARD METHODS 1998) e o ferrocianeto de potássio (VERDOUW et al. 1977). Apesar do mecanismo da reação não ser conhecido em detalhes, geralmente a reação pode ser assim representada, quando são utilizados o fenol e o hipoclorito (SCHEINER 1976, VERDOUW et al. 1977):



Foi observado que o mecanismo da reação de formação do indofenol é dependente da luz, temperatura, catalisador e pH. Foram obtidos bons resultados, quando o método foi aplicado à análise de águas, utilizando luz UV durante o desenvolvimento da cor, na presença do catalisador ferrocianeto de potássio. Contudo, alguns pesquisadores observaram que o desenvolvimento da reação no escuro elimina as interferências induzidas pela luz, utilizando nitroprussiato como catalisador. Alguns autores preferiram a utilização de ferrocianeto de potássio a nitroprussiato de sódio, devido à maior estabilidade da cor, tanto na luz quanto no escuro. O aumento da temperatura afetou a velocidade de formação do indofenol, mas não influenciou o comprimento de onda de máxima absorção (VERDOUW et al. 1977).

O método do indofenol, utilizando a solução de nitroprussiato-fenol tem sido estudado e aplicado para análise de águas de superfície e subterrânea (FEEMA 1983), águas (VAN STADEN e TALJAARD 1997), águas doces (VERDOUW et al. 1977, SCHEINER 1976), águas de despejo (SCHEINER 1976), efluentes industriais (VAN STADEN e TALJAARD 1997, FEEMA 1983) e água do mar (KANDA 1995). Para análise de solos e plantas foi empregado o método do indofenol, utilizando nitroprussiato-salicilato e como oxidante, DCIC (Mc LEOD 1992), sendo que a faixa de detecção foi de 5 -100 mg L⁻¹N-NH₄⁺. Na literatura não foi encontrada aplicação do método do indofenol, utilizando nitroprussiato-fenol e o agente oxidante hipoclorito, para análise de solos.

Para maior exatidão do método do indofenol, são recomendados alguns procedimentos, quais sejam: a) todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente; (b) as soluções-amostra devem ser protegidas da luz, caso as absorvâncias sejam lidas no dia seguinte ao do desenvolvimento da cor; (c) estocar o reagente nitroprussiato-fenol em um frasco de vidro âmbar e refrigerado, devido ao escurecimento do reagente com o tempo, especialmente quando é exposto diretamente à luz solar; (d) preparar o reagente nitroprussiato-fenol a cada 3 semanas e (e) testar, antes do uso, o reagente nitroprussiato-fenol, preparado há 2 semanas, com pelo menos um padrão (SCHEINER 1976).

2. OBJETIVO

O trabalho é uma continuação daquele apresentado por Ferreira et al. (2004), e teve como objetivo implementar e otimizar o método do indofenol, utilizando nitroprussiato-fenol e hipoclorito de sódio, para a determinação de nitrogênio Kjeldahl total em amostras de referência certificadas de solo. Foi proposta uma modificação para diminuir os valores do branco e do limite de detecção do método. As estabilidades do reagente nitroprussiato-fenol e da cor do indofenol foram estudadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. INSTRUMENTAL

Para a digestão das amostras foi utilizado um bloco igestor TE-008/25 com capacidade para 8 provas micro, fornecido pela Tecnal (Piracicaba-SP, Brasil). Foi construído um sistema de vidro pyrex e utilizado vácuo para sucção do SO_3 , produzido durante a digestão das amostras.

Para a destilação da amônia foi utilizado um destilador modelo TE 036/1 Tecnal. Um banho ultratermostato Nova Ética, contendo água Milli-Q foi acoplado ao destilador.

Foi utilizado um espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 12/1.0 nm (1.3) UV-Vis, celas de 1 cm de caminho óptico, para medidas de absorvância no comprimento de onda de 630 nm, para as determinações da espécie N-NH_4^+ .

3.2. REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS

Todas as soluções foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico (P.A.). Água destilada e deionizada foi purificada em um sistema Milli-Q. Foram utilizados ácido sulfúrico e hidróxido de sódio, fornecidos pela Vetec Química Fina Ltda.; sulfato de cobre, sulfato de potássio, cloreto de amônio, fenol e nitroprussiato de sódio fornecidos pela Merck; hipoclorito de sódio da Isofar. Foram utilizados três materiais de referência certificados de solo, NCS DC 73319, 73321 e 73326. Foram preparadas as seguintes soluções padrão para a construção da curva analítica:

Solução - padrão estoque de amônio $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$: dissolveram-se 0,382 g de NH_4Cl anidro, previamente seco a 100°C , em água e diluiu-se para 1000 mL.

