

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós Graduação em Química
Mestrado em Química

Gilvânia Kércia de Oliveira

**DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÂNIONS POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM PAREAMENTO
IÔNICO EM ÁGUAS SUPERFICIAIS**

Juiz de Fora

2012

Gilvânia Kércia de Oliveira

Determinação e avaliação da concentração de ânions por cromatografia líquida de alta eficiência com pareamento iônico em águas superficiais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração Química Analítica, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química

Orientadora: Prof^a Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos

Juiz de Fora

2012

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus que me ajudou a conquistar mais um degrau na longa escada da vida.

Aos meus pais, Gilberto e Edivânia pelo apoio incondicional e pela paciência. Aos meus irmãos, Luanna e Heberth, pela paciência comigo durante os momentos em que as coisas não andavam da maneira que eu queria.

A professora Maria Auxiliadora pela orientação, apoio, dedicação e paciência ao longo do desenvolvimento do trabalho. Ao professor Renato Camargo pelo incentivo e contribuição para a realização do meu projeto de mestrado.

As minhas amigas (Carla, Juliana, Glaucia, Jackeline, Mellina, Michele, Aparecida, Ângela, Isabela e Cynthia) por me acompanharem sempre nos bons e maus momentos.

Ao Aluno Gustavo pela construção do coletor de água de rio que foi um equipamento imprescindível para a realização da coleta. Aos alunos Marcelo e Fausto pelo auxílio na realização de algumas análises.

Aos professores Júlio e Rafael Arromba pela contribuição no meu exame de qualificação através de sugestões.

A todos os professores do departamento de química que contribuíram para minha formação profissional.

Aos amigos do Nupis (Alessandra, Camila, Rafaela, Marcos, Daniel, Yara, Taymara, Thaís, Gláucio, William) pela convivência e pelo carinho.

Aos órgãos de fomento: CAPES, CNPq, FAPEMIG e PROPESQ/UFJF pelo apoio financeiro.

*Dedicado a minha
família e amigos pelo
apoio incondicional.*

RESUMO

A cromatografia de íons é a técnica analítica mais utilizada para realizar a determinação de íons em amostras ambientais. Mas, atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência com pareamento iônico (*ion-pair HPLC*) tem sido usada para fazer este tipo de análise devido a estabilidade e a eficiência da coluna de fase reversa (FR). *ion-pair HPLC* é uma técnica mais complexa que a cromatografia de fase reversa, uma vez que o equilíbrio entre o reagente de pareamento iônico (RPI) e a fase estacionário (FE) é lento, a separação é mais sensível às variações de temperatura e pH. Além disso, variações na concentração do RPI também afeta a separação do analito. No *ion-pair HPLC*, vários parâmetros devem ser otimizados tais como: composição e pH da fase móvel, tipo de RPI (modificação permanente ou dinâmica da FE) e concentração do RPI. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia analítica para separação e quantificação dos ânions cloreto, nitrito, nitrato e sulfato em amostras de água superficial por *ion-pair HPLC*. O método de separação dos ânions foi otimizado utilizando uma coluna de FR octadecilsilano (C18) com detecção indireta na região do ultravioleta. Durante a execução deste trabalho a composição e o fluxo da fase móvel por eluição isocrática foram estudados, assim com o comprimento de onda de detecção. Foram testados quatro RPI diferentes para compor a fase móvel. A melhor condição de separação dos íons foi alcançada com a utilização do reagente brometo de cetiltrimetilamônio com modificação permanente da FE. Concluído o processo de separação dos ânions a metodologia foi aplicada na análise das amostras de água do Rio Paraibuna (Juiz de Fora, MG). O método apresentou boa exatidão e boa precisão. Os níveis de concentração encontrados nas amostras de água do Rio Paraibuna ficaram a baixo do limite permitido pela legislação brasileira para água utilizada para consumo humano, indicando baixos níveis de contaminação.

Palavras-chave: Ion-pair HPLC, ânions, água de rio.

ABSTRACT

The ion chromatography (IC) is the most widely used analytical technique to perform ion analysis in environmental samples. Nowadays, the ion-pair high performance liquid chromatography (*ion-pair HPLC*) has been used to perform this kind of analysis due to the stability and efficiency of reverse phase (RP) column. The *ion-pair HPLC* is more complex than the reverse phase chromatography, since the equilibrium between the ion-pairing reagent (IPR) and stationary phase (SP) is slow, the separation is more sensitive to variations in temperature and pH. A variation in the concentration of IPR also affects the separation of the analytes. In *ion-pair HPLC*, several parameters must be optimized such as: mobile phase (MP) composition, type IPR, the concentration of the IPR in MP and pH of the MP. The present work aims to develop an analytical methodology for the separation and quantification of anions (chloride, nitrite, nitrate and sulfate) in surface water samples from Paraibuna River by *ion-pair HPLC*. The method of analysis of anions was optimized using RP chromatography column octadecylsilane (C18) with indirect detection in the ultraviolet region (UV). During the execution of this work the composition and flow rate of the MP for isocratic elution were studied as well with the wavelength for detection. We tested four different ion-pairing reagents to from the mobile phase. The best condition for separation of ions was achieved with the use of reagent cetyltrimethylammonium bromide. Once completed, the process of separation of anions the methodology was applied in the analyses of water samples from Paraibuna River. The parameters used for evaluate the accuracy and precision of method presented satisfactory values. The concentration levels found for the anions in the samples were below the limit allowed by brazilian legislation for water used for human consume.

Keywords: ion-pair HPLC, anions and river water

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Representação do processo de troca iônica entre o RPI e o analito. Fonte: adaptação de SYNDER, 1997; COLLINS *et al.*, 2006..... 8
- FIGURA 2:** Foto do coletor desenvolvido pelo NUPIS para coleta de água do Rio Paraibuna, Juiz de Fora, MG. 16
- FIGURA 3:** Fotos dos locais de coleta: Ponto de coleta 10 (à esquerda) e Ponto de coleta 9 (à direita)..... 17
- FIGURA 4:** Mapas dos locais de coleta da cidade de Juiz de Fora. Fonte: GOOGLE MAPAS. 19
- FIGURA 5:** Fórmulas estruturais dos RPI que promovem a modificação dinâmica da FE: brometo de tetraetilamônio (TEABr) e o brometo de tetrabutilamônio (TBABr)..... 23
- FIGURA 6:** Fórmulas estruturais dos RPI que promovem a modificação permanente da FE : cloreto de cetilpiridina (CPC) e o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)..... 23
- FIGURA 7:** Fluxograma de preparação das soluções padrão mistura dos ânions (Mix) para a curva analítica..... 28
- FIGURA 8:** Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). Fase móvel composta por uma solução de $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEABr/MeOH (92:8 v/v), fluxo de $0,50 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção em: 220 nm. Ordem de eluição: 1- H_2O , 2- H_2O , SO_3^{2-} , SO_4^{2-} , 3- Cl^- , 4- NO_2^- , NO_3^- . Coluna de RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 μm); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 μm). 34
- FIGURA 9:** Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). Fase móvel composta por uma solução de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEABr/ MeOH (90:10 v/v), fluxo de $0,50 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção em: 220 nm. Ordem de eluição: 1- H_2O , 2- H_2O , Cl^- , SO_3^{2-} , SO_4^{2-} , 3- NO_2^- , 4- NO_3^- . Coluna de RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 μm); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 μm)..... 35

FIGURA 10: Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Fase móvel composta por uma solução de 10,0 mmol L^{-1} de TEABr/MeOH (96:4 v/v), fluxo de 0,50 mL min^{-1} . Detecção em: 220 nm. Ordem de eluição: 1- H_2O , 2- H_2O , Cl^- , SO_3^{2-} , SO_4^{2-} , 3- NO_2^- , NO_3^- . Coluna de RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 μm); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 μm). 36

FIGURA 11: Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Fase móvel composta por uma solução de 1,25 mmol L^{-1} de TBABr/MeOH (89:11 v/v), fluxo de 1,00 mL min^{-1} . Detecção em: 214 nm. Ordem de eluição: 1- H_2O , 2- Cl^- , 3- NO_2^- , 4- NO_3^- , 5- SO_3^{2-} , 6- SO_4^{2-} . Coluna de RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 μm); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 μm). 41

FIGURA 12: Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Fase móvel composta por uma solução de 1,25 mmol L^{-1} de TBABr (pH = 7,53) (ajustado com trietanolamina)/MeOH (91:9 v/v), fluxo de 1,00 mL min^{-1} . Detecção em: 214 nm. Coluna de RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 μm); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 μm). 42

FIGURA 13: Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Fase móvel composta por uma solução de 1,25 mmol L^{-1} de TBABr (pH = 7,53) (ajustado com a solução de monohidrogenofosfato de potássio)/MeOH (95:5 v/v), fluxo de 1,00 mL min^{-1} . Detecção em: 214 nm. Ordem de eluição: 1- H_2O , Cl^- , 2- NO_2^- , 3- NO_3^- , 4- SO_3^{2-} , SO_4^{2-} . Coluna RP C18 ZORBAX ODS (150,0 x 4,6 mm, 5 μm); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 μm). 43

FIGURA 14: Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Fase móvel composta por uma solução de 0,50 mmol L^{-1} de biftalato de potássio (pH = 7,80) (ajustado com trietanolamina)/MeOH (97:3 v/v), fluxo de 1,00 mL min^{-1} . Detecção em: 265 nm. Coluna RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 μm) imobilizada com CPC ; coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 μm). 49

FIGURA 15: Cromatogramas obtidos para a solução padrão mistura dos ânions ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). Fase móvel composta por uma solução de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de biftalato de potássio ($\text{pH} = 7,80$)/MeOH (97:3 v/v), fluxo de $0,70 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção em: 235 nm. Coluna de RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, $5\mu\text{m}$) (A)-Imobilizada com solução de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB; (B)-Imobilizada com de solução $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB; (C)-Imobilizada com solução $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB..... 51

FIGURA 16: Cromatogramas obtidos para a solução padrão mistura dos ânions ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). (A) Fase móvel composta por uma solução de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de biftalato de potássio $\text{pH} = 7,90$ (ajustado com Tris)/MeOH (95:5 v/v); (B) Fase móvel composta por uma solução de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de biftalato de potássio $\text{pH} = 7,90$ (ajustado com Tris)/MeOH (95:5 v/v). Fluxo de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção em: 235 nm. Coluna de RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, $5\mu\text{m}$) imobilizada com a solução de CTAB ($0,25 \text{ mmol L}^{-1}$)..... 54

FIGURA 17: Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$). Fase móvel composta por uma solução de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de biftalato de potássio $\text{pH} = 7,90$ (ajustado com Tris)/MeOH (95:5 v/v), fluxo de $0,70 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção em: 235 nm. Coluna de RP C18 ZORBAX (150,0 mm x 4,6 mm, $5\mu\text{m}$) imobilizada com a solução de CTAB ($0,25 \text{ mmol L}^{-1}$)..... 55

FIGURA 18: Cromatogramas obtidos para a amostra de água do Rio Paraibuna analisadas por CLAEPI após imobilização do reagente de pareamento iônico com modificação permanente da fase estacionária da coluna C18 com a solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de CPC (A) e com a solução $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB (B). 57

FIGURA 19: Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions (10 mg L^{-1}). Fase móvel composta por uma solução de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de biftalato de potássio ($\text{pH} = 7,90$)/MeOH (95:5 v/v), fluxo de $0,70 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção em: 235 nm. Coluna de RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, $5\mu\text{m}$) imobilizada com a solução de CTAB ($0,25 \text{ mmol L}^{-1}$)..... 58

FIGURA 20: Curvas analíticas ($n = 3$) no intervalo de linearidade: 0,00 (branco); 2,00; 6,00; 10,00; 15,00 e $20,00 \text{ mg L}^{-1}$. Obtidas por CLAE com

pareamento iônico. Coluna C18 imobilizada com CTAB; Fase móvel composta por uma solução de 0,50 mmol L⁻¹ de biftalato de potássio (pH=7,90)/ MeOH (95:5), fluxo de 0,70 mL min⁻¹ e detecção em 235 nm..... 60

FIGURA 21: Cromatogramas sobrepostos da curva analíticas obtidos na condição descrita no item 4.3..... 61

FIGURA 22: Gráficos de análise de resíduos para as curvas analíticas dos ânions..... 64

FIGURA 23: Cromatogramas obtidos (A) solução padrão mistura dos ânions de 10,0 mg L⁻¹, (B) amostra da ponte das avenidas Acesso Norte/ Honório Brito (ponto 1), (C) amostra da ponte das avenidas Brasil/Nelson Silva (ponto 10). Fase móvel composta por uma solução de 0,50 mmol L⁻¹ de biftalato de potássio (pH = 7,90)/MeOH (95:5 v/v), fluxo de 0,70 mL min⁻¹. Detecção em: 235 nm. Coluna de RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5µm) imobilizada com solução CTAB (0,25 mmol L⁻¹)..... 71

FIGURA 24: Concentrações médias dos íons cloreto, nitrato e sulfato e valores de pH das amostras de água do Rio Paraibuna, Juiz de Fora, MG, coletadas em setembro de 2011. 76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Padrão de aceitação dos íons em água para consumo humano....	5
TABELA 2: Reagentes de pareamento iônico e suas principais aplicações.	9
TABELA 3: Localização das pontes e os números dos pontos de coleta.....	12
TABELA 4: Coordenadas geográficas dos locais de coleta junto com os horários das amostragens.....	18
TABELA 5: Fator de retenção obtido para eluição com FM composta pela mistura de diferentes concentrações de TBABr e MeOH.....	40
TABELA 6: Parâmetros cromatográficos obtidos para análise da mistura padrão dos ânions ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$) no HPLC, eluído na coluna RP C18 ZORBAX, fase móvel composta por solução $1,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de TBABr/MeOH (89:11), fluxo $1,00 \text{ mL min}^{-1}$ e comprimento de onda de detecção 214 nm	45
TABELA 7: Parâmetros cromatográficos obtidos para análise da mistura padrão dos ânions ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$) no HPLC, eluído na coluna RP C18 ZORBAX, fase móvel composta por solução $1,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de TBABr/MeOH/ACN (89:10:1), fluxo $1,00 \text{ mL min}^{-1}$ e comprimento de onda de detecção 214 nm ...	46
TABELA 8: Tabela de análise da variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados.	62
TABELA 9: Valores de F calculado e tabelado para análise da variância para cada analito a um nível de 95% de confiança.	63
TABELA 10: Limites de detecção e quantificação do método, expresso em mg L^{-1}	65
TABELA 11: Padrão de aceitação dos íons para água potável.....	65
TABELA 12: Percentuais de recuperação médios e desvio padrão ($n = 3$) obtidos para amostra fortificada com 10 mg L^{-1} de cloreto, nitrato e sulfato. ...	66

TABELA 13: Valores das concentrações médias ($n = 3$) dos analitos (mg L^{-1}) determinados na amostra do material de referência certificada de água de chuva (<i>major elements in rain water-high contents BCR-151 do European commission</i>).....	67
TABELA 14: Valores do teste t encontrado pelo método desenvolvido por este trabalho e o t tabelado para um nível de 95% ($n = 3$).	67
TABELA 15: Desvio padrão relativo encontrado para a solução padrão mistura ($n = 5$) em diferentes dias de injeções.....	68
TABELA 16: Concentração média (\pm desvio padrão) de cloreto, nitrato e sulfato nas amostras de água do Rio Paraibuna, Juiz de Fora, MG, coletadas em setembro de 2011.	70
TABELA 17: Comparação dos níveis de concentração dos ânions nas amostras de água do Rio Paraibuna com diferentes áreas de estudos.	80
TABELA 18: Comparação entre o limite de detecção e tempo de análise determinado por este trabalho com outros trabalhos relatados na literatura....	81

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1: Expressão utilizada para determinação do Limite de Detecção.....	30
EQUAÇÃO 2: Expressão utilizada para determinação do Limite de Quantificação.....	30
EQUAÇÃO 3: Expressão utilizada para determinação do Fator de retenção (K).....	39
EQUAÇÃO 4: Expressão utilizada para determinação do Fator de separação (α).....	44
EQUAÇÃO 5: Expressão utilizada para determinação da Resolução (R).....	45

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A - Simetria

ACN – Acetonitrila

ANA - Agência Nacional de Águas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C18 - Coluna cromatográfica octadecilsilano

CESAMA - Companhia de Saneamento Ambiental de Juiz de Fora

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CI - Cromatografia de Íons

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAEPI - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Pareamento Iônico

COGERH – Companhia de Gestão dos Recursos Hídricos

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CPC - Cloreto de cetilpiridina

CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio

DPR – Desvio Padrão Relativo

EC - Eletroforese capilar

EPA - *Environment Protection Agency*

FE – Fase Estacionária

FEAM - Fundação Estadual do Meio Ambiente

FM - Fase Móvel

FR - Fase Reversa

Ion-pair HPLC – Ion-pair *High Performance Liquid Chromatography*

K – Fator de Retenção

LD - Limite de Detecção do Método

LQ - Limite de Quantificação do Método

MeOH – Metanol

Mix – Solução Padrão Mistura dos Ânions

MQ_{ep} - Média quadrática do erro puro

MQ_{raj} - Média quadrática da falta de ajuste

MRC – Material de Referência Certificado

NUPIS - Núcleo de instrumentação e separações analíticas

ONU - Organizações das Nações Unidas

PTFE- Politetrafluoretileno

R - Resolução

RPI - Reagente de Pareamento Iônico

SQ_{ep} - Soma quadrática do erro puro

SQ_r - Soma quadrática dos resíduos

SQ_{reg} - Soma quadrática da regressão

TBA^+ - Contra-íon do reagente TBABr

TBABr – Brometo de Tetrabutilamônio

TEABr – Brometo de Tetraetilamônio

THF - Tetraidrofurano

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

UNIAGUA – Universidade da Água

UV – Ultravioleta

VPM – Valor Máximo Permitido

α – Fator de separação

λ – Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.2 IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE DOS ÂNIONS NA ÁGUA	3
1.3 PRINCIPAIS TÉCNICAS DE ANÁLISE DE ÍONS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS.....	5
1.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM PAREAMENTO IÔNICO (CLAEPI) (ION-PAIR HPLC)	7
1.5 ÁREA DE ESTUDO	10
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODO	14
3.1 MATERIAL E REAGENTES	14
3.2 PREPARO DE SOLUÇÕES	15
3.3 AMOSTRAGEM.....	16
3.3.1 Desenvolvimento do coletor	16
3.3.2 Coleta das amostras.....	17
3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	19
3.5 MEDIÇÃO DO pH E DA CONDUTIVIDADE DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO.....	20
3.6 OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE POR CLAE	21
3.6.1 Composição da fase móvel	21
3.6.1.1 Reagentes de pareamento iônico estudados para compor a fase móvel	22
3.6.1.2 Concentração do reagente de pareamento iônico na fase móvel.	24

3.6.1.3	pH da fase móvel.....	25
3.6.2	Seleção do comprimento de onda (λ) para análise.....	25
3.7	PRÉ-TRATAMENTO DA COLUNA CROMATOGRÁFICA PARA IMOBILIZAÇÃO DO REAGENTE DE PAREAMENTO IÔNICO COM MODIFICAÇÃO PERMANENTE DA FASE ESTACIONÁRIO	26
3.8	CURVA ANALÍTICA.....	27
3.9	AVALIAÇÃO DO MÉTODO	29
3.9.1	Estudo da linearidade do método	29
3.9.2	Limites de detecção e quantificação do método	29
3.9.3	Estudo de recuperação da amostra fortificada	31
3.9.4	Análise do material de referência certificado	31
3.9.5	Precisão intermediária do método	32
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
4.1	ESTUDOS REALIZADOS COM OS REAGENTES DE PAREAMENTO IÔNICO COM MODIFICAÇÃO DINÂMICA DA FASE ESTACIONÁRIA	33
4.1.1	Brometo de Tetraetilamônio (TEABr).....	33
4.1.1.1	Estudo da composição da fase móvel sem ajuste de pH	33
4.1.1.2	Estudo da composição da fase móvel com ajuste de pH	37
4.1.2	Brometo de Tetrabutylamônio (TBABr).....	39
4.1.2.1	Estudo da composição da fase móvel sem ajuste do pH	39
4.1.2.2	Estudo da composição da fase móvel com ajuste de pH	42
4.1.2.3	Solventes orgânicos empregados para compor a fase móvel em conjunto com a solução de TBABr de 1,25 mmol L ⁻¹	44

4.2	ESTUDOS REALIZADOS COM REAGENTES DE PAREAMENTO IÔNICO COM MODIFICAÇÃO PERMANENTE DA FASE ESTACIONÁRIA...	48
4.2.1	Estudo preliminar com o cloreto de cetilpiridina (CPC).....	48
4.2.2	Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB).....	50
4.2.2.1	Estudo da concentração de CTAB imobilizada na fase estacionária de coluna	50
4.2.2.2	Estudo da composição da fase móvel empregada para a eluição dos ânions na coluna C18 imobilizada com 0,25 mmol L ⁻¹ de CTAB.....	52
4.2.3	Comparação entre as melhores condições de separação obtida para os reagentes CPC e CTAB	56
4.3	CONDIÇÃO DE ANÁLISE OTIMIZADA POR CLAE	58
4.4	AVALIAÇÃO DO MÉTODO	59
4.4.1	Curva Analítica	59
4.4.1.1	Análise de Variância	61
4.4.1.2	Análise dos Resíduos	63
4.4.2	Limite de detecção e quantificação do método.....	64
4.4.3	Estudo de recuperação da amostra fortificada	65
4.4.4	Análise do material de referência certificado.	66
4.4.5	Precisão intermediária do método	67
4.5	ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	69
4.6	COMPARAÇÃO COM OUTROS ESTUDOS.....	78
5.	CONCLUSÃO.....	81
6.	REFERÊNCIAS	85

1. Introdução

1.1 Considerações gerais

A superfície terrestre é composta por 70% de água, sendo que, deste total, apenas 3% são de água doce e os 97% restantes encontram-se nos oceanos e mares (BAIRD, 2002; MANAHAN, 2004; SPIRO *et al*, 2009; CONCEIÇÃO *et al*, 2011). Do total de água doce no mundo, apenas 0,3% são exploráveis. O restante está confinado em: lençóis freáticos e aquíferos profundos, calotas polares, geleiras, neves permanentes e outros reservatórios, fato que dificulta o acesso a eles (MANAHAN, 2004; CONCEIÇÃO *et al*, 2011). O Brasil é um país privilegiado uma vez que detém 13% da água doce do mundo (PEREIRA, 2003).

Água é uma substância essencial para vida na Terra, uma vez que é em meio aquoso que ocorre grande parte das reações bioquímicas. Ela é responsável pelo transporte de nutrientes para o meio intracelular e pela retirada das excretas (SPIRO *et al*, 2009). É importante ainda para a realização das mais simples atividades em nosso dia-a-dia, tais como: beber, cozinhar, lavar e transportar resíduos. Na economia, ela é utilizada na produção industrial, na agricultura, na pecuária e na produção de energia elétrica. No Brasil, 19% da água são usadas pela indústria, 22% para o abastecimento doméstico e 59% para a irrigação, segundo dados da Agência Nacional de Águas (ANA) (PEREIRA, 2003).

Apesar da total dependência que há dos recursos hídricos para desenvolver nossas atividades, durante muito tempo não houve a preocupação em se preservar as fontes de água, pois se pensava ser um recurso inesgotável, devido à sua grande abundância na natureza. Porém, hoje se sabe que isso não é verdade. Atualmente, o mau uso, aliado à crescente demanda pelo recurso, vem preocupando especialistas e autoridades no assunto, pela evidente redução da disponibilidade de água limpa em todo o planeta (UNIAGUA, 2011). Segundo dados da Organização das Nações Unidas (ONU),

900 milhões de pessoas não têm acesso à água potável no mundo e mais de 2,6 milhões não têm acesso ao saneamento básico (UNIC Rio, 2011).

A poluição dos recursos hídricos é um assunto preocupante e muito discutido atualmente pela sociedade. Para entender o significado de “poluição das águas” é necessário primeiramente definir este conceito. Uma das definições aceitáveis é a preconizada pela lei nº 3068 de 14 de junho de 1955 do Estado de São Paulo, que estabelece: “poluição em água é qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas das águas que possa constituir prejuízo à saúde, à segurança e ao bem estar das populações e, ainda, possa comprometer a fauna ictiológica e a utilização das águas para fins comerciais, industriais e recreativos”. Estabelecida a definição de poluição dos recursos hídricos é necessário conhecer as principais fontes causadoras deste problema.

Dessa maneira a poluição de mananciais¹ pode ser subdividida em: física, físico-química e química. Os principais fatores físicos que podem causar poluição, por determinarem modificações de flora e fauna do meio ou por serem nocivos à saúde, são: cor, turbidez e temperatura. Os físico-químicos são: pH e radioatividade. Já a poluição química é provocada pelo lançamento de substâncias químicas nocivas no ambiente aquático (BRANCO,1986 apud RITCHER, 2004).

As causas fundamentais da poluição dos recursos hídricos ocasionadas pelas atividades humanas são: poluição urbana e doméstica, poluição agrícola e industrial. A poluição urbana e doméstica ocorrem quando descargas de efluentes domésticos não tratados são lançadas diretamente em rios ou em lagos. Este tipo de poluição provoca o aparecimento de cor, sabor e odor desagradáveis na água. A poluição agrícola é provocada pelo uso excessivo de fertilizantes e de defensivos agrícolas (ANA, 2011).

De acordo com a ANA (2011), as atividades industriais geram inúmeros resíduos, sendo que alguns destes são lançados sem tratamento em cursos de água, provocando a contaminação dos mananciais. Dentre as indústrias que mais poluem, destacam-se: as alimentares, as metalúrgicas, as petroquímicas, as farmacêuticas, as de fabricação de pesticidas e inseticidas. No Brasil, a

¹ Manancial: É qualquer local que tenha água e que possa ser retirada para uso. Fonte: UFCG.

