

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Marciel Vaz Marinho

**Quantificação dos Nutrientes Minerais Na, K e Mg
por Espectrometria Atômica e dos ânions Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- e NO_2^- por Eletroforese
Capilar de Zona em Amostras de Água de
Carcinicultura**

Juiz de Fora

2022

Marciel Vaz Marinho

**Quantificação dos Nutrientes Minerais Na, K e Mg
por Espectrometria Atômica e dos ânions Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- e NO_2^- por Eletroforese
Capilar de Zona em Amostras de Água de
Carcinicultura**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Arromba de Sousa

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Marinho, Marciel Vaz.

Quantificação dos Nutrientes Minerais Na, K e Mg por Espectrometria Atômica e dos ânions Cl⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻, NO₃⁻ e NO₂⁻ - por Eletroforese Capilar de Zona em Amostras de Água de Carcinicultura / Marciel Vaz Marinho. -- 2022.

88 f. : il.

Orientador: Rafael Arromba de Sousa

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2022.

1. Validação analítica. 2. Carcinicultura. 3. Espectrometria Atômica. 4. Eletroforese Capilar. 5. Kit de potássio. I. Sousa, Rafael Arromba de, orient. II. Título.

Marciel Vaz Marinho

Quantificação dos Nutrientes Minerais Na, K e Mg por Espectrometria Atômica e dos ânions Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- e NO_2^- por Eletroforese Capilar de Zona em Amostras de Água de Carcinicultura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovada em 02 de junho de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Arromba de Sousa - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 23/05/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Arromba de Sousa, Professor(a)**, em 02/06/2022, às 22:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Jonas Augusto Rizzato Paschoal, Usuário Externo**, em https://sei.ufjf.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=900682&infra_sistema=10... 1/2

09/06/2022 14:40

SEI/UFJF - 0798391 - PROPP 01.5: Termo de Aprovação



08/06/2022, às 10:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Auxiliadora Costa Matos, Professor(a)**, em 08/06/2022, às 16:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj (www2.ufff.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0798391** e o código CRC **1008CA7E**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser meu conforto nos momentos mais difíceis.

À minha mãe por não me deixar esquecer que sempre terei para onde voltar, e por ter me apoiado, mesmo quando não concordou com as minhas decisões. Ao meu avô, pelas orações. Tenho certeza de que me protegeram até aqui. E ao meu bunnynho, pela companhia.

Ao meu orientador, Prof. Rafael, pelos ensinamentos, e respeito com que sempre me tratou.

Ao Paulo e à Heloísa, da Veromar, pelos esclarecimentos e fornecimento das amostras, sem as quais não seria possível esse trabalho.

Ao Prof. Marcone e à Maria Patrícia, do GQAQ, pela parceria na análise dos ânions e pelos ensinamentos. Ao Prof. Gustavo, da físico-química, pela ajuda na determinação da viscosidade das soluções.

Aos membros do Baccan e adjacências, pela valiosa ajuda ao longo desses meses, por me receber tão bem no grupo, e por tornar essa etapa da minha vida mais agradável e cheia de aprendizados. Em especial, agradeço à Náira pela amizade e por todos os rolês que compartilhamos: tudo registrado em foto e vídeo. Ao Felipe, pela indispensável ajuda com o fotômetro. Ao Thales, pela valiosa ajuda com o equipamento de absorção.

Aos amigos que fiz até aqui, aos que ainda estão comigo, aos que a vida e as circunstâncias afastaram, obrigado por tudo. Nunca serão esquecidos porque contribuíram para o que sou hoje: vocês também são culpados.

À UFJF, pela estrutura oferecida, e à CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos professores e funcionários da UFJF, em especial ao técnico Fernando, pela ajuda.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a finalização do trabalho e fizeram parte desta jornada.

RESUMO

Neste trabalho foram propostos métodos analíticos para a determinação dos teores de Na^+ , K^+ e Mg^{2+} e determinação simultânea de Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- e NO_2^- em amostras de água provenientes de viveiros de criação de camarão, empregando as técnicas de espectrometria de emissão e absorção atômicas com chama e eletroforese capilar com detecção UV. Os métodos foram aplicados em 6 (seis) amostras provenientes de diferentes sistemas de criação de camarão. A precisão, medida pelo RSD ($n=10$), ficou abaixo de 4 % para os cátions e abaixo de 5,0 % para os ânions, indicando baixa dispersão dos dados. Em relação à exatidão, os métodos obtiveram recuperações médias ($n=3$) de 102 % para Na^+ , 96 % para K^+ e 95 % para Mg^{2+} , 98 % para Cl^- , 100 % para SO_4^{2-} e 99 % para HCO_3^- e NO_3^- . Os limites de quantificação dos métodos variaram entre 85 e 814 mg/L para os cátions e entre 9 e 326 mg/L para os ânions. No desenvolvimento do método por eletroforese capilar de zona, foi usado eletrólito composto por $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$ 60 mM, CTAB 2,5 mM, acetonitrila 0,88 % (v/v) e metanol 2,6 % (v/v), otimizado a partir de um planejamento de misturas composto por 6 (seis) diferentes condições de BGE, e tendo como parâmetros a estatística de resolução cromatográfica (CRS) e os ensaios de repetibilidade para tempos de migração e áreas de pico ($n=6$). Determinaram-se os raios hidratados dos ânions em cada uma das 6 (seis) condições avaliadas no planejamento de misturas. A adição dos solventes orgânicos metanol e acetonitrila resultou na diminuição dos raios solvatados dos ânions, entre 4 e 12 %, diminuindo a interação analito-parede do capilar e aumentando a seletividade do método. Na quantificação dos íons, os teores determinados de Na^+ , K^+ e Mg^{2+} variaram até 244, 300 e 330 %, respectivamente, entre as diferentes amostras; a concentração de Cl^- variou até 262 %, enquanto SO_4^- , HCO_3^- e NO_3^- variaram 4000, 341 e 2900 %, respectivamente. Foram feitos estudos de viabilidade para o desenvolvimento de um kit para a quantificação de potássio por via úmida, que indicaram a possibilidade de um kit semiquantitativo para determinação do analito, considerando a massa do precipitado formada a partir da adição de tetrafenilborato de sódio à solução. Todos os métodos desenvolvidos se mostraram confiáveis e aplicáveis em rotinas de análise, seja pela sua relativa simplicidade, seja pelo custo moderado de operação dos equipamentos empregados.

Palavras-chave: Validação analítica. Carcinicultura. Espectrometria atômica. Raio iônico. Eletroforese capilar. Kit para quantificação de potássio.

ABSTRACT

In this work, analytical methods were proposed for the determination of Na^+ , K^+ and Mg^{2+} contents and the simultaneous determination of Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- e NO_2^- in shrimp farming water samples, using atomic absorption and emission spectroscopy and capillary electrophoresis with UV detection. The methods were applied in 6 (six) samples coming from different shrimp farming. The precision, measured by the RSD (%) ($n=10$), was below 4.0 % for cations and below 5.0 % for anions, thus presenting low data dispersion. Regarding accuracy, the methods obtained mean recoveries ($n=3$) of 102 % for Na^+ , 96 % for K^+ and 95 % for Mg^{2+} , 98 % for Cl^- , 100 % for SO_4^{2-} and 99 % for HCO_3^- and NO_3^- . The quantification limits of the methods varied between 85 and 814 mg/L for cations and between 09 and 326 mg/L for anions. In the development of the capillary electrophoresis method, an optimized electrolyte consisting of K_2CrO_4 60 mM, CTAB 2.5 mM, acetonitrile 0.88% and methanol 2.6% (v/v) and a pH range between 8.0 and 8.5 was used. Its optimization was performed from a mixture design, considering 6 (six) different electrolyte composition conditions, and having as parameters the chromatographic resolution statistics (CRS) and repeatability tests ($n=6$) for migration time and peak area. The hydrated radii of the anions were also determined in each of the 6 (six) conditions evaluated in the experimental mixture design. The addition of the organic solvents methanol and acetonitrile reduced the ion-analyte interaction in the solution, causing a decrease in the anion radii, between 4 and 12 %; methanol showed the greatest decreases in the anion-solvent interaction. As for the quantification of the cations in the samples, the determined contents of Na^+ , K^+ and Mg^{2+} varied up to 244, 300 and 330 % among the samples, respectively; and for the ions, the concentration of Cl^- varied up to 262 %, while SO_4^- , HCO_3^- e NO_3^- varied up to 4000, 341 and 2900 %, respectively. Viability studies were carried out for the development of a wet based kit for potassium quantification, which results indicated the possibility of a semi-quantitative approach for this analyte determination, from the mass of the precipitate formed in solution after reacting with tetraphenylborate. The developed methods proved to be reliable and applicable in routine analysis, either due their relative simplicity or the moderate cost of the operational equipment used.

Keywords: Analytical validation. Shrimp farming. Atomic spectrometry. Ionic radii. Capillary electrophoresis. Kit for potassium quantification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da formação do fluxo eletrosmótico no interior do capilar de sílica fundida.	27
Figura 2 - Comparação das curvas de calibração com padrão interno e curvas de adição de padrão para o Na^+ (n=3, triplicatas autênticas).....	44
Figura 3 - Comparação das curvas de calibração com padrão interno e adição de padrão para o K^+ (n=3, triplicatas autênticas).....	44
Figura 4 - Comparação das curvas de calibração externa e curvas de adição de padrão para o Mg^{2+} (n=3, triplicatas autênticas).....	45
Figura 5 - Solução de TFBNa, na concentração de 0,01 mol/L	50
Figura 6 - Precipitação do potássio na solução padrão após a adição da solução de TFBNa 0,01 mol/L.....	50
Figura 7 - Teste de solubilização na solução precipitada de tetrafenilborato de potássio após a adição de hidróxido de sódio (A), ácido nítrico (B), acetona (C).....	51
Figura 8 - Número de gotas da solução acetona: água 2:1 (v/v) adicionadas até a dissolução do precipitado formado, pela adição de 2 mL de solução de TFBNa 0,01 M em 2 mL de solução padrão.....	52
Figura 9 - Massa do precipitado formada (em g) a partir da adição de 4 mL de TFBNa 0,01 mol/L a 4 mL solução padrão em diferentes concentrações de K^+	54
Figura 10 - Curva de mobilidade efetiva (μ_{ef}) em função do pH para os ânions para CrO_4^{2-} ,	57
Figura 11 - Eletroferograma de uma amostra mistura de 250 mg/L de Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- e NO_2^- com 13 mM de BGE ¹	59
Figura 12 - Eletroferogramas obtidos para a amostra AMR2 a partir de diferentes condições de análise.....	60
Figura 13 - Eletroferogramas, em duplica, obtidos de acordo com as diferentes composições de ACN e MeOH no BGE utilizadas no planejamento de misturas.....	63
Figura 14 - Eletroferogramas das amostras de água provenientes de viveiros de criação de camarão utilizadas para a quantificação dos ânions Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- e NO_3^- por eletroforese capilar de zona	71

Figura 15 - Titulação condutométrica, em triplicata, de 1,00 mL de solução de NaCl 0,1 mol/L acrescido de 40 mL de água deionizada, utilizando a solução padronizada de AgNO ₃ 0,048 mol/.....	73
Figura 16 - Curva de titulação condutométrica da amostra de criação AMR2, contendo íons cloreto, utilizando solução padronizada de AgNO ₃ 0,048 mol/L	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de referência para a criação do camarão da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i> , em sistema intensivo de produção e frequência recomendada de análise	17
Tabela 2 - Fatores para multiplicação por salinidade (ppmil) para obter concentrações de íons equivalentes à água do mar, em mg/L	21
Tabela 3 - Composição da água do mar sintética (AMS1), avolumada para 1 L de solução	34
Tabela 4 - Parâmetros de pH medidos nas amostras por meio de instrumentação apropriada, após filtração	39
Tabela 5 - Parâmetros Instrumentais empregados para a determinação de Na ⁺ e K ⁺ , por F AES e Mg ²⁺ , por F AAS, em amostras de água provenientes de viveiros de criação de camarão.....	40
Tabela 6 - Concentrações obtidas para Na ⁺ e K ⁺ a partir da análise da amostra de água salina sintética, obtidas por calibração externa, com e sem lítio como padrão interno	41
Tabela 7 - Parâmetros analíticos das curvas de calibração com padrão interno e calibração externa para determinação de Na ⁺ , K ⁺ e Mg ²⁺ em amostras de água provenientes de viveiros de criação de camarão	42
Tabela 8 - Concentrações determinadas de Na ⁺ , K ⁺ e Mg ²⁺ na amostra mistura ¹ e nas amostras individuais AMR1 e AMR5 e valores de recuperação obtidos para cada analito, a partir das curvas de calibração	46
Tabela 9 - Valores calculados para os limites de detecção e quantificação para a determinação de Na ⁺ , K ⁺ e Mg ²⁺ em água de carcinicultura	47
Tabela 10 - Concentrações (em mg/L) de Na ⁺ , K ⁺ e Mg ²⁺ nas amostras sintética e de criação, com detecção por F AES e F AAS	48
Tabela 11 - Determinação da proporção teórica dos cátions no viveiro para a amostra AMR6, e comparação com aquelas encontradas através da aplicação de método analítico	49
Tabela 12 - Volume, em mL, da solução solubilizante adicionada à 5 mL da amostra mistura ¹ até a completa dissolução do precipitado formado	52
Tabela 13 - Número de gotas adicionadas de solução de acetona 33% (v/v) necessárias para a dissolução do precipitado tetrafenilborato de potássio, formado pela adição de 2 mL de solução de TFBNa 0,01 mol/L a 2 mL de amostra.....	53

Tabela 14 - Massa (em g) do precipitado obtida após a adição de 4 mL de solução de TFBNa 0,01 M a 4 mL de amostra ou solução padrão	55
Tabela 15 - Quantidades de ACN (acetonitrila) e MeOH (metanol), em % (v/v) ¹ usados em cada mistura, preparada em duplicata, e resposta estatística CRS ²	62
Tabela 16 - Valores de RSD (%) para o teste de repetibilidade	64
Tabela 17 - Raios de solvatação dos ânions (em Å) determinados a partir dos diferentes BGEs do planejamento de misturas	65
Tabela 18 - Valores de RSD % considerando a área dos picos e o tempo de migração dos analitos Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , HCO ₃ ⁻ e NO ₃ ⁻ na amostra mistura ¹ determinados por Eletroforese Capilar de Zona	67
Tabela 19 - Limites de detecção, quantificação e recuperação obtidos para os analitos Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , HCO ₃ ⁻ , NO ₃ ⁻ por Eletroforese Capilar de Zona, a partir da amostra mistura ¹ e das amostras AMR1 e AMR6	68
Tabela 20 - Resultados obtidos para a quantificação dos analitos Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , HCO ₃ ⁻ e NO ₃ ⁻ nas amostras de água de carcinicultura por eletroforese capilar e respectivos RSD.	69
Tabela 21 - Concentração determinada de cloreto e valores de recuperação obtidos, a partir da curva de titulação condutométrica de 1,00 mL da amostra mistura acrescido de 40,0 mL de água deionizada	74
Tabela 22 - Concentrações determinadas de Cl ⁻ (em mg/L) nas amostras de água provenientes de viveiros de criação de camarão, por titulação condutométrica.....	74
Tabela 23 - Aplicação do teste t-student para a comparação das concentrações médias de Cl ⁻ obtidas por eletroforese capilar e condutometria, a um nível de significância de 95 %	76
Tabela 24 - Tempos de escoamento médio medidos e viscosidade calculada para os BGEs utilizados no planejamento de mistura.	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGE	Eletrólito de fundo, do inglês <i>Background Electrolity</i>
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CE	Eletroforese Capilar, do inglês <i>Capillary Electrophoresis</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CRS	Estatística de Resolução Cromatográfica, do inglês <i>Chromatography Resolution Statistic</i>
CZE-UV	Eletroforese capilar de zona com detecção UV, do inglês <i>Capillary Zone Electrophoresis with UV Detection</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EOF	Fluxo Eletrosmótico, do inglês <i>Electroosmotic Flow</i>
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectroscopy</i>
F AES	Espectrometria de emissão atômica com chama, do inglês <i>Flame Atomic Emission Spectroscopy</i>
ICP – AES	Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy</i>
LOD	Limite de Detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LOQ	Limite de Quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>
MeOH	Metanol
NH ₃	Amônia
NH ₄ ⁺	Amônio
OD	Oxigênio dissolvido
pH	Potencial hidrogeniônico
ppmil	partes por mil (= g/L)
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
TFBNa	Tetrafenilborato de sódio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE DE CARCINICULTURA NO PAÍS	14
1.2	MONITORAMENTO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA USADA NOS VIVEIROS DE CRIAÇÃO DO CAMARÃO	16
1.3	TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE CÁTIOS E ÂNIOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA PROVENIENTES DE VIVEIROS DE CRIAÇÃO DE CAMARÃO	21
1.3.1	Espectrometria de absorção e emissão atômica com chama	23
<i>1.3.1.1</i>	<i>Interferentes</i>	<i>24</i>
1.3.2	Eletroforese capilar de zona com detecção por UV – CZE-UV	25
2	OBJETIVOS.....	30
2.1	OBJETIVOS GERAIS	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3	PARTE EXPERIMENTAL	31
3.1	MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS.....	31
3.2	AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS	33
3.2.1	Amostra de água salina sintética	33
3.2.2	Amostras provenientes dos viveiros de criação de camarão	34
3.3	AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO ANALÍTICO DOS MÉTODOS PROPOSTOS.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE A AMOSTRA SALINA SINTÉTICA	38
4.2	CONSIDERAÇÕES SOBRE AS AMOSTRAS PROVENIENTES DOS VIVEIROS DE CRIAÇÃO DE CAMARÃO.....	38
4.3	DETERMINAÇÃO DE Na ⁺ E K ⁺ POR FOTOMETRIA DE CHAMA E Mg ²⁺ POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA.....	39
4.3.1	Avaliação de desempenho analítico dos métodos propostos.....	41
4.3.2	Aplicação dos métodos	47

4.4	DESENVOLVIMENTO DE UM KIT PARA A QUANTIFICAÇÃO DE POTÁSSIO POR VIA ÚMIDA	49
4.5	DETERMINAÇÃO DOS ÂNIOS Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- e NO_2^- POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA COM DETECTOR UV/VIS	55
4.5.1	Escolha dos constituintes do BGE e ajuste da força iônica.....	56
4.5.2	Planejamento Experimental.....	58
4.5.2.1	<i>Cálculo do raio de solvatação das espécies aniônicas nos diferentes BGE utilizados no planejamento de misturas</i>	<i>64</i>
4.5.3	Avaliação de desempenho analítico dos métodos propostos.....	66
4.5.4	Aplicação do método	68
5	DETERMINAÇÃO DE CLORETO POR TITULAÇÃO CONDUTOMÉTRICA..	72
6	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	APÊNDICE A - Cálculo das viscosidades dos BGEs usados no planejamento de misturas	86
	APÊNDICE B - Procedimento utilizado para a validação e quantificação do método usado para a determinação dos analitos Cl^-, SO_4^{2-}, HCO_3^-, NO_3^- e NO_2^- em amostras de água provenientes de viveiros de criação de camarão	88

1 INTRODUÇÃO

Faz-se nas próximas seções uma revisão bibliográfica acerca da atividade de carcinicultura no Brasil, bem como aspectos relevantes relacionados à qualidade da água utilizada nos viveiros de criação de camarão e técnicas analíticas disponíveis para a quantificação dos compostos iônicos dissolvidos.

1.1 ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE DE CARCINICULTURA NO PAÍS

A carcinicultura é um ramo específico da aquicultura¹ voltado para a criação de camarão em cativeiro, seja em ambiente marinho, seja em ambiente de água doce (RIBEIRO, L. *et al.*, 2014). A atividade se encontra em expansão no Brasil, especialmente devido ao crescimento da demanda por alimentos mais nutritivos e saudáveis, tal como é o camarão, e devido à boa receptividade e possibilidade de expansão do produto brasileiro no mercado internacional (ROCHA, 2018). Apesar dos impactos provocados pela pandemia do coronavírus, o setor cresceu 33 % no ano de 2020, majoritariamente devido ao aumento do consumo no mercado interno. Aliado a isso, a retomada da exportação do produto para a Ásia, embora ainda de maneira tímida, e a possibilidade de exportação para os Estados Unidos e a União Europeia, ajudam a explicar a boa expectativa de crescimento desse mercado para os próximos anos (CARVALHO, 2021).

A história da carcinicultura no país se inicia na década de 1970, no Rio Grande do Norte, quando foi criado um centro para pesquisa e produção de pós-larvas de camarões marinhos (MADRID; WURMANN, 2011) e em Santa Catarina, onde eram desenvolvidas pesquisas em reprodução, larvicultura e engorda (CAVALCANTI *et al.*, 2005). Entre os anos de 1978 e 1984, o governo do Rio Grande do Norte desenvolveu experiências com camarões da espécie *Marsupenaeus japonicus* que não deram resultados satisfatórios, devido à baixa adaptabilidade da espécie às variações bruscas da salinidade do ambiente, causadas pelo fim da estiagem na região; também foram mal sucedidas, nos anos seguintes, as tentativas de domesticação das espécies nativas *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Farfantepenaeus subtilis* e *Litopenaeus schmitti* (FREIRE;

¹Aquicultura é definida como o cultivo de organismos que vivem em água marinha, salobra ou doce, abrangendo, portanto, somente organismos aquáticos e anfíbios. Além da criação de camarão, a atividade inclui a criação de ostras (ostreicultura), peixes (piscicultura) e rãs (ranicultura) (RIBEIRO, L.*et al.*, 2014).

BALDI, 2014). Nestes casos, entre os fatores que contribuíram para os resultados aquém do esperado pode-se citar o desconhecimento das necessidades proteicas dos camarões e a falta de insumos.

Apesar disso, como exemplifica Natori *et al.* (2011), conhecimentos importantes foram adquiridos durante esses anos, especialmente em relação ao manejo da água, reprodução e larvicultura dos espécimes.

Na década de 1990, foi introduzido no país o camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*, também chamado de camarão-branco-do-pacífico, ainda hoje o principal produto da carcinicultura brasileira (TAHIM *et al.*, 2018). Devido à boa adaptabilidade da espécie às condições climáticas e ambientais do país e ao seu rápido crescimento, em 2003, o Brasil já era o sexto maior produtor mundial de camarão (ROCHA, 2018). Nos anos seguintes, entretanto, principalmente entre 2005 e 2011, o setor experimentou um período de declínio e estagnação, cuja causa principal foi o aparecimento de doenças virais, entre elas, a doença da mancha branca, que acometeu as fazendas de cultivo, causando prejuízos de milhões de dólares ao setor (CAVALCANTI *et al.*, 2005). A partir de 2012, o setor começa a se recuperar, muito em função da introdução ou aperfeiçoamento de novas tecnologias, abrangendo toda a cadeia de produção, desde os fornecedores de insumos (ração, fertilizantes, etc) e medidores de parâmetros físico-químicos, até implementação de novos sistemas de criação do camarão e melhoramento genético (TAHIM *et al.*, 2018).

Essas novas tecnologias têm permitido a interiorização da atividade de carcinicultura no país, para as chamadas águas meso (salinidade entre 5 e 18 ppmil) e polihalinas (salinidade entre 19 e 30 ppmil), cuja iniciativa se deve em grande parte ao adensamento das fazendas nos estuários, à expansão do mercado consumidor e ao aumento da especulação imobiliária no litoral (TAHIM *et al.*, 2018), e a substituição dos sistemas extensivos (0,5 a 4 camarões/m²) e semi-intensivos (6-20 camarões/m²) de produção para sistemas intensivos (20-100 camarões/m²) (NUNES, 2019).

A base produtora da carcinicultura brasileira é predominantemente formada por micro (60 %), pequenos (15 %) e médios (20 %) carcinicultores (CARVALHO, 2021), concentrados majoritariamente na região Nordeste, com destaque para os Estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Bahia, Sergipe, Paraíba e Piauí. De acordo com a Pesquisa da Pecuária Municipal - PPM, feita pelo IBGE, em 2020, os Estados da região Nordeste foram responsáveis por 99,6 % da produção nacional, com Rio Grande do Norte e Ceará, representando, respectivamente, 38,2 e 30,2 % do total nacional produzido.

