

## AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO POR CROMATOGRAFIA IÔNICA (IC) E POR TEOR DE NITROGÊNIO TOTAL (TN) POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA

Lucélia Hoehne\*, Fábio dos Santos, Simone Stülp, Julia Spellmeyer Tischer, Fernando Afonso Schneider

Centro Universitário Univates, CEP 9590-000, Lajeado, Brasil

\*E-mail: [luceliah@univates.br](mailto:luceliah@univates.br)

Recebido em: 16/06/2015

Aceito em: 15/09/2015

### Resumo:

A determinação de nitrogênio pode ser feita por diferentes técnicas, tais como Kjeldahl, Nitrogênio Total (NT) por quimioluminescência, cromatografia iônica (IC), entre outras. A determinação do nitrogênio total proposta por Kjeldahl em 1883, ainda é muito usada por ser uma técnica confiável, porém, tem a desvantagem de gerar resíduos e ter o tempo de análise elevado. Desse modo, outras técnicas recentes podem ser usadas para determinar o nitrogênio, reduzindo os resíduos e tempo de análise. A luminescência é o fenômeno caracterizado pela emissão de luz de uma molécula que estava no seu estado excitado. A quimioluminescência é amplamente utilizada para determinar a concentração dos óxidos de nitrogênio nos gases de combustão. Já a cromatografia iônica é uma variante da cromatografia líquida que utiliza resinas de troca iônica para separar íons atômicos ou moleculares com base na sua interação com a resina. Dessa forma, este trabalho tem o objetivo de comparar as técnicas de IC e de quimioluminescência para a determinação de nitrogênio em amostras aquosas. Para isso, foram feitos padrões de nitrogênio e as amostras foram avaliadas nas duas técnicas. Verificou-se o tempo de análise, bem como o preparo da amostra. Também foi verificada a linearidade da curva em cada técnica. Como resultado, foi visto que ambas apresentaram dados satisfatórios e resultados semelhantes.

**Palavras-chave:** cromatografia iônica, quimioluminescência, nitrogênio.

### Introdução

O nitrogênio é um elemento químico essencial para a existência de vida na Terra, já que é componente de todos os aminoácidos do nosso corpo, além das bases nitrogenadas (que constituem as moléculas de ácido desoxirribonucleico e ácido ribonucleico DNA e RNA). Aproximadamente 78% do ar que se respira, é composto pelo nitrogênio da atmosfera ( $N_2$ ), que é seu maior reservatório. Para que o  $N_2$  atmosférico atinja o solo, entrando no ecossistema, ele deve passar por um processo chamado fixação, que é realizado por pequenos grupos de bactérias nitrificantes, que retiram o nitrogênio na forma de  $N_2$  e o incorporam em suas moléculas orgânicas. Quando a fixação é realizada por organismos vivos, como as bactérias, ela é chamada de fixação biológica, ou biofixação. [1] Atualmente, também se pode fazer uso de fertilizantes comerciais para a fixação de nitrogênio, caracterizando a fixação industrial, método muito utilizado na agricultura. Além destas, há também a fixação física, que é realizada por raios e faíscas elétricas, através dos quais o nitrogênio é oxidado e carregado para o solo através das chuvas, mas tal método possui uma capacidade reduzida de fixação de nitrogênio, que não é suficiente para que os organismos e a vida na Terra se mantenham. Outra questão a ser considerada é o fato de que o nitrogênio pode também ser prejudicial às plantas quando presente em quantidades que vão além de suas capacidades de assimilação. Assim, um excesso de nitrogênio fixado no solo pode limitar o crescimento da planta, prejudicando culturas. Dessa forma, a relação

carbono/nitrogênio também deve ser considerada em processos de compostagem, para que sempre se mantenham ativos os metabolismos das colônias de micro-organismos envolvidos no processo de decomposição. [2-4]

A determinação do nitrogênio total proposta por Kjeldahl em 1883, ainda é muito usada por ser uma técnica confiável, com rotinas bem estabelecidas e ao longo do tempo permaneceu praticamente a mesma com poucas modificações. Esta técnica possibilita a determinação indireta de proteínas em várias amostras biológicas, assim como o nitrogênio em plantas para a avaliação do estado nutricional. O método é baseado na decomposição da matéria orgânica através da digestão da amostra a  $400^\circ\text{C}$  com ácido sulfúrico concentrado, em presença de sulfato de cobre como catalisador que acelera a oxidação da matéria orgânica. O nitrogênio presente na solução ácida resultante é determinado por destilação por arraste de vapor, seguida de titulação com ácido diluído. [5]