Resolução Nº 357 de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente, CONAMA, é responsável por estabelecer os níveis aceitáveis dos poluentes na água para consumo humano (CONAMA, 2005).

A qualidade da água ingerida é um parâmetro fundamental para que se possa ter uma boa saúde (KARAVOLTSOS *et al*, 2008). Inúmeras doenças são provocadas pelo consumo de água contaminada com substâncias químicas, por isso, é necessário realizar o monitoramento dessas substâncias para controlar a qualidade do recurso hídrico. Para avaliar a contaminação dos mananciais, alguns parâmetros são estudados, tais como o nível de concentração de ânions, metais pesados, nível de concentração de cátions, pH e outros.

Dessa forma é de suma importância realizar estudos que visem avaliar e monitorar o nível de contaminação dos mananciais que abastecem a população de inúmeras cidades.

1.2 Importância da análise dos ânions na água

A análise de ânions na água é importante, uma vez que determinados íons em alta concentração podem provocar inúmeras doenças no organismo humano. Neste trabalho foram estudados os ânions cloreto, nitrato, nitrito, sulfato e sulfito em amostras de água. Dessa maneira, estarão expostas neste item as principais implicações provocadas pela ingestão de água com alto nível de concentração destes íons.

O controle da concentração de nitrato e nitrito em amostras de água natural é um importante indicador de sua qualidade (GONZALEZ *et al.*, 1994; CONNOLLY *et al.*, 2001; LEGNEROVÁ *et al.*, 2002; KODAMATANI *et al.*, 2009). Geralmente os compostos de nitrogênio são incorporados aos recursos hídricos por meio do escoamento superficial de fertilizante nitrogenado, pela deposição ácida e pelo lançamento de efluentes industriais sem tratamento (SPIRO *et al.*, 2009). A alta concentração de nitrito e nitrato em ambiente aquático atesta a presença excessiva de matéria orgânica, sendo o processo

de biodegradação deste material o responsável pela formação destes íons (BURAKHAM *et al.*, 2004).

Esse excesso de matéria orgânica promove o processo de eutrofização das águas, no qual ocorre o crescimento de grande quantidade de algas que provocam a oxidação do nitrito em nitrato, retirando o oxigênio dissolvido do ambiente, o que pode acarretar a morte dos peixes (ROZAN *et al.*, 2002).

A quantificação de nitrato e nitrito em diversas matrizes é de suma relevância devido ao seu efeito nocivo à saúde humana (GAPPER *et al.*, 2004; CABRAL *et al.*, 2007). O nitrato em nosso organismo é convertido em nitrito que reage com aminas secundárias e terciárias formando N-nitrosaminas, que são cancerígenas (WANG *et al.*, 1998; OKAFOR *et al.*, 2003). Além disso, o nitrito pode causar em bebês uma doença chamada metahemoglobinemia, na qual o íon NO_2^- converte o ferro (II) da hemoglobina a ferro (III) e isto limita a capacidade do sangue de transportar oxigênio dos pulmões para o resto do corpo. Estudos mais recentes mostraram ainda que a presença de concentrações elevadas de nitrato em água para o consumo humano (50 mg L^{-1}) pode afetar a atividade da glândula tireóide (ZAKI *et al.*, 2004).

A concentração do íon cloreto em águas naturais é baixa. Em águas despoluídas, normalmente, a concentração é menor que 10 mg L^{-1} , podendo, muitas vezes, estar próximo a 1 mg L^{-1} (OMS, 1984). Em um nível mais alto caracteriza a contaminação do ambiente aquático por esgoto sanitário, pois cada pessoa expele por dia através da urina cerca de 6 gramas de cloreto (APHA, 1998; CETESB, 2011). O excesso desse ânion é responsável pelo aumento do poder de corrosão da água (MACEDO, 2007).

O enxofre é uma espécie química abundante na crosta terrestre na forma de minerais do tipo sulfeto e em sulfato de cálcio e magnésio (SPIRO *et al.*, 2009). Ele também é encontrado em águas naturais, sendo o íon sulfato, facilmente achado em diferentes concentrações em meio aquático. A degradação de compostos de enxofre em ambientes aquático pode gerar inúmeros produtos tóxicos, como o ácido sulfídrico (H_2S), que pode causar sérios problemas à qualidade da água (MANAHAN, 2004).

Em sedimento e águas naturais é possível encontrar ainda espécies de enxofre nas mais diversas formas químicas tais como: sulfeto, sulfito e tiosulfato. (MIURA *et al.*, 2000; MIURA *et al.*, 2005; OHIRA *et al.*, 2006).

Segundo a resolução nº 357 do CONAMA (2005) o ânion sulfato também é considerado um parâmetro para atestar a qualidade da água. Geralmente o excesso de sulfato em água potável provoca efeito laxativo no organismo humano (MACEDO, 2007).

No Brasil, a portaria nº 518 do Ministério da Saúde de 25 de abril de 2004 é responsável por estabelecer os níveis aceitáveis dos ânions estudados na água potável. Na TABELA 1 são apresentados os valores dos ânions especificados nesta portaria.

TABELA 1: Padrão de aceitação dos íons em água para consumo humano.

Íons	VPM (mg L ⁻¹)
Cloreto	250
Nitrato	10
Nitrito	1
Sulfato	250

Fonte: Ministério da Saúde, portaria Nº 518
Valor máximo permitido (VPM)

Os valores máximos permitidos pela portaria nº 518 do Ministério da Saúde para os íons nitrato e nitrito são os mesmos preconizados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, *Environment Protection Agency* (EPA), órgão responsável por estabelecer inúmeras diretrizes relacionada ao meio ambiente (EPA, 2011).

1.3 Principais técnicas de análise de íons em amostras ambientais

As principais técnicas analíticas utilizadas para determinação simultânea de ânions em água, precipitações chuvosas e aerossóis

atmosféricos são: Eletroforese Capilar, Cromatografia de Íons e Cromatografia Líquida de alta eficiência com formação de par iônico.

A técnica mais empregada para análise de ânions em amostras ambientais é a Cromatografia de Íons (CI). As vantagens de utilização da CI estão relacionadas à sua alta sensibilidade, estabilidade e seletividade (TANNER *et al.*, 1996). Há na literatura inúmeros relatos do uso desta técnica na determinação de ânions em amostra de água de chuva. Entre eles: WILLIAMS *et al.*, 1997; TANAKA *et al.*, 2000; MELLO, 2001; LARA *et al.*, 2001; TANAKA *et al.*, 2001; VÁZQUEZ *et al.*, 2003; MELLO *et al.*, 2004; LEAL *et al.*, 2004; AL-KHASHMAN *et al.*, 2009; COELHO *et al.*, 2011; CONCEIÇÃO *et al.*, 2011. Em análise de águas naturais e de água potável também são encontrados alguns relatos: (STEINMANN *et al.*, 1995; MEDINA *et al.*, 1996; OHTA *et al.*, 1996; SAKAI *et al.*, 1996; GROS *et al.*, 1997; OHTA *et al.*, 1998; GETTAR *et al.*, 2000; MORALES *et al.*, 2000; JACKSON, 2001; BARRON *et al.*, 2005; MISKAKI *et al.*, 2007; AMIN *et al.*, 2008; TIRUMALESH, 2008).

A Eletroforese Capilar (EC) é uma técnica muito atraente para determinação simultânea de ânions, devido à sua versatilidade e simplicidade (COLOMBARA *et al.*, 1997). Na literatura é possível encontrar relatos da análise de ânions em amostra de água com esta técnica, entre eles pode-se citar: DABEK-ZLOTORZYNSKA *et al.*, 1997; VALSECCHI *et al.*, 1997; FUNG *et al.*, 1998; HISSA *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 1999; ALONSO *et al.*, 2000; ROCHA *et al.*, 2003 e GARCIA *et al.*, 2008. A desvantagem no uso desta técnica em análise de amostras ambientais, as quais possuem compostos com concentração na ordem de traço, é a sua baixa detectabilidade, quando não é utilizado um aparelho equipado com detector de massa.

Apesar de a CI ser a técnica mais usada para análise de íons em amostras ambientais, atualmente a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Pareamento Iônico (CLAEPI) tem sido usada para realizar este tipo de análise, devido à estabilidade e à eficiência da coluna de fase reversa (LANÇAS, 2009). A CLAEPI tem um baixo custo em relação à coluna e à instrumentação em comparação com a CI (GENNARO *et al.*, 1997). Além disso, o aparelho utilizado na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é mais versátil, já que não se limita apenas a análise de íons. Os métodos desenvolvidos por CLAEPI apresentam resolução e sensibilidade comparáveis

aos métodos empregados por CI, desde que o reagente de pareamento iônico (RPI) tenha sido escolhido adequadamente (GENNARO *et al.*, 1997).

Na literatura são encontrados artigos que utilizam a CLAEPI para análise dos ânions estudados por esse trabalho em matrizes de água e vinho, entre eles, podem ser citados os seguintes: MINGJIA *et al.*, 1988; GENNARO *et al.*, 1990; MARENGO *et al.*, 1992; GONZALEZ *et al.*, 1994; JUN *et al.*, 1996; KAZUAKI, 1997; MIURA *et al.*, 2000 ; BUTT *et al.*, 2001; CONNOLLY *et al.*, 2001; ZUO *et al.*, 2003; MIURA *et al.*, 2005; OHIRA *et al.*, 2006; ZUO *et al.*, 2006; AULER *et al.*, 2011. Como a proposta deste trabalho foi desenvolver um método para separação de ânions utilizando a CLAEPI, ela será melhor discutida no item 1.4.

1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência com pareamento iônico (CLAEPI) (ion-pair HPLC)

A CLAEPI é uma técnica aplicada na separação de espécies facilmente ionizáveis ou iônicas utilizando uma coluna de fase reversa (FR) (COLLINS *et al.*, 2006; SKOOG *et al.*, 2009). Nesse tipo de cromatografia, um reagente de pareamento iônico (RPI) é adicionado à fase móvel (FM), sendo ele um sal inorgânico, que contém um contra-íon orgânico de tamanho grande. Geralmente esse contra-íon deve ter carga oposta ao do analito que se deseja separar (SNYDER *et al.*, 1997; COLLINS *et al.*, 2006; LANÇAS, 2009).

Este reagente ficará retido na superfície da FR da coluna, devido à característica hidrofóbica do grupo alifático do contra-íon que terá maior afinidade pelas cadeias da FR, proporcionando a separação do analito (SNYDER *et al.*, 1997). Dessa maneira, teoricamente, a superfície da FR da coluna terá a carga que a ela foi atribuída devido à fixação do RPI. Porém, inicialmente, essa superfície ficará com carga neutra, pois o contra-íon forma uma ligação com o íon do próprio sal do RPI ou com o íon do tampão usado na fase móvel (SNYDER *et al.*, 1997).

O analito será retido quando ocorrer o processo de troca iônica com o íon do RPI. Na FIGURA 1 há um esquema que representa esse processo de troca iônica, na qual o íon do RPI (Br^-) é trocado pelo analito (A^-) na superfície da coluna (COLLINS *et al.*,2006).

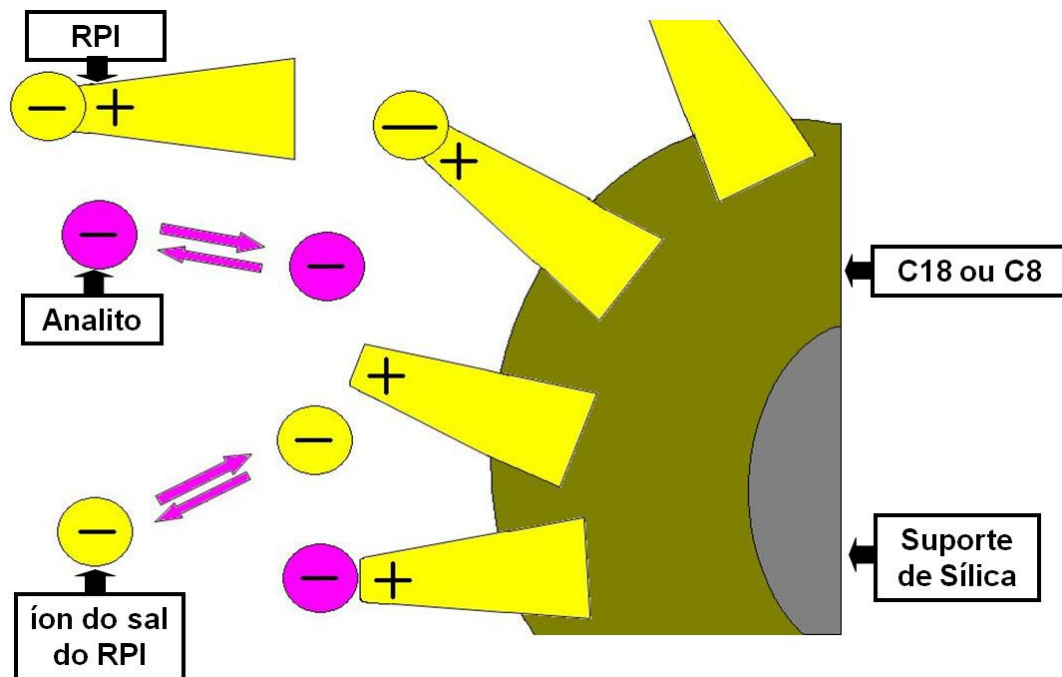


FIGURA 1: Representação do processo de troca iônica entre o RPI e o analito. Fonte: adaptação de SYNDER, 1997; COLLINS *et al.*,2006.

A troca iônica sozinha não é capaz de explicar todos os processos de separações que ocorrem por CLAEPI. Os mecanismos de retenção que ocorrem nesta técnica ainda estão sendo elucidados (LANÇAS, 2009).

O tipo de RPI usado na FM depende da natureza do soluto a ser analisado. Para análise de cátions empregam-se reagentes aniônicos, tais como butil ou dodecil sulfonato de sódio (LANÇAS, 2009). É recomendado utilizar um tampão para ajustar o pH da FM no intervalo entre 2,50 a 3,50, pois, dessa forma, a ionização do ácido fraco será reprimida (COLLINS *et al.*,2006). Já para a análise de ânions, é comum utilizar sais de alquil amônios como

tetrabutyl amônio (LANÇAS, 2009). Deve-se ajustar o pH da FM, com um tampão, no intervalo entre de 6,50 a 7,50, pois, dessa maneira, a ionização da base fraca será reprimida (COLLINS *et al.*,2006).

Na TABELA 2, há os principais RPI utilizado na CLAEPI e suas principais aplicações:

TABELA 2: Reagentes de pareamento iônico e suas principais aplicações.

Reagente de pareamento iônico	Aplicações
Aminas Quaternárias (por exemplo, tetrabutyl, tetraetil)	Ácidos fortes e fracos, corantes sulfurados, ácido carboxílicos.
Aminas Terciárias (por exemplo, trioctilamina)	Compostos sulfonados
Alquil- e arilsulfonatos (por exemplo, heptanossulfonato)	Bases fortes e fracas, catecolaminas
ácidos perclórico	Uso genérico; estabelece pares de íons com muitos compostos básicos.

Fonte: COLLINS *et al.*,2006.

Os RPI podem modificar a superfície da fase estacionária (FE) de maneira dinâmica ou permanente. O processo de modificação permanente é feito utilizando um surfactante com cadeia carbônica grande, que será imobilizado na FE da coluna. Neste tipo de modificação é eliminado o uso do RPI na FM, sendo assim, o custo da análise é reduzido. Além disso, a coluna imobilizada com o surfactante pode ser usada durante vários meses sem que haja perda de desempenho. Mas, se houver perda, é só realizar a regeneração da coluna com o surfactante novamente (CECCHI, 2007).

Já no processo de modificação dinâmica, o RPI é adicionado na FM promovendo o processo de separação dos analitos sem que este fique permanentemente retido na FE.

Em separações que envolvem analitos com pequenas diferenças na estrutura molecular, é recomendado o uso de RPI que possua em sua estrutura contra-íons pequenos. Para compostos que apresentam uma retenção maior,

são empregados RPI com contra-íons de cadeia maior e mais hidrofóbica (LANÇAS, 2009).

A FM utilizada geralmente é uma mistura de água e solvente orgânico (metanol ou acetonitrila). É recomendado que a coluna empregada na CLAEPI deva ser separada de outras colunas utilizadas para FR convencional, porque, com o tempo, os RPI podem alterar a seletividade da fase estacionária (FE) (LANÇAS, 2009).

Durante o desenvolvimento de um método por CLAEPI, os principais parâmetros que precisam ser otimizados são: o tipo de RPI utilizado, a concentração do RPI, a concentração do solvente orgânico que compõe a FM e o pH (COLLINS *et al.*, 2006; LANÇAS, 2009).

1.5 Área de estudo

O Rio Paraibuna nasce na serra da Mantiqueira a 1.200 m de altitude e, depois de percorrer 166 Km, lança-se à margem esquerda do Rio Paraíba do Sul a 250 m de altitude (PQA, 1999). A bacia do Rio Paraibuna é formada por três principais rios: o Paraibuna, o Cágado e o Peixe. Suas águas seguem no sentido noroeste-sul sudoeste e ao longo do seu leito recebe água de pequenos afluentes (CESAMA, 2011).

O Rio Paraibuna faz parte da bacia do Rio Paraíba do Sul localizada na Região Sudeste entre os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, totalizando numa área de drenagem de cerca de 55.500km² (ANA, 2001).

De acordo com a CESAMA (2011), 70% do curso do Rio Paraibuna corta a cidade de Juiz de Fora, apresentando um perfil longitudinal escalonado, com declividades mais amenas entre o Distrito Industrial I e o centro da cidade, sendo a declividade média do rio no município, numa extensão aproximada de 61 km, de 4m/km.

Segundo dados do Anuário Estatístico de Juiz de Fora (2010) o município apresenta um relevo bastante diversificado com colinas côncavo-convexo e vales, com altitudes compreendidas entre 700 e 900 metros. O clima

da cidade pode ser classificado como tropical de altitude, com duas estações bem definidas, uma mais quente e chuvosa e um menos quente e mais seca. A cidade possui cerca de 516.247 habitantes com uma frota de 180.200 veículos circulantes.

A Fundação Estadual do Meio Ambiente (FEAM) informou que estão cadastradas cerca de 2.000 indústrias no setor mineiro da bacia do rio Paraíba do Sul, entre metalúrgicas, químicas, têxteis, alimentícias, de papel e outras. Deste total cerca de 1.000 estão localizadas na sub-bacia do Rio Paraibuna e 83% das indústrias potencialmente poluidoras estão localizadas em Juiz de Fora (IGAM, 2008).

De acordo com dado do Projeto Qualidade das Águas e Controle da Poluição Hídrica (1999), as águas da bacia do Rio Paraibuna são as de pior qualidade de toda a bacia do Paraíba do Sul, principalmente no trecho próximo a Juiz de Fora, devido a intenso lançamento de esgotos residenciais e industriais. Dessa forma, este rio é considerado “morto” entre a cidade de Juiz de Fora e a Barragem de Joasal (CESAMA, 2011).

O desenvolvimento econômico de Juiz de Fora, associado ao grande crescimento populacional, tornou este município o principal responsável pela poluição desse rio, uma vez que é uma cidade industrializada na qual há predominância da indústria metalúrgica (CESAMA, 2011). Do total de esgoto lançado no curso do Rio Paraibuna, no ano de 2009, dentro da cidade de Juiz de Fora, apenas 9,76% foi tratado nas duas estações de tratamento de esgoto (ETE) que estão em funcionamento na cidade: ETE Barbosa Lage e ETE Barreira do Triunfo (ACESSO.COM, 2011).

A degradação das águas desse rio tem impacto altamente negativo, já que a busca de alternativa para a localização de fontes de abastecimento de água para consumo humano, particularmente nas cidades de médio e grande portes, tem significado investimentos cada vez mais elevados (CESAMA, 2011).

Logo, realizar estudos que visam monitorar a qualidade de água é de suma importância, pois fornecem dados para a cidade, que podem ser utilizados para direcionar as políticas públicas para conter a poluição dos recursos hídricos. Dessa forma, foram selecionados dez pontos de coleta que abrangem grande parte da área urbana da cidade de Juiz de Fora, sendo que a

coleta foi feita a partir das principais pontes da cidade. Na TABELA 3, há a ordem de coleta junto com os nomes das avenidas onde se encontram as pontes.

TABELA 3: Localização das pontes e os números dos pontos de coleta.

Pontos de coleta	Localização das pontes (Cruzamentos das avenidas)
1	Acesso Norte/ Honório Brito
2	Avenida Brasil/ próximo a rodoviária
3	Avenida Brasil/ Rui Barbosa
4	Avenida Brasil/ José Eutrópio
5	Avenida Brasil/ Rio Branco
6	Avenida Brasil/ Marechal Setembrino
7	Avenida Brasil/ Benjamin Constant
8	Avenida Brasil/ Halfeld
9	Avenida Brasil/ Carlos Otto
10	Avenida Brasil/ Nelson Silva

2. Objetivos

O objetivo principal do trabalho foi desenvolver uma metodologia analítica para separação dos íons (cloreto, nitrato, nitrito, sulfato e sulfeto) e a quantificação dos ânions (cloreto, nitrato, nitrito e sulfato) em amostras de águas superficiais por cromatografia líquida de alta eficiência com formação de par iônico (CLAEPI) e a detecção na região do ultravioleta (UV).

Objetivos Específicos

- Otimização dos parâmetros analíticos para determinação simultânea dos ânions de interesse por cromatografia líquida de alta eficiência com pareamento iônico e detecção UV/Vis.
- Desenvolvimento do coletor para águas e implementação da coleta de amostras de água superficial.
- Avaliação dos níveis de concentração de cloreto, nitrato, nitrito e sulfato em amostras de água.
- Validação da metodologia através de tratamento estatístico: análises de amostras fortificadas e amostra de referência certificada.

3. Material e Método

3.1 Material e reagentes

Todas as vidrarias utilizadas neste trabalho foram lavadas com detergente alcalino (Detertec, Vetec) e posteriormente com água corrente e por fim com água deionizada (Milipore-Mili-Q). Elas foram armazenadas em um ambiente limpo e seco para evitar contaminação por poeira ou por outro contaminante.

Em análises químicas realizadas por CLAE é necessário utilizar solventes orgânicos com alto grau de pureza para evitar a presença de interferentes durante o desenvolvimento do método de separação. Dessa forma, foram utilizados os seguintes solventes com alto grau de pureza (J.T Baker e Tedia): acetonitrila (ACN), metanol (MeOH), tetraidrofurano (THF).

Os RPI e os sais dos analitos foram obtidos com grau p.a da empresa Vetec, sendo eles: cloreto de sódio, nitrato de sódio, nitrito de sódio, sulfato de potássio e sulfato de sódio, brometo de tetraetilamônio (TEABr), brometo de tetrabutilamônio (TBABr), tris (hidroximetil) aminometano, cloreto de cetilpiridina (CPC) (Synth) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (Sigma Aldrich). Os demais reagentes utilizados também possuíam grau p.a e foram adquiridos da empresa Dinâmica, sendo eles: biftalato de potássio e trietanolamina. Os reagentes utilizados no preparo das soluções também possuíam alto grau de pureza, sendo eles: dihidrogenofosfato de potássio (Tedia), monohidrogenofosfato de potássio (Merck).

3.2 Preparo de soluções

Para iniciar o preparo das soluções padrões foi necessário primeiramente secar os sais dos analitos de interesse. O processo de calcinação consistia em levar uma determinada massa dos sais dos analitos na estufa com temperatura de 120° C durante 2 horas. Posteriormente, esses sais eram conservados em dessecado até o preparo das soluções.

As soluções padrões dos ânions, com concentração de 4000 mg L⁻¹, foram preparadas semanalmente pesando uma determinada massa do seu sal que era diluída com água deionizada (Millipore-Mili-Q), com resistividade igual a 18 MΩcm⁻¹. Sendo posteriormente filtrada em membrana de PTFE de 0,45 μm de porosidade e conservada a temperatura de -4° C. A solução padrão mistura de 200 mg L⁻¹ foi preparada diariamente a partir das soluções padrões individuais dos ânions.

As soluções dos RPI utilizadas para compor a FM foram preparadas a partir do reagente sólido, sendo posteriormente filtradas a vácuo (Sistema de filtragem holders Millipore) em membrana de PTFE de 0,45 μm de porosidade. Essas soluções foram preservadas sob refrigeração (4 °C) e utilizadas por até dois dias.

As soluções tampão fosfato utilizadas para compor a FM foram obtidas através da mistura conveniente das soluções de monohidrogenofosfato (0,05 mol L⁻¹) e dihidrogenofosfato (0,05 mol L⁻¹) de potássio conforme o pH desejado.

3.3 Amostragem

A metodologia adotada foi baseada em manuais técnicos de coleta de amostras de água das seguintes instituições: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), Companhia de Gestão dos Recursos Hídricos (COGERH) e no Serviço Geológico do Brasil.

3.3.1 Desenvolvimento do coletor

Para realizar a coleta das amostras de água foi desenvolvido um coletor pelo próprio grupo de pesquisa, NUPIS (Núcleo de instrumentação e separações analíticas). Ele foi construído utilizando uma estrutura metálica retangular na qual em seu centro foi afixada a garrafa de polietileno. Este mecanismo permitiu facilmente a troca das garrafas para coletas de diferentes amostras. As garrafas usadas para coleta foram previamente limpas em laboratório. Na FIGURA 2 tem-se a foto do coletor.



FIGURA 2: Foto do coletor desenvolvido pelo NUPIS para coleta de água do Rio Paraibuna, Juiz de Fora, MG.

3.3.2 Coleta das amostras

As amostras de água do Rio Paraibuna (Juiz de Fora, MG) foram recolhidas no dia 18 de setembro de 2011 entre 07:00 e 09:30 h. As amostras de água superficial foram coletadas em 10 pontos do Rio Paraibuna ao longo da avenida Brasil. A escolha dos pontos de coleta foi feita de maneira que englobasse a área mais urbanizada e a de maior tráfego de veículo da avenida. A identificação dos locais foi feita por meio de fotografias e descrição de coordenadas geográficas dos mesmos. As fotos de dois locais de coletas estão apresentadas na FIGURA 3.