Essa grande diferença em relação aos outros Estados está relacionada à extensa faixa litorânea nordestina e às condições climatológicas, hidrológicas e topográficas favoráveis encontradas na região (CASTRO; PAGANI, 2004). A atividade também está presente nos Estados do Pará, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, de acordo com o mesmo documento.

Como exemplifica Cavalcanti *et al.* (2005) e Ribeiro, L. *et al.* (2014), o crescimento sustentado e com alta produtividade do setor depende da implementação de boas práticas de manejo e biossegurança, além da produção de conhecimento técnico-científico na área e capacitação de mão-de-obra, de modo que se busque, continuamente, o aprimoramento do diagnóstico e tratamento de enfermidades, a análise e o monitoramento dos parâmetros físicos e químicos das águas de criação, discutido a seguir, o conhecimento das necessidades nutricionais dos espécimes, melhores insumos alimentares e sistemas de criação mais eficientes.

Um outro aspecto da atividade carcinicultora, que a torna importante do ponto de vista social, trata-se da sua capacidade de absorção de mão-de-obra local, portanto, diminuindo a migração, e de geração de renda, já que é majoritariamente praticada por pequenos e médios produtores (ROCHA, 2020).

1.2 MONITORAMENTO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA USADA NOS VIVEIROS DE CRIAÇÃO DO CAMARÃO

De acordo com Cavalheiro *et al.* (2016), a água usada nos viveiros de criação de camarão necessita de um controle e monitoramento constante da sua qualidade, a fim de garantir adequado crescimento, reprodução e sobrevivência dos espécimes. Os principais parâmetros químicos e físicos associados a esses fatores são: composição iônica da água, pH, temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade, dureza, alcalinidade, concentração de nitritos e nitratos, amônia, concentração de sulfito de hidrogênio e partículas sólidas em suspensão (BOYD, 2001; BOYD; TUCKER, 1998; NUNES, 2002;). Algumas dessas características físico-químicas, com seus respectivos parâmetros de referência, para o *Litopenaeus vannamei*, em sistema intensivo de produção, são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros de referência para a criação do camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*, em sistema intensivo de produção e frequência recomendada de análise

Parâmetros	Variação	Frequência
Temperatura	26-32°C	diariamente (06h e 18h)
Salinidade	12-28 ppmil [†]	diariamente (10h e 14h)
Transparência	35-45 cm	diariamente (10h e 14h)
Cor	preferencialmente marrom	diariamente
Profundidade	1,0 – 2,0 m	-
Oxigênio dissolvido	> 3,7 mg/L	diariamente (06h e 18h)
pH	7 - 9	diariamente (manhã e tarde)
Nitrito	< 0,2 mg/L	semanal
Amônia total	< 0,2 mg/L	semanal
Fósforo	0,2 - 0,9 mg/L	semanal

[†]partes por mil = g/L;

Fonte: Adaptada de Soares *et al.*, 2021.

O oxigênio dissolvido é a variável mais crítica da qualidade da água, especialmente em sistemas intensivos (20-100 camarões/m²) e semi-intensivos (6-20 camarões/m²) de produção. As taxas de oxigênio requeridas pelos animais variam em função da espécie, tamanho, alimento ofertado, grau de atividade, concentração de matéria orgânica e, também, dos parâmetros temperatura e salinidade do ambiente (BETT; VINATEA, 2009; PINA-VALDEZ *et al.*, 2015). Segundo Boyd (1990), o aumento da temperatura e da salinidade causam a diminuição do oxigênio dissolvido no ambiente. Baixas concentrações de OD tendem a afetar o crescimento dos espécimes e aumentar a susceptibilidade a doenças (VINATEA *et al.*, 2011). Para a espécie *Litopenaeus vannamei*, o ideal é uma concentração de oxigênio dissolvido acima de 3,0 mg/L (ROCHA, 2000).

De acordo com Wyban *et al.* (1995), a temperatura ótima para o desenvolvimento do *Litopenaeus vannamei* juvenil é de 27 °C, e temperaturas abaixo de 25 °C ou acima de 35 °C já podem afetar negativamente o desempenho desses espécimes. Variações bruscas na temperatura afetam a capacidade osmorregulatória dos camarões, que eventualmente se tornam fracos e propensos ao aparecimento de enfermidades (LEMAIRE *et al.*, 2002). Segundo Nunes (2002), a baixas temperaturas, os processos metabólicos e fisiológicos do camarão, incluindo a atividade alimentar, diminuem.

No caso do pH, sua variação está relacionada aos efeitos nos processos metabólicos e fisiológicos dos crustáceos. Nos viveiros, o principal elemento responsável pela alteração do pH é

o dióxido de carbono- CO₂, que é liberado pela respiração dos organismos aquáticos e consumido na fotossíntese das algas (BOYD, 2018).

Os compostos nitrogenados oriundos da criação do camarão (amônia, nitrato e nitrito), em concentrações altas, podem comprometer o crescimento e a resistência dos animais a doenças. A amônia é produzida a partir do metabolismo de aminoácidos dos espécimes, da decomposição da matéria orgânica pelas bactérias, incluindo aí as sobras de ração, adubos orgânicos e microalgas, e através dos fertilizantes nitrogenados, introduzidos no ambiente para estimular a floração/desenvolvimento de algas, a fim de diminuir custos com a alimentação artificial, especialmente no caso de sistemas extensivos e semi-intensivos de produção (KUBITZA, 2017).

O excesso de amônia na água pode ser absorvido pelo fitoplankton ou ser oxidado a nitrito e em seguida a nitrato por bactérias nitrificadoras (KUBITZA, 2017). Para os peneídeos, nos viveiros, a concentração de amônia tóxica (NH₃-forma não ionizada) não deve exceder o limite de 2 mg/L de amônia total (NH₃ + NH₄⁺) (LIN; CHEN, 2003; CAMPOS, 2014).

Elevadas concentrações de nitrito tendem a reduzir a capacidade da hemocianina de transportar oxigênio para o sangue dos camarões (TSENG; JEN, 2003). Segundo estudos de Tseng e Chen (2004), o aumento da concentração do nitrito nos viveiros influencia negativamente no crescimento, muda, consumo de oxigênio e sistema imunológico do *Litopenaeus vannamei*. Experimentos conduzidos por Kuhn *et al.* (2010) mostram que a tolerância dos espécimes à concentração de nitrito no ambiente aumenta com o aumento da concentração de cloretos na água (aumento de salinidade), porque estes são absorvidos mais facilmente pelos camarões.

O nitrato, apesar de ser menos tóxico para os camarões em comparação à amônia e nitrito, em concentrações elevadas, acima de 100 mg/L, pode prejudicar o crescimento dos espécimes, e acima de 400 mg/L, ser letal. Em sistemas de recirculação e com bioflocos o nitrato pode atingir concentrações muito elevadas e precisa ser monitorado (KUBITZA, 2017). O sistema de bioflocos caracteriza-se pela criação dos camarões com altas densidades de estocagem, elevada produtividade e altamente oxigenados, com mínima renovação de água e altamente fertilizados (EMERENCIANO *et al.*, 2013).

A salinidade² é causada basicamente por sete substâncias iônicas dissolvidas na água, a saber: sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), cloreto (Cl^-), sulfato (SO_4^{2-}) e bicarbonato (HCO_3^-) (BOYD, 2001). Para o *Litopenaeus vennamei*, de acordo com Boyd (1989), o intervalo de salinidade considerado ideal é entre 15 e 25 ppmil. Para Lamaire *et al.* (2002), a salinidade que proporciona um conforto osmótico para os espécimes, no entanto, é em torno de 27 ppmil.

É importante correlacionar, ainda que brevemente, a salinidade da água nos viveiros à osmorregulação desses animais. Entende-se por osmorregulação “a manutenção de pressão osmótica constante nos fluidos de um organismo através do controle das concentrações de água e íons”. Para manter o equilíbrio isosmótico, os camarões necessitam ingerir constantemente água do meio, o que demanda considerável gasto energético (CARVALHO, 2021).

Os íons de sódio, potássio e cloreto são essenciais nos processos fisiológicos dos camarões, especialmente no processo osmorregulatório e no balanço ácido:base. Tais íons constituem cerca de 90 % da hemolinfa dos espécimes, que responde pela sua capacidade de adaptação a diferentes salinidades (ROY *et al.*, 2007). Experimentos conduzidos por Davis *et al.* (2005), Saoud *et al.* (2003) e Perez-Velazquez *et al.* (2012) demonstraram que a deficiência de sódio e potássio nos viveiros influenciam negativamente na sobrevivência e crescimento dos camarões em cativeiro.

Para a criação de camarão, recomenda-se que a água apresente dureza total ≥ 150 mg/L CaCO_3 e alcalinidade total ≥ 100 mg/L CaCO_3 , sendo esta, definida como a soma das concentrações das bases dissolvidas na água, principalmente carbonato, bicarbonato e hidróxidos, e aquela, como a soma das concentrações de cátions bivalentes, especialmente Ca^{2+} e Mg^{2+} , mas também, Sr^{2+} , Fe^{2+} e Mn^{2+} .

Situações em que a alcalinidade é maior que a dureza são extremamente prejudiciais para os viveiros, pois permitem elevação do pH da água a níveis críticos (VAN WYK; SCARPA, 1999). De acordo com Valença e Mendes (2004), juntamente com os íons cloreto e sulfato, os íons bicarbonatos contribuem substancialmente para a manutenção da pressão osmótica nos camarões e para a formação do seu exoesqueleto.

² Outros elementos minerais presentes, como o fósforo, nitrogênio, zinco, manganês, cobre, boro e ferro, embora não influenciem na salinidade do ambiente, são essenciais para o crescimento das algas que servirão de alimento para os camarões (BOYD, 2001).

Os íons de Ca e Mg são importantes para a manutenção da homeostase celular, metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos, além de estarem ligados ao processo de osmorregulação e na mineralização do exoesqueleto dos animais (BOYD; TUCKER, 1998; ROY *et al.*, 2007). O desequilíbrio entre cálcio e magnésio na água de viveiro foi apontado como a causa da câimbra muscular nos camarões, comprometendo o seu desenvolvimento (SAOUD *et al.*, 2003; VALENZUELA-MADRIGAL *et al.*, 2017).

A concentração e a proporção ideais desses íons nos viveiros de criação de camarão não são bem conhecidas (SOWERS *et al.*, 2005). Sabe-se, no entanto, que a composição iônica dessa água do viveiro é fator fundamental para o crescimento e sobrevivência desses espécimes. (BOYD; QUEIROZ, 2004; VALENÇA; MENDES, 2004; ROY *et al.*, 2007; VALENZUELA-MADRIGAL *et al.*, 2017).

Nos casos em que o cultivo do camarão ocorre em baixas e médias salinidades, a mesma proporção entre os íons encontradas na água do mar deve ser mantida nos viveiros (BOYD, 2001; BOYD; THUNJAI, 2003; VALENÇA; MENDES, 2004; SOWERS *et al.*, 2005). A proporção entre a concentração desses íons na água do mar, considerada constante, é a seguinte: ($\text{Na}^+:\text{Mg}^{2+}:\text{Ca}^{2+}:\text{K}^+$) 28:3:1:1. Ou ainda: relação sódio/potássio ($\text{Na}^+:\text{K}^+$) = 28:1; relação magnésio/cálcio ($\text{Mg}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$) = 3:1; relação cálcio/potássio ($\text{Ca}^{2+}:\text{K}^+$) = 1:1, relação magnésio/potássio ($\text{Mg}^{2+}:\text{K}^+$) = 3:1 e cloreto/sódio/magnésio ($\text{Cl}^-:\text{Na}^+:\text{Mg}^{2+}$) = 14:8:1 (BOYD, 2018; SUGUNA, 2020).

As concentrações e, portanto, as proporções requeridas desses íons, podem ser estimadas a partir da multiplicação da salinidade do viveiro (geralmente medida usando um salinômetro ou refratômetro) pelo fator do íon desejado, mostrado na Tabela 2. Considerando, por exemplo, uma água de criação com salinidade de 10 ppmil, a concentração de sódio, magnésio e potássio deverá ser de 3043,5, 391,3 e 110,1 mg/L, respectivamente.

Tabela 2 - Fatores para multiplicação por salinidade (ppmil) para obter concentrações de íons equivalentes à água do mar, em mg/L

ÍON	FATOR^(†)
Cálcio	11,59
Magnésio	39,13
Potássio	11,01
Sódio	304,35
Cloretos	551
Sulfatos	78,3

^(†) Fator é calculado através da razão entre a concentração do íon no mar, em mg/L, e a salinidade normal da água do mar, em g/L.

Fonte: Adaptada de BOYD, 2018.

Uma vez identificada o incorreto balanceamento iônico do viveiro, ou seja, proporções entre os íons muito diferentes daquelas esperadas, é necessário proceder à etapa de suplementação dos íons, o que geralmente é feito através da adição de sais minerais à água dos viveiros, por exemplo, pela adição de sulfatos de potássio, cálcio e magnésio, e cloreto de sódio, cloreto de potássio, hidróxido de cálcio (BOYD, 2003), e, mais recentemente, pela suplementação desses minerais na ração (BOYD, 2018). A determinação da concentração desses íons nas águas provenientes dos viveiros de cultivo de camarão é feita a partir da aplicação de técnicas analíticas quantitativas e serão discutidas no próximo subitem.

Como bem cita Kubitza (2019), esse balanço iônico ideal do ambiente pode ser afetado por fatores ambientais, extração dos minerais para a formação da carapaça dos camarões e variabilidade na composição dos corretivos usados; portanto, o monitoramento da qualidade da água dos viveiros deve fazer parte do gerenciamento da atividade, de modo a garantir as boas práticas de manejo e biossegurança.

1.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE CÁTIONS E ÂNIONS EM AMOSTRAS DE ÁGUA PROVENIENTES DE VIVEIROS DE CRIAÇÃO DE CAMARÃO

Para que os produtores de camarão saibam quais concentrações de íons precisarão ser corrigidas é necessária a determinação dos teores dos íons nos viveiros, para em seguida, comparar os resultados obtidos com os valores requeridos (obtidos pela multiplicação da salinidade do viveiro pelo fator de cada íon (Tabela 2)) (VALENÇA; MENDES, 2004; BOYD, 2018).

Entre as técnicas disponíveis para a determinação de íons em matriz aquosa, podem-se citar os métodos volumétricos, gravimétricos, espectrométricos e eletroanalíticos. Em se tratando da determinação simultânea desses íons, os métodos cromatográficos são os mais empregados, entre eles, a cromatografia líquida de alta eficiência, a cromatografia iônica e a eletroforese capilar (COLOMBARA *et al.*, 1997).

Entre os métodos espectrométricos disponíveis, destacam-se aqueles baseados na absorção/emissão da energia radiante por átomos gasosos no estado fundamental/excitado (SKOOG *et al.*, 2006), a saber: espectrometria de emissão atômica em chama, também referida como fotometria de chama (F AES), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP - AES), e espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS) e em forno de grafite (GF AAS). Os limites de detecção para estas técnicas variam desde mg/L (F AAS, F AES e ICP-AES) a µg/L (G FAAS) (SKOOG *et al.*, 2006).

As determinações desses íons nas amostras provenientes dos viveiros têm sido feitas empregando as técnicas de ICP – AES, titulação com solução padrão de um ácido (HCO_3^-), titulação argentimétrica para a determinação de cloreto e método turbidimétrico com cloreto de bário para SO_4^{2-} . Esses métodos geralmente são custosos, demorados e/ou empregam grandes quantidades de reagentes (BOYD; LE, 2013, APHA, 2012). Não há, no entanto, um método validado para a determinação de cátions e ânions em água de carcinicultura.

Levando-se em conta o nível de concentração dos analitos, rapidez, simplicidade e baixo custo operacional, a técnica de F AES foi escolhida para a quantificação de Na^+ e K^+ e F AAS, para a quantificação de Mg^{2+} nas amostras provenientes dos viveiros de criação de camarão.

Para a determinação dos ânions Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- e NO_2^- optou-se pela técnica de eletroforese capilar de zona. A eletroforese capilar se baseia na migração diferencial de compostos iônicos e neutros, quando da aplicação de um campo elétrico a um capilar contendo um eletrólito ou BGE (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Entre os fatores que justificam a posição de destaque da técnica estão a sua versatilidade e simplicidade, alto desempenho do capilar, tempo de análise reduzido e pequeno volume de amostra requerido (COLOMBARA *et al.*, 1997).

Nos dois próximos subitens, trata-se das técnicas escolhidas para a determinação dos cátions e ânions em água de carcinicultura.

1.3.1 Espectrometria de absorção e emissão atômica com chama

As técnicas de F AAS e F AES se baseiam na identificação dos elementos constituintes de uma amostra, geralmente no estado líquido, introduzida em uma chama, na qual ocorrem fenômenos físicos e químicos: o nebulizador converte a solução em uma nuvem de gotículas, chamada aerossol, seguida da evaporação do solvente, devido à alta temperatura da chama, formando um aerossol seco, que é, então, volatilizado e atomizado, produzindo átomos livres, moléculas e íons gasosos no estado fundamental (SKOOG *et al.*, 2006). Quando os átomos gasosos são promovidos do estado fundamental para o estado excitado, tem-se o fenômeno de absorção, e quando estes retornam para o estado fundamental, emitindo a energia absorvida, observa-se o processo de emissão. Em ambos os casos, a energia absorvida ou emitida, em comprimentos de onda característicos para cada elemento, é proporcional à concentração do analito na amostra (WHITTEN; DAVIS; PECK, 1996; WELZ, 1999).

No caso da F AES, a chama é a responsável tanto pela geração dos átomos gasosos no estado fundamental quanto pela excitação destes, de modo que ao retornarem ao nível de mais baixa energia (nível mais estável) emitem a energia absorvida em comprimentos de onda característicos (KRUG; NOBREGA; OLIVEIRA, 2004). A seleção do comprimento de onda desejado, no equipamento, é feita através de filtros, que permitem apenas a detecção de elementos que têm espectros de linhas simples, tais como lítio, sódio, potássio e cálcio (CIENFUEGOS; VAISTMAN, 2000).

Já na F AAS, a chama é a responsável pelo processo de atomização do analito, que, no estado fundamental, absorverá energia de frequência específica, emitida pela fonte de radiação. Esta radiação é gerada, mais comumente, através de uma lâmpada de catodo oco (HCL, do inglês *hollow-cathode lamp*) (KRUG; NOBREGA; OLIVEIRA, 2004). Os sistemas de detecção e amplificação são comuns para ambas as técnicas.

Em ambas as técnicas, a reprodutibilidade e eficiência da etapa de atomização da amostra podem influenciar significativamente nos parâmetros de sensibilidade, exatidão e precisão do método (SKOOG, *et al.*, 2006). A temperatura da chama tem um papel extremamente importante neste processo porque determina a eficiência da fração do analito que é dessolvatada, vaporizada e convertida em átomos livres e/ou íons, bem como determina o número relativo de átomos excitados e não excitados na chama. Na fotometria de chama, utiliza-se uma mistura de gás liquefeito de

petróleo -GLP/ar, cuja temperatura varia entre 1700 e 2400 °C, daí a utilização dessa técnica para a determinação de metais alcalinos, que são facilmente excitáveis (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000). Na técnica espectrométrica de absorção atômica com chama, costuma-se empregar a chama acetileno-oxigênio ou acetileno-óxido nítrico, cujas temperaturas variam entre 2500 e 3100 °C (SKOOG *et al*, 2006).

Embora temperaturas mais altas aumentem a sensibilidade do método, porque aumentam a população total de átomos na chama, para elementos como os metais alcalinos, tal vantagem não compensa a perda de átomos por ionização (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

1.3.1.1 Interferentes

A interferência é qualquer componente ou característica da amostra (ou da solução de amostra) que vai mudar o sinal de concentração do analito. Pode ser corrigida removendo a fonte de interferência ou utilizando padrões que mostrem as mesmas interferências. As interferências mais comuns nos métodos espectrométricos de análise são as interferências espectrais, químicas, físicas e de ionização (HARRIS, 2010).

Interferências espectrais acontecem quando a medida da radiação absorvida é mais alta devido à absorção de uma outra espécie, que apresente, por exemplo, linhas espectrais muito próximas. Também pode ocorrer interferência de radiação de fundo proveniente do solvente, da amostra ou da chama (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

Interferências químicas são causadas por qualquer componente da amostra que afete a eficiência da dissociação dos analitos na chama (HARRIS, 2010). Por exemplo, íons SO_4^{2-} e PO_4^{3-} tendem a inibir a atomização de íons Ca^{2+} , porque podem formar sais não voláteis, estáveis, tais como $CaSO_4$ e $Ca_3(PO_4)_2$. Tais interferências podem ser superadas utilizando uma mistura de Acetileno/ N_2O na chama, ou ainda, pela adição de um elemento que irá formar um composto estável com o interferente, como lantânio, ou ainda, pela adição de um agente protetor, como o EDTA (WELZ; SPERLING, 1999). Segundo Cienfuegos e Vaitsman (2000) não foram observadas interferências dos ânions NO_3^- e Cl^- na determinação de cálcio. No caso dos íons Mg^{2+} , uma chama do tipo Acetileno/Ar é o suficiente para prevenir interferências.

Em interferências devido às características físicas da matriz, as propriedades físicas da solução, tais como viscosidade e tensão superficial, e variações instrumentais, tais como

temperatura da chama e volume de amostra aspirada, tendem a influenciar na resposta do instrumento. Tais efeitos podem ser contornados igualando ao máximo possível a composição dos padrões e amostras (SKOOG *et al.*, 2006) ou, quando possível, utilizando padrões internos, como o lítio, nas análises de Na^+ e K^+ .

Além disso, observa-se na prática que a análise de soluções muito diluídas tende a minimizar essas interferências, pois as propriedades físicas das soluções se aproximam daquelas do solvente, normalmente água ou ácido diluído (LAJUNEN, 1992).

Interferências de ionização acontecem quando ocorre uma diminuição da quantidade de átomos no estado fundamental, devido à ionização dos átomos logo após a atomização, o que prejudica o sinal de absorção, e, portanto, diminui a sensibilidade do método (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

No caso da quantificação de metais alcalinos e alcalinos terrosos, cujas primeiras energias de ionização são baixas, é aconselhável se trabalhar com temperaturas mais baixas, dando preferência à técnica espectrométrica de emissão atômica com chama, cujos combustível e oxidante, gás natural e ar, respectivamente, atingem temperaturas máximas de $1900\text{ }^{\circ}\text{C}$ (SKOOG, *et al.*, 2006). Nos casos em que não for possível usar a técnica espectrométrica de emissão atômica, os efeitos da ionização podem ser reduzidos pela adição, em grande quantidade, às amostras, de um supressor de ionização, isto é, um elemento mais facilmente ionizável que aquele de interesse. Para o potássio, por exemplo, recomenda-se a utilização de cloreto de cézio- CsCl (HARRIS, 2010).

O método de adição de padrão, em que se adiciona quantidades conhecidas do analito à matriz pode ser usado para diminuir ou mesmo eliminar muitos tipos de interferências, e é usado especialmente quando se trabalha com matrizes muito complexas, em que as suas propriedades físicas e/ou químicas não podem ser reproduzidas.

1.3.2 Eletroforese capilar de zona com detecção por UV – CZE-UV

O instrumento de eletroforese capilar consiste, basicamente, de um tubo capilar onde ocorre a separação dos analitos, um par de eletrodos, geralmente de platina, em cada extremidade do capilar, uma fonte de alta tensão, que tem a função de estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar a partir da conexão com os eletrodos, frascos reservatórios, um detector e um computador para a obtenção dos dados (SPUDEIT *et al.*, 2012).