A técnica de Kjeldahl apresenta como principal vantagem o uso de uma aparelhagem extremamente simples e pouco onerosa. O método clássico Kjeldahl é satisfatório para a análise de Ntotal para a maioria dos compostos nitrogenados que ocorrem nos solos e plantas. Entretanto, não apresenta resultados satisfatórios quando estão presentes compostos com ligações N-N e N-O. O método clássico Kjeldahl compreende duas etapas: (1) digestão da amostra para converter Norg. a íon amônio ( $N-NH_4^+$ ) e (2) determinação do  $N-NH_4^+$  no digerido, após destilação com álcali. O sulfato de amônio resultante da digestão é aquecido com uma base,

desprendendo amônia (NH<sub>3</sub>), e a reação pode ser representada pela equação:

$\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$ . A amônia é então recolhida em uma solução ácida, e a espécie N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> determinada por colorimetria, eletrodo íon seletivo ou titulação com solução padrão ácida. [6-7]

Existem outras técnicas para a determinação de nitrogênio, como a Luminescência, que é o fenômeno caracterizado pela emissão de luz de uma molécula que estava no seu estado excitado. Existem três tipos de luminescência que são utilizadas em análise de gases quais sejam: a fotoluminescência normalmente conhecida como fluorescência, a quimiluminescência e a fotometria de chama. A quimiluminescência é amplamente utilizada para determinar a concentração dos óxidos de nitrogênio nos gases de combustão. Este princípio aplicado à determinação do óxido de nitrogênio (NO) é baseado na reação do (NO) com o ozônio (O<sub>3</sub>) produzindo dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>) e oxigênio (O<sub>2</sub>). Uma parcela das moléculas de NO<sub>2</sub> produzidas está, inicialmente no estado eletronicamente excitado. Estas moléculas são imediatamente revertidas ao estado fundamental emitindo fótons. Esta emissão é detectada por um fotodetector, cuja intensidade é diretamente proporcional a concentração de NO na amostra. O método de quimiluminescência possui grande sensibilidade para a determinação de NOx porém, apresenta alguns problemas quanto à interferência de outros componentes na amostra. [8-10]

A técnica IC é aplicada na determinação de ânions enquanto os métodos de espectrometria atômica, comumente usados para a determinação de cátions, são raramente úteis para a determinação dos ânions eletronegativos do quinto ao sétimo grupo do sistema periódico. A cromatografia iônica é uma variante da cromatografia líquida que utiliza resinas de troca iônica para separar íons atômicos ou moleculares com base na sua interação com a resina. A separação dos analitos é conseguida de forma isocrática ou por aplicação de gradiente. A vantagem desta técnica prende-se com a simplificação da determinação de espécies iônicas em simultâneo cuja alternativa é mais complexa e demorada. É utilizada para a análise de íons inorgânicos em várias matrizes como águas residuais ou caldos de fermentação (ânions tais como cloreto, fluoreto, nitrito, nitrato e sulfato; cátions como lítio, cálcio, amônia, magnésio, potássio e sódio). O limite de detecção é da ordem de ppm podendo-se identificar analitos aniônicos na ordem de ppb. [11-13]

Assim, o principal objetivo do presente trabalho foi comparar cromatografia iônica (IC) e nitrogênio total (TN) por quimiluminescência para a determinação de nitrogênio em amostras líquidas, vislumbrando a técnica mais adequada.

## **Materiais e Métodos:**

### **Instrumentação**

Para as análises de N em pesticidas por IC, foi utilizado um cromatógrafo iônico (marca Metrohm, modelo COMPACT IC PRO 881). Foi usada uma pré-coluna (marca Metrohm, METROSEP A SUPP 4/5 GUARD/ 4.0) e uma

coluna de troca iônica (marca Metrohm METROSEP A SUPP 5-150/4.0). A fase móvel utilizada foi feita através de uma solução composta de 0,678g de bicarbonato e 0,168g de carbonato de sódio e aferida a 1 litro com água purificada.