FIGURA 3: Fotos dos locais de coleta: Ponto de coleta 10 (à esquerda) e Ponto de coleta 9 (à direita).

Para executar a coleta, o coletor foi lançado, a partir das pontes, até o leito do rio utilizando uma corda. A água superficial foi recolhida diretamente na garrafa de polietileno, que após o seu enchimento total foi içada até a ponte. A garrafa foi tampada, identificada e retirada do coletor, sendo posteriormente armazenada em uma caixa. Para cada local de coleta, uma nova garrafa foi

fixada no coletor. Ao final da coleta todas as amostras foram transportadas para o laboratório NUPIS, onde foram guardadas sobre refrigeração.

Na TABELA 4, encontram-se a identificação numérica das pontes de onde ocorreu a coleta junto com as coordenadas geográficas dos pontos de amostragens e os horários de recolhimentos das amostras. Na FIGURA 4 há um mapa com os locais das amostragens.

TABELA 4: Coordenadas geográficas dos locais de coleta junto com os horários das amostragens.

Pontos	Pontes Cruzamentos das avenidas	Coordenadas Geográficas		Horário (h)
1	Acesso Norte/Honório Brito	S 21° 71' 80.8"	N 43° 40' 60.8"	07:15
2	Brasil/Próximo a rodoviária	S 21° 73' 86.3"	N 43° 37' 15.7"	07:34
3	Brasil/Rui Barbosa	S 21° 74' 38.7"	N 43° 36' 34.4"	07:52
4	Brasil/José Eutrópio	S 21° 74' 38.7"	N 43° 36' 54.4"	07:57
5	Brasil/Rio Branco	S 21° 74' 52.9"	N 43° 35' 36.9"	08:15
6	Brasil/Marechal Setembrino	S 21° 74' 88.9"	N 43° 35' 21.1"	08:25
7	Brasil/Benjamin Constant	S 21° 75' 38.4"	N 43° 34' 66.3"	08:36
8	Brasil/Halfeld	S 21° 75' 96.6"	N 43° 34' 25.0"	09:02
9	Brasil/Carlos Otto	S 21° 76' 14.5"	N 43° 33' 88.0"	09:11
10	Brasil/Nelson Silva	S 21° 76' 17.5"	N 43° 33' 76.2"	09:20

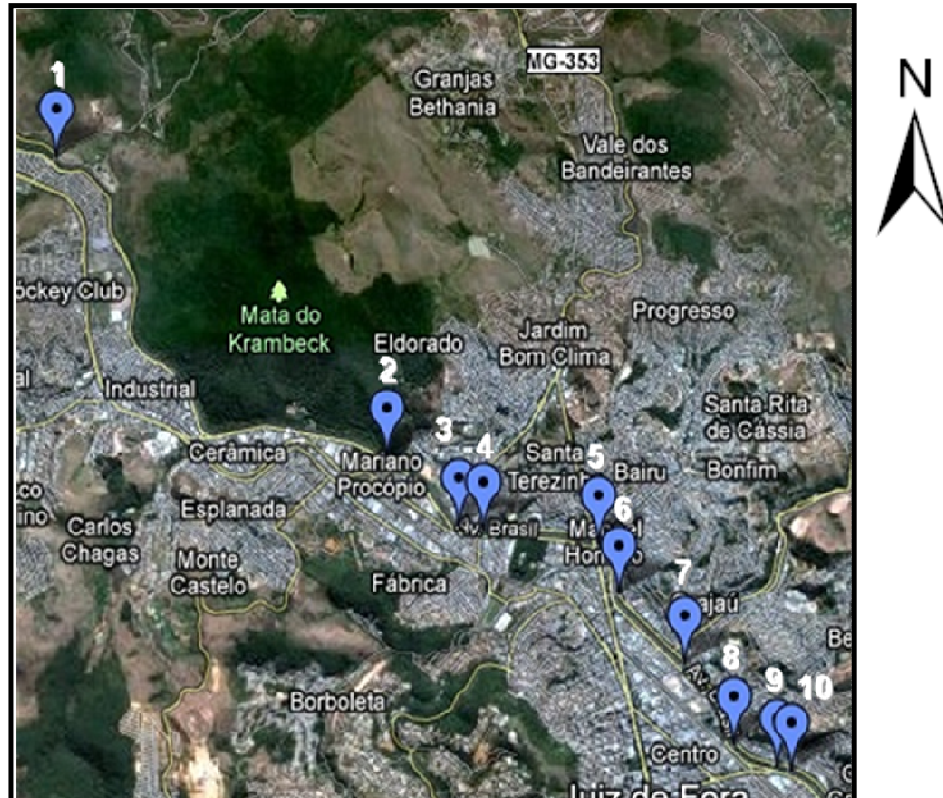


FIGURA 4: Mapas dos locais de coleta da cidade de Juiz de Fora. Fonte: GOOGLE MAPAS.

3.4 Preparo das amostras

Depois de coletadas, as amostras foram conservadas sobre refrigeração a 4º C, seguindo o procedimento descrito na literatura (CUNHA e MACHADO, 2003; MANAHAN, 2004). Posteriormente essas amostras passaram pelo processo de filtragem.

Na primeira etapa elas foram filtradas utilizando um filtro de papel para retirar o material particulado em suspensão. Na segunda etapa, o líquido resultante do primeiro processo foi novamente filtrado usando um filtro de membrana de PTFE de 0,45 µm de porosidade.

Em seguida, as amostras foram conservadas sobre refrigeração a -20°C até o momento da análise. Cabe ressaltar que as amostras foram injetadas diretamente no cromatógrafo sem sofrer qualquer diluição.

3.5 Medição do pH e da condutividade das amostras de água do rio

Para cada amostra coletada foi medido o pH usando um potenciômetro da Digimed DM 20 com eletrodo de vidro (Metrohm) combinado com eletrodo de referência de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ calibrado com soluções tampão Merck de pH 4,01 e pH 7,00. Além do pH, também foi medida a condutividade das amostras utilizando um condutivímetro da Digimed DM 31 com uma célula de condutividade. A calibração foi feita com solução padrão de cloreto de potássio da Digimed.

3.6 Otimização da análise por CLAE

O desenvolvimento do método por CLAEPI foi realizado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC Agilent 1100 Series), equipado com o software Agilent Chemstation LC Systems, empregando uma coluna de fase reversa C18 ZORBAX ODS (150 mm, 4,6 mm de D.I. e partículas de 5µm), um injetor manual com alça de amostragem de 20 µL e um detector UV-VIS de múltiplos comprimentos de ondas (MWD).

Conforme já citado anteriormente no item 1.4, os parâmetros a serem otimizados na CLAEPI são: a composição da FM, o tipo de RPI, a concentração do RPI na FM e o pH da FM. Dessa maneira, todas essas variáveis foram estudadas e avaliadas ao longo da execução do trabalho.

Os RPI selecionados para os estudos, bem com as composições iniciais da FM utilizadas no desenvolvimento do método foram baseados nos seguintes artigos da literatura: PAPP *et al.*, 1988; GONZALEZ *et al.*, 1994; JUN *et al.*, 1996; BUTT *et al.*, 2001; ZUO *et al.*, 2003; ZUO *et al.*, 2006.

3.6.1 Composição da fase móvel

A FM utilizada na CLAEPI depende do tipo de modificação empregada na FE e conseqüentemente do RPI que é utilizado. Se o RPI usado promover a modificação dinâmica da FE, a FM empregada deverá ser composta por água e solvente orgânico (MeOH ou ACN), sendo que o mais utilizado é o MeOH, pois os RPI são mais solúveis na mistura água/MeOH que na mistura água/ACN (COLLINS *et al.*, 2006; LANÇAS, 2009).

Se o RPI usado promover a modificação permanente da FE, a FM utilizada será composta por uma solução salina e um solvente orgânico. Sendo que a solução salina mais amplamente utilizada é a de biftalato de potássio. O Emprego do íon biftalato na FM provocará uma competição entre este íon e o analito, pelo contra-íon do RPI, que está imobilizado na coluna, no processo de

troca-iônica. Os solventes orgânicos estudados para compor a FM foram: MeOH, ACN e THF.

Devido ao lento equilíbrio que ocorre entre o RPI e a FE da coluna, é recomendado que a eluição dos analitos seja realizada em condições isocráticas (HARRIS *et al*, 2008).

Durante o desenvolvimento do método, o fluxo da FM também foi estudado, pois o emprego de um alto fluxo pode prejudicar a separação, uma vez que o analito irá passar pela coluna rapidamente, não tendo tempo suficiente de atingir o equilíbrio para a formação do par iônico.

3.6.1.1 Reagentes de pareamento iônico estudados para compor a fase móvel

Conforme mencionado no item 1.4, o RPI utilizado para compor a FM pode modificar a superfície da FE da coluna de maneira dinâmica ou permanente. Neste trabalho, foram estudados dois reagentes que promovem a modificação dinâmica (TEABr e TBABr) e dois que realizavam a modificação permanente (CPC e CTAB). A principal diferença entre os reagentes estudados é o caráter hidrofóbico da cadeia carbônica de cada um deles. Dessa forma, quanto maior for a cadeia carbônica do RPI maior será o seu caráter hidrofóbico. Nas FIGURAS 5 e 6 estão representadas as fórmulas estruturais dos reagentes estudados.

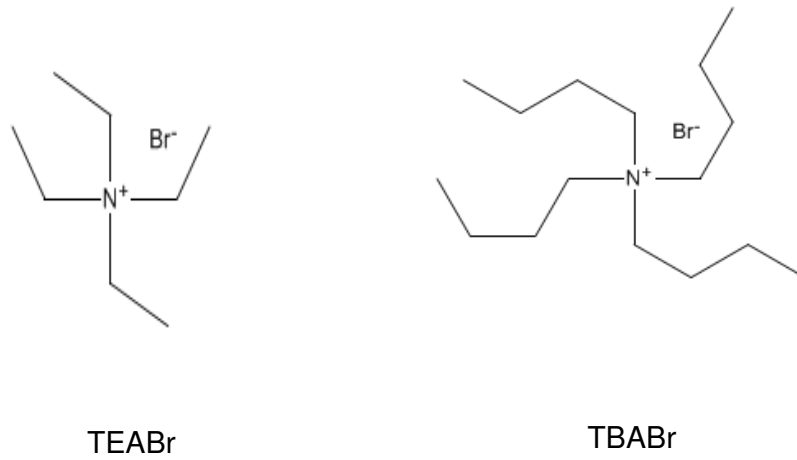


FIGURA 5: Fórmulas estruturais dos RPI que promovem a modificação dinâmica da FE: brometo de tetraetilamônio (TEABr) e o brometo de tetrabutilamônio (TBABr).

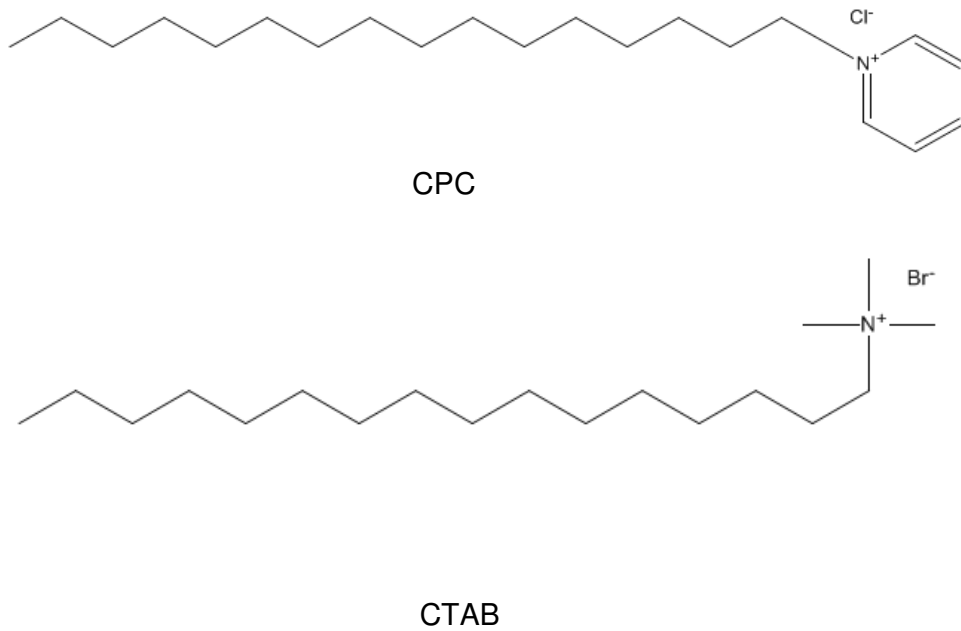


FIGURA 6: Fórmulas estruturais dos RPI que promovem a modificação permanente da FE : cloreto de cetilpiridina (CPC) e o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB).

3.6.1.2 Concentração do reagente de pareamento iônico na fase móvel

É importante estudar a concentração do RPI na FM, pois tanto na modificação dinâmica e como na permanente é possível variar o processo de retenção do analito por CLAEPI mudando a concentração do RPI. De maneira geral, a adsorção do RPI pela FE aumenta com o aumento da concentração do reagente na FM até atingir um limite.

Como neste trabalho foram estudados quatro RPI com caráter hidrofóbico diferente, foi necessário ajustar a concentração de cada um destes reagentes de maneira a alcançar condição de separação semelhante. Quanto maior for o caráter hidrofóbico do reagente menor deveria ser a sua concentração na FM, pois este reagente seria facilmente retido na superfície da FR e promoveria a retenção do analito. Enquanto que um reagente com caráter hidrofóbico menor necessitaria de uma concentração maior para promover a mesma separação, pois devido a esse baixo caráter, o reagente teria menor taxa de retenção na FE.

Logo, é necessário aumentar a concentração do RPI de menor caráter hidrofóbico para promover o mesmo nível de saturação alcançado pelo RPI com caráter hidrofóbico maior (SNYDER *et al.*,1997). Deve-se encontrar a condição de equilíbrio entre a concentração de RPI, conforme o seu caráter hidrofóbico para promover a separação desejada dos analitos.

A retenção do analito na coluna ocorre principalmente devido ao processo de troca iônica, sendo assim, a concentração do RPI não pode ser muito alta na FM. Pois haverá aumento na concentração do íon proveniente do sal do RPI e este competirá com o analito pelo contra-íon do RPI.

3.6.1.3 pH da fase móvel

Na CLAEPI, os métodos são desenvolvidos para separar e quantificar espécies ionizáveis, portanto o pH da FM tem suma importância nesse processo. O pH empregado na FM deve ser aquele que favoreça o analito estar na forma iônica (LANÇAS, 2009).

É sabido que um aumento no pH da FM implica em um aumento da ionização dos ácidos fracos e uma diminuição da ionização das bases fracas (SNYDER *et al.*, 1997). Como os ânions objetos desse estudo provêm de ácidos fortes (cloreto, nitrato e sulfato) e fracos (nitrito e sulfito), deve-se proceder de maneira a aumentar o pH da FM. Além de favorecer a ionização dos ácidos fracos, de acordo com ZUO (2003), o aumento do pH também é útil na separação de sulfito e sulfato. Outra condição limitante é o intervalo de pH de aplicação da coluna cromatográfica. Os limites de pH da coluna utilizada neste trabalho foram 2,00 a 8,00.

A faixa de pH estudada variou entre 6,50 e 7,90 e as substâncias utilizadas para realizar o ajuste de pH foram: trietanolamina, tampão fosfato e tris (hidroximetil) aminometano.

3.6.2 Seleção do comprimento de onda (λ) para análise

Em uma análise deve-se buscar um comprimento de onda no qual seja obtido um aumento da intensidade do sinal dos analitos, porque assim a sensibilidade do método é melhorada, bem com seus limites de detecção e quantificação. Dos íons analisados por este trabalho, três deles (cloreto, sulfato e sulfito) não absorvem na região do ultravioleta, por isso, sua detecção foi feita de maneira indireta. Nesse tipo de detecção, é utilizada uma FM que tenha alta absorvidade, pois quando o analito alcança o detector, o sinal referente à fase móvel irá diminuir, resultando em um pico negativo e dessa forma o analito será detectado.

A solução padrão mistura dos ânions (Mix) foi analisada em diversos comprimentos de ondas. O comprimento de onda escolhido para análise foi aquele que proporcionou, uma maior área dos picos dos analitos, menor interferência e menor ruído da linha de base.

Cabe salientar que como foram estudados quatro RPI diferentes cada um deles possui um comprimento de onda de máxima absorção. Sendo assim para cada RPI usado por este trabalho, foram estudadas faixas diferentes de comprimento de onda. A faixa de comprimento de onda estudada variou de 210 a 265 nm.

3.7 Pré-tratamento da coluna cromatográfica para imobilização do reagente de pareamento iônico com modificação permanente da fase estacionária

O RPI que modifica a FE de maneira permanente altera a superfície da FE da coluna, sendo assim, é necessário imobilizar este reagente na coluna antes da análise. O procedimento adotado para imobilização neste trabalho foi o descrito por ZUO (2003) e consiste das seguintes etapas:

- Primeira etapa: Limpeza da coluna

Essa limpeza foi feita utilizando ACN com um fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ durante 90 minutos.

- Segunda etapa: Processo de imobilização do RPI

Após a limpeza, a coluna foi eluída com uma FM composta por solução do RPI/ACN (93:7) com um fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ durante 3 horas para promover a imobilização do RPI.

3.8 Curva analítica

Para construir a curva analítica foram injetadas as soluções padrão mistura dos ânions na faixa de concentração de 2,00 a 20,00 mg L⁻¹ diluídos a partir de uma solução padrão mistura intermediária com concentração de 200,00 mg L⁻¹. No preparo da curva analítica, foram utilizados os níveis de concentração dentro da faixa de linearidade do método e faixa estimada para os níveis de concentração dos analitos na amostra.

A FIGURA 7 apresenta um fluxograma de preparação das soluções utilizadas para construção da curva analítica.

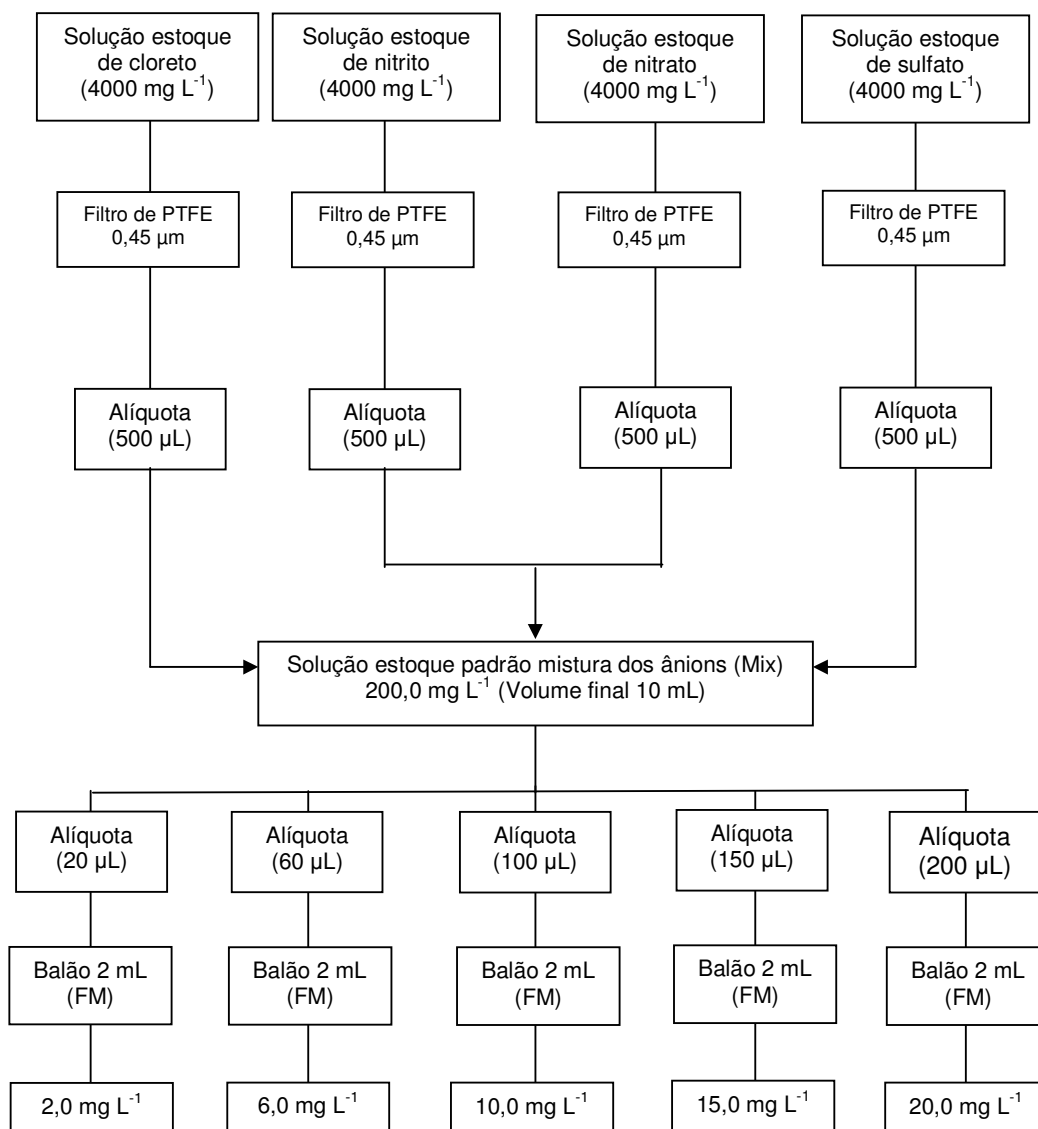


FIGURA 7: Fluxograma de preparação das soluções padrão mistura dos ânions (Mix) para a curva analítica.

3.9 Avaliação do Método

Para avaliar o método otimizado foi feita a análise de alguns parâmetros, dentre eles: linearidade, limites de detecção e quantificação, recuperação da amostra fortificada, análise do material de referência certificado e precisão intermediária. Todos esses estudos foram realizados com réplicas autênticas.

3.9.1 Estudo da linearidade do método

A avaliação da linearidade do método foi feita pela análise da variância, pela análise dos resíduos e pela análise do coeficiente de correlação da curva. Essa avaliação é necessária, pois a análise apenas do coeficiente de correlação da reta não é indicativo seguro do ajuste linear do modelo. Segundo RIBANI (2004), um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado somente como evidência de um ajuste ideal dos dados para linha de regressão e não uma certeza. Dessa maneira, é necessário realizar outras análises.

Para realização da análise da variância, os procedimentos experimentais foram feitos com repetições autênticas, de forma aleatória.

3.9.2 Limites de detecção e quantificação do método

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade de analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2004; HARRIS, 2005). O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser

determinada com um nível aceitável de precisão (INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

O LD e o LQ podem ser calculados de diferentes maneiras. Para o método desenvolvido por este trabalho foi utilizada a relação sinal-ruído. Para determinar a relação sinal-ruído, é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz ou um branco (matriz isenta do composto de interesse) desta amostra (RIBANI *et al.*,2004).

A relação sinal-ruído é indicativo da probabilidade que um determinado pico, em uma linha base ruidosa, represente o sinal do analito. Esta relação é estimada utilizando as medições da altura do pico em relação ao ruído da linha base (GROB e BARRY,2004).

Para encontrar a relação sinal-ruído foi usada uma solução padrão mistura com baixa concentração conhecida dos compostos de interesse. Com a análise desta solução, foi determinado o desvio padrão do ruído referente à resposta do detector em unidade de área (mUA·s).

Para calcular os limites de detecção e quantificação foram utilizadas as seguintes equações:

$$LD = \frac{3 \times \text{desvio padrão}}{\text{Coeficiente angular}} \quad (\text{EQUAÇÃO 1})$$

$$LQ = \frac{10 \times \text{desvio padrão}}{\text{Coeficiente angular}} \quad (\text{EQUAÇÃO 2})$$

3.9.3 Estudo de recuperação da amostra fortificada

A análise da amostra fortificada é feita para avaliar a exatidão e a precisão do método. Para analisar esses parâmetros é determinada a recuperação dos analitos adicionados à amostra. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ (RIBANI *et al.*, 2004).

Para efetuar o estudo de recuperação primeiro foi realizada a análise de uma amostra de água do Rio Paraibuna. Estimadas as concentrações dos íons, uma alíquota dessa amostra foi fortificada da seguinte maneira: uma alíquota de 80 μL da solução padrão mistura contendo cloreto (Cl^-), nitrato (NO_3^-) e sulfato (SO_4^{2-}) com concentração de 200 mg L^{-1} foi adicionada a 1,00 mL da amostra de água do Rio Paraibuna e posteriormente, o volume foi completado para 2,00 mL com água deionizada. A fortificação da amostra foi realizada em nível de concentração de 10 mg L^{-1} . Tanto a análise da amostra de água de rio quanto a amostra fortificada foram realizadas em triplicata na condição otimizada para análise.

3.9.4 Análise do material de referência certificado

A avaliação da exatidão do método otimizado por este trabalho foi feito por meio da análise do material de referência certificado (MRC). Foi adquirida pelo NUPIS uma amostra certificada de água de chuva (*major elements in rain water-high contents*) BCR-151 da *European Commission (Institute for Reference Materials and Measurements)* para fazer essa determinação. Cabe salientar que essa amostra de MRC apresenta um nível de concentração dos ânions de interesse menor que o nível de concentração encontrado nas amostras de água de rio. Para avaliar a presença de interferentes na amostra sobre a separação dos analitos foi utilizada a amostra fortificada.