Entre os vários modos de eletroforese capilar disponíveis, a Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE, do Inglês *Free Solution Capillary Electrophoresis*), também chamada Eletroforese Capilar de Zona, é a mais utilizada pelos analistas, provavelmente devido à facilidade de implementação, operação e otimização das condições experimentais (TAVARES, 1996; SPUDEIT *et al.*, 2012). Pode ser aplicada na separação de íons inorgânicos, que é o caso deste trabalho, mas também na separação de compostos orgânicos e biomoléculas (TAVARES, 1994).

No modo em solução livre, após o preenchimento do capilar³ com uma solução tampão (o eletrólito de corrida), injeta-se a amostra, sob certa pressão, de modo a se obter uma zona de amostra com pequena espessura, e aplica-se um determinado potencial, que vai gerar um campo elétrico e induzir a migração dos analitos em direção aos eletrodos de carga oposta, com velocidades diferentes e constantes, propiciando, desse modo, a separação e a quantificação desses compostos (TAVARES, 1996; SPUDEIT *et al.*, 2012).

A velocidade de migração para cada analito é característica da sua mobilidade eletroforética ou iônica e mobilidade eletrosmótica, resultantes da aplicação da voltagem no capilar (TAVARES, 1996).

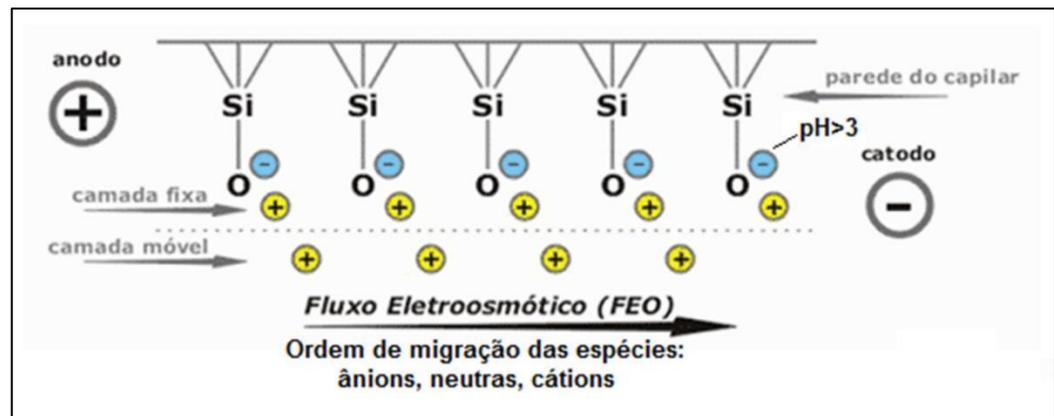
A mobilidade eletroforética (μ_e) é a medida da capacidade de movimentação de um íon em um determinado meio: a força elétrica e a força de atrito agem a favor e contra o movimento, respectivamente; sob condição de diluição infinita e soluto completamente ionizado, tem valor constante e pode ser expressa pela equação $\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$, em que q, r e η , são, respectivamente, a carga, o raio do íon, e a viscosidade da solução (BAKER, 1995).

O fluxo eletrosmótico (EOF) resulta da ionização dos grupos silanóis (Si-OH) - que revestem o capilar de sílica fundida - a íons silanoatos (Si-O⁻), quando postos em contato com o tampão eletrolítico a pH > 3. O resultado disso, como mostrado na Figura 1, é a formação de uma camada carregada negativamente aderida à parede do capilar; essa superfície, então, atrai os íons positivamente carregados oriundos do eletrólito, culminando na formação de uma dupla camada elétrica e de uma diferença de potencial (potencial Zeta) na camada próxima à superfície

³ Os capilares podem ser feitos de sílica fundida, vidro ou teflon e possuem diâmetros internos variando entre 20 e 100 μm e comprimentos entre 10 e 100 cm. O pequeno diâmetro interno do capilar (alta relação área x volume) e a sua alta resistência elétrica possibilitam, respectivamente, uma dissipação mais eficiente do calor gerado por efeito Joule e a aplicação de voltagens maiores, neste caso, aumentando a eficiência e diminuindo o tempo de análise (SHINTANI; POLONSKI, 1997).

(COLOMBARA, 1996). Quando da aplicação do potencial no capilar, os cátions da camada aderida aos grupos silanoatos migram em direção ao eletrodo negativo (catodo), induzindo, então, o fluxo eletrosmótico na solução (FRAZIER *et al.*, 2000).

Figura 1 - Esquema da formação do fluxo eletrosmótico no interior do capilar de sílica fundida



Fonte: Rosa *et al.*, 2018.

O fluxo eletrosmótico pode ser calculado pelas equações $v_{EOF} = \left(\frac{\epsilon_0 \epsilon Z}{4\pi\eta}\right) E$ ou $\mu_{EOF} = \left(\frac{\epsilon_0 \epsilon Z}{4\pi\eta}\right)$, onde: ϵ_0 é a constante dielétrica do vácuo, ϵ é a constante dielétrica do eletrólito de corrida, Z é o potencial Zeta, η é a viscosidade do eletrólito de corrida e E é a intensidade do campo elétrico aplicado, e tende a aumentar com o aumento do pH (melhor ionização dos grupos silanóis) e diminuir à medida que a força iônica aumenta, devido a uma maior compactação da dupla camada e diminuição do potencial Zeta (SHINTANI; POLONSKI, 1997).

Nos casos em que o fluxo eletrosmótico está presente, a velocidade de migração do analito é dada pela soma vetorial das mobilidades eletroforética (μ_{elet}) e eletrosmótica (μ_{eof}), ou seja: $v = (\mu_{elet} + \mu_{eof})E$ (SHINTANI; POLONSKI, 1997).

O controle do fluxo eletrosmótico e da polaridade da fonte de tensão é muito importante para a análise de íons (TAVARES, 1997). Sob fluxo normal, os analitos são injetados no polo positivo (anodo) e as espécies catiônicas e neutras se movem na mesma direção do fluxo eletrosmótico (para o polo negativo -catodo), enquanto os ânions podem se mover em direção ao catodo ou em direção ao anodo, a depender do seu tamanho: ânions maiores são arrastados pelo fluxo eletrosmótico e

atingem o detector; ânions menores são atraídos pelo polo positivo (anodo) e saem do capilar (BAKER, 1995; COLOMBARA, 1996).

Neste último caso, para que esses ânions sejam detectados, tem-se a opção da inversão da polaridade da fonte de tensão e do fluxo eletrosmótico, de modo que os ânions e o fluxo eletrosmótico se movam na mesma direção, para o detector.

A inversão do fluxo eletrosmótico pode ser conseguida, por exemplo, pela adição de surfactantes catiônicos ao eletrólito, sendo o mais comum deles o CTAB (do inglês *cetiltrimethyl ammonium bromide*). Nesse caso, a cauda hidrofílica, positiva, do CTAB, interage com os grupos silanoato do capilar e as caudas hidrofóbicas do tensoativo interagem entre si de modo a formarem uma camada provisória revestindo o capilar. Os ânions do eletrólito, então, vão interagir com essa superfície temporariamente positivamente carregada do capilar. Ao aplicar a diferença de potencial, com polaridade invertida, a direção do fluxo eletrosmótico e dos ânions será em direção ao polo positivo (catodo) (BAKER, 1995; COLOMBARA *et al.*, 1997; TAVARES, 1997).

Em se tratando dos detectores disponíveis, eles podem ser divididos entre específicos e universais. Os específicos têm como característica medir uma propriedade específica do soluto; inclui-se aí os fotodetectores (UV/Vis e fluorescência), os espectrômetros de massa e amperométricos. Já os detectores universais medem a diferença entre alguma propriedade do soluto em relação à solução, por exemplo, a condutividade (TAVAREZ, 1996).

Na eletroforese capilar o detector mais utilizado é o UV-Vis. Neste caso, as espécies de interesse apresentam absorção nessa região. Ao passar pela janela de detecção, essas espécies absorvem parte da radiação e a parte não absorvida é detectada por um fotodiodo ou fotodetector. Aplicando-se a lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon bC$) é possível encontrar a concentração do analito (C). Nesta lei, A corresponde à absorbância, b ao caminho óptico, que será o diâmetro interno do capilar e ϵ , a absorvidade molar (BAKER, 1995; SATO, 2014).

Nos compostos com baixa absorvidade molar é possível usar a detecção indireta, que é a análise a ser empregada neste trabalho. Neste caso, é necessário adicionar um cromóforo (absorvente) ao eletrólito. Quando o analito (não absorvente) passa pelo detector, ocorre um decréscimo do sinal, resultando em um pico negativo (BAKER, 1995; SATO, 2014).

Por fim, a injeção da amostra pode ser feita por método hidrodinâmico ou eletrocínético. Neste, injeta-se a amostra considerando um gradiente de potencial estabelecido ao longo do capilar, por um tempo determinado; naquele, a amostra é injetada no capilar através da utilização de um

gradiente de pressão, também por tempo determinado. Vale lembrar que o modo de injeção influencia na resolução dos picos e na reprodutibilidade do tempo de migração (FRAZIER *et al.*, 2000).

Na injeção hidrodinâmica, modo utilizado neste trabalho, o volume de amostra injetado pode variar entre 1 e 50 nL, a depender das dimensões do capilar, diferença de pressão de trabalho, tempo de injeção, entre outros (FRAZIER *et al.*, 2000; TAVARES, 1996).

2 OBJETIVOS

Nesta seção são apresentados os objetivos gerais e específicos que se pretende alcançar no decorrer do desenvolvimento do trabalho.

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivo geral desenvolver e otimizar métodos analíticos para a quantificação de cátions, utilizando espectrometria de emissão atômica em chama (F AES) e espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS) e de ânions, utilizando eletroforese capilar de zona com detecção por UV (CZE-UV), em amostras de água proveniente de viveiros de criação de camarão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho são os seguintes:

- a) quantificar Mg^{2+} em amostras de água proveniente de viveiros de criação de camarão por F AAS;
- b) quantificar Na^+ e K^+ em amostras de água proveniente de viveiros de criação de camarão por F AES;
- c) quantificar Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- e NO_2^- em amostras de água provenientes de viveiros de criação de camarão por CZE-UV;
- d) desenvolver um kit portátil para a quantificação de potássio por via úmida em amostras de água provenientes de viveiros de criação de camarão.

3 PARTE EXPERIMENTAL

A seguir são descritos os materiais, reagentes e equipamentos, o processo de aquisição e tratamento das amostras e os parâmetros de desempenho analítico empregados para o desenvolvimento do trabalho.

3.1 MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Neste trabalho foram utilizadas micropipetas de volumes variáveis (LabMate Pro®), suporte universal, pinças, barra magnética, agitador magnético (fisatom, mod. 752), soluções tampão padrão pH 4,0 e pH 7,0 ± 0,1 (Digimed), béqueres e balões de volumes variáveis, vidros de relógio, tubos tipo Falcon de 15 e 50 mL e garrafas de polietileno de 100 e 250 mL para acondicionamento de padrões e amostras. Para a determinação dos cátions metálicos, todas as vidrarias e materiais plásticos foram lavados com água da torneira e detergente neutro, descontaminadas em solução de ácido nítrico 10 % v/v, por 24 h, enxaguados 3 vezes com água deionizada e secos à temperatura ambiente.

Para a preparação da solução de água salina sintética foram utilizados os seguintes sais: NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis-EUA), MgCl₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis-EUA), MgSO₄.7H₂O (Isofar, Duque de Caxias – RJ), Na₂SO₄ (Isofar, Duque de Caxias-RJ), CaCl₂.2H₂O (Sigma-Aldrich, St. Louis-EUA), KCl (Isofar, Duque de Caxias – RJ), NaHCO₃ (Isofar, Duque de Caxias-RJ), KBr (Synth, Diadema – SP), H₃BO₃ (Isofar, Duque de Caxias – RJ), e SrCl₂. 4H₂O (Synth, Diadema – SP).

Para os estudos de viabilidade do kit portátil para a quantificação de potássio foi utilizado o sal tetrafenilborato de sódio (TFBNa) da Sigma Aldrich, solução de HNO₃ 37 % (v/v), NaOH 1 mol/L, acetona P.A. e etanol P.A.

Empregou-se solução padrão multi-elementar de Na, K, Mg e Ca 1000 mg/L (Specsol, São Paulo, SP, Brasil) para preparar as soluções usadas para calibração nas análises por fotometria de chama e F AAS. Utilizou-se uma solução padrão de Li 1000 mg/L como padrão interno nas análises por fotometria de chama, preparada a partir do sal LiCl 99 % (Sigma Aldrich, St. Louis - EUA). Utilizou-se, também, HNO₃ 70 % (Synth, Diadema – SP) para acidificar todas as amostras e padrões a uma concentração final de 1 % v/v.

Para as análises por eletroforese capilar, utilizou-se: NaOH microperola PA (Synth, Diadema-SP); Metanol PA (Dinâmica, Diadema-SP); Acetonitrila (Dinâmica, Diadema-SP), Brometo de cetiltrimetilamônio-CTAB (Vetec, Duque de Caxias - RJ), HCl 37 % (Synth, Diadema - SP) e cromato de potássio PA (Proquímios, Rio de Janeiro-RJ). Os padrões para sulfato 3500 mg/L, cloreto 3500 mg/L e bicarbonato 3500 mg/L foram preparados a partir da pesagem das massas dos sais Na_2SO_4 , NaCl e NaHCO_3 , respectivamente, e armazenados na geladeira. Foram utilizados também padrões de nitrato e nitrito 1000 mg/L (Sigma-Aldrich, St. Louis-EUA). Para as análises, misturas das soluções de Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , NO_2^- e HCO_3^- foram preparadas, a partir da adição de volume apropriado de BGE e diluição com água deionizada, até concentração final de 13 mM.

Para a determinação de íons cloreto por titulação condutimétrica, utilizou-se padrão AgNO_3 P. A. (Vetec, Duque de Caxias-RJ).

Foram preparadas soluções de NaOH e HCl 1 mol/L para condicionamentos inicial e final e limpeza do capilar entre as análises. Condicionamento do capilar se dava pela passagem da solução de NaOH 1 mol/L por 20 min., água deionizada por 10 min., solução de HCl 1 mol/L por 20 min., água deionizada por 10 min. e BGE por 20 min. Entre as corridas, o capilar era limpo com solução HCl 1 mol/L (1 min.), água deionizada (1 min.) e BGE (1 min.). A limpeza ao final do dia de análise era feita passando-se pelo capilar NaOH 1 mol/L (5 min.), água deionizada (5 min.), HCl 1 mol/L (5 min.), água deionizada (5 min.) e ar (5 min.).

A lavagem dos eletrodos era feita a cada 24 corridas como segue: banho ultrassônico embebido em isopropanol por 15 minutos para a remoção de toda a sujeira acumulada, seguido de banho ultrassônico em etanol, também por 15 minutos.

Para o eletrólito foram preparadas soluções estoques de cromato de potássio 250 mM (mantida na geladeira) e CTAB 20 mM. Também se utilizou metanol PA 100 % e acetonitrila PA 100 % (v/v). A solução de eletrólito, previamente otimizada, composta por cromato de potássio 60 mM, CTAB 2,5 mM, acetonitrila (0,875 %) e metanol (2,625 %), pH 8-8,5, era preparada diariamente, a partir da diluição de 2,4 mL de K_2CrO_4 (250 mM), 1,25 mL de CTAB (20 mM), 87,5 μL de ACN e 262,5 μL de MeOH, completando-se com água deionizada até o volume de 10 mL.

Os equipamentos e parâmetros usados neste trabalho foram: balança analítica (Mettler Toledo, modelo ME204), deionizador de água (Elga Veolia, PureLab OptionQ), condutivímetro de

bancada (Highmed, modelo HMCDB150), pHmetro de bancada (Mettler Toledo, modelo Mpa-210), banho ultrassônico (Unique Ultra Sonic Cleaner, modelo USC 2800), centrífuga (Hettich technology, modelo universal 320), dessecador a vácuo (SOLAB, modelo SL-175/60), eletroforese capilar (modelo Agilent 7100, Agilent Technologies, Palo Alto, USA), comprimento de onda determinado para as análises em 254 nm, largura do pico 0,1 min., tempo de resposta 2 s, temperatura do cartucho mantida em 25 °C, voltagem mantida em -5 kV, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) e controle, aquisição e tratamento dos dados em software (ChemStation A.06.01). Os capilares utilizados eram de sílica fundida, revestidos com poliimida (série TSP), de 48,5 cm (40 cm de comprimento efetivo) x 75 µm de diâmetro interno x 375 µm diâmetro externo (Polymicro Technologies, Phoenix, USA), espectrômetro de emissão atômica (fotômetro de chama-*Digimed*, modelo DM-61), em que se utilizou gás liquefeito de petróleo (GLP) como gás combustível e ar comprimido como gás oxidante, espectrômetro de absorção atômica com chama (modelo *Solaar série M5, ThermoScientific*), equipado com lâmpadas de cátodo oco de Mg como fonte de radiação, gás acetileno como comburente e ar sintético como gás oxidante.

3.2 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS

A aquisição e o tratamento das amostras utilizadas no desenvolvimento deste trabalho são discutidos nos próximos subitens.

3.2.1 Amostra de água salina sintética

Foi preparada em laboratório uma amostra de água do mar sintética (AMS1), cuja composição consta na Tabela 3. Todos os sais utilizados na preparação da solução foram secos em estufa, à temperatura aproximada de 70 °C, por 2 horas, deixados resfriar por 2(dois) minutos à temperatura ambiente, e então, pesados até que apresentassem variação de massa desprezível. A partir daí, foram dissolvidos em água deionizada ultrapura, misturados e transferidos para balão volumétrico, e, então, avolumado para 1 L de solução. Para os sais cujas concentrações requeridas eram muito baixas, foram preparadas soluções intermediárias, como é o caso de H_3BO_3 e $SrCl_2$.

Tabela 3 - Composição da água do mar sintética (AMS1), avolumada para 1 L de solução

Ordem de adição do Reagente	Reagente	Quantidade
1	<i>NaCl</i>	24,30 g
2	<i>MgCl₂</i>	5,20 g
3	<i>Na₂SO₄</i>	4,09 g
4	<i>CaCl₂</i>	1,16 g
5	<i>KCl</i>	0,69 g
6	<i>NaHCO₃</i>	0,21 g
7	<i>KBr</i>	0,11 g
8	<i>H₃BO₃</i>	0,027 g
9	<i>SrCl₂</i>	0,0025 g

Fonte: adaptada de Lyman e Fleming, 1940.

3.2.2 Amostras provenientes dos viveiros de criação de camarão

As amostras foram coletadas manualmente, em garrafas plásticas com capacidade de 100 mL cada, em 6 (seis) viveiros diferentes de criação de camarão, todos localizados no Estado de São Paulo, a partir de uma parceria com a empresa Veromar. As coletas foram feitas em dois momentos: 3 amostras em fevereiro de 2020 e 3 amostras em janeiro de 2022.

Após a coleta, as amostras foram filtradas em papel de filtro quantitativo e envasadas para transporte em garrafas de polietileno. No laboratório, as amostras foram identificadas como AMR1, AMR2, AMR3, AMR4, AMR5 e AMR6 e novamente filtradas em papel de filtro quantitativo (8 μ m). O pH de cada uma foi medido, empregando pHmetro de bancada calibrado com solução padrão de pH 4,0 e pH 7,0, conforme manual do instrumento.

As amostras identificadas como AMR1, AMR2 e AMR3 são provenientes de viveiros contendo camarões na fase de engorda, enquanto as amostras AMR4, AMR5 e AMR6 são provenientes de um aquário, de um tanque que havia sido recentemente clorado e de um viveiro

que havia sido recentemente salinizado, respectivamente, como informado pela empresa colaboradora.

A salinização do viveiro do qual foi coletada a amostra AMR6 foi feita com sal constituído majoritariamente de íons cloreto, possibilitando esperar uma alta concentração desse ânion e uma baixa concentração ou ausência dos outros analitos, quando na realização das análises.

Para a determinação dos metais dissolvidos, as amostras foram acidificadas com ácido nítrico concentrado a $\text{pH} < 2$ e mantidas sob refrigeração à temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, em garrafas de polietileno previamente desinfetadas, de acordo com procedimento constante no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). As análises para os cátions Na^+ , K^+ e Mg^{2+} foram realizadas no período de 2 semanas a partir da chegada das amostras.

Para os ânions Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- e NO_2^- , as análises foram realizadas no período entre 1 e 24 meses, visto que os métodos só puderam ser desenvolvidos posteriormente. As amostras AMR1, AMR4, AMR5 e AMR6 foram armazenadas *in natura* sob refrigeração a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, enquanto as amostras AMR2 e AMR3 foram acidificadas com ácido nítrico concentrado a $\text{pH} < 2$ e mantidas sob refrigeração a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os testes de validação dos métodos foram feitos considerando uma amostra mistura. Para a análise dos cátions, a amostra mistura foi composta de 5 mL das amostras AMR1, AMR2 e AMR3; para a análise dos ânions, 5 mL das amostras AMR2, AMR3, AMR4 e AMR5. A diferença na composição das amostras mistura se deu em função da disponibilidade das amostras em laboratório, porque, como mencionado, foram enviadas em períodos diferentes.

Para os testes de exatidão, foi utilizada, além das amostras misturas, amostras individuais: AMR1 e AMR5, para a validação dos métodos para a determinação dos cátions e AMR1 e AMR6, para a validação dos métodos para a determinação dos ânions.

3.3 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO ANALÍTICO DOS MÉTODOS PROPOSTOS

Alguns parâmetros analíticos de desempenho foram avaliados por meio de ensaios com os padrões e amostras, com o objetivo de atestar a confiabilidade e adequabilidade do método à finalidade proposta. Os parâmetros escolhidos, de acordo com as recomendações da IUPAC (2014) e outros protocolos (THOMPSON; ELLISON STEPHEN; WOOD, 2002; RIBANI *et al*, 2004; EURACHEM, 2014; INMETRO, 2018; ANVISA RDC 166, 2017), foram seletividade, faixa de

trabalho e linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), recuperação, precisão e concentração característica/sensibilidade (C_0).

A precisão dos métodos foi avaliada através do cálculo do desvio-padrão relativo (RSD), dado pela equação $RSD (\%) = \frac{s}{x_{med}} \times 100$, em que s é o desvio-padrão dos dados e x_{med} é a média dos dados.

Para as análises por F AES e F AAS, os parâmetros LOD e LOQ foram estimados de acordo com as equações: $LOD = \frac{3 \times sB}{S}$ e $LOQ = \frac{10 \times sB}{S}$, em que sB é o desvio-padrão do coeficiente linear e S é coeficiente angular da curva analítica. Os valores de LOD e LOQ dos métodos foram obtidos a partir da multiplicação dos respectivos parâmetros instrumentais pelo fator de diluição das amostras, isto é, (volume da solução) / (volume da amostra adicionada).

A linearidade da faixa de trabalho e o ajuste dos dados foram avaliados por meio da análise de variância da regressão (ANOVA), empregando o teste F; os pressupostos de homoscedasticidade e normalidade dos resíduos foram avaliados empregando-se, respectivamente, os testes de Cochran e Shapiro-Wilk, a um nível de confiança de 95 %. As análises das soluções padrões e amostras foram realizadas de maneira aleatória para garantir o parâmetro de independência.

No caso do teste F, a adequação do modelo linear é investigada através da equação $F = \frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}}$, em que MQ_{reg} e MQ_{res} são, respectivamente, a média quadrática da regressão e do resíduo, considerando seus graus de liberdade (gl). Compara-se, então, o F calculado ao F tabelado, a 95 % de confiança ($\alpha = 0,05$) e de acordo com os respectivos graus de liberdade, e caso $F_{calc} > F_{tab}$, considera-se o modelo linear estatisticamente válido.

A concentração característica (C_0) é utilizada para avaliar a sensibilidade das determinações por F AAS. De acordo com Welz e Sperling (1999), corresponde à concentração do analito que fornece uma absorbância de 0,0044 u.a., ou seja, 1 % da radiação que chega à amostra. É calculada pela equação $C_0 = \frac{C \times 0,0044}{A}$, em que C é a concentração da solução padrão a ser analisada e A é a sua absorbância correspondente.