Solução - padrão intermediária de amônio $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$: foram pipetados 5 mL da solução estoque de amônia e diluídos para 50 mL com água em balão volumétrico. A solução foi utilizada logo após o seu preparo.

Soluções - padrão de amônio $0,1$ a $0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$: foram preparadas soluções - padrão com concentrações finais de N na faixa e $0,1$ a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,036 \text{ mmol L}^{-1}$, diluindo-se adequadamente o padrão intermediário. Quando as soluções - padrão foram submetidas às etapas de digestão e destilação, foram utilizadas massas iniciais de NH_4Cl contendo 5 a $25 \mu\text{g N}$. As soluções foram usadas logo após a sua preparação.

Na etapa de digestão foram utilizadas as seguintes misturas:

Mistura de digestão: sulfato de potássio e sulfato de cobre foram misturados na proporção de 3:1 (em massa) e triturados num gral de ágata.

Mistura ácida digestora: a solução foi preparada misturando-se 10 g da mistura de digestão, 100 mL de água e 100 mL de H_2SO_4 concentrado.

Para a etapa de destilação foram utilizadas as seguintes soluções:

Solução de hidróxido de sódio 10 mol L^{-1} : foram pesados 400 g de NaOH e dissolvidos em água. A solução foi avolumada com água a 1000 mL.

Solução de ácido sulfúrico $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$: adicionaram-se 25 mL de H_2SO_4 concentrado em cerca de 500 mL de água. Após arrefecimento da solução à temperatura ambiente, avolumou-se com água para 1000 mL. Pipetaram-se 2 mL desta solução e diluiu-se novamente com água para 1000 mL.

Para a reação colorimétrica foram utilizadas as seguintes soluções:

Solução de fenol e nitroprussiato de sódio - foram pesados 5 g de fenol e 0,025 g de nitroprussiato de sódio, dissolvidos em água e misturados. O volume da solução foi completado com água a 100 mL.

Solução de hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio - foram dissolvidos 2,5 g de NaOH em um pouco de água e misturados com uma solução de hipoclorito de sódio contendo aproximadamente 0,21% de cloro ativo. A solução foi avolumada para 100 mL com água. Todo o material de vidro foi mantido em solução de Detertec (Vetec), faixa neutra, 5%v/v por 24h, e em seguida, em solução de H_2SO_4 10%v/v por 24 h. O material foi então lavado várias vezes com água deionizada.

3.1 PROCEDIMENTO

O procedimento de digestão, destilação e determinação espectrofotométrica do NH_4^+ pelo método do indofenol foi idêntico àquele utilizado por Ferreira et al.(2004).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabilidade do reagente de nitroprussiato-fenol

Foi estudada a estabilidade do reagente nitroprussiato-fenol através da preparação diária do complexo de indofenol em soluções-padrão de NH_4Cl em H_2SO_4 $0,036 \text{ mmol L}^{-1}$, contendo $0,1, 0,3$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de N-NH_4^+ , de acordo com o procedimento descrito por Ferreira et al.(2004). O reagente nitroprussiato-fenol foi estocado em recipiente de vidro, recoberto com papel de alumínio, para evitar a incidência da luz, e mantido em refrigerador (4°C). O reagente foi utilizado após arrefecimento à temperatura ambiente. Todos os dados são estatisticamente equivalentes de acordo com os resultados do teste t-pareado para um nível de confiança de 95%. Não há diferença significativa entre os cinco primeiros e os cinco últimos resultados em todas as concentrações estudadas, indicando que o reagente permaneceu estável até pelo menos 29 dias.(Figura 1).

4.1 Estabilidade da cor do composto de indofenol em diferentes concentrações de N-NH_4^+

O composto de indofenol foi desenvolvido em soluções-padrão de NH_4Cl em H_2SO_4 $0,036 \text{ mmol L}^{-1}$, contendo $0,1, 0,3$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de N-NH_4^+ , de acordo com o procedimento descrito por Ferreira et al.(2004). As medidas de absorvância das soluções foram subtraídas do branco. As soluções coloridas foram mantidas em balões volumétricos de vidro transparente e à temperatura de cerca de 4°C , em refrigerador. As soluções foram arrefecidas à temperatura ambiente antes das medidas de absorvância. A Figura 2 apresenta o efeito do tempo na estabilidade do complexo do indofenol. Recuperações de 100% foram consideradas para as medidas realizadas após 30 min do desenvolvimento da cor. A cor foi considerada estável para recuperações $\geq 90\%$. Considerando os resultados do teste t-pareado($P=0,05$), as soluções permaneceram estáveis até 8 dias, com exceção da solução mais concentrada, que se manteve estável por apenas 48 horas.