A amostra MRC de água de chuva possuía três dos cinco ânions estudados, sendo eles: cloreto, nitrato e sulfato. Segundo o certificado de análise, as concentrações destes íons e os seus respectivos intervalos de confiança são: $(4,00 \pm 0,07 \text{ mg L}^{-1})$ para cloreto, $(4,84 \pm 0,06 \text{ mg L}^{-1})$ para nitrato e $(5,10 \pm 0,07 \text{ mg L}^{-1})$ para sulfato. A amostra certificada foi injetada diretamente, sem sofrer diluição, em triplicata na condição final estabelecida para análise dos ânions.

3.9.5 Precisão intermediária do método

A precisão intermediária refere-se a precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definido exatamente quais as condições a variar (uma ou mais) tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes dias (INMETRO, 2003). O objetivo de validar a precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá resultados semelhantes (RIBANI *et al.*, 2004).

Para determinar a precisão intermediária do método desenvolvido por este trabalho foi usado uma solução padrão mistura com concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ que foi injetada, na condição final de análise dos ânions, em diferentes dias. Baseado na trombeta de Horwitz o desvio padrão relativo aceito para o nível de concentração (mg L^{-1}) estudado neste trabalho é de 20% (HORWITZ, 1982; HARRIS, 2008).

4. Resultados e Discussões

Para melhor compressão desta seção ela foi dividida em duas partes: desenvolvimento do método e análise das amostras. Na primeira parte, são descritos todos os estudos realizados com os diferentes RPI testados (TEABr, TBABr, CPC e CTAB). Nesta etapa, para cada RPI estudado, foram testados e avaliados os seguintes parâmetros: concentração do RPI, percentual de solvente orgânico e pH da FM. Na segunda parte, são discutidos os resultados das amostras obtidos com o método otimizado por este trabalho.

4.1 Estudos realizados com os reagentes de pareamento iônico com modificação dinâmica da fase estacionária

4.1.1 Brometo de Tetraetilamônio (TEABr)

4.1.1.1 Estudo da composição da fase móvel sem ajuste de pH

Conforme foi relatado no item 3.6.1, na CLAEPI a FM é composta por uma solução aquosa do RPI e um solvente orgânico, dessa forma, iniciou-se o estudo com esse reagente variando a concentração do TEABr na FM. De acordo com o que foi relatado no item 3.6.1.2, é importante estudar a concentração do RPI na FM, pois é possível variar o processo de retenção do analito na FE. Assim, foram testadas três concentrações de TEABr (1,00; 10,0 e 100,0 mmol L⁻¹), sendo que para cada uma delas, a proporção de solvente orgânico e o fluxo da FM foram variados. O solvente orgânico utilizado foi o MeOH e sua proporção na FM variou de 0 a 10% (v/v).

Para cada nova composição de FM foi realizada a injeção da solução padrão mistura dos ânions (Mix) de concentração de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$. A identificação dos picos obtidos com a injeção do Mix foi realizada por meio de comparação com os cromatogramas obtidos com a injeção das soluções individuais dos íons na mesma composição de FM.

Os testes realizados utilizando a solução de $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEABr não foram capazes de promover a separação dos ânions estudados, pois os compostos eluíam rapidamente. Pela análise do cromatograma gerado por esse experimento, que está apresentado na FIGURA 8, foi observado que os íons nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) coeluíam no pico indicado pelo número 4 e que o íon cloreto (Cl^-) eluía no pico negativo indicado pelo número 3. Além disso, foi percebido que em todas as condições estudadas havia a coeluição dos íons sulfato (SO_4^{2-}) e sulfito (SO_3^{2-}) com os sinais referentes ao solvente, água deionizada, utilizada no preparo das soluções que são representados no cromatograma pelo pico número 1.

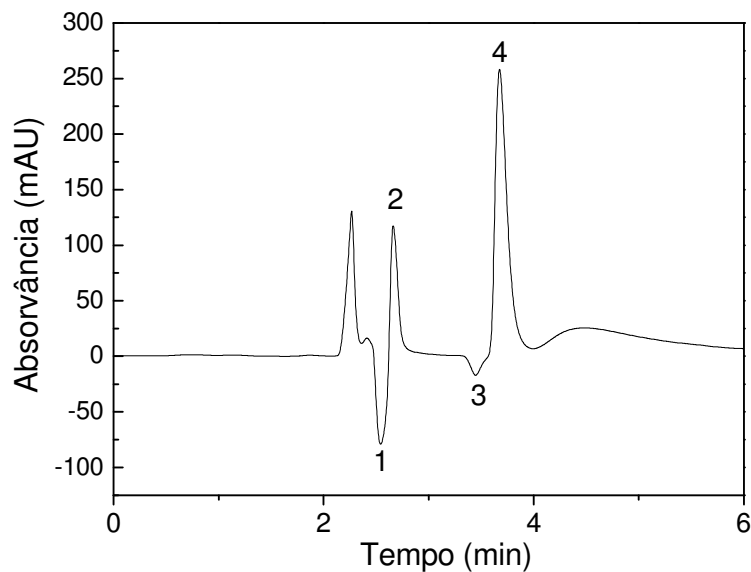


FIGURA 8: Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). Fase móvel composta por uma solução de $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEABr/MeOH (92:8 v/v), fluxo de $0,50 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção em: 220 nm . Ordem de eluição: 1- H_2O , 2- H_2O , SO_3^{2-} , SO_4^{2-} , 3- Cl^- , 4- NO_2^- , NO_3^- . Coluna de RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 μm); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 μm).

Sabendo que, dentre os RPI estudados, o TEABr possui o menor caráter hidrofóbico, isto é, não é tão fortemente retido pela FE da coluna, optou-se por aumentar sua concentração na FM a fim de observar uma melhora na separação dos íons. Por isso, uma solução com concentração de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEABr foi estudada.

Com a solução de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEABr foi alcançada a separação entre os íons NO_2^- e NO_3^- , porém, ocorreu a coeluição entre os ânions Cl^- , SO_4^{2-} e SO_3^{2-} e os picos referentes à água deionizada. Observou-se também que o aumento da proporção de MeOH na FM resultou na diminuição do tempo de retenção do NO_3^- e NO_2^- . O cromatograma obtido para esta concentração de TEABr é mostrado na FIGURA 9.

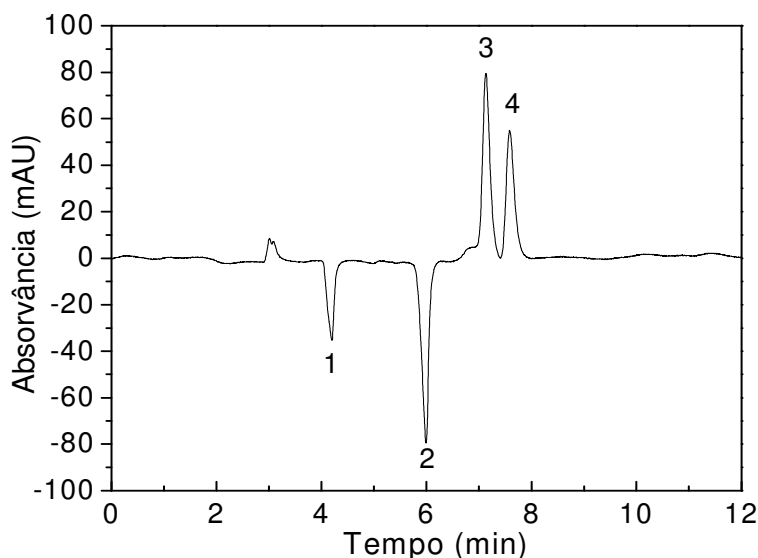


FIGURA 9: Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). Fase móvel composta por uma solução de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TEABr/ MeOH (90:10 v/v), fluxo de $0,50 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção em: 220 nm . Ordem de eluição: 1- H_2O , 2- H_2O , Cl^- , SO_3^{2-} , SO_4^{2-} , 3- NO_2^- , 4- NO_3^- . Coluna de RP C18 ZORBAX ODS ($150,0 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); coluna de guarda ZORBAX ODS ($12,5 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$).

Segundo LANÇAS (2007), o aumento na concentração do RPI na FM resulta em um aumento no tempo de retenção do analito. Para aumentar o tempo de retenção dos íons SO_4^{2-} e SO_3^{2-} que eluíam no início do

cromatograma, foi estudada uma solução de TEABr com concentração de 100 mmol L⁻¹.

Os experimentos realizados com a solução de TEABr com concentração de 100,0 mmol L⁻¹ também não foram eficientes na separação dos analitos, já que os íons Cl⁻, SO₄²⁻ e SO₃²⁻ continuaram a coeluir com os picos referente a água deionizada. Além disso, essa concentração provocou a coeluição entre o íon NO₃⁻ e NO₂⁻, que haviam sido separados utilizando a solução de TEABr com concentração de 10,0 mmol L⁻¹.

A diminuição da resolução dos picos de interesse, provocada pelo aumento excessivo da concentração do TEABr, é provavelmente explicada, pelo aumento na concentração do íon brometo, que constitui o sal do RPI. O processo de retenção na CLAEPI é governado principalmente pela troca iônica, dessa maneira, possivelmente o excesso do íon brometo na FM impossibilitou a competição do analito pelo RPI (SNYDER *et al.*,1997). Na FIGURA 10, é apresentado o cromatograma obtido por este experimento.

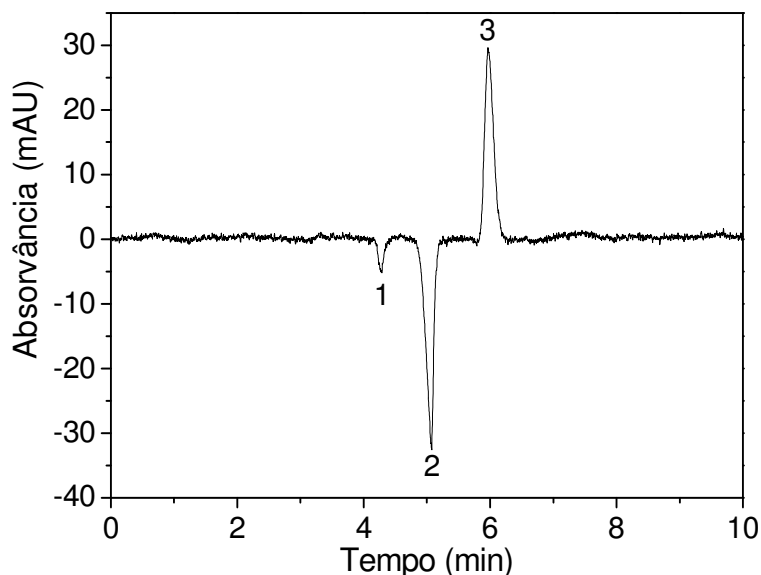


FIGURA 10: Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions (500 µmol L⁻¹). Fase móvel composta por uma solução de 10,0 mmol L⁻¹ de TEABr/MeOH (96:4 v/v), fluxo de 0,50 mL min⁻¹. Detecção em: 220 nm. Ordem de eluição: 1-H₂O, 2-H₂O, Cl⁻, SO₃²⁻, SO₄²⁻, 3-NO₂⁻, NO₃⁻. Coluna de RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 µm); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, 5 µm).

Em paralelo com os experimentos realizados, para determinar a concentração de TEABr que deveria compor a FM, também foi examinado o fluxo. A faixa de fluxo estudado variou de 0,50 a 1,00 mL min⁻¹.

Por meio dos inúmeros testes que foram feitos variando o fluxo, foi observado que o seu aumento provocou a coeluição entre os íons NO₃⁻ e NO₂⁻. Além disso, é possível que este aumento no fluxo tenha prejudicado a formação do par iônico entre o RPI e o analito. Pois, o alto fluxo passou a carregar mais rapidamente o RPI pela coluna, dificultando assim sua fixação na FE. Dessa maneira, o melhor fluxo para análise foi o 0,50 mL min⁻¹.

O estudo do comprimento de onda para detecção foi realizado variando o λ de 210 a 235 nm. Em método cromatográfico com detecção na região do ultravioleta-visível é importante buscar comprimento de onda em que se tenha um aumento significativo do sinal dos analitos, pois, assim, a sensibilidade do método é melhorada. No caso desse reagente, o comprimento de onda no qual era obtida a maior intensidade dos sinais dos íons e menor ruído da linha de base foi em 220 nm.

Observou-se que, promovendo apenas a variação da concentração TEABr na FM, não foi possível separar os analitos de interesse. Sabendo que o pH da FM é muito importante para a separação na CLAEPI, foi efetuado um estudo no qual foram variados, ao mesmo tempo, a concentração do RPI e o pH. Os resultados obtidos com esse experimento serão discutidos no próximo item.

4.1.1.2 Estudo da composição da fase móvel com ajuste de pH

Iniciou-se este estudo testando três concentrações diferentes de TEABr (1,00; 5,00 e 10,0 mmol L⁻¹), sendo que o pH de cada solução estudada foi ajustado para o valor de 7,50. Nesta etapa, dois reagentes químicos (trietanolamina e o tampão fosfato) foram utilizados para realizar o ajuste de pH da solução de TEABr. Este ajuste de pH foi feito usando um pequeno incremento do reagente químico até alcançar o pH desejado.

O solvente orgânico usado para compor a FM foi o MeOH e sua proporção variou de 0 a 10% (v/v). O melhor fluxo de análise foi o de 0,50 mL min⁻¹.

Apesar da variação simultânea do pH e da concentração do RPI na FM, não foi possível, utilizando o TEABr, encontrar uma condição que separasse os analitos.

RPI com contra-íon pequeno, como é o caso do TEABr, são indicados para separação de compostos que têm pequenas diferenças na sua estrutura molecular (LANÇAS, 2009). Porém este fato não foi observado na separação entre NO₃⁻ e NO₂⁻ ou SO₄²⁻ e SO₃²⁻. Isto pode ser explicado baseado no baixo caráter hidrofóbico do TEABr.

É provável que devido a esse baixo caráter, o TEABr apresente menor retenção na FE, não havendo tempo suficiente para atingir o equilíbrio para formação do par iônico com os analitos e promover a retenção dos mesmos.

Por isso, foi necessário realizar outro estudo utilizando um RPI com um caráter hidrofóbico maior do que o TEABr, para assim aumentar a retenção dos analitos. Portanto, com esta finalidade foram realizados experimentos empregando o TBABr.

4.1.2 Brometo de Tetrabutilamônio (TBABr)

4.1.2.1 Estudo da composição da fase móvel sem ajuste do pH

O TBABr é um reagente de modificação dinâmica da FE que possui um caráter hidrofóbico maior que o TEABr. Portanto, conforme foi relatado no item 3.6.1.2, quanto maior o caráter hidrofóbico menor deve ser a concentração do RPI na FM, dessa forma, foram testadas as seguintes concentrações: 0,50; 1,00 e 1,25 mmol L⁻¹. O solvente orgânico usado para compor a FM, junto com TBABr, foi o MeOH e sua proporção variou de 9 a 14% (v/v).

Para cada concentração de TBABr empregada foi encontrada uma condição na qual era possível separar os ânions estudados. Portanto, para determinar qual seria a concentração de TBABr adequada para constituir a FM, foi analisado o fator de retenção (K) para cada analito. Este fator é determinado pela razão entre a quantidade das moléculas que ficam retidas na FE e as que percorrem a FM (SKOOG *et al.*,2009). O fator de retenção (K) foi calculado de acordo com a equação 3.

Os valores de K calculados para cada concentração de TBABr testada são apresentados na TABELA 5, sendo que os espaços não preenchidos na tabela são aqueles nos quais a proporção de MeOH na FM não foi suficiente para separar os cinco analitos ou nos quais há um decréscimo muito grande de resolução entre os picos do NO₃⁻ e NO₂⁻.

$$K = \frac{\text{tempo de retenção do analito}}{\text{tempo de retenção do pico adjacente}} \quad (\text{EQUAÇÃO 3})$$

A condição que apresentou os maiores valores de fator retenção para os íons ocorreu quando a FM era constituída pela mistura da solução de TBABr com concentração de $1,25 \text{ mmol L}^{-1}$ e MeOH na proporção 89:11 respectivamente (TABELA 5). O cromatograma obtido com esta condição de análise é mostrado na FIGURA 11.

TABELA 5: Fator de retenção obtido para eluição com FM composta pela mistura de diferentes concentrações de TBABr e MeOH.

Analito	Composição da FM (TBABr/MeOH)	Fator de retenção (K)		
		0,50 mmol L ⁻¹	1,00 mmol L ⁻¹	1,25 mmol L ⁻¹
Cloreto	(89,5:10,5)	-	1,605	-
	(89:11)	1,351	1,408	1,716
	(88:12)	1,141	1,167	1,373
	(87:13)	-	-	1,144
	(86:14)	-	-	0,961
Nitrito	(89,5:10,5)	-	1,827	-
	(89:11)	1,531	1,610	1,911
	(88:12)	1,291	1,333	1,543
	(87:13)	-	-	1,291
	(86:14)	-	-	1,085
Nitrato	(89,5:10,5)	-	2,045	-
	(89:11)	1,661	1,798	2,119
	(88:12)	1,422	1,478	1,692
	(87:13)	-	-	1,409
	(86:14)	-	-	1,177
Sulfito	(89,5:10,5)	-	2,196	-
	(89:11)	1,800	1,973	2,272
	(88:12)	1,611	1,695	1,907
	(87:13)	-	-	1,655
	(86:14)	-	-	1,430
Sulfato	(89,5:10,5)	-	2,537	-
	(89:11)	2,340	2,308	2,566
	(88:12)	2,039	1,992	2,187
	(87:13)	-	-	1,916
	(86:14)	-	-	1,680

- = Valores não calculados.

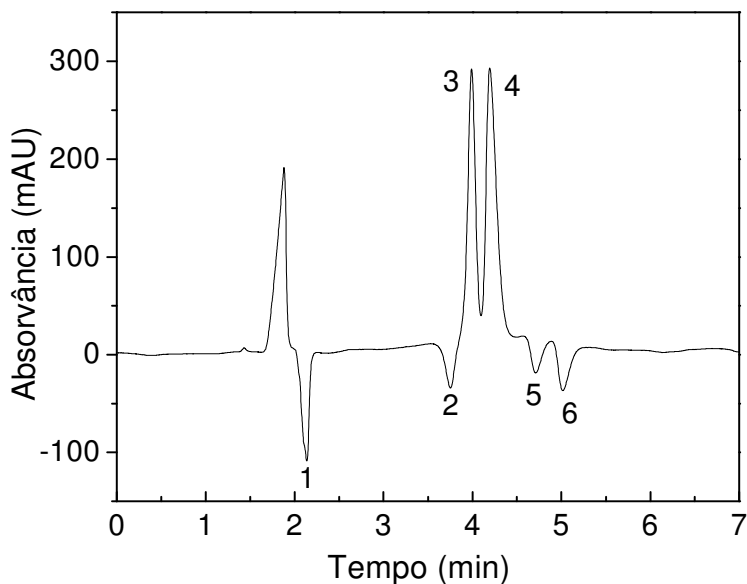


FIGURA 11: Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). Fase móvel composta por uma solução de $1,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de TBABr/MeOH (89:11 v/v), fluxo de $1,00 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção em: 214 nm . Ordem de eluição: 1- H_2O , 2- Cl^- , 3- NO_2^- , 4- NO_3^- , 5- SO_3^{2-} , 6- SO_4^{2-} . Coluna de RP C18 ZORBAX ODS ($150,0 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); coluna de guarda ZORBAX ODS ($12,5 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$).

O fluxo influenciou pouco na separação dos analitos e por este motivo o seu aumento gerou apenas diminuição no tempo de retenção. Logo, o melhor fluxo para análise foi obtido com $1,00 \text{ mL min}^{-1}$.

O estudo do comprimento de onda para detecção foi realizado variando o λ de 214 a 254 nm . No caso do TBABr, o comprimento de onda no qual era obtida a maior intensidade dos sinais dos íons foi em 214 nm .

Determinada a concentração de TBABr que foi utilizada para constituir a FM, o pH da solução passou a ser avaliado, uma vez que esta variável influencia na separação.

4.1.2.2 Estudo da composição da fase móvel com ajuste de pH

Segundo a literatura, o intervalo de pH recomendado para análise de compostos derivados de ácidos deve estar de 6,50 a 7,50. Nesta faixa de pH, forma-se o par iônico com íons de ácidos fortes ou fracos, enquanto o tamponamento reprime a ionização das bases fracas (COLLINS *et al.*, 2006; LANÇAS, 2009). Para realizar o ajuste do pH da solução de $1,25 \text{ mmol L}^{-1}$ TBABr, foram utilizados os seguintes reagentes: a trietanolamina e uma solução de monohidrogenofosfato de potássio ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$). Pequenos incrementos destes reagentes foram adicionados à solução de TBABr até atingir o pH desejado. Lembrando que o valor de pH medido da solução de TBABr antes de realizar o ajuste de pH foi de 5,80. Os experimentos realizados usando a trietanolamina não foram satisfatórios, pois, como pode ser observado na FIGURA 12, não era possível separar os ânions, uma vez que houve coeluição dos analitos no início do cromatograma. Para todos os valores de pH testados, utilizando a trietanolamina, o perfil cromatográfico obtido foram parecidos com o da FIGURA 12.

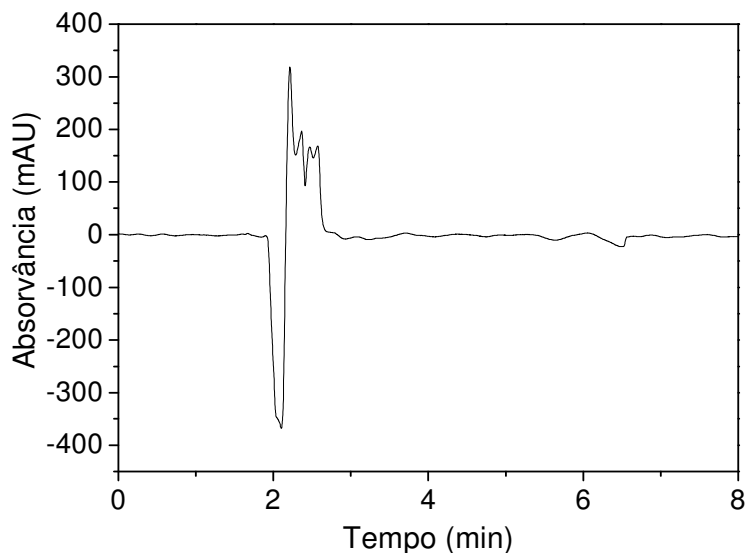


FIGURA 12: Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). Fase móvel composta por uma solução de $1,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de TBABr (pH=7,53) (ajustado com trietanolamina)/MeOH (91:9 v/v), fluxo de $1,00 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção em: 214 nm. Coluna de RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, $5 \mu\text{m}$); coluna de guarda ZORBAX ODS (12,5 mm x 4,6 mm, $5 \mu\text{m}$).

No estudo realizado utilizando a solução de monohidrogenofosfato de potássio ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), para ajustar o pH da solução de TBABr, foi observado que também não houve favorecimento na separação dos analitos. Por meio da análise do cromatograma da FIGURA 13, foi constatado que havia coeluição entre os íons SO_4^{2-} e SO_3^{2-} e que o íon Cl^- também coeluía com o pico referente à água deionizada utilizada no preparo das soluções.

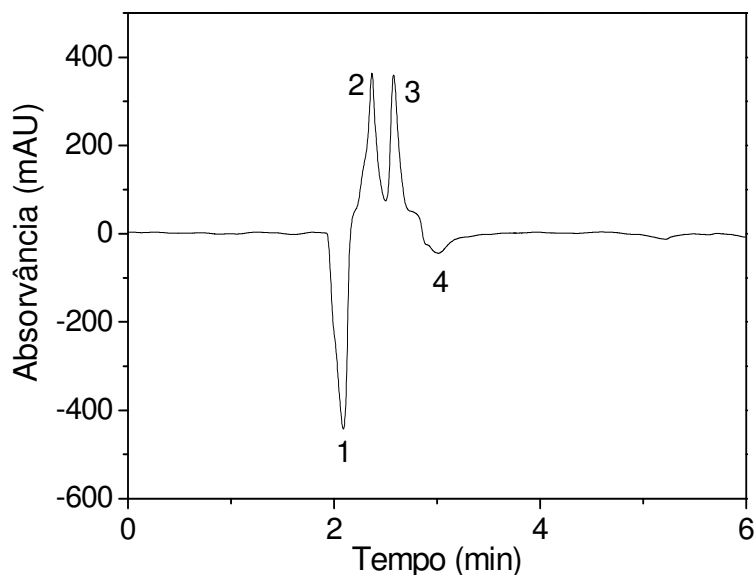


FIGURA 13: Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). Fase móvel composta por uma solução de $1,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de TBABr (pH = 7,53) (ajustado com a solução de monohidrogenofosfato de potássio)/MeOH (95:5 v/v), fluxo de $1,00 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção em: 214 nm. Ordem de eluição: 1- H_2O , Cl^- , 2- NO_2^- , 3- NO_3^- , 4- SO_3^{2-} , SO_4^{2-} . Coluna RP C18 ZORBAX ODS ($150,0 \times 4,6 \text{ mm}$, $5\mu\text{m}$); coluna de guarda ZORBAX ODS ($12,5 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5\mu\text{m}$).

Uma dificuldade enfrentada ao usar o sal de fosfato para ajustar o pH foi o fato de sua solubilidade diminuir a medida que a proporção de solvente orgânico aumentava na FM. Essa diminuição na solubilidade do sal provocou precipitação do mesmo dentro do sistema cromatográfico, acarretando em aumento de pressão, o que poderia ter causado danos irreversíveis à coluna.

Observou-se com esse estudo que o ajuste de pH da FM prejudicou a separação, pois em alguns casos não foi possível separar os íons de interesse e em outros houve coeluição entre alguns analitos. A perda de

resolução na separação, provocada pelo ajuste de pH pode ser explicada baseado-se no fato de que, em valores altos de pH o íon OH⁻, presente no meio, irá competir com o analito pelo contra-íon do TBABr (TBA⁺) retido na FE da coluna. Dessa forma, ocorre diminuição na retenção do analito pelo contra-íon do RPI. Logo, ficou estabelecido que, ao utilizar o TBABr, não era conveniente ajustar o pH.