No caso das análises por eletroforese capilar de zona, os valores de LOD e LOQ foram estimados considerando as equações: $LOD = \frac{3 \times S_{ruído} \times C_a}{H_{max} - H_{min}}$ e $LOQ = \frac{10 \times S_{ruído} \times C_a}{H_{max} - H_{min}}$, em que $S_{ruído}$

é o desvio-padrão da linha base (ruído), C_a é a concentração do analito e H_{max} e H_{min} , são, respectivamente, a altura máxima e mínima do pico do sinal do analito.

A exatidão de cada método foi avaliada pelos estudos de adição e recuperação. Os níveis foram selecionados com base nas faixas de trabalho empregadas para a calibração. Para o Na: nível 1 (20 mg/L) e nível 4 (35 mg/L); para o K: nível 1 (15 mg/L) e nível 3 (25 mg/L); para o Mg: nível 1 (0,4 mg/L) e nível 3 (0,8 mg/L). Para os ânions, as recuperações foram obtidas em dois níveis: 250 e 750 mg/L, para Cl^- , SO_4^{2-} e HCO_3^- e 100 e 250 mg/L, para NO_3^- e NO_2^- .

Para as análises dos cátions, a recuperação foi determinada de acordo com a equação $R (\%) = \left(\frac{C_{A+P} - C_A}{C_P} \right) \times 100$, em que R (%) é a porcentagem de recuperação do analito; C_{A+P} é a concentração do analito na amostra fortificada; C_A é a concentração do analito na amostra não fortificada e C_P é a concentração devido à quantidade de padrão adicionado. Para as análises dos ânions, empregou-se a equação $R (\%) = \left(\frac{A_{A+P} - A_A}{A_P} \right) \times 100$, em que A_{A+P} é a área do sinal correspondente à adição do padrão à amostra; A_A é a área do sinal correspondente à amostra e A_P é a área correspondente ao padrão (FARIA *et al*, 2008).

A quantificação dos cátions foi feita a partir de curvas de calibração com 5 (cinco) pontos, preparadas a partir de padrão multielementar e validadas estatisticamente. A quantificação dos ânions foi realizada utilizando o método de adição de padrão de ponto único, em triplicata. Para isso, as amostras foram fortificadas com soluções dos analitos de concentração conhecida, de modo que a absorbância da amostra diluída e da amostra fortificada com solução do analito sob análise foram registradas. O cálculo da concentração de cada analito foi realizado conforme a equação $C_x = \frac{A_1 C_s V_s}{(A_2 - A_1) V_x}$, em que A_1 e A_2 são, respectivamente, as absorbâncias das amostras diluídas e das amostras fortificadas, C_s é a concentração da solução de concentração conhecida, V_s é o volume adicionado da solução de concentração conhecida e V_x é o volume da amostra. O detalhamento do procedimento utilizado para a validação do método para a determinação dos ânions por eletroforese capilar é mostra no Apêndice B, à página 74.

O teste t não pareado com variância agrupada foi utilizado para a comparação dos resultados obtidos por dois métodos/procedimentos diferentes e a distribuição t, para estimar o intervalo de confiança para a média populacional.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção, são apresentados os resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho e as discussões pertinentes.

4.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A AMOSTRA SALINA SINTÉTICA

Em virtude da indisponibilidade de material de referência, uma amostra sintética de água salina foi empregada na avaliação da eficácia dos métodos propostos. No entanto, há de se ressaltar que a amostra sintética não mimetiza toda a composição de amostras de água provenientes dos viveiros de criação de camarão, as quais podem conter muitas outras substâncias, por exemplo, aquelas provenientes do metabolismo dos espécimes e reações químicas “in situ”.

As concentrações dos analitos na amostra salina sintética preparada (AMS1) foi determinada empregando os métodos validados e considerando um fator de correção da pureza dos reagentes empregados, obtendo-se concentrações de Na^+ , K^+ e Mg^{2+} de 10008 ± 222 mg/L, 393 ± 37 mg/L e 601 ± 6 mg/L⁴, respectivamente. A amostra apresentou pH de $8,0 \pm 0,3$ e salinidade de 33 g/L.

O fator de correção ($F_{\text{correção}}$) da pureza dos sais empregados na preparação da amostra salina sintética foi obtido pela equação $F_{\text{correção}} = \frac{\text{Conc. sal}_{\text{obtida}}}{\text{Conc. sal}_{\text{padrão}}}$, a partir da preparação de padrões de cada sal, em triplicata, e análise por fotometria de chama e por F AAS, considerando curva de calibração obtida a partir de padrão multielementar.

4.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS AMOSTRAS PROVENIENTES DOS VIVEIROS DE CRIAÇÃO DE CAMARÃO

As determinações do pH foram feitas considerando as amostras à temperatura ambiente. Os resultados obtidos constam na Tabela 4.

⁴ Medidas determinadas = média \pm intervalo de confiança = $\frac{t \times S}{\sqrt{n}}$, em que s é o desvio-padrão e N é o número de replicatas e t é o parâmetro de Student ($\alpha = 0,05; n = 4$); $t_{\text{tabelado}} = 3,182$.

Tabela 4 - Parâmetros de pH medidos nas amostras por meio de instrumentação apropriada, após filtração

Amostra	pH medido
AMR1	7,7 ± 0,1
AMR2	7,9 ± 0,1
AMR3	6,8 ± 0,1
AMR4	7,6± 0,1
AMR5	9,1± 0,1
AMR6	7,8 ± 0,4

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

De acordo com Rocha e Maia (2003) e Pádua (2001b), valores de pH relativamente básicos, entre 7 e 9, são considerados ideais para o sucesso da carcinicultura; valores fora dessa faixa tendem a influenciar negativamente no metabolismo e nos processos fisiológicos dos indivíduos, podendo ser fatal. Para Bernhardt (2003), a diminuição do pH nos viveiros pode estar relacionada ao aumento de algas, aumento da concentração de amônia e aumento da quantidade de matéria orgânica disponível, o que causa o aumento da produção de ácidos como subproduto da decomposição desse material.

4.3 DETERMINAÇÃO DE Na⁺ E K⁺ POR FOTOMETRIA DE CHAMA E Mg²⁺ POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA

A proposta original deste trabalho incluía o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação do macronutriente cálcio nas amostras provenientes de viveiros de criação de camarão. Contudo, devido a problemas com o equipamento do departamento de química da Universidade Federal de Juiz de Fora, relacionados ao uso da chama de óxido nitroso, essa parte do projeto não pôde ser concluída.

O problema da não dissociação de compostos refratários de cálcio com íons fosfatos e sulfatos em chamas menos quentes (ar-acetileno e ar-GLP) costuma ser superado pela utilização de agentes liberalizantes (como o lantânio) e de proteção (como o EDTA) às soluções (SKOOG *et al.*, 2006). Desse modo, foram feitas análises de padrões de cálcio, por espectrometria de absorção atômica e fotometria de chama, na presença de lantânio (0,1 % v/v) e EDTA (0,1 M). Nesses casos,

não se observou boa correspondência entre a concentração de cálcio nos padrões e o sinal analítico, portanto, inviabilizando a determinação do analito nas condições instrumentais possíveis, na ocasião.

Para a determinação de Mg^{2+} por F AAS foram otimizados, no modo univariado, os parâmetros altura do queimador, largura da fenda e vazão do gás acetileno, de modo a se obter uma máxima resposta analítica. Para tal, preparou-se uma solução padrão de concentração igual a 0,5 mg/L para o Mg^{2+} em meio ácido (HNO_3 , 1 % v/v).

Nas determinações de Na^+ e K^+ por fotometria de chama, empregou-se os parâmetros instrumentais constantes no manual do equipamento: gás liquefeito de petróleo (GLP) como gás combustível e ar comprimido como gás oxidante, vazão de 5 mL/min, taxa de aspiração da solução de $(5,8 \pm 0,1)$ mL/min e tempo de resposta aproximado de 6 s. Avaliou-se a necessidade da utilização do lítio como padrão interno, adicionando-se um volume de concentração conhecida nas soluções de amostras, brancos e padrões.

Os valores otimizados, para os quais se observou a menor relação sinal/ruído e os menores desvios-padrão, assim como outros parâmetros, tais como comprimento de onda e corrente da lâmpada de magnésio são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros Instrumentais empregados para a determinação de Na^+ e K^+ , por F AES e Mg^{2+} , por F AAS, em amostras de água provenientes de viveiros de criação de camarão

Parâmetro	Analito		
	Na^+	K^+	Mg^{2+}
Comprimento de onda (nm)	590	766	285,2
Altura do queimador (mm)	-	-	12,6
Corrente da Lâmpada (mA)	-	-	4
Fenda espectral (mm)	-	-	0,2
Vazão do gás combustível (mL/min)	5,0	5,0	1,0
Mistura gasosa	ar/GLP	ar/GLP	ar/ C_2H_2

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Para todos os analitos quantificados, as faixas de trabalho foram selecionadas baseando-se nos manuais dos equipamentos, nas concentrações dos analitos nas amostras e em trabalhos anteriormente desenvolvidos no laboratório.

4.3.1 Avaliação de desempenho analítico dos métodos propostos

Para avaliar a adequabilidade dos métodos propostos para a determinação de Na^+ e K^+ em amostras de carcinicultura por fotometria de chama, inicialmente, foi investigada a necessidade da utilização de lítio como padrão interno, através da comparação estatística das concentrações desses analitos, obtidas a partir das curvas de calibração externa sem e com padrão interno. Como nesse momento não se dispunha das amostras, foi utilizada, nas análises, a amostra de água salina sintética. Os resultados obtidos constam na Tabela 6. As amostras foram analisadas em triplicata, em meio de HNO_3 1 % v/v.

Tabela 6 - Concentrações obtidas para Na^+ e K^+ a partir da análise da amostra de água salina sintética, obtidas por calibração externa, com e sem lítio como padrão interno

Analito	Concentração determinada (mgL^{-1}) ¹		$t_{\text{calculado}}$
	Sem padrão interno	Com padrão interno	
Na^+	$(10377 \pm 265) \text{ mg L}^{-1}$	$(10008 \pm 221) \text{ mg L}^{-1}$	1,5
K^+	$(441 \pm 24) \text{ mg L}^{-1}$	$(393 \pm 37) \text{ mg L}^{-1}$	

¹Concentração determinada = média \pm intervalo de confiança = $\frac{t \cdot x \cdot S}{\sqrt{n}}$, em que s é o desvio-padrão e n é o número de replicatas e t é o parâmetro de Student ($\alpha = 0,05; n = 3$); ; $t_{\text{tabelado}} = 4,3$;
Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Embora a aplicação do teste estatístico t de *student* indicar, a 95 % de confiança, não haver diferença estatisticamente relevante entre as concentrações obtidas para os analitos com e sem o uso do padrão interno, optou-se pelo seu uso, por considerar que as amostras a serem analisadas devam apresentar composição e características físicas variadas. O uso do padrão interno pode evitar ou minimizar os erros devido a flutuações do sinal analítico, causado, por exemplo, por mudanças na temperatura da chama e viscosidade da amostra (SKOOG *et al.*, 2006).

Na calibração externa com padrão interno, a utilização da razão do sinal analítico pela razão do padrão interno tende a melhorar a precisão e a exatidão do método. No caso da F AAS, não é possível o uso de padrão interno porque o instrumento não permite a determinação simultânea de analitos (FERNANDES, *et al.*, 2003).

A Tabela 7 apresenta os parâmetros de mérito investigados para a avaliação do desempenho dos métodos propostos, tanto para análise por fotometria de chama, quanto por F AAS, considerando uma amostra mistura. As curvas de calibração foram construídas em triplicatas, em meio de HNO₃ 1 % v/v. Como branco da curva foi usado uma solução contendo água deionizada, HNO₃ 1 % v/v e padrão interno (no caso das determinações de Na⁺ e K⁺). Todas as hipóteses estatísticas foram testadas ao nível de confiança de 95 %.

Tabela 7 - Parâmetros analíticos das curvas de calibração com padrão interno e calibração externa para determinação de Na⁺, K⁺ e Mg²⁺ em amostras de água provenientes de viveiros de criação de camarão

		Na ⁺ *	K ⁺ *	Mg ²⁺
Faixa linear (mg L⁻¹)		20 - 40	15 - 35	0,4 - 1,2
Equação da reta		Y = 0,9892 X + 0,0069	Y = 0,9798 X - 0,0081	Y = 0,4762 X + 0,0491
R²		0,9991	0,9996	0,998
Shapiro-Wilk	W _{calc.} /W _{tab.}	0,946/0,842	0,944/0,842	0,976/0,842
Cochran	C _{calc.} /C _{tab.}	0,414/0,684	0,501/0,684	0,405/0,684
ANOVA	Falta de ajuste			
	F _{calc.} /F _{tab.}	0,055/3,708	0,488/3,708	0,595/3,708
	Linearidade			
	F _{calc.} /F _{tab.}	5749/4,667	4644/4,667	982,4/4,667

*Adição de Li como padrão interno na concentração de 30 mg/L (Na⁺) e 25 mg/L (K⁺);

Determinação por F AAS: Mg²⁺; Determinação por F AES: Na⁺ e K⁺;

Y=sinal analítico; X= concentração do analito em mg/L;

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Os pressupostos de normalidade da distribuição e homoscedasticidade dos dados foram avaliados pela aplicação dos testes de Shapiro-Wilk e Cochran, respectivamente.

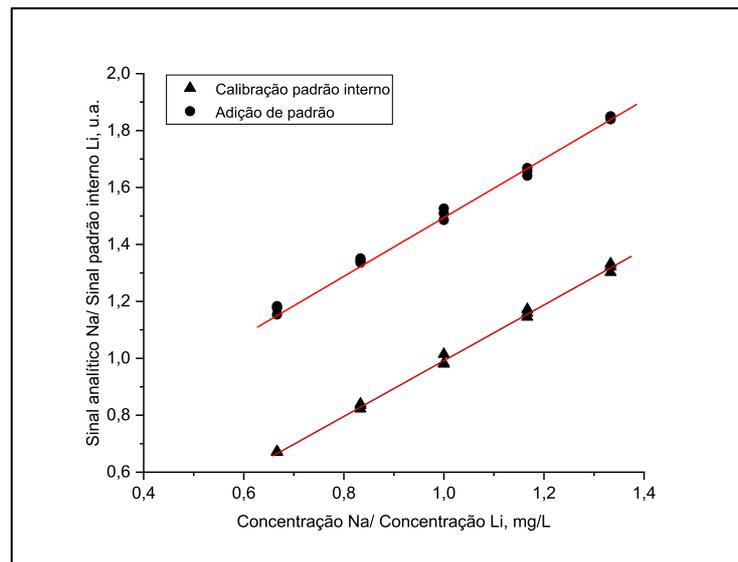
No teste de Shapiro-Wilk considera-se os resíduos da curva, isto é, a diferença de concentração, ponto a ponto, entre os valores previstos pelo modelo matemático e as concentrações reais preparadas em laboratório. Como para os íons de Na, K e Mg, $W_{calc.} > W_{tab}$ pode-se dizer que não há evidência de não-normalidade na distribuição dos dados, que são, pelo menos aproximadamente, similares à distribuição normal.

No teste de Cochran avalia-se se a variância dos dados é constante nos pontos testados. Como $C_{calc.} < C_{tab}$, pode-se dizer que os dados têm uma distribuição heterogênea, ou seja, são homoscedásticos.

Através da análise de variância (ANOVA), testou-se a linearidade do modelo e a sua não falta de ajuste. O teste de linearidade garante que os sinais analíticos obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Já o teste da falta de ajuste garante que essa relação se mantém entre os pontos não testados da curva. Os resultados mostrados na Tabela 8 indicam que há linearidade, já que os valores de $F_{calc.}$ são até 10x maiores que os $F_{tab.}$, e que não há falta de ajuste entre os pontos experimentais, considerando que $F_{calc.} < W_{tab}$ (PIMENTEL; NETO, 1996).

A influência do efeito de matriz nos resultados foi verificada através da comparação dos coeficientes angulares das curvas obtidas por calibração externa (Mg^{2+}) e calibração com padrão interno (para Na^+ e K^+) com as curvas de adição de padrão (THOMPSON; ELLISON STEPHEN; WOOD, 2002). A avaliação do efeito de matriz é um estudo de seletividade, em que se averigua possíveis interferências causadas por substâncias presentes na amostra, resultando no aumento ou diminuição do sinal analítico (ANVISA, 2017). As duas curvas foram analisadas no mesmo dia e em triplicatas autênticas. A partir dos dados e Figuras 2 a 4 é possível inferir que não se observou efeito de matriz significativo nas análises.

Figura 2 - Comparação das curvas de calibração com padrão interno e curvas de adição de padrão para o Na^+ (n=3, triplicatas autênticas)

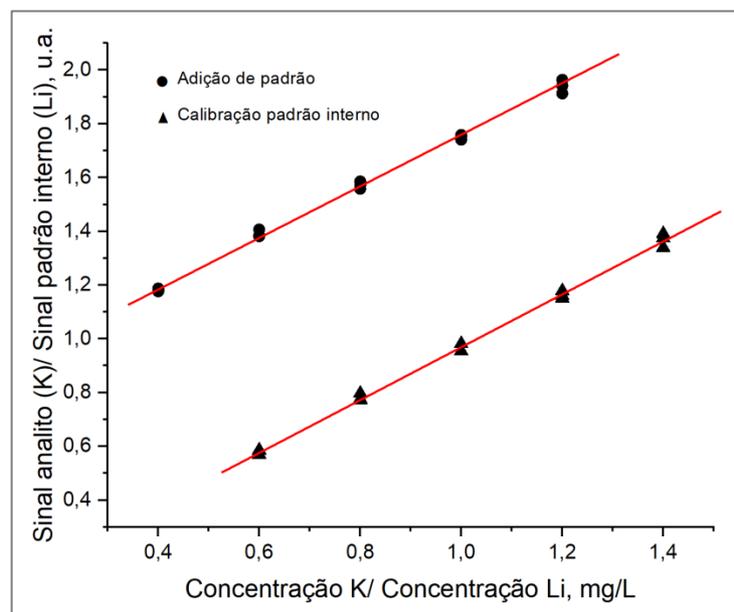


Equação reta calibração padrão interno: $y = 0,9892x + 0,0069$;

Equação reta adição de padrão: $y = 0,9831x + 0,5257$;

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Figura 3 - Comparação das curvas de calibração com padrão interno e adição de padrão para o K^+ (n=3, triplicatas autênticas)

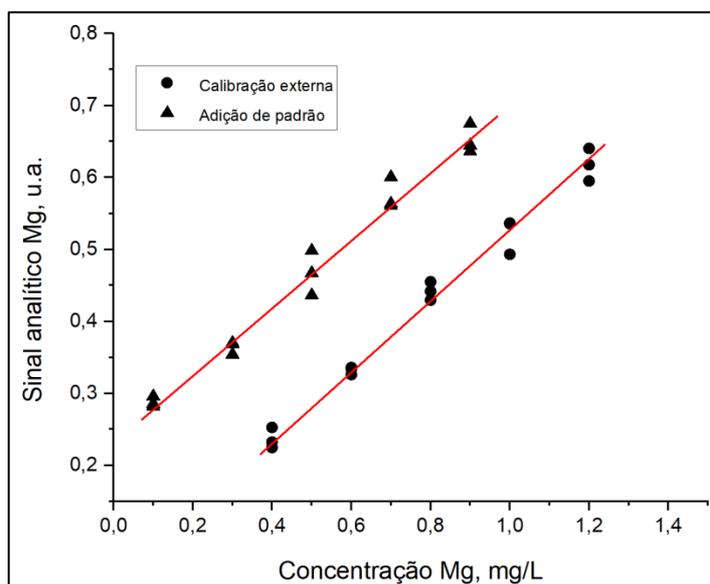


Equação reta calibração padrão interno: $y = 0,9904x + 0,0159$;

Equação reta adição de padrão: $y = 0,9846x + 0,7768$;

Fonte: elaborada pelo autor (2021).

Figura 4 - Comparação das curvas de calibração externa e curvas de adição de padrão para o Mg^{2+} (n=3, triplicatas autênticas)



Equação reta calibração externa: $y = 0,4762x + 0,0491$;

Equação reta adição de padrão: $y = 0,4696x + 0,2345$;

Fonte: elaborada pelo autor (2021).

A precisão dos métodos também foi avaliada. O RSD foi calculado a partir de 10 leituras autênticas de uma amostra mistura. Os valores para o RSD ficaram abaixo de 0,5 % tanto para o Na^+ como para o K^+ e abaixo de 4 % para o Mg^{2+} , indicando baixa dispersão dos dados (THOMPSON; ELLISON STEPHEN; WOOD, 2002).

A exatidão dos métodos foi avaliada por meio de ensaios de adição e recuperação para a amostra mistura e para as amostras individuais AMR1 e AMR5. Ensaios de adição e recuperação refletem a quantidade do analito recuperado em relação à quantidade presente na amostra (WOOD, 1999; BRITO *et al*, 2003).

Os ensaios foram realizados em dois níveis de concentração, escolhidos a partir da curva de calibração com adição de padrão. Cada nível foi preparado em triplicata. Para Na^+ e K^+ , as concentrações corresponderam ao primeiro e ao quarto pontos das curvas; para o Mg^{2+} , ao primeiro e ao terceiro pontos, como exposto no subitem 5.3. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentrações determinadas de Na⁺, K⁺ e Mg²⁺ na amostra mistura¹ e nas amostras individuais AMR1 e AMR5 e valores de recuperação obtidos para cada analito, a partir das curvas de calibração

Amostra	Analito	Concentração determinada ² (mg/L)	Recuperação (%) ³	
			Nível 1	Nível 2
AMOSTRA MISTURA	Na ⁺	6853 ± 71	106 ± 4	106 ± 3
	K ⁺	375 ± 19	92 ± 2	94 ± 4
	Mg ²⁺	288 ± 6	93 ± 5	98 ± 3
AMR1	Na ⁺	6305 ± 275	106 ± 3	101 ± 5
	K ⁺	537 ± 27	106 ± 2	96 ± 1
	Mg ²⁺	535 ± 10	93 ± 1	93 ± 3
AMR5	Na ⁺	1631 ± 120	97 ± 5	95 ± 3
	K ⁺	293 ± 17	97 ± 1	92 ± 1
	Mg ²⁺	378 ± 8	96 ± 3	95 ± 1

¹ Amostra mistura composta por AMR1, AMR2 e AMR3;

² Expresso como Média ± Intervalo de Confiança = $\frac{t \times S}{\sqrt{n}}$, S é o desvio-padrão, n é o número de replicatas e t é o parâmetro de Student ($\alpha = 0.05$; $n=3$);

³ Recuperação = $[(C_{A+P} - C_A) / C_P] \times 100$;

Nível 1: Na⁺: 20 mg/L, K⁺: 15 mg/L, Mg²⁺: 0,4 mg/L;

Nível 2: Na⁺: 35 mg/L; K⁺: 30 mg/L; Mg²⁺: 0,8 mg/L;

Fonte: elaborada pelo autor (2021).

Em se tratando de porcentagens de recuperado de analito, é sabido que as faixas podem variar dependendo das características da amostra, do procedimento de extração e da concentração do analito (HUBER, 2007). No presente estudo, considerando a concentração dos macronutrientes da ordem de mg/L, considerou-se como aceitável a faixa de recuperação entre 90 e 107 %, de acordo com os critérios estabelecidos pelo manual da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2012). Para o Na⁺, os valores de recuperação média ficaram próximos de 106 %; para o K⁺, de 93 % e para o Mg²⁺, de 95 %, indicando que os métodos possuem exatidão adequada.