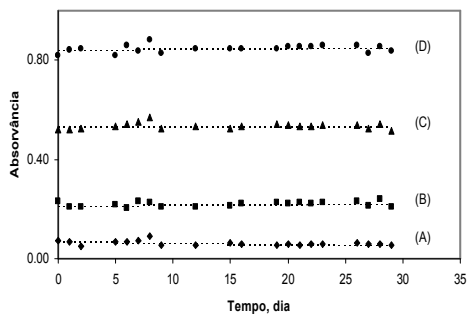


Figura 1. Estabilidade do reagente nitroprussiato-fenol, utilizado na determinação de $N-NH_4^+$ pelo método do indofenol. (A) branco; (B) 0,1 mg L⁻¹ N-NH₄⁺; (C) 0,3 mg L⁻¹ N-NH₄⁺; (D) 0,5 mg L⁻¹ N-NH₄⁺. Cada ponto corresponde a uma determinação.

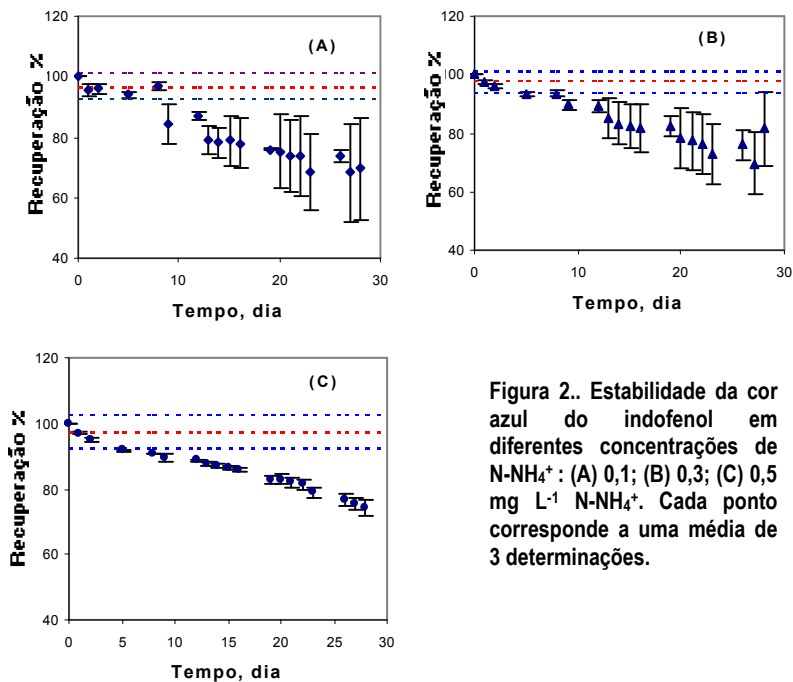


Figura 2.. Estabilidade da cor azul do indofenol em diferentes concentrações de $N-NH_4^+$: (A) 0,1; (B) 0,3; (C) 0,5 mg L⁻¹ N-NH₄⁺. Cada ponto corresponde a uma média de 3 determinações.

4.2. Resultados analíticos

Soluções padrão de NH_4Cl foram submetidas às etapas de digestão, destilação e determinação pelo método do indofenol para determinação das características analíticas do método (Tabela 1). Durante o estudo foram observados valores altos de branco (absorvância de $0,112 \pm 0,008$). Sendo assim, foi proposta a utilização de um banho termostaticado contendo água milli-Q com a finalidade de: (a) estabilizar a temperatura do condensador do destilador, garantindo a condensação total da amônia, e (b) fornecer água para caldeira, isenta de contaminação, para a diminuição do branco. Os valores do branco e do limite de detecção foram diminuídos em cerca de 73 e 65 %, respectivamente, e foi verificada a obediência à lei de Beer na faixa de concentração testadas de 0,1 a 0,5 mg L^{-1} de N-NH_4^+ ($R^2 = 0,9974 \pm 0,0009$)

As concentrações de nitrogênio Kjeldahl total (NKT), com os desvios-padrão, das amostras certificadas de solo são apresentadas na Tabela 2. Todos os resultados de NKT não apresentam diferença significativa dos valores certificados de nitrogênio total, validando o método. O método também apresenta boa precisão ($\text{RSD} \leq 8\%$).

