

CONSÓRCIO LOOP – O2 – LaGEn UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE



Protocolo LAB N° 008 - 12 REV 01 Análises de Nutriente Inorgânicos Dissolvidos do WH

1. OBJETIVO

O objetivo deste protocolo é descrever o método adotado para análises distintas de nutrientes inorgânicos dissolvidos do Water Hunters.

2. MATERIAIS & EQUIPAMENTOS

Materiais & Reagentes	Equipamentos
<ul style="list-style-type: none">• Água ultra-pura (Tipo I, Milli-Q)• Pissete com água ultra-pura• Provetas volumétricas• Balões volumétricos• Pipetas volumétricas• Béchers• Espátulas de inox• Coluna de Nitrato• N-NH₄⁺:	<ul style="list-style-type: none">• Bomba peristáltica• Espectrofotômetro• Balança analítica de precisão• Frascos para reação (copinhos plásticos)• Dispenseter• Pipetador automático• Ponteiras

Elaborado por: Lívia Gebara	e-mail do elaborador: sem e-mail	Revisor: Stephanie	Última Revisão: 17/03/2014 n° da REV 01	Página: 1
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	--	-----------

<ul style="list-style-type: none"> ○ Frascos de vidro c/ tampa ○ Solução tampão de Citrato ○ Fenol ○ Nitroprussiato de Sódio ○ Solução DTT (Cloro) ○ Hipoclorito ○ Solução estoque 10.000 µM ● P-PO43-: <ul style="list-style-type: none"> ○ Ácido Sulfúrico 4,5M (H2SO4) ○ Ácido Ascórbico acidificado ○ Reagente Mistura para Fosfato ○ Solução estoque 10.000 µM ● N-NO2-: <ul style="list-style-type: none"> ○ Sulfanilamida ○ NED ○ Solução estoque 10.000 µM ● N-NO3-: <ul style="list-style-type: none"> ○ Tampão de Cloreto de Amônio ○ Coluna redutora (cádmio cuperizado) ○ Sulfanilamida ○ NED ○ Sulfato de Cobre ○ Solução estoque 10.000 µM ● Si (OH)4 <ul style="list-style-type: none"> ○ Frascos de Plástico ○ H2SO4 4,5M ○ Ácido Oxálico ○ Ácido Ascórbico ○ Solução estoque 5000 µM 	
--	--

3. FLUXOGRAMA DE TRABALHO



Elaborado por: Lívia Gebara	e-mail do elaborador: sem e-mail	Revisor: Stephanie	Última Revisão: 17/03/2014 n° da REV 01	Página: 2
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	--	-----------

4. PROCEDIMENTOS

I. Análise do Amônio (N-NH₄⁺)

Preparo das Soluções

II. Solução tampão de Citrato:

A. 48g citrato tri-sódico dihidratado (52) (C₆H₅Na₃ O₇.2H₂O) + 0,08g hidróxido de sódio (20) (NaOH). Dissolver aquecendo em 120mL de água ultrapura; deixar ferver até chegar ao volume de 100mL.

III. Fenol:

A. 3,8g fenol (14) (C₆H₅OH) e 0,04g de Sódio Nitroprusiato dissódico dihidratado (25). Dissolver em 60mL de água ultrapura e avolumar até 100mL.

IV. Solução DTT (Cloro) Hipoclorito:

A. 0,2g ác.diclorocianurico (13) DTT (C₃Cl₂Na₃O₃.2H₂O) e 1,6g de hidróxido de sódio (20) (NaOH). Dissolver em 60mL de água ultrapura fervida e avolumar até 100mL.

V. Solução estoque padrão (NH₄⁺):

A. Secar cloreto de amônio (NH₄Cl) (51) a 100°C. Esfriar em dessecador. Dissolver 53,5mg em 100mL de água ultrapura fervida. Esta solução contém 10.000 µM.

Metodologia

B. Após descontaminação, lavar toda a vidraria com solução de NaOH 1%. Enxaguar os frascos várias vezes com água recém-purificada e depois com amostra.