Para estes testes, usou-se 20 µL de amostra e tempo de corrida de 18 minutos, de acordo com instruções do fabricante (METROHM). Os gráficos foram calculados através do software do equipamento MAGIC NET 2.3. Após a amostra ser eluída, o equipamento de IC possui uma solução regenerante composta de 5,4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aferida a 1 litro de água purificada sendo esta uma solução de limpeza a qual serve para remover os cátions retidos na coluna. [14-15]

Para as análises de N por nitrogênio total (TN) por quimiluminescência foi utilizado um determinador de nitrogênio total (Shimadzu, TNM-1 TOTAL NITROGEN MEASURING UNIT). Para as análises, foram necessários 50 µL de amostra por leitura, e o tempo de corrida no equipamento foram 10 minutos. Este equipamento foi programado para duas leituras com análise de coeficiente de variação (<2,0), sendo que se o valor extrapolar o estabelecido, automaticamente se faz mais uma leitura da amostra, conforme instruções do fornecedor (SHIMADZU). Os resultados foram feitos através do software TOC 5 SAMPLE TABLE. [16]

Toda a vidraria utilizada e outros materiais foram descontaminados por imersão em HNO<sub>3</sub> 10% (v/v) por 24 horas e, posteriormente, lavados com água purificada.

### **Reagentes**

Para o preparo das soluções de N, foi necessário o uso de KNO<sub>3</sub> P.A. (marca F. Maia lote: 37834) previamente seco em estufa (marca Biopar, modelo S330SD) por 24 horas. Para a solução estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup>, foram pesados 7,219 g do sal em balança analítica (marca BEL, modelo Mark 210A – Classe I) e aferidos a 1L em recipiente adequado.

A partir da solução estoque, efetuou-se a diluição para diferentes concentrações de N de 0,1 mg L<sup>-1</sup>, 0,20 mg L<sup>-1</sup>, 0,60 mg L<sup>-1</sup>, 1,00 mg L<sup>-1</sup>, 4,00 mg L<sup>-1</sup>, 8,00 mg L<sup>-1</sup>, 10,00 mg L<sup>-1</sup> para a construção das curvas analíticas nos dois equipamentos de IC e de NT por quimiluminescência. Cabe salientar que todos os resultados foram avaliados estatisticamente com o programa Instat® para posterior comparação da melhor técnica para a determinação de N em pesticidas. Dessa forma, tempo de preparo da amostra para a injeção nos equipamentos foi o mesmo.

### **Resultados e Discussão:**

Após preparo das soluções de N, construiu-se a curva de calibração no cromatógrafo iônico. A Tabela 1 demonstra os valores de N com suas respectivas médias e valores desvio padrão.

Pontos da curva	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Médias	Desvio padrão
(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )
0,1	0,185	0,154	0,136	0,1583	0,024785
0,2	0,244	0,26	0,254	0,2527	0,008082
0,6	0,6321	0,62	0,591	0,6144	0,021121
1	1,254	0,943	1,138	1,1117	0,157163
4	3,947	3,986	3,968	3,967	0,019519
8	7,846	8,221	8,034	8,0337	0,187500
10	9,895	10,183	10,13	10,0693	0,153285

Tabela 1 – Valores de N encontrados no IC e suas respectivas médias e valores de desvio padrão.

Como pode ser visto na Tabela 1, observou-se que os valores das triplicatas foram próximas, e houve uma linearidade entre os pontos da curva que podem ser melhor vistos no gráfico da Figura 1.

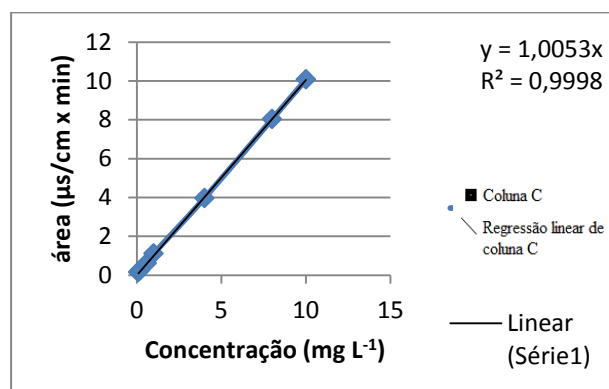


Figura 1 - Concentração versus Área de análises de IC.

Para a faixa de concentração do analito (de 0,05 a 10 mg L<sup>-1</sup> de N) apresentada na Figura 1 verificou-se boa correlação para os resultados de concentração versus área, obtendo-se o valor de R = 0,9998.