Também foram estimados os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) instrumentais e do método. O LOD corresponde à menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser

detectado, enquanto o LOQ é a menor quantidade do analito que pode ser determinada, considerando precisão e exatidão requeridas pela análise (IUPAC, 2014). Os resultados obtidos estão discriminados na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores calculados para os limites de detecção e quantificação para a determinação de Na, K e Mg em água de carcinicultura

Analito	LOD e LOQ instrumentais (mg/L)	LOD e LOQ do método (mg/L)	Co (mg/L)
Na⁺	1,34 e 4,06	268,6 e 814,0	Não se aplica
K⁺	1,26 e 3,81	11,23 e 34,03	Não se aplica
Mg²⁺	0,10 e 0,27	27,9 e 84,6	0,0082

Determinação por F AES: Na⁺ e K⁺; Determinação por F AAS: Mg²⁺;
Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Os limites de detecção e quantificação determinados foram menores do que os primeiros pontos das curvas, mostrando a adequabilidade dos métodos desenvolvidos para a quantificação dos analitos. Para o Mg²⁺, a concentração característica calculada, abaixo do valor informado pelo fabricante (0,01 mg/L), confirma a boa sensibilidade do método.

4.3.2 Aplicação dos métodos

Os métodos estabelecidos foram aplicados às 6(seis) amostras de água provenientes dos viveiros de criação de camarão e identificadas como AMR1, AMR2, AMR3, AMR4, AMR5 e AMR6 e à amostra de água salina sintética AMS1. Os teores encontrados para os analitos Na⁺, K⁺ e Mg²⁺, bem como as diluições necessárias para as análises, considerando as curvas de calibração validadas, são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Concentrações (em mg/L) de Na⁺, K⁺ e Mg²⁺ nas amostras sintética e de criação, com detecção por F AES e F AAS

	Código da amostra	Concentração do analito (mg/L) ¹					
		Na ⁺	Diluição	K ⁺	Diluição	Mg ²⁺	Diluição
Resultados lab. Baccan	AMR1	5284 ± 15	200	226 ± 29	10	435 ± 29	600
	AMR2	4986 ± 11	250	176 ± 11	08	479 ± 42	700
	AMR3	3990 ± 06	250	201 ± 04	08	288 ± 31	400
	AMR4	4301 ± 84	132	246 ± 11	07	398 ± 18	454
	AMR5	2159 ± 37	56	134 ± 07	08	330 ± 22	384
	AMR6	2261 ± 49	89	82 ± 02	04	145 ± 09	200
	AMS1	10616 ± 107	330	379 ± 03	15	602 ± 16	580
Resultados lab. Independente²	AMR2	4747 ± 340	500	167 ± 10	10	587 ± 24	500
	AMR3	3880 ± 310	500	180 ± 11	500	356 ± 14	500

¹Expresso como Média ± Intervalo de Confiança = $\frac{t \times S}{\sqrt{n}}$, S é o desvio-padrão, n é o número de replicatas e t é o parâmetro de Student ($\alpha = 0,05$; n=3);

²Teores obtidos a partir das análises das amostras de água de carcinicultura por laboratório independente, contratado pelo colaborador, utilizando a técnica de ICP-AES;

Fonte: elaborada pelo autor (2021).

Os resultados obtidos na quantificação dos analitos indicam que os métodos desenvolvidos são robustos, capazes de quantificar com precisão e exatidão adequadas concentrações muito variadas dos cátions. Em termos percentuais, os teores determinados de Na⁺, K⁺ e Mg²⁺, entre amostras, variaram até 244, 300 e 330 %, respectivamente, conforme esperado, considerando que são provenientes de diferentes viveiros.

Comparando os resultados para os teores dos cátions Na⁺, K⁺ e Mg²⁺ obtidos por empresa independente, para as amostras AMR2 e AMR3, também mostrados na Tabela 10, com aqueles obtidos pela aplicação dos métodos analíticos desenvolvidos, observam-se resultados próximos.

Para a amostra AMS1, a comparação dos resultados obtidos (Tabela 10) e esperados (subitem 7.1) indicou erros relativos entre 1 e 5 %, indicando exatidão satisfatória para os métodos.

A partir do conhecimento do teor de cada íon dissolvido na água proveniente do viveiro de criação de camarão e de sua salinidade (geralmente medida com o auxílio de um salinômetro), o produtor poderá fazer a adequação, se necessário, das proporções desses íons, de modo que esteja o mais próximo possível daquela encontrada na água do mar. Tomando como exemplo a amostra AMR6, monta-se o cenário mostrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Determinação da proporção teórica dos cátions no viveiro para a amostra AMR6, e comparação com aquelas encontradas através da aplicação de método analítico

Proporção determinada dos cátions:	Na ⁺ :K ⁺ = 28:1 mg/L Mg ²⁺ :K ⁺ = 2:1 mg/L
Proporção ideal dos cátions ¹ :	(Na ⁺ :K ⁺) = 28:1 (Mg ²⁺ :K ⁺) = 3:1

¹Proporção dos principais cátions na água do mar de acordo com SUGUNA, 2020;
Fonte: elaborada pelo autor (2021).

Nessas condições, há a necessidade de suplementação do viveiro com o cátion Mg²⁺, de modo a adequar a proporção Mg²⁺:K⁺ considerada ideal.

Como cita Suguna (2020), e como mencionado ao longo deste trabalho, a criação de camarão em águas de baixa salinidade requer vigilância constante acerca do equilíbrio iônico nos viveiros porque a deficiência de alguns minerais pode comprometer o seu crescimento e desenvolvimento, e até, em casos mais graves, causar a morte dos espécimes. A suplementação dos minerais pode ser feita através da alimentação e/ou pela adição de sais à água (ROY *et al.*, 2010; SUGUNA, 2020).

4.4 DESENVOLVIMENTO DE UM KIT PARA A QUANTIFICAÇÃO DE POTÁSSIO POR VIA ÚMIDA

Sabendo da importância do potássio para a sobrevivência e crescimento dos espécimes nos viveiros (PAN *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2014, VALENZUELA-MADRIGAL *et al.*, 2017), buscou-se avaliar a viabilidade de um kit portátil de baixo custo para a determinação das concentrações desse cátion *in situ*, permitindo que a sua correção imediata no viveiro.

Como agente precipitante foi utilizado o sal tetrafenilborato de sódio - TFBNa (VOGEL, 1981; SKOOG, 2006). A estequiometria da reação entre o tetrafenilborato de sódio e o potássio em solução é de 1:1, como indicado pela reação: $Na^+(C_6H_5)_4B^- + K^+ \rightarrow K^+(C_6H_5)_4B^- + Na^+$ (VOGEL, 1981).

Nas análises, foi utilizado uma solução do agente precipitante na concentração de 0,01 mol/L (Figura 5), preparada a partir da dissolução de massa apropriada do sal em 25,00 mL de água deionizada e posterior sonicação por 1 min. A solução era preparada no momento das análises.

Figura 5 - Solução de TFBNa, na concentração de 0,01 mol/L



Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Inicialmente foram realizados testes de precipitação e solubilização, à temperatura ambiente e em triplicata, considerando a adição lenta de 2 mL de solução de TFBNa 0,01 mol/L à 2 mL de solução padrão de potássio 0,01 mol/L. Após a adição da solução de TFBNa, a mistura foi deixada em repouso por 5 minutos.

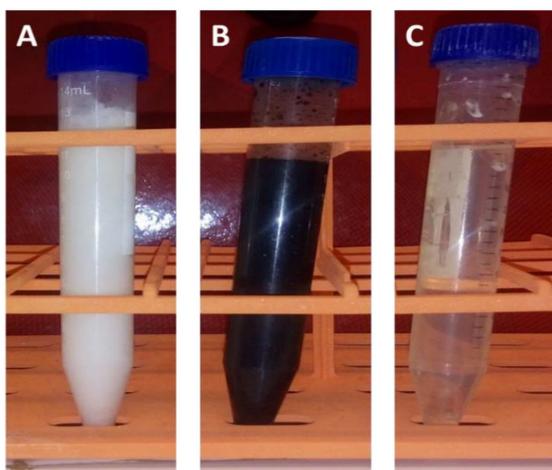
Os resultados indicaram a formação instantânea de um precipitado branco leitoso na solução-tetrafenilborato de potássio-, que se manteve estável ao longo do tempo, como mostrado na Figura 6, e a acetona como sendo o melhor solubilizante (Figura 7C).

Figura 6 - Precipitação do potássio na solução padrão após a adição da solução de TFBNa 0,01 mol/L



Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Figura 7 - Teste de solubilização na solução precipitada de tetrafenilborato de potássio após a adição de hidróxido de sódio (A), ácido nítrico (B), acetona (C)



Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Para o teste de solubilização do precipitado formado foram testadas, além da acetona P.A., soluções de ácido nítrico, hidróxido de sódio e etanol P.A. (VOGEL, 1981). As quantidades adicionadas foram as necessárias para ocorrer a total solubilização do precipitado.

No caso da adição da solução de NaOH 1 mol/L, não houve solubilização do precipitado, conforme mostrado na Figura 7A; a adição de HNO₃ concentrado dissolveu o precipitado, mas resultou em uma solução de coloração escura, dificultando a visualização da transformação (Figura 7B); a adição de etanol dissolveu o precipitado, mas foram necessários 8 mL do reagente, o que o torna pouco prático para o propósito do kit.

Identificada a acetona como o melhor solubilizante, procurou-se avaliar quantitativamente a eficiência da solubilização do precipitado frente a diferentes porcentagens de água em acetona. Os testes foram realizados em uma amostra mistura, formada por 5 mL de cada amostra AMR1, AMR2, AMR3. O parâmetro utilizado foi o número de gotas do agente solubilizante necessários para a completa dissolução do precipitado. Os resultados mostrados na Tabela 12 indicam que ocorreu perda do poder de solubilização do precipitado à medida que se aumentou a porcentagem de água na solução. Embora a acetona pura seja mais eficiente na dissolução do precipitado formado, optou-se por utilizar a solução de acetona 33 % (v/v), por entender que é mais viável para ser usada em um kit.

Tabela 12 - Volume, em mL, da solução solubilizante adicionada à 5 mL da amostra mistura¹ até a completa dissolução do precipitado formado

Porcentagem água em acetona	Volume de solubilizante adicionado (mL)
50 % (v/v) (1:1)	6,0
33 % (v/v) (2:1)	3,6
0 %	2,0

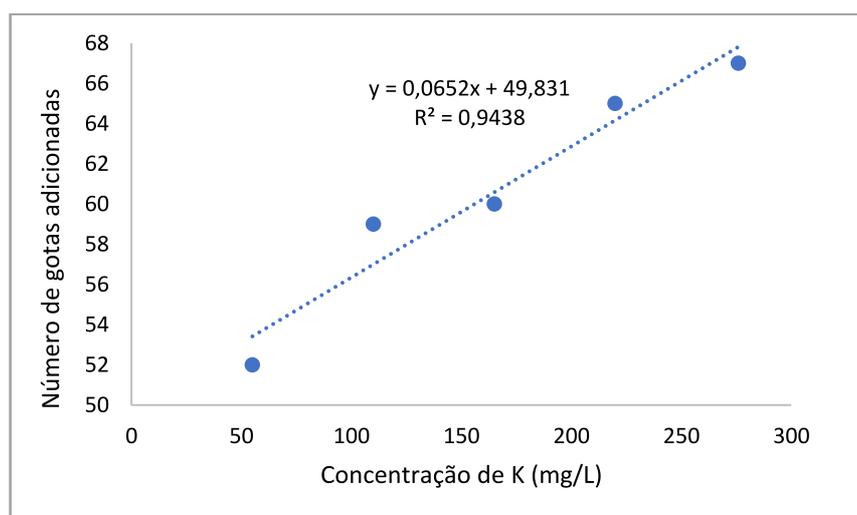
¹AMR1, AMR2, AMR3;

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

A adição do solubilizante à mistura (solução + precipitado) foi feita com o auxílio de um conta-gotas. Escolheu-se um conta-gotas que apresentou a menor variação de volume dispensado por gota.

Baseando-se na concentração de potássio esperada nas amostras de água provenientes dos viveiros de criação de camarão, foi preparada uma curva de calibração, na faixa entre 55 e 276 mg/L, relacionando a concentração de potássio nos padrões com o número de gotas do solubilizante (solução acetona: água 2:1) necessárias para a completa dissolução do precipitado. A curva de calibração obtida é mostrada na Figura 8.

Figura 8 - Número de gotas da solução acetona: água 2:1 (v/v) adicionadas até a dissolução do precipitado formado, pela adição de 2 mL de solução de TFBNa 0,01 mol/L em 2 mL de solução padrão



Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Os padrões de potássio foram preparados a partir da dissolução apropriada de massa do sal de cloreto de potássio em água deionizada. Para a formação do precipitado, foi adicionado lentamente à 2 mL da solução padrão 2 mL da solução de TFBNa 0,01 mol/L.

Pretendia-se estabelecer uma relação proporcional entre o número de gotas da solução de acetona necessário para solubilizar o precipitado formado e a concentração de potássio na amostra.

Portanto, a partir da curva de calibração obtida (Figura 8), determinou-se a concentração de potássio nas amostras AMR1, AMR2 e AMR3. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 13. Foi feita, então, uma comparação entre as concentrações de potássio determinadas a partir da curva de calibração e a partir da aplicação do método validado por fotometria de chama.

Os resultados obtidos indicam uma relação pouco linear ($R^2 = 0,9438$) entre a concentração de K^+ nas amostras e o número de gotas do solubilizante adicionado. Quando se analisam as amostras, os teores de potássio obtidos diferiram do esperado, apresentando erros relativos entre 29 % e 50 %, indicando a baixa exatidão do método. Para a amostra AMR1, a concentração de potássio obtida ficou fora da curva de calibração.

Tabela 13 - Número de gotas adicionadas de solução de acetona 33% (v/v) necessárias para a dissolução do precipitado tetrafenilborato de potássio, formado pela adição de 2 mL de solução de TFBNa 0,01 mol/L a 2 mL de amostra

Amostra	Concentração de K^+ ^(1,2) (mg/L)	Gotas de sol. acetona adicionadas	Concentração obtida (mg/L) ²
padrão	55	52	
padrão	110	59	
padrão	165	60	
padrão	220	65	
padrão	276	67	
AMR1	226 ± 29	51 ± 4	fora da curva
AMR2	176 ± 11	58 ± 2	125 ± 1
AMR3	201 ± 04	55 ± 3	99 ± 2

¹As concentrações de K^+ nas amostras AMR1, AMR2 e AMR3 foram obtidas por fotometria de chama, a partir de método validado pelo laboratório;

²Expresso como Média ± Intervalo de Confiança = $\frac{t \times S}{\sqrt{n}}$, S é o desvio-padrão, n é o número de replicatas e t é o parâmetro de Student ($\alpha = 0,05$; n=3);

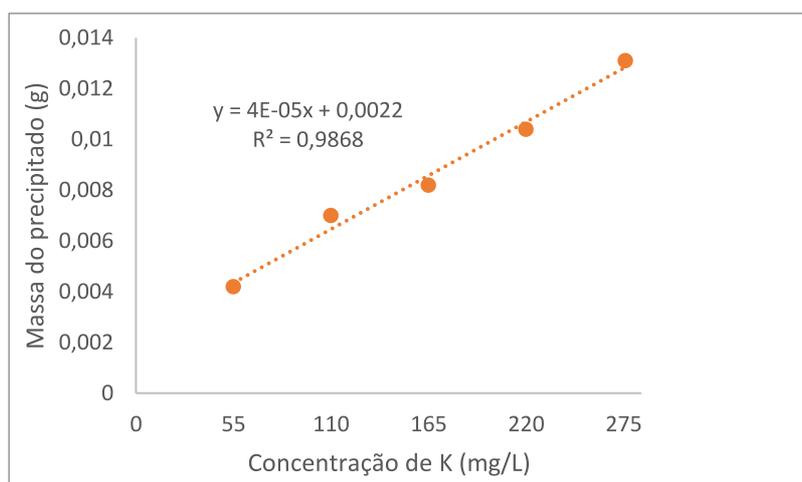
Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Esses resultados pareciam indicar que a visualização do ponto final da titulação, isto é, a completa dissolução do precipitado, poderia não estar ocorrendo de maneira eficiente, em virtude, por exemplo, da turbidez da mistura. Desse modo, foram feitos testes para a quantificação em massa do precipitado formado.

A determinação da massa de tetrafenilborato de potássio nos padrões e amostras foi feita como segue: adição lenta de 4 mL da solução de TFBNa 0,01 mol/L à 4 mL de amostra ou solução padrão 0,01 mol/L, com conseqüente formação do precipitado; após 5 minutos de repouso, as misturas resultantes foram centrifugadas a 4000 rpm, por 6 minutos; o sobrenadante foi descartado e o corpo de fundo foi seco em estufa, a 60°C, por aproximadamente 30 minutos, resfriado em dessecador e, finalmente, pesado em balança analítica. A utilização de 4 mL de amostra e 4 mL solução de TFBNa 0,01 mol/L se deu em função da necessidade da formação de precipitado cuja massa pudesse ser determinada de maneira mais precisa.

A curva de calibração obtida, relacionando a concentração de potássio nos padrões com a massa do precipitado obtida é mostrada na Figura 9. A partir dessa curva, foram obtidas as concentrações do analito nas amostras AMR1, AMR2 e AMR3, e novamente, esses teores de potássio foram comparados àqueles obtidos por fotometria de chama. Os resultados são mostrados na Tabela 14.

Figura 9 - Massa do precipitado formada (em g) a partir da adição de 4 mL de TFBNa 0,01 mol/L a 4 mL solução padrão em diferentes concentrações de K⁺



Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Tabela 14 - Massa (em g) do precipitado obtida após a adição de 4 mL de solução de TFBNa 0,01 M a 4 mL de amostra ou solução padrão

Amostra	Concentração de K ⁺ (¹) (mg/L)	Massa do precipitado obtida (g)	Concentração obtida (mg/L) ²
padrão	55	0,0042	
padrão	110	0,0070	
padrão	165	0,0082	
padrão	220	0,0104	
padrão	276	0,0131	
AMR1	226 ± 29	0,0119	243
AMR2	176 ± 11	0,0067	113
AMR3	201 ± 04	0,0072	190

¹As concentrações de K⁺ nas amostras AMR1, AMR2 e AMR3 foram obtidas por fotometria de chama, a partir de método validado pelo laboratório;

²Obtidas a partir da curva de calibração (Figura 9);

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

A partir da observação da Figura 9 é possível confirmar que existe uma relação aproximadamente proporcional entre a massa do precipitado formado e a concentração de K⁺ nas amostras, dado o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9868$). A comparação das concentrações de K⁺ obtidas a partir da curva de calibração mostrada na Figura 9 com aquelas obtidas por fotometria de chama, indicam erros relativos entre 5 % e 35 %, portanto, melhores, quando comparados ao obtidos pela titulação. Desse modo, deixa-se em aberto a possibilidade do desenvolvimento de um kit semiquantitativo para determinação de potássio, a partir da massa do precipitado, devendo serem feitos teste de adição e recuperação e o método ser testado em mais amostras.

4.5 DETERMINAÇÃO DOS ÂNIONS Cl⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻, NO₃⁻ e NO₂⁻ POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA COM DETECTOR UV/VIS

Nesta seção são apresentadas as principais etapas desenvolvidas para o desenvolvimento e a otimização do método analítico para a determinação dos ânions supracitados por eletroforese capilar de zona.

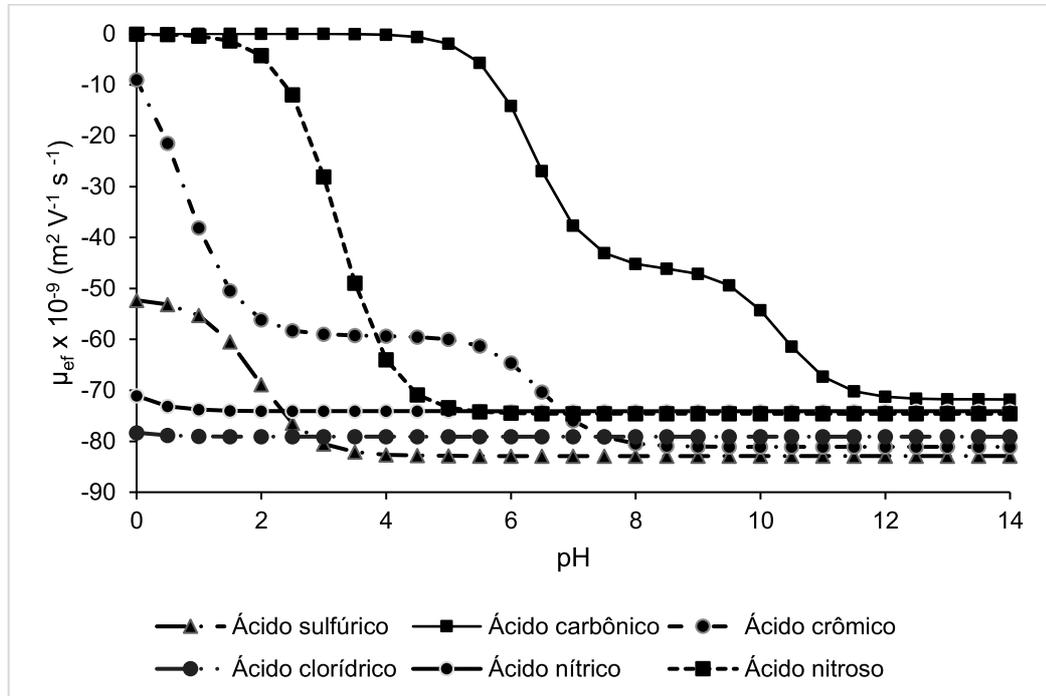
4.5.1 Escolha dos constituintes do BGE e ajuste da força iônica

A água de carnicultura possui considerável concentração de íons, ou seja, alta força iônica, o que influencia na análise por CE, porque a matriz da amostra salina compete com os analitos no processo de migração no interior do capilar, prejudicando a repetibilidade do método e provocando aquecimento pelo efeito Joule, o que causa distorção do pico (DING; TORNTON; FRITZ, 1998). Além disso, a alta concentração iônica da matriz gera uma condutividade maior do analito em comparação àquela observada no BGE, o que causa o alargamento da zona, e conseqüentemente, picos planos e baixa resolução (BODEN; BACHMANN, 1996). Portanto, a escolha correta do BGE e o ajustamento da força iônica são parâmetros de vital importância para o sucesso do desenvolvimento do método analítico.

Nos casos em que se usa detecção na região UV/Vis, o eletrólito deve conter uma espécie cromófora, visto que, como citado por Colombara *et al* (1996), a maioria dos ânions de baixo peso molecular não absorve radiação nessa região, por exemplo, o íon Cl⁻. Neste caso, então, a detecção é feita de modo indireto: o espectro UV do cromóforo é monitorado durante o tempo da corrida, e quando os analitos que não absorvem a radiação passam pelo detector, ocorre uma queda na absorbância, que é registrada pelo equipamento como um pico negativo no eletroferograma (VAZ *et al*, 2015). A escolha do cromato de potássio como eletrólito para as análises dos analitos foi baseada nos trabalhos de Colombara *et al* (1996) e Mimura *et al* (2013).

A determinação da faixa do pH do BGE de trabalho deve ser feita de modo a se garantir que os analitos estejam totalmente ionizados na forma de interesse e apresentem diferenças de mobilidade suficientes para permitir a separação (BETTA, 2017). Para auxiliar na escolha do pH, foi construída uma curva de mobilidade efetiva (μ_{ef}) versus pH, como mostrado na Figura 10. Os valores de mobilidade foram obtidos do software PeakMaster 5.3.

Figura 10 - Curva de mobilidade efetiva (μ_{ef}) em função do pH para os ânions para CrO_4^{2-} , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , NO_2^- e HCO_3^-



Fonte: elaborada pelo autor (2022).