4.1.2.3 Solventes orgânicos empregados para compor a fase móvel em conjunto com a solução de TBABr de 1,25 mmol L⁻¹

Para avaliar a qualidade dos dados obtidos com a FM constituída de uma solução de 1,25 mmol L⁻¹ de TBABr e MeOH na proporção 89:11, foram analisados alguns parâmetros cromatográficos, entre eles: fator de simetria (A), que pode apresentar valores entre 0,90 e 1,30 (SNYDER *et al.*,1997); resolução (R) dos picos maior que 1,25, devendo-se evitar valores abaixo de 1,00 (COLLINS *et al.*,2006) e fator de separação (α) que deve ser o maior valor possível.

O fator de separação (α) é calculado pela razão entre os respectivos fatores de retenção que, por sua vez, são relacionados aos tempos de retenção ajustados de acordo com a equação 4 (COLLINS *et al.*,2006):

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{tr'_2}{tr'_1} \quad (\text{EQUAÇÃO 4})$$

α : Fator de separação

K_1 e K_2 : Fator de retenção

tr'_1 e tr'_2 : Tempo de retenção ajustado

A resolução entre os picos dos compostos foi calculada de acordo com a equação 5:

$$R = \frac{(2,35/2)(tr_b - tr_a)}{W_{1/2a} + W_{1/2b}} \quad (\text{EQUAÇÃO 5})$$

tr_a e tr_b : tempos de retenção dos compostos adjacentes

$W_{1/2a}$ e $W_{1/2b}$: largura do pico à meia altura dos picos adjacentes

Pela análise dos parâmetros cromatográficos que estão expressos na TABELA 6, obtidos nessa condição de FM, foi observado que alguns desses parâmetros não estavam em concordância com os limites aceitáveis, sendo assim, outros solventes orgânicos foram avaliados com o intuito de melhorar estes parâmetros. Dessa forma, foram testados a ACN e o THF para compor a FM. Ao utilizar o THF, não foi possível encontrar uma condição na qual fosse possível separar os ânions.

TABELA 6: Parâmetros cromatográficos obtidos para análise da mistura padrão dos ânions ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$) no HPLC, eluído na coluna RP C18 ZORBAX, fase móvel composta por solução $1,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de TBABr/MeOH (89:11), fluxo $1,00 \text{ mL min}^{-1}$ e comprimento de onda de detecção 214 nm.

Analito	Simetria (A)	Resolução (R)	F. de retenção (K)	F. de separação (α)
Cloreto	0,943	0,568	1,719	1,092
Nitrito	0,841	1,555	1,911	1,113
Nitrato	0,586	0,940	2,119	1,036
Sulfito	0,769	2,010	2,272	1,072
Sulfato	0,757	1,111	2,566	1,041

No estudo realizado com ACN, foi utilizada uma proporção menor deste solvente na FM em comparação com a proporção de MeOH. Esta diminuição foi necessária para evitar o risco de precipitação do RPI no sistema cromatográfico, uma vez que o RPI é menos solúvel em ACN. Por meio da análise dos cromatogramas gerados por este experimento foi

observado que houve perda de eficiência uma vez que os picos se apresentavam largos.

Como a utilização da ACN para compor a FM não foi satisfatória, avançou-se o estudo utilizando uma mistura de MeOH e ACN. A somatória da proporção dos dois solventes orgânicos na FM foi mantida constante em 11% e a melhor condição de separação foi obtida com 10% de MeOH e 1% de ACN. Na TABELA 7, são apresentados os parâmetros cromatográficos obtidos com essa condição de FM.

Porém, ao analisar os parâmetros obtidos com essa condição, foi constatado que não houve melhora significativa nos valores dessas variáveis se comparados aos obtidos com a utilização de apenas 11% de MeOH.

TABELA 7: Parâmetros cromatográficos obtidos para análise da mistura padrão dos ânions ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$) no HPLC, eluído na coluna RP C18 ZORBAX, fase móvel composta por solução $1,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de TBABr/MeOH/ACN (89:10:1), fluxo $1,00 \text{ mL min}^{-1}$ e comprimento de onda de detecção 214 nm.

Analito	Simetria (A)	Resolução (R)	F. de retenção (K)	F. de separação (α)
Cloreto	0,800	-	1,214	1,115
Nitrito	0,870	1,224	1,385	1,141
Nitrato	0,844	1,153	1,532	1,107
Sulfito	0,707	1,247	1,709	1,115
Sulfato	0,552	1,356	2,000	1,043

Dentre todas as condições estudadas com o TBABr o melhor resultado foi alcançado com 11% de MeOH, apesar de alguns parâmetros cromatográficos não estarem em concordância com os limites recomendáveis.

Desta maneira, a melhor condição de análise obtida utilizando esse RPI foi com FM constituída por uma solução de $1,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de TBABr e MeOH, na proporção de 89:11 (v/v). Vale ressaltar que não foi necessário ajustar o pH. Uma dificuldade enfrentada no trabalho com o TBABr foi que, ao

longo do desenvolvimento do método, esta condição mostrou-se pouco reprodutível em relação ao tempo de retenção dos analitos.

Encontrada a melhor condição de eluição dos ânions com TBABr, foi necessário analisar uma amostra de água do Rio Paraibuna para verificar a influência de matriz. Uma vez que os resultados obtidos foram alcançados utilizando a solução padrão mistura dos íons. Após a injeção desta amostra, foi observado que, na condição de análise estabelecida, o método não apresentou sensibilidade suficiente para detectar os analitos, uma vez que o nível de concentração era baixo.

Este fato pode ser atribuído à baixa absorvidade da FM empregada na região do UV. Possivelmente, para aumentar a sensibilidade do método por detecção indireta, seria preciso utilizar um RPI com maior absorvidade, o que resultaria em uma maior absorção de radiação pela FM. Dessa maneira, optou-se por testar um RPI que modificasse a superfície da FE de maneira permanente.

4.2 Estudos realizados com os reagentes de pareamento iônico com modificação permanente da fase estacionária

4.2.1 Estudo preliminar com o cloreto de cetilpiridina (CPC)

Como a aplicação desse reagente já foi descrita na literatura para análise de íons em amostras de vinho e água de chuva (JUN *et al.*, 1996; ZUO *et al.*, 2003), não foi realizado nenhum estudo relacionado com a concentração de RPI que deveria ser imobilizada na coluna ou qual deveria ser a melhor concentração de biftalato de potássio utilizado na FM para eluição dos íons. Foi apenas reproduzida a condição de análise descrita por ZUO (2003). O objetivo de trabalhar com esse reagente foi adquirir experiência para propor a aplicação de outro reagente que pudesse ser utilizado para realizar a mesma separação feita com o CPC.

A solução de 1,00 mmol L⁻¹ de CPC foi imobilizada na coluna C18 de acordo com o procedimento descrito no item 3.7. Foi empregada como FM uma solução de 0,50 mmol L⁻¹ de biftalato de potássio, cujo pH foi ajustado para o valor de 7,80 com trietanolamina e MeOH na proporção de 97:3 (v/v), fluxo de 1,00 mL min⁻¹, comprimento de onda de detecção em 265 nm. Na FIGURA 14, é apresentado o cromatograma obtido para análise da solução padrão mistura dos ânions, com a condição fornecida acima. Neste cromatograma, é possível observar que a resolução entre os picos é satisfatória, mas os picos referentes a NO₃⁻, SO₃²⁻ e SO₄²⁻ apresentam larguras de bases maiores, menor eficiência, se comparados aos picos referente a Cl⁻ e NO₂⁻. Além disso, é possível perceber que apesar de todos os ânions estarem na mesma concentração, o NO₃⁻ e o SO₃²⁻ tem a menor sensibilidade.

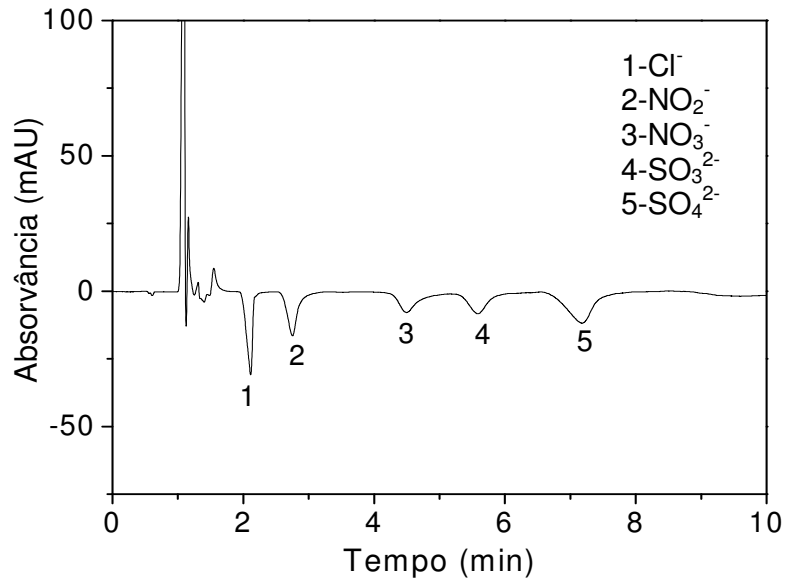


FIGURA 14: Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). Fase móvel composta por uma solução de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de biftalato de potássio ($\text{pH} = 7,80$) (ajustado com trietanolamina)/MeOH (97:3 v/v), fluxo de $1,00 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção em: 265 nm . Coluna RP C18 ZORBAX ODS ($150,0 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) imobilizada com CPC ; coluna de guarda ZORBAX ODS ($12,5 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$).

O CPC é um reagente de modificação permanente muito utilizado na literatura, por isso, a proposta desse trabalho foi empregar o CTAB, que possui um caráter hidrofóbico tão alto quanto o CPC para realizar a mesma separação dos ânions de interesse.

4.2.2 Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)

4.2.2.1 Estudo da concentração de CTAB imobilizada na fase estacionária de coluna

Inicialmente foram propostas três concentrações de soluções de CTAB (0,25; 0,50 e 1,00 mmol L⁻¹) para realizar a imobilização do reagente na coluna C18. A imobilização foi feita de acordo com o procedimento descrito no item 3.7.

Para determinar qual concentração de CTAB forneceria a cobertura da FE mais adequada para a separação dos ânions foi empregada a mesma composição de FM para eluição dos analitos, após a imobilização do CTAB, em todas as concentrações testadas. Posteriormente, foi realizada a comparação entre cromatogramas gerados.

A FM usada foi uma solução de 0,50 mmol L⁻¹ de biftalato de potássio e MeOH na proporção de 97:3 (v/v), sendo que o pH da solução de biftalato foi ajustado para o valor de 7,80, empregando a trietanolamina ou tris (hidroximetil) aminometano. Na FIGURA 15, são apresentados os três cromatogramas obtidos com as colunas imobilizadas com as soluções de CTAB.

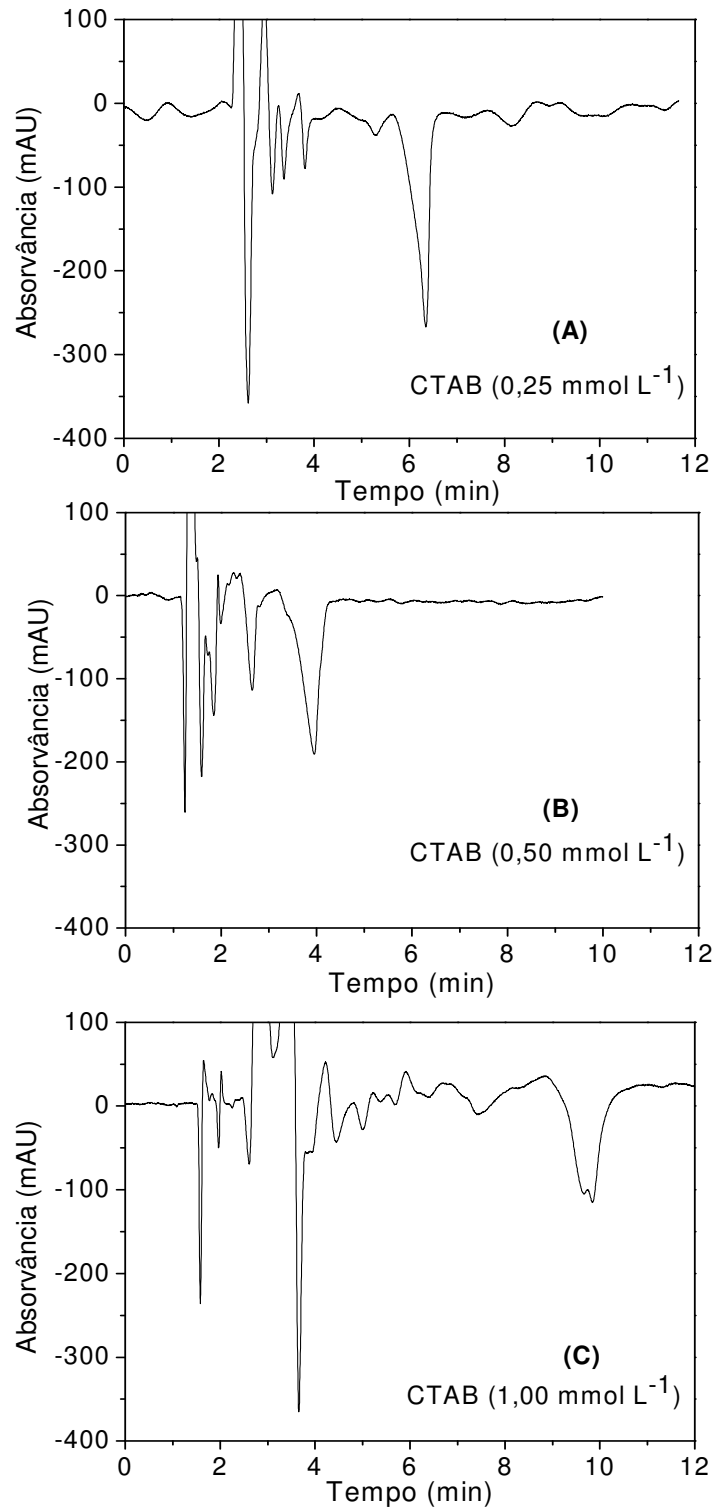


FIGURA 15: Cromatogramas obtidos para a solução padrão mistura dos ânions ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). Fase móvel composta por uma solução de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de biftalato de potássio ($\text{pH} = 7,80$)/MeOH (97:3 v/v), fluxo de $0,70 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção em: 235 nm . Coluna de RP C18 ZORBAX ODS ($150,0 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) (A)-Imobilizada com solução de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB; (B)-Imobilizada com de solução $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB; (C)-Imobilizada com solução $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB.

Pelo exame dos cromatogramas mostrados na FIGURA 15, foi observado que o aumento na concentração da solução de CTAB, empregada para imobilização na coluna, provocou perda de eficiência e de resolução na separação. Provavelmente, essa piora na separação pode ter sido causada pela formação de micelas (concentração micelar crítica do CTAB é igual a $0,90 \text{ mmol L}^{-1}$) no interior da coluna cromatográfica, impossibilitando assim a formação do par iônico (HARRIS, 2008).

Sendo assim, é possível afirmar que, dentre as condições estudadas, a melhor separação dos íons foi obtida com a imobilização empregando a solução de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB.

4.2.2.2 Estudo da composição da fase móvel empregada para a eluição dos ânions na coluna C18 imobilizada com $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB

Segundo JUN (1996) é importante estudar a concentração da solução salina empregada para constituir a FM, pois ela vai influenciar diretamente no tempo de retenção dos analitos. Portanto, foram propostas três concentrações diferentes de biftalato de potássio ($0,25$; $0,50$ e $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$) empregada na eluição dos ânions. Na separação, também foi utilizado o MeOH, sendo que sua proporção na FM variou de 0 a 10% (v/v). Cabe salientar que a proporção de MeOH na FM não podia ser muito alta, pois havia o risco de ocorrer a remoção do CTAB que estava imobilizado na FE da coluna.

O pH da FM foi uma variável que também foi estudada. Por isso, foram utilizados dois reagentes, para ajustar o pH da solução de biftalato de potássio: a trietanolamina e o tris (hidroximetil) aminometano. Os valores de pH testados foram 7,80 e 7,90, pois, nessa faixa de pH haveria o favorecimento da formação do par iônico do RPI com os ânions oriundos de ácido fraco e ácido forte (COLLINS *et al*, 2006).

Entre as concentrações de biftalato de potássio testadas foi possível encontrar uma condição para separação dos analitos utilizando as soluções

com concentração de 0,25 e 0,50 mmol L⁻¹. Por meio da comparação dos cromatogramas obtidos com o emprego dessas soluções, apresentado na FIGURA 16, foi percebido que o aumento da concentração do biftalato de potássio diminuiu o tempo de retenção dos analitos. Além disso, o cromatograma da solução de concentração de 0,25 mmol L⁻¹ apresentou uma separação pouco eficiente, já que os picos referente a SO₃²⁻ e SO₄²⁻ se mostram largos. Sendo assim, entre as concentrações estudadas, a mais adequada para a separação dos analitos foi a de 0,50 mmol L⁻¹.

Em relação ao pH da FM, ficou estabelecido que o tris (hidroximetil) aminometano foi o melhor reagente para ajustar o pH, pois os cromatogramas obtidos utilizando a trietanolamina mostrava que havia coeluição entre os picos referentes à água deionizada e aos íons Cl⁻ e SO₄²⁻. O melhor valor de pH foi o 7,90, pois favorecia ainda mais a formação do par iônico. Além disso, esse valor de pH contribuía para a formação de um tampão.

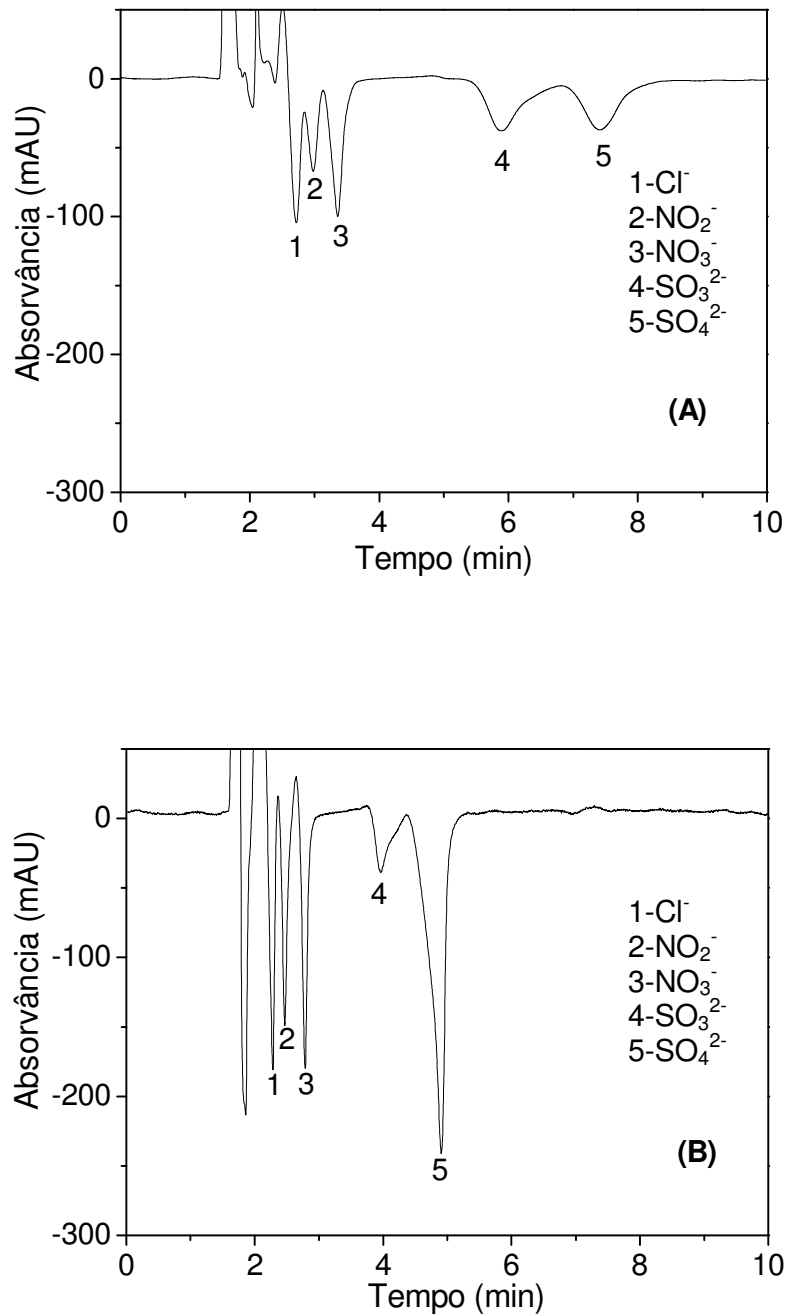


FIGURA 16: Cromatogramas obtidos para a solução padrão mistura dos ânions ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). **(A)** Fase móvel composta por uma solução de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de biftalato de potássio $\text{pH} = 7,90$ (ajustado com Tris)/MeOH (95:5 v/v); **(B)** Fase móvel composta por uma solução de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de biftalato de potássio $\text{pH} = 7,90$ (ajustado com Tris)/MeOH (95:5 v/v). Fluxo de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção em: 235 nm . Coluna de RP C18 ZORBAX ODS ($150,0 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) imobilizada com a solução de CTAB ($0,25 \text{ mmol L}^{-1}$).

Com os resultados apresentados acima ficou estabelecido que a melhor condição de eluição dos ânions foi alcançada quando a FM era composta por uma solução de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de biftalato de potássio/ MeOH na proporção de 95:5 (v/v), com pH igual a 7,90, ajustado com tris (hidroximetil) aminometano. A melhor condição de fluxo para análise foi de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ e o comprimento de onda de máxima detecção para os analitos foi em 235 nm . Na FIGURA 17, é apresentado o cromatograma obtido nesta condição.

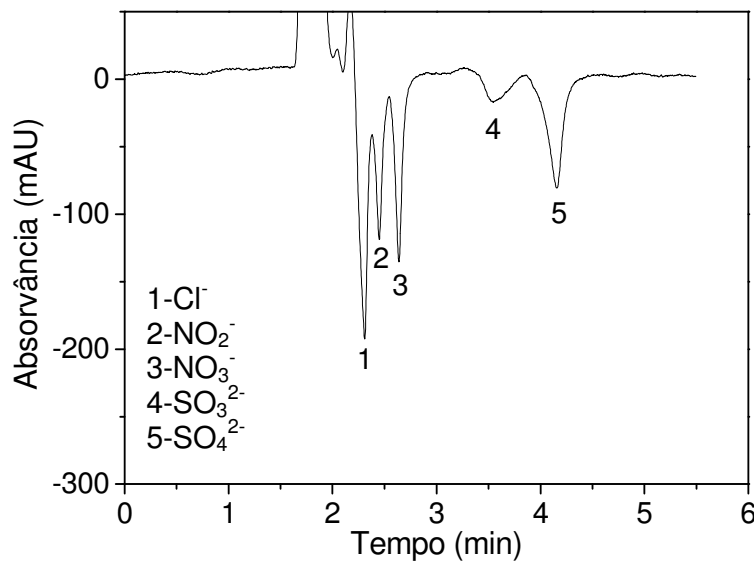


FIGURA 17: Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$). Fase móvel composta por uma solução de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de biftalato de potássio pH = 7,90 (ajustado com Tris)/MeOH (95:5 v/v), fluxo de $0,70 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção em: 235 nm . Coluna de RP C18 ZORBAX ($150,0 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5\mu\text{m}$) imobilizada com a solução de CTAB ($0,25 \text{ mmol L}^{-1}$).

4.2.3 Comparação entre as melhores condições de separação obtida para os reagentes CPC e CTAB

Para definir qual reagente de modificação permanente da FE seria empregado para quantificar os ânions, foram realizadas análises de uma amostra de água do Rio Paraibuna (amostra coletada no ponto 1). A injeção dessa amostra foi realizada na melhor condição de análise obtida para cada um dos reagentes.

Esta comparação se fez necessária, pois, pela análise dos cromatogramas obtidos com a imobilização do CPC e do CTAB na FE, foi observado que os picos dos analitos apresentam uma resolução maior quando o CPC foi utilizado (FIGURA 14). Mas o CPC mostrou-se pouco sensível aos analitos presentes na amostra analisada, como pode ser comprovado através da comparação dos cromatogramas da FIGURA 18, pois, com o CPC, os sinais dos analitos não foram tão intensos (FIGURA 18A).

Apesar da separação dos pares (cloreto/nitrito; sulfito/sulfato), utilizando o CTAB está pouco resolvida (FIGURA 17) em relação ao CPC, na análise da amostra a sensibilidade foi melhor com o CTAB (FIGURA 18B). Portanto, a melhor condição de análise obtida para o reagente CTAB foi escolhida para realizar a análise dos íons em amostra de água de rio.