Para as amostras determinadas pela técnica de TN por quimioluminescência, foi feita a curva de calibração de N e os resultados estão apresentados na Tabela 2, juntamente com suas respectivas médias e valores de desvios padrões.

Pontos da curva	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Médias	Desvio padrão
(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )
0,1	0,125	0,114	0,106	0,115	0,009539
0,2	0,337	0,32	0,343	0,3333	0,011930
0,6	0,627	0,661	0,618	0,6353	0,022678
1	1,046	0,984	0,981	1,0037	0,036692
4	4,46	4,124	4,052	4,212	0,217770
8	8,962	7,269	6,415	7,5487	1,296326
10	11,63	9,077	9,458	10,055	1,377228

Tabela 2 – Valores encontrados no TN e suas respectivas médias e valores de desvio padrão.

Como pode ser visto na Tabela 2, observou-se que os valores das triplicatas foram próximas, e houve uma linearidade entre os pontos da curva que podem ser melhor vistos no gráfico da Figura 2.

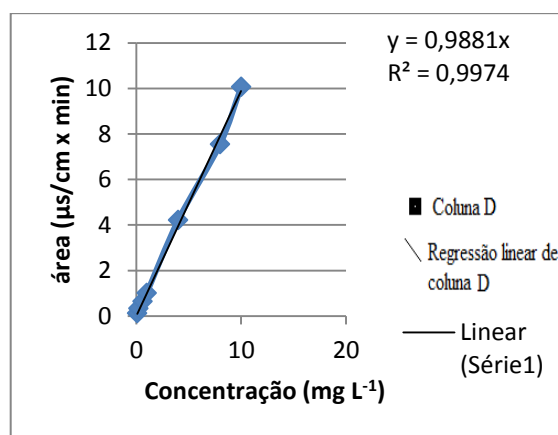


Figura 2 - Concentração versus Área de análises de TN.

Para a faixa de concentração do analito (de 0,1 a 10 mg L<sup>-1</sup> de N) determinado por NT apresentada na Figura 2 verificou-se boa correlação para os resultados de concentração versus área, sendo obtido o valor de R=0,9974.

## Conclusão:

Após o preparo dos padrões para a confecção das curvas, pode-se verificar que ambos os métodos de análise apresentaram boa linearidade nos resultados. Mesmo assim a IC obteve uma correlação ( $R^2$ ) um pouco melhor do que a quimiluminescência. Um fator que pode dificultar a análise na quimiluminescência é a presença de interferentes. No caso da IC, tem-se a necessidade de se fazer várias diluições do analito, para que se obtenha resultado dentro da faixa limite do equipamento. Dessa forma, o tempo de análise é relativamente maior em comparação com a quimiluminescência, pois há a necessidade de fazer a corrida cromatográfica, em torno de 20 a 30 minutos. Já na quimiluminescência, cada análise levou em torno de 3 a 5 minutos. Em comparação com outros trabalhos<sup>2,3</sup>, usando determinação de nitrogênio por Kjeldahl, o presente trabalho mostra que há possibilidade de determinar concentrações menores de nitrogênio, além de diminuir resíduos usando tanto a IC quanto a NT por quimiluminescência. Assim, a determinação de nitrogênio total é de suma importância, pois a presença do mesmo em excesso pode limitar o desenvolvimento de plantas, limitando culturas. Já se o mesmo se apresentar deficitariamente, não haverá assimilação do mesmo pelo solo e posteriormente pelas plantas, dificultando seu desenvolvimento e produtividade.

---

## EVALUATION OF NITROGEN DETERMINATION BY ION CHROMATOGRAPHY (IC) AND BY CONTENT OF TOTAL NITROGEN (TN) CHEMILUMINESCENCE

**ABSTRACT:** The determination of nitrogen can be made by different techniques, such as Kjeldahl, Total Nitrogen (TN) by chemiluminescence, ion chromatography (IC), among others. The determination of total nitrogen by Kjeldahl proposal in 1883, is still widely used to be a reliable technique, however, has the disadvantage of generating waste and have high analysis time. Thus, other recent techniques can be used to determine the nitrogen waste and reducing analysis time. Luminescence is the phenomenon characterized by the emission of light from a molecule that was in its excited state. Chemiluminescence is widely used to determine the concentration of nitrogen oxides in flue gases. Since the ion chromatography is a variant of liquid chromatography using ion exchange resins to separate atomic or molecular ions based on their interaction with the resin. Thus, this study aims to compare the techniques of IC and chemiluminescence for the determination of nitrogen in aqueous samples. For this, nitrogen standards were made and samples were assessed for both techniques. It is the analysis time and sample preparation. It was also verified the linearity of the curve in each technique. As a result, it was seen that both presented satisfactory data and similar results.