A partir da análise da Figura 10, e considerando os ânions a serem determinados, optou-se por trabalhar com o BGE em pH na faixa entre 8,0 e 8,5, visto que nessa condição há o predomínio de todas as espécies de interesse: CrO_4^- ($\text{pH} > 8$), SO_4^{2-} ($\text{pH} > 3$), NO_2^- ($\text{pH} > 5$) e HCO_3^- ($8 < \text{pH} < 9$). Para as espécies Cl^- e NO_3^- não foram observadas alterações de suas mobilidades com a variação de pH.

Quanto ao ajuste da força iônica, optou-se por usar um BGE com a força iônica próxima à da amostra, de modo a se evitar uma etapa de pré-tratamento e/ou aditivos. Roder e Bachmann (1994), por exemplo, usaram solução de bário para melhorar a separação dos ânions NO_3^- e SO_4^{2-} em água da chuva.

Para o cálculo da força iônica das amostras, considerou-se uma concentração iônica aproximada de 10 g/L, que para efeitos de simplificação, correspondem à concentração de NaCl ($M = 58,5$ g/mol), portanto, força iônica de 171 mM, determinada a partir da equação $I = \frac{1}{2} ([A]Z_a^2 + [B]Z_b^2 + \dots + [N]Z_n^2)$, em que [A] e [B] correspondem às concentrações do cátion e do

ânion, respectivamente, e Z_a e Z_b suas cargas. Tendo o BGE sido preparado a partir do sal K_2CrO_4 , chegou-se a uma concentração 60 mM e força iônica de 180 mM, portanto, próxima àquela determinada para as amostras (171 mM).

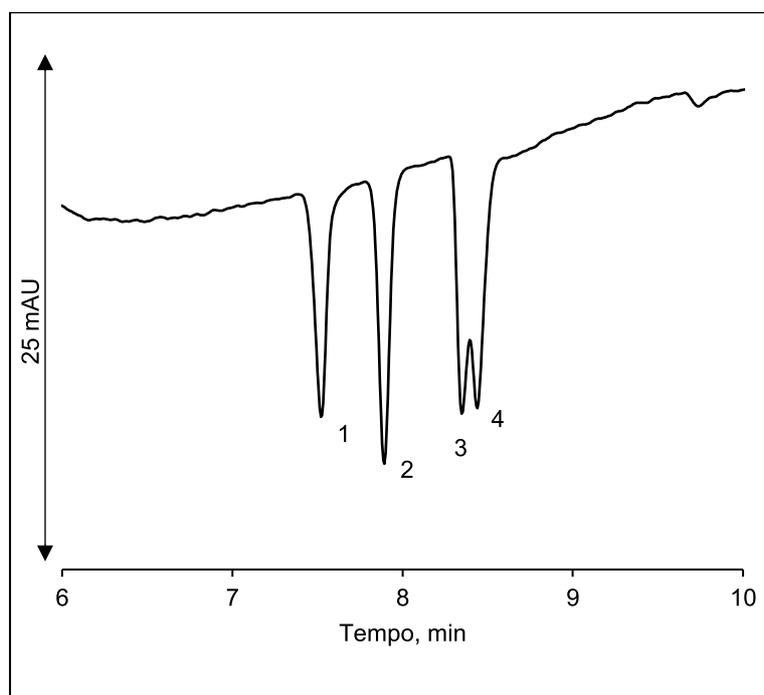
Para a detecção dos ânions, foi adicionado ao BGE o surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) na concentração de 2,5 mM, e foi utilizada polaridade invertida. Nestas condições, ocorre, respectivamente, a inversão do fluxo eletrosmótico e aplicação de voltagem negativa na extremidade do capilar em que é feita a injeção, e consequentemente, polaridade positiva no polo em que é feita a detecção. Isso permite que os ânions e o EOF migrem na direção do detector, o que aumenta a eficiência na separação dos ânions. A escolha do CTAB como inversor de fluxo foi baseada no trabalho de Oliveira *et al* (2012).

4.5.2 Planejamento Experimental

Determinadas, então, as condições de corrida, isto é, fluxo e polaridades invertidos e BGE de composição inicial de 60 mM de CrO_4^{2-} e 2,5 mM de CTAB, procedeu-se à fase de aplicação e otimização.

Inicialmente, testou-se o BGE na composição inicial, considerando uma voltagem de -5 kV, a partir da injeção de uma amostra mistura de Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- e NO_2^- na concentração de 250 mg/L para cada analito, com concentração final de BGE igual a 13 mM. O eletroferograma é mostrado na Figura 11. Nesta figura é possível observar a completa separação dos picos 1 e 2 e a comigração dos picos 3 e 4, correspondentes aos ânions NO_3^- e SO_4^{2-} , respectivamente.

Figura 11 - Eletroferograma de uma amostra mistura de 250 mg/L de Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- e NO_2^- com 13 mM de BGE¹



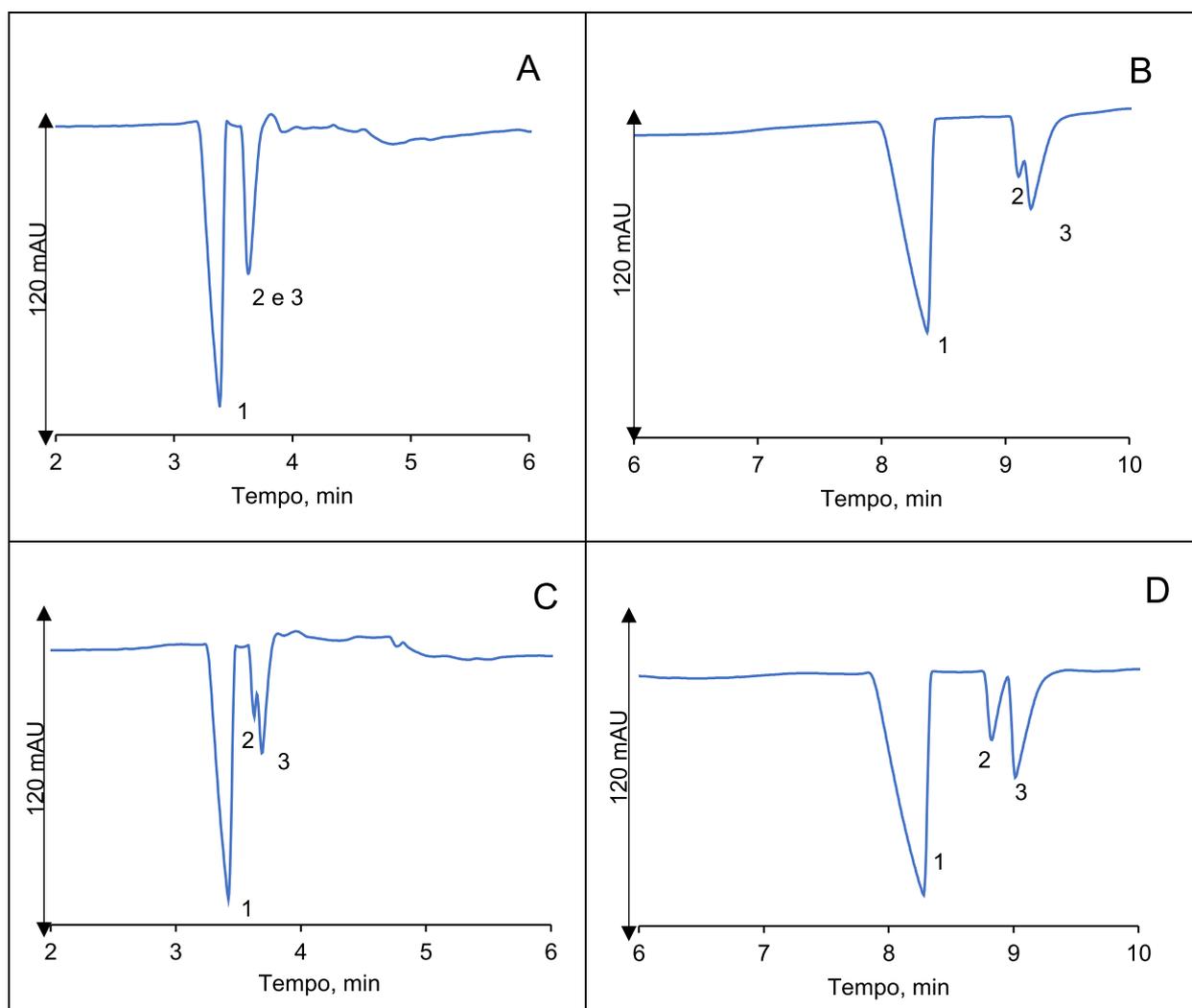
¹BGE 60 mM CrO_4^{2-} e CTAB 2,5 mM (pH 8,40), temperatura cassete: 25°C, voltagem: -5 kV, detecção em: 254 nm, injeção hidrodinâmica: 25 mbar/ 5 s e coluna capilar de sílica fundida -TSP (comprimento efetivo 40 cm). Identificação dos picos: 1: Cl^- , 2: NO_2^- , 3: NO_3^- , 4: SO_4^{2-} .
Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Essas mesmas condições de corrida foram aplicadas na análise da amostra AMR2, mas aplicando voltagens de -10 kV e -5 kV. Os eletroferogramas nas Figuras 12A e 12B mostram que ocorreu a comigração dos analitos, embora em menor extensão quando da aplicação da voltagem menor (-5 kV).

Para melhorar a separação, e baseando-se nos trabalhos de Buchberger e Haddad (1992), optou-se por testar a adição do solvente orgânico acetonitrila 3,5 % (v/v) no BGE. Os resultados são mostrados nas Figuras 12C e 12D, e indicam uma melhoria na separação dos ânions na condição de -5 kV, embora com tempo de migração maior. Esta, então, foi a voltagem escolhida para a continuação do trabalho.

A não detecção de nitrito na amostra AMR2 decorre do fato de que, em presença de oxigênio, o nitrito é um intermediário instável e é rapidamente oxidado a nitrato (VINATEA, 1996).

Figura 12 - Eletroferogramas obtidos para a amostra AMR2 a partir de diferentes condições de análise



Condições de corrida iguais: temperatura cassete: 25°C; detecção em: 254 nm, injeção hidrodinâmica: 25 mbar/ 5s; capilar sílica fundida revestido com poliimida (serie TSP) de 48 cm (comprimento efetivo 40 cm); (A) e (B): BGE 60 mM CrO_4^{2-} e 2,5 mM CTAB (pH 8,40); voltagem: -10 kV (A) e -5kV (B); (C) e (D): BGE 60 mM CrO_4^{2-} , 2,5 mM CTAB e 3,5 % ACN (pH 8,40), voltagem: -10 kV (C) e -5kV (D).

Identificação dos picos: 1: Cl^- , 2: NO_3^- , 3: SO_4^{2-} ;

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Buchberger e Haddad (1992) também relatam a utilização do solvente orgânico metanol (MeOH) para ajudar no processo de separação de ânions. Desse modo, decidiu-se investigar, a partir de um planejamento de misturas, a influência da adição ao BGE desses dois solventes (MeOH e ACN), separados ou em conjunto, na melhoria da separação dos analitos. A porcentagem total de solvente orgânico no eletrólito foi fixada em 3,5% (v/v) do BGE. A concentração do eletrólito e do

CTAB foram mantidas constantes em 60 mM e 2,5 mM, respectivamente, bem como polaridade e fluxo eletrosmótico invertidos e voltagem em -5 kV.

Para o planejamento, foi preparada uma solução padrão a partir da mistura de soluções de Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- e NO_2^- na concentração de 250 mg/L cada e injetada em duplicata. A matriz de contraste e as respostas (CRS) são mostradas na Tabela 15; os eletroferogramas correspondentes são mostrados na Figura 13. No triângulo retângulo da Figura 13, todas as cinco possíveis misturas dos dois componentes correspondem a pontos localizados sobre a hipotenusa. O ponto localizado sobre o ângulo reto representa o BGE sem adição dos componentes.

Para a escolha da melhor condição de análise, foi utilizada a estatística de resolução cromatográfica (CRS, do inglês *chromatographic resolution statistic*), cuja função é avaliar a resolução dos picos no eletroferograma simultaneamente ao tempo de corrida. Quanto menor o CRS, mais eficiente a separação. Pode ser calculada pela equação $CRS = \left\{ \sum_{i=1}^{n-1} \left[\frac{(R_{i,i+1} - R_{ot})^2}{(R_{i,i+1} - R_{min})^2 R_{i,i+1}} \right] + \sum_{i=1}^{n+1} \frac{R_{i,i+1}^2}{(n-1)R_{méd}^2} \right\} \cdot \frac{t_n}{n}$, em que $R_{i,i+1}$ corresponde a resolução entre pares de solutos adjacentes, $R_{méd}$ corresponde a resolução média entre pares de solutos, R_{ot} é a resolução ideal ou desejada fixada como 1,5, R_{min} é a resolução mínima aceitável, igual a 1, t_n é o tempo de migração do último soluto eluente e n é o número de analitos na amostra ($n=4$) (McGUFFIN; TAVARES, 1997).

Tabela 15 - Quantidades de ACN (acetonitrila) e MeOH (metanol), em % (v/v)¹ usados em cada mistura, preparada em duplicata, e resposta estatística CRS²

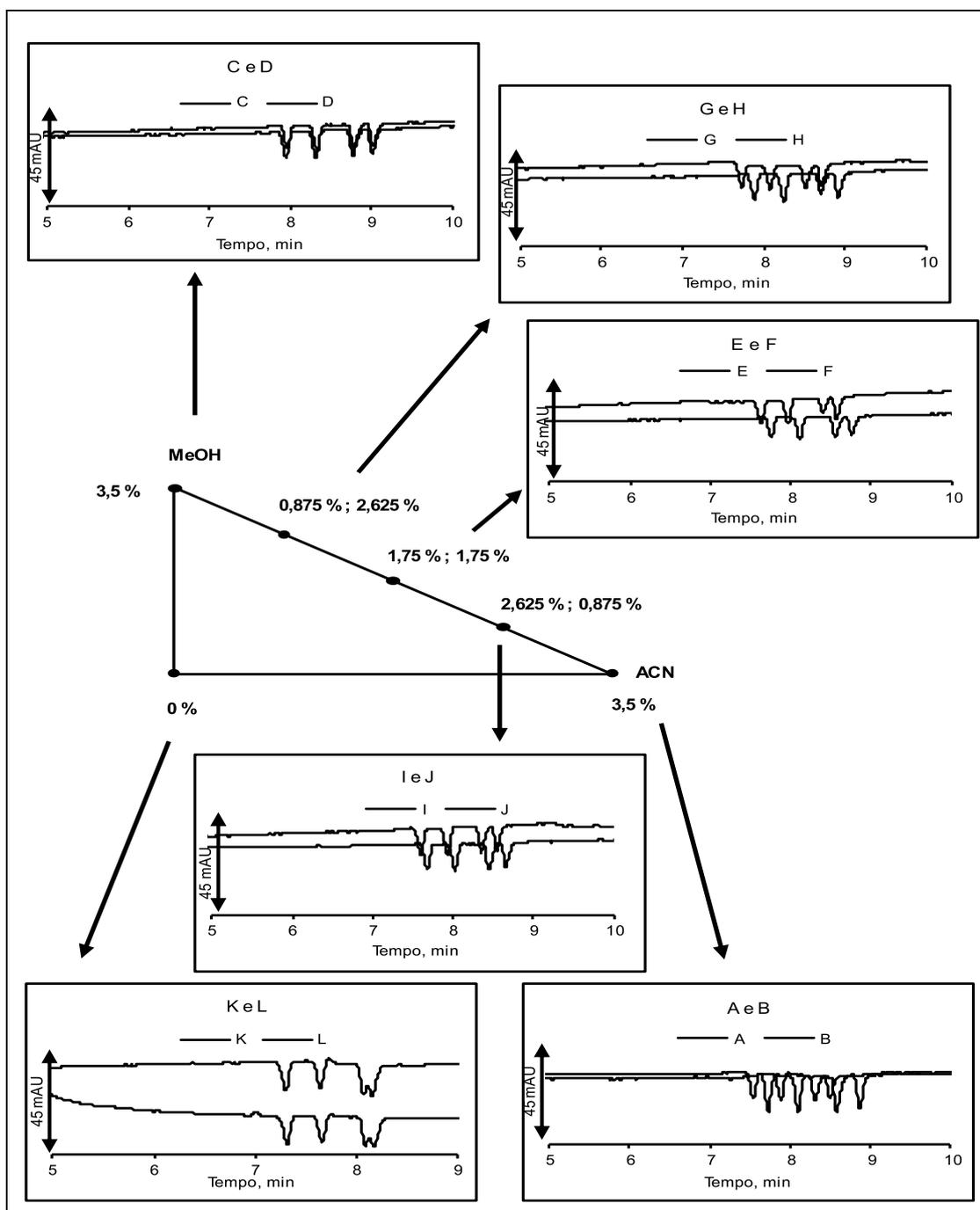
Mistura	ACN	MeOH	CRS
A	3,500%	0,000%	3,0
B	3,500%	0,000%	72,1
C	0,000%	3,500%	3,3
D	0,000%	3,500%	3,1
E	1,750%	1,750%	807,1
F	1,750%	1,750%	6,4
G	0,875%	2,625%	16,2
H	0,875%	2,625%	4,0
I	2,625%	0,875%	6,7
J	2,625%	0,875%	13,3
K	0,000%	0,000%	1256,3
L	0,000%	0,000%	80,2

¹A porcentagem de solvente orgânico foi fixa em 3,5 % (v/v) do BGE;

²Estatística de resolução cromatográfica (CRS, do inglês *chromatographic resolution statistic*);

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Figura 13 – Eletroferogramas, em duplicata, obtidos de acordo com as diferentes composições de ACN e MeOH no BGE utilizadas no planejamento de misturas



BGE: 60 mM CrO_4^{2-} , 2,5 mM CTAB 2,5, A e B: 3,5% ACN, C e D: 3,5% MeOH, E e F: 1,75% ACN e 1,75% MeOH, G e H: 0,875% ACN e 2,625% MeOH, I e J: 2,625% ACN e 0,875% MeOH, K e L: 0% ACN e 0% MeOH. Temperatura cassete: 25°C, voltagem: -5 kV, detecção em 254 nm, injeção hidrodinâmica: 25 mbar/5 s e capilar de sílica fundida- TSP (comprimento efetivo 40 cm).
 Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Os ensaios identificados em A, C, D e H apresentaram os menores valores de CRS, e, portanto, correspondem às melhores condições de análise, isto é, melhor resolução dos picos, já que o tempo de corrida não variou muito entre as análises. De modo a decidir entre essas condições, foi usado o parâmetro de repetibilidade como segunda resposta. A amostra mistura dos ânions Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- e NO_2^- foi injetada seis vezes, sob diferentes BGE, pela adição das misturas A, C e H (os ensaios C e D são réplicas das mesmas condições). Os ensaios de repetibilidade foram avaliados a partir do RSD (%) dos tempos de migração e áreas dos picos dos analitos (Tabela 16).

Tabela 16 - Valores de RSD (%) para o teste de repetibilidade

Mistura	RSD (%) Tempo de migração				RSD (%) Área do pico			
	Cl^-	SO_4^{2-}	NO_3^-	NO_2^-	Cl^-	SO_4^{2-}	NO_3^-	NO_2^-
A	1,68	1,76	1,86	1,87	1,54	5,02	5,38	2,20
C	0,28	0,27	0,27	0,26	8,82	9,12	7,50	6,62
H	0,50	0,51	0,54	0,51	1,55	1,88	2,10	3,78

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Os valores de RSD (%) para o tempo de migração nas três condições de BGE analisadas são baixos – entre 0,27 e 1,87. Porém, o RSD (%) da área do pico, comparando-se todos os ânions, é menor na mistura H, indicando maior reprodutibilidade dos dados. Portanto, a mistura H foi usada na adição ao BGE, otimizado da seguinte forma: 60 mM CrO_4^{2-} , 2,5 mM CTAB, 0,875% ACN e 2,625% MeOH. As outras condições instrumentais foram mantidas: temperatura cassete: 25°C, voltagem: -5 kV, detecção em 254 nm, injeção hidrodinâmica: 25 mbar/5 s e capilar sílica fundida -TSP (comprimento efetivo 40 cm).

4.5.2.1 Cálculo do raio de solvatação das espécies aniônicas nos diferentes BGE utilizados no planejamento de misturas

Os raios de hidratação dos ânions (r_i) nas diferentes condições do planejamento de misturas foram calculados a partir da equação, $r_i = \frac{q}{\mu_{EP} \cdot 6\pi \cdot \eta}$, em que q é a carga do íon, η é a viscosidade da solução e μ_{EP} é a mobilidade eletroforética do íon (VAZ *et al*, 2015). Os dados de μ_{EP} foram

obtidos do *software PeakMaster 5.3*; a carga q foi calculada a partir da equação $q = ne$, em que n é o número de elétrons ganhos ou perdidos e e é a carga elétrica elementar do elétron ($1,6 \times 10^{-19}$ C); a viscosidade de cada BGE foi calculada usando um Viscosímetro de Ostwald (RAYAPROLU *et al.*, 2018). Uma explicação do procedimento para o cálculo da viscosidade e os valores do tempo médio de escoamento e viscosidade para cada BGE são mostrados no Apêndice A, à página 72. Os raios dos íons solvatados para cada condição são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17 - Raios de solvatação dos ânions (em Å) determinados a partir dos diferentes BGEs do planejamento de misturas

BGE	$r_i(\text{Cl}^-)$	$r_i(\text{SO}_4^{2-})$	$r_i(\text{NO}_3^-)$	$r_i(\text{NO}_2^-)$	$r_i(\text{HCO}_3^-)$
CrO₄²⁻ (60 mM), CTAB (2,5mM), ACN (3,5 %)	1,23	2,35	1,31	1,30	2,11
CrO₄²⁻ (60 mM), CTAB (2,5 mM), MeOH (3,5 %)	1,13	2,16	1,21	1,20	1,94
CrO₄²⁻ (60 mM), CTAB (2,5mM), ACN (1,75 %), MeOH (1,75 %)	1,20	2,29	1,28	1,27	2,06
CrO₄²⁻ (60 mM), CTAB (2,5 mM), ACN (0,875 %), MeOH (2,625%)	1,19	2,27	1,27	1,26	2,04
CrO₄²⁻ (60 mM), CTAB (2,5 mM), ACN (2,625%), MeOH (0,875%)	1,22	2,32	1,30	1,29	2,09
CrO₄²⁻ (60 mM), CTAB (2,5 mM)	1,29	2,46	1,37	1,36	2,21

1 Å = 10^{-10} m;

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Acredita-se que a melhora no perfil de separação dos ânions, sobretudo do NO_3^- e do SO_4^{2-} esteja relacionada a mudanças na interação BGE-analito, causadas pela adição do solvente orgânico.

A Tabela 17 mostra que a adição de metanol e acetonitrila diminuiu a interação íon-solvente, considerando que a diminuição dos raios dos ânions variou entre 4 e 12 %, quando comparados à condição em que não se adicionou solvente orgânico ao BGE, sendo as maiores variações observadas à medida em que se aumentou a porcentagem de metanol na solução. Daí, conclui-se que o metanol tem efeito negativo mais pronunciado na interação íon-solvente.

No planejamento de misturas, as melhores condições consideradas, de acordo com o menor CRS – condições A, C, D e H -, têm em comum a maior concentração de metanol na solução do BGE, o que sugere que um menor raio interage menos com a parede do capilar, aumentando a seletividade do método.

O ânion bicarbonato não fora incluído no planejamento de misturas porque, nas amostras disponíveis à época não foi detectada a sua presença. No entanto, a partir da análise de amostras contendo tal ânion, observou-se que as condições estabelecidas no método se adequavam perfeitamente a sua detecção e quantificação, sendo possível, assim, a sua inclusão no processo de validação do método.

4.5.3 Avaliação de desempenho analítico dos métodos propostos

Os parâmetros precisão intradia (repetibilidade) e interdia (precisão intermediária), exatidão, limite de quantificação e limite de detecção foram avaliados por meio de ensaios com a amostra mistura e com os padrões.