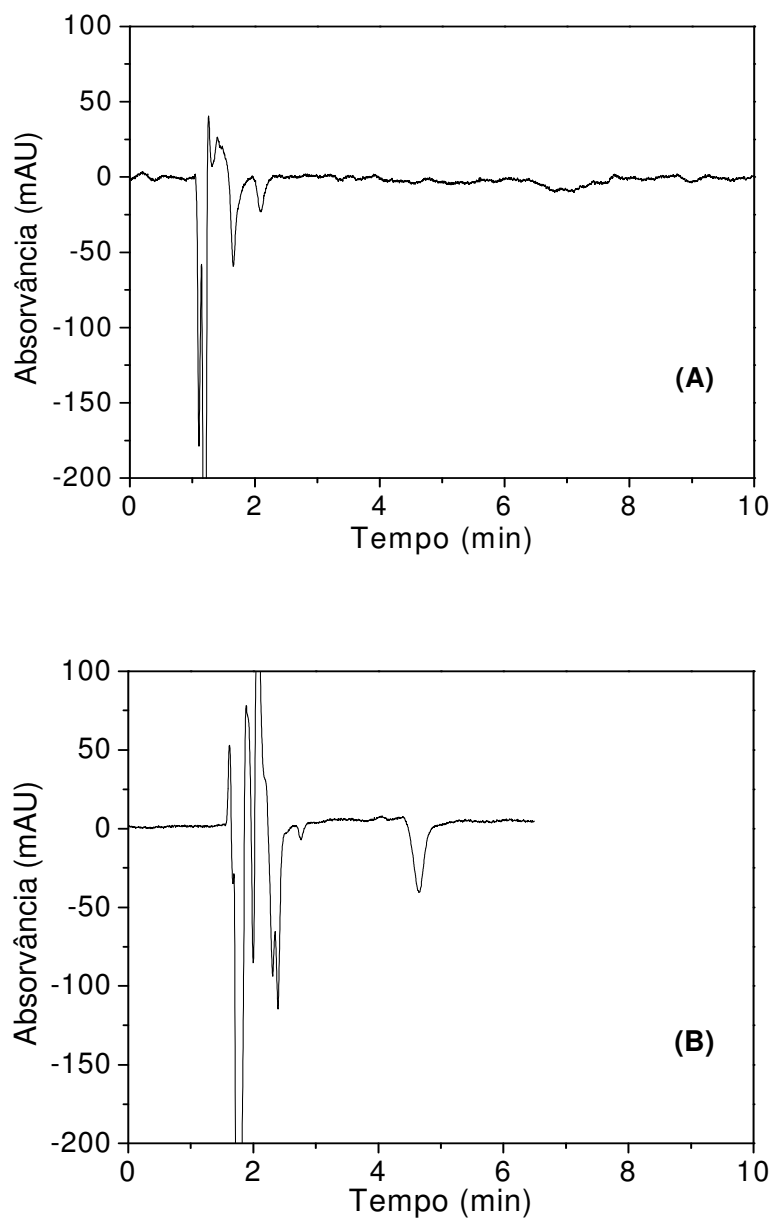


FIGURA 18: Cromatogramas obtidos para a amostra de água do Rio Paraibuna analisadas por CLAEPI após imobilização do reagente de pareamento iônico com modificação permanente da fase estacionária da coluna C18 com a solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de CPC **(A)** e com a solução $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB **(B)**.

4.3 Condição de análise otimizada por CLAE

A condição final utilizada para análise dos ânions por CLAE foi:

- 1) Coluna: Fase reversa C18 Zorbax ODS (150 mm, 4,6 mm de D.I. e particular de 5 μ m), imobilização com solução de CTAB (0,25 mmol L⁻¹), descrito no item 4.2.2.1
- 2) Fase móvel: 0,50 mmol L⁻¹ de biftalato de potássio pH = 7,90 ajustado com tris (hidroximetil) aminometano / metanol (95:5 v/v)
- 3) Fluxo da fase móvel: 0,70 mL min⁻¹
- 4) Detecção indireta: 235 nm
- 5) Tempo de análise: 6 minutos

Na FIGURA 19 é apresentado o cromatograma obtido para análise da solução padrão mistura dos ânions na condição acima descrita.

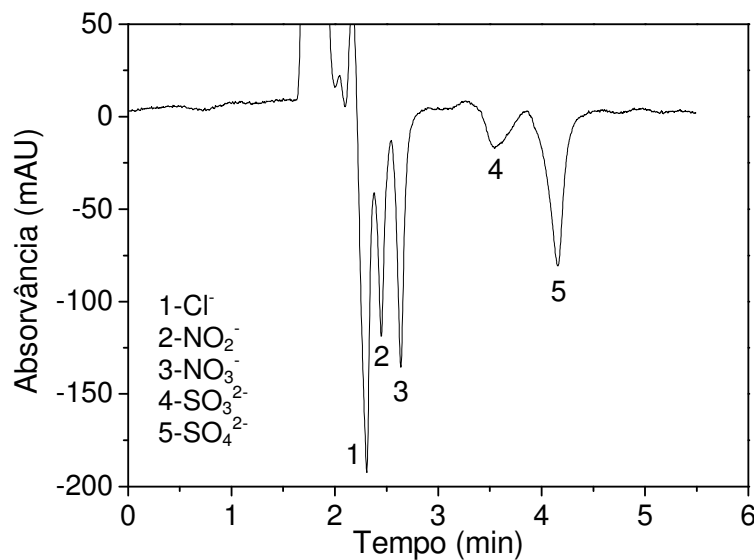


FIGURA 19: Cromatograma obtido para a solução padrão mistura dos ânions (10 mg L⁻¹). Fase móvel composta por uma solução de 0,50 mmol L⁻¹ de biftalato de potássio (pH = 7,90)/MeOH (95:5 v/v), fluxo de 0,70 mL min⁻¹. Detecção em: 235 nm. Coluna de RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5 μ m) imobilizada com a solução de CTAB (0,25 mmol L⁻¹).

4.4 Avaliação do Método

4.4.1 Curva Analítica

A curva analítica foi construída para todos os analitos, com exceção do sulfito, pois, geralmente em ambiente aquoso este íon é facilmente oxidado a sulfato. Além disso, esse projeto não tinha por objetivo quantificar o sulfito, mais sim encontrar uma condição cromatográfica na qual ele esteja bem separado do sulfato.

Na FIGURA 20 são apresentadas as curvas analíticas dos ânions obtidas em triplicatas, junto com as respectivas equações da reta. As curvas foram geradas utilizando as condições cromatográficas descrita no item 4.3. Pela análise das respectivas equações das curvas analíticas foi observado que a curva do cloreto apresentou o maior coeficiente linear. Isto ocorreu possivelmente devido a contaminação do branco da curva (ponto 1) por cloreto.

Na FIGURA 21, são apresentados os cromatogramas dos seis níveis de concentração da curva analítica sobrepostos de maneira quase perfeita, evidenciando a boa repetitividade do tempo de retenção dos analitos. Além disso, essa sobreposição indica que o aumento na concentração dos analitos não interferiu na separação dos íons.

Para avaliar a linearidade da curva analítica, um dos parâmetros que pode ser considerado é o coeficiente de correlação (R). Segundo RIBANI (2004), um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado somente como evidência de um ajuste ideal dos dados para linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO, um valor acima de 0,90 (RIBANI *et al.*,2004).

Os valores de coeficientes de correlação das curvas analíticas variaram de 0,996 (Cl⁻) a 0,997 (NO₂⁻, NO₃⁻ e SO₄²⁻). Dessa forma, é possível

concluir que existe evidência de que as curvas analíticas são lineares na faixa de concentração estudada.

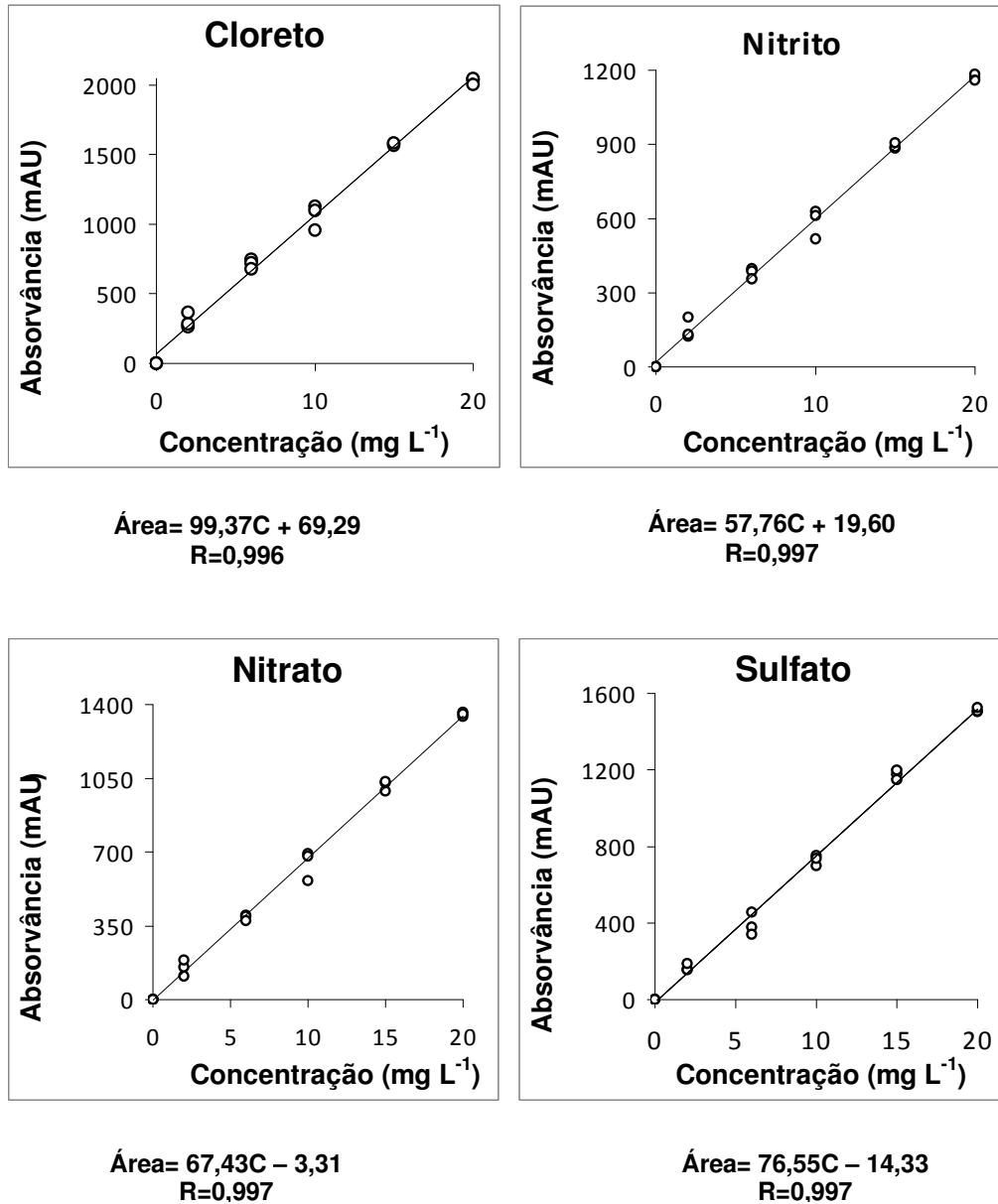


FIGURA 20: Curvas analíticas (n = 3) no intervalo de linearidade: 0,00 (branco); 2,00; 6,00; 10,00; 15,00 e 20,00 mg L⁻¹. Obtidas por CLAE com pareamento iônico. Coluna C18 imobilizada com CTAB. Fase móvel composta por uma solução de 0,50 mmol L⁻¹ de biftalato de potássio (pH = 7,90)/ MeOH (95:5), fluxo de 0,70 mL min⁻¹ e detecção em 235 nm.

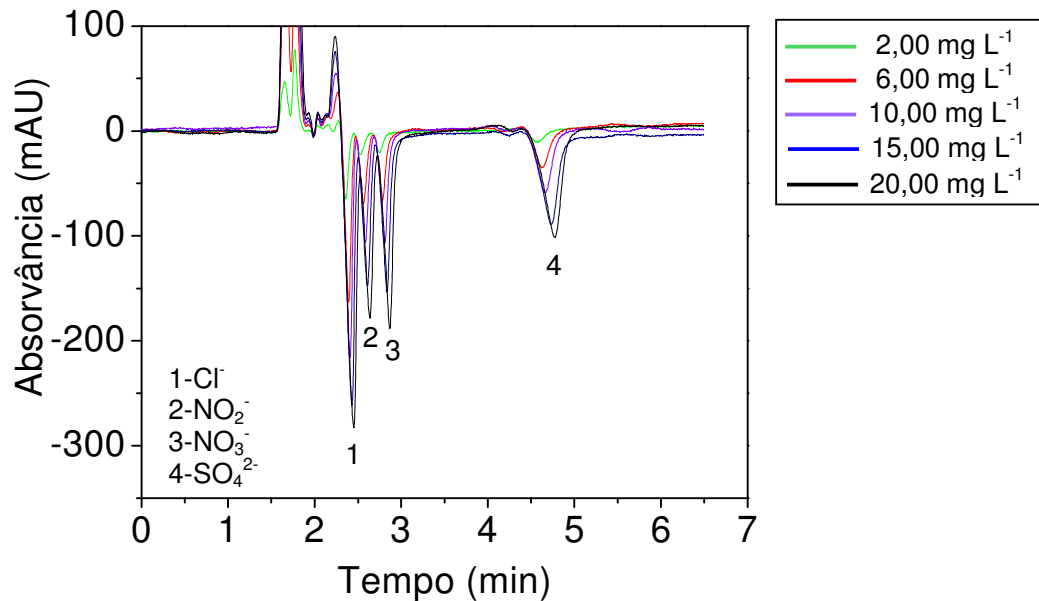


FIGURA 21: Cromatogramas sobrepostos da curva analíticas obtidos na condição descrita no item 4.3.

4.4.1.1 Análise de Variância

A análise da variância é o melhor método para o exame dos resíduos, que é de fundamental importância para avaliar a qualidade do ajuste de qualquer método (NETO, 2007).

Para realizar a análise da variância do modelo, é necessário calcular as seguintes médias quadráticas: modelo (MQ_{reg}), residual (MQ_r), falta de ajuste (MQ_{faj}) e erro puro (MQ_{ep}). As equações para calcular essas médias estão apresentadas na TABELA 8.

Cabe ressaltar que todos os procedimentos experimentais foram realizados com repetições autênticas e de forma aleatória.

TABELA 8: Tabela de análise da variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados.

Fonte	Soma Quadrática	G.L.	Média Quadrática
Modelo	$SQ_{reg} = \sum n_i [(y_e)_i - y_m]^2$	p-1	$MQ_{reg} = SQ_{reg} / (p-1)$
Residual	$SQ_r = \sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	n-p	$MQ_r = SQ_r / (n-p)$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	m-p	$MQ_{faj} = SQ_{faj} / (m-p)$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum \sum (y_{ij} - y_{im})^2$	n-m	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / (n-m)$
Total	$SQ_t = \sum \sum (y_{ij} - y_m)^2$	n-1	

n_i = número de repetições no nível i ($n_i=3$), m = número de níveis distintos da variável x ($m = 6$), $n = \sum n_i$ = número total de medidas ($n = 18$), p = número de parâmetros do modelo ($p = 2$). O índice i indica o nível da variável x ; o índice j refere-se às medidas repetidas da variável y em um dado nível de x . O segundo somatório das expressões para SQ_{reg} , SQ_{ep} e SQ_r vai de $j = 1$ até $j = n_i$. Os outros somatórios vão de $i = 1$ até $i = m$. y_m é a média de todos os valores de y ; y_{im} é a média das determinações repetidas no nível i . O termo SQ significa soma quadrática e MQ significa média quadrática.

Para que um modelo linear esteja bem ajustado sua média quadrática, devido à falta de ajuste, deve refletir apenas os erros aleatórios. Como a média quadrática devido ao erro puro também é uma estimativa dos erros aleatórios, nesse caso, tanto MQ_{faj} quanto MQ_{ep} , estariam estimando a mesma grandeza, a variância populacional. Dessa maneira, é de se esperar que os valores numéricos dessas médias não sejam significativamente diferentes (PIMENTEL e NETO, 1995).

Portanto, a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} é comparada com o ponto da distribuição F correspondentes aos mesmos números de graus de liberdade, no nível de confiança escolhido. Ou seja, a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} deve ser menor que o valor de $F_{vfaj,vep}$ tabelado para que o modelo seja considerado ajustado (PIMENTEL e NETO, 1995).

A avaliação das curvas analíticas de todos os ânions estudados, através da análise da variância, mostrou que não houve falta de ajuste do modelo, ou seja, elas apresentaram linearidade satisfatória. Uma vez que os valores de F calculados para as curvas analíticas apresentadas na FIGURA 20, foram menores que o $F_{(4,12)}$ tabelado a um nível de 95% de confiança. Na TABELA 9 são mostrados os resultados obtidos.

TABELA 9: Valores de F calculado e tabelado para análise da variância para cada analito a um nível de 95% de confiança.

Analito	Valor de F calculado	Valor de $F_{4,12}$ tabelado
Cloreto	3,22	3,26
Nitrito	0,65	3,26
Nitrato	0,81	3,26
Sulfato	3,24	3,26

4.4.1.2 Análise dos Resíduos

Além de realizar a análise da variância, é necessário examinar cuidadosamente os resíduos deixados pelo modelo. Em um modelo bem ajustado, esses resíduos devem dar a impressão de terem sido produzidos por uma distribuição normal e aleatória, indicando que sua variância é constante (PIMENTEL e NETO, 1995).

Os gráficos dos resíduos obtidos estão dispostos na FIGURA 22. Como a curva analítica foi realizada em triplicata, no gráfico encontram-se os valores dos resíduos obtidos para as três injeções em cada nível de concentração.

Pela análise dos gráficos obtidos para cada curva analítica, concluiu-se que os resíduos estão distribuídos de forma aleatoriamente.

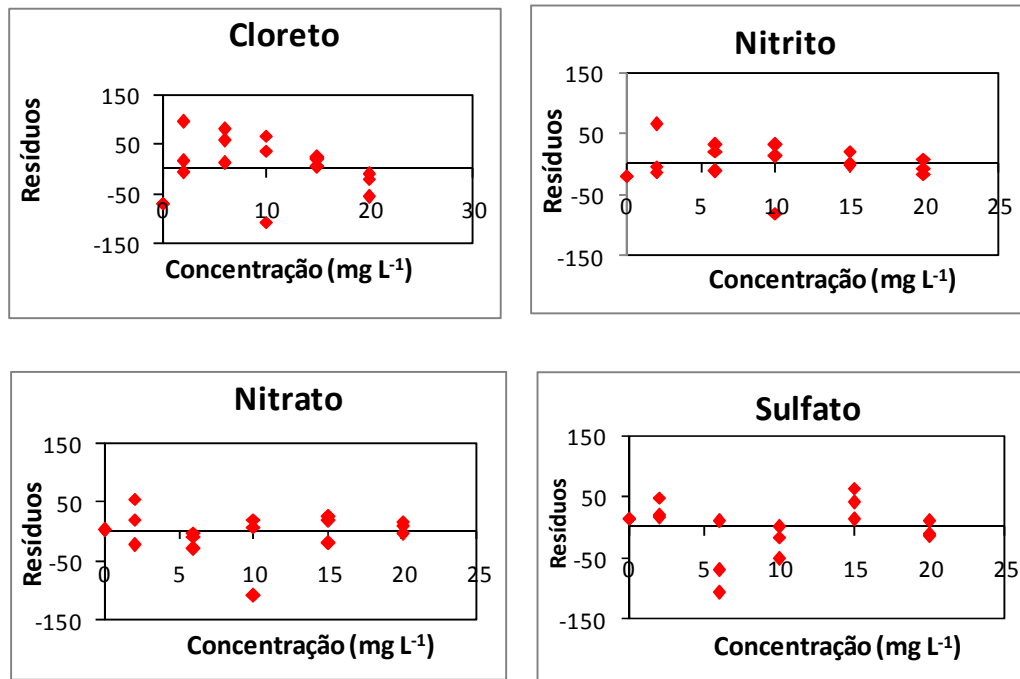


FIGURA 22: Gráficos de análise de resíduos para as curvas analíticas dos ânions.

4.4.2 Limites de detecção e quantificação do método

Os valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método foram calculados de acordo com o procedimento descrito no item 3.9.2. Os valores encontrados são apresentados na TABELA 10. Por meio da comparação dos resultados encontrados para o LD do método (TABELA 10) com os valores estabelecidos, pela legislação brasileira para ânions (TABELA 11), é possível concluir que todos os valores do LD do método estão abaixo do limite estabelecido para água potável.

TABELA 10: Limites de detecção e quantificação do método, expresso em mg L^{-1} .

Analito	LD (mg L^{-1})	LQ (mg L^{-1})
Cloreto	0,08	0,27
Nitrito	0,14	0,47
Nitrato	0,12	0,40
Sulfato	0,11	0,35

LD = limite de detecção do método

LQ = limite de quantificação do método

TABELA 11: Padrão de aceitação dos íons para água potável.

Íons	VPM (mg L^{-1})
Cloreto	250
Nitrato	10
Nitrito	1
Sulfato	250

Fonte: Ministério da Saúde, portaria N° 518

VPM- Valor máximo permitido

4.4.3 Estudo de recuperação da amostra fortificada

A amostra de água do Rio Paraibuna foi fortificada de acordo com o procedimento descrito no item 3.9.3. Esta fortificação foi realizada em nível de 10 mg L^{-1} . Foi escolhida essa concentração para realizar a fortificação porque era o valor estimado de concentração de íons que se esperava encontrar na amostra.

A amostra fortificada foi analisada na condição estabelecida para análise (item 4.3). Os resultados obtidos para amostra fortificada encontram-se na TABELA 12.

TABELA 12: Percentuais de recuperação médios e desvio padrão ($n = 3$) obtidos para amostra fortificada com 10 mg L^{-1} de cloreto, nitrato e sulfato.

Analito	Concentração \pm DP (mg L^{-1})	Recuperação \pm DP (%)	DPR (%)
Cloreto	$10,2 \pm 0,0_5$	$101,4 \pm 0,5$	0,5
Nitrato	$7,8 \pm 0,1_9$	$93,3 \pm 2,8$	3,0
Sulfato	$11,2 \pm 0,2_8$	$95,9 \pm 2,9$	3,1

DP= Desvio padrão

DPR= Desvio padrão relativo

Os percentuais de recuperação variaram entre 93 ± 2 a $101,4 \pm 0,5\%$ e estão em concordância com os limites aceitos para este nível de concentração (70 a 120%). Os desvios padrão relativos dos analitos foram menor que 3,2%.

4.4.4 Análise do material de referência certificado.

Os resultados obtidos para a análise do material de referência certificado de água de chuva (*major elements in rain water-high contents BCR-151 do European commission*) e os seus respectivos valores certificados são apresentados na TABELA 13.

Com o intuito de estabelecer se os valores encontrados pelo método são comparáveis aos valores determinados pelo laudo de análise da amostra de referência, foi realizado o teste t para cada analito. Os valores calculados para o teste t e o valor tabelado, para um nível de 95% de confiança, são apresentados na TABELA 14.

Pela análise dos valores apresentados na TABELA 14, é possível concluir que eles são comparáveis, uma vez que o t calculado foi menor que o t tabelado.

TABELA 13: Valores das concentrações médias ($n = 3$) dos analitos (mg L^{-1}) determinados na amostra do material de referência certificada de água de chuva (*major elements in rain water-high contents BCR-151 do European commission*).

Analito	Val. Certificado \pm DP (mg L^{-1})	Valores obtidos		
		Concentração \pm DP (mg L^{-1})	DPR (%)	ER (%)
Cloreto	4,00 \pm 0,07	4,06 \pm 0,11	2,8	1,4
Nitrato	4,84 \pm 0,06	4,82 \pm 0,04 ₁	0,8 ₅	-0,3 ₄
Sulfato	5,10 \pm 0,07	4,77 \pm 0,11 ₆	2,4	-4,3

DP= Desvio padrão

DPR= Desvio padrão relativo

ER= Erro relativo

TABELA 14: Valores do teste t encontrado pelo método desenvolvido por este trabalho e o t tabelado para um nível de 95% ($n = 3$).

Analito	t calculado	t tabelado
Cloreto	0,8508	4,303
Nitrato	0,7019	4,303
Sulfato	3,2873	4,303

4.4.5 Precisão intermediária do método

A precisão intermediária do método foi obtida através do procedimento descrito no item 3.9.5. Os valores encontrados para os desvios padrão relativos dos diferentes dias de injeção são apresentados na TABELA 15.

TABELA 15: Desvio padrão relativo encontrado para a solução padrão mistura (n = 5) em diferentes dias de injeções.

Analito	DPR(%)		
	1º Dia	2º Dia	3º Dia
Cloreto	5,02	3,79	4,07
Nitrito	3,94	4,54	4,22
Nitrato	6,39	4,81	1,79
Sulfato	4,46	1,90	6,98

DPR= Desvio padrão relativo

Os valores encontrados para a precisão intermediária de cada analito estão todos abaixo do limite aceitável (20%) para esse nível de concentração, ou seja, mostram-se satisfatório.

4.5 Análise das amostras.

As amostras coletadas em dez pontos distintos do leito do Rio Paraibuna foram tratadas de acordo com a condição apresentada no item 3.4, sendo posteriormente analisadas conforme a condição estabelecida no item 4.3. Os resultados obtidos para análise dos ânions e os valores medidos de pH e de condutividade de cada amostra, são apresentados na TABELA 16.

Os cromatogramas obtidos para análise das amostras dos pontos de coleta 1 e 10 e o cromatograma da solução padrão mistura dos ânions são mostrados na FIGURA 23.

TABELA 16: Concentração média (\pm desvio padrão) de cloreto, nitrato e sulfato nas amostras de água do Rio Paraibuna, Juiz de Fora, MG, coletadas em setembro de 2011.