**Keywords:** ion chromatography, chemiluminescence, nitrogen.

## Referências

- [1] Ciclo do nitrogênio: entenda etapas, organismos participantes e importância. Acessado em: <http://www.ecycle.com.br/component/content/article/63-meio-ambiente/3056-ciclo-nitrogenio-etapas-organismos-importancia-biogeoquimico-azoto-moleculas-organicas-aminoacidos-proteinas-rna-dna-elemento-quimico-enxofre-transformacoes-resumo-eutrofizacao-desnitrificacao-amonificacao-ferro-fixacao-devolucao-metabolismo-nitrogenado.html>, as 20:48 em 27/05/15;
- [2] Ferreira, F.N., et al. Determinação de Nitrogênio Total em Amostras de Rocha Petrolífera pelo Método Kjeldahl / Indofenol. Acessado em: [www.cetem.gov.br/publicacao/serie\\_anais\\_I\\_jpci\\_2007/Fernanda\\_Nunes\\_Ferreira.pdf](http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_I_jpci_2007/Fernanda_Nunes_Ferreira.pdf), as 19:59 em 27/05/15;
- [3] Galvani, F. et al. Adequação da Metodologia Kjeldahl para determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta. Corumbá, MS. Maio, 2006;
- [4] HOLANDA, E., Emissão de poluentes. Curso de Engenharia UFPE. Acessado em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAHDsAL/emissao-poluentes>, as 19:18 em 27/05/15;
- [5] Faculdade de ciências e tecnologia (FCT), departamento de química. Cromatografia Ionica. 2015. Acessado em: <http://www.dq.fct.unl.pt/servicos-externos/cromatografia-ionica>, as 19:41 em 27/05/15;
- [6] Rodriguez, S.B. et al. Application of pig slurry to soils. Effect of air stripping treatment on nitrogen and TOC leaching. *Journal of Environmental Management* 91 (2010) pp 2594-2598;
- [7] Verma, P. et al. Determination of trace amounts of nitrogen in uranium based samples by ion chromatography (IC) without Kjeldahl distillation. *Analytica Chimica Acta* 596 (2007) 281–284. Sciencedirect;
- [8] Ammann, A. A. et al. Simultaneous determination of TOC and  $TN_B$  in surface and wastewater by optimised high temperature catalytic combustion. Vol. 34, No. 14, pp. 3573-3579, 2000;
- [9] Avramidis, P. et al. Total Organic Carbon and Total Nitrogen in Sediments and Soils: A Comparison of the Wet Oxidation – Titration Method with the Combustion-Infrared Method. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 4 (2015) 425 – 430. Science Direct;
- [10] Barbooti, M. Environmental Applications of Instrumental Chemical Analysis. 2015. Apple Academic Press, inc.

[11] De Borba, B.M. et al. Simultaneous determination of total nitrogen and total phosphorus in environmental waters using alkaline persulfate digestion and ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1369 (2014) 131–137. Scienccdirect;

[12] Kimura, M. *Testing Methods for Fertilizers* (2013). Incorporated Administrative Agency Food and Agricultural Materials Inspection Center. May, 2013

[13] Niedzielski, P. et al. A new tool for inorganic nitrogen speciation study: Simultaneous determination of ammonium ion, nitrite and nitrate by ion chromatography with post-column ammonium derivatization by Nessler reagent and diode-array detection in rain water samples. *Analytica Chimica Acta* 577 (2006) 220–224. Scienccdirect;

[14] METROHM, Manual de operação Cromatógrafo Iônico modelo Compact IC PRO 881. 02/2012. Acessado em: [http://partners.metrohm.com/GetDocument?action=get\\_dms\\_document&docid=868323](http://partners.metrohm.com/GetDocument?action=get_dms_document&docid=868323), as 18:34 em 01/06/15;

[15] Eith, C. et al. *Práticas em cromatografia de íons*. 2ª edição. Monografia Metrohm. 2006;

[16] SHIMADZU, Manual de operação determinador de nitrogênio total modelo TNM-1. Acessado em: <http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/toc/catalogos/toc-l.pdf>, as 18:39 em 01/06/15;