A precisão do método foi avaliada pelo cálculo do RSD das áreas dos picos e tempos de migração, a partir de 10 (dez) corridas sucessivas da amostra mistura. Os resultados são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18 - Valores de RSD % considerando a área dos picos e o tempo de migração dos analitos Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- e NO_3^- na amostra mistura¹ determinados por Eletroforese Capilar de Zona

	RSD % (Área dos Picos)				RSD % (Tempo de Migração)			
	Cl^-	SO_4^{2-}	HCO_3^-	NO_3^-	Cl^-	SO_4^{2-}	HCO_3^-	NO_3^-
Repetibilidade	1,50	1,84	4,98	3,19	0,24	0,21	3,68	0,21
Precisão Intermediária	2,86	2,75	6,30	3,72	0,31	0,29	4,82	0,28

¹AMR2, AMR3, AMR4, AMR5;

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Mesmo com essas altas concentrações dos analitos nas amostras, o RSD variou entre 0,59 e 4,98%, indicando a boa repetibilidade (precisão) do método.

A Tabela 19 mostra os resultados para os testes de exatidão, bem como os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), obtidos para todos os analitos, a partir da amostra mistura e das amostras AMR1 e AMR6. Todas as análises foram feitas em triplicatas. A exatidão do método foi avaliada por meio de ensaios de adição e recuperação, a partir da fortificação da amostra mistura com as soluções padrões dos analitos em dois níveis de concentração: 250 e 750 mg/L, para Cl^- , SO_4^{2-} e HCO_3^- , e 100 e 250 mg/L, para o NO_3^- , conforme mostrado no subitem 3.2.2. O LOD e o LOQ foram obtidos a partir da relação sinal-ruído dos eletroferogramas e alturas dos picos.

Tabela 19 - Limites de detecção, quantificação e recuperação obtidos para os analitos Cl⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻, NO₃⁻ por Eletroforese Capilar de Zona, a partir da amostra mistura¹ e das amostras AMR1 e AMR6

Código das Amostras	Analitos	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Recuperação (%) ²	
				Nível 1	Nível 2
AMOSTRA MISTURA	Cl ⁻	97,7	325,8	97,1 ± 9,8	98,1 ± 10,2
	SO ₄ ²⁻	16,6	55,4	94,0 ± 10,9	98,1 ± 4,3
	HCO ₃ ⁻	3,4	11,4	101,1 ± 10,6	104,2 ± 10,7
	NO ₃ ⁻	2,6	8,6	94,8 ± 5,9	97,3 ± 5,7
AMR1	Cl ⁻	116,5	388,2	99,8 ± 11,7	99,2 ± 9,7
	SO ₄ ²⁻	88,9	96,4	101,5 ± 9,3	102,3 ± 7,8
	HCO ₃ ⁻	13,3	44,4	97,9 ± 4,3	97,4 ± 8,7
	NO ₃ ⁻	26,9	89,5	99,4 ± 11,6	95,9 ± 4,1
AMR6	Cl ⁻	69,3	231,1	97,5 ± 10,8	97,6 ± 6,2
	SO ₄ ²⁻	4,1	13,8	105,7 ± 9,8	97,2 ± 9,4
	HCO ₃ ⁻	41,3	137,6	97,5 ± 8,7	99,1 ± 10,2
	NO ₃ ⁻	26,9	89,5	107,3 ± 12,5	102,1 ± 5,9

¹Amostra mistura composta por 5 mL da amostra AMR2, AMR3, AMR4 e AMR5;

²Expresso como Média ± Intervalo de Confiança = $\frac{t \times S}{\sqrt{n}}$, *S* é o desvio-padrão, *n* é o número de replicatas e

t é o parâmetro de Student ($\alpha = 0,05$; $n=3$); Recuperação = $[(C_{A+P} - C_A) / C_P] \times 100$;

Nível 1: Cl⁻, SO₄²⁻ e HCO₃⁻: 250 mg/L, NO₃⁻: 100 mg/L;

Nível 2: Cl⁻, SO₄²⁻ e HCO₃⁻: 750 mg/L, NO₃⁻: 250 mg/L;

Fonte: elaborada pelo autor (2021).

Os resultados de recuperação obtidos, cuja variação média ficou entre 94,0 e 107,3 %, se mostraram satisfatórios e dentro do considerado razoável para o trabalho, que é de 90 a 107%, considerando a faixa de concentração em partes por milhão (ppm) dos analitos nas amostras (AOAC, 2012). Os limites de detecção e quantificação foram considerados adequados para a quantificação das análises.

4.5.4 Aplicação do método

Os métodos estabelecidos foram aplicados às 6(seis) amostras de água de carcinicultura: AMR1, AMR2, AMR3, AMR4, AMR5 e AMR6. Os teores, em mg/L, encontrados para os analitos

Cl⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻ e NO₃⁻ e respectivos RSD, estão mostrados na Tabela 20. Alguns dos eletroferogramas correspondentes à quantificação das amostras estão mostrados na Figura 14.

Tabela 20 - Resultados obtidos para a quantificação dos analitos Cl⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻ e NO₃⁻ nas amostras de água de carcinicultura por eletroforese capilar e respectivos RSD.

Código da amostra	[Cl ⁻] mg/L	RSD %	[SO ₄ ²⁻] mg/L	RSD %	[HCO ₃ ⁻] mg/L	RSD %	[NO ₃ ⁻] mg/L	RSD %
AMR1	9486 ± 1716	7,28	1656 ± 178	4,33	148 ± 18	4,98	389 ± 34	3,48
AMR2	8189 ± 255	1,25	2846 ± 37	1,28	-	-	1320 ± 13	0,97
AMR3	5134 ± 75	0,59	490 ± 08	0,66	-	-	627 ± 63	4,07
AMR4	12842 ± 555	4,32	1880 ± 80	1,72	506 ± 07	1,31	45 ± 02	1,42
AMR5	7561 ± 275	1,46	1175 ± 37	1,25	255 ± 21	3,29	402 ± 49	4,88
AMR6	4886 ± 96	2,05	67 ± 02	3,40	208 ± 12	5,76	-	-

^(a)Expresso como Média ± Intervalo de Confiança = $\frac{t \times S}{n}$, S é o desvio-padrão, n é o número de replicatas e t é o parâmetro de Student ($\alpha = 0,05$; n=3).

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

O método desenvolvido e otimizado nesse trabalho foi capaz de separar e quantificar os analitos em concentrações muito diversas entre amostras e com baixos valores de RSD, o que indica a sua robustez. Entre amostras, a concentração de Cl⁻ variou até 262 %, enquanto SO₄²⁻, HCO₃⁻ e NO₃⁻ variaram 4000, 341 e 2900 %, respectivamente. À exceção da AMR1, os RSD variaram entre 0,59 e 4,88 %, indicando boa precisão.

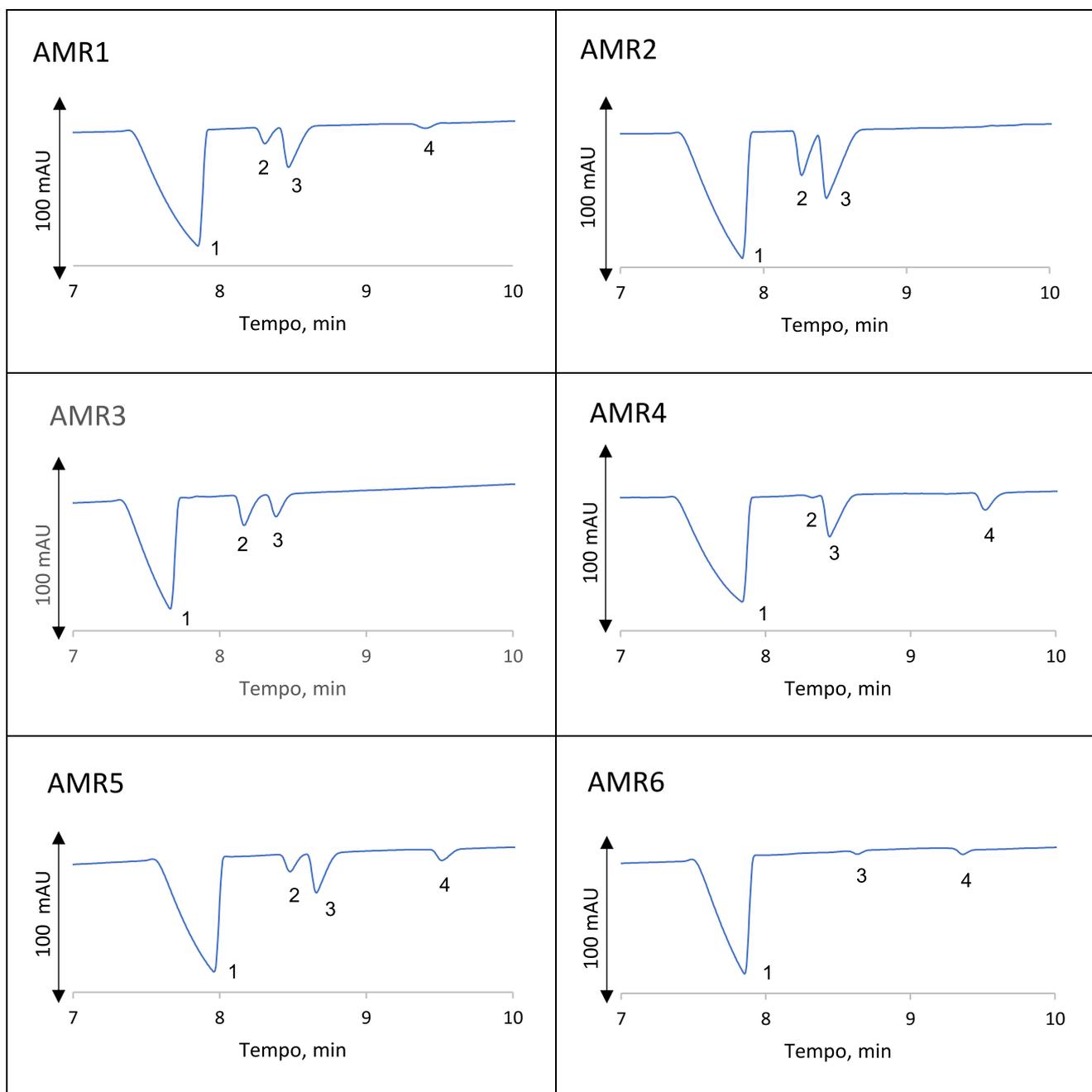
As concentrações encontradas para Cl⁻, SO₄²⁻ e HCO₃⁻ na amostra AMR6 foram 4889 ± 96 mg/L, 67 ± 2 mg/L e 208 ± 12 mg/L, respectivamente. A ausência de nitrato e nitrito se justifica porque esse viveiro não recebeu animais e estes são ânions resultantes majoritariamente do processo oxidativo da amônia, cuja presença nos viveiros é devida aos processos metabólicos dos animais cultivados e da alimentação não consumida (CHEN; LIN, 1992).

Assim como na amostra AMR2, não foi detectado nitrito nas amostras AMR1, AMR3, AMR4 e AMR5, em virtude da sua oxidação a nitrato, em meio abundante em oxigênio (VINATEA, 1996). Logo, visando a aplicação do método em novas amostras, recomenda-se a

análise imediata do analito (48 h) ou o uso de um preservante para que o íon nitrito possa se manter estável por mais tempo, permitindo a sua quantificação.

A ausência do íon bicarbonato nas amostras identificadas como AMR2 e AMR3 decorre do fato de que essas amostras foram acidificadas com HNO_3 a $pH < 2$ para armazenamento e posterior determinação dos metais (conforme subitem 5.2.2). Em pH abaixo de 4, ocorre o consumo completo do ânion pelo ácido, através da seguinte reação $HCO_3^- + HNO_3 \rightarrow H_2CO_3 + NO_3^- \rightarrow CO_2 + H_2O + NO_3^-$. Por essa equação, é plausível supor que a alta concentração de íons nitrato encontrada nessas amostras seja em parte devido à reação entre o bicarbonato e o ácido nítrico.

Figura 14 - Eletroferogramas das amostras de água provenientes de viveiros de criação de camarão utilizadas para a quantificação dos ânions Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- e NO_3^- por eletroforese capilar de zona



Condição: BGE 60 mM, CTAB 2,5 mM, acetonitrila 0,875% e metanol 2,625 %, pH 8,40; temperatura cassete: 25 °C; injeção hidrodinâmica: amostra: 25 mbar/5 s, eletrólito: 25 mbar/16 s- pelo lado distante do detector; voltagem aplicada: -5 kV e detecção: 250 nm; capilar sílica fundida revestido com poliimida (serie TSP) de 48 cm (41 cm comprimento efetivo) x 75 μm de diâmetro interno x 375 μm diâmetro externo. Identificação dos picos: 1: Cl^- , 2: NO_3^- , 3: SO_4^{2-} , 4: HCO_3^- ;
 Fonte: elaborada pelo autor (2022).

5 DETERMINAÇÃO DE CLORETO POR TITULAÇÃO CONDUTOMÉTRICA

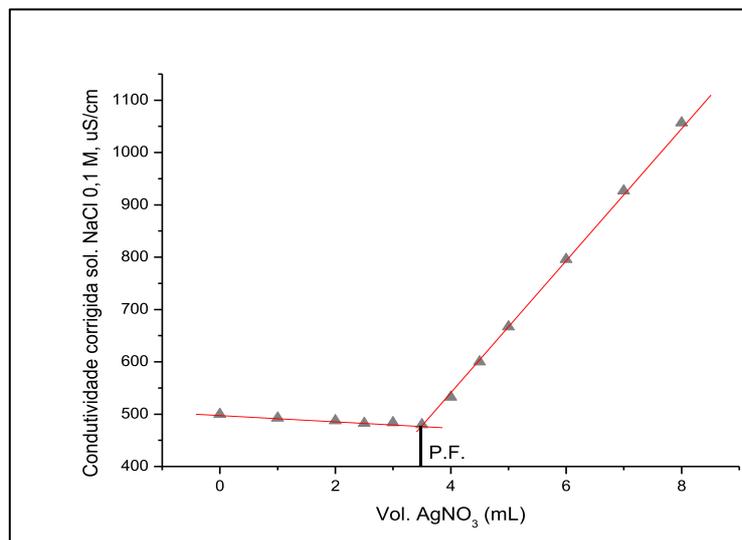
A determinação do cloreto nas amostras provenientes dos viveiros de criação de camarão também foi feita empregando a titulação condutométrica. Esta é uma técnica de execução simples, rápida e precisa, que pode ser empregada em análises de rotina, por exemplo, na quantificação de espécies químicas em formulações farmacêuticas (JUNIOR *et al.*, 2017).

O método se baseia na variação da condutividade da amostra pela adição de solução de AgNO_3 , em volumes definidos, com conseqüente formação de um sólido branco insolúvel, o cloreto de prata- AgCl . Até que o ponto final seja atingido, observa-se uma diminuição da condutividade pela substituição dos íons Cl^- pelos íons NO_3^- em solução, cuja condutividade ($71,5 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) é menor quando comparada àquela do cloreto ($76,3 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$). Após o ponto final, a condutividade aumenta devido ao excesso dos íons Ag^+ em solução ($61,9 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$). Considerando essas duas condições, o ponto final da titulação pode ser determinado pela interseção dessas retas extrapoladas.

Após algumas experimentações, foi definida a concentração de $0,05 \text{ mol/L}$ para a solução titulante de AgNO_3 . Foram preparados 100 mL de solução, a partir da dissolução de massa apropriada de AgNO_3 em água deionizada. Em seguida a solução foi padronizada utilizando solução de NaCl $3,5 \text{ g/L}$ como padrão primário, cuja curva de titulação está mostrada na Figura 15. A concentração obtida para a solução de AgNO_3 padronizada foi de $0,048 \pm 0,001 \text{ mol/L}$ ($n=3$).

O valor da condutância obtida experimentalmente foi corrigido em função do volume de titulante adicionado, considerando a equação $\text{Condut}_{cor} = \text{Cond}_{exp} \times \left(\frac{V_i + V_{ad}}{V_i} \right)$, em que Condut_{cor} e Condut_{exp} são as condutâncias corrigida e experimental e V_i e V_{ad} são os volumes inicial e adicionado, respectivamente.

Figura 15 - Titulação condutométrica, em triplicata, de 1,00 mL de solução de NaCl 0,1 mol/L acrescido de 40 mL de água deionizada, utilizando a solução padronizada de AgNO₃ 0,048 mol/L



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

A fim de avaliar o parâmetro de precisão do método para a determinação de cloreto em água proveniente de viveiro de criação de camarão, uma amostra mistura foi preparada pela mistura de 5 mL das amostras AMR1, AMR2 e AMR3. A partir daí, foram preparadas seis amostras contendo uma alíquota de 1,00 mL da amostra mistura acrescido de 40,0 mL de água deionizada. As seis réplicas foram então tituladas com a solução padronizada de AgNO₃ 0,048 mol/L. Obteve-se um coeficiente de variação de 1 %, portanto, indicando a boa precisão do método.

A exatidão foi avaliada por meio de ensaios de adição e recuperação, pela adição de dois valores diferentes de massa ao titulado (1,00 mL da amostra mistura + 40,0 mL de água deionizada). Os resultados são mostrados na Tabela 21. Os valores de recuperação obtidos ($90,0 \pm 0,2$ %) e ($99,6 \pm 0,2$ %), foram considerados satisfatórios.

Tabela 21 - Concentração determinada de cloreto e valores de recuperação obtidos, a partir da curva de titulação condutométrica de 1,00 mL da amostra mistura acrescido de 40,0 mL de água deionizada

Massa de NaCl (mg) ¹		Recuperação ² (%)
Determinada	Adicionada	
3,70 ± 0,2	1,07	90,0 ± 0,2
5,76 ± 0,2	3,03	99,6 ± 0,2

¹Expresso como Média ± Intervalo de Confiança = $\frac{t \times S}{\sqrt{n}}$, S é o desvio-padrão, n é o número de replicatas e t é o parâmetro de Student ($\alpha = 0,05$; n=3);

²Recuperação = $[(C_{A+P} - C_A) / C_P] \times 100$;

Fonte: elaborada pelo autor (2021).

O método foi aplicado às amostras provenientes dos viveiros de criação de camarão, AMR1, AMR2 e AMR3. Os resultados são mostrados na Tabela 22, bem como os teores de cloreto nas amostras AMR2 e AMR3, obtidos por laboratório independente contratado pelo colaborador. A Figura 16 mostra a curva condutométrica obtida para a amostra AMR2, que é similar àquelas obtidas para as outras amostras.

Tabela 22 – Concentrações determinadas de Cl⁻ (em mg/L) nas amostras de água provenientes de viveiros de criação de camarão, por titulação condutométrica

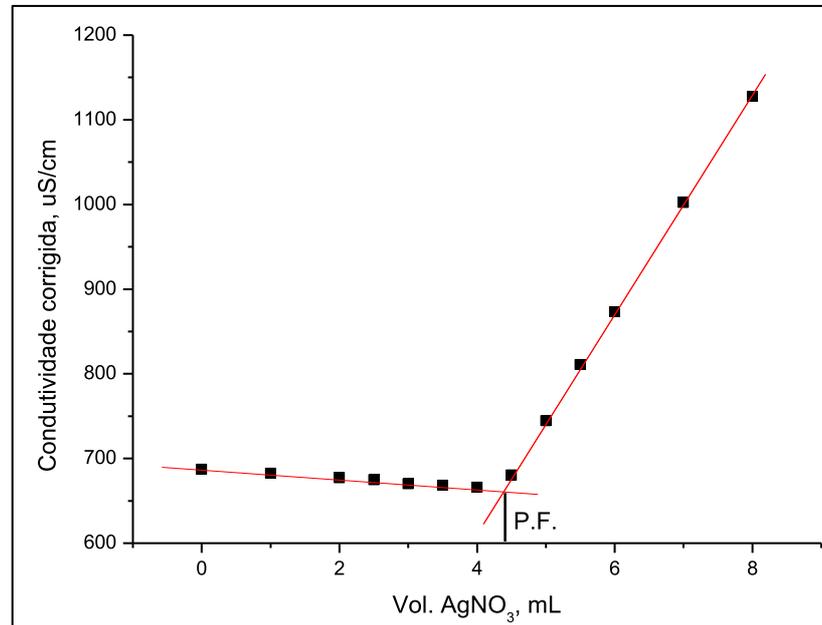
	Código da amostra	Concentração de Cl ⁻ (mg/L) ¹
Resultados lab. Baccan	AMR1	9318 ± 294
	AMR2	7464 ± 99
	AMR3	6038 ± 305
Resultados lab. Independente²	AMR2	8173 ± 409
	AMR3	7430 ± 372

¹Expresso como Média ± Intervalo de Confiança = $\frac{t \times S}{\sqrt{n}}$, S é o desvio-padrão, n é o número de replicatas e t é o parâmetro de Student ($\alpha = 0,05$; n=3);

²Teores obtidos a partir das análises das amostras de água de carcinicultura por laboratório independente contratado pelo colaborador;

Fonte: elaborada pelo autor (2021).

Figura 16 - Curva de titulação condutométrica da amostra de criação AMR2, contendo íons cloreto, utilizando solução padronizada de AgNO_3 0,048 mol/L



Fonte: elaborada pelo autor (2021).

A partir da aplicação do teste t de *student* para médias, comparou-se as concentrações de cloreto obtidas nas amostras de carcinicultura pelo método de eletroforese capilar de zona com detector UV e condutométrico. Os resultados resumidos na Tabela 23 ($t_{\text{tabelado}} > t_{\text{calculado}}$), indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados, a um nível de significância de 95 %, o que confirma a confiabilidade dos métodos desenvolvidos.

Não foi possível aplicar o teste estatístico nos resultados obtidos pelo laboratório contratado pelo colaborador, que utilizou o método argentométrico para as análises, porque não houve acesso aos dados brutos, apenas aos valores médios.

Tabela 23 - Aplicação do teste t-student para a comparação das concentrações médias de Cl^- obtidas por eletroforese capilar e condutometria, a um nível de significância de 95 %

Amostra	Concentração média determinada Cl^- (mgL^{-1}) ¹			t _{calculado}
	Eletroforese capilar	Condutometria	Método Argentimétrico ²	
AMR1	9486 ± 1716	9318 ± 294	-	2,9
AMR2	8189 ± 255	7464 ± 99	8173 ± 409	
AMR3	5134 ± 75	6038 ± 305	7430 ± 372	

¹Concentração determinada = média ± intervalo de confiança = $\frac{t \cdot x \cdot S}{n}$, em que s é o desvio-padrão e n é o número de replicatas e t é o parâmetro de Student ($\alpha = 0,05; n = 3$); ; t_{tabelado} = 4,3;

²Resultados obtidos a partir do laboratório independente. Método de referência SMWW 22^a Ed. 2012 - 4500 Cl B.

Fonte: elaborada pelo autor (2021).

6 CONCLUSÃO

Foi possível desenvolver e validar métodos analíticos para a quantificação dos cátions Na^+ , K^+ e Mg^{2+} e dos ânions Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- e NO_2^- em amostras de água provenientes de diferentes viveiros de criação de camarão, empregando as técnicas de espectrometria de emissão e absorção atômicas com chama e eletroforese capilar de zona com detecção UV. Foram avaliados alguns parâmetros de analíticos dos métodos otimizados, sendo eles: linearidade, precisão, limites de detecção e quantificação, seletividade e exatidão. Os resultados indicaram boas exatidão e precisão para os métodos, bem como adequada seletividade.

O método desenvolvido usando a técnica de eletroforese capilar tem como vantagem a determinação simultânea de 5 ânions em concentrações diversas e na presença de uma matriz com alta força iônica, contornando a mobilidade próxima de alguns ânions como nitrato e sulfato, sem a necessidade de uma mistura complexa de eletrólitos e em tempo relativamente curto de análise.

Alternativamente, a determinação do cloreto foi estudada em algumas amostras empregando a titulação condutométrica. A precisão e exatidão do método também se mostraram satisfatórias. A comparação dos teores médios de cloreto obtidos pelo método de eletroforese capilar de zona com detector UV e pelo método condutométrico, a partir da aplicação do teste t de *Student*, indicou não haver diferença estatisticamente significativa entre os dados, a um nível de significância de 95 %.