Amostra	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Cloreto		Nitrato		Sulfato	
			mg L ⁻¹	DPR	mg L ⁻¹	DPR	mg L ⁻¹	DPR
1	6,38	16,90	4,62 \pm 0,04	0,8	<LQ	-	9,33 \pm 0,19	1,9 ₉
2	6,50	17,10	6,13 \pm 0,13	2,0 ₈	0,43 \pm 0,02	5,1 ₇	8,80 \pm 0,36	4,0 ₆
3	6,74	16,75	6,96 \pm 0,34	4,8 ₃	0,49 \pm 0,02	4,9 ₄	10,13 \pm 0,75	7,3 ₈
4	6,83	16,45	6,78 \pm 0,24	3,5 ₈	<LQ	-	10,52 \pm 0,51	4,8 ₇
5	6,88	16,15	7,36 \pm 0,17	2,2 ₈	<LQ	-	10,12 \pm 0,34	3,3 ₆
6	6,77	16,35	7,48 \pm 0,05	0,6 ₄	<LQ	-	9,94 \pm 0,18	1,8 ₃
7	6,77	15,65	7,41 \pm 0,04	0,5 ₈	<LQ	-	9,56 \pm 0,25	2,5 ₇
8	6,55	15,52	7,51 \pm 0,03	0,3 ₆	<LQ	-	9,45 \pm 0,05	0,5 ₀
9	6,68	15,35	8,81 \pm 0,01	0,1 ₆	<LQ	-	9,60 \pm 0,04	0,3 ₈
10	6,80	15,30	9,45 \pm 0,10	1,0 ₈	<LQ	-	10,61 \pm 0,38	3,1 ₈

LQ= Limite de Quantificação

- = Valor não calculado

Observação: Não foi detectado nitrito em nenhuma das amostras de águas do Rio Paraibuna coletadas

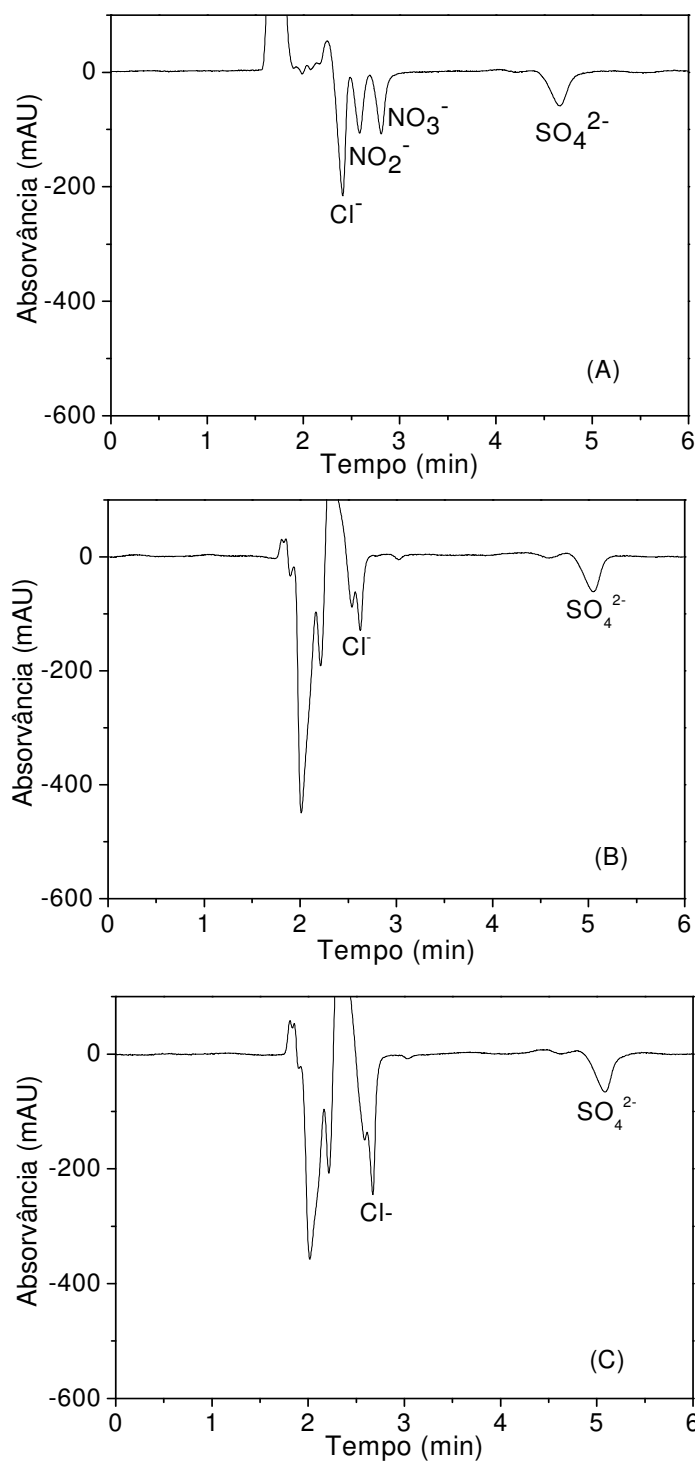


FIGURA 23: Cromatogramas obtidos (A) solução padrão mistura dos ânions de 10,0 mg L⁻¹, (B) amostra da ponte das avenidas Acesso Norte/ Honório Brito (ponto 1), (C) amostra da ponte das avenidas Brasil/Nelson Silva (ponto 10). Fase móvel composta por uma solução de 0,50 mmol L⁻¹ de biftalato de potássio (pH = 7,90)/MeOH (95:5 v/v), fluxo de 0,70 mL min⁻¹. Detecção em: 235 nm. Coluna de RP C18 ZORBAX ODS (150,0 mm x 4,6 mm, 5µm) imobilizada com solução CTAB (0,25 mmol L⁻¹).

A realização da medida de pH em águas naturais é importante, pois pode influenciar diretamente sobre a fisiologia das diversas espécies. Além disso, o pH pode ter efeito indireto na precipitação e dissolução de nutrientes e/ou substâncias tóxicas (CETESB,2011). Devido a importância deste parâmetro a legislação brasileira estabelece um intervalo de pH para diversas classes de águas naturais. A portaria do Ministério da Saúde nº 518 estabelece que o pH é um parâmetro considerado padrão de potabilidade para água de abastecimento público, onde água com pH situado entre 6,50 a 8,50 são considerados aceitáveis.

Os valores de pH obtidos em todos os pontos de amostragem indicam que a água do Rio Paraibuna está quase próxima a neutralidade, encontrando-se dentro da faixa aceitável estabelecida pela portaria do Ministério da Saúde. Apenas a amostra coletada no ponto 1 (ponte localizada no encontro das ruas Acesso Norte com Honório Brito) apresentou pH abaixo de 6,50.

A condutividade elétrica é uma expressão numérica da capacidade de uma solução aquosa em conduzir corrente elétrica. Geralmente, a medida de condutividade pode, de uma maneira indireta, fornecer a concentração de poluentes na água, sendo que níveis superiores a $100 \mu\text{Scm}^{-1}$ são considerados ambientes contaminados. Porém essa medida não confere nenhuma indicação das quantidades relativas dos vários componentes (CETESB, 2011).

As medidas de condutividade realizadas nas amostras de água do Rio Paraibuna (mínimo: 15,3 e máximo: $17,1 \mu\text{Scm}^{-1}$) estão abaixo do limite estabelecido para ambiente contaminado.

Os valores de condutividade medidos nas amostras estavam abaixo dos valores relatados na literatura para água dos seguintes rios, da região sudeste do Brasil, localizados no estado de São Paulo: Sorocaba ($30 \mu\text{Scm}^{-1}$) (SARDINHA et al., 2008), Embu Guaçu ($35 \mu\text{Scm}^{-1}$) (RITCHER, 2004), Paraíba do sul ($31 \mu\text{Scm}^{-1}$) e Mogi Mirim ($192 \mu\text{Scm}^{-1}$) (CETESB, 2010).

Na análise química das amostras o nível de concentração médio obtido para cloreto variou de 4,62 a $9,45 \text{ mg L}^{-1}$. Estes valores são comparáveis aos resultados relatados pela CETESB (2010), para o cloreto, em diferentes rios do estado de São Paulo: Guaratingueta (1,46 a $7,80 \text{ mg L}^{-1}$), Paraíba do Sul (1,50 a $8,80 \text{ mg L}^{-1}$), Jaguari (4,10 a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$) e Una (1,85 a $8,40 \text{ mg L}^{-1}$).

Existem relatos na literatura nos quais são encontrados valores de concentração média para o Cl^- superior aos obtidos para amostras do Rio Paraibuna. No Brasil uma pesquisa desenvolvida no nordeste brasileiro por CARNEIRO (2002), registrou níveis médios de Cl^- no intervalo de 92,60 a 273,60 mg L^{-1} na água do Açude Atalho, localizado no estado do Ceará, no município de Brejo Santo. Em São Paulo, no rio Embu Mirim foi relato níveis que variavam de 16,18 a 23,00 mg L^{-1} (RITCHER, 2004).

Uma pesquisa realizada na Grécia para avaliar a qualidade da água potável, em diferentes partes do país, registrou a seguinte faixa de concentração para Cl^- : 75,4 a 171,9 mg L^{-1} , sendo portanto mais elevada que os níveis determinados nas amostras do Rio Paraibuna (KARAVOLTSOS et al., 2008).

A presença de Cl^- em alta concentração em cursos d'água pode indicar contaminação por esgoto doméstico, uma vez que o ser humano elimina pela urina cerca de 6 gramas de Cl^- por dia (APHA,1998). Em vários pontos do leito do Rio Paraibuna é possível observar o lançamento de esgoto sem tratamento, diretamente em seu leito. Segundo dados divulgados na imprensa local do total de esgoto produzido na cidade de Juiz de Fora, no ano de 2009, apenas 9,76 % foi tratado nas duas estações de tratamento de esgoto (ACESSO.COM, 2011).

Os níveis de concentração média obtidos para nitrato variaram de 0,43 a 0,49 mg L^{-1} . Estes valores estão em concordâncias com a concentração média relatada pela CETESB (2010), no seu relatório de Qualidade de águas do estado de São Paulo, para os seguintes rios: Sapucaí Guaçu (0,44 mg L^{-1}), Paraiba do sul (0,49 mg L^{-1}), Riberão água branca (0,41 mg L^{-1}), São Francisco (0,46 mg L^{-1}) e Pardo (0,49 mg L^{-1}).

Os valores determinados para NO_3^- (mínimo: 0,43 e máximo: 0,49 mg L^{-1}) nas águas do Rio Paraibuna são menores que a concentração média encontrada para este íon nos seguintes rios situados no Japão: Uji (1,40 mg L^{-1}), Katsura (4,20 mg L^{-1}), Kizu (2,20 mg L^{-1}) e Kamo (2,00 mg L^{-1}) (AOKI *et al.*, 1995).

Um estudo na Venezuela apresentou valores mais elevados de concentração média de NO_3^- (Pompery: 5,60 mg L^{-1} e Viateca: 2,90 mg L^{-1}) em

água subterrânea, se comparados com os valores registrados no Rio Paraibuna (MORALES et al., 2000).

Na República Tcheca uma pesquisa realizada na região de Hraced Kralove (LEGNEROVÁ, *et al.*, 2002), para água superficial, mostrou valores, variando de 0,70 a 12,34 mg L⁻¹, sendo portanto mais elevados que os encontrados nas amostras de água de Juiz de Fora.

O íon nitrito não foi detectado em nenhuma das amostras coletadas, isso pode ter ocorrido possivelmente devido ao fato deste ânion ser muito instável em solução aquosa e ser facilmente oxidado a nitrato.

A faixa de concentração média obtida para sulfato nas amostras do Rio Paraibuna variaram de 8,80 a 10,61 mg L⁻¹. Os resultados encontrados por este trabalho, para este íon, foram mais elevados que os relatados pela CETESB (2010) para os seguintes rios do estado de São Paulo: Paraíba do Sul (0,65 a 1,00 mg L⁻¹), Jaguara (1,00 a 2,00 mg L⁻¹), Atibaia (1,00 a 2,00 mg L⁻¹) e Camanducaia (0,60 a 2,00 mg L⁻¹).

No estudo realizado na China, utilizando água do Rio Wulumuqi, obteve uma concentração de SO₄²⁻ de 20,83 mg L⁻¹ (YANG *et al.*, 1999). Na Lituânia uma pesquisa registrou para este ânion um valor de 26,50 mg L⁻¹ (PADARAUSKAS *et al.*, 1998).

No Brasil o trabalho realizado por SARDINHA (2008), determinou este íon nas águas do Rio Sorocabuçu, localizado no município de Sorocaba, e encontrou 30,00 mg L⁻¹. Através da análise dos dados obtidos nesses países é possível afirmar que em ambos os rios o nível de SO₄²⁻ relatados foram superiores ao registrado nas amostras de Juiz de Fora.

Segundo a CETESB (2011) a presença de SO₄²⁻ em alta concentração na água de rio indica a contaminação do recurso hídrico por esgoto doméstico ou efluente industrial. Apesar, dos níveis de concentração dos ânions analisados estarem abaixo do limite estabelecido pela legislação para água classificada como potável, os dados apresentados por este trabalho corroboram para atestar a contaminação do leito do Rio Paraibuna por esgoto doméstico. Já que em águas naturais despolidas o nível de concentração encontrado para Cl⁻ e SO₄²⁻ é muito baixo. É possível atestar essa contaminação por esgoto doméstico ao longo do Rio Paraibuna, uma vez que,

pode-se ver a tubulação de esgoto, lançando detritos sem tratamento nas águas.

O Projeto Qualidade das Águas e Controle da Poluição Hídrica (1999) atestou que as águas do Rio Paraibuna são a de pior qualidade em toda a bacia do Paraíba do Sul, e isto ocorre principalmente devido ao lançamento de esgoto doméstico e resíduos industriais no curso deste rio.

Na FIGURA 24 é apresentado um gráfico que mostra a concentração média dos ânions em cada ponto de coleta junto com o pH medido para cada amostra recolhida.

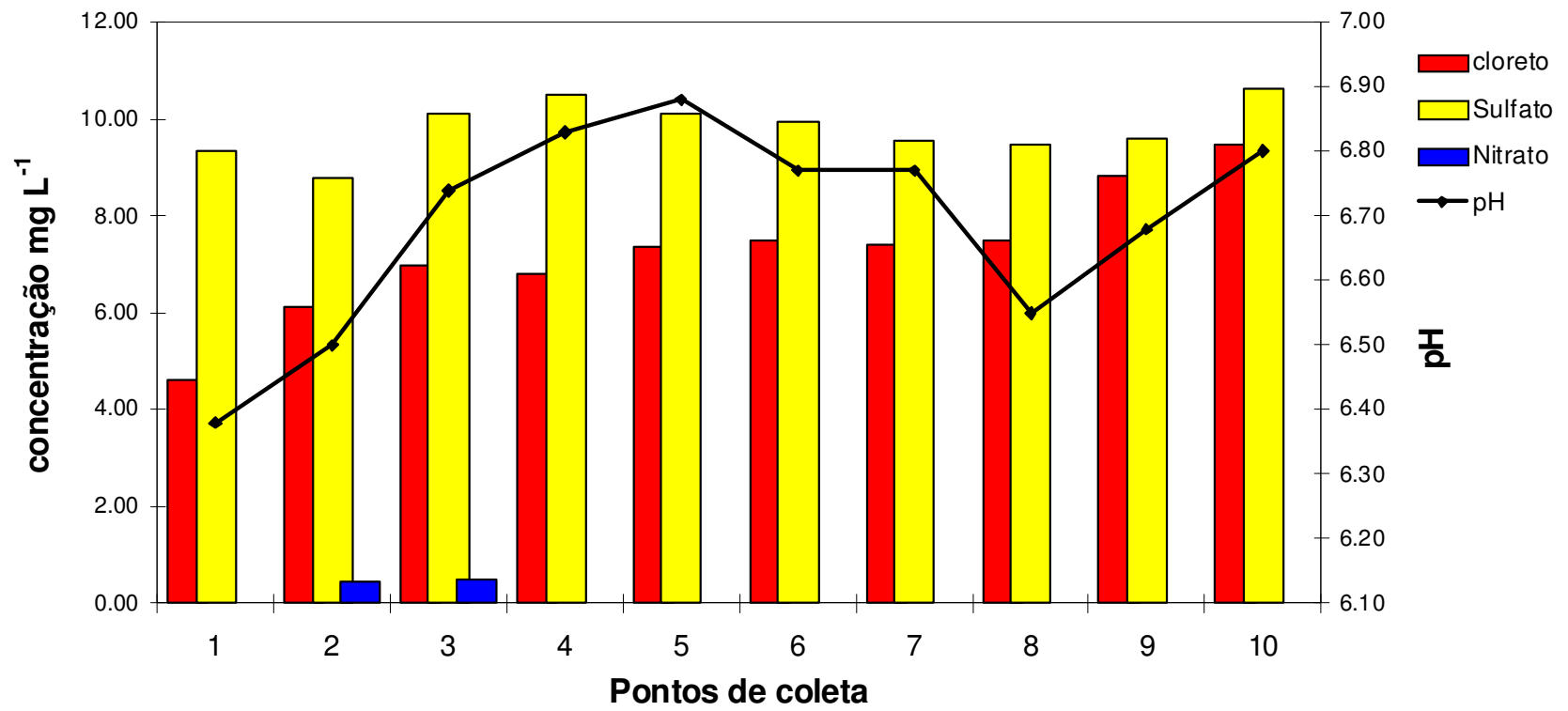


FIGURA 24: Concentrações médias dos íons cloreto, nitrato e sulfato e valores de pH das amostras de água do Rio Paraibuna, Juiz de Fora, MG, coletadas em setembro de 2011.

Foi observado através da análise das amostras que os pontos de coleta que apresentaram maior concentração para os íons Cl^- e SO_4^{2-} estão inseridos na área da cidade mais densamente urbanizada, onde existe maior tráfego de veículo. Sendo que área de maior urbanização da cidade é representada pelo ponto de coleta nº 5 até o nº 10. Esta tendência foi mais evidente para o cloreto. Os valores obtidos para as amostras coletadas dos pontos nº: 1 a 4 variaram de 4,62 a 6,78 mg L^{-1} e de 5 a 10 variaram de 7,36 a 9,45 mg L^{-1} .

No ponto de coleta nº 10 foi detectado a maior concentração dos íons Cl^- e SO_4^{2-} . Este ponto está localizado em frente a uma grande empresa gráfica.

De maneira geral é possível afirmar que o nível de concentração médio determinado para os ânions nas amostras (TABELA 16) estão a abaixo do limite estabelecido pela portaria nº 518 do Ministério de Saúde (TABELA 1) para água potável.

Apesar dos níveis de concentração encontrados para os íons cloreto, nitrato e sulfato estarem abaixo do limite aceito para água potável **não é possível considerar que a água do Rio Paraibuna é própria para o consumo humano, pois uma série de outros estudos avaliando outros parâmetros químicos devem ser realizados.**

A Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) tem desenvolvido inúmeros trabalhos de pesquisa que avaliaram o grau de poluição e degradação das águas do Rio Paraibuna.

Durante os anos de 2001 a 2003, uma pesquisa realizada pelo Departamento de Geociências, tinha como objetivo relacionar a qualidade da água do rio com a urbanização. Os parâmetros avaliados por esse trabalho foram: Coliformes fecais e totais, oxigênio dissolvidos, demanda bioquímica de oxigênio, pH, turbidez e condutividade (MACHADO *et al.*, 2003).

O grupo concluiu que os pontos localizados nas áreas mais densamente urbanizadas apresentavam os piores resultados referente a qualidade da água (MACHADO *et al.*, 2003).

Em 2009 um outro projeto intitulado “Monitoramento da qualidade das águas da Bacia do rio Paraibuna em sua região mais urbanizada” tinha por objetivo traçar os cenários de qualidade do Rio Paraibuna em função do

tratamento parcial de fluidos domésticos, visando à melhoria da qualidade de suas águas e da vida da população do município. Durante o transcorrer do trabalho foram realizadas medidas dos seguintes parâmetros: vazões dos afluentes e do próprio Rio Paraibuna, os valores de oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, temperatura, condutividade elétrica e pH (ACESSO.COM, 2011).

Segundo os autores, na classificação de poluição de rio, o Paraibuna está na classe III. Os resultados finais do trabalho foram apresentados no primeiro Simpósio de Engenharia Sanitária e Meio ambiente da Zona da Mata que foi realizado no ano de 2010.

Trabalhos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, NUPIS, FABRI (2010) avaliou os níveis de esteróis fecais em sedimentos dos afluentes do Rio Paraibuna e concluiu que 5 dos 6 afluentes do rio analisados estão contaminados com esteróis fecais.

As inúmeras pesquisas desenvolvidas pela UFJF só evidenciam o grau de degradação e poluição das águas Rio Paraibuna. Cabe ao poder público da cidade avaliar esses dados gerados e realizar um programa que vise diminuir o nível de poluição do rio.

4.6 Comparação com outros estudos

Na TABELA 17 são comparados os resultados encontrados por este trabalho, para os níveis de concentração dos ânions, com outros trabalhos que analisaram os mesmos íons em amostras de água de rio, água potável e água subterrânea.

Entre os trabalhos apresentados na TABELA 17, foram utilizadas as seguintes técnicas: Eletroforese capilar (EC), Cromatografia de íons (CI) e a Cromatografia líquida de alta eficiência com pareamento iônico (CLAEPI). Cabe ressaltar que em alguns destes artigos, não foram reportados todos os ânions pesquisados por este trabalho. Além disso, em alguns artigos só foi realizada a análise de apenas uma amostra.

Pela análise dos dados apresentados na TABELA 17 é possível afirmar que as faixas de concentrações obtidas para os ânions nas amostras de água do Rio Paraibuna são comparáveis aos valores relatados em outras regiões do mundo.

Na TABELA 18 foram comparados o limite de detecção e o tempo de análise estabelecido por este trabalho com os resultados encontrados por alguns trabalhos na literatura. De maneira geral, os resultados determinado para o limite de detecção são comparáveis aos relatados na literatura.

TABELA 17: Comparação dos níveis de concentração dos ânions nas amostras de água do Rio Paraíba com diferentes áreas de estudos.

Técnica	Autores	País	Tipo de amostra	Concentração (mg L ⁻¹)			
				Cl ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
CLAEPI	Presente trabalho	Brasil	Água de rio	4,62 a 9,45	-	0,43 a 0,49	8,80 a 10,61
EC	OEHRLE (1996)	Japão	Água potável	17,70 a 19,90	-	3,54 a 3,81	58,6 a 68,1
EC	HISSA <i>et al.</i> ,(1999)	Finlândia	Água de rio	4,10 a 5430	0,50 a 54,70	-	2,27 a 795
EC	YANG <i>et al.</i> ,(1999)	China	Água de rio	1,14	-	1,64	20,80
EC	RITCHER (2004)	Brasil	Água de rio	24,36 a 28,46	-	0,13 a 1,69	10,38 a 13,06
EC	KUBAN <i>et al.</i> ,(1999)	República Tcheca	Água potável	21,10 a 38,90	-	16,10 a 16,70	25,50 a 26,40
CI	AMIN <i>et al.</i> ,(2008)	Japão	Água de rio	5,70	-	5,80	6,40
CI	SAKAI <i>et al.</i> ,(1996)	Japão	Água de rio	7,70	-	4,60	26,00
CI	MORALES <i>et al.</i> ,(2000)	Venezuela	Água subterrânea	4,90 a 821,9	<0,01	2,90 a 24,2	0,50 a 100,9
CI	KARAVOLTSOS <i>et al.</i> ,(2008)	Grécia	Água potável	75,40 a 171,9	-	8,80 a 28,70	750
CI	OHTA <i>et al.</i> ,(1996)	Japão	Água de rio	3,41 a 37,70	0,046 a 0,092	1,30 a 8,31	4,03 a 110,4
CI	GETTAR <i>et al.</i> ,(2000)	Argentina	Água de rio	3,30	-	0,10	12,30
CLAEPI	GONZALEZ <i>et al.</i> ,(1994)	Espanha	Água de rio	-	0,04 a 2,96	0,80 a 10,20	-
CLAEPI	ITO (1997)	Japão	Água de rio	10,20	-	1,20	6,70

TABELA 18: Comparação entre o limite de detecção e tempo de análise determinado por este trabalho com outros trabalhos relatados na literatura.

Técnica	Autores	Limite de detecção (mg L ⁻¹)			Tempo de análise (min)
		Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	
CLAEPI	Presente trabalho	0,08	0,12	0,11	6
EC	HIISA <i>et al.</i> , (1999)	0,01	0,02	0,01	15
EC	RITCHER (2004)	0,23	0,43	0,50	5
CI	AMIN <i>et al.</i> , (2008)	0,05	0,09	0,58	30
CI	SAKAI <i>et al.</i> , (1996)	0,08	0,08	0,07	8
CI	MORALES <i>et al.</i> , (2000)	0,1	0,1	0,1	5
CI	OHTA <i>et al.</i> , (1996)	0,02	0,03	0,05	20

5. Conclusões

A proposta deste trabalho foi otimizar e aplicar uma metodologia de separação dos íons (cloreto, nitrito, nitrato, sulfito e sulfato) e a quantificação dos ânions (cloreto, nitrito, nitrato e sulfato) por cromatografia líquida de alta eficiência com formação de par iônico. A metodologia otimizada foi aplicada à análise de 10 amostras de águas superficiais do Rio Paraibuna, no trecho localizado na cidade de Juiz de Fora, MG.

A coleta das amostras foi feita utilizando um coletor desenvolvido pelo próprio grupo de pesquisa, NUPIS. Este equipamento foi construído com uma estrutura metálica, na qual em seu centro foi afixada a garrafa de polietileno, que facilitou o procedimento de captação das águas superficiais. O coletor foi lançado, a partir das principais pontes da cidade de Juiz de Fora, usando uma corda para atingir o leito do rio. Os pontos de amostragens foram escolhidos de maneira que englobasse grande parte da área urbana da cidade.

Para otimizar o método por CLAEPI, foram estudados quatro RPI para compor a FM. Os reagentes TEABr e o TBABr, realizavam a modificação dinâmica da FE da coluna, e os reagentes CPC e o CTAB, realizavam a modificação permanente da FE.

Os reagentes que modificavam a FE de maneira permanente foram imobilizados na superfície da coluna C18 utilizando o procedimento descrito na literatura. Durante o desenvolvimento do método de separação dos ânions alguns parâmetros cromatográficos foram avaliados tais como: fator de retenção, resolução, simetria e fator de separação.