Elaborado por: Lívia Gebara	e-mail do elaborador: sem e-mail	Revisor: Stephanie	Última Revisão: 17/03/2014 n° da REV 01	Página: 3
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	--	-----------

C. Retirar alíquotas de 10 ml* de amostra;

volume variável. Caso varie o volume de amostra, mantenha as proporções.

D. Adicionar:

1. 0,4 ml de fenol (conservado em geladeira)
2. agitar
3. 0,2 ml de citrato para NH_4^+
4. agitar
5. 0,4 ml de DTT
6. Agitar
7. Deixar as amostras no escuro por no mínimo 6 horas (no máximo 30 horas); *Caso necessário acelerar o processo, colocar em estufa por 45min a 40 °C)
8. Fazer leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 630 nm.

VI. Brancos:

A. 10 mL de água recém purificada + reagentes colorimétricos.

VII. Padrões:

A. A partir de uma solução estoque de 10.000 μM são preparados dois padrões de 1 μM mediante duas diluições de 1/100 ml.

Ou fazer curva padrão com diferentes diluições.

VIII. Análise Fosfato (P- PO_4^{3-})

Preparo de Soluções:

IX. Ácido Sulfúrico 4,5M (H_2SO_4):

Elaborado por: Lívia Gebara	e-mail do elaborador: sem e-mail	Revisor: Stephanie	Última Revisão: 17/03/2014 n° da REV 01	Página: 4
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	--	-----------

A. Adicionar 250 mL de H₂SO₄ concentrado (5) a 700 mL de água ultrapura. Ajustar o volume para 1L, depois de resfriado.

*Cuidado!!! Dissolução muito exotérmica. Preparar em banho de gelo e com acompanhamento do técnico do laboratório.

X. Ácido Ascórbico acidificado:

A. Dissolver 5 g de ácido ascórbico (12) (C₆H₈O₆) em 25 mL de água ultrapura. Adicionar esta solução a 25 mL de H₂SO₄ 4,5M. Estocar em vidro âmbar na geladeira. A solução é estável por pelo menos uma semana e pode ser usada enquanto permanecer sem cor.

XI. Reagente Misto:

A. Dissolver 2,5g de heptamolibidato de amônio tetrahidratado (46) [(NH₄)₆ Mo₇O₂₄.4H₂O] em 25 mL de água destilada. Dissolver 0,1g de tartarato de antimônio potássio (31) em 4 mL de H₂O. Adicionar a solução de Molibidato a 70mL da solução de H₂SO₄ 4,5M, mexendo constantemente. Adicionar então, o tartarato e misturar bem. A solução é estável por muitos meses. Estocar em frasco de vidro de 100mL.

XII. Solução estoque 10.000 µM:

A. KH₂PO₄ (73) é seco em estufa a 110oC por duas horas, resfriar em dessecador. Pesar exatos 136,1 mg e dissolver em água destilada, previamente acidificada com 0,2 ml da solução H₂SO₄ 4,5M. Elevar o volume a 100 ml. Estocar a solução em frasco de vidro âmbar na geladeira. A solução é estável por meses.

Elaborado por: Lívia Gebara	e-mail do elaborador: sem e-mail	Revisor: Stephanie	Última Revisão: 17/03/2014 n° da REV 01	Página: 5
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	--	-----------

Metodologia:

B. O fosfato inorgânico reage com molibdato acidificado, produzindo um complexo de fosfomolibdato, posteriormente reduzido, por ácido ascórbico, a um composto azul.

1. Retirar alíquotas de 10 ml da amostra.
2. Adicionar 0,2 ml de ácido ascórbico para PO₄³⁻
3. Agitar
4. Adicionar 0,2 ml de reagente misto para PO₄³⁻
5. Agitar
6. A leitura deve ser feita no intervalo de 10 a 20 minutos, devido à possibilidade de interferência pelo silicato.
7. A absorbância deve ser lida no comprimento de onda de 880 nm.

XIII. Brancos:

- A. 10 ml de água destilada.

XIV. Padrões:

- A. A partir de uma solução estoque de 10.000 µM são preparados dois padrões de 1 µM mediante duas diluições de 1/100 mL.

Ou fazer curva padrão com diferentes diluições.