Tabela 1. Características analíticas do método do indofenol

Absortividade molar (L.mol.cm^{-1}) (n=4)	$(2,3 \pm 0,2) \times 10^4$
Coefficiente de correlação (R^2) (n=3)	$0,9974 \pm 0,0009$
Limite de detecção (mg L^{-1} N-NH_4^+) sem banho termostaticado	0,089
Limite de detecção (mg L^{-1} N-NH_4^+) com banho termostaticado	0,031
Faixa de concentração da curva de calibração(mg L^{-1} N-NH_4^+)	0,1 - 0,5
Medida de absorvância do branco (n=10) sem banho termostaticado	$0,112 \pm 0,008$
Medida de absorvância do branco (n=10) com banho termostaticado	$0,030 \pm 0,006$

Tabela 2. Resultados da determinação de NKT em amostras certificadas de solos pelo método do indofenol

Amostra	NKT ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor certificado de N_{total} ($\mu\text{g g}^{-1}$)
73319	1846 \pm 17 (3)	1870 \pm 54
73321	626 \pm 21 (4)	640 \pm 40
73326	400 \pm 32 (8)	370 \pm 43

Entre parênteses, o número de determinações

5. CONCLUSÕES

- A utilização de um banho termostatzado, contendo água Milli-Q para alimentar a caldeira do destilador para o arraste da amônia diminuiu os valores de branco e do limite de detecção em cerca de 73 e 65 %, respectivamente.
- As soluções-padrão contendo o composto indofenol em concentrações de 0,1 e 0,3 mg L⁻¹ de N-NH₄⁺ podem ser estocadas, a 4 °C, por 8 dias, permitindo flexibilizar o procedimento, particularmente quando é analisado um grande número de amostras. Já a solução-padrão de 0,5 mg L⁻¹ N-NH₄⁺ pode ser estocada por apenas 48 horas. O reagente nitroprussiato-fenol pode ser estocado em frasco escuro a 4 °C por pelo menos 30 dias, sem perda de sensibilidade analítica.
- Todos os resultados de NKT não apresentam diferença significativa dos valores certificados de N_{total} , validando o método.
- O método apresentou boa precisão (RSD \leq 8%).

BIBLIOGRAFIA

Bremner J.M.(1965) Total Nitrogen. Methods of soil analysis Part 2- Chemical and Microbiological Properties, number 9 in the series Agronomy, American Society of Agronomy, Inc., Publisher USA, p. 1149-1178.

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (1999). Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes, Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, Brasília, Brasil, 370 p.

FEEMA – Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente (1983) Nitrogênio Kjeldahl total (micro Kjeldahl). Manual do Meio Ambiente Volume II – Métodos FEEMA, R.J., Brasil, MF 421.R2, p.45.

Ferreira F.N., (2004). Determinação de Nitrogênio Total em Amostras de Rocha Petrolífera pelo Método Kjeldahl/Indofenol. Jornada de Iniciação Científica, CETEM/RJ.

Kanda J. (1995). Determination of ammonium in seawater based on the indophenol reaction with o-phenylphenol (OPPS). Water Research, 29, 2746-2750.

Kempers A.J. and Kok C.J. (1989). Re-examination of the determination of ammonium as the indophenol blue complex using salicylate. Analytica Chimica Acta, 221, 147-155.

McLeod S. (1992). Determination of total soil and plant nitrogen using a micro-distillation unit in a continuous flow analyzer. Analytica Chimica Acta, 266, 113-117.

Patton C.J. and Crouch S.R. (1977). Spectrophotometer and Kinetics Investigation of the Berthelot Reaction for the Determination of Ammonia. Analytical Chemistry, 49, 464-469.

Scheiner D. (1976). Determination of ammonia and Kjeldahl nitrogen by indophenol method. Water Research, 10, 31-36.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998) Nitrogen, 20th Ed., American Public Health Association, Washington, p. 4-99, 4-124.

Van Standen J.F., Taljaard R.E. (1997). Determination of ammonia in water and industrial effluent streams with the indophenol blue method using sequential injection analysis. Analytica Chimica Acta, 344, 281-289.

Verdouw H., van Echteld C.J.A., Dekkers E.M.J. (1977). Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. Water Research, 12, 399-402.

Yasuhara T., Nokihara K. (2001). High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. Journal of agricultural and food chemistry, 49, 4581-4583.