Os estudos realizados empregando os reagentes de modificação dinâmica não se mostraram satisfatórios para a separação dos analitos. Pois, com a utilização do TEABr não foi possível encontrar uma condição cromatografia que promovesse a separação dos íons. Já nos testes realizados, usando o TBABr, foi possível separar os cinco ânions, mas ao aplicar a condição estabelecida, em uma amostra de água de rio, foi observado que o método desenvolvido não apresentou sensibilidade suficiente para detectar os

analitos, uma vez que o nível de concentração era baixo. Esta baixa sensibilidade pode ser atribuída a baixa absorvidade da FM na região do UV.

Para aumentar a sensibilidade foi necessário utilizar uma FM que apresentasse uma absorvidade maior, já que a detecção era realizada de maneira indireta. Sendo assim, optou-se em utilizar os reagentes de modificação permanente da FE, pois a FM usada atendia a necessidade apontada acima.

Nos testes realizados utilizando os reagentes de modificação permanente da FE, o melhor resultado apresentado para separação dos analitos nas amostras de água de rio foi alcançado empregando o CTAB. A condição cromatográfica estabelecida permitiu a separação dos ânions com seis minutos de análise.

Para avaliar a exatidão e a precisão da metodologia desenvolvida foi feito o estudo de recuperação da amostra fortificada e a análise do material de referência certificado. Os percentuais de recuperação dos compostos obtidos para a amostra fortificada foram satisfatórios. A média de recuperação dos compostos foi de 93,3 a 101,4% e estão em concordância com os limites aceitos. Os desvios padrão relativos dos analitos foram menor que 3,2%.

Além disso, a análise do material de referência certificado evidenciou, através do teste t, que os valores encontrados por esta metodologia são comparáveis aos valores do certificado de análise. Os valores percentuais do DPR variaram de 1,0 a 2,8 %. Os erros relativos obtidos variaram de -6,9 a 1,4%.

Os limites de detecção do método variaram de 0,08 (Cl^-) a 0,14 (NO_2^-) e os limites de quantificação de 0,27 (Cl^-) a 0,47 (NO_2^-); expressos em mg L^{-1} . Esses valores possibilitaram a aplicação da metodologia em amostras de água de rio. Sendo estes valores abaixo dos limites aceitos pela Legislação Brasileira para águas classificadas como potável.

Com a metodologia desenvolvida foi possível quantificar os íons de interesses nas águas do Rio Paraibuna. Por meio da análise dos resultados determinados foi possível concluir que os níveis de concentração encontrados para os ânions na água do Rio Paraibuna foram menores que os limites aceitos pela legislação brasileira para água classificada como potável. Porém o nível

de concentração de Cl^- e SO_4^{2-} encontrados nas amostras comprova a contaminação das águas por esgoto doméstico.

6. Referências

ACESSA.COM 2011. Disponível em: http://www.acesa.com/cidade/arquivo/noticias/2010/05/21-esgoto_agua/. Acesso em: 20 de dez. 2011.

ACESSA.COM 2011. Disponível em: http://www.acesa.com/cidade/meioambiente/arquivo/2009/05/12-rio_paraibuna/. Acesso em 15 de jan 2011.

AL-KHASHMAN, O. A, Chemical characteristics of rainwater collected at a western site of Jordan. **Atmospheric Research**, v.91, n.1, p.53-61, 2009.

ALONSO, M.C.B; PREGO, R.; Determination of silicate, simultaneously with other nutrients (nitrite, nitrate and phosphate), in river waters by capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v.416, n.1, p.21-27. 2000.

AMIN, M.; LIM, L.W.; TAKEUCHI, T. Determination of common inorganic anions and ion chromatography with column switching. **Journal of Chromatography A**, v.1182, p.169-175, 2008

ANA, 2011 Agência Nacional de Águas. Disponível em: <http://www.ana.gov.br/bibliotecavirtual/pesquisa.asp?criterio=polui%E7%E3o+&categoria=0&NovaPagina=1&pesquisar=Pesquisar>. Acesso 10 jun de 2011.

ANA, 2001 Agência Nacional de Águas. BACIA DO RIO PARAÍBA DO SUL - LIVRO DA BACIA, 2001. Disponível em: <http://www.ana.gov.br/acoesadministrativas/cdoc/Catalogo/2001/BaciadoRioParaibadoSul.pdf>. Acesso em 2 de jan 2012.

Anuário Estatístico de Juiz de Fora, 2010. Coordenador: Prof. Marcos Alberto Patronis, Centro de Pesquisas Sociais da Universidade Federal de Juiz de Fora. Disponível em: <http://www.cps.ufjf.br/anuarios/Anuario2011/index.html>. Acesso em 10 de jan 2012.

AOKI, T.; WAKABAYASHI, M. Simultaneous of nitrate and nitrite in water by gas-phase chemiluminescence. **Analytica Chimica Acta**, v.308, p.308-312, 1995.

APHA, 1998. American Public Health Association. **Standard methods for examination of water and waste and wastewater**, 20^a edição, Washington.

AULER, L.M.L.A; SILVA, C.R; BOTTOLI, C.B.G; COLLINS, C.H; Anion separations for liquid chromatography using propylpyridinium silica as the stationary phase. **Talanta**, v.84, n.4, p.1174-1179. 2011.

BAIRD, C. **Química Ambiental**, 2^a edição, São Paulo, Bookman, 2002.

BARRON, L.; NESTERENKO, P.N.; PAULL, B. Use of temperature programming to improve resolution of inorganic anions, haloacetic acids and oxyhalides in drinking water by suppressed ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1072, p.207-215, 2005

BASTOS, C.A. Otimização de Metodologia por Cromatografia Líquida em Fase Reversa por Pareamento iônico para Análise Simultânea de Paracetamol, Cloridrato de Fenilefrina e Maleato de Carbinoxamina em Formulações Farmacêuticas. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

BRANCO, S.M. **Hidrologia Aplicada a Engenharia Sanitária**. CETESB, 3^a edição, São Paulo, 1986.

BURAKHAM, R.; OSHIMA, M.; GRUDPAN, K.; MOTOMIZU, S. Simple flow-injection system for the simultaneous determination of nitrite and nitrate in water samples. **Talanta**, v.64, p.1259-1265, 2004.

BUTT, S.B.; RIAZ, M.; IQBAL, M. Z. Simultaneous determination of nitrite and nitrate by normal phase ion-pair liquid chromatography. **Talanta**, v.55, p.789-797, 2001.

CABRAL, N. M. T. Teores de Nitrato e Amônio nas águas de aquífero barreiras nos bairros do reduto, Nazaré e Umarizal- Belém / PA. **Química Nova**, v.8, p.1808-1808, 2007.

CARNEIRO, F.M. Análise do estudo de impacto ambiental e qualidade da água- o caso do açude Atalho-Brejo Santo, Ceará. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2002.

CECCHI, T. Application of Ion Pairing Chromatography to the Analysis of Inorganic Analytes: Review. **Journal of liquid Chromatography & Related Technologies**, v.30, p. 1205-1225, 2007.

COELHO, C.H.; ALLEN, A.G.; FORNARO, A.; ORLANDO, E.A.; GRIGOLLETO, T.L.B.; CAMPOS, M.L.A.M. Wet deposition of major ions a rural area impacted by biomass burning emissions. **Atmospheric Environment**, v.45, p.5260-5265, 2011.

CESAMA, 2011. Companhia de Saneamento Ambiental de Juiz de Fora. Disponível em: <http://www.cesama.com.br>. Acesso em: 20 nov. 2011.

CETESB, 2011. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Variáveis de qualidade das águas. Disponível em: <http://www.cetesb.org.br>. Acesso em 5 de jan de 2011.

CETESB, 2010. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.cetesb.org.br>. Acesso em 5 de jan de 2011.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. CETESB, **Guia de Coleta e preservação de amostras de água**, 1ª edição, São Paulo, 1987.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2009.

COLOMBARA, R.; TAVARES, M.F.M; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: Característica e aplicação. **Química Nova**, v.20, p.512-518, 1997.

COGERH. Companhia de Gestão dos Recursos Hídricos. **Recomendações e cuidados na coleta de amostras de água**. Informe técnico, nº 02, 1ª edição, Fortaleza, 2001.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 357 de 17 de março de 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/conama/>. Acesso em 10 de Mai 2010.

CONCEIÇÃO, F. T.; SARDINHA, D.S.; NAVARRO, G.R.B.; Composição química das águas pluviais e deposição atmosférica anual na Bacia do Alto Sorocaba (SP). **Química Nova**, Sorocaba, Brazil, v.34, p.610-616, 2011.

CONOLLY, D.; PAULL, B.. Rapid determination of nitrate and nitrite in drinking water samples using ion-interaction liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.441, p.53-62, 2001.

CUNHA, F.G.; MACHADO, G.J.; **Manual simplificado sobre procedimento de coleta de água superficial e de consumo doméstico**. Serviço Geológico do Brasil, 2003. Disponível em http://www.cprm.gov.br/pgagem/puerto/coleta_amostras.pdf. Acesso em 10 de jun 2011.

DABEK-ZLOTORZYNSKA, E.; PIECHOWSKI, M.; LIU, F.; KENNEDY, S.; DLOUHY, J.F. Routine determination of major anions in atmospheric aerosols by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.770, p.349-359, 1997.

FABRI, M.R. Metodologia analítica para determinação de esteróis fecais em sedimentos por cromatografia líquida de alta eficiência. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

FUNG, Y.S.; LAU, K.P. Development and validation of analytical methodology using capillary electrophoresis for separation and determination of anions in rainwater. **Talanta**, v.45, p.641-656, 1998.

GAPPER, L.W.; FONG, B. Y.; OTTER, D.E.; INDYK, H.E.; WOOLLARD, D.C. Determination of nitrite and nitrate in dairy products by ion exchange LC with spectrophotometric detection. **International Dairy Journal**, v.14, p.881-887, 2004.

GARCIA, S. T.; ACEDO, M.I.V.; GIL, E.P. Optimization and validation of a capillary electrophoresis methodology for inorganic anions in atmospheric aerosol samples. **Talanta**, v.75, p.748-752, 2008.

GENNARO, M. C.; ANGELINO, S. Separation and determination of inorganic anions by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.789, p.181-194, 1997.

GENNARO, M. C.; BERTOLO, P.L; CORDERO, A. Determination of nitrite and nitrate in Venice lagoon water by ion interaction reversed-phase liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.239, p.203-209, 1990.

GETTAR, R.T.; GARAVAGLIA, R.N.; GAUTIER, E.A.; BATISTONI, D.A. Determination of inorganic and organic arsenic species in water by ion chromatography coupled to hydride generation-inductively coupled plasma atomic spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.884, p.211-221, 2000.

GONZALEZ, M.J; VALLE, A.I.; MARINA, M.L. Determination of Nitrate and Nitrite Anions in Natural Waters by Reversed-Phase Ion Pair Liquid Chromatography. **Microchemical Journal**, v.50, p.1-5, 1994.

GOOGLE MAPAS. Disponível em: maps.google.com.br. Acesso em 10 de out 2011.

GROB, R.L.; BARRY, E.F. **Modern practice of gas chromatography**, 4^a edição, Estados Unidos, John Wiley & Sons, 2004,

GROS, N.; GORENC, B. Performance of ion chromatography in the determination of anions and cations in various natural waters with elevated mineralization. **Journal of Chromatography A**, v.770, p.119-124, 1997.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**, 7^a edição, New York, LTC, 2008.

HISSA, T.; SIRÉN, H.; SNELLMAN, M.; HAUTOJARVI, A. Quantification of anions and cations in environmental water samples: Measurements with capillary electrophoresis and indirect-UV detection. **Journal of Chromatography A**, v.853, p.403-411, 1999.

HOBDAY, S.R.; FORBES, C. **On Water and Land Drainage**. London, England: Sweet & Maxwell Limited, 1952.

HORWITZ, D. Evaluation of analytical methods used for regulation in food and drugs. **Analytical Chemistry**, v.54, p 67A- 76A, 1984.

IGAM, 2008. Instituto Mineiro de Gestão de Águas. Monitoramento da qualidade das águas superficiais na bacia do Rio Paraíba do Sul em 2007 - Relatório Anual. Belo Horizonte: 2008.

INMETRO, 2003. Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, Março de 2003.

ITO, K. Separation behavior of inorganic anions on na octadecyl-bonded sílica column coated with cetyltrimethylammonium by phthalate and salicylate eluents. **Journal of Chromatography A**, V.764, p.346-349, 1997.

JACKSON, P.E. Determination of inorganic ions in drinking water by ion chromatography. **Trends Analytical Chemistry**, v.20, p.320-329, 2001.

JUN, X.; LIMA, J.L.F.C.; MONTENEGRO, M.C.B.S.M. Simultaneous determination of inorganic anions and carboxylic acids in wine using isocratic separation on a permanently coated reversed-phase column and UV indirect detection. **Analytica Chimica Acta**, v.321, p.263-271, 1996.

KARAVOLTSOS, S.; SAKALLARI, A.; MIHOPOULOS, N.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M.J. Evaluation of the quality of drinking water in regions of Greece. **Desalination**, v.224, n.1-3, p.317-329, 2008.

KODAMATANI, H.; YAMAZAKI, S.; SAITO, K.; TOMIYASU, T.; KOMATSU, Y. Selective determination method for measurement of nitrite and nitrate in water samples using high-performance liquid chromatography with post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p.3163-3167, 2009.

KUBAN, P.; KUBAN, P.; KUBAN, V. Simultaneous capillary electrophoretic separation of small anions and cations after complexation with ethylenediaminetetraacetic acid. **Journal of Chromatography A**, v.836, p.75-80, 1999

LANÇAS, F.M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**, Editora Átomo, Campinas, 2009.

LARA, L.B.L.S.; ARTAXO, P.; MARTINELLI, L.A.; VICTORIA, R. L.; CAMERGO, P.B.; AYERS, G.P.; KRUSCHE, A.; FERRAZ, E.S.B.; BALLESTER, M.V. Chemical composition of rainwater and anthropogenic influences in the Piracicaba River Basin, Southeast Brazil. **Atmospheric Environment**, v.35, p.4937-4945, 2001.

LEAL, T.F.M.; FONTENELE, A.P.G.; PEDROTTI, J.J. Composição iônica Majoritária da águas de chuva no centro da cidade de São Paulo. **Química Nova**, v.27, n.6, p.855-861, 2004.

LEGNEROVÁ, Z.; SOLISCH, PETR, SKLENÁROVÁ, H.; SATPINSKÝ, D.; KARLÍČEK, R. Automated simultaneous monitoring of nitrate and nitrite in surface water by sequential injection analysis. **Water Research**, v.36, p.2777-2783, 2002.

Lei nº 3068 de 14 de junho, São Paulo. **Revista D.A.E**, 16 (26): 94, São Paulo, 1955.

LI, Y.; WHITAKER, J.S.; MCCARTY, C.L. Reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry with isotope dilution for the analysis of nitrate and nitrite in water. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p.476-483, 2011.

MACEDO, J. A. B. **Águas & Águas**, 3ª edição, Belo Horizonte: Jorge Macedo, 2007.

MACHADO, P.J.O; VALLE, G.M.; RINCO, L.; CARMO, L.F.Z; LATUF, M.O. Qualidade das águas do Rio Paraibuna no trecho urbano de Juiz de Fora, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2003. Disponível em: www.UFJF.br/virtu/files/2010/03/artigos-1a5.pdf. Acesso em 15 jan de 2011.

MANAHAN, S.E. **Environmental Chemistry**, 8 edição, New York: CRC Press, 2004.

MARENGO, E.; GENNARO, M.C.; ABRIGO, A. Experimental Design and Partial Least Squares for Optimization of Reversed-Phase Ion-Interaction Liquid Chromatographic Separation of Nitrite, Nitrate, and Phenylenediamine Isomers. **Analytical Chemistry**, v.64, p.1885-1893. 1992.

MEDINA, H.L.; GUTIÉRREZ, E.; VARGAS, M. C.; GONZÁLEZ, G.; MARÍN, J.; ANDUEZA, E.; Determination of phosphate and sulphite in natural waters in the presence of high sulphate concentrations by ion chromatography under isocratic conditions. **Journal of Chromatography A**, v.739, n.1-2, p.207-215, 1996.

MELLO, W. Z. Precipitation chemistry in the coast of the Metropolitan Region of Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Pollution**, v.114, n.2, p.235-242, 2001.

MELLO, W. Z.; ALMEIDA, M.D. Rainwater chemistry at the summit and southern flank of the Itatiaia massif, Southeastern Brazil. **Environmental Pollution**, v.129, p.63-68, 2004.

MINGJIA, W.; PACÁKOVÁ, V.; STULÍK, K.; SACCHETTO, G.A. Ion-pair high-performance liquid chromatography of inorganic anions with photometric, conductometric and amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.439, p.363-373, 1988.

MISKAKI, P.; LYTRAS, E.; KOUSOURIS, L.; TZOUMERKAS, P. Data quality in water analysis: validation of ion chromatographic method for the determination of routine ions in potable water. **Desalination**, v.213, p.182-188, 2007.

MIURA, Y.; KAWAOI, A. Determination of thiosulfate, thiocyanate and polythionates in a mixture by ion-pair chromatography with ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography A**, v.884, p.81-87, 2000.

MIURA, Y.; MATSUSHITA, Y.; HADDAD, P.R. Stabilization of sulfide and sulfite and ion-pair chromatography of mixtures of sulfide, sulfite, sulfate and thiosulfate. **Journal of Chromatography A**, v.1085, p.47-53, 2005.

MORALES, J.A; GRATEROL, L.S; MESA, J. Determination of chloride, sulfate and nitrate in groundwater samples by ion chromatography. **Journal Chromatography A**, v.884, p.185-190, 2000.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos**. Campinas, UNICAMP, 2007.

OEHRLE, S.A. Analysis of anions in drinking water by ion electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, V.733, p.101-104, 1996.

OHIRA, S.I; TODA, K. Ion chromatographic measurement of sulfide, methanethiolate, sulfite and sulfate in aqueous and air samples. **Journal of Chromatography A**, v.1121, p.280-284, 2006.

OHTA, K.; TANAKA, K. Simultaneous determination of common inorganic anions, magnesium and calcium ions in various environmental waters by indirect UV-photometric detection ion-chromatography using trimellitic acid-EDTA as eluent. **Analytica Chimica Acta**, v.373, p.189-195, 1998.

OHTA, K.; TANAKA, K.; FRITZ, J.S. Non-suppressed ion chromatography of inorganic anions, magnesium and calcium ions using a pyromellitate eluent and its application in evaluating environmental water quality. **Journal Chromatography A**, v.731, p.179-186, 1996.

OKAFOR, P.N.; OGBONNA, U.I. Nitrate and nitrite contamination of water sources and fruit juices marketed in South-Eastern Nigeria. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.16, p.213-218, 2003.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Guidelines for drinking water quality**, v.2, 1984.

PADARAUSKAS, A; OLSAUSKAITE, V; PALIULIONYTES, V. Simultaneous determination of inorganic anions and cations in water by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v 829, p 359-365, 1998.

PAPP, E.; FEHÉRVÁRI, A. Anion Chromatography using a coated PRP-1 column and eluents of pH>7. **Journal of Chromatography**, v.447, p.315-322, 1988.

PEREIRA, D. S. P. Estratégias e Políticas de Recursos Hídricos, São Paulo. 2003. Agência Nacional de Águas (ANA). Disponível em: <http://www.ana.gov.br/bibliotecavirtual/pesquisa>. Acesso em 11 de jun 2011.

PIMENTEL, M.F.; NETO, B.B. Calibração: Uma Revisão Para Químicos Analíticos. **Química Nova**, v.19, p.268-277, 1995.

Portaria Nº 518 do Ministério da Saúde de 24 de Mar 2004. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>. Acesso em 03 de jul de 2010.

PQA, 1999. Projeto qualidade das águas e controle da poluição hídrica. Disponível em: <http://www.hidro.ufrj.br/pqaceivap/mg/3-1-2-1-1.htm>. Acesso em: 20 nov. 2011.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

ROCHA, F. R.; SILVA, J.A.F; LAGO, C.L.; FORNARO, A.; GUTZ, I.G.R. Wet deposition and related atmospheric chemistry in the São Paulo metropolis, Brazil: Part 1. Major inorganic ions in rainwater as evaluated by Capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, **Atmospheric Environmental**, vol. 37, p.105-115, 2003.

RITCHER, E.M. Desenvolvimento de Novos sensores a partir de CD-Rs para análise voltamétrica e de métodos de eletroforese capilar para monitoramento de íons em água. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ROZAN, T.F.; LUTHER, G.W. An anion chromatography/ultraviolet detection method to determine nitrite, nitrate, and sulfide concentrations in saline (pore) waters. **Marine Chemistry**, v.77, n.1, p.1-6, 2002.

SAKAI, H.; FUJIWARA, T.; KUMAMARU, T. Determination of inorganic on water samples by íon-exchange chromatography with chemilunesce detection based on the neutralization reaction of nitric acid potassium hydroxide. **Analytica Chimica Acta**, v.331, p.239-244, 1996

SARDINHA, D.S.; CONCEIÇÃO, F.T.; BONOTTO, D.M.; SALLES, M.H.D.; ANGELUCCI, V.A. Avaliação de balanço anual de cátions e ânions na bacia do alto Sorocaba. **Revista Brasileira de Geociências**, v.38, p.730-740, 2008.

SAZAKLI, E.; ALEXOPOULOS, A.; LEOTSINIDIS, M. Rainwater harvesting, quality assessment and utilization in Kefalonia Island, Greece. **Water Research**, v.41, p.2039-2047, 2007.

SKOOG, D.A; WEST, D.M.; HOLLER, F.J. **Fundamentos de Química Analítica**, Cengage Learning, São Paulo, 2009.

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

SPIRO, T. G.; STIGLIANI, W.M. **Química Ambiental**, 2^a edição, Pearson Prentice Hall, 2009.

STEINMANN, P.; SHOTYK, W. Ion chromatography of organic-rich natural waters from peatlands III. Improvements for measuring anions and cations. **Journal of Chromatography A**, v.706, n.1-2, p.281-286, 1995.

TANAKA, K.; OHTA, K.; HADDAD, P.R.; FRITZ, J.S; MIYANAGA, A.; HU, W.; HASEBE, K. Simultaneous ion-exclusion/cation-excahnge chromatography of anions and cations in acid rain waters on weakly acidic cation-exchange resin by elution with sulfosalicylic acid. **Journal of Chromatography A**, v,884, p.167-174, 2000.

TANAKA, K.; OHTA, K.; HADDAD, P.R.; FRITZ, J.S; MIYANAGA, A.; HU, W.; HASEBE, K.; LEE, K.P.; SARZANIMI, C. High-perfomance ion-exclusion/cation-

exchange chromatography of anions and cations in acid rain waters on a weakly acidic cation-exchange resin. **Journal of Chromatography A**, v.920, p.239-245, 2001.

TANNER, P.A.; CHAN, S.M. Application of ion chromatography to the Hong Kong rainfall monitoring program. **Journal of Chromatography A**, v.739, p.249-256, 1996.

TIRUMALESH, K. Simultaneous determination of bromide and nitrate in contaminated waters by ion chromatography using amperometry and absorbance detectors. **Talanta**, v.74, o.1428-1438, 2008

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized for Singlelaboratory Validation of Methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v.74, p. 835-855, 2002,

UFCG. Universidade Federal de Campina Grande. Disponível em: www.dec.ufcg.edu.br. Acesso em 15 de Jan de 2012.

UNITED STATES ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY b. U.S. EPA, 2011. Disponível em: water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm#inorganic. Acesso em 20 nov de 2011.

UNIAGUA. Universidade da água (Uniagua). Disponível em: www.uniagua.org.br/publichtml/website/default.asp?tp=3&pag=aguaplaneta.html. Acesso em 26 de Nov de 2011.

UNIC RIO. Centro de Informações das Nações Unidas – Rio de Janeiro. Disponível em: <http://unicrio.org.br/direito-a-agua-potavel-e-saneamento-basico-e-juridicamentevinculativo-afirma-o-conselho-de-direitos-humanos-da-onu/>. Acesso em 11 de jun 2011.

VALSECCHI, S.; TARTARI, G.; POLESELLO, S. Determination of anions in rainwater by capillary electrophoresis with conductivity detection. **Journal of Chromatography A**, v.760, p.326-332, 1997.

VÁZQUEZ, A.; COSTOYA, M.; GARCIA, S.; HERRERO, C. A rainwater quality monitoring network: a preliminary study of the composition of rainwater in Galicia (NW Spain). **Chemosphere**, v.51, p.375-386, 2003.

WANG, G.F.; SATAKE, M.; HORITA, K. Spectrophotometric determination of nitrate and nitrite in water and some fruit samples using column preconcentration. **Talanta**, v.46, p.671-678, 1998.

WILLIAMS, M.R.; FISHER, T. R.; MELACK, J.M. Chemical composition and deposition of rain in the central Amazon, Brazil. **Atmospheric Environment**, v.31, p.207-217, 1997.

YANG, Y.; LIU, F.; KANG, J.; OU, Q. Improved selectivity of anions with methanol as additive: Determination of Cl^- , NO_3^- and SO_4^{2-} in river water by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v 834, p.393-399, 1999.

ZAKI, A.; CHAOUI, A.A.; TALIBI, A.; DEROUICHE, A.F.; ABOUSSAOUIRA, T.; ZARROUCK, K.; CHAIT, A.; HIMMI, T. Impact of nitrate intake in drinking water on the thyroid gland activity in male rat. **Toxicology Letters**, v.147, p.27-33, 2004.

ZUO, Y.; CHEN, H. Simultaneous determination of sulfite, sulfate, and hydroxymethanesulfonate in atmospheric waters by ion-pair HPLC technique. **Talanta**, v.59, p.875-881, 2003.

ZUO, Y.; WANG, C.; VAN, T. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in dew, rain, snow and lake water samples by ion-pair high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v.70, n.2, p.281-285. 2006.