XV. Análise Nitrito (N-NO₂⁻)

Preparo de Soluções:

XVI. Sulfanilamida:

- A. Dissolver 1,0 g de sulfanilamida (40) cristalina em uma solução de 10 mL de HCl concentrado + 60 mL de água destilada. Após resfriada, aferir o volume para 100 mL.

Elaborado por: Lívia Gebara	e-mail do elaborador: sem e-mail	Revisor: Stephanie	Última Revisão: 17/03/2014 n° da REV 01	Página: 6
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	--	-----------

XVII. NED:

- A. Dissolver 0,10g de dihidroclorato de N (1-naftil)-etilenodiamina (NED) (48) em 100 mL de água destilada. Estocar em geladeira em vidro âmbar. Precisa ser renovada se a cor for alterada de maneira característica.

XVIII. Solução Estoque 10.000 μ M:

- A. Secar NaNO_2 (50) a 100°C por 1 hora. Resfriar em dessecador. Pesar 69mg e dissolver em 100 mL de água destilada. Guardar a solução em vidro âmbar, na geladeira, preservada com 1 gota de clorofórmio (10). Essa solução pode ser armazenada de 6 meses a 1 ano.

Metodologia:

- B. Todos os métodos para detecção de nitrito baseiam-se na reação deste com amina aromática, formando um composto que reage com uma amina aromática secundária produzindo uma coloração rosada.
1. Retirar alíquotas de 10 ml da amostra.
 2. Adicionar 0,2 ml de sulfanilamida
 3. Agitar
 4. Adicionar 0,2 ml de NED
 5. Agitar
 6. Um período mínimo de 15 minutos é necessário para o desenvolvimento da reação. O tempo máximo para a leitura é de 1 hora após a adição dos reagentes.
 7. A absorbância deve ser lida no comprimento de onda de 540 nm.

XIX. Brancos:

- A. 10 ml de água destilada.

Elaborado por: Lívia Gebara	e-mail do elaborador: sem e-mail	Revisor: Stephanie	Última Revisão: 17/03/2014 n° da REV 01	Página: 7
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	--	-----------

XX. Padrões:

A. A partir de uma solução estoque de 10.000 μM são preparados dois padrões de 1 μM mediante duas diluições de 1/100 ml.

Ou fazer curva padrão com diferentes diluições.

XXI. Análise Nitrato (N-NO_3^-)

Preparo de Soluções:

XXII. Tampão de Cloreto de Amônio:

A. Dissolver 20 g de cloreto de amônio (51) em 2L de água destilada. Adicionar 3,0 mL de hidróxido de amônio (22) concentrado para que o pH seja ajustado para aproximadamente 8,5.

XXIII. Sulfanilamida e NED:

A. Ver reagentes do Nitrito.

XXIV. Sulfato de Cobre:

A. 5g de sulfato de cobre pentahidratado (54) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) em 500 mL de água destilada.

XXV. Solução estoque de NO_3^- :

A. Dissolver 85mg de Nitrato de Sódio (79) (NaNO_3) previamente secos (1h a 100°C), em 100 mL de água ultrapura. A solução contém uma concentração de 10.000 μM . Estocar em geladeira, em vidro âmbar.

XXVI. Coluna redutora (cádmio cuperizado):

A. Cádmio granulado comercial peneirado na fração de 40 – 60 de malha. O cádmio é lavado primeiramente com pequenas porções de água ultrapura, até que a cor da água de lavagem fique límpida. Então, lava-se com uma solução de HCl 2 M, com o intuito de eliminar os óxidos. Observar o desprendimento gasoso. Continuar lavando com pequenas frações de ácido até que não haja mais evolução de gás.

Elaborado por: Livia Gebara	e-mail do elaborador: sem e-mail	Revisor: Stephanie	Última Revisão: 17/03/2014 n° da REV 01	Página: 8
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	--	-----------

Então, ele é vagarosamente agitado num becker contendo aproximadamente 10 mL de sulfato de cobre, durante mais ou menos 3 minutos. Lava-se com um pouco de água ultrapura para remover o excesso de cobre e então os grânulos devem ficar imersos em tampão de cloreto de amônio enquanto a coluna é montada para que não haja oxidação dos mesmos.