Os métodos desenvolvidos se mostraram confiáveis e podem ser aplicados em rotinas de análise, seja pela relativa simplicidade dos métodos, seja pela facilidade de operação dos equipamentos e custo moderado.

Finalmente, recomenda-se propor e validar metodologia analítica para análise de cálcio em amostras dos viveiros por F AAS e outros micronutrientes, aplicação dos métodos de análise para um estudo de caso mais abrangente, com mais amostras, para caracterizar (e avaliar) a qualidade da água dos viveiros de diferentes regiões do Brasil, por exemplo, correlacionando a qualidade dessa água com clima e/ou alimentação e/ou produtividade dos viveiros, e, para o kit de potássio, sugerem-se estudos de interferentes, testes de adição e recuperação e aplicação em mais amostras.

REFERÊNCIAS

AOAC INTERNATIONAL. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. p. 1–17, 2012.

APHA, 2012. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater, 22nd ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington, DC.

BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis**. New York: John Wiley & Sons, 244 p., 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 166, 24 de junho de 2017. Guia para Validação de Métodos Analíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 25 de julho de 2017b.

BERNHARDT, M. F. MicroServidor Web no monitoramento e controle remotos da qualidade da água na carcinicultura. 2003. 112f. Dissertação (Mestrado), Departamento de Ciência da Computação, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

BETT, C.; VINATEA, L.. Combined effect of body weight, temperature and salinity on shrimp *Litopenaeus vannamei* oxygen consumption rate. **Brazil Journal of Oceanography**, v. 57, n.4, p. 305-314, 2009.

BETTA, F. D.. **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS RÁPIDOS POR ELETROFORESE CAPILAR APLICADOS À ANÁLISE DE PRODUTOS CÁRNEOS E CERVEJA**. 2017. 177 p. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2017.

BODEN, J., BACHMANN, K.. Investigation of matrix effects in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography**, n. 734, p. 319-330, 1996.

BOYD, C., LE, P. T.. Accuracy of Custom Water Analyses Varies. **Global Aquaculture Advocate**, may/June 2013.

BOYD, C. E. Composição da água e manejo do viveiro de camarão. *In*: **Revista da ABCC**, Recife, ano 3, n.1, p. 17-19, abr. 2001.

BOYD, C.E. Water Quality Management and Aeration in Shrimp Farming. Fisheries and Allied Aquaculture Department: Series No 2. Alabama Agricultural Experiment Station, Alabama. 1989.

BOYD, C. E.. Water quality in ponds for aquaculture. Alabama: Auburn University, Alabama. Birmingham Publishing Co. p. 482, 1990.

BOYD, C. E. Revisiting ionic imbalance in low-salinity shrimp aquaculture. 2018. Disponível em: <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/revisiting-ionic-imbalance-in-low-salinity-shrimp-aquaculture/>. Acesso em: 05 jun. 2021.

BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. Pond aquaculture water quality management. Kluwer Academic Publishers, Boston, 1998.

BOYD, C. E.; THUNJAI, T. Concentrations of major ions in water of inland shrimp farms in china, Ecuador, Thailand and The United States. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 34, n. 4, p. 524-532, 2003.

BUCHBERGER, W., HADDAD, P. R. Effects of carrier electrolyte composition on separation selectivity in capillary zone electrophoresis of low molecular-mass anions. **Journal of Chromatography**, n. 608, p. 59-64, 1992.

CAMPOS, B. R. *et al.* The Effect of Ammonia, Nitrite, and Nitrate on the Oxygen Consumption of Juvenile Pink Shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (Crustacea: Decapoda). **Journal of Applied Aquaculture**, v. 26, 2014.

CARVALHO, R. A. Atualização sobre as exigências de minerais para camarões marinhos. In: **Revista da ABCC**, Recife, ano XXIII, p. 40-43, jun. 2021.

CHEN, J. C. *et al.* Survival, haemolymph osmolarity and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles acclimated to different salinities and temperature levels. *Physiol.* 1995; 110: 253-258.

CASTRO, A.A.; PAGANI, G.D. Secagem e composição química da cabeça de camarão (*Litopenaeus vannamei* Boone) a diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais** (ISSN 1517-8595), v. 6, n. 2; p. 123-129. Campina Grande, PB, Brasil, 2004.

CAVALCANTI, L. *et al.* **Iniciativas Estratégicas para Apoiar Inovações no Nordeste:** Segmento Carcinicultura. Recife, 2005.

CAVALHEIRO, T. B.; CONCEIÇÃO, M. M. DA; RIBEIRO, T. T. B. C. Crescimento do camarão *Litopenaeus vannamei* em viveiros e tanques utilizando efluente do processo de dessalinização. **Gaia Scientia**, v. 10, n. 4, 19 dez. 2016.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. S.. **Análise Instrumental**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2000.

COLOMBARA, R.; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 512 – 518, 1997.

COLOMBARA, R. **Desenvolvimento de metodologia para análise de ânions por eletroforese capilar aplicada a emissão veicular**. Tese (Doutorado em Ciências – Área: Química Analítica), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

COLOMBARA, R.; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 512 – 518, 1997.

COZER, N. INTERIORIZAÇÃO DA CARCINICULTURA BRASILEIRA. 2018. Disponível em: <https://gia.org.br/portal/interiorizacao-da-carcinicultura-brasileira/>. Acesso em: 11 jul. 2012.

DAVIS, D.A., BOYD, C.E., ROUSE, D.B., SAOUD, I.P.. Effects of potassium, magnesium and age on growth and survival of *Litopenaeus vannamei* post-larvae reared in inland low salinity well waters in West Alabama. **J. World Aquac. Soc.**, v. 36, p. 416–419, 2005.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2005.tb00346.x>.

DING, W., THORNTON, M. J., FRIZT, J.S. Capillary electrophoresis of anions at high salt concentrations. **Electrophoresis**, n. 19, p. 2133-2139, 1998.

EURACHEM Guide: **The Fitness for Purpose of Analytical Methods** – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Magnusson, B. and U. Örnemark (Ed.), 2014.

EMERENCIANO, M.; GAXIOLA, G.; CUZON, G. Biofloc technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. *In*: **Biomass now-cultivation and utilization**. 2013.

FARIA, A. F.; DE SOUZA, M. V. N.; OLIVEIRA, M. A. L. Validation of a Capillary Electrophoresis Method for the Determination of Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin and Ofloxacin in Pharmaceutical Formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 389 – 396, 2008.

FERNANDES, K. G. *et al.*. Padronização Interna em Espectrometria de Absorção Atômica. **Quim. Nova**, Vol. 26, No. 2, 249-252, 2003.

FRAZIER, R. A. *et al.*. Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks. **Journal of Chromatography A**, v. 876, p. 213–220, 2000.

FREIRE, A.C.; BALDI, M. Processo inovativo e indicadores estruturais: posição dos atores e trajetória tecnológica na rede de carcinicultura potiguar. **Organizações&Sociedade**, v. 21, n. 69, p. 235-254, 2014.

HARRIS, D.C. **Quantitative Chemical Analysis**. 8th edition. New York, NY: W.H. Freeman and Co, 2010.

HUBER, L. **Validation of Analytical Methods**: Validation and Qualification in Analytical Laboratories. 2nd Edition, Informa Healthcare, New York, 125, 2007.

IBGE- Produção da Pecuária Municipal 2018. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_informativo.pdf. Acesso em: 30 abr. 2020.

INMETRO: Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos. Inmetro. Rio de Janeiro, Julho 2018.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**. Prague: IUPAC, 2014.

KUBITZA, F. O impacto da amônia, do nitrito e do nitrato sobre o desempenho e a saúde dos peixes e camarões. In: **Panorama da Aquicultura**, vol. 27, n. 164, p. 14-23, 2017.

KUBITZA, F. A interiorização do *L. vannamei* no Brasil: os desafios nos cultivos em sistemas intensivos com zero descarga de água. In: **Panorama da Aquicultura**, vol. 29, n. 175, p. 17-27, 2019.

KUHN, D. D. Evaluation of two types of bioflocs derived from biological treatment of fish effluent as feed ingredients for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 303, p. 28-33, 2010.

KRUG, F. J.; NOBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. Espectrometria de Absorção Atômica. Parte 1. Fundamentos e Atomização com chama, 2004. Disponível em: <http://www.ufjf.br/baccan/files/2011/05/AAS-geral-parte-1-revisada.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2019.

LAJUNEN, L. H. J. Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission. 1st edition. **Royal Society of Chemistry**, 1992.

LEMAIRE, P., et al. Combined effect of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and subadult *Penaeus stylirostris*. **Aquaculture**, n. 209, p. 307-317, 2002.

LIN, Y. C.; CHEN, J. C. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* Boone Juveniles at different salinity levels. **Aquaculture**, v. 224, p. 193, 2003.

LIU, H. *et al.* Effect of Various Na/K Ratios in Low-Salinity Well Water on Growth Performance and Physiological Response of Pacific White Shrimp *Litopenaeus Vannamei*. **Chinese J. Oceanol. Limnol.**, v. 32, n. 5, p. 991-999, 2014.

LYMAN, J.; FLEMING, R. Composition of seawater. **Journal of Marine Research**, n. 3, p. 134-146, 1940.

MADRID, R. M.; WURMANN, C. G. O futuro da carcinicultura marinha no Brasil. In: **Revista da ABCC**, Recife, ano XIII, n.2, p. 42-47, jun. de 2011.

MCGUFFIN, V. L.; TAVARES, M. F. M.. Computer-Assisted Optimization of Separations in Capillary Zone Electrophoresis. **Anal. Chem.**, n. 69, p. 152-164, 1997.

MIMURA, A. M. S. **Investigação de Diferentes Estratégias de Preparo de Amostras de Sedimentos de Rio para Determinação de Elementos-Traço por Espectrometria de Absorção Atômica**. 2013. 100f. Dissertação (Mestrado), Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2013.

NATORI, M. M. *et al.*. Desenvolvimento da Carcinicultura Marinha no Brasil e no Mundo: Avanços Tecnológicos e Desafios. **Informações Econômicas**, SP, v. 41, n. 2, fev. 2011.

NUNES, A. J. P. O impacto da temperatura no cultivo de camarões marinhos. In: **Revista ABCC**, ano 4, n. 01, p. 32-36, 2002.

NUNES, A. J. P. A intensificação no cultivo de camarões: uma tendência inevitável para melhorar a eficiência produtiva e econômica. In: **Panorama da Aquicultura**, v. 29, n. 175, p. 49-61, set/out 2019.

OLIVEIRA, M. A. L.; SOARES, D. C.; TOSTES, G. S.; GUIMARÃES, M. C.; VAZ, F. A. S. Optimization of an Alternative Methodology for Simultaneous Analysis of Nitrite and Nitrate in Water from Urban Street by Capillary Electrophoresis under Direct UV Detection. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 484 – 490, 2012.

PÁDUA, H. B.. Poluição da água. 2001a. Disponível em: <http://www.jundiai.com.br/abrapresq/materias.htm>. Acesso em: 30 mar. 2021.

PAN, L. Q.; LUAN, Z. H.; JIN, C. X. Effects of Na⁺/K⁺ and Mg²⁺/Ca²⁺ Ratios in Saline Groundwaters on Na⁺-K⁺-ATPase Activity, Survival and Growth of *Marsupenaeus Japonicus* Postlarvae. **Aquaculture**, 2006, 261 (4), 1396–1402. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.031>.

PLANO DE DESENVOLVIMENTO DA AQUICULTURA BRASILEIRA – 2015/2020. Ministério da Pesca e Agricultura. 2015. Disponível em: http://seafoodbrasil.com.br/wp-content/uploads/2015/09/Plano_de_Developmento_da_Aquicultura-2015-2020.pdf. Acesso em: 30 abr. 2020.

PEREZ-VELAZQUEZ, M.; ALLEN DAVIS, D.; ROY, L. A.; GONZÁLEZ-FÉLIX, M. L. Effects of water temperature and Na⁺:K⁺ ratio on physiological and production parameters of *Litopenaeus vannamei* reared in low salinity water. **Aquaculture**, 342:13-17, 2012.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268 – 277, 1996.

PIÑA-VALDEZ, P.; ARZOLA-GONZALEZ, J. F.; NIEVES-SOTO, M.; MEDINA-JASSO, M. A. Efecto combinado de temperatura y salinidad nel consumo de oxígeno em post-larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. **Bol. Inst. Pesca**, v. 41, n. 1, p.89-101, 2015.

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.

RIBEIRO, L. F. *et al.* Desafios da carcinicultura: aspectos legais, impactos ambientais e alternativas mitigadoras. **RGCI, Lisboa**, v. 14, n. 3, p. 365-383, set. 2014. <http://dx.doi.org/10.5894/rgci453>.

ROCHA, I. P. Setor Carcinícola, Aquícola e Pesqueiro: Potencialidades, Desafios e Oportunidades para uma Efetiva Contribuição com o Fortalecimento da Sódia Economia Pesqueira do Brasil. In: **Revista ABCC**, Natal, ano XX, nº 2, p. 06-10, nov. 2018.

ROCHA, I. O Papel e a Importância da Carcinicultura Marinha para a Sódia Economia, o Meio Ambiente e, a Qualidade das Águas Adjacentes às suas Explorações. In: **Revista da ABCC**, Recife, ano XXII, n.1, p. 38-43, jul. de 2020.

ROCHA, I. P., MAIA, E. P. Desenvolvimento Tecnológico e perspectivas de Crescimento da Carcinicultura Marinha Brasileira. MCR Publicações. **MCR Aquacultura**. 2003. Disponível em: http://www.mcraquacultura.com.br/publicacoes/html/pub_12.htm. Acesso em: 11 abr. 2021.

RODER, A., BACHMANN, K. B. Simultaneous determination of organic and inorganic anions in the sub- mol/l range in rainwater by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, n. 689, p. 305-311, 1995.

ROSA, J. S. *et al.* **Eletroforese capilar para iniciantes**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2018.

ROY, L. A., *et al.* Effects of varying levels of aqueous potassium and magnesium on survival, growth, and respiration of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters. **Aquaculture**, n. 262, p. 461-469, 2007.

ROY, L. A. *et al.* Shrimp culture in inland low salinity waters. **Aquaculture**, n. 2, p. 191-208, Nov. 2010. DOI:10.1111/j.1753-5131.2010.01036.x.

RAYAPROLU, P.A. *et al.* Fabrication of cost-effective and efficient paper-based device for viscosity measurement, **Analytica Chimica Acta**, 2018. doi: 10.1016/j.aca.2018.05.036.

RIBEIRO, L. F. *et al.* Desafios da carcinicultura: aspectos legais, impactos ambientais e alternativas mitigadoras. **RGCI**, Lisboa, v. 14, n. 3, p. 365-383, set. 2014. Disponível em: http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S164688722014000300002&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 29 abr. 2020. <http://dx.doi.org/10.5894/rgci453>.

SAOUD, I.P., DAVIS, D.A., ROUSE, D.B. Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. **Aquaculture**, v. 217, p. 373-383, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00418-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00418-0).

SATO, R. T. **Otimização de metodologia alternativa para determinação de ácidos graxos livres, em óleos vegetais, por eletroforese capilar**. 2014. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/4316>. Acesso em: 02 ago. 2021.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, p. 591-611, 1965.

SHINTANI, H.; POLONSKY, J. Handbook of Capillary Electrophoresis Applications. BLACKIE ACADEMIC & PROFESSIONAL, 1st edition, 1997.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª Edição norte-americana, São Paulo-SP: Thomson, 2006.

SOARES, M., EVANGELISTA, D. K. R., PEREIRA, A. M. L. **Boas práticas de manejo e de biossegurança na carcinicultura para convivência com enfermidades**. Brasília, DF: Embrapa, 2021.

SOWERS, A. D, *et al.* Responses of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in water containing low concentrations of total dissolved solids. **Aquaculture Research**, v. 36, n. 8, p. 819-823, 2005.

SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Conceitos Básicos em Eletroforese Capilar. **Scientia Chromatographica**. v. 4, n. 4, p. 287 – 297. 2012.

SUGUNA, T. Application of Minerals in Low Saline Water Culture Systems of *L. vannamei*. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.** 9(09): 516-521, 2020. doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.909.065>.

TAHIM, E. F. *et al.* Trajetória Tecnológica e Sustentabilidade Ambiental na Cadeia de Produção da Carcinicultura no Brasil. **RESR**, Piracicaba-SP, Vol. 57, Nº 01, p. 93-108, Jan./Mar. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1234-56781806-94790570106>.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 493 – 511, 1996.

TAVARES, M. F. M.; MCGUFFIN, V. L.; **J. Chromatogr.**, v. 686, n. 129, 1994.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493 – 511, 1997.

TSENG, I. T.; JEN, J. C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. **Fish & Shellfish Immunology**, n. 17, p. 325-333, 2004.

THOMPSON, M.; ELLISON STEPHEN, L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

VALENÇA, A. R.; MENDES, G. N. Importância da Composição Iônica da Água Oligohalina e “Doce” no Cultivo de *Litopenaeus vannamei*. 2014. In: **Panorama da Aquicultura**, v. 14, n. 86, p. 22-29, 2004.

VALENZUELA-MADRIGAL, I. S, *et al.* Effects of ionic composition on growth and survival of white shrimp *Litopenaeus vannamei* culture at low-salinity well water. **Revista de Biología**

Marina y Oceanografía, vol. 52, n.1, p. 103-112, abril 2017. DOI 10.4067/S0718-19572017000100008.

VAN WYK, P., SCARPA, J. Water quality and management. p.128-138, 1999. In: **Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems**. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, FL, USA.

VAZ, F. A. S., MARTA DE OLIVEIRA, C. L., LEAL DE OLIVEIRA. FUNDAMENTOS DE ELETROFORESE CAPILAR: UMA ABORDAGEM POR ANIMAÇÕES. **Quim. Nova**, Vol. 38, No. 5, 732-737, 2015.

VINATEA, L., MUEDAS, W., ARANTES, R. The impact of oxygen consumption by the shrimp *Litopenaeus vannamei* according to body weight, temperature, salinity and stocking density on pond aeration: a simulation. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 33, n. 2, p. 125-132, 2011.

VOGEL, A. **Química Analítica Qualitativa**. 5. ed. Editora Mestre Jou: São Paulo, 1981.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic absorption spectroscopy**. Wiley-VCH. 3rd Completely Revised Edition, 1999.

WHITTEN, K. W.; DAVIS, R. E.; PECK, M. L.; **General Chemistry with Qualitative Analysis**. 5. ed. Saunders: New York, 1996.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 624-632, 1999.

WHYBAN, *et al.* Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the pacific white shrimp (*Penaeus Vannamei*). **Aquaculture**, v. 138, p.267-279, 1995.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Cálculo das viscosidades dos BGEs usados no planejamento de misturas

Para o cálculo da viscosidade das soluções de BGE utilizadas no planejamento de misturas, foi utilizado um viscosímetro de Ostwald (RAYAPROLU, 2018), mantido em um banho de água à temperatura constante de 22,5 °C. Esse viscosímetro apresenta um tubo capilar de comprimento e raio conhecidos. Nele, um líquido escoar de um reservatório superior de volume conhecido até um reservatório inferior, sob a influência da gravidade. O tempo que o líquido necessita para passar entre duas marcas estabelecidas é o tempo de escoamento.

A viscosidade dos BGEs foi determinada em relação à água, utilizada como substância de referência. Para isso, mediu-se o tempo de escoamento de volumes iguais da água (duplicata autêntica) e dos BGEs (triplicata autêntica) de forma randômica. A viscosidade foi calculada de acordo com a equação $\eta_{\text{BGE}} = \frac{\eta_{\text{H}_2\text{O}} \cdot t_{\text{BGE}}}{t_{\text{H}_2\text{O}}}$, em que: η_{BGE} é a viscosidade calculada do BGE, $\eta_{\text{H}_2\text{O}}$ é a viscosidade da água, t_{BGE} é o tempo de escoamento do BGE e $t_{\text{H}_2\text{O}}$ é o tempo de escoamento da água.

A viscosidade da água ($\eta_{\text{H}_2\text{O}}$) a 22,5°C foi determinada de acordo com a equação $\eta_{\text{H}_2\text{O}} = (1,002 \times 10^{-3})(10^B)$, sendo $B = \frac{1,3272(20-T) - 0,001053(T-20)^2}{T+105}$ e T a temperatura do experimento (Crittenden et al., 2012).

Os tempos de escoamento médios e os valores de viscosidade encontrados para a água e para os BGEs são mostrados na Tabela 24.

Tabela 24 - Tempos de escoamento médio medidos e viscosidade calculada para os BGEs utilizados no planejamento de mistura.

MISTURA	Tempo de escoamento médio (s)¹	η^2 (kg m⁻¹ s⁻¹)
Substância de Referência: água	243,22	0,000944
CrO₄²⁻ (60 mM), CTAB (2,5mM), ACN (3,5 %)	225,01	0,000873
CrO₄²⁻ (60 mM), CTAB (2,5 mM), MeOH (3,5 %)	244,88	0,000950
CrO₄²⁻ (60 mM), CTAB (2,5mM), ACN (1,75 %), MeOH (1,75 %)	230,39	0,000894
CrO₄²⁻ (60 mM), CTAB (2,5 mM), ACN (0,875 %), MeOH (2,625%)	232,14	0,000901
CrO₄²⁻ (60 mM), CTAB (2,5 mM), ACN (2,625%), MeOH (0,875%)	227,06	0,000881
CrO₄²⁻ (60 mM), CTAB (2,5 mM)	215,00	0,000834

¹Medida realizada em duplicata para a água e em triplicata para os BGEs.
Fonte: elaborado pelo autor (2022).

APÊNDICE B – Procedimento utilizado para a validação e quantificação do método usado para a determinação dos analitos Cl⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻, NO₃⁻ e NO₂⁻ em amostras de água provenientes de viveiros de criação de camarão

- Nível baixo (100 mg/L - NO₃⁻ e NO₂ e 250 mg/L - Cl⁻, SO₄²⁻ e HCO₃⁻)

Amostras: 200 µL de amostra + 200 µL de água deionizada;

Padrões: 40 µL solução padrão de nitrato e nitrito 1000 mgL⁻¹ cada + 274µL água deionizada + 86 µL solução BGE 60 mM;

Amostras + Padrões (spike): 200 µL amostra + 74 µL água deionizada + 40 µL solução padrão de nitrato e nitrito 1000 mg/L cada + 86 µL solução BGE 60 mM;

Padrões: 29 µL solução aquosa de cloreto, sulfato e bicarbonato 3500 mg/L cada + 285 µL água deionizada + 86 µL solução BGE 60 mM;

Amostras + Padrões (spike): 200 µL amostra + 85 µL água deionizada + 29 µL solução aquosa de cloreto, sulfato e bicarbonato 3500 mg/L cada + 86 µL solução BGE 60 mM.

- Nível alto (250 mg/L - NO₃⁻ e NO₂ e 750 mg/L - Cl⁻, SO₄²⁻ e HCO₃⁻)

Amostras: 200 µL de amostra + 200 µL de água deionizada;

Padrões: 100 µL solução padrão de nitrato e nitrito 1000 mgL⁻¹ cada + 214 µL água deionizada + 86 µL solução BGE 60 mM;

Amostras + Padrões (spike): 200 µL amostra + 14 µL água deionizada + 100 µL solução padrão de nitrato e nitrito 1000 mgL⁻¹ cada + 86 µL solução BGE 60 mM;

Padrões: 86µL solução aquosa de cloreto, sulfato e bicarbonato 3500 mg/L cada + 228 µL água deionizada + 86 µL solução BGE 60 mM;

Amostras + Padrões (spike): 200 µL amostra + 28µL água deionizada + 86µL solução aquosa de cloreto, sulfato e bicarbonato 3500 mg/L cada + 86 µL solução BGE 60 mM.