- B. Antes de montar a coluna, lavar as mangueiras e a coluna com solução de HCl 50% (v/v). Retirar o excesso de ácido com água ultrapura. A coluna é montada enchendo-a primeiramente com tampão de NH₄Cl e colocando-se o cádmio para dentro. Deve ser bem empacotada, evitando a formação de bolhas. Tampar as extremidades com lã de vidro e conectar as mangueiras. Passar solução tampão, garantindo que não haja bolhas nem nas mangueiras, nem na coluna.
- C. Ativar a coluna passando cerca de 100 mL de uma solução de NITRATO (NO₃-) 10 µM (diluir a partir da solução padrão). Logo após, lavar a coluna com cloreto de amônio (aproximadamente 400 mL).
- D. É preciso fazer um teste de eficiência na água de saída: recolher um pouco da água de saída e adicionar os reagentes para NITRITO (NO₂-) na água de saída. Caso o teste dê positivo, deixar o tampão de NH₄Cl circulando até teste dar negativo (não observar coloração rosada após adição dos reagentes)

Caso a coluna já esteja montada, verificar sempre sua eficiência antes do uso.

Elaborado por: Lívia Gebara	e-mail do elaborador: sem e-mail	Revisor: Stephanie	Última Revisão: 17/03/2014 n° da REV 01	Página: 9
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	--	-----------

Metodologia:

- E. Várias metodologias fracassaram em tentar analisar diretamente o nitrato na água do mar. O melhor e mais aplicado consiste na redução do nitrato a nitrito e posterior determinação deste último. A redução do nitrato pode se dar num meio homogêneo ou heterogêneo, sendo este último o mais usado. O redutor em questão é uma coluna de grânulos de cádmio envoltos num manto de íons de cobre (cádmio cuperizado). Os principais problemas estão relacionados com as condições de redução. Um baixo pH ou superfícies muito ativas reduzem o nitrato à formas mais reduzidas que nitrito. Alto pH ou superfícies pouco ativas resultam em baixa redução.
- F. Em ambos os casos, o resultado é abaixo do esperado. Vários problemas ocorrem devido a mudanças de pH no curso da passagem do nitrato na coluna, alterações que são inevitáveis no processo. Para evitar tais problemas a água do mar precisa ser tratada com um tampão, usando neste caso, o cloreto de amônio (NH_4Cl). De qualquer maneira, o tempo durante o qual a amostra fica em contato com a coluna precisa ser controlado. O nitrito inicial presente na amostra precisa ser descontado.
- G. É importante observar que o fluxo no redutor deve ser de 2 mL por minuto. O fluxo deve ser regulado antes da passagem das amostras. (regular usando uma proveta e um cronômetro)
- H. Retirar alíquotas de 20 mL da amostra em uma proveta.
- I. Adicionar 20 mL da solução tampão de cloreto de amônio.

Elaborado por: Lívia Gebara	e-mail do elaborador: sem e-mail	Revisor: Stephanie	Última Revisão: 17/03/2014 n° da REV 01	Página: 10
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	--	------------

- J. Passar esta mistura pela coluna redutora.
- K. Os primeiros 10 mL são desprezados.
- L. Os próximos 10 mL são recolhidos no tubo coletor para lavagem deste, sendo também desprezados.
- M. Os últimos 10 mL são recolhidos no tubo graduado coletor e passados para um tubo de ensaio comum para serem analisados.
- N. Tratar as amostras reduzidas como nitrito: adicionar 0,2 mL de sulfanilamida, agitar e aguardar 1 minuto, e após, adicionar 0,2 mL de NED.
- O. Após 15 minutos de reação, fazer a leitura em 540 nm.
- P. Checagem da eficiência da coluna:
- Q. Checar periodicamente, verificando os fatores de calibração para nitrito e nitrato e sua relação. A eficiência deve estar entre 90 - 100%. Caso esteja baixa, repetir ativação. Em último caso, montar novamente.

XXVII. Análise Silicato (Si (OH)_4)

Preparo de Soluções:

XXVIII. H_2SO_4 4,5M:

- A. Adicionar 250 mL de H_2SO_4 concentrado (5) a 700 mL de água ultrapura. Ajustar o volume para 500 mL, depois de frio.

*Cuidado!!! Dissolução muito exotérmica. Preparar em banho de gelo e com acompanhamento do técnico do laboratório

XXIX. Reagente Misto para Silicato:

- A. Dissolver 6,33g de heptamolibdato de amônio tetrahidratado (46) $[(\text{NH}_4)_6 \text{MO}_7 \text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ em 50 mL de água ultrapura, depois

Elaborado por: Lívia Gebara	e-mail do elaborador: sem e-mail	Revisor: Stephanie	Última Revisão: 17/03/2014 n° da REV 01	Página: 11
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	--	------------

adicionar esta solução em 50 mL de solução de H₂SO₄ 4,5M. (Nunca adicionar ácido diretamente no molibdato). Estocar em recipiente de polietileno de 100 mL, abrigado da luz. Estável por meses.

XXX. Ácido Oxálico:

A. Dissolver 10g de ácido oxálico (55) (C₂H₂O₄·2H₂O) em 100 mL de água ultrapura. Guardar em frasco plástico.

XXXI. Ácido Ascórbico:

A. Dissolver 2,8g de ácido ascórbico (12) (C₆H₈O₆) em 100mL de água ultrapura. Guardar em frascos na geladeira. Estável até permanecer sem cor.

XXXII. Solução Estoque – Si (5000 µM):

A. Secar aproximadamente 0,5 g de Hexaflúor silicato de sódio (77) (Na₂SiF₆) em estufa por 1 hora à 105°C. Esfriar em dessecador e pesar exatamente 94 mg. Dissolver em água ultrapura (aproximadamente 50 ml), usando um béquer de polietileno e um agitador magnético (é de difícil dissolução). Aferir para 100 ml. Conservar em frasco plástico, ao abrigo da luz. Esta solução é estável por vários meses

Metodologia:

B. Os compostos de sílica dissolvida reagem com uma solução de molibdato, quando a amostra é acidificada. Algumas reações paralelas são necessárias para a manutenção da estabilidade do composto formado, cuja coloração é azul.

C. Alíquotas de 10 mL de amostra são colocadas em frascos plásticos;

D. Adicionar 0,4 mL do reagente mistura para silicato;

E. Agitar e aguardar de 10 - 20 minutos;

Elaborado por: Lívia Gebara	e-mail do elaborador: sem e-mail	Revisor: Stephanie	Última Revisão: 17/03/2014 n° da REV 01	Página: 12
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	--	------------

- F. Adicionar 0,4mL de ácido oxálico para silicato;
- G. Agitar;
- H. Imediatamente após, adicionar 0,2 mL de ácido ascórbico para silicato, agitando em seguida.
- I. A reação atinge um máximo após 20 minutos e é estável por horas.
- J. Ler a absorbância em comprimento de onda de 810 nm.

XXXIII. Brancos e Padrões:

- A. Brancos são obtidos com 10 mL de água destilada mais os reagentes.
- B. Padrões são obtidos de solução estoque de 5.000 μM de Si, em uma diluição de 2/250 ml. Ficando assim com uma concentração final de 40 μM . Ou fazer curva padrão com diferentes diluições.

5. TROUBLESHOOTING (SOLUÇÃO DE PROBLEMAS)

- Indeterminado

6. REFERÊNCIAS

Adaptado de Grashoff, K.; Kremling, K.; Ehrhardt, M. *Methods of seawater analysis*. 3^a ed. Weinheim: Wiley-VCH. 1999.

Elaborado por: Lívia Gebara	e-mail do elaborador: sem e-mail	Revisor: Stephanie	Última Revisão: 17/03/2014 n° da REV 01	Página: 13
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	--	------------



Protocolo LAB N° 008-12
REV 01

7.HISTÓRICO

8.APÊNDICES

Em REVISÃO Banco de Dados Thetys
2020-07-13 17:14:36 - 377062

Elaborado por: Livia Gebara	e-mail do elaborador: sem e-mail	Revisor: Stephanie	Última Revisão: 17/03/2014 n° da REV 01	Página: 14
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	